

## 改良原代培养体系提高人脐带间充质干细胞的产量

高彦琳<sup>1,2</sup>, 张宁坤<sup>2</sup>, 陈厚良<sup>2</sup>, 高连如<sup>2</sup>, 朱智明<sup>2</sup>(<sup>1</sup>安徽医科大学海军临床学院, 北京市 100048; <sup>2</sup>解放军海军总医院, 北京市 100048)

### 文章亮点:

- 1 在传统组织块贴壁法的基础上, 将初次培养后废弃的组织块、培养液、组织块与培养液的混合物分别进行再次培养, 大约 1 周即可传代, 且获取的细胞数为初次培养的 2 倍左右。相对于传统组织贴壁法, 这种改进的方法可在较短时间内获得大量原代细胞。
- 2 在传统组织块贴壁法的基础上进行再次贴壁培养, 得到的脐带间充质干细胞在形态、生长曲线、增殖速率、免疫表型等方面与初次培养的细胞无明显差异, 可以为再生医学提供足够的种子细胞。

### 关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 脐带间充质干细胞; 细胞培养; 华通胶; 国家自然科学基金

### 主题词:

脐带; 间质干细胞; 细胞, 培养的

### 基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81170094)

### 摘要

背景: 目前关于脐带间充质干细胞培养方法的研究很多, 但尚无关于初次培养后废弃物的相关研究。

目的: 探讨优化人脐带来源间充质干细胞体外培养的最佳方法。

方法: 采用组织块贴壁法分离培养人脐带间充质干细胞, 记为初次培养组。将原代培养瓶中的培养液及组织离心, 重新分成组织组、混合组和纯液组进行再次培养。观察 4 组原代细胞的细胞形态、获得时间和细胞得率; MTT 法绘制细胞生长曲线, 流式细胞仪检测细胞周期及免疫表型。

结果与结论: 初次培养组、再次培养组织组、再次培养混合组、再次培养纯液组获取细胞的平均时间分别为 (15.00±0.45) d, (7.0±0.3) d, (8.00±0.25) d, (8.00±0.25) d。每个 T75 培养瓶可获取的第 1 代细胞数分别为 (4.0±0.5)×10<sup>5</sup>、(9.0±0.55)×10<sup>5</sup>、(15.0±0.2)×10<sup>5</sup>、(7.0±0.33)×10<sup>5</sup> 个。倒置显微镜下观察 4 组细胞为形态相对均一的梭形贴壁细胞, 呈平行排列生长或漩涡状生长。4 组细胞的生长曲线、增殖活性、表面标记物检测均无明显差异。结果表明对脐带间充质干细胞的初次培养体系进行再次培养, 可在短时间内扩增出大量原代细胞。

高彦琳, 张宁坤, 陈厚良, 高连如, 朱智明. 改良原代培养体系提高人脐带间充质干细胞的产量[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10):1477-1481.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.001

## Improved primary culture system increases the yield of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Gao Yan-lin<sup>1,2</sup>, Zhang Ning-kun<sup>2</sup>, Chen Hou-liang<sup>2</sup>, Gao Lian-ru<sup>2</sup>, Zhu Zhi-ming<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Clinical College of Navy Medicine, Anhui Medical University, Beijing 100048, China; <sup>2</sup>Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** At present, a lot of research about culture methods for umbilical cord mesenchymal stem cells, but not for the waste of primary system.

**OBJECTIVE:** To explore the best culture method of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*.

**METHODS:** Human umbilical cord mesenchymal stem cells were prepared by tissue explants method, recorded as initial culture group. The centrifugal fluid and tissue of the primary culture flask were centrifuged and divided into three groups for secondary culture: tissue group, mixed group and pure liquid group. Cell morphology, time for cell acquisition, and yield of primary cells in the four groups were observed; the cell growth curve was analyzed by MTT assay; and cell cycle and phenotype were detected by flow cytometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The average time for cell acquisition in the initial culture group, tissue group, mixed group and pure liquid group were (15.00±0.45), (7.0±0.3), (8.00±0.25) and (8.00±0.25) days, respectively. The number of cells at first generation was (4.0±0.5)×10<sup>5</sup>, (9.0±0.55)×10<sup>5</sup>, (15.0±0.2)×10<sup>5</sup> and (7.0±0.33)×10<sup>5</sup> per T75 culture bottle, respectively. Under the inverted microscope, cells in the four groups were fusiform-like adherent cells, which were in parallel or circinate arrangement. Growth curve, proliferative activity, surface markers of the four groups had no significant differences. The human umbilical cord mesenchymal stem cells can be obtained rapidly and largely through the secondary culture to the primary culture system.

