

人脐带间充质干细胞的培养鉴定及其向神经元细胞分化的研究

毛希宏¹⁾, 杨智勇²⁾, 孟明耀³⁾, 侯宗柳³⁾, 庞伟³⁾, 魏传钰³⁾

(1) 昆明医学院附属延安医院神经外科, 云南昆明 650051; 2) 昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南昆明 650032; 3) 昆明医学院附属延安医院中心实验室, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 研究脐带间充质干细胞(UC-MSCs)在体外分离、培养、扩增和鉴定以及向神经元分化的方法。**方法** 30例符合入选标准的脐带采用贴壁法分离得到UC-MSCs, 选用20% FBS血清培养液进行原代培养, 再选用10% FBS扩增培养液进行一般传代。用神经分化培养基诱导UC-MSCs向神经细胞分化, 在荧光显微镜下观察细胞形态, 透射电镜观察UC-MSCs超微结构, 用流式细胞仪分析其表面特性, 采用直接和间接免疫荧光法检测细胞悬浮液的表现特征, 用抗人神经纤维M、突触素、微管蛋白、半乳糖神经酰胺的单克隆抗体检测各代之间神经诱导形成率。**结果** 12 h后细胞开始贴壁生长, 超微结构观察表现出未分化细胞的特征, CD123、CD49、CD29、CD73和CD166均为阳性, 免疫荧光检测人UC-MSCs分化成神经细胞。**结论** UC-MSCs长期传代培养, 生物学特性稳定, 具有向神经细胞分化的潜能。

[关键词] 脐带间充质干细胞; 神经细胞; 分化

[中图分类号] Q813.1+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2011)01-0041-07

Culture, Identification, and Differentiation to Neural cells of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

MAO Xi-hong¹⁾, YANG Zhi-yong²⁾, MENG Ming-yao³⁾, HOU Zong-liu³⁾, PANG Wei³⁾, WEI Chuan-yu³⁾

(1) Dept. of Neurosurgery, The Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051; 2) Dept. of Neurosurgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Meddica University, Kunming Yunnan 650032,; 3) Central laboratory, The Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To establish an useful method to isolate and culture umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) and induce it to neural differentiation. **Methods** Thirty human umbilical cords (UCs) were obtained from pregnant women with their written consent and the approval of the Clinic Ethics Committee, the primary UC-MSCs were isolated by adherent culture in the medium contains 20% fetal bovine serum (FBS), then they were maintained in the medium contains 10% FBS and induced to neural cells in neural differentiation medium. Their formations were observed by fluorescence microscope, their ultrastructure were detected by transmission electron microscope, and their surface markers were checked by flow cytometry. The

[基金项目] 云南省科技厅联合专项基金资助项目(2007C000R)、云南省科技计划基金资助项目(2010CA004)

[作者简介] 毛希宏(1966~),男,云南昆明市人,在职硕士研究生,副主任医师,主要从事干细胞移植、脑血管病的基础与临床研究工作。

[通讯作者] 杨智勇. E-mail:13808721500@163.com

neural cells phenotypes were monitored by direct or indirect immunofluorescence, and the ratio of neural cells were measured by monoclonal antibodies to human neurofilament M, synaptophysin, tubulin, and galactoserebroside. **Results** The primary UC-MSCs were adherent after 12 h culture, and their ultra-structure were similar to undifferentiated cells. The surface markers were CD123+, CD49+, CD29+, CD73+ and CD166+. The neural cells were detected by immunofluorescence. **Conclusions** It is a convenient method to isolate and culture of UC-MSCs by adherent culture. UC-MSCs are stable in the growth medium after long-term passage. UC-MSCs have the potential to differentiate into neural cells.

