

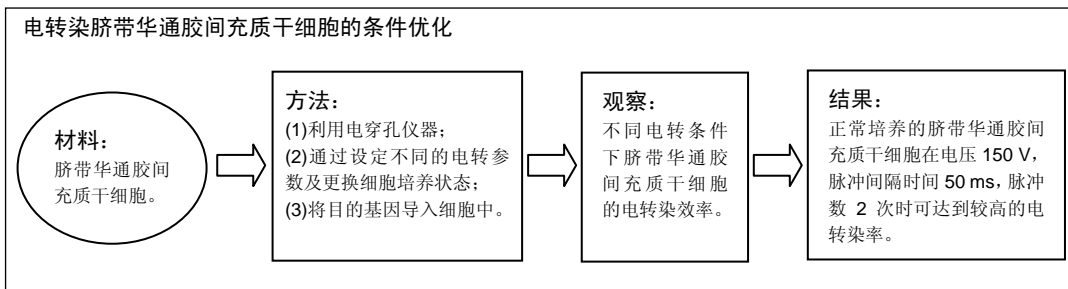
电穿孔法转染脐带华通胶间充质干细胞的最佳条件

王泽^{1,2}, 李春花², 张宁坤², 高连如², 陈宇^{1,2} (¹安徽医科大学海军临床学院, 北京市 100048; ²解放军海军总医院心血管内科, 北京市 100048)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0870

ORCID: 0000-0001-7316-7168(王泽)

文章快速阅读:



王泽, 女, 1991 年生, 安徽省池州市人, 汉族, 安徽医科大学海军临床学院在读硕士, 主要从事干细胞治疗的研究。

通讯作者: 陈宇, 博士, 博士后, 副主任医师, 硕士生导师, 安徽医科大学海军临床学院, 北京市 100048; 解放军海军总医院心血管内科, 北京市 100048

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2018-05-15



文题释义:

脐带华通胶间充质干细胞: 脐带华通胶间充质干细胞富含透明质酸, 占脐带中黏多糖的 70%, 形成成纤维细胞周围的水凝胶结构, 确保脐带中不仅含有大量的胶原纤维, 还包括大量增殖能力极强的间充质干细胞。华通胶曾被认为是医疗的废弃物, 然而现在很多研究者都以此为干细胞中的研究重点, 认为其是理想的种子细胞。

电穿孔: 当生物细胞暴露于足够幅度的脉冲电场时, 它们的质膜通透性增加。在膜通透性增加时, 不能进入细胞的分子可被导入细胞内部, 或者细胞组分可从细胞中泄漏出来, 这个现象称为电穿孔。电穿孔可有效转染干细胞等转染较难的细胞系, 从而成为近 10 年来研究主题之一。

摘要

背景: 脐带华通胶间充质干细胞是目前较为原始的干细胞, 为当前干细胞的研究热点之一, 是基因治疗的理想载体。然而, 目前尚未有对脐带华通胶间充质干细胞电转染条件的研究, 因此探索脐带华通胶间充质干细胞的电转染最佳条件占据重要地位。

目的: 探讨不同电穿孔条件对脐带华通胶间充质干细胞转染率的影响, 以确定最佳电转染条件。

方法: 通过控制电压、脉冲时长及细胞状态等转染条件, 采用不同条件组合后用电穿孔法将质粒 EEV-EGFP 转入脐带华通胶间充质干细胞, 流式细胞仪检测转染率。

结果与结论: ①电压自 125 V 至 150 V, 转染率呈现递增趋势, 150 V 时获得最大转染率, 但将电压进一步调高至 170 V, 转染率开始显著降低; ②脉冲时长为 5.0 ms 时获得最大转染率; 脉冲时长为 2.5 ms 和 7.5 ms 时转染效率均有所降低; ③与低氧培养比较, 正常培养的细胞转染率更高; ④结果表明, 正常培养的脐带华通胶间充质干细胞在电压 150 V、脉冲时长 5.0 ms、脉冲间隔时间 50 ms、脉冲数 2 次时可达到较高的电转染率。