**Subject headings:** Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Cells, Cultured

高彦琳, 女, 1989 年生, 安徽省宿州市人, 汉族, 安徽医科大学海军临床学院在读硕士, 医师, 主要从事干细胞治疗缺血性心脏病方面的研究工作。

通讯作者: 朱智明, 硕士, 主任医师, 解放军海军总医院, 北京市 100048

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)10-01477-05

稿件接受: 2015-02-03

http://www.crter.org

Gao Yan-lin, Studying for master's degree, Physician, Clinical College of Navy Medicine, Anhui Medical University, Beijing 100048, China; Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: Zhu Zhi-ming, Master, Chief physician, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Accepted: 2015-02-03

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81170094

Gao YL, Zhang NK, Chen HL, Gao LR, Zhu ZM. Improved primary culture system increases the yield of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(10):1477-1481.

## 0 引言 Introduction

干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源, 它既可以通过细胞分裂维持自身群体的稳定, 又可以分化成为不同类型细胞, 进而构成机体各种复杂的组织器官<sup>[1-2]</sup>。对于干细胞的研究可追溯到20世纪50年代, 最早源于对畸胎瘤的研究。20世纪70年代, 人们就发现了一种来源于中胚层、成纤维样贴壁生长的细胞, 称之为间充质干细胞<sup>[3]</sup>。

间充质干细胞是干细胞家族的重要成员, 因具有很强的自我更新和向多种组织分化发育的潜能而日益受到人们的关注<sup>[4-5]</sup>。目前已从骨髓、脂肪、羊膜、胎盘、脐血以及脐带等组织中分离出间充质干细胞, 其有向内皮细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和神经细胞分化的能力<sup>[6-8]</sup>。脐带来源广泛, 取材方便, 易于收集、保存、冷冻, 属于医疗废弃物, 不受伦理、道德及法律方面的限制, 并且可在体外进行分离、培养, 生物性能稳定, 多次传代扩增仍能保持旺盛功能<sup>[9-11]</sup>。脐带间充质干细胞在再生医学研究中具有极大潜质和广阔应用前景。

目前, 随着生物医学研究的不断深入, 按照一定的目的在体外培养扩增干细胞已成为现实<sup>[12-13]</sup>。但是如何才能在规定时间内获取大量的脐带间充质干细胞仍需要进一步研究。本实验以贴壁法为基础, 对初次培养废弃的组织块、培养液及其混合物进行再次培养, 力求降低成本、简化操作、提高质量、高效率的获得细胞。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 多样本观察实验。

**时间及地点:** 实验于2013年9月至2014年2月在解放军海军总医院心脏中心实验室完成。

**材料:**

改良原代培养体系提高人脐带间充质干细胞产量实验所用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12培养液、胎牛血清、0.25% trypsin-EDTA胰蛋白酶	美国Gibco公司
MTT	Sigma公司
流式单抗 CD45-FITC、CD44-FITC、CD90-PE、CD105-PE、HLA-ABC-PE、HLA-DR-FITC、CD31-PE	美国Biolegend 公司
倒置相差显微镜	日本NIKON公司
流式细胞仪	美国BD公司
紫外分光光度仪、二氧化碳培养箱	Thermo公司

