

人脐带间充质干细胞生物特性比较：胰酶冷消化和组织块法体外培养

张 飞, 王一雄, 武忠炎, 李贵才, 曹 鹏, 王 武(新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001)

文章亮点:

1 实验创新性地采用胰酶冷消化法培养人脐带间充质干细胞, 从细胞形态、生长曲线、细胞表面标记物及诱导分化能力 4 个方面与传统组织块法比较, 为不同需求的科研工作者获得较多的脐带间充质干细胞、更完整的细胞结构及其功能以满足实验要求提供一些资料。
2 结果显示组织块法培养原代细胞形态优于胰酶冷消化法, 第 3 代细胞增殖速率显著快于胰酶冷消化法, 两种方法获得的脐带间充质干细胞具有相同的表面标志, 经诱导后均表达神经干细胞特征性标志物 nestin, 说明组织块法更适合用于培养脐带间充质干细胞。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 胰酶冷消化法; 组织块法; 脐带间充质干细胞; 组织工程; 生物学特性

主题词:

脐带; 间质干细胞; 细胞培养技术; 细胞, 培养的

基金资助:

新疆医科大学科研创新基金项目(XJC2012117)

摘要

背景: 以往采用胰酶冷消化法培养脐带间充质干细胞的研究较少。

目的: 比较两种方法体外培养人脐带间充质干细胞的生物学特性。

方法: 采用胰酶冷消化法和组织块法从人脐带中分离、纯化和传代培养人脐带间充质干细胞, 记录首次出现贴壁细胞时间及原代培养周期, 倒置相差显微镜观察脐带间充质干细胞的形态及生长情况, 制作第 3 代脐带间充质干细胞生长曲线, 流式细胞仪分析检测第 3 代脐带间充质干细胞表面标志的表达, 第 3 代脐带间充质干细胞加入成神经诱导培养基诱导分化第 3 天行荧光免疫化学染色检测 Nestin 的表达。

结果与结论: 使用上述两种方法均可获得脐带间充质干细胞, 胰酶冷消化法首次出现贴壁细胞时间早于组织块法($P < 0.05$); 原代培养周期差异无显著性意义($P > 0.05$)。倒置相差显微镜下细胞均为贴壁生长, 形态为成纤维细胞样, 但胰酶冷消化法培养的少数原代细胞呈多角形, 不规则, 细胞的体积较组织块法大。组织块法获得第 3 代细胞的增殖速率显著快于胰酶冷消化法, 在进入对数生长期后各个时间点细胞数量差异有显著性意义($P < 0.05$)。两种细胞具有均一的细胞表型, 均表达 CD29, CD105, 不表达 CD34, CD45。两种方法培养出来的第 3 代脐带间充质干细胞经诱导后, 免疫荧光均显示神经干细胞特征性标志物 nestin 阳性表达。结果表明胰酶冷消化法与组织块法均能培养出脐带间充质干细胞, 但组织块法更适合于此类细胞的培养, 对细胞的伤害更低。

张飞, 王一雄, 武忠炎, 李贵才, 曹鹏, 王武. 人脐带间充质干细胞生物特性比较: 胰酶冷消化和组织块法体外培养[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6614-6619.

Biological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells: cold trypsin digestion versus tissue explant method *in vitro*

Zhang Fei, Wang Yi-xiong, Wu Zhong-yan, Li Gui-cai, Cao Peng, Wang Wu (Department of Orthopedic Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Cold trypsin digestion is rarely reported to culture umbilical cord mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To compare the biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells cultured by cold trypsin digestion and tissue explant method.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated, purified and passaged using cold trypsin digestion and tissue explant method, and then the first adhesion time and cell cycle were recorded. Morphology of umbilical cord mesenchymal stem cells was observed under inverted phase contrast microscope to draw growth curve of cells at passage 3. Flow cytometry was used to detect the surface markers of passage 3 umbilical cord mesenchymal stem cells, and Nestin expression was detected in passage 3 cells after 3 days culture in neural induction medium by fluorescence immunochemistry staining.