关键词:

电穿孔; 电转染; 华通胶间充质干细胞; 华通胶; 低氧培养; 干细胞; 国家自然科学基金

主题词:

脐带; 间质干细胞; 转染; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(81370238, 81370901)

缩略语:

脐带华通胶间充质干细胞: wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs; 增强型绿色荧光蛋白: enhanced green fluorescent protein, EGFP

Optimal conditions for transfecting Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells with electroporation method

Wang Ze^{1,2}, Li Chun-hua², Zhang Ning-kun², Gao Lian-ru², Chen Yu^{1,2} (¹The Navy Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048, China; ²Department of Cardiology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China)

Abstract

BACKGROUND: Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells are relatively primitive stem cells that are ideal vectors for gene therapy. However, there is a lack of studies on the conditions for the electrotransfection of

Wang Ze, Master candidate, the Navy Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048, China; Department of Cardiology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

Corresponding author: Chen Yu, M.D., Associate chief physician, Master's supervisor, the Navy Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048, China; Department of Cardiology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. Therefore, exploring the optimal conditions for the electrotransfection of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells occupies an important position.

OBJECTIVE: To investigate the effects of different electroporation conditions on the transfection efficiency of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells, and to explore the optimal conditions for cell electroporation.

METHODS: By controlling the transfection conditions such as voltage, pulse duration and cell status, EEV-EGFP plasmids were transfected into Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells by electroporation under different conditions. Transfection efficiency was detected by flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The transfection efficiency was intended to increase when the voltage ranged from 125 V to 150 V, and the maximum transfection efficiency was obtained when the voltage was 150 V. However, when the voltage was further increased to 170 V, the transfection efficiency began to decrease considerably. (2) The maximum transfection efficiency was obtained when the pulse duration was 5.0 ms, while it was certainly decreased when the pulse duration was 2.5 and 7.5 ms. (3) The transfection efficiency of the cells cultured under normoxia was higher than that under hypoxic culture. These findings reveal that normally cultured Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells can achieve higher electroporation efficiency via two pulse sessions at a voltage of 150 V, pulse duration of 5.0 ms, and pulse interval time of 50 ms.

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Transfection; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81370238, 81370901

0 引言 Introduction

脐带华通胶间充质干细胞(Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs)是近年来干细胞研究的热点,其具有较高的分化潜能,可以分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、内皮细胞、心肌细胞等^[1-5]。此外,WJ-MSCs具有取材方便、增殖能力强、免疫原性低、无致肿瘤性、无伦理学争议等优势^[6-9]。在再生医学领域,将不同基因导入WJ-MSCs进行基因治疗有望成为未来冠心病等疾病临床研究的重点方向。

目前将基因导入真核细胞的方法有许多种,根据所用载体的不同,可将基因转移技术分为病毒类载体技术和非病毒类载体技术。前者利用病毒载体与细胞表面受体的相互识别把外源基因转入受体细胞,而非病毒类载体较病毒载体有较低的毒性和免疫反应,它们没有整合到染色体基因组内,不受细胞或种属特异机制的限制,也不受引入基因大小的限制^[10-11]。目前在非病毒转染的方法中,电穿孔转染方法以其较高的转染率得到了研究者们的青睐。

电穿孔法可有效转染磷酸钙-DNA沉淀物等其他方法转染效果不好的细胞系^[12]。实验用电穿孔法将带有增强型绿色荧光蛋白基因(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的真核表达载体EEV(Enhanced Episome DNA)转染WJ-MSCs,分析各条件下的转染效率,为应用基因表达载体转染WJ-MSCs提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分组对照细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年4月至8月在解放军海军总医院心血管内科实验室完成。