**脐带标本:** 经医院伦理委员会批准, 征得产妇和家属书面知情同意的情况下, 在解放军海军总医院妇产科取当

日剖宫产健康足月生产的新生儿脐带(乙型肝炎病毒、丙肝病毒、人类免疫缺陷病毒、TP-SX、巨细胞病毒、梅毒、艾滋病等传染性疾病预防阴性)。

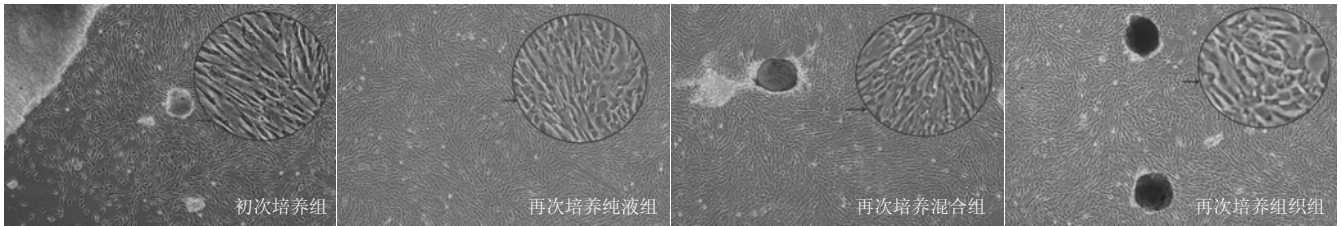
**实验方法:**

**人脐带间充质干细胞的分离、培养:** 将无菌条件下获取的脐带放入无菌生理盐水中, 1 h之内送至细胞培养实验室。参照文献<sup>[14]</sup>报道的人脐带间充质干细胞分离、培养方法, 用生理盐水反复冲洗, 洗去脐带残留血液, 将脐带剪成3.0-4.0 cm的小段, 每段均沿脐静脉腔剪开, 平铺后剔除静脉, 再剔除2根动脉, 取出血管之间、血管与外膜之间的胶状物——华通胶, 用小剪刀将取出的华通胶反复剪切成大约1 mm<sup>3</sup>小块, 接种于T75培养瓶内, 每个培养瓶内加入10 mL含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养液, 使脐带华通胶均匀分布瓶底, 置于体积分数为5%CO<sub>2</sub>、37 °C的培养箱内培养。在显微镜下观察细胞生长增殖情况并拍照。待细胞生长至80%-90%融合状态时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代细胞, 记为初次培养第1代细胞(P1)。

**人脐带间充质干细胞的再次培养:** 将原代培养瓶中的废弃物移入离心管中, 1 500 r/min离心5 min, 将沉淀的组织块置于培养瓶中加入新的培养基(含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养液), 记为再次培养组织组; 将离心后的上清液(原培养液)8.0-10.0 mL置于培养瓶中, 记为再次培养纯液组; 取部分沉淀的组织块及离心后的上清液(原培养液)4.0-5.0 mL置于培养瓶中, 并加入4.0-5.0 mL新的培养基, 记为再次培养混合组。将以上3组分别置于体积分数为5%CO<sub>2</sub>、37 °C的培养箱内培养。在显微镜下观察细胞生长增殖情况并拍照。待细胞生长至80%-90%融合状态时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代细胞, 记为再次培养第1代细胞(组织P1; 混合P1; 纯液P1)。

**人脐带间充质干细胞表面标记物检测:** 取初次培养和再次培养的第3代脐带间充质干细胞, 0.25%胰蛋白酶消化, PBS洗2次, 调整细胞浓度为1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>单细胞悬液, 每个Eppendrof管加100 μL的细胞悬液, 每种抗体设置4个复管, 分别为初次培养组, 再次培养组织组, 再次培养混合组, 再次培养纯液组, 加入鼠抗人单克隆抗体 PE-CD90, PE-CD105, PE-CD44, PE-CD73, PE-HLA-ABC, FITC-CD45, FITC-CD34, FITC-HLA-DR各20 μL, 充分混匀, 避光室温孵育30 min, PBS洗2遍(250×g离心5 min), 重新制成细胞悬液0.5 mL, 经300目细胞筛过滤, 流式细胞仪上机检测并分析。

**MTT法检测细胞增殖活性:** 取第3代初次培养组、再次培养组织组、再次培养混合组、再次培养纯液组细胞, 经0.25%胰蛋白酶消化计数后, 分别用完全培养基调整细胞

图1 各组人脐带间充质干细胞形态( $\times 40$ )Figure 1 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells in four groups ( $\times 40$ )

图注: 倒置显微镜下观察4组原代细胞呈贴壁生长, 形态均为长梭形或多角形。

浓度至 $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 取 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液接种在96孔板中, 每组设6个副孔, 共设7组, 置于 $37^\circ\text{C}$ , 体积分数为5% $\text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱中培养。每隔24 h向6孔中加入 $20 \mu\text{L}$  MTT溶液(5 g/L, 用PBS配), 继续孵育4 h, 用无细胞的培养液做空白对照, 酶标仪检测各组细胞吸光度值(激发波长490 nm), 连续7 d, 取6孔均值绘制生长曲线。

**细胞周期测定:** 取第3代初次培养组、再次培养组织组、再次培养混合组、再次培养纯液组细胞, 经0.25%胰蛋白酶消化收集后, 分别用PBS离心洗涤2次, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 离心弃上清, 加入 $4^\circ\text{C}$ 预冷的体积分数为70%乙醇1 mL重悬,  $4^\circ\text{C}$ 冰箱过夜, 离心弃上清, 用1 mL碘化丙啶重悬,  $4^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min, 流式细胞仪检测, 分析细胞周期。

