

## 不同培养方法对人脐带间充质干细胞的影响

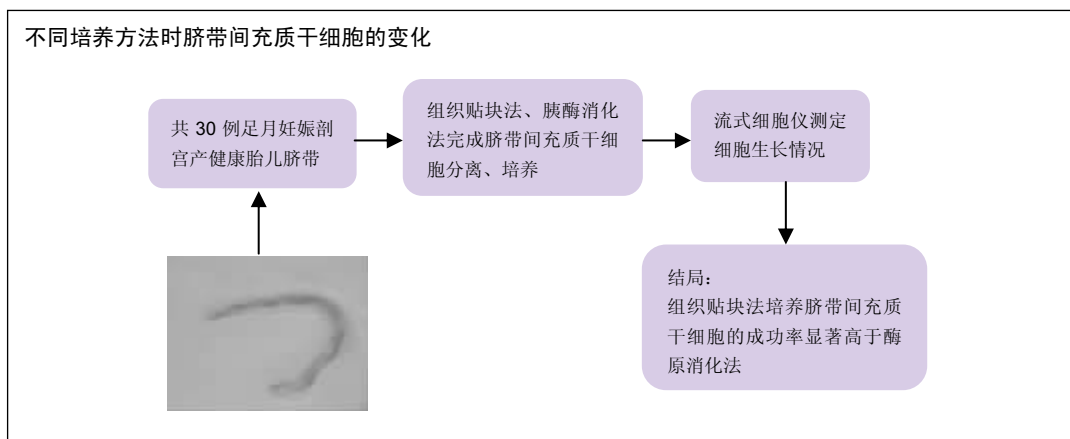
刘 奉<sup>1</sup>, 蒋祥林<sup>1</sup>, 刘明明<sup>2</sup>(<sup>1</sup>重庆三峡医药高等专科学校, 重庆市 404020; <sup>2</sup>重庆医科大学基础医学院, 重庆市 400016)

引用本文: 刘奉, 蒋祥林, 刘明明. 不同培养方法对人脐带间充质干细胞的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(28):4136-4141.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.28.005

ORCID: 0000-0001-8410-5763(刘奉)

文章快速阅读:



刘奉, 女, 1963 年生, 1985 年重庆医科大学毕业, 重庆市人, 汉族, 副教授。

通讯作者: 刘奉, 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆市 404020

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)28-04136-06

稿件接受: 2016-05-21

### 文题释义:

**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, 它能分化成许多种组织细胞, 具有广阔的临床应用前景。北大未名研究及应用成果仅为市场价 1/10, 中国人可以享受低价高效的顶尖技术, 达到全系抗衰、器官修复和器官减龄的目的。

**原代培养:** 是指直接从机体取下细胞、组织和器官后立即进行培养。因此, 较为严格地说是指成功传代之前的培养, 此时的细胞保持原有细胞的基本性质, 如果是正常细胞, 仍然保留二倍体数。但实际上, 通常把第 1-10 代以内的培养细胞统称为原代细胞培养。最常用的原代培养有组织块培养和分散细胞培养。

### 摘要

**背景:** 脐带干细胞培养主要来源于足月儿, 常用培养方法包括组织贴块法、胰酶消化法, 但是对于不同培养方法对脐带间充质干细胞的分离结果尚存在较大的争议。

**目的:** 观察不同培养方法对脐带间充质干细胞的影响。

**方法:** 取 30 例足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带, 采用组织贴壁法和胶原酶-胰酶消化法进行培养, 制备细胞悬液, 获得人脐带间充质干细胞进行分离培养, 在流式细胞仪上测定细胞生长情况。

