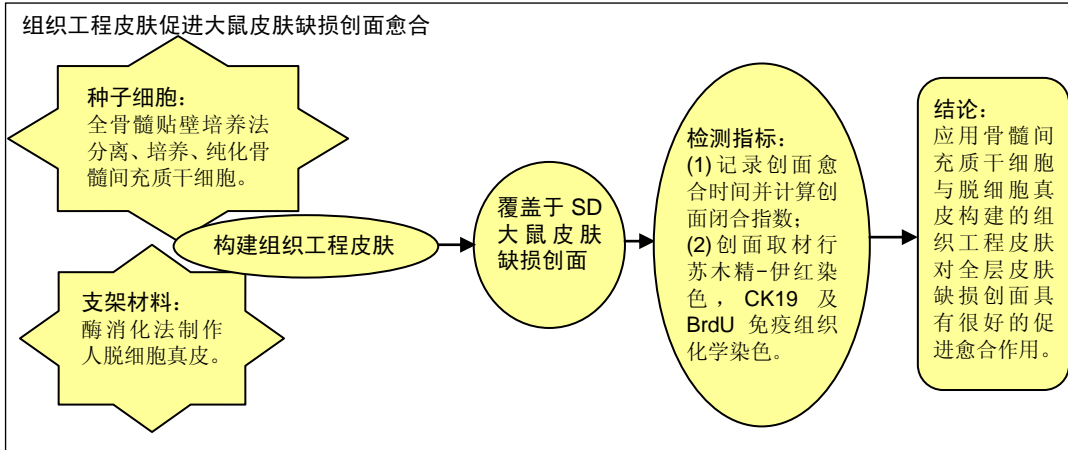


# 人脱细胞真皮复合骨髓间充质干细胞构建组织工程皮肤修复皮肤创面缺损

池 凯, 毋 磊, 陈龙金, 李永林(郑州市第一人民医院整形外科, 河南省郑州市 450000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0889 ORCID: 0000-0002-1011-7187(池凯)

文章快速阅读:



池凯, 男, 硕士, 主要从事组织修复与创面愈合研究。

通讯作者: 李永林, 博士, 郑州市第一人民医院整形外科, 河南省郑州市 450000

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
稿件接受: 2018-05-03



## 文题释义:

**脱细胞真皮基质:** 是由动物或人类皮肤制成的无细胞组织薄片。它去除了皮肤的全层表皮及真皮层中的全部细胞成分, 而保留了真皮的胶原成分和组织基本结构, 同时也保留了基底膜成分。由于皮肤移植中的排斥反应主要是由细胞免疫引起, 在去除了具有较强原性的细胞成分后, 以胶原蛋白为主要成分的脱细胞真皮基质本身抗原性很低, 几乎不引起宿主的排斥反应, 可以在宿主体内长期存留并最终被降解和引导正常组织重建。

**角蛋白:** 属于细胞支架蛋白质类, 它通过形成中间纤维网络维持上皮细胞和组织的完整性。角蛋白 19 作为细胞中间丝的重要组成能起到维持细胞形态的作用。细胞角蛋白 19 是检测表皮干细胞的重要指标, 在正常皮肤的基底层细胞呈阳性表达, 在皮肤鳞状细胞癌中的表达与细胞的分化程度有关, 分化越低表达越强, 分化越高表达越弱, 甚至不表达。

## 摘要

**背景:** 构建组织工程皮肤的种子细胞和支架材料多种多样, 探索更为合适的构建方法亦是国内外专家学者争相研究的热点。

**目的:** 探讨组织工程皮肤促进大鼠皮肤缺损创面愈合的可行性。

**方法:** 选用 6-8 周龄 SD 大鼠, 采用全骨髓贴壁培养法分离、培养、纯化骨髓间充质干细胞。利用人包皮为材料, 采用酶消化法制作脱细胞真皮。以骨髓间充质干细胞为种子细胞, 脱细胞真皮为支架材料, 构建组织工程皮肤, 将其覆盖于 SD 大鼠皮肤缺损创面, 另设置单纯移植脱细胞真皮组和空白对照组。记录创面愈合时间并计算创面闭合指数。移植 2 周后创面取材行苏木精-伊红染色, CK19 及 BrdU 免疫组织化学染色, 以评价创面的愈合情况。