**主要观察指标:** ①不同组分的人脐带间充质干细胞形态、获得时间、细胞得率等情况。②不同组分的人脐带间充质干细胞免疫表型。③不同组分的人脐带间充质干细胞增殖能力。④不同组分的人脐带间充质干细胞的细胞周期。

**统计学分析:** 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理, 以配对 $t$ 检验进行双侧显著性检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 各组原代人脐带间充质干细胞形态、获得时间、细胞得率等情况分析** 倒置显微镜下观察4组原代细胞呈贴壁生长, 形态均为长梭形或多角形(图1)。

初次培养组细胞以华通胶为中心呈漩涡状或平行排列生长, 获取细胞的平均时间为 $(15.0 \pm 0.45) \text{ d}$ , 平均每个T75培养瓶可获取 $(4.0 \pm 0.5) \times 10^5$ 个第1代细胞; 再次培养组织组细胞以华通胶为中心呈漩涡状生长, 获取细胞的平均时间为 $(7.0 \pm 0.3) \text{ d}$ , 平均每个T75培养瓶可获取 $(9.0 \pm 0.55) \times 10^5$ 个第1代细胞; 再次培养混合组部分细胞以华通胶为中心呈漩涡状生长, 部分细胞呈散在生长, 得到原代细胞的平均时间 $(8.0 \pm 0.25) \text{ d}$ , 平均每个T75培养瓶可获取 $(15.0 \pm 0.2) \times 10^5$ 个第1代细胞; 再次培养纯液组细胞呈散在生长, 得到原代细胞的平均时间 $(8.0 \pm 0.58) \text{ d}$ , 平均每个T75培养瓶可获取 $(7.0 \pm 0.33) \times 10^5$ 个第1代细胞。

传至第3代, 细胞增殖速度加快, 形态较为均一呈长梭

表1 各组人脐带间充质干细胞表面标志物阳性表达率 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 1 The positive rates of surface markers in human umbilical cord mesenchymal stem cells of the four groups

免疫表型	初次培养组	再次培养		
		组织组	混合组	纯液组
CD31	1.20 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.11	1.07 $\pm$ 0.12	1.12 $\pm$ 0.10
CD34	0.72 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.15	0.85 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.12
CD45	1.11 $\pm$ 0.10	1.10 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.12	1.22 $\pm$ 0.10
CD90	99.01 $\pm$ 0.09	99.50 $\pm$ 0.08	98.87 $\pm$ 0.09	99.18 $\pm$ 0.07
CD105	99.74 $\pm$ 0.07	99.82 $\pm$ 0.06	99.14 $\pm$ 0.08	99.37 $\pm$ 0.07
HLA-ABC	94.57 $\pm$ 0.09	97.41 $\pm$ 0.10	94.22 $\pm$ 0.11	95.13 $\pm$ 0.09
HLA-DR	1.26 $\pm$ 0.14	0.98 $\pm$ 0.13	1.32 $\pm$ 0.11	1.29 $\pm$ 0.11

形, 折光度好。

结果表明, 4组细胞形态无明显差异, 初次培养组原代细胞培养时间显著高于其他3个再次培养组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 再次培养3个组之间两两比较, 差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。4组所获取的原代细胞数比较, 再次培养混合组数目最多, 再次培养组织组其次, 再次培养纯液组稍差, 初次培养组最少, 4组间两两比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 各组人脐带间充质干细胞免疫表型分析** 流式细胞仪检测结果显示(表1), 4组第3代脐带间充质干细胞均高表达CD90、CD105、HLA-ABC, 不表达CD31、CD34、CD45、HLA-DR, 且4组培养方法所获取的细胞表面标志物的阳性表达率差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 各组人脐带间充质干细胞增殖能力分析** MTT法绘制4组第3代人脐带间充质干细胞的生长曲线(图2)。4组人脐带间充质干细胞生长曲线形态相似, 1至2 d细胞处于潜伏期, 增殖不明显; 3-5 d细胞进入对数生长期, 细胞增殖加速; 第6天以后进入平台期, 细胞生长停滞。4组间生长曲线比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.4 各组人脐带间充质干细胞的细胞周期分析** 用流式细胞仪检测4组第3代人脐带间充质干细胞的细胞周期(图3)。