[**Key words**] Umbilical cord mesenchymal stem cells; Neural cells; Differentiation

脐带间充质干细胞是一类存在于人脐带中,具有多向分化潜能和自我更新能力的细胞群.它取材方便,来源广泛,其使用属“废物利用”,不受伦理、道德限制,可以为实验和临床提供充足的细胞来源,特别能为神经系统疾病的治疗带来新的希望.然而脐带间充质干细胞的生长、分化过程的内部作用机制尚有很多问题不明,而且其临床应用必须以在体外获得高数量和高纯度的脐带间充质干细胞为基础.笔者对如何在体外培养、扩增和鉴定脐带间充质干细胞,以及脐带间充质干细胞在体外能否分化为神经元进行研究,以期将来应用脐带间充质干细胞修复神经损伤打下基础.

1 材料与方 法

30例脐带在征得产妇同意后采集,所有待产产妇的输血前九项检测必需阴性,实验经医院伦理委员会批准.

1.1 试剂耗材

胎牛血清, α -MEM 完全培养基.含有 1 000 g/L 葡萄糖和谷氨酰胺的 DMEM, 2%FCS, 10^{-7} M 的地塞米松, 0.5 μ M 亚油酸, 10 ng/mL 血小板衍生生长因子, 10 ng/mL 表皮生长因子 (R&D Systems), 50 μ g/mL 庆大霉素, 8 孔的细胞腔室培养系统 (NUNC).

1.2 分化检测试剂

Abs 抗人 M 神经丝, 突触素, 微管素, 半乳糖神经酰胺 (Chemicon), PE 标记的羊抗鼠免疫球蛋白抗体.

1.3 细胞表面标志检测试剂

抗人的单克隆抗体 (Abs) CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD73, CD105, CD106, HLA-ABC 和 HLA-DR, 荧光标记的鼠抗

免疫球蛋白 (serotec (oxford, UK) (immunotech beckman coulter, Paris, France). 适当的同型对照从 BD Pharmingen 公司获得.

1.5 UC-MSC 的分离培养

将符合入选标准的脐带用含 PS 的 PBS 洗 3 次, 然后剔除动脉, 将静脉剪开, 然后用刀片刮除静脉内膜. 加入 PS 的 PBS 洗 3 次. 将脐带剪成小块, 用眼科剪剪碎至 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小, 用 0.1% 胶原酶 IV, 40 $^{\circ}$ C 30 min 消化, 再加 0.25% 胰酶 40 $^{\circ}$ C 消化 30 min, 小牛血清终止消化, 滤网过滤, 离心, 沉淀用含 20% 胎牛血清的 α -MEM 完全培养基放入 175 cm \times 175 cm 培养瓶于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养.

1.6 UC-MSC 的传代培养

将长成单层的细胞用 0.062 5% 胰酶 /EDTA 消化后制备细胞悬液按一定比例传代, 大约 5 d 左右成单层, 继续传代, 每 3 代检测细胞表面标志 1 次, 第 3 代和 23 代进行染色体的检测, 并在第 5 代进行致瘤实验和安全性实验.

1.7 超微结构观察

透射电镜观察脐带间质干细胞超微结构, 取生长良好的第 3、7、20 代对数期细胞, 经胰蛋白酶常规消化, 生理盐水洗涤 1 次, 制成单细胞悬液, 计数细胞, 调整浓度为 1.0×10^6 个 /mL, 取 1 mL 细胞悬液, 缓慢加入电镜专用固定液, 送电镜室进行检测.

1.8 UC-MSC 的鉴定

细胞悬浮液的表型特征采用直接和间接免疫荧光检测法, 操作流程按说明书进行.

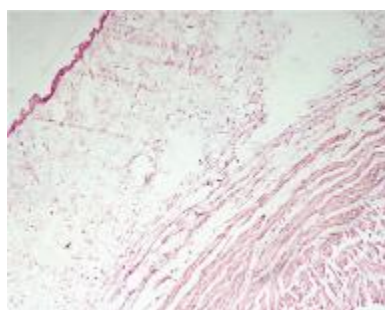
1.9 向神经细胞诱导分化培养方案

(1) 计数 UC-MSCs 并用完全 α -MEM 培养基调整细胞浓度为 20 000/mL; (2) 分配细胞悬液到腔室培养系统中, 10 000 个 /cm²; (3) 第 2 天, 倒弃培养基并用相同体积的神经分化培养基

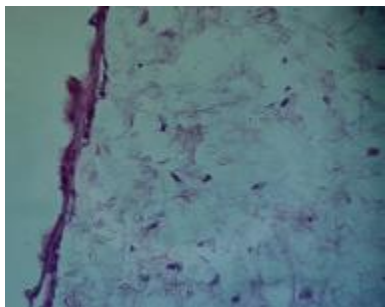
更换或者是完全 α -MEM 培养基; (4) 培养 2 周, 在此期间每周 2 次更换新鲜相同的培养基.