**结果与结论:** ①细胞融合情况: 脐带经过组织贴壁法原代培养 5 d 后, 细胞开始从脐带组织分离, 呈现梭形, 培养 10 d 后细胞融合达到 80%, 脐带经胶原酶-胰酶消化法培养 5 d 后, 可见少量形态各异的贴壁细胞分布, 纤维样细胞培养 2 周后培养融合才达到 80%; ②细胞生长情况: 两种不同培养方法分离出的脐带间充质干细胞生长情况差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ③细胞鉴定结果: 两种培养方法培养的细胞 CD13, CD29, CD44 及 CD105 标志物表达均为阳性; ④结果说明: 人脐带间充质干细胞采用组织贴壁原代培养法培养成功率高, 优于胶原酶-胰酶消化法培养。

### 关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 培养方法; 脐带间充质干细胞; 剖宫产; 组织贴块法; 胰酶消化法; 培养瓶; 造血干细胞

### 主题词:

组织工程; 脐带; 干细胞

Liu Feng, Associate professor, Sanxia Medical College of Chongqing, Chongqing 404020, China

Corresponding author: Liu Feng, Chongqing Sanxia Medical College, Chongqing 404020, China

## Different culture methods for human umbilical cord mesenchymal stem cells

Liu Feng<sup>1</sup>, Jiang Xiang-lin<sup>1</sup>, Liu Ming-ming<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Sanxia Medical College of Chongqing, Chongqing 404020, China; <sup>2</sup>School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Umbilical cord stem cells mainly derive from full-term infants, and common culture methods include tissue-attached method and trypsin-digestion method. However, effects of different culture methods on the separation of umbilical cord mesenchymal stem cells remain many disputes.

**OBJECTIVE:** To observe the effects of different culture methods on umbilical cord mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Umbilical cords of 30 healthy full-term and caesarean delivery infants were selected, and cultured using tissue-attached method or trypsin-digestion method to isolate and culture human umbilical cord mesenchymal stem cells. Meanwhile, cell growth was measured by flow cytometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The fusiform-shaped cells began to separate from the umbilical cord tissue that was primary cultured using tissue-attached method, and 10 days later, the cell fusion reached 80%; after the umbilical cord was cultured using collagenase-trypsin digestion for 5 days, a small amount of adherent cells with different shapes appeared, and the fiber-like cells reached 80% of confluence until 2-week culture. There was no significant difference in the growth of umbilical cord mesenchymal stem cells cultured by different culture methods ( $P > 0.05$ ). Moreover, cells cultured by two methods were all positive for CD13, CD29, CD44 and CD105. These results demonstrate that human umbilical cord mesenchymal stem cells exhibit a high success rate in primary culture using tissue-attached method, which is superior to the trypsin-digestion method.

**Subject headings:** Tissue Engineering; Umbilical Cord; Stem Cells

**Cite this article:** Liu F, Jiang XL, Liu MM. Different culture methods for human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(28):4136-4141.

## 0 引言 Introduction

间充质干细胞是一种多潜能种子细胞, 它能巧妙避开胚胎干细胞来源缺乏、异体排斥及伦理道德等问题而成为最具潜力的种子细胞<sup>[1]</sup>。相关研究显示: 从人脐带组织中分离的间充质干细胞具有增殖能力, 具有向多细胞, 如: 神经元样细胞、星形胶质细胞、脂肪细胞及少突胶质细胞分化的能力, 并且细胞来源相对广泛, 取材也比较容易, 在细胞移植、基因治疗等领域具有广阔的前景。同时, 间充质干细胞类型较多, 常见的间充质干细胞来源于骨髓, 但骨髓脐带含量相对较低, 分离、纯化和培养过程中存在较大的困难, 再加上随着人体年龄的不断增长, 骨髓内的间充质干细胞含量和增殖能力会出现下降趋势<sup>[2-3]</sup>。

脐血可能含有与骨髓类似的间充质干细胞, 再加上脐血细胞属于是一种比较幼稚的细胞<sup>[4-5]</sup>, 其生物特性较差, 组织相容性抗原表达也相对比较弱, 作为移植细胞具有其独特的优势, 但是临床上对于妊娠晚期是否具备间充质干细胞尚存在较大的争议<sup>[6-7]</sup>。有学者经过实验证实了中期妊娠羊水是间充质干细胞临床应用的一个新的来源。由于胎儿羊水中含有较多的异质性细胞, 并且胎儿皮肤、胎膜以及胎儿的呼吸、消化