结果显示 $(75.28 \pm 0.55)\%$ 的人脐带间充质干细胞处于 $G_0/G_1$ 期, 其余细胞处于增殖分裂期, 且各组间 $G_0/G_1$ 期细胞比例差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。说明这4组细胞增殖能力旺盛, 且差异无显著性意义。

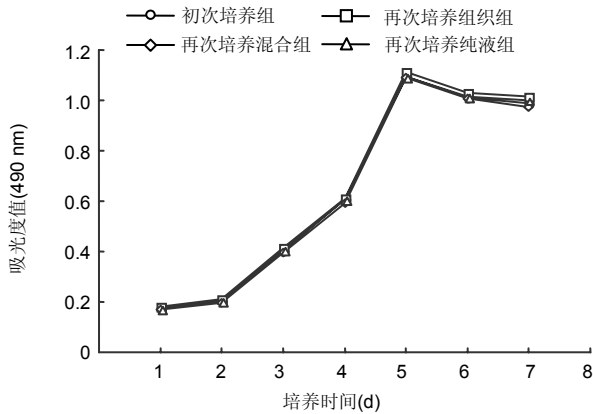


图2 各组人脐带间充质干细胞生长曲线

Figure 2 Growth curves of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the four groups

图注: 4 组人脐带间充质干细胞生长曲线形态相似, 1 至 2 d 细胞处于潜伏期, 增殖不明显; 3-5 d 细胞进入对数生长期, 细胞增殖加速; 第 6 天以后进入平台期, 细胞生长停滞。

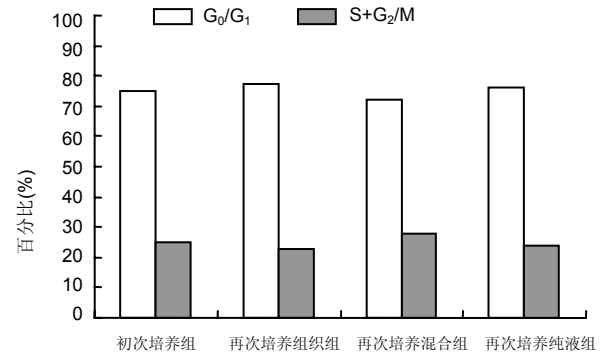


图3 各组人脐带间充质干细胞的细胞周期

Figure 3 Cell cycles of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the four groups

图注: (75.28±0.55)% 的人脐带间充质干细胞处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 其余细胞处于增殖分裂期, 且各组间 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例差异无显著性意义(P>0.05)。

### 3 讨论 Discussion

最近几年里, 对成体干细胞疗法的研究在不断增加<sup>[15]</sup>。间充质干细胞是一个相当具有吸引力的种子细胞, 可以用于治疗各种疾病, 包括神经系统疾病, 心血管疾病, 自身免疫性疾病、内分泌疾病等<sup>[16-18]</sup>。脐带来源的间充质干细胞是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间的原始干细胞, 其分化能力强, 倍增时间短, 具有免疫调节作用和较低的免疫原性, 且无致肿瘤性<sup>[19-21]</sup>。

1976年Friedenstein等<sup>[22]</sup>首先从脐带组织中分离培养出间充质干细胞, 之后Schugar等<sup>[23]</sup>又采用了组织块法和酶消化法两种方法分别培养出脐带间充质干细胞, 这也是目前较为常用的两种方法。这两种方法分离培养出的脐带间充质干细胞形态、生长曲线、细胞表面标记物等无明显差异<sup>[24-25]</sup>。但是, 酶消化法成本较高; 操作比较繁琐污染概率大; 消化过程时间过短细胞很难爬出; 消化时间过长易损伤细胞; 长时间酶的消化对细胞损伤较大, 多次传代后细胞易脱落死亡<sup>[26-27]</sup>。

本实验采用组织块培养法提取脐带中间充质干细胞。通常来讲组织块贴壁法是将小的组织块均匀铺于培养瓶底, 原代细胞从组织块边缘爬出。虽然组织块贴壁法方便易行, 操作简单, 但存在原代细胞收获率低、培养周期长等问题<sup>[28-29]</sup>, 难以适应组织工程对种子细胞的需要。本实验中初次培养组获取原代细胞的平均时间大约2周, 获取细胞数量较少, 符合组织块贴壁法培养的结果。一般传代结束后就会将培养原代细胞的组织和培养液丢弃。本实验是将废弃的组织和培养液离心后, 分成组织组、混合组和纯液组进行再次培养, 大约1周即可传代, 且获取的细胞数为初次培养的2倍左右。相对于传统组织贴壁法, 这种改进的方法可在较短时间内获得大量原代细胞。因此, 对脐带间充质干细胞的原代培养体系进行再次培养, 可以在短时间内扩增出大量原代细胞。

