

利用层粘连蛋白扩增罗曼鹤鸡骨髓间充质干细胞

李双星¹, 戚媛², 朴丰源², 李亚晨², 刘晓晖², 邵静², 李双月²(¹哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江省哈尔滨市 150001; ²大连医科大学公共卫生学院, 辽宁省大连市 116044)

文章亮点:

研究创新点在于利用层粘连蛋白构建体外培养体系, 为鸡骨髓间充质干细胞的扩增提供合适的微环境。实验证实层粘连蛋白培养体系能快速地扩增出大量增殖能力强和未分化性能良好的鸡骨髓间充质干细胞, 效果显著优于传统的二维培养体系。

关键词:

干细胞; 骨髓间充质干细胞; 层粘连蛋白; 间充质干细胞; 罗曼鹤鸡; 扩增; 细胞外基质; 国家自然科学基金

主题词:

间充质干细胞; 层粘连蛋白; 细胞外基质; 细胞增殖; 鸡

基金资助:

国家自然科学基金(81102160, 81273038)

摘要

背景: 鸡骨髓间充质干细胞是胚胎发育学、免疫学和肿瘤学研究重要的细胞模型, 但如何大规模扩增并使其保持良好的未分化潜能是鸡骨髓间充质干细胞应用中亟待解决的难题。

目的: 建立扩增鸡骨髓间充质干细胞的层粘连蛋白培养体系。

方法: 将体外分离得到的鸡骨髓间充质干细胞分别接种在包被层粘连蛋白培养皿和传统二维培养皿上。经过体外扩增, 比较两种培养体系下, 鸡骨髓间充质干细胞的形态特征、表面标志物、扩增性能和成脂分化潜能。

结果与结论: 层粘连蛋白培养体系和常规培养体系中骨髓间充质干细胞的形态学特征和表面标志物表达没有显著差异, 但层粘连蛋白培养体系获得的骨髓间充质干细胞增殖能力和分化潜能都明显优于传统培养体系。可见层粘连蛋白培养体系能快速地扩增出大量增殖能力强和未分化性能良好的鸡骨髓间充质干细胞, 为鸡骨髓间充质干细胞的进一步深入研究和应用提供生物学基础。

李双星, 戚媛, 朴丰源, 李亚晨, 刘晓晖, 邵静, 李双月. 利用层粘连蛋白扩增罗曼鹤鸡骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7222-7226.

Expansion of chicken bone marrow mesenchymal stem cells by laminin culture system

Li Shuang-xing¹, Qi Yuan², Piao Feng-yuan², Li Ya-chen², Liu Xiao-hui², Shao Jing², Li Shuang-yue²
(¹the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China;
²Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells from chickens are important cell models for embryonic developmental biology, immunology and oncology research. However, it is difficult to keep bone marrow mesenchymal stem cells with good undifferentiated potential in a large-scale expansion system.

OBJECTIVE: To establish a culture system *in vitro* with laminin coating to expand bone marrow mesenchymal stem cells from chickens.

METHODS: Isolated bone marrow mesenchymal stem cells from chickens were seeded in laminin-coated plates and traditional two-dimensional plates, respectively. After expansion *in vitro*, the morphological characteristics, expression of surface markers, expansion characteristics and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in both conditions were analyzed and compared.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no statistical differences in the morphological characteristics and expression of surface markers of bone marrow mesenchymal stem cells expanded by laminin-coated plates and traditional two-dimensional plates. But, the expansion characteristics and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in laminin-coated plates were better than those in traditional two-dimensional plates. Laminin culture system could quickly amplify out of a large number of chicken bone marrow mesenchymal stem cells with better proliferation ability and undifferentiated performance. All above results indicated that a more efficient expansion system with laminin coating is established.

Subject headings: mesenchymal stem cells; laminin; extracellular matrix; cell proliferation; chickens

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81102160, 81273038

李双星, 女, 1980年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2006年哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞相关研究。

并列第一作者: 戚媛, 女, 1988年生, 辽宁省大连市人, 汉族, 2010年大连医科大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞相关研究。

通讯作者: 李双月, 博士, 讲师, 大连医科大学公共卫生学院, 辽宁省大连市 116044

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.002
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344
(2014)45-07222-05

稿件接受: 2014-10-14

Li Shuang-xing, Master, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Qi Yuan, Master, Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Li Shuang-xing and Qi Yuan contributed equally to this work.