RESULTS AND CONCLUSION: These two methods were both successful to harvest umbilical cord mesenchymal stem cells, but the first adhesion time was earlier in cells cultured by cold trypsin digestion than tissue explant method ($P < 0.05$), and there was no difference in primary cell cycle ($P > 0.05$). Under the inverted

张飞, 男, 1988 年生, 陕西省延安市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事创伤骨科的研究。

通讯作者: 武忠炎, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.41.010
<http://www.crter.org>

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)41-06614-06
稿件接受: 2014-09-20

Zhang Fei, Studying for master's degree, Department of Orthopedic Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Wu Zhong-yan, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedic Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-09-20

microscope, cells grew adherently and presented fibroblast-like shape. However, the minority of primary cells under induction of cold trypsin digestion was polygonal, irregular, and had larger cell volume than those cultured by tissue explant method. Passage 3 cells cultured by tissue explant method showed faster proliferation rate than those cultured by cold trypsin digestion, and at logarithmic growth phase, cells cultured by these two methods were significant different in cell number ($P < 0.05$). Two types of cells had a uniform cell phenotype, both of which expressed CD29, CD105, but did not express CD34, CD45. Under induction, passage 3 cells cultured by these two methods were both positive for nestin. These findings indicate that these two methods can both be used to culture umbilical cord mesenchymal stem cells, but the tissue explant method is more suitable for culture of umbilical cord mesenchymal stem cells and exhibits less damage to cells.

Subject headings: umbilical cord; mesenchymal stem cells; cell culture techniques; cells, cultured

Funding: Medical Research and Innovation Fund of Xinjiang Medical University, No. XJC2012117

Zhang F, Wang YX, Wu ZY, Li GC, Cao P, Wang W. Biological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells: cold trypsin digestion versus tissue explant method in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(41): 6614-6619.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一类起源于中胚层的非造血干细胞, 具有多向分化的潜能, 能够为细胞治疗提供理想的种子细胞, 同时也能作为基因治疗的载体细胞, 目前已从骨髓、胎盘、脂肪、脐血、脐带、滑膜等组织器官中分离出间充质干细胞。体外培养的间充质干细胞形态均一, 平行生长或漩涡状生长, 能够表达多种表面抗原, 如高表达间质细胞标志(CD44、CD90、CD105), 不表达造血干细胞标志(CD34、CD45、CD14)、内皮细胞标志(CD31、CD33)及人白细胞抗原(HLA-DR、-DP、-DQ)等^[1]。在特定条件下间充质干细胞可以分化为成骨细胞、神经细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞及肝细胞等^[2-5]。

相比其他间充质干细胞, 本实验选用的人脐带间充质干细胞具有种子细胞的很多优良特性, 如增殖活性高、免疫原性低、无致瘤性等, 且来源充足, 无伦理问题^[6-15]。现阶段用于分离间充质干细胞的方法主要有以下几种: 贴壁组织块法、流式细胞仪分选法、胶原酶消化法及其改进方法等^[16-21]。每种方法各有利弊, 贴壁组织块法原代培养时间较长, 液体的浮力使组织块漂起, 使其丧失了长出细胞的能力, 减少了细胞数量, 但细胞活性保持良好。流式细胞仪分选法虽然所获得的细胞纯度较高, 但实验成本较大, 亦难获得足够的细胞数量。普通胶原酶消化法费用较高, 虽然可在短时间内获得细胞, 但常温中消化时间长可能损伤细胞, 致使细胞不易贴壁, 不易传代; 消化时间短液体较黏稠, 难以离心获得足够量细胞。

胰酶冷消化法曾用于培养乳鼠心肌细胞, 与温胰蛋白酶消化法比较, 胰酶冷消化法所需实验条件简单, 因为不需搅拌和多次酶消化、清洗的烦琐过程, 胰蛋白酶用量少, 节约大量的人力物力, 而且冷消化相对细胞活性损伤较轻^[22]。本实验首次采取胰酶冷消化法分离脐带间充质干细胞^[23], 从细胞形态、生长曲线、细胞表面标记物及诱导分化能力4个方面与传统组织块法比较, 为不同需求的科研工作者获得较多的脐带间充质干细胞、更完整的细胞结构及其功能以满足实验要求并能达到更节约人力、物力提供一些资料。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察细胞学实验。

时间及地点: 实验于2013年6月至2014年3月在新疆医科大学干细胞研究室完成。

材料: 足月健康新生儿脐带组织取自新疆医科大学第五附属医院妇产科, 产妇及家属均知情同意, 采集后装于盛有无菌生理盐水的50 mL离心管中, 4 h内处理。

两种方法培养人脐带间充质干细胞实验用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
低糖DMEM培养基	Gibco公司
胎牛血清、0.25%胰蛋白酶溶液	Hyclone公司
兔抗人Nestin单克隆抗体、山羊抗兔IG-FITC(二抗)	博奥森
FITC标记的抗人CD29、CD34、CD45及CD105	BD公司
CO ₂ 培养箱(HF420)	力新仪器上海有限公司
流式细胞仪	美国Beckman公司
倒置荧光显微镜	德国Leica公司
低温离心机	德国Thermo公司