1.10 向神经细胞诱导分化鉴定

(1) 从载玻片上分离腔体并用 PBS 洗涤载玻片 2 次; (2) 固定加入甲醇 10 min -20°C 孵育; (3) 用 PBS 洗涤 3 次; (4) 分别滴加适当浓度的一抗 (鼠抗人 M 神经丝、突触素、微管素、半乳糖神经酰胺, 每个抗体 2 复孔, 对照加兔抗人多克隆抗体, 37°C 孵育 1 h; (5) PBS 洗 2 次; (6) 加 PE 标记的兔抗小鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG (二抗) 室温孵育 40 min; (7) PBS 冲洗 2 次; (8) 荧光显微镜下观察 (波长 = 570 nm), 拍照.



A



B

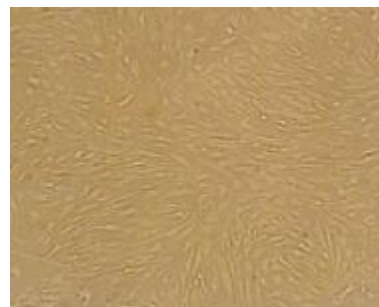
2 结果

2.1 UC-MSC 的分离和传代结果

消化组织块 12 h 后细胞开始贴壁, 72 h 形成散在的纺锤状细胞. 72 h 后出现散在的纺锤状、梭形贴壁细胞, 第 7 天细胞数量陡增, 多数细胞成梭形, 少数细胞呈三角形. 第 10~14 天, 细胞呈片状融合达到 80%~90%, 呈现规则平行排列生长, 细胞的两极有规律地排列成束状, 有的呈漩涡状, 见图 1.



C



D

图 1 脐带间充质干细胞病理切片和原代细胞

Fig. 1 The pathological section of umbilical cord mesenchymal stem cells and the primary cells

A: 脐带病理切片低倍镜下 $20\times$; B: 脐带病理切片高倍镜下 $40\times$;

C: 原代脐带消化接种后 72 h, 分裂相增多 $40\times$; D: 原代脐带生长至 7~8 d 时, 呈致密单层, 束状、漩涡状排列 $40\times$.

2.2 超微结构观察结果

细胞呈椭圆形, 单细胞核, 核质比较大, 核仁大而明显; 胞质丰富, 有大量微丝, 胞浆内可见核糖体和线粒体, 其他细胞器较少, 常染色质较少, 异染色质较多; 细胞表面有微绒毛. 表现出未分化细胞的特征. 考虑为非幼稚细胞, 称为干细胞样细胞, 图 2.

2.3 UC-MSC 的鉴定

2.3.1 UC-MSC 表面标志检测 从培养的 3~23

代, CD123、CD49、CD29、CD73 和 CD166 均为阳性, 造血干细胞标志 CD34、CD45RA、CD45RB、CD45RO 阴性, 组织相容性抗原 HLA-DR 阴性, 见表 1, 图 3.

2.3.2 UC-MSC 的神经分化结果

人脐带间充质干细胞能够分化成神经细胞, 通过抗人神经纤维 M, 突触素, 微管蛋白, 半乳糖神经酰胺的单克隆抗体可以检测到, 见图 4.