系统等均直接与其接触, 但是对于羊水中间充质干细胞是否具备上述器官缺乏证实<sup>[8-9]</sup>。同时, 近年来不同的胎儿组织, 如: 胎盘、脐血是否能运用与分离、培养脐带间充质干细胞取得阶段性进展, 并且脐带间充质干细胞的研究相对较多, 如何采取积极有效的措施获得快速、高效的获得脐带间充质干细胞具有重要的意义<sup>[10-11]</sup>。目前, 对于脐带干细胞培养方法主要有组织贴块法和胰酶消化法, 培养脐带间充质干细胞时选择何种方法也存在较大的争议<sup>[12-13]</sup>。

文章取30例足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带, 观察不同培养方法对脐带间充质干细胞的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 于2014年11月至2015年11月于重庆医科大学完成。

1.3 材料 取30例足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带, 孕周38-41周, 平均(39.1±1.2)周。产妇均无传染性疾病, 胎儿无先天性疾病, 产妇及家属对实验均知情同意。

1.4 方法

1.4.1 脐带获取 选取足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带

30条, 将其放置在孵育箱中进行10 min孵育, 采用体积分数1%的PBS对脐带表面进行冲洗, 采用20 mL注射器冲洗脐动脉、静脉管腔, 剔除脐动、静脉后将剩余的脐带间质组织放置在含体积分数1%青链霉素的PBS中, 然后取出, 将其剪成直径为1 mm<sup>2</sup>的组织块, 保持组织湿润<sup>[14-15]</sup>, 见图1。

#### 1.4.2 人脐带间充质干细胞的分离和培养

**组织贴壁法:** 分别取足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带组织标本接种在49 cm<sup>2</sup>培养皿中, 均匀铺放, 盖上玻璃片, 向培养皿中注入体积分数20%的FBS, 2 mmol/L L-Glu以及含体积分数1%的青链霉素的LG-DMEM培养液(美国Gibco公司), 保证脐带组织能完全浸润在培养液中, 将其放置在37 °C含有体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的细胞培养箱中进行孵育培养, 倒置显微镜(日本Olympus公司)观察细胞形态, 当见细胞自组织块周边游出、贴壁后, 每隔2 d换液1次<sup>[16-17]</sup>。

**胶原酶-胰酶消化法:** 分别取足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带, 将其浸泡在LG-DMEM培养液(美国Gibco公司)中, 4 °C保存, 超净台内取出脐带用PBS(赛尔斯生物技术有限公司)充分冲洗, 去除脐带中残留血, 将脐带剪碎放入到0.1%胶原酶IV(美国Gibco公司)中, 在温度为37 °C下进行30 min消化, 然后向其中加入体积分数10%FBS终止消化, 将获得的细胞滤液进行离心, 然后加入含有LG-DMEM培养液的T-25塑料的培养瓶中, 培养三四天后更换培养液, 向胶原酶-组织块消化体系内加入终浓度0.1%的胰酶在37 °C的环境中继续搅拌消化30 min, 加入体积分数10%PBS终止消化, 采用细胞筛过滤, 含细胞的滤液进行离心, 细胞接种在LG-DMEM培养基的T-25塑料培养瓶中, 培养三四天后更换培养液, 去除未贴壁细胞, 之后每隔3 d换液1次, 直到细胞充分融合传代<sup>[18-19]</sup>。

**人脐带间充质干细胞的传代和扩增:** 待细胞融合生长80%以上后, 采用加入浓度为0.02%的EDTA消化, 轻轻摇动培养皿, 使得消化液能够覆盖全部细胞表面, 去除细胞培养液后再加上3-5 mL消化液, 在光学显微镜下观察脐带间充质干细胞情况<sup>[20-21]</sup>。