实验方法:

脐带间充质干细胞的原代培养:

胰酶冷消化法: 取足月健康新生儿脐带组织, 剔除组织中的血管, 用PBS反复冲洗去除血迹, 剪碎至大小约1 mm³, 放入50 mL离心管中, 加入PBS离心(1 200 r/min) 5 min, 洗涤3遍, 之后取离心后的组织块放入培养皿中并加入稀释后的胰酶(PBS与胰酶同比例混合)10 mL, 用封口膜封死培养皿边缘, 放入4 °C冰箱过夜。第2天取出培养皿中的组织于50 mL离心管中, 放入37 °C水浴箱中15 min, 之后加入L-DMEM用巴氏管充分吹打, 静置1 min待组织块沉底后吸取上清液于15 mL离心管中。上述步骤重复操作2遍, 尽量收集上清液, 加入15 mL离心管离心(1 200 r/min) 10 min, 去除上清液加入含体积分数为20%胎牛血清培养液。混匀后加入培养皿中, 放入37 °C、体积分数为5%CO₂及饱和湿度条件下培养, 每3 d换液1次。培养14 d左右,

当细胞达到大部分融合时,用胰酶消化传代,并将组织转移到一个新的培养皿中,按上述方法继续培养。

组织块培养法:取足月妊娠分娩胎儿脐带,用PBS洗涤数遍,去除残留血迹。把脐带剪切成4.0 cm左右的片段并剔除血管(1条脐静脉,2条脐动脉),之后将其剪成大小约1 mm³的组织块,然后平摊置于55 mm培养皿中并加入2 mL胎牛血清加以固定。2 h后,按比例加入含有青霉素、谷氨酰胺、维生素C及碳酸氢钠的L-DMEM培养基约8 mL,放置在37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。每隔3 d半换液1次。观察贴壁组织周围的细胞生长情况,当细胞达到80%–90%融合度时,用胰酶消化传代,并将组织转移到一个新的培养皿中,按上述方法继续培养。

脐带间充质干细胞的生物学特性:

细胞形态:两种方法培养的原代细胞通过普通倒置显微镜观察其形态变化。

生长曲线:取上述两组第2代脐带间充质干细胞以每孔 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的浓度接种于24孔板中。采用胰酶消化锥虫蓝染色法,每日取4孔计数细胞,绘制细胞生长曲线,细胞达到生长抑制时停止实验。

流式细胞仪检测细胞表面标记特征:胰蛋白酶消化第3代脐带间充质干细胞,1 200 r/min离心5 min,细胞重悬。调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$,与抗CD29, CD34, CD45, CD105单克隆抗体室温反应30 min, PBS洗涤2次后,与FITC或PE标记的二抗避光作用30 min,将洗涤后的细胞重悬于PBS中,待测。

诱导脐带间充质干细胞分化为神经干细胞:取传至第3代的脐带间充质干细胞,置于诱导培养基(含2%B27、20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子、20 μg/L表皮生长因子的DMEM/F12培养基)中培养,倒置显微镜下观察细胞的形态变化。取诱导第3天的脐带间充质干细胞,行荧光免疫化学检测,细胞爬片在室温下用40 g/L多聚甲醛固定,经PBS预清洗,血清封闭,滴加兔抗人神经巢蛋白抗体(1:400),置湿盒中4 °C下过夜。加入Alexa Fluor 594标记的羊抗兔IgG抗体(1:200),37 °C下孵育0.5 h。以PBS作为阴性对照。

主要观察指标:①两种方法培养的原代脐带间充质干细胞最早出现时间及培养周期。②两种方法培养的脐带间充质干细胞的形态。③两种方法培养的脐带间充质干细胞的生长曲线。④两种方法培养的脐带间充质干细胞的细胞表面标记特征。⑤两种方法培养的脐带间充质干细胞向神经干细胞多向分化的潜能。

统计学分析:用SPSS 17.0统计学软件处理,做t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 两种方法培养的原代脐带间充质干细胞最早出现时间及培养周期 使用上述两种方法均可获得人脐带间充质