**结果与结论:** ①3 组创面闭合指数: 组织工程皮肤组>脱细胞真皮组>空白对照组, 组间两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ); ②3 组创面愈合时间: 组织工程皮肤组<脱细胞真皮组<空白对照组, 组间两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ); ③组织工程皮肤组有 BrdU 阳性细胞表达, 组织工程皮肤组 CK19 表达显著高于脱细胞真皮组、空白对照组; ④结果表明, 应用骨髓间充质干细胞与脱细胞真皮构建的组织工程皮肤对全层皮肤缺损创面具有很好的促进愈合作用。

## 关键词:

脱细胞真皮; 骨髓间充质干细胞; 组织工程皮肤; 创面愈合; 生物材料

## 主题词:

骨髓; 间质干细胞; 皮肤移植; 伤口愈合; 组织工程

## Tissue-engineered skin for skin wound repair: construction by human acellular dermal matrix combined with bone marrow mesenchymal stem cells

Chi Kai, Wu Lei, Chen Long-jin, Li Yong-lin (Department of Plastic Surgery, the First People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Chi Kai, Master, Department of Plastic Surgery, the First People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Corresponding author: Li Yong-lin, M.D., Department of Plastic Surgery, the First People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** A variety of seed cells and scaffolds can be used for constructing tissue-engineered skin. Exploring a proper construction method is a hot topic of research.

**OBJECTIVE:** To explore the feasibility of tissue-engineered skin to promote healing of skin wounds in rats.

**METHODS:** Sprague-Dawley rats of 6-8 weeks old were taken to isolate bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) using the whole bone marrow adherent method. Then, BMSCs were cultured and purified *in vitro*. Human foreskin samples were digested using enzyme digestion method to make human acellular dermal matrix (ADM). Tissue-engineered skin was thereafter constructed using BMSCs as seed cells and ADM as the scaffold, to cover the skin defect wound in the rats. Skin wound covered with ADM and nothing was used as ADM and blank control groups, respectively. Wound healing time was recorded and wound closure index was calculated. Evaluation of wound healing was conducted through hematoxylin-eosin, CK19 and BrdU immunohistochemical staining of wound samples at 2 weeks after transplantation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The wound closure indexes in the three groups were ranked as follows: tissue-engineered skin group > ADM group > blank control group, and there were significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). The wound healing time was shortest in the tissue-engineered skin group, shorter in the ADM group and longest in the blank control group, and there were also significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). Cells positive for BrdU were detected in the tissue-engineered skin group, and the expression level of CK19 was significantly higher in the tissue-engineered skin group as compared with the other two groups. In conclusion, the tissue-engineered skin constructed by BMSCs and ADM achieves good outcomes in the repair of full-thickness skin wound.

**Subject headings:** Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Skin Transplantation; Wound Healing; Tissue Engineering

## 0 引言 Introduction

皮肤由表皮、真皮、皮下组织构成,覆盖在整个人体表面,是人体最大的器官,对人体起保护屏障作用。各种原因导致的皮肤缺损是整形外科工作中较为常见的疾病,尤其是烧烫伤、手术后和全身慢性疾病导致的缺损创面,不仅给患者带来身体上的痛苦,也造成了极大的精神压力和沉重的经济负担。目前治疗此类创面的主要方法有自体/复合皮移植、同种异体/异种皮移植<sup>[1]</sup>,但都存在着供区不足、免疫排斥及传播疾病等缺点<sup>[2]</sup>。因此,寻找更好的皮肤代替物来治疗皮肤缺损显得尤为必要。

实验在体外构建骨髓间充质干细胞复合脱细胞真皮的组织工程皮肤,探讨其促进大鼠皮肤缺损创面愈合的可行性,希望为其应用于临床提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 材料