Corresponding author: Li Shuang-yue, M.D., Lecturer, Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-10-14

Li SX, Qi Y, Piao FY, Li YC, Liu XH, Shao J, Li SY. Expansion of chicken bone marrow mesenchymal stem cells by laminin culture system. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(45):7222-7226.

0 引言 Introduction

自1976年Friedenstein等首次报道在长期培养的骨髓中存在一种可贴壁生长的成纤维样细胞后, 科学工作者们陆续在脂肪、肝脏、脐带、胎盘、肌肉和骨实质等组织中分离出这种具有多向分化潜能的成体干细胞, 并命名为间充质干细胞^[1-2]。间充质干细胞已成为细胞移植、组织再生和组织工程领域重要的细胞来源, 在创伤修复、细胞治疗、组织结构/功能重建及人工器官等方面具有巨大的应用前景^[3-6]。间充质干细胞的研究目前多集中于大鼠、小鼠和人, 鸡骨髓间充质干细胞的相关报道不多见^[7-9]。鸡是胚胎发育学、免疫学和肿瘤学研究重要的动物模型, 鸡骨髓间充质干细胞具有扩增迅速、来源方便和可塑性强等特点, 已成为相关研究不可替代的细胞模型^[10-12]。

课题组在前期实验中已证实, 可通过差速贴壁法分离、纯化罗曼鹤鸡骨髓来源的间充质干细胞^[13]。然而, 在对鸡骨髓间充质干细胞进行应用转化过程中发现, 鸡骨髓间充质干细胞极易老化或自我分化, 利用常规培养体系难以获得大量的未分化性能保持良好的干细胞, 其他实验室培养人和大鼠间充质干细胞也曾有类似报道^[14-16]。这提示, 现有的培养体系中可能缺乏维持间充质干细胞未分化特性的关键成分。

在体内, 骨髓间充质干细胞特性的维持依赖于其所处的干细胞微环境。细胞外基质是骨髓微环境重要的组成成分, 由大量的胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白和多种糖蛋白及基质膜蛋白构成, 为细胞黏附、迁移提供支架, 从而传递细胞外信号, 调节骨髓间充质干细胞的生命活动^[17-20]。层粘连蛋白是细胞外基质中一种可溶的大分子蛋白, 对间充质干细胞的生长分化具有重要的调节作用^[21-22]。Lai等^[23]报道, 层粘连蛋白在体外可部分重构间充质干细胞微环境, 有助于间充质干细胞特性的维持和快速扩增。

本实验通过比较鸡骨髓间充质干细胞在常规培养体系和层粘连蛋白培养体系中的形态特征、表面标志物、扩增性能和成脂分化潜能, 检验层粘连蛋白培养体系是否能高效地扩增未分化性能保持良好的鸡骨髓间充质干细胞, 以期为鸡骨髓间充质干细胞的进一步深入研究和应用提供生物学基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学实验。

时间及地点: 于2013年4至12月在大连医科大学公共卫生学院实验室完成。

材料:

实验动物: 1-14 d龄罗曼鹤鸡, 雌雄不限, 体质量15-80 g, 购自大连韩伟集团。

层粘连蛋白扩增罗曼鹤鸡骨髓间充质干细胞实验所用主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶	Hyclone公司, 美国
层粘连蛋白	BD公司, 美国
FITC-CD29抗体、PE-CD34抗体	e-BIOSCIENCE公司, 美国
β -磷酸甘油、谷氨酰胺、地塞米松、抗坏血酸、异丁基甲基黄嘌呤、胰岛素、吡啶美辛	Sigma公司, 美国
倒置显微镜	Olympus公司, 日本
流式细胞仪	COULTER公司, 美国

实验方法:

鸡骨髓间充质干细胞的分离、纯化和培养^[13, 24-25]: 鸡断颈处死, 体积分数为75%乙醇浸泡10 min后无菌分离股骨和胫骨, 仔细去除骨表面附着的肌肉, PBS冲洗后, 剪开干骺端, 暴露骨髓腔, 用PBS反复冲洗骨髓腔和干骺端, 将冲洗液反复吹打后过200目筛网, 制成单细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 离心后用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液重悬, 接种于培养皿中, 在37 °C、体积分数为5% CO₂的培养箱中静置培养。1 d后首次换液, 之后每3 d换液1次。待细胞生长、覆盖培养皿表面面积80%-90%时, 0.25%胰酶消化, 按1:3的比例传代培养。用传至第3代的骨髓间充质干细胞进行实验。

实验分组: 用10 mg/L层粘连蛋白包被培养皿4 h后, 弃去残余液体并用PBS漂洗3次, 实验组骨髓间充质干细胞接种于其上, 对照组骨髓间充质干细胞接种于常规培养皿, 进行体外培养。

显微镜下观察: 在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况及形态学变化。

增殖能力检测: 用MTT法检测不同体系中鸡骨髓间充质干细胞的增殖能力。分别取第5代经层粘连蛋白体系和常规体系培养的鸡骨髓间充质干细胞接种于各自对应的96孔板, 每组6个复孔, 每天加20 μ L MTT(5 g/L)溶液于相应复孔, 孵育4 h后, 弃上清液并加入150 μ L二甲亚砷, 结晶物充分振荡溶解后, 检测490 nm波长处各孔吸光度值, 共检测7 d。

表面标志物检测: 收集不同体系中第3代生长状态良好的鸡骨髓间充质干细胞, 1 000 r/min室温离心5 min, PBS洗涤细胞3次, 过筛网并轻轻吹打成单细胞悬液, 待检测样本分别加入单克隆抗体FITC-CD29和PE-CD34, 同时每管样品设立同型阴性对照, 4 °C避光孵育20 min, PBS洗涤细胞3次, 以去除未结合抗体, 用500 μ L PBS重悬细胞后上流式细胞仪检测分析。

成脂诱导分化: 分别向对数生长期的不同体系中的鸡骨髓间充质干细胞中加入成脂诱导培养液(DMEM培养液含体积分数为10%胎牛血清、600 nmol/L吡啶美辛、5 mg/L胰岛

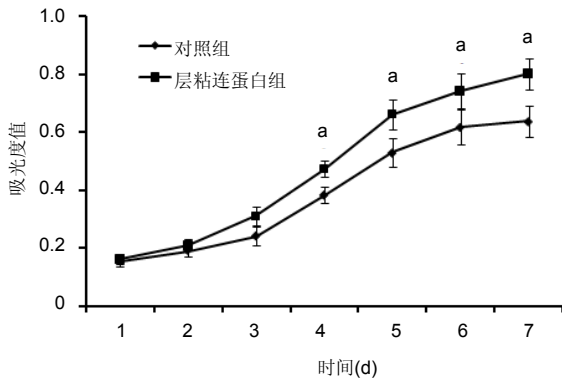


图2 鸡骨髓间充质干细胞在常规培养体系和层粘连蛋白培养体系中增殖性能的比较

Figure 2 Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in laminin-coated plates and traditional two-dimensional plates

图注: 层粘连蛋白组与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

素、10 mmol/L 异丁基黄嘌呤、1 μ mol/L 地塞米松), 对照孔加含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液, 每3 d换液1次, 均于第14天进行油红O染色。

主要观察指标: ①倒置显微镜下观察不同体系中鸡骨髓间充质干细胞形态。②MTT法检测不同体系对鸡骨髓间充质干细胞增殖的影响。③流式细胞仪检测不同体系对鸡骨髓间充质干细胞表面标志物表达的影响。④利用成脂诱导分化液和油红O染色检测不同体系对鸡骨髓间充质干细胞分化潜能的影响。

2 结果 Results

2.1 层粘连蛋白对鸡骨髓间充质干细胞形态学的影响 见图1。两种体系中骨髓间充质干细胞均为梭形或多边形, 形态均一, 有序排列, 层粘连蛋白对鸡骨髓间充质干细胞的形态学无显著影响。但光镜下可见相同大小视野内, 层粘连蛋白培养体系中的骨髓间充质干细胞数量明显多于常规培养体系, 层粘连蛋白能明显促进骨髓间充质干细胞的增殖。