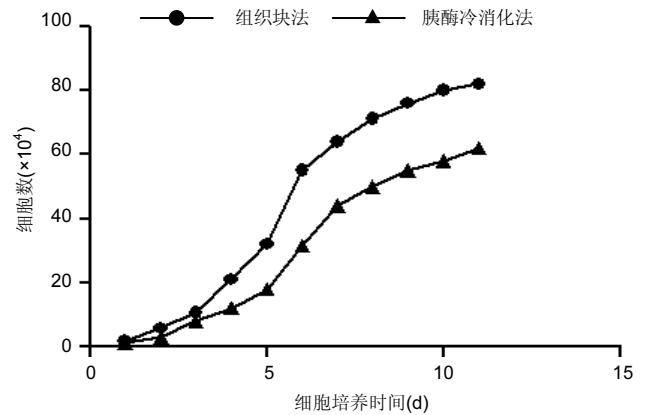


图2 两种方法培养的第3代人脐带间充质干细胞的生长曲线
Figure 2 Growth curves of passage 3 umbilical cord mesenchymal stem cells cultured by two different methods

干细胞,组织块法在种植后第5–7天才见到细胞从组织块爬出,最早观察细胞贴壁时间为 (5.80 ± 0.84) d,而胰酶冷消化法在消化种植后第2,3天就可见到细胞贴壁生长,最早观察细胞贴壁时间为 (2.60 ± 0.55) d,差异有显著性意义($P < 0.05$)。但两种方法得到的原代细胞达到90%–95%融合的时间差异无显著性意义($P > 0.05$),组织块法为 (14.4 ± 1.67) d,胰酶冷消化法为 (14.6 ± 0.90) d。

2.2 两种方法培养的脐带间充质干细胞形态观察及生长情况 胰酶冷消化法培养两三天就可见单个贴壁细胞,呈圆形或短梭形,培养10 d左右,细胞形态逐渐伸展开来,大体呈长梭形,但少数细胞边缘不光滑,为多角形,不规则,细胞的体积较大,培养2周之后,细胞已逐渐形成漩涡状的集落,且逐渐变大,细胞增多,即可传代。传代后的细胞生长速度明显增快,数量增多,四五天即可传代1次。组织块法培养5 d左右亦可观察到个别细胞沿组织块边缘爬出,呈短梭形、纤细;随后细胞数量增多,慢慢向外扩张,形态类似成纤维细胞,并逐渐形成漩涡状的集落,培养13–16 d,可见细胞集落逐渐变大,细胞增多,即可传代,见图1。

2.3 第3代人脐带间充质干细胞的生长曲线 两组细胞的增殖曲线近似“S”型,细胞种植后第一二天处于潜伏期,从第3天起细胞开始进入对数增殖期,于第8天左右进入平台期;组织块法获得第3代细胞的增殖速率显著快于胰酶冷消化法,在进入对数生长期后的各个时间点细胞数量差异有显著性意义($P < 0.05$),见图2。

2.4 两种方法培养的脐带间充质干细胞表面抗原检测 为了明确脐带来源贴壁生长细胞是否与骨髓间充质干细胞具有相同的抗原标志表达,取上述第3代脐带间充质干细胞样细胞经流式细胞仪检测,结果显示,上述细胞不表达CD34, CD45,而表达CD29、CD105(图3, 4),即表达了骨髓间充质干细胞的常见抗原标志。