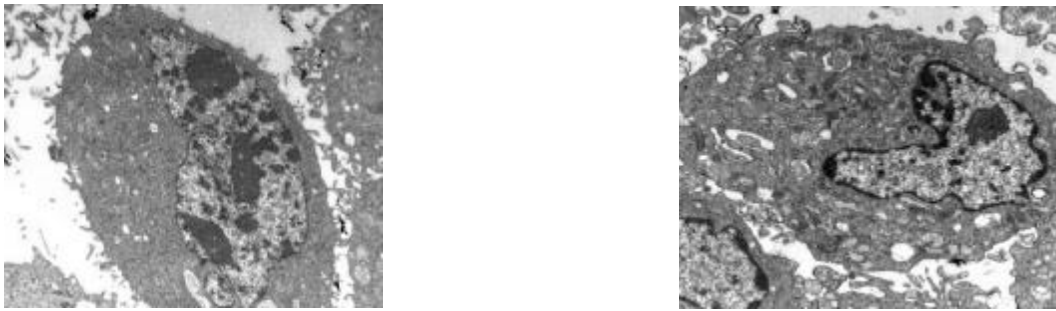


图2 透射电镜示 UC - MSCs 的超微结构

Fig. 2 The ultrastructure of UC - MSCs under transmission electron microscope

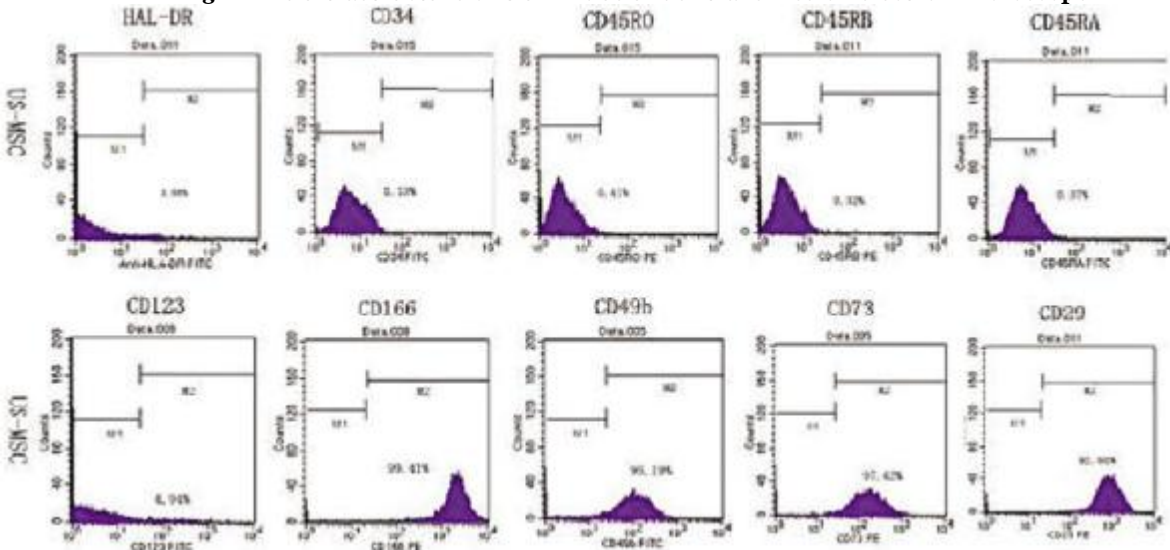


图3 UC-MSC 流式细胞检测图

Fig. 3 The flow cytometric results of UC-MSC

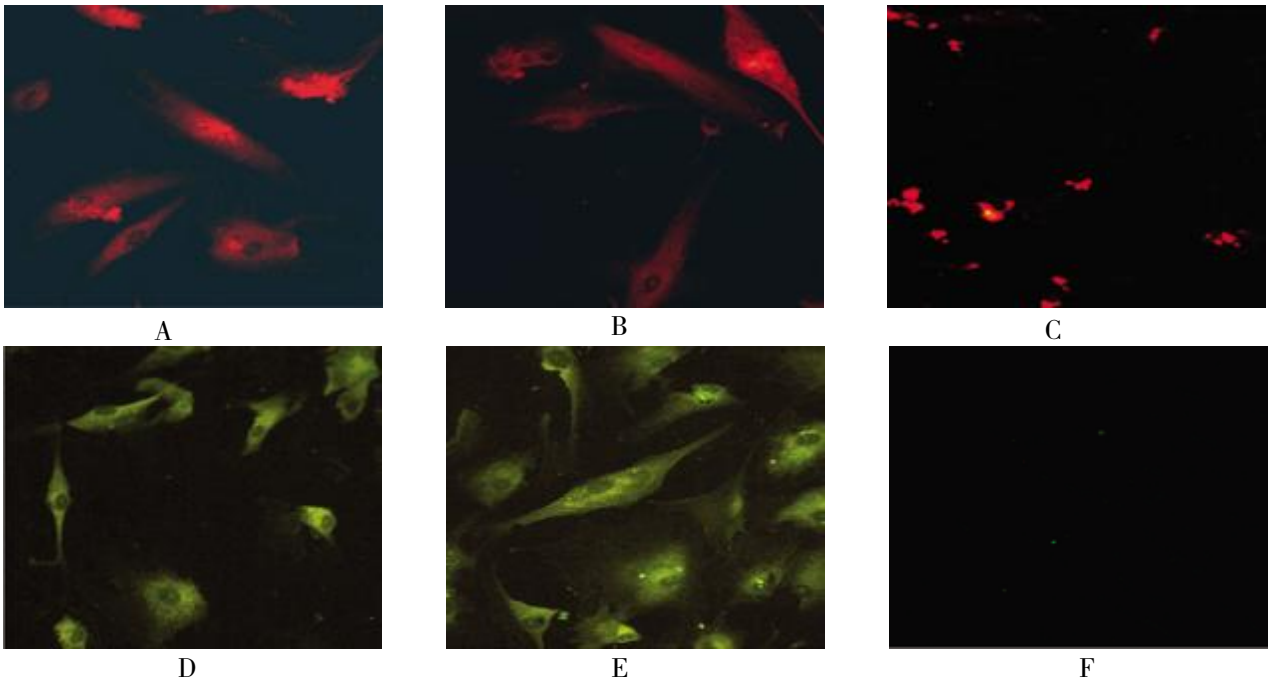


图4 人脐带间充质干细胞成神经细胞分化图 (免疫荧光检测)

Fig. 4 The differentiation of UC-MSC to neural cells(immunofluorescence)

A:M 神经丝结合; B:突触素结合; D:微管素结合; E: 半乳糖神经酰胺结合; C、F:对照.

表 1 UC-*MSC* 培养第 3 代、第 8 代、第 23 代表面标志
Tab. 1 The surface marker of UC-*MSC* at the 3rd, 8th, and 23rd generation

分子标志	培养代次		
	P3	P8	P23
CD11	0.11	0.24	0.15
CD13	92.25	95.12	96.14
CD166	99.41	98.65	95.80
CD49b	95.19	99.0	94.6
CD73	97.42	99.73	95.25
CD29	92.80	100	97.70
CD123	2.46	1.57	2.12
HLA-DR	3.88	3.76	0.29
CD34	0.13	0.03	4.71
CD45RA	0.37	0.51	0.42