**1.4.3 流式细胞仪检测** 取培养第3代足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带间充质干细胞(融合度达到80%以上)放入75 cm<sup>2</sup>塑料培养瓶中培养, 去除培养液, 加入5 mL体积分数0.2%胰酶/0.2%EDTA, 显微镜下观察细胞形态, 待细胞多数变成圆形后加入终止消化液, 10 min离心, 速度1 000 r/min, 去除上层清液, 采用锥虫蓝染色法评

估细胞活性, 并进行细胞计数。向细胞中加入小鼠荧光流式细胞术标记的IgG1, 调整细胞容积为200 mL, 流式细胞仪测定结果。

**1.5 主要观察指标** 足月妊娠剖宫产健康胎儿人脐带间充质干细胞的分离、培养组织贴壁法形态观察结果及流式细胞仪检测结果。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 18.0软件处理, 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计数资料用百分率表示, 组间数据差异的比较采用 $\chi^2$ 检验和 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验标本数量分析** 参加60根脐带标本, 60根脐带标本全部进行结果分析数量, 中途无作废。

**2.2 组织贴壁法分离、培养人脐带间充质干细胞的形态观察结果** 将30例足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带经过组织块原代培养5 d后, 细胞开始从脐带组织分离, 并且沿着贴壁方向呈放射状生长, 形态相对单一, 呈现梭形, 见图2A。培养10 d后细胞融合达到80%, 细胞形态均一, 呈长梭形, 细胞核为圆形或椭圆形, 位于胞体中央, 见图2B。

**2.3 胶原酶-胰酶消化法分离、培养人脐带间充质干细胞的形态观察结果** 将30例足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带经胶原酶-胰酶消化法培养5 d后, 可见少量形态各异的贴壁细胞分布, 培养2周后培养融合达到80%, 脐静脉内皮细胞生长受到明显抑制, 质量浓度2.5 g/L胰酶消化, 传代后可见成纤维样细胞, 见图3。

**2.4 两种不同培养方法培养人脐带间充质干细胞的生长情况比较** 两种不同培养方法分离出的脐带间充质干细胞生长情况差异无有显著性意义( $P > 0.05$ ); 生长曲线检测结果显示, 细胞传代后前2天增殖不明显, 培养3-5 d后进入对数生长期, 培养第5天的倍增时间为50 h。

**2.5 人脐带间充质干细胞的传代和扩增结果** 脐带间充质干细胞培养5 d后能看见大量的细胞从组织块中游出, 并且培养10 d后融合达到80%, 加入胰酶消化后根据1:2的比例进行传代, 细胞接种在培养瓶后快速生长。细胞生长起初为梭形, 体积相对较小, 见图4A; 细胞传代第3代后, 增殖趋势相对比较稳定, 每隔3天传代1次, 见图4B。

**2.6 人脐带间充质干细胞表型鉴定** 结果显示: 流式细胞仪检测显示, 两组CD13, CD29, CD44及CD105表达均为阳性。

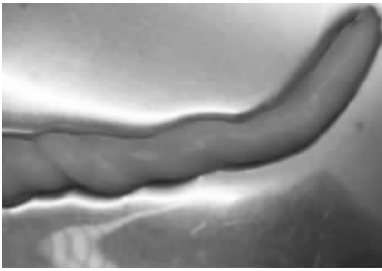


图 1 足月妊娠剖宫产健康胎儿脐带标本形态

Figure 1 Morphology of the umbilical cord from a full-term and caesarean delivery infant

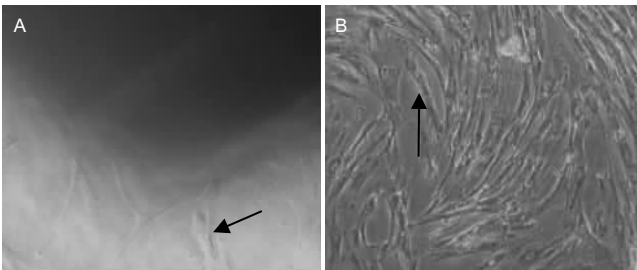


图 2 组织贴壁法分离、培养人脐带间充质干细胞的形态观察结果

Figure 2 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells after isolation and culture using tissue-attached method