**1.1.1 实验标本** 取自郑州市第一人民医院泌尿外科行包皮环切术后废弃的人包皮,患者年龄5-25岁,无传染病及家族遗传性疾病。

**1.1.2 实验动物** 清洁级成年SD大鼠,6-8周龄,体质量200-250 g,雌雄不限,购自延安大学医学院动物实验中心。

**1.1.3 实验试剂和仪器** SD大鼠骨髓间充质干细胞完全培养基(广州赛业生物科技有限公司);胰蛋白酶、BrdU工作液(美国Sigma公司);十二烷基硫酸钠;Thermo培养箱;超纯水系统;超净工作台;荧光倒置显微镜;酶联免疫检测仪;电子分析天平。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 骨髓间充质干细胞的分离培养** 用体积分数为75%乙醇浸泡颈椎脱臼法处死的SD大鼠20 min,无菌PBS反复冲洗至乙醇无残留,取双侧股骨、胫骨,剪除骨的两端,暴露髓腔,用含抗凝剂肝素的无血清SD大鼠骨髓间充质干细胞基础培养基反复冲洗骨髓腔,制备成单细胞悬液,离心,弃上清,加入SD大鼠骨髓间充质干细胞完全培养基,

分种于2个培养瓶中,以后每2 d换液1次,按1:2比例传代培养,依次标记为第1, 2, 3代等<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 分子标记物检测** 取处于对数生长期的第3代骨髓间充质干细胞, PBS离心洗涤3次, 300目尼龙网过滤,调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ,加入500  $\mu\text{L}$ 适当稀释浓度的FITC标记的鼠抗人CD34、CD44、CD73、CD105单克隆抗体,室温避光孵育30 min,流式细胞仪检测<sup>[4]</sup>。

**1.2.3 脱细胞真皮的制备** 收集泌尿外科行包皮环切术患者包皮,术前均告知实验目的并征得患者同意,将包皮洗净、去脂,剪成2 cm $\times$ 2 cm大小,以1 mol/L NaCl水溶液37  $^{\circ}\text{C}$ 持续振荡24 h,机械分离残留的表皮细胞层,将分离干净的皮片放入盛有0.5% SDS的烧瓶中室温振荡2 h,使真皮中细胞成分完全脱净,将脱细胞真皮在PBS中(含青链霉素)振荡洗涤3-5遍至SDS无残留,取部分脱细胞真皮标本做苏木精-伊红染色观察,证实细胞成分完全脱净。将制备好的脱细胞真皮置PBS中(含青链霉素),4  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用<sup>[5]</sup>。

**1.2.4 组织工程皮肤的构建及检测** 将脱细胞真皮制成直径为1.5 cm的圆形皮片,放入6孔板中,基质面向上,加入完全培养基浸泡12 h,置37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育4 h备用。取处于对数生长期的第3代骨髓间充质干细胞,加入浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU工作液,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育48 h,调整细胞浓度,按 $2.5 \times 10^5$ /孔接种于6孔培养板中(接种前需吸弃原培养基),置37  $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数为5%CO<sub>2</sub>,95%湿度的培养箱中培养,每2 d换液1次,每天在倒置显微镜下观察记录细胞成活及生长状况,连续培养12 d,制作切片,苏木精-伊红染色后进一步观察细胞在脱细胞真皮支架中的生长、伸展情况,培养至14 d,创面移植备用。

**1.2.5 模型制作及分组** 30只SD大鼠,用10%水合氯醛按3 mL/kg麻醉,待麻醉生效后,涂脱毛剂脱毛,将SD大鼠固定在木板上,常规碘伏消毒后,在鼠背部制作3个直径为1.5 cm大小的圆形创面,使基底部深达肌肉层,将背部分成4个象限,将3个创面按象限分成3组,第一象限为不含骨髓间充质干细胞的脱细胞真皮组,第二象限为含有骨髓