从文章结果中对于初次培养组和再次培养组织组、混合组、纯液组的比较可以推测: 初次培养后组织块内细胞并未完全爬出; 在初次培养的过程中可能形成了某些黏附物质和生长因子, 能促进组织块贴壁和生长<sup>[30]</sup>; 组织块再经过一轮培养后, 纤维组织松解, 细胞易于爬出; 原代培养的培养液中可能存在一些散在细胞。本文仅是针对高效率扩增细胞进行研究, 其进一步机制和原因有待于做深入研究。

综上所述, 在传统组织块贴壁法的基础上进行再次贴壁培养, 得到的脐带间充质干细胞在形态、生长曲线、增殖速率、免疫表型等方面与初次培养的细胞无明显差异。相对于传统组织贴壁法, 这种再次培养的方法具有成本低、操作简单、易于短时间内获取大量原代细胞等优点, 可以为再生医学提供足够的种子细胞。

**作者贡献:** 实验设计为第一作者和通讯作者, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为通讯作者。第一作者成文, 通讯作者审核, 第一作者、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:** 实验过程中对脐带的处置已征得产妇和家属书面知情同意, 且通过了医院伦理委员会的审查。

**学术术语:** 华通胶(Wharton's jelly)-来源于胚胎发育 13 周左右的胚外中胚层, 包围在迁移中的胚胎血岛周围, 是填充在脐带羊膜下, 2 条动脉和 1 条静脉之间的一种黏稠的富含黏多糖和蛋白聚糖的胶状物质, 其内含有大量的原始间充质干细胞。

**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] Trounson A, Thakar RG, Lomax G, et al. Clinical trials for stem cell therapies. BMC Med. 2011;9:52.

- [2] Gatta V, D'Aurora M, Lanuti P, et al. Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing. *BMC Genomics*. 2013;14:635.
- [3] Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther*. 2011;22(1):19-26.
- [4] Mok PL, Leong CF, Cheong SK. Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. *Malays J Pathol*. 2013;35(1):17-32.
- [5] Neirinckx V, Coste C, Rogister B, et al. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(4):284-296.
- [6] 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; 50(10): 937-944.
- [7] Kang BJ, Ryu HH, Park SS, et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci*. 2012;13(3): 299-310.
- [8] Fu YS, Shih YT, Cheng YC, et al. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci*. 2004;11(5):652-660.
- [9] Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, et al. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells Cloning*. 2011;4: 39-50.
- [10] 杨晨. 脐带间充质干细胞的分离鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [11] Kim DW, Staples M, Shinozuka K, et al. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11692-11712.
- [12] 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.
- [13] Kang BJ, Ryu HH, Park SS, et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci*. 2012;13(3): 299-310.
- [14] Hsieh JY, Fu YS, Chang SJ, et al. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev*. 2010;19(12): 1895-1910.
- [15] Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519-532.
- [16] Bai J, Hu Y, Wang YR, et al. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity. *J Geriatr Cardiol*. 2012;9(2):166-171.
- [17] Xu Y, Meng H, Li C, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. *Stem Cells Dev*. 2010;19(10): 1511-1522.
- [18] Chen Y, Qian H, Zhu W, et al. Hepatocyte growth factor modification promotes the amelioration effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on rat acute kidney injury. *Stem Cells Dev*. 2011;20(1):103-113.
- [19] 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.
- [20] Prasajak P, Leeansaksiri W. Developing a New Two-Step Protocol to Generate Functional Hepatocytes from Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells under Hypoxic Condition. *Stem Cells Int*. 2013;2013:762196.
- [21] Zhang Y, Cai W, Huang Q, et al. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology*. 2014;59(2):671-682.
- [22] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.
- [23] Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009: 789526.
- [24] 李昆, 于艳秋, 李世正. 两种分离人胎盘间充质干细胞方法的比较[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 39(8): 675-676.
- [25] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669-1675.
- [26] 郝白露, 杨瑞峰, 彭祥焱, 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.
- [27] Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1):195-207.
- [28] 任宇, 吴海青, 马玉珍, 等. 牛脂肪间充质干细胞的分离、培养与鉴定[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(12): 1645-1651.
- [29] Diao Y, Ma Q, Cui F, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 91(1): 123-131.
- [30] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.