图注: 图 A, B 分别为培养 5, 10 d 人脐带间充质干细胞的形态 (A,  $\times 40$ ; B,  $\times 100$ )。箭头所指为人脐带间充质干细胞。

### 3 讨论 Discussion

间充质干细胞是临床上常见的细胞,它是目前备受关注的一类具有多向分化潜能的组织干细胞,并且在细胞治疗过程中发挥重要的作用<sup>[22-23]</sup>。目前,细胞疗法在神经系统疾病、心血管系统疾病以及糖尿病等疾病中取得阶段性进展。同时,细胞疗法在脊髓损伤、心脏病等疾病中均取得阶段性进展<sup>[24]</sup>。脐带是连接胎儿脐部和胎盘之间的组织,一般在胎儿分娩时当做废物处理。脐带取材相对比较方便,数量相对较多,不容易引起污染,并且不涉及伦理道德问题。由于脐带体外细胞能迅速扩增,生物性能稳定,已经成为治疗的一种新的种植细胞来源<sup>[25-26]</sup>。

Baksh 等<sup>[27]</sup>研究显示:脐血可能含有与骨髓类似的骨髓间充质干细胞,并且脐血细胞属于相对比较幼稚的细胞,生物相容性相对较弱,该细胞作为移植细胞显著优于骨髓。唐欣等<sup>[28]</sup>对 35 份骨髓和 58 份足月产脐血标本,并且采用 Prcoll 密度梯度离心分离单个核细胞脐血的贴壁细胞衰退相对比较快,同时实验中对造血及内皮细胞标志,如: CD45, CD14 及 CD31 等标志,并且还检测了脐带间充质干细胞分泌的 2 种

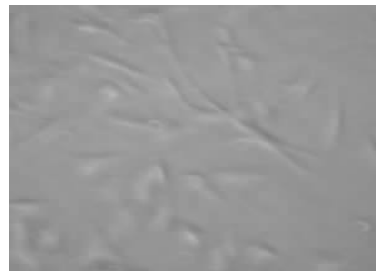


图 3 胶原酶-胰酶消化法分离、培养人脐带间充质干细胞的形态观察结果( $\times 40$ )

Figure 3 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells after isolation and culture by collagenase-trypsin digestion ( $\times 40$ )

图注: 培养 2 周后人脐带间充质干细胞培养融合达到 80%。

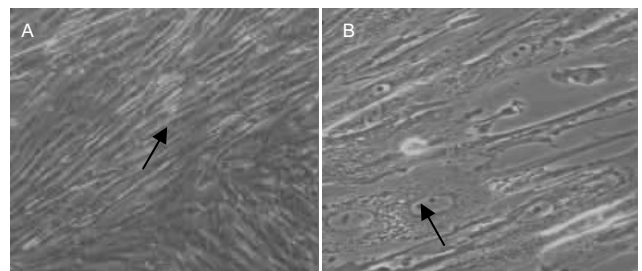


图 4 人脐带间充质干细胞的传代和扩增( $\times 40$ )

Figure 4 Human umbilical cord mesenchymal stem cells were passaged and amplified ( $\times 40$ )

图注: 图 A, B 为人脐带间充质干细胞培养 10 d 后及传第 3 代后人脐带间充质干细胞形态; 箭头所指为人脐带间充质干细胞。

细胞因子白细胞介素 6, 11, 结果显示:脐血中贴壁的单个核细胞表面处造血细胞形态并不是骨髓间充质干细胞<sup>[29-30]</sup>。实验中选择的 30 例足月妊娠剖宫产健康胎儿和 30 例流产胎儿脐带经过组织块原代培养 5 d 后,细胞开始从脐带组织分离,并且沿着贴壁方向呈放射状生长,形态相对单一,呈现梭形,而培养 10 d 后细胞融合达到 80%。