2.5 两种方法培养的脐带间充质干细胞向神经干细胞多向分化的潜能 两种方法培养出来的第3代人脐带间充质干细胞加入诱导液后第2天均可看到部分细胞聚集成团漂浮于诱

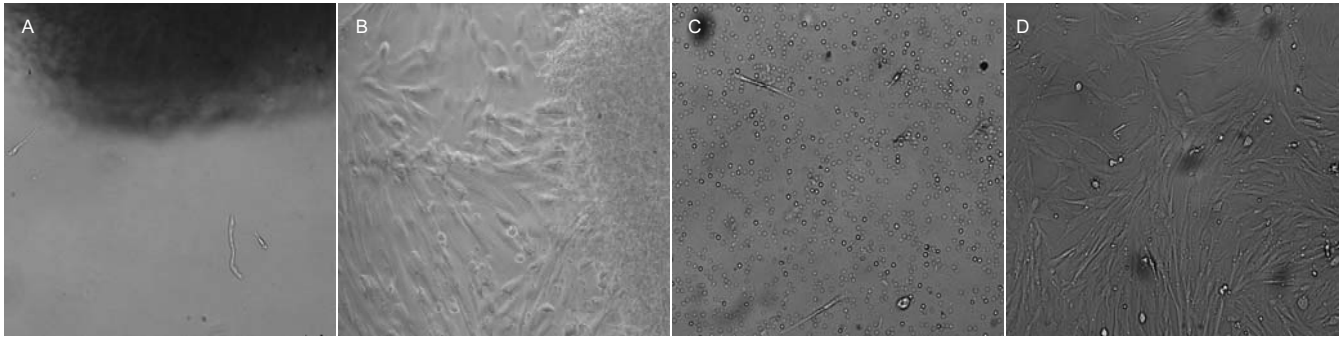


图 1 不同分离方法获得的原代细胞形态

Figure 1 Morphology of primary cells isolated by different methods

图注: A 为组织块培养法培养 7 d 时原代细胞从组织块中迁移出来($\times 100$); B 为组织块培养法培养 15 d 时组织块周围形成 75%–80% 的融合, 细胞为长梭形, 体积较小($\times 100$); C 为胰酶冷消化法培养 3 d 时首次观察到贴壁细胞($\times 100$); D 为胰酶冷消化法培养 14 d 时大部分细胞形态为长梭形, 少数为多角形, 不规则, 细胞的体积较大($\times 100$)。

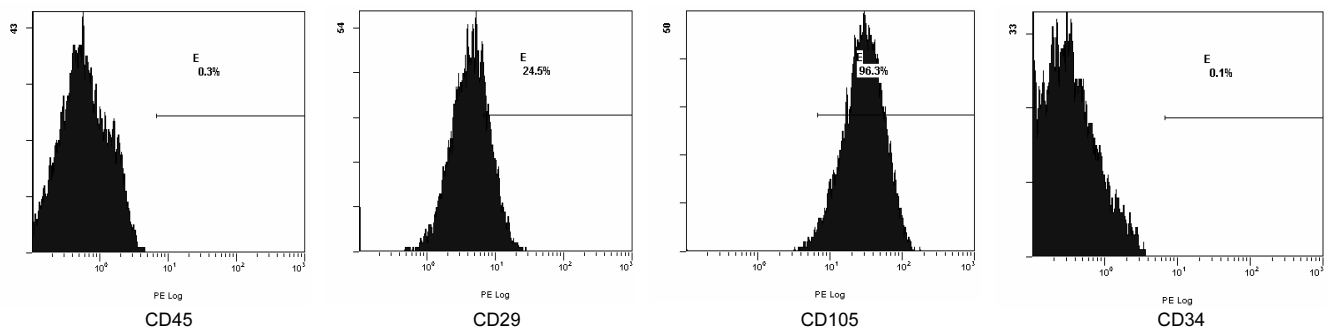


图 3 流式细胞仪鉴定组织块法获得的第 3 代人脐带间充质干细胞的表面标志

Figure 3 Flow cytometry identification of surface markers of passage 3 umbilical cord mesenchymal stem cells isolated by tissue explant method

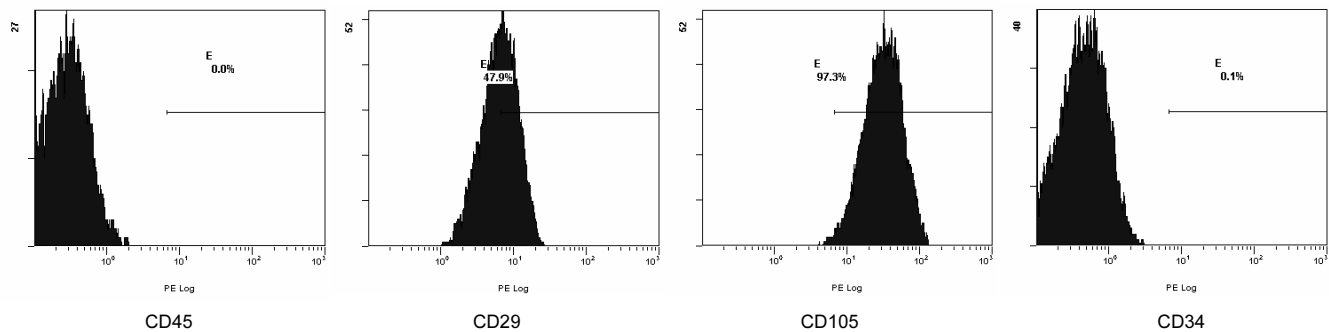


图 4 流式细胞仪鉴定胰酶冷消化法获得的第 3 代人脐带间充质干细胞的表面标志

Figure 4 Flow cytometry identification of surface markers of passage 3 umbilical cord mesenchymal stem cells isolated by cold trypsin digestion

导液当中, 呈椭圆形或圆形, 随着诱导时间增长, 漂浮的神经球样细胞越来越多, 且越来越大, 免疫荧光显示神经球样细胞表达神经干细胞特征性标志物nestin阳性, 见图5。