CD45RB	0.32	0.28	0.36
CD45RO	0.41	1.27	1.58

3 讨论

间质干细胞 (mesenchymal stem cells, *MSCs*) 来源于中胚层, 也称多能间充质基质细胞 (multipotent mesenchymal stromal cells), 为多能干细胞的一种, 它最早发现于骨髓中, 具有向三种胚层细胞分化的多向分化潜能^[1], 具有低免疫原性、不刺激产生同种异体免疫反应、不被细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞杀伤, 以及免疫调节作用^[2,3]. 1976 年, Friedenstein^[4]和他的同事第一次发现并成功用贴壁培养的方法分离了这群细胞. 间质干细胞这一概念是由 Mauren Owen^[5]及其同事在 Friedenstein 工作的基础上提出来的, 又因 Arnold Caplan^[6]的关系得以在 20 世纪 80 年代末及 90 年代被科学界广为接受而得到普遍应用. 随着研究的深入, 证明该群细胞并非是一个单一的细胞群体, 而是一个包含了许多干/祖细胞的混合群体. 2005 年“国际细胞治疗协会” (international society for cellular therapy, *ISCT*) 将这群细胞命名为 *MSCs*, 并提出并不是所有的 *MSCs* 均是干细胞^[7]. *ISCT* 还规定了 *MSCs* 鉴定的 3 个标准^[8]: (1) *MSCs* 在标准培养条件下粘附于塑料制品生长; (2) *MSCs* 表达 CD105, CD73 和 CD90; 不表达 CD45, CD34, CD14 (或 CD11b), CD79a (或 CD19), 也不表达主要组织相容性抗原 HLA-DR; (3) *MSCs* 在体外培养,