间质干细胞的组织工程皮肤组,第三象限为空白对照组。按分组情况分别移植含有骨髓间质干细胞的组织工程皮肤及不含骨髓间质干细胞的脱细胞真皮(图1A),创缘预留打包线,凡士林油纱覆盖,适当压力打包缝合(图1B),空白对照组不移植任何材料仅覆盖凡士林油纱,其他处理同上,术毕,分笼饲养。

**1.3 主要观察指标** 1周后拆除荷包缝线,每日观察记录创面愈合情况,按照伤口完全上皮化的标准,记录每组伤口完全愈合的时间,并在第7,10,14天时创面用透明薄膜覆盖描记创面愈合范围,扫描后采用Image-Pro Plus图像分析软件计算各时间点的创面面积和创面闭合指数(WCI),创面闭合指数=(1-未愈创面面积/原始创面面积)×100%。在第2周时取创面组织标本做苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色,光学显微镜下行组织学观察。

**1.4 统计学分析** 实验数据采用SPSS 17.0统计软件进行处理,完全随机设计采用方差分析,两两组间比较采用最小显著法(LSD),所有结果数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P < 0.05$ (双侧)为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间质干细胞的形态** 采用全骨髓贴壁培养法,第7天时,细胞爬满瓶底达90%,呈长梭形或多角形,1:2传代培养后,8 h左右即可完成贴壁,细胞增殖较快,三四天可长满瓶底,多为长梭形,类似成纤维细胞,呈漩涡状、放射状生长,具有明显的方向性,细胞形态较为均一,见图2。

**2.2 骨髓间质干细胞表面抗原的表达** 应用流式细胞仪检测骨髓间质干细胞表面抗原CD34, CD44, CD73, CD105的表达分别为0.18%, 99.54%, 90.21%, 96.43%, CD34阴性表达, CD44、CD73、CD105阳性表达。有文献报道CD44、CD73及CD105是目前比较公认的骨髓间质干细胞表型分子,实验结果与文献报道一致<sup>[6-9]</sup>。

### 2.3 创面愈合观察结果

**2.3.1 大体观察结果** 创面移植组织工程皮肤后,所有动物全部存活,术后创面干燥,未出现红、肿等感染症状。组织工程皮肤组、脱细胞真皮组创面愈合速度较快,但组织工程皮肤组创面缩小更为明显,空白对照组创面愈合较慢。

术后第2周时,组织工程皮肤组创面完全愈合,创面可见上皮化组织,创面闭合指数为(100±0)%;脱细胞真皮组创面未能完全愈合,创面周围可见向创面中心爬行的上皮,但仍未达到完全上皮化,创面闭合指数为(95.64±1.51)%;空白对照组创面较前明显缩小,仍有一定的创面未愈合,周围未见上皮化组织,创面闭合指数为(84.84±2.55)%,两两组间比较,差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),见图3和表1。

组织工程皮肤组创面完全愈合时间为(14.2±1.5) d,脱细胞真皮组为(16.7±2.3) d,空白对照组为(20.7±3.5) d,

两两组间比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表1 各组不同时间点创面闭合指数比较 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )  
Table 1 Wound closure index at different time after repair

组别	7 d	10 d	14 d
组织工程皮肤组	71.27±4.87 <sup>ab</sup>	94.67±2.65 <sup>ab</sup>	100±0.00 <sup>ab</sup>
脱细胞真皮组	61.71±3.39 <sup>a</sup>	84.64±2.44 <sup>a</sup>	95.64±1.51 <sup>a</sup>
空白对照组	24.76±4.18	58.54±3.26	84.84±2.55

表注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.001$ ;与脱细胞真皮组比较,<sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

表2 各组创面完全愈合时间比较 ( $\bar{x}\pm s, d$ )  
Table 2 Comparison of wound healing time among groups

组别	n	完全愈合时间
组织工程皮肤组	30	14.2±1.5 <sup>ab</sup>
脱细胞真皮组	30	16.7±2.3 <sup>a</sup>
空白对照组	30	20.7±3.5

表注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脱细胞真皮组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

