

经血源子宫内膜干细胞培养、鉴定及体外分化潜能的研究

严 琰¹ 东健泮¹ 桑运霞¹ 刘召青² 齐念民^{1*}

(¹上海交通大学药学院, 上海 200240; ²上海坤爱生物科技有限公司, 上海 201203)

摘要 现阶段干细胞的来源常具有侵入性, 该文旨在研究新来源于经血的经血源子宫内膜干细胞(menstrual blood-derived mesenchymal stem cells, MenSCs)的基本生物学特性及分化潜能。采用密度梯度法从女性经血中分离MenSCs, 测定MenSCs群体倍增时间, 流式细胞仪鉴定细胞表面抗原, 免疫荧光法检测MenSCs nestin阳性表达情况, 体外验证其成骨成脂分化潜能。结果表明, MenSCs具有典型的梭状结构, 细胞倍增时间为32.2 h, 均一地高表达CD29、CD90及CD105, 不表达CD14、CD45、HLA-DR。免疫荧光表明, MenSCs为nestin阳性。MenSCs成脂诱导后, 油红O染色为阳性。成骨诱导前期诱导组细胞胶原表达量升高, 诱导两周后MenSCs形成钙结节, 诱导组细胞ALP(alkaline phosphatase)活性连续3周呈上升趋势。以上证明, MenSCs具有来源广泛的优势, 具有较高的增殖能力、较低免疫原性、nestin阳性及多向分化潜能等特性, 可成为干细胞治疗的理想种子细胞。

关键词 经血源子宫内膜干细胞; 多向分化潜能; 细胞治疗; nestin

Isolated Culture, Identification and Differentiation Potential of Menstrual Blood-derived Mesenchymal Stem Cells

Yan Yan¹, Dong Jianfeng¹, Sang Yunxia¹, Liu Zhaoqing², Qi Nianmin^{1*}

(¹Pharmacy College, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

²Shanghai Kun'ai Biological Technology Co., LTD, Shanghai 201203, China)

Abstract Stem cell therapy can help cure many diseases. Yet many of the suitable cells currently identified for human use are difficult to obtain and involve invasive procedures. In this research, we investigated the basic biological characteristics and differentiation potential of novel menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs). MenSCs specific markers were analyzed by a flow cytometer. Nestin expression was evaluated with immunofluorescence. The capacity of osteoblast and adipocyte to differentiate was evaluated. Our results showed that MenSCs were successfully isolated from female menstrual blood. The doubling rate of MenSCs was 32.2 h. MenSCs were positive for CD29, CD90, CD105, while negative for CD14, CD45, HLA-DR. Immunofluorescence showed that MenSCs exhibited nestin-positive characteristics. MenSCs were positive for Oil Red O staining after inducing by adipogenic differentiation medium. After exposure in osteogenetic differentiation media, collagen expression of MenSCs was higher at the early age and Alizarin Red staining evidenced that MenSCs exhibited osteocyte phenotypes after 2 weeks. In addition, ALP activity analysis illustrated that MenSCs was on the rise for

收稿日期: 2014-01-27 接受日期: 2014-03-14

*通讯作者。Tel: 021-34204746, E-mail: drqi@sjtu.edu.cn

Received: January 27, 2014 Accepted: March 14, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-021-34204746, E-mail: drqi@sjtu.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-02 10:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0032.html>

3 weeks. These results indicate that MenSCs have properties of low immunogenicity, high proliferation potential and multi-lineage differentiation capacity. Our study suggests that MenSCs might be an ideal resource for stem cell therapy and regenerative medicine applications.