能分化成为骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞. 2003 年 Romanov^[9]等从脐静脉内皮下层成功分离出 *MSCs*, 2004 年台湾学者 Hwai-Shi^[10]也成功的在脐带中分离并培养成功 *MSCs*, 国内细胞产品国家工程研究中心也于 2006 年从脐带中成功分离出大量的 *MSCs*^[10]. 脐带 *MSCs* 的优势在于: (1) 脐带为分娩后的废弃物, 取材方便, 来源广泛, 易于收集、保存、冷冻, 不受伦理、道德及法律方面的争论与限制; (2) 相对纯净, 与干细胞输注相关的病毒和病原微生物感染率远低于骨髓移植; (3) 人脐带 *MSCs* 含量丰富, 较为原始, 分化能力强, 可在体外进行分离、培养, 扩增迅速, 且生物性能稳定, 多次传代扩增仍能保持旺盛功能, 可以为实验和临床提供充足的细胞来源; (4) 人脐带 *MSCs* 不表达或低表达组织相容性标记, 免疫原性低, 异体移植无免疫排斥反应或反应较弱, 不须经过严格配型即能使用, 适宜于不同个体之间的移植; (5) 易于转染外源基因, 可作为携带自杀基因或抗癌药物的载体细胞用于抗癌治疗, 是细胞治疗和基因治疗的理想靶细胞; (6) 脐带 *MSCs* 具有跨胚层向多组织细胞分化的潜能和自我更新的高增殖潜能, 有向神经细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞、脂肪细胞等分化的能力使其拥有广泛的临床应用前景, 为神经系统疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病、糖尿病、骨缺损等的治疗带来新的希望. 然而, 无论哪一种组织来源的 *MSCs*, 要为组织工程、修复和免疫调节提供种子细胞, 都必须以高数量和高纯度的细胞为基础. 因此, 本研究着重探索建立脐带间质干细胞的体外分离纯化和培养扩增体系, 系统研究了培养 30 代次内的 UC-*MSCs* 的细胞生物学特性.

3.1 UC-*MSCs* 的分离、纯化

目前, 在体外从脐带分离获得 UC-*MSCs* 方法主要有: (1) 酶消化法, 脐带剪碎至约 1 mm³, 经 0.1% 胶原酶和 0.125% 的胰酶 37 °C 消化, 去除未消化的组织后贴壁培养. 此种方法细胞单层形成时间早, 约 7 d 左右, 但成本较高; (2) 组织块贴壁法: 脐带剪碎至约 1 mm × 1 mm × 1 mm 后贴壁培养, 此种方法第一代细胞单层形成时间较晚, 约 12 d 左右, 但成本较低. 本实验采用脐带贴壁法分离得到 UC-*MSCs*, 笔者认为该方法具有操作简便、细胞较纯, 并能保持 UC-*MSCs* 生物学特性及免疫学特性的优点.