3 讨论 Discussion

脐带是联系胎儿与胎盘的一种管状结构, 在胎儿正常分娩时被当作废弃物丢弃。故利用脐带来分离扩增间充质干细胞属于变废为宝, 几乎不涉及伦理道德问题, 易于收集, 不易污染, 可以在短时间内获得足够数量的细胞^[24-28]; 其次, 脐带间充质干细胞比较原始, 分化、增殖分化能力强, 生物活性稳定, 而骨髓间充质干细胞在骨髓内含量较少且增殖能力随着年龄的增长而显著下降, 故易受到供者

年龄的限制^[29-30]。Weiss等^[31]也通过CFU-F培养法检测显示脐带中间充质干细胞含量明显多于骨髓液。因此脐带间充质干细胞以其独特的优点, 逐渐成为干细胞中最具有应用前景的种子细胞。

本实验使用上述两种方法均可获得脐带间充质干细胞, 组织块法在种植后第5–7天才见到细胞从组织块爬出, 而胰酶冷消化法在消化种植后两三天就可见到细胞贴壁生长, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。但两种方法得到的细胞达到90%–95%融合的时间差异无显著性意义($P > 0.05$), 镜下可见细胞均为贴壁生长, 呈成纤维细胞样, 但胰酶冷消化法培养的少数细胞呈多角形, 不规则, 细胞的体积较组织块法大。组织块法获得第3代细胞的增殖速率显著快于

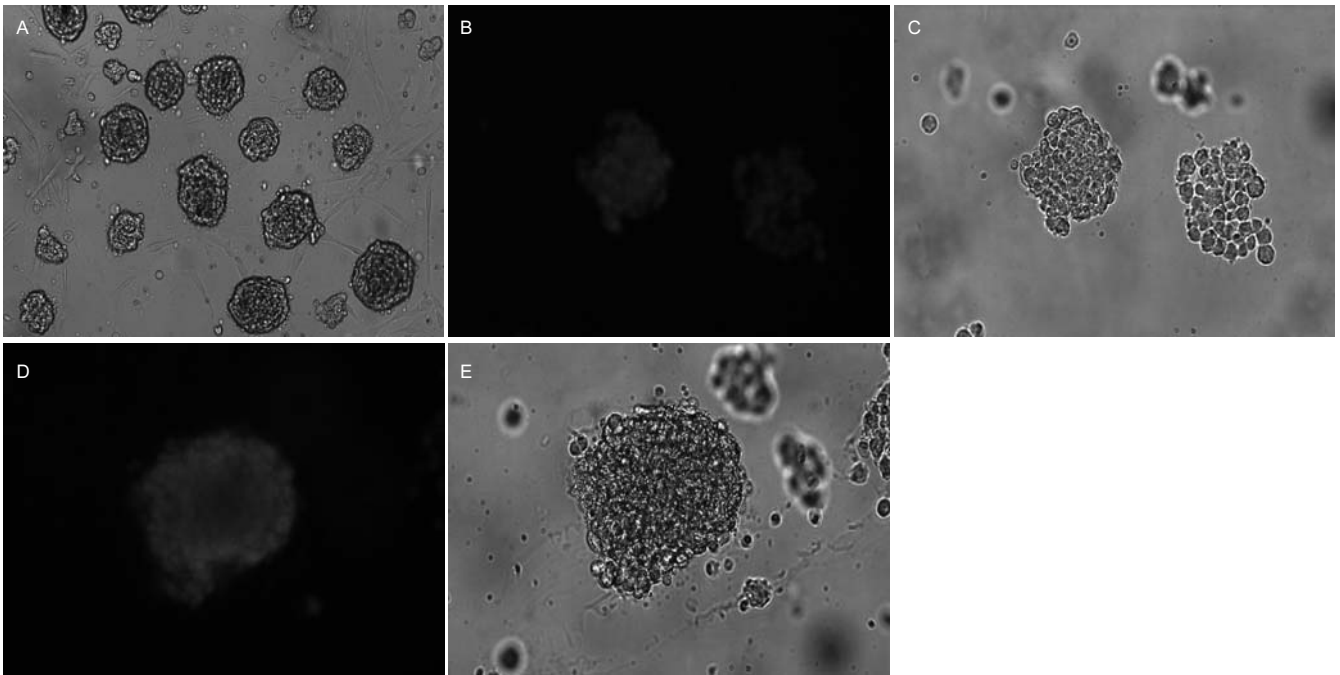


图5 两种方法获得的第3代人脐带间充质干细胞经诱导分化的形态变化

Figure 5 Morphological changes of passage 3 umbilical cord mesenchymal stem cells isolated by two methods under induction