Key words menstrual blood-derived mesenchymal stem cells; pluripotent; stem cell therapy; nestin

干细胞(stem cell)是指一类具有高度增殖潜能(high proliferative potential)、自我更新能力(self-renewal)以及高度分化能力(differentiation ability)的早期未分化细胞^[1]。自1981年Evans和Kaufman建立第一个小鼠胚胎干细胞系^[2],现阶段干细胞研究已经取得了跨越式的发展。由于干细胞的多向分化能力、自我更新能力或旁分泌功能,干细胞在细胞治疗方面展示了巨大的潜能^[3]。研究表明,干细胞有望治疗神经退行性疾病、骨损伤、杜氏肌营养不良、糖尿病等疾病^[4-7]。2013年,美国FDA批准用干细胞治疗慢性脊髓损伤的临床实验,同样证实了干细胞治疗的有效性。

干细胞的研究受到越来越多的关注,然而由于胚胎干细胞涉及伦理道德方面的争议,严重限制了其在临床上的运用。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是目前最受关注的干细胞成员,具有高度自我更新能力和多向分化潜能^[8],然而骨髓间充质干细胞的获得具有侵入性从而制约了其在临床中的应用^[9]。理想的干细胞应具备无伦理道德的争议、易于获得、高度增殖能力以及多向分化的潜能等特性^[10]。

子宫是一个具有高度再生及分化能力的组织,每个月经周期,女性的子宫内膜可以从0.5 mm左右增长到5~7 mm左右^[11],一个女性一生可以经历400次这样的循环。这些均提示我们,子宫内膜中含有具有高度增殖能力的干细胞。研究表明,子宫内膜中含有干细胞,具有高度的分化潜能,增殖能力以及较低的免疫源性。但是其直接获得途径,包括子宫切除术、早起妊娠脱膜、刮除术均对供者具有严重侵入性^[12]。

近年来,日本科学家在女性经血中发现了具有多向分化潜能的干细胞,该干细胞可用于修复受损的心肌组织^[13]。2008年,美国科学家Patel等^[14]发现,从健康女性经血中可分离出来间充质干细胞,这些细胞具有多向分化能力,并将该细胞命名为经血源子宫内膜干细胞(menstrual blood-derived mesenchymal stem cells, MenSCs)。经血的获得不具有侵入性,

不会对供者造成伤害, MenSCs的来源广泛,体外培养具有成体干细胞样特征,展示出较高的增殖潜能、向多种细胞分化的能力^[15]。

现阶段,对经血源子宫内膜干细胞的研究尚处于起步时期。为了进一步深入研究经血来源的干细胞,本实验拟对MenSCs的生长、鉴定和体外分化进行研究;检测该细胞的群体倍增时间、表面抗原表达以及nestin表达情况;连续3周检测细胞成脂分化能力,并从多方面验证其成骨分化效果,探索其在临床应用中的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

收集健康女性(20~40岁)志愿者的经血样品。样品48 h内送往实验室处理, MenSCs分离提取在亚洲干细胞库(上海坤爱生物科技有限公司)完成。本研究获得亚洲干细胞库和上海交通大学药学院伦理委员会批准,医疗或人体废弃物处理按国家标准执行。

1.2 试剂及仪器

α -MEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶-EDTA由美国Gibco公司提供; L-抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、胰岛素、异丁基甲基黄嘌呤、吡啶美辛购自Sigma公司; CD29、CD90、CD105、CD14、CD45、HLA-DR购自eBioscience公司; 蛋白裂解液、ALP试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗人nestin一抗等购自Abcam公司; 羊抗兔DyLight549二抗购自联科生物; 其他试剂均为国产分析纯。

6孔和24孔细胞培养板(美国Costar公司); CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司); 倒置显微镜(Olympus公司); 激光共聚焦显微镜(Leica公司)。

1.3 MenSCs原代培养

本研究所用MenSCs及相关材料由亚洲干细胞库惠赠,原代细胞用6孔板接种,用含20% FBS的基本培养基培养。48 h半量换液,72 h后全量换液,将未贴壁的细胞弃除。倒置显微镜下观察细胞形态及

生长状况。当细胞融合至80%~90%后,细胞进行常规传代处理。

1.4 MenSCs增殖能力检测

取生长良好的MenSCs细胞,胰酶消化,培养基重悬后计数,细胞以 1×10^4 /孔接种于24孔板中,置于 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱内培养。每天设3个复孔,连续测8天。台盼蓝染色后血细胞计数板,分析该细胞增殖能力。