3.2 UC-MSCs 的传代培养及生长特性

目前, 间质干细胞培养液的配方并不统一, 包括含血清和无血清培养基两种. 基础培养基包括 α -MEM、IMDM、DMEM-LG、DMEM/F12、RMPI-1640. 在间质干细胞培养中, 前 3 种基础培养基应用较多. 含血清培养基主要有 20% 胎牛血清或 9% 胎牛血清加 9% 马血清, 再配上基础培养基, 一般不再添加辅助的干细胞生长因子或其他微量添加剂. 而无血清培养基或低血清培养基, 由于缺少细胞生长的必需成分及细胞增殖所必需的生长因子, 必须补充一些生长因子^[4,5]. 本实验在间质干细胞的原代培养时选用 20% FBS 血清培养液, 一般传代后选择 10% FBS 扩增培养液. 在培养 UC-MSCs 的过程中发现, 血清对 MSCs 的生长有一定的影响. 在同一浓度下, 加入胎牛血清培养的 MSCs 比加入小牛血清培养的 MSCs 生长得快; 对于同一种血清, 血清浓度对 MSCs 的生长也有影响, 20% 胎牛血清培养的 MSCs 比 10% 胎牛血清培养的 MSCs 生长得快. 综合细胞生长情况, 笔者认为 10%~15% FBS 为 MSCs 的最佳血清浓度, 10% FBS 是诱导分化的最佳血清浓度. 在传代培养中, 接种密度及培养条件是影响体外培养间质干细胞增殖潜能的重要因素. 有些研究者认为低密度接种有利于 MSCs 的增殖, 高密度接种由于细胞间的相互接触或细胞释放某些因子到培养基中从而影响 MSCs 的增殖. 本实验中, 通过最适接种浓度试验发现, 以 $1 \sim 2 \times 10^3$ 个/cm² 接种, 置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中培养, 生长最佳, 传代至 30 代均较为稳定. 本研究中分离培养的 UC-MSCs 形态学特性与文献报道基本一致, 光镜下传代培养的 UC-MSCs 呈均匀分布, 形态呈纺锤形、长梭形, 贴壁稀疏时, 长梭形细胞的两极朝向不规律, 细胞排列混乱, 细胞之间往往通过突起相连接; 出现致密的贴壁细胞层时, 细胞的两极有规律地排列成束状, 有的呈漩涡状. 透射电镜显示: 细胞呈椭圆形, 单细胞核, 核质比较大, 核仁大而明显; 胞质丰富, 有大量微丝, 胞浆内可见核糖体和线粒体, 其他细胞器较少, 常染色质较少, 异染色质较多; 细胞表面有微绒毛. 表现出未分化细胞的特征. 考虑为非幼稚细胞, 称为干细胞样细胞. 细胞器丰富, 有微绒毛结构, 核浆比较大, 说明细胞蛋白合成和分泌能力旺盛, 能够大量摄取营养物

质, 功能活跃, 显示了干细胞的幼稚特性, 而间质干细胞的这种低分化状态构成了其强大的自我复制和能够向多种组织分化的基础.

3.3 UC-MSCs 的表型

间质干细胞无特异性表面标志. 与造血干细胞不同, 对于 MSCs 的表面标志物目前尚无确定结论. 利用流式细胞仪研究显示, MSCs 的表面抗原具有非专一性, 它表达了间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志. 主要包括以下四类^[11-13]: (1) 粘附分子类: 表达 ALCAM (CD166)、ICAM-1 (CD54)、ICAM-2 (CD102)、LFA-3 (CD58)、NCAM (CD56)、HCAM (CD44)、VCAM (CD106) 等, 但不表达 P2selectin (CD62P) 及 PECAM-1 (CD31) 等; (2) 生长因子和细胞因子受体: 表达 IL-1 受体 (CD121)、IL-3 受体 (CD123)、IL-6 受体 (CD126)、IL-7 受体 (CD127)、IFN- γ 受体 (CDw119)、TNF- α 受体 (CD120a)、FGF 受体、PDGF 受体 (CD140a) 等, 不表达 IL-2 受体 (CD25); (3) 整合素家族成员: 表达 VLA- α 1 (CD49a)、VLA- α 2 (CD49b)、VLA- β (CD29)、 β 4 整合素 (CD104) 等, 不表达 LFA1- α (CD11a)、Macl (CD11b) 等; (4) 其它分子: 表达 SH2、SH3、SH4、Thy1 (CD90)、5' 末端核苷酸酶 (CD73)、Endoglin (CD105) 等, 不表达 CD34、CD45、MHC II 类分子以及其刺激因子 B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86) 等.