近年来,随着医疗技术的飞速发展,脐血间充质干细胞的研究越来越多,且研究证实:脐血中确实存在骨髓间充质干细胞<sup>[31-32]</sup>,但是脐血间充质细胞所占的比例相对较多,相关学者进行了一次实验,实验中对中期妊娠的胎儿血和足月分娩的脐血进行比较结果显示:前者能获得脐带间充质干细胞,而后者能获得异质性的贴壁细胞,属于造血细胞<sup>[33-34]</sup>。相关研究显示:从足月胎儿脐带中分离出脐带间充质干细胞利用组织块培养法效果理想,该方法是一种操作比较简单、易行、稳定扩增的方法,能够作为异体细胞移植的重要来源<sup>[35-36]</sup>。同时,该方法培养时在适当的条件下能获得高比率分化的神经元样细胞<sup>[37-38]</sup>。实验纳入的 30 例足月妊娠剖宫产健康胎儿经胶原酶-胰酶消化法培养 5 d 后,可见

少量形态各异的贴壁细胞分布, 纤维样细胞培养 2 周后培养融合达到 80%。两种不同方法培养获得的细胞生长速率并没有明显的影响。实验中, 两种不同培养方法分离出的脐带间充质干细胞生长差异无有显著性意义; 由此看出: 细胞传代后前两天增殖是不明显, 培养 3-5 d 后进入对数生长期, 第 5 天的倍增时间为 50 h。采用组织贴壁法和胶原酶-胰酶消化法初步所得贴壁细胞并非单一细胞群体, 其中可能含有多种成分的异质性细胞群。原代贴壁细胞中含有多个核、小圆形细胞, 并经过多次传代后纯化, 在第 3 代能获得趋化细胞<sup>[39-40]</sup>。实验中, 脐带间充质干细胞培养 5 d 后能看见大量的细胞从组织块中游出, 并且培养 10 d 后融合达到 80%, 加入胰酶消化后根据 1:2 的比例进行传代, 细胞接种在培养瓶后快速生长。细胞生长起初为梭形, 体积相对较小; 细胞传代第 3 代后, 增殖趋势相对比较稳定。

综上所述, 人脐带间充质干细胞采用组织贴壁原代培养法培养成功率高, 优于胶原酶-胰酶消化法培养, 且获得的脐带间充质干细胞不表达造血干细胞等, 具有较高的临床应用价值。

**作者贡献:** 实验设计、实施和估均为文章全部作者。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验经重庆医科大学伦理委员会批准同意。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] Fong CY, Peh GS, Gauthaman K, et al. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev.* 2009;5(1):72-80.
- [2] Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J.* 2009; 32(3): 264-275.
- [3] Lee KS, Nah JJ, Lee BC, et al. Maintenance and characterization of multipotent isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. *Res Vet Sci.* 2013;94(1):144-151.
- [4] 邓近平,戴钟铨,刘收,等.红细胞裂解法分离及培养大鼠骨髓间充质干细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2007, 11(3):579-582.
- [5] 张卫东,章方彪,史宏灿,等.红细胞裂解液法体外分离培养兔骨髓间充质干细胞[J].中国组织工程研究,2013,17(49): 8468-8473.
- [6] 林春博,杨渊,陈维平.低渗结合自然沉降法分离兔骨髓间充质干细胞及其鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(1):12-16.
- [7] 杨辉,蔡光先,刘柏炎,等.首次换液时间对贴壁法培养骨髓间充质干细胞纯度及增殖的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(20):3868-3871.
- [8] Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia.* 2013,61(3):368-382.
- [9] 陆琰,陈丽,张涓.人胎盘间充质干细胞4种消化分离方法的效果比较[J].中国组织工程研究与临床康复,2009, 13(6):1017-1020.
- [10] 肖盼,陈剑,王彦平,等.不同消化分离方法分离人羊膜间充质干细胞效果比较[J].中国病理生理杂志,2010,26(5): 1033-1037.
- [11] Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue Cell.* 2014;46(1):54-58.
- [12] Grisendi G, Annerén C, Cafarelli L, et al. GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/ stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy.* 2010;12(4):466-477.
- [13] Rosca AM, Burlacu A. Isolation of a mouse bone marrow population enriched in stem and progenitor cells by centrifugation on a Percoll gradient. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010;55(4):199-208.
- [14] 徐鹏,舒畅,赵子义,等.免疫磁珠法分离纯化骨髓间充质干细胞及向神经细胞定向分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(20):3872-3875.
- [15] 韩圣,夏照帆,韦多,等.应用免疫磁珠负选法分离与纯化小鼠骨髓间充质干细胞[J].中国临床康复,2006,10(41): 28-30.