1.3 材料 重组载体EEV-EGFP的构建为美国张剑青博士完成并惠赠,载体EEV的图谱见图1。

实验试剂: 无血清培养基(军事医学科学院); 0.25%胰酶、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 mg/L)(Sigma公司); PBS(HyClone公司); 电转buffer(即Opti-MEM培养基, Invitrogen公司); 感受态大肠杆菌(鼎国昌盛公司); 去内毒素质粒抽提试剂盒(Promega公司)。

实验仪器: 电穿孔仪、2 mm电转杯(NEPA21 Super Electroporator, NEPA GENE公司); 流式细胞仪(Beckman公司); 大容量高速冷冻离心机(美国Beckman公司); DU640核酸蛋白分析仪(美国Beckman公司); 二氧化碳培养箱(Thermo公司); 倒置荧光显微镜(Olympus公司); 恒温细菌摇床。

1.4 实验方法

1.4.1 质粒的制备 将EEV-EGFP转入DH5 α 感受态细胞,静置于冰上30 min,42 °C热激90 s后快速转移至冰上,冷却2 min,加LB培养基800 μ L,37 °C、150 r/min振荡培养1 h,将已转化的感受态细胞均匀涂布于含氨苄青霉素的LB平板上(终质量浓度为100 mg/L),37 °C倒置培养过夜。从培养皿上挑取单菌落,置于5 mL含氨苄青霉素的LB培养液中,37 °C培养箱培养过夜,去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒,核酸蛋白分析仪测定质粒浓度, A_{260}/A_{280} 为1.8-1.9,质量浓度约为1.61 g/L。

1.4.2 WJ-MSCs的培养 实验所用脐带标本来源于海军总医院2016年4月产科40周胎龄剖宫产胎儿,经产妇及其家属同意,产妇健康,无传染性疾病,胎儿无先天性疾病。将脐带组织从取样瓶中取出,用镊子夹住脐带,PBS反复清洗,洗净血凝块。将脐带剪成2.0-3.0 cm的小段,沿脐带静脉血管剪开,剥去静脉血管内膜及动脉血管,撕下胶质层于无菌培养皿中,用PBS清洗后剪成1 mm \times 1 mm \times 1 mm小块,取适量组织块放入75 mL培养瓶中,每瓶加入10 mL无血清培养基,移液管轻轻吹打后混匀,使组织块在培养基中均匀散开,覆盖培养瓶底面,放置于37 °C,体积分数为5%CO₂细胞培养箱中培养,7-10 d后组织块完全固定在培养瓶底,观察细胞生长情况。每一两天换液1次,待细胞长满整个底面,转移组织块并传代。

1.4.3 电转染 所有操作均在无菌条件下进行。实验前,在6孔塑料培养板中加2 mL无血清培养基及电转buffer置于37 °C预热。实验时,WJ-MSCs处于细胞生长对数中期,细胞密度为70%-80%,0.25%胰酶消化,收集细胞,电转buffer洗2遍;用电转buffer重悬细胞,计数板计数,调整细胞浓度至1 \times 10¹⁰ L⁻¹,用微量加样器取98 μ L细胞悬液与

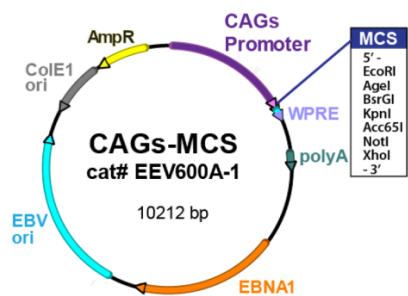


图1 载体 EEV 图谱
Figure 1 The map of vector EEV

表1 不同电压条件下脐带华通胶间充质干细胞的电转染率
($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 1 Electrotransfection efficiency of the Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells under different voltage conditions

电压(V)	转染率(%)
125	15.11±0.91
130	21.98±1.28
140	31.41±1.79
150	44.65±0.98 ^{ab}
170	14.95±0.58