**2.3.2 苏木精-伊红染色观察结果** 术后第2周时,组织工程皮肤组、脱细胞真皮组创面中胶原纤维排列有序,成纤维细胞、纤维细胞及毛细血管数量均多于空白对照组,组织工程皮肤组创面可见有新生表皮覆盖,但不可见毛囊、汗腺等皮肤附属器结构,脱细胞真皮组创面周围有新生表皮组织存在,但创面中心无表皮层覆盖,空白对照组创面表现为肉芽组织增生现象,细胞各层次不清,可见中性粒细胞和成纤维细胞,但是上皮化速度较慢,无表皮层覆盖,见图4。

**2.3.3 CK19免疫组织化学染色结果** CK19为表皮细胞的特异性标志物,术后第2周,各组创面取材行CK19免疫组织化学染色,可见组织工程皮肤组、脱细胞真皮组皮肤表层CK19表达增多,但组织工程皮肤组表达更为致密,空白对照组表达略少,密度较低,见图5。

**2.3.4 BrdU免疫组织化学染色结果** 移植后第2周组织工程皮肤组创面取材行BrdU免疫组化检测,可见创面组织标本中有大量的BrdU阳性表达细胞存在,细胞呈梭形或圆形,提示创面愈合部位存在骨髓间充质干细胞或由其分化的细胞,见图6。

## 3 讨论 Discussion

各种原因引起的皮肤软组织缺损,是致残的主要原因,不但严重影响人们的生活质量,也给家庭和社会带来了负担。目前还没有行之有效的方法,使创面得到完全愈合。随着组织工程学的发展,使体外构建有生命的工程化组织用以组织修复和器官功能替代成为可能,目前已经有多种组织工程化皮肤被批准应用于临床<sup>[10]</sup>,用于烧、烫伤及各种原因引起的皮肤缺损,并取得了不错的临床效果,如Dermagraft、Integra、Apligraf等。但是,这些组织工程皮肤仍然有许多不足之处,与实现创面完全愈合的标准相差甚远<sup>[11]</sup>。



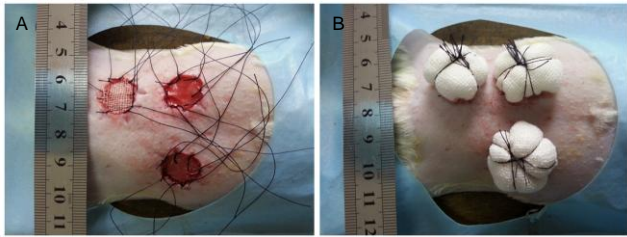


图1 组织工程皮肤移植修复创面

Figure 1 Skin wound repair by tissue-engineered skin

图注: 图中 A 为创面移植术中; B 为术毕打包加压包扎创面。

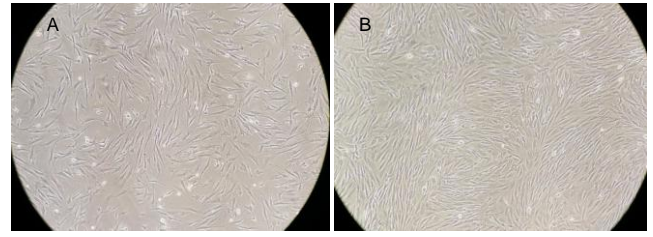


图2 大鼠骨髓间质干细胞的形态

Figure 2 Morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为第 3 代骨髓间质干细胞(50%瓶底); B 为第 3 代骨髓间质干细胞(100%瓶底)。

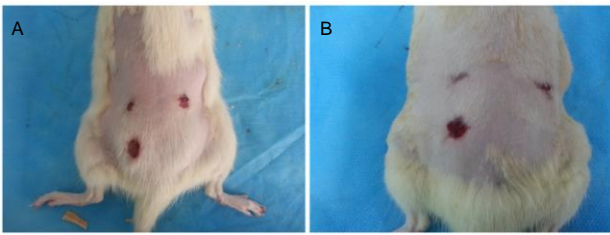
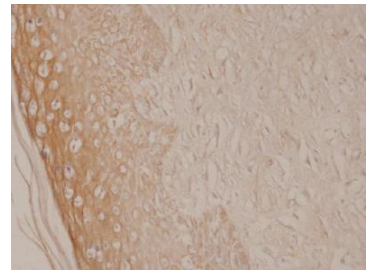