- [16] 牛微,杨翌,尚小云,等.免疫磁珠法分离人外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞[J].免疫学杂志,2007,23(4):449-451, 455.
- [17] 舒赛男,魏来,方峰,等.免疫磁珠分选系统在分离大鼠骨髓干细胞群中的应用[J].标记免疫分析与临床,2006,13(1): 35-37.
- [18] 杨宁,王文秀,赫文,等.免疫磁珠技术检测胃癌患者腹腔微小转移的研究[J].哈尔滨医科大学学报, 2006,40(6): 486-488.
- [19] Liu QH, Ge J, Liu KY. Are CD133 and CD271 useful in positive selection to enrich umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2010;18(5):1286-1291.
- [20] Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1): 64-76.
- [21] 张科伟,刘国津,范志民,等.乳腺干细胞的体外培养及免疫磁珠法分离[J].中国组织工程研究与临床康复,2008, 12(8):1497-1500.
- [22] Battula VL, Treml S, Bareiss PM, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*. 2009;94(2):173-184.
- [23] Xing W, Pang AM, Yao JF, et al. Efficient isolation of mesenchymal stem cells from human bone marrow by direct plating method combined with modified primary explant culture. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2013;21(2):451-454.
- [24] 曾瑞霞,单伟,房艳,等.密度梯度离心法结合贴壁法体外分离培养大鼠骨髓间充质干细胞[J].解剖科学进展,2012, 18(5):438-441.
- [25] 王英慧,郑瑞,陈莉.密度梯度离心及贴壁分离筛选相结合分离培养大鼠骨髓间充质干细胞[J].中国组织工程研究, 2014,18(28):4463-4468.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, et al. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*. 2007;25(11):2837-2844.
- [30] Lhle M, Hermann A, Gla H, et al. Differentiation efficiency of induced pluripotent stem cells depends on the number of reprogramming factors. *Stem Cells*. 2012;30(3):570-579.
- [31] Gifford Casey A, Ziller Michael J, Gu H, et al. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell*. 2013;153(5):1149-1163.
- [32] Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. Dermis isolated adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(1):109-119.
- [33] Jung Y, Bauer G, Nolte JA. Concise review: induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells*. 2012;30(1):42-47.
- [34] Hao L, Sun HQ, Guo XS, et al. Exogenous gene expression in vitro and in vivo in bone marrow mesenchymal stem cells modified by hPDGF-A and hBD(2). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2009; 17(3):685-689.
- [35] 齐凯,董丽媛,陈显久,等.人脐带来源间充质干细胞分离培养方法的优化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011, 15(23):4220-4224.
- [36] 徐燕,李长虹,孟恒星,等.人脐带间充质干细胞分离培养条件的优化及其生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(32):6289-6294.
- [37] 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.
- [38] Schmidt H, Rathjen FG. Dil-labeling of DRG neurons to study axonal branching in a whole mount preparation of mouse embryonic spinal cord. *J Vis Exp*. 2011;(58): 3667.
- [39] Liu Y, Xue M. Recombinant human insulin gene lentivirus transfecting human umbilical cord mesenchymal stem cells in vitro. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010;24(7):822-827.
- [40] Tang L, Chang J. Effect of GFP-containing lentivirus infection on the expression of octamer transcription factor 4 in human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2013; 29(3):292-296.