表注: 与 140 V 电压比较, ^aP < 0.05; 与 170 V 电压比较, ^bP < 0.05。

表2 不同脉冲时长条件下脐带华通胶间充质干细胞的电转染率
($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 2 Electrotransfection efficiency of the Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells under different pulse length conditions

脉冲时长(ms)	转染率(%)
2.5	16.35±1.18
5.0	44.65±0.98 ^{ab}
7.5	23.94±3.90

表注: 与脉冲时长 5.0 ms 比较, ^aP < 0.05; 与脉冲时长 7.5 ms 比较, ^bP < 0.05。

表3 不同细胞状态下脐带华通胶间充质干细胞的电转染率
($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 3 Electrotransfection efficiency of the Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells under different cell states

细胞状态	转染率(%)
体积分数 20%正常氧	44.57±0.87
体积分数 5%低氧	33.55±3.98 ^a

表注: 与体积分数 20%正常氧比较, ^aP < 0.01。

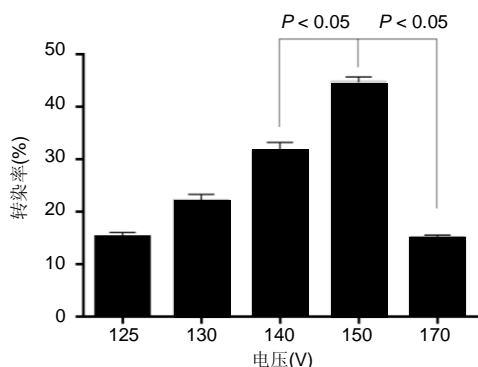


图2 不同电压条件对脐带华通胶间充质干细胞电转染率的影响
Figure 2 Effects of different voltage conditions on the electrotransfection efficiency of the Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells

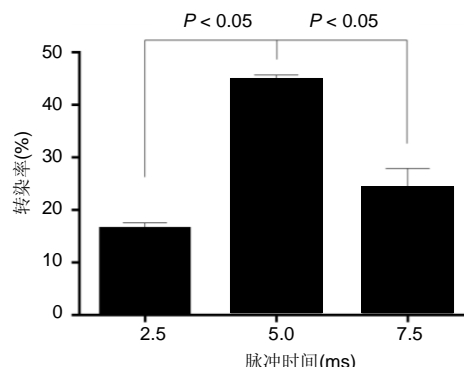


图3 不同脉冲时长条件对脐带华通胶间充质干细胞电转染率的影响
Figure 3 Effects of different pulse length conditions on the electrotransfection efficiency of the Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells

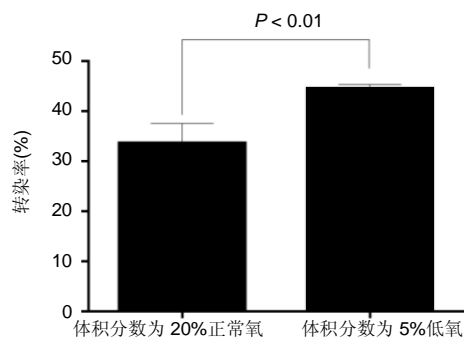


图4 不同细胞状态对脐带华通胶间充质干细胞电转染率的影响
Figure 4 Effects of different cell states on the electrotransfection efficiency of the Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells

10 μg质粒混合均匀。取100 μL混合液沿着电转杯的侧壁缓缓加入, 随后立即将电转杯放入电转槽中, 选择不同的电压、脉冲时长等条件组合电击细胞, 操作完毕后, 快速将电转杯中的细胞转移到6孔塑料培养板中, 放入饱和湿度 37 °C, 体积分数为5%CO₂细胞培养箱静置培养。