本实验用流式细胞仪分析 UC-MSCs 的表面抗原, 结果显示, UC-MSCs 均 CD13、CD29、CD44、CD49、CD73、CD105, 阳性率均在 90% 以上; 而 CD11b、CD34、CD45、HLA-DR 阴性. 而且, 在传代培养的 23 代细胞内, 总体无明显差异. 说明 UC-MSCs 长期传代培养后, 生物学特性稳定.

3.4 UC-MSCs 的多向分化潜能

间质干细胞缺乏特征性标志, 故多向分化能力的鉴定是鉴定 MSCs 的重要方法^[9]. 本研究用神经分化培养基诱导 UC-MSCs 向神经细胞分化, 用抗人神经纤维 M、突触素、微管蛋白、半乳糖神经酰胺的单克隆抗体可以检测到各代之间神经诱导形成率无显著性差异. 证明 UC-MSCs 具有向神经细胞分化的潜能.

综上所述, 本实验通过脐带贴壁法获得了高

纯度、高活性的原代 UC-MSCs. 通过体外培养扩增获得了生物学性状稳定的 UC-MSCs 细胞系. 对 UC-MSCs 细胞系进行鉴定, 形态学鉴定其为成纤维样细胞; 生长特性鉴定其粘附于塑料制品生长; 细胞表型鉴定其稳定表达 CD13、CD29、CD44、CD49、CD73、CD105, 不表达 CD11b、CD34、CD45、HLA-DR; 多向分化潜能鉴定其能够分化为神经细胞. 比较体外培养扩增的不同代次的 CD13、CD29、CD44、CD49、CD73、CD105, 阳性率均在 90% 以上; 而 CD11b、CD34、CD45、HLA-DR 细胞系的生物学特性, 经统计分析, 23 代次内的 CD13、CD29、CD44、CD49、CD73、CD105, 阳性率均在 90% 以上; 而 CD11b、CD34、CD45、HLA-DR 生物学性状稳定, 无显著差异. 因此, 本实验分离纯化、培养扩增得到的 CD13、CD29、CD44、CD49、CD73、CD105, 阳性率均在 90% 以上; 而 CD11b、CD34、CD45、HLA-DR 可用于后续实验, 而且在 3~15 代次内应用, 效果较好. 为后续的科研和临床研究奠定了基础.

[参考文献]

- [1] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143 - 147.
- [2] LE BLANC K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2003, 5(6): 485 - 489.
- [3] JONES B J, MCTAGGART S J. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic [J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(6): 733 - 741.
- [4] FRIEDENSTEIN A J, GORSKAJA J F, KULAGINA N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267 - 274.
- [5] OWEN M. Marrow stromal stem cells [J]. *J Cell Sci Suppl*, 1988, 10: 63 - 76.
- [6] HORWITZ E M, LE B K, DOMINICI M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2005, 7(5): 393 - 395.
- [7] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315 - 317.
- [8] YURI A, ROMANOV, VERONIKA A, et al. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-Like cells from umbilical cord [J]. *Stem Cells Jan*, 2003, 21: 105 - 110.
- [9] HWAI-SHI WANG, SHIH-CHIEH HUNG, SHU-TINE PENG, et al. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 1330 - 1337.
- [10] 袁源, 杨树源, 韩忠朝, 等. 人脐带间充质干细胞分离纯化及基本生物学特性研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(1): 118.
- [11] 赵春华. 干细胞原理、技术与临床 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 343 - 344.
- [12] STICH S, LOCH A, LEINHASE I, et al. Human periosteum-derived progenitor cells express distinct chemokine receptors and migrate upon stimulation with CCL2, CCL25, CXCL8, CXCL12, and CXCL13 [J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(6): 365 - 376.
- [13] VACANTI V, KONG E, SUZUKI G, et al. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 205(2): 194 - 201.

(2010 - 10 - 16 收稿)