2.2 层粘连蛋白对鸡骨髓间充质干细胞增殖的影响 结果显示, 两种培养体系中鸡骨髓间充质干细胞的生长潜伏期均为1-3 d, 之后开始进入对数生长期。但常规培养体系中的骨髓间充质干细胞第6天就进入平台期, 之后增殖速度逐渐减慢。而层粘连蛋白组细胞在培养4 d后, 其增殖速度明显快于对照组, 至培养第7天仍在快速增殖(图2)。

2.3 层粘连蛋白对鸡骨髓间充质干细胞表面标志物的影响 流式细胞仪检测结果显示, 常规培养体系中, 骨髓间充质干细胞表面标志物CD29阳性表达率为90.81%, CD34阳性表达率仅为0.75%; 而在层粘连蛋白培养体系中骨髓间充质干细胞CD29和CD34阳性表达率分别为93.27%和0.56%。层粘连蛋白组骨髓间充质干细胞的CD29表达阳性率虽高于对照组, 但差异无显著性意义(图3)。

2.4 层粘连蛋白对鸡骨髓间充质干细胞成脂分化的影响 两个培养体系中的骨髓间充质干细胞在成脂诱导培养液下

均出现不同程度的细胞间空隙增大, 细胞密度降低, 部分细胞呈圆形或椭圆形、内有呈串珠样分布的脂滴, 细胞亮度增高。油红O检测发现大量强阳性脂肪样细胞, 胞浆内含有红色串珠样排列脂滴, 部分脂滴已融合, 细胞体积变大。层粘连蛋白组骨髓间充质干细胞的成脂分化能力明显高于对照组, 见图4。

3 讨论 Discussion

自2009年, Khatri等^[24-29]首次分离纯化出鸡骨髓间充质干细胞以来, 鸡骨髓间充质干细胞已被应用于多个领域。目前, 鸡骨髓间充质干细胞的培养扩增主要是通过密度梯度离心法在传统的二维培养体系(如培养瓶、培养皿等)上进行。梯度离心法可去除与单个核细胞密度不同的其他细胞, 并分离出单个核细胞进行培养, 从而获得骨髓间充质干细胞。但已有多篇文献报道, 密度梯度离心法操作复杂, 耗时较长, 对细胞损伤较大, 骨髓间充质干细胞的获得量较低。而差速贴壁培养法是通过定期换液去除骨髓组分中的不贴壁细胞和贴壁性能较弱的细胞, 从而筛选出骨髓间充质干细胞。该方法操作简单, 耗时短, 对细胞损伤小, 而且骨髓中其他细胞分泌的营养组分最大限度地保留在培养体系内, 促进骨髓间充质干细胞增殖。本实验室已通过前期工作, 建立起鸡骨髓间充质干细胞的差速贴壁培养体系, 获得的鸡骨髓间充质干细胞增殖能力强, 并具有良好的未分化潜能^[13]。

干细胞特性的维持依赖于其所处的生长微环境, 细胞外基质是干细胞微环境重要的组成成分, 并为干细胞的生命活动提供关键的物理和生化信号, 这一点常被传统的二维培养体系所忽略。传统的二维培养体系由于在体外难以重建骨髓间充质干细胞的体内微环境, 极易使培养的骨髓间充质干细胞丧失其未分化性能, 趋向分化。