1.4.4 不同电转染条件及电转染效率的确定 观察不同电压(125, 130, 140, 150, 170 V)、不同脉冲时间(2.5, 5.0, 7.5 ms)、不同细胞状态(体积分数为20%正常氧、体积分数为5%低氧)对WJ-MSCs电转染效率的影响。电穿孔后48 h进行检测, 该质粒携带EGFP绿色荧光标签, 经质粒转染成功的WJ-MSCs将表达绿色荧光蛋白, 使用流式细

胞仪检测荧光表达率。

1.5 主要观察指标 不同电转染条件下WJ-MSCs的电转染效率。

1.6 统计学分析 应用SPSS 23.0软件进行统计分析。相同条件下每组实验重复3次, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用独立样本 t 检验, 多组间数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 电压对转染率的作用 从125 V起逐渐调节电压至170 V, 脉冲时长选用5 ms, 流式细胞仪分析电转染结果。从表1中可知150 V时获得最大转染率; 从图2中可观察到电压自125 V至150 V, 转染率呈现递增趋势, 但将电压进一步调高至170 V, 转染率开始显著降低。

2.2 脉冲时长对转染率的作用 电压选用150 V, 脉冲时长选用2.5, 5.0, 7.5 ms共3个档位, 流式细胞仪分析电转染结果。从表2中可知脉冲时长为5.0 ms时获得最大转染率, 脉冲时长为2.5 ms和7.5 ms时转染效率均有所降低。从图3中观察可得脉冲时长为5 ms时与2.5 ms及7.5 ms时的转染率差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 细胞状态对转染率的作用 分析上述2个条件的转染率结果, 采用电压150 V、脉冲时长5.0 ms这个最佳搭配条件, 取低氧培养箱中培养24 h后的WJ-MSCs进行电转, 发现低氧培养时细胞电转后虽然死亡率降低, 但是电转效率亦较低(表3和图4)。

3 讨论 Discussion

电穿孔法是应用短暂的高压电流脉冲诱导活细胞产生跨膜电位, 由于外加电场强度大于细胞膜穿孔的临界值, 引起细胞质膜结构暂时性改变, 使多种细胞质膜形成纳米级微孔, DNA等外源基因通过这些微孔或者通过伴随微孔关闭时膜成分的再分布而直接进入细胞质^[13-14]。大多数细胞系通过传统转染技术就可提高转染效率, 而在间充质干细胞中却无法实现, 干细胞转染相对来说转染难度较大。电穿孔法是转染技术的重要发现, 该技术具有高度可重复性, 其可以有效转染干细胞, 方法容易优化, 且能在实现高转染效率的同时, 不会对间充质干细胞的多能性产生不利影响^[15-18]。电穿孔转染的效率主要受以下几种因素的影响: ①外加电场的强度。电压过低, 培养细胞质膜的改变不足以允许DNA分子通过; 电压过高, 细胞会受到不可逆转的损害。通常经过电穿孔, 只有20%~50%的细胞可以存活; ②电脉冲的长度。通常单个电脉冲可以通过细胞。电脉冲的长度、形状和强度由所供电容量和电转化池的大小决定^[19-22]。

研究者们探索了不同细胞电转染条件的优化, 大多数研究选用的是骨髓间充质干细胞, 同时对其电转染条件优化的研究较少^[23-25]。王晓军等^[26]对大鼠骨髓间充质干细胞

进行电转染, 流式细胞仪分析可知转染率为(32.8±3.0)%。张平等^[27]成功对大鼠骨髓间充质干细胞进行电转染, 结果显示瞬时转染率达20%, 之后对其进行筛选, 基因阳性表达率可达80%。Helledie等^[28]对人骨髓间充质干细胞的电转染条件展开研究, 发现细胞数为 1×10^6 个、质粒为60 μg 、电转缓冲液为Opti-MEM时, 转染率有所提高。