图3 各组创面愈合情况

Figure 3 Wound healing in each group

图注: 图中 A 为术后 7 d 时创面愈合情况; B 为术后 14 d 时创面愈合情况。由图可见, 组织工程皮肤组、脱细胞真皮组创面愈合速度较快, 但组织工程皮肤组创面缩小更为明显, 空白对照组创面愈合较慢。



图注: 创面组织标本中有大量的 BrdU 阳性表达细胞存在, 细胞呈梭形或圆形。

图6 组织工程皮肤组创面 BrdU 免疫组化染色

Figure 6 BrdU immunohistochemical staining of skin wound tissues after repair with tissue-engineered skin grafts

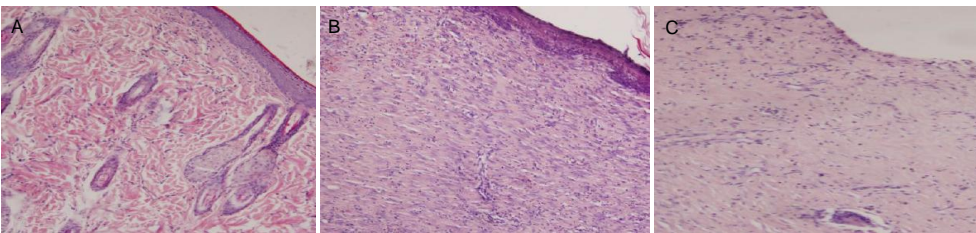


图4 各组创面组织苏木精-伊红染色

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of skin wound tissues

图注: 图中 A 为组织工程皮肤组, 创面可见有新生表皮覆盖, 但不可见毛囊、汗腺等皮肤附属器结构; B 为脱细胞真皮组, 创面周围有新生表皮组织存在, 但创面中心无表皮层覆盖; C 为空白对照组, 创面表现为肉芽组织增生现象, 细胞各层次不清, 可见中性粒细胞和成纤维细胞, 但是上皮化速度较慢, 无表皮层覆盖。

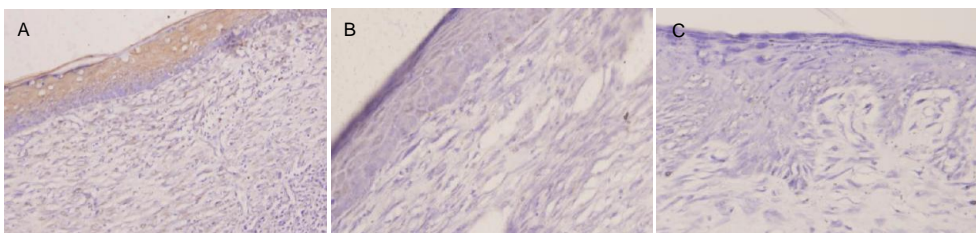


图5 各组创面组织免疫组织化学染色

Figure 5 Immunohistochemical staining of skin wound tissues in each group

图注: 图中 A, B 为组织工程皮肤组、脱细胞真皮组皮肤表层 CK19 表达, 其中组织工程皮肤组表达更为致密; C 为空白对照组 CK19 表达略少, 密度较低。

实验将骨髓间充质干细胞与脱细胞真皮共培养, 发现骨髓间充质干细胞的生长状态良好, 与脱细胞真皮具有一定的亲和力, 为实验的进一步进行奠定了基础。组织工程皮肤创面移植后, 组织工程皮肤组的愈合速度明显加快, 14 d 左右即可达到愈合标准, 同时时间段的脱细胞真皮组、空白对照组均未能实现愈合, 说明组织工程皮肤明显促进了创面的愈合。移植第 2 周时, 创面取材行苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色来检测创面愈合结果。苏木精-伊红