近年来, 部分实验室已开始尝试利用细胞外基质的生物学特性来调控骨髓间充质干细胞的增殖。苏约翰等^[30]报道利用细胞外基质可大规模扩增人脂肪来源的间充质干细胞, 细胞在传至15代后仍具有良好的增殖能力和分化潜能。Yang等^[31]研究层粘连蛋白、I型胶原酶、V型胶原酶和纤维连接蛋白等细胞外基质组分对猪来源干细胞的体外富集作用, 结果发现层粘连蛋白培养干细胞纯度远远高于常规培养的对照组。Nasiri等^[32]报道, 牛来源干细胞克隆在层粘连蛋白上的生长面积、生长数量和未分化性能都显著优于常规的二维培养体系。Kanatsu-Shinohara等^[33]用层粘连蛋白包被的孔板培养小鼠干细胞, 结果显示, 层粘连蛋白可显著提高干细胞的增殖能力。这些研究提示, 层粘连蛋白可能通过对微环境中细胞外基质的体外重构, 实现干细胞未分化性能的维持和快速扩增。但鸡来源骨髓间充质干细胞的相关研究尚未见报道。本研究尝试将鸡骨髓间充质干细胞接种于层粘连蛋白包被的培养皿中, 并对其形态学特征、表面标志物表达、增殖速度和分化能力进行检测, 结

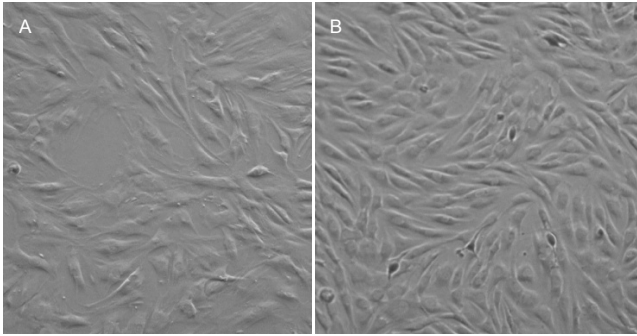


图1 鸡骨髓间充质干细胞在常规培养体系和层粘连蛋白培养体系中的形态学观察($\times 100$)

Figure 1 Light microscope images of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in plastic system and laminin system ($\times 100$)

图注: 图中 A 为常规培养体系培养的第 3 代鸡骨髓间充质干细胞, 呈梭形或多边形, 形态均一, 有序排列, 布满大部分视野; B 为层粘连蛋白培养体系培养的第 3 代鸡骨髓间充质干细胞, 多数为梭形、少数呈多边形, 有序排列, 细胞密度明显大于常规培养体系, 几乎布满整个视野。

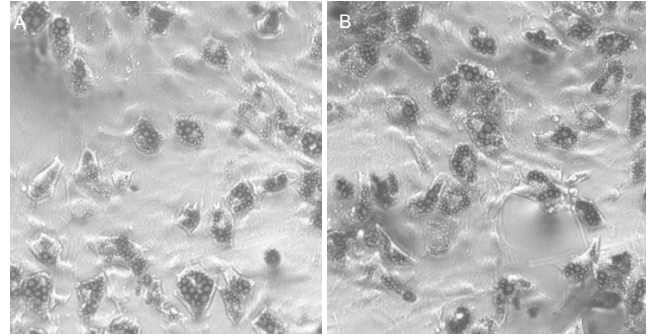


图4 培养体系对鸡骨髓间充质干细胞成脂分化的影响($\times 100$)

Figure 4 The adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in laminin-coated plates and traditional two-dimensional plates ($\times 100$)

图注: 图中 A 为常规培养体系培养的鸡骨髓间充质干细胞经成脂诱导分化后的油红 O 染色, 染色阳性细胞内含有红色串珠样排列脂滴; B 为层粘连蛋白培养体系培养的鸡骨髓间充质干细胞经成脂诱导分化后的油红 O 染色, 染色阳性细胞明显增多, 部分红色串珠样排列脂滴已经融合为较大脂滴。