近几年来, WJ-MSCs已成为干细胞中的研究热点, 其是胚外来源的间充质干细胞, 既没有胚胎干细胞的伦理道德、免疫排斥及致瘤性, 且较骨髓间充质干细胞更原始, 增殖能力更强, 是目前基因治疗的理想种子细胞^[29-32]。然而, 目前国内外针对WJ-MSCs电转染条件的研究却寥寥无几。实验首先观察电压对转染率的影响, 当电压从125 V起逐渐升高, 转染率亦随之逐渐增加, 但电压到150 V之后, 转染率开始下降, 整个曲线呈抛物线样; 电压为150 V时, 转染率达到了(44.65±0.98)%, 与电压为140 V及170 V时的转染率差异有显著性意义($P < 0.05$), 结果表明电压为150 V时的转染率达到最高; 接着观察脉冲时长与转染率之间的关系, 脉冲时长从2.5 ms逐步调节至7.5 ms, 随着脉冲时长的延长, 转染率上升到一个最高点后下降, 从图表中可知最高转染率对应5.0 ms脉冲时长, 这与改变电压条件的转染率曲线图类似。将脉冲时长为5.0 ms分别与2.5, 7.5 ms的转染率进行比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 证实5.0 ms为最佳脉冲时长。

早在2010年, Nekanti等^[33]体外低氧培养人WJ-MSCs, 发现低氧状态下能促进细胞增殖。宋希拿等^[34]证实低氧培养人脐带间充质干细胞能促进其增殖并抑制凋亡, 同时可保留其干细胞的特性。基于电转染时细胞死亡率稍高, 作者考虑改变细胞的培养状态后是否能在不改变转染率的前提下, 降低细胞死亡率。将细胞放入低氧培养箱, 24 h后进行电转染, 显微镜下可见细胞死亡率显著降低, 然而转染率并未提高, 与正常培养的细胞相比, 转染率反而明显降低($P < 0.01$), 表明低氧处理并不能提高转染的效率。

电转染是一种有前景的方法, 没有生物污染和免疫反应, 它适用于所有细胞类型, 包括最原始的WJ-MSCs^[35-36]。然而, 实验也存在不足之处, 即电穿孔时对电压、脉冲时长的取值不够精确。综上所述, 实验通过探索WJ-MSCs电转染条件, 表明正常培养的WJ-MSCs在电压150 V、脉冲时长5.0 ms、脉冲间隔时间50 ms、脉冲数2次时可达到较高的电转染率。该研究以WJ-MSCs为研究模型, 为冠心病等疾病基因修饰的干细胞治疗研究奠定了基础。

致谢: 感谢高连如教授和陈宇副教授的指导, 感谢李春花实验员的帮助, 感谢海军总医院心血管内科实验室提供实验平台。

作者贡献: 实验设计为第一、二、四作者, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为第三作者和通讯作者。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81370238, 81370901)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中