图注: A 为组织块法培养的第3代人脐带间充质干细胞诱导分化后呈现悬浮的神经球($\times 100$); B 为组织块法培养的第3代人脐带间充质干细胞诱导2 d后免疫荧光显示 nestin 阳性($\times 200$); C 为 B 图普通镜下细胞; D 为胰酶冷消化法培养的第3代人脐带间充质干细胞诱导3 d后免疫荧光显示 nestin 阳性($\times 200$); E 为 D 图普通镜下细胞。

胰酶冷消化法, 在进入对数生长期后的各个时间点细胞数量差异有显著性意义($P < 0.05$), 提示冷消化法对原代的脐带间充质干细胞有损害作用。两种方法获得的细胞经3代以上培养, 均呈现长梭形贴壁形态, 与骨髓间充质干细胞为金标准一样^[32], 具有与其相同的表面标志, 如表达CD29、CD105, 不表达CD34、CD45, 具有间充质干细胞的特性。脐带间充质干细胞经诱导后呈现神经球样形态, 漂浮于诱导液当中, 表达神经干细胞特异性标志——nestin蛋白^[33-36]; 进一步将这些细胞球分离成单细胞悬液, 继续传代培养, 发现单个的细胞又很快变成类似原代培养时出现的岛屿状细胞球, 充分显示了神经干细胞有别于一般神经细胞的增殖特性, 说明人脐带间充质干细胞在特定的培养液中具备形成神经干细胞的潜力和特性; 实验中所采用的培养条件可以保证神经干细胞的生成与存活环境, 有人把神经球继续诱导可以表达NSE、GFAP、NF-M、S100、Tubulin等神经元或神经胶质特异性表达标志物^[37-38], 为将来以诱导人脐带间充质干细胞成神经干细胞作为种子细胞进行体内移植治疗脊髓损伤提供了实验依据。

实验结果显示: 胰酶冷消化法与组织块法均能培养出人脐带间充质干细胞, 具有相同的表面标志及诱导成神经干细胞的能力。组织块法的优点: 简单易行, 无需放入4℃冰箱过夜, 操作时间短, 而且原代培养时间也与酶消化法无明显差异, 细胞形态保持良好的长梭形, 此法对细胞无明显损害, 细胞活性较冷消化法强。缺点: 液体的浮力使组织块漂起, 使其丧失了长出细胞的能力, 减少了细胞数量。

胰酶冷消化法通过研究仅原代细胞爬出时间较组织块法早, 其他无明显优势, 故胰酶冷消化法虽然可以同样培养出人脐带间充质干细胞, 但并没有想象中那么多优点, 相对而言操作变得烦琐且时间长, 细胞形态也受到损害。故对于培养人脐带间充质干细胞, 组织块法要优于胰酶冷消化法。

致谢: 感谢新疆医科大学第一附属医院干细胞室提供技术支持与帮助。

作者贡献: 第一作者、通讯作者进行实验设计, 第一、二作者实施, 第三、四作者评估和资料收集。第一作者成文, 通讯作者审核, 第一作者和通讯作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 足月健康新生儿脐带组织取自新疆医科大学第五附属医院妇产科, 产妇及家属均知情同意, 实验经过医院伦理委员会批准。

学术术语: 脐带间充质干细胞-是指存在于新生儿脐带组织中的一种多功能干细胞, 具有来源丰富、免疫原性低、移植后不需应用免疫抑制剂的情况下长期存活等诸多特性, 为其应用于临床开阔了更好的前景。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 马锡慧, 冯凯, 石炳毅. 人脐带间充质干细胞生物学特性及其研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(32): 6064-6067.