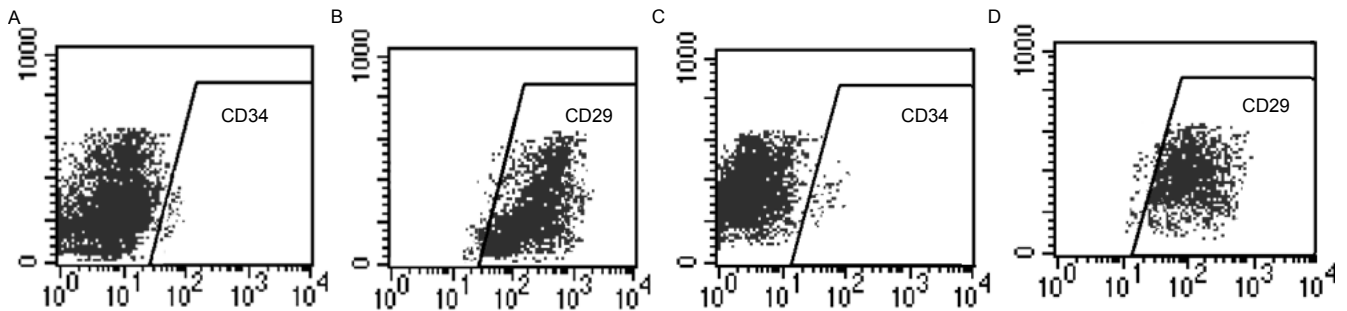


图3 培养体系对鸡骨髓间充质干细胞表面标志物表达的影响

Figure 3 The expression of surface markers of bone marrow mesenchymal stem cells in laminin-coated plates and traditional two-dimensional plates

图注: A, B 为对照组鸡骨髓间充质干细胞表面标志物 CD34, CD29 阳性表达率为 0.75%, 90.81%; C, D 为层粘连蛋白鸡骨髓间充质干细胞表面标志物 CD34, CD29 阳性表达率为 0.56%, 93.27%。

果显示, 层粘连蛋白培养体系和常规培养体系中骨髓间充质干细胞的形态学特征和表面标志物表达没有显著差异, 但层粘连蛋白能显著提高骨髓间充质干细胞的增殖能力和分化潜能。

骨髓间充质干细胞属于非造血谱系干细胞, 但由于其缺乏特异性表面标志物, 对骨髓间充质干细胞的鉴别尚缺乏统一标准。本研究选择 CD34 和 CD29 这一对表面分子进行检测, 发现所得细胞绝大多数都表达 CD29, 却几乎都不表达 CD34, 证明所得细胞即为骨髓间充质干细胞。虽然结果显示层粘连蛋白组骨髓间充质干细胞的 CD29 表达阳性率高于常规培养组, 但差异无显著性意义, 这可能是由于此时干细胞传代次数较少(本次实验检测的是不同体系培养至第 3 代间充质干细胞), 仍能较好的保持干细胞表型。其他课题组的报道也显示, 培养时间较短(少于 5 代)时, 常规培养体系可较好的保持间充质干细胞性能^[34-35]。

本实验利用层粘连蛋白培养体系成功扩增出大量未分化潜能和增殖能力强的鸡骨髓间充质干细胞, 在下一步实验中, 将对获得的鸡骨髓间充质干细胞进行动物疾病模型

体内移植, 从功能水平评价层粘连蛋白培养体系获得骨髓间充质干细胞的有效性和安全性。

作者贡献: 实验设计为第七作者, 实验具体实施为第二、四、五作者, 实验评估为第五、六作者。第一作者成文, 第三作者审核。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: Niche-目前特指干细胞 Niche, 即干细胞微环境, 是专指干细胞定居及进行自我更新并能产生大量祖细胞的特定场所, 由一些维持干细胞功能的细胞、信号分子等构成, 是组织结构和功能的基本单位。

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] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-147.