不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合解放军海军总医院的相关伦理要求。

知情同意问题: 实验所用脐带标本来源于海军总医院妇产科, 经产妇和相关家属知情同意, 并签署知情同意书。

写作指南: 本研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经解放军海军总医院生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Fu YS, Lu CH, Chu KA, et al. Xenograft of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Differentiating into Osteocytes and Reducing Osteoclast Activity Reverses Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Cell Transplant*. 2018;27(1):194-208.
- [2] Udalamaththa VL, Jayasinghe CD, Udagama PV. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):110.
- [3] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015;24(3):339-347.
- [4] Sierra-Sanchez A, Ordonez-Luque A, Espinosa-Ibanez O, et al. Epithelial in vitro differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018 May 1. doi: 10.2174/1574888X13666180501120416. [Epub ahead of print]
- [5] Merlo B, Teti G, Mazzotti E, et al. Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Comparing Human and Horse. *Stem Cell Rev*. 2018 Mar 5. doi: 10.1007/s12015-018-9803-3. [Epub ahead of print]
- [6] Lo Iacono M, Anzalone R, La Rocca G, et al. Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells as a Feeder Layer for the Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: a Review. *Stem Cell Rev*. 2017;13(1):35-49.
- [7] Joerger-Messeri MS, Marx C, Oppliger B, et al. Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016;31:30-44.
- [8] Joshi KS, Bhonde R. Insights from Ayurveda for translational stem cell research. *J Ayurveda Integr Med*. 2014;5(1):4-10.
- [9] Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, et al. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013;8(2):144-155.
- [10] 冯一梅,徐辉. 间充质干细胞基因转染的相关研究现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(11):2118-2121.
- [11] 张禾璇,何燕,张婷,等. HepG2细胞电转染条件的优化[J]. 山东医药, 2013, 53(42):1-4.
- [12] 钟翠丽,李国玲,莫健新,等.不同电转仪的电转参数、质粒用量和拓扑结构对猪胎儿成纤维细胞转染效率的影响[J]. 遗传, 2017, 39(10):930-938.
- [13] 张禾璇,单可人,何燕,等.脂质体法与电穿孔法转染两种细胞效率的比较[J].重庆医学, 2014,43(33):4432-4433.
- [14] 加三三,胡俊,李美宁,等.慢病毒转染和电转染原代C57BL/6小鼠神经干细胞的比较[J].中国现代医学杂志, 2017,27(6):6-9.
- [15] André F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther*. 2004;11 Suppl 1: S33-42.
- [16] Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;4:99.
- [17] Mellott AJ, Godsey ME, Shinogle HE, et al. Improving viability and transfection efficiency with human umbilical cord wharton's jelly cells through use of a ROCK inhibitor. *Cell Reprogram*. 2014;16(2):91-97.
- [18] Gresch O, Engel FB, Nesic D, et al. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*. 2004;33(2):151-163.
- [19] Ferreira E, Potier E, Logeart-Avramoglou D, et al. Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Ther*. 2008;15(7):537-544.
- [20] 钟翠丽,李国玲,莫健新,等.不同电转仪的电转参数、质粒用量和拓扑结构对猪胎儿成纤维细胞转染效率的影响[J].遗传, 2017, 39(10):930-938.
- [21] Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T, et al. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J Gene Med*. 2004;6(7):809-816.
- [22] Baum C, Forster P, Hegewisch-Becker S, et al. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques*. 1994;17(6):1058-1062.
- [23] Abdul Halim NS, Fakiruddin KS, Ali SA, et al. A comparative study of non-viral gene delivery techniques to human adipose-derived mesenchymal stem cell. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15044-15060.
- [24] Liew A, André FM, Lesueur LL, et al. Robust, efficient, and practical electrogene transfer method for human mesenchymal stem cells using square electric pulses. *Hum Gene Ther Methods*. 2013;24(5):289-297.
- [25] Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, et al. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol*. 2005;30(1):9-20.
- [26] 王晓军,崔连群,王敏,等.增强型绿色荧光蛋白基因电穿孔转染骨髓间充质干细胞的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(1):16-22.
- [27] 张平,赵钢勇,陈凯,等.重组质粒pIRESneo-EGFP-BDNF构建及转染骨髓间充质干细胞[J]. 医学研究与教育,2012,29(1):7-11.
- [28] Helledie T, Nurcombe V, Cool SM. A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(4):837-848.
- [29] Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(7):1620-1630.
- [30] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91(8):1017-1026.
- [31] Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, et al. Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran*. 2018;56(1):28-33.
- [32] Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, et al. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell Tissue Res*. 2018;372(1):51-65.
- [33] Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, et al. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int J Biol Sci*. 2010;6(5):499-512.
- [34] 宋希拿,孟恒星,张宇光,等.低氧对人脐带间充质干细胞生物学特性及增殖的影响[J]. 生物医学工程与临床,2014,18(2):106-112.
- [35] Zhang Z, Qiu S, Zhang X, et al. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. *BMC Biotechnol*. 2018;18(1):4.
- [36] Wang W, Xu X, Li Z, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells by non-viral gene delivery. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;58(1):19-48.