染色显示: 组织工程皮肤组创面完全由新生表皮覆盖, 脱细胞真皮组、空白对照组均未实现表皮的完全覆盖。免疫组织化学染色显示: 组织工程皮肤组创面 CK19 的表达远远多于脱细胞真皮组、空白对照组, 而 CK19 为表皮细胞的特异性标志物, 此结果证实了组织工程皮肤组创面愈合的确具有领先优势。BrdU 免疫组织化学染色显示: 只有组织工程皮肤组创面结果为阳性, 提示创面愈合部位存在骨髓间充质干细胞或由其分化的细胞。以上实验结果从多方面验

证了组织工程皮肤的促愈合作用，可为今后的临床实践提供一条新线索。

综上所述，采用全骨髓贴壁培养法分离骨髓间充质干细胞操作简单易行<sup>[12]</sup>，经多种方法对所培养细胞进行检测，结果均较肯定<sup>[13-18]</sup>。以脱细胞真皮为支架材料，骨髓间充质干细胞为种子细胞共培养构建组织工程皮肤的设想可行，也具有可操作性。将组织工程皮肤移植于全层皮肤缺损创面治疗后，效果肯定，具有重要的临床指导意义。但是，骨髓间充质干细胞参与创面愈合的详细机制还不清楚，将是今后研究工作的重点内容。

**作者贡献:** 实验设计、实施、评估为全部作者。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**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，不存在利益冲突。

**伦理问题:** 研究用人体组织、动物组织的实验方案符合相关伦理学要求，文章的撰写与编辑修改后文章遵守了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。

**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。

**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] 陈璧,姜笃银,贾赤字,等.复合皮移植的实验研究与临床应用[J].中华烧伤杂志,2004,20(6):347-350.
- [2] Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, et al. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011; 2(4):34.
- [3] Delirez N, Shojaeefar E, Parvin P, et al. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J*. 2013;15(3): 218-223.
- [4] 李晓峰,赵劲民,苏伟,等.大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(10):1721-1725.
- [5] 刘坡,祁少海,舒斌,等.异体脱细胞真皮基质作为组织工程皮肤真皮支架的可行性[J].中国组织工程研究, 2012,16(21): 3864-3868.
- [6] Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2004;13(4):436-448.
- [7] Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14 (4-6):311-324.
- [8] Rasini V, Dominici M, Kluba T, et al. Mesenchymal stromal/ stem cells markers in the human bone marrow. *Cytherapy*. 2013;15(3):292-306.
- [9] Lu X, Alshemali S, de Wynter EA, et al. Mesenchymal stem cells from CD34(-) human umbilical cord blood. *Transfus Med*. 2010;20(3):178-184.
- [10] 韩跃东,刘玲.组织工程皮肤的临床应用[J].国际皮肤性病杂志,2007,33(6):340-342.
- [11] Mirastschijski U, Bugdahl R, Rollman O, et al. Epithelial regeneration from bioengineered skin explants in culture. *Br J Dermatol*. 2006;154(1):42-49.
- [12] 迟作华,张涇,陆琰,等.人骨髓间充质干细胞分离方法的比较[J].中国临床康复,2006,10(1):20-22.
- [13] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(11):4857-4861.
- [14] Zhang B, Wang F, Deng L, et al. Isolating and culturing rat marrow mesenchymal stem cells and studying their phenotypical and functional properties. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003;34(4):738-741.
- [15] Boiret N, Rapatel C, Veyrat-Masson R, et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol*. 2005;33(2): 219-225.
- [16] Jones EA, English A, Kinsey SE, et al. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006; 70(6):391-399.
- [17] Gao K, Lu Y, Li S, et al. Isolation, culturing and growth characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow of Rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2007;24(6):1343-1347, 1351.
- [18] Nadri S, Soleimani M, Hosseini RH, et al. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*. 2007;51(8):723-729.