- [2] Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-525.
- [3] Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005;309(5732):314-317.
- [4] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10711-10716.
- [5] Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, et al. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol*. 2008;65(6):753-761.
- [6] Cerrada A, de la Torre P, Grande J, et al. Human Decidua-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Functional Alveolar Type II-Like Cells that Synthesize and Secrete Pulmonary Surfactant Complexes. *PLoS One*. 2014;9(10):e110195.
- [7] Paradisi M, Alviano F, Pirondi S, et al. Human mesenchymal stem cells produce bioactive neurotrophic factors: source, individual variability and differentiation issues. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(3):391-402.
- [8] Wang G, Li Y, Wang Y, et al. Roles of the co-culture of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with rat pancreatic cells in the treatment of rats with diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2014;8(5):1389-1396.
- [9] Hao L, Yang H, Du C, et al. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2014;2(30):4794-4801.
- [10] Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, et al. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med*. 1966;123(1):75-102.
- [11] Silveira P, Marin SY, Moreira PA, et al. Interactions of Plasmodium juxtannulare and chicken anaemia virus: establishing a model. *Parasitology*. 2013;140(14):1777-1788.
- [12] Wang JX, Zhou JY, Yang QW, et al. An improved embryonated chicken egg model for the evaluation of antiviral drugs against influenza A virus. *J Virol Methods*. 2008;153(2):218-222.
- [13] 李双星, 朴丰源, 戚媛, 等. 罗曼鹤鸡骨髓间充质干细胞的分离培养和鉴定[J]. *山东医药*, 2014, 54(11):1-4.
- [14] Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Display Reduced Expression of CD105 after Culture in Serum-Free Medium. *Stem Cells Int*. 2013;2013: 698076.
- [15] Tsang WP, Shu Y, Kwok PL, et al. CD146+ human umbilical cord perivascular cells maintain stemness under hypoxia and as a cell source for skeletal regeneration. *PLoS One*. 2013;8(10):e76153.
- [16] Zhang D, Kilian KA. The effect of mesenchymal stem cell shape on the maintenance of multipotency. *Biomaterials*. 2013;34(16):3962-3969.
- [17] Abdeen AA, Weiss JB, Lee J, et al. Matrix composition and mechanics direct proangiogenic signaling from mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(19-20):2737-2745.
- [18] Nakamura R, Nakamura F, Fukunaga S. Changes in the composition of the extracellular matrix accumulated by mesenchymal stem cells during in vitro expansion. *Anim Sci J*. 2014;85(6):706-713.
- [19] Kim JH, Jekarl DW, Kim M, et al. Effects of ECM protein mimetics on adhesion and proliferation of chorion derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*. 2014;11(3):298-308.
- [20] Wilkinson AE, Kobelt LJ, Leipzig ND. Immobilized ECM molecules and the effects of concentration and surface type on the control of NSC differentiation. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(10):3419-3428.
- [21] Carlson KB, Singh P, Feaster MM, et al. Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination, and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin. *Glia*. 2011;59(2):267-277.
- [22] Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*. 2006;24(11):2346-2354.
- [23] Lai Y, Sun Y, Skinner CM, et al. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1095-1107.
- [24] Khatri M, O'Brien TD, Sharma JM. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells Dev*. 2009;18(10):1485-1492.
- [25] Bai C, Hou L, Ma Y, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from chicken bone marrow. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(3):437-451.
- [26] Khatri M, Sharma JM. Susceptibility of chicken mesenchymal stem cells to infectious bursal disease virus. *J Virol Methods*. 2009;160(1-2):197-199.
- [27] Kocamaz E, Gok D, Cetinkaya A, et al. Implication of C-type natriuretic peptide-3 signaling in glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte hypertrophy during TGF- β 1 induced chondrogenic differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Mol Histol*. 2012;43(5):497-508.
- [28] Li X, Gao Y, Hua J, et al. Research potential of multi-lineage chicken amniotic mesenchymal stem cells. *Biotech Histochem*. 2014;89(3):172-180.
- [29] Bai C, Gao Y, Li Q, et al. Differentiation of chicken umbilical cord mesenchymal stem cells into beta-like pancreatic islet cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2013 Dec 5. [Epub ahead of print]
- [30] 苏约翰, 卫超, 吕品雷, 等. 利用细胞外基质大规模扩增临床级人脂肪间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(10):1521-1531.
- [31] Yang Y, Honaramooz A. Efficient purification of neonatal porcine gonocytes with Nycodenz and differential plating. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(3):496-505.
- [32] Nasiri Z, Hosseini SM, Hajian M, et al. Effects of different feeder layers on short-term culture of prepubertal bovine testicular germ cells in-vitro. *Theriogenology*. 2012;77(8):1519-1528.
- [33] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, et al. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*. 2005;132(18):4155-4163.
- [34] Kasten A, Naser T, Brüllhoff K, et al. Guidance of mesenchymal stem cells on fibronectin structured hydrogel films. *PLoS One*. 2014;9(10):e109411.
- [35] Hao L, Yang H, Du C, et al. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2014;2(30):4794-4801.