- [2] Zhang YN, Lie PC, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*. 2009;11(5):548-558.
- [3] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61(4):364-370.
- [4] Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, et al. Induction of dopaminergic neurons from human Wharton's jelly mesenchymal stem cell by forskolin. *J Cell Physiol*. 2014; 229(2):232-244.
- [5] Alves da Silva ML, Costa-Pinto AR, Martins A, et al. Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Oct 24. doi: 10.1002/term.1812. [Epub ahead of print].
- [6] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans*. 1991;19(1):29S.
- [7] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*. 2001;82(4): 583-590.
- [8] 庞荣清, 何洁, 李福兵, 等. 一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法[J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2011, 1(2):30-33.
- [9] 唐欣, 王岩, 易海波, 等. 人脐带间充质干细胞诱导分化为心肌细胞的特异性基因表达[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(27):4988-4991.
- [10] 王跃春, 李业霞, 段阿林, 等. 人脐带间充质干细胞的快速分离、纯化及冻存[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(8):1658-1661.
- [11] Shaer A, Azarpira N, Aghdaie MH, et al. Isolation and characterization of Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Decidua Basalis; Umbilical cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. *Pak J Med Sci*. 2014; 30(5):1022-1026.
- [12] Tsai PJ, Wang HS, Lin GJ, et al. Undifferentiated Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Transplantation Induces Insulin-Producing Cell Differentiation and Suppression of T Cell-Mediated Autoimmunity in Non-Obese Diabetic Mice. *Cell Transplant*. 2014 Jul 15. [Epub ahead of print]
- [13] Constantinescu A, Andrei E, Iordache F, et al. Recellularization potential assessment of Wharton's Jelly-derived endothelial progenitor cells using a human fetal vascular tissue model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014 Aug 15. [Epub ahead of print]
- [14] Ribeiro J, Pereira T, Amorim I, et al. Cell therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord Wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds. *Int J Med Sci*. 2014;11(10):979-987.
- [15] Alunno A, Montanucci P, Bistoni O, et al. In vitro immunomodulatory effects of microencapsulated umbilical cord Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jul 26. pii: keu292. [Epub ahead of print].
- [16] 马海英, 李丽, 马玲, 等. 组织块贴壁法提取胎盘、脐带和胎膜间充质干细胞效果观察[J]. *山东医药*, 2011, 51(15):39-41.
- [17] 蒋知新, 艾民, 张清华, 等. 体外原代培养脐带基质间充质细胞和人皮肤成纤维细胞[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(19):4193-4194.
- [18] 刘玲英, 柴家科, 段红杰, 等. 人脐带间充质干细胞不同分离方法的效果比较[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(32):2592-2596.
- [19] 侯克东, 许文静, 张莉, 等. 人脐带Wharton胶中间充质干细胞向软骨诱导的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2007, 27(12):930-935.
- [20] 郝白露, 杨瑞峰, 彭祥炽, 等. 改良的人脐带间充质干细胞培养方法[J]. *中国计划生育学杂志*, 2013, 21(1):44-49.
- [21] 庞荣清, 何洁, 李福兵, 等. 一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法[J]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2011, 1(2):30-33.
- [22] 王绮雯, 吴启端, 陈奕芝. 胰酶蛋白酶消化法和冷消化法培养乳鼠心肌细胞的比较[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(20):401-403.
- [23] 刘巨超, 周海洋, 孙慧伟, 等. 工程化肝组织肝表面片状植入新方法[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(5):880-882.
- [24] Massood E, Maryam K, Parvin S, et al. Vitrification of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cryo Letters*. 2013;34(5):471-480.
- [25] Tantrawatpan C, Manochantr S, Kheolamai P, et al. Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. *J Med Assoc Thai*. 2013;96(9):1208-1217.
- [26] Mikaeili Agah E, Parivar K, Nabiuni M, et al. Induction of human umbilical Wharton's jelly-derived stem cells toward oligodendrocyte phenotype. *J Mol Neurosci*. 2013;51(2): 328-336.
- [27] Messerli M, Wagner A, Sager R, et al. Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. *Reprod Sci*. 2013;20(12):1455-1464.
- [28] Kim MJ, Shin KS, Jeon JH, et al. Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. *Cell Tissue Res*. 2011;346(1):53-64.
- [29] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392.
- [30] De Bruyn C, Najjar M, Raicevic G, et al. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem Cells Dev*. 2011;20(3):547-557.
- [31] Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 2008;26(11):2865-2874.
- [32] Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007;25(2):319-331.
- [33] Hu Y, Liang J, Cui H, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cells differentiate into retinal progenitor cells. *Neural Regen Res*. 2013;8(19):1783-1792.
- [34] Joerger-Messerli M, Brühlmann E, Bessire A, et al. Preeclampsia enhances neuroglial marker expression in umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014:1-6.
- [35] Yan M, Sun M, Zhou Y, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS One*. 2013;8(5):e64000.
- [36] Balasubramanian S, Thej C, Venugopal P, et al. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol Int*. 2013;37(5): 507-515.
- [37] 周剑云, 孙炜, 张新, 等. 人脐带源神经干细胞的培养和分化[J]. *中国康复理论与实践*, 2012, 18(7): 615-618.
- [38] 李伟伟, 姚星宇, 杨丽敏, 等. 体外诱导人脐带间充质干细胞向神经干细胞的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(1):75-80.