根据生长曲线,以Patterson公式计算对数生长期的细胞群体倍增时间(T_d)。公式如下:

$$T_d = T \times \frac{\lg 2}{\lg \left(\frac{N_t}{N_0} \right)}$$

其中: T_d 代表群体倍增时间; T 代表生长曲线中的指数增殖时间; N_0 是接种时的细胞数; N_t 是指数增殖末期的细胞数。根据此公式计算MenSCs的群体倍增时间 T_d 。

1.5 细胞表面抗原鉴定

取第4代MenSCs, PBS清洗2遍,胰酶消化,制成单细胞悬液,然后PBS清洗3遍,调整细胞密度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$,细胞分别与CD13-FITC、CD14-FITC、CD45-FITC、HLA-DR-FITC、CD29-PE、CD90-PE、CD105-APC流式抗体于 4°C 避光孵育30 min。与Anti-human IgG1 FITC/PE(eBioscience, USA)抗体结合过的细胞样品作为同型对照样品。孵育结束后,再次使用PBS清洗2~3遍,洗去未结合的抗体,将细胞样品置于 4°C ,并上机使用流式细胞仪(FACSCalibur, BD)进行检测,检测结束后使用CellQuest软件对数据进行处理。

1.6 nestin蛋白检测

取生长良好的第4代的MenSCs,制成细胞爬片,多聚甲醛固定30 min,0.5% Triton 100室温孵育30 min,5%羊血清室温封闭1 h,兔抗人nestin一抗于 4°C 过夜孵育,二抗羊抗兔DyLight549孵育室温孵育1 h,DAPI室温染5 min, PBS清洗,激光共聚焦镜下拍照。

1.7 成骨分化及检测

取第4代MenSCs,按 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种至12孔板中,细胞过夜贴壁后更换成骨诱导培养液,成骨诱导培养液为H-DMEM添加10% FBS、200 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松。对照组培养液为H-DMEM添加10% FBS,细胞置入

37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中进行培养,每两天换液1次,连续培养3周。在第1、2、3周结束时,检测其胶原表达情况、ALP活性以及钙结节表达情况。

天狼星红染色及半定量分析:细胞PBS清洗2遍,加入天狼星红染色, 37°C 30 min, PBS清洗3次,镜下观察。每孔加入1:1甲醇/NaOH溶液300 μL ,室温下脱色10 min,转移至96孔板中,酶标仪测定495 nm波长的吸光值。

茜素红染色及半定量分析:细胞PBS清洗2遍,用4%多聚甲醛室温固定30 min,加入40 mmol/L茜素红 37°C 染色30 min。PBS清洗3遍,洗去多余染料,镜下观察,用10 mmol/L十六烷基吡啶溶解钙结节,酶标仪测定550 nm波长的吸光值。

ALP检测:细胞加入150 μL 蛋白裂解液,将蛋白裂解液转移至低温高速离心机,于 4°C 下 $14\ 000 \times g$ 离心5 min,取上清50 μL 加入至另一个EP管,使用ALP试剂盒,加入PNPP液50 μL , 37°C 反应30 min,100 μL NaOH终止反应,转移至96孔板,测定405 nm波长的吸光值。

1.8 成脂分化及检测

取第4代MenSCs,按 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于12孔板中,细胞过夜贴壁后更换成脂诱导培养液,成脂培养液为H-DMEM培养液添加10% FBS, 1×10^{-6} mol/L地塞米松,10 mol/L胰岛素,0.5 mmol/L IBMX,0.2 mmol/L 吡啶美辛,对照组培养液为H-DMEM添加10% FBS,细胞置入 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中进行培养,每两天换液1次。分别在诱导2、3、4周结束时,进行油红O染色和半定量测量。

油红O染色及半定量分析:油红O干粉0.4 g加入10 mL异丙醇充分溶解后,和三蒸水以3:2比例混合,过滤。细胞用PBS冲洗3次,再用4%多聚甲醛室温固定30 min,加入油红O染液 37°C 孵育30 min, PBS清洗3遍,75%乙醇清洗1遍,镜下观察,加300 μL 异丙醇溶解油红O,转移至96孔板,测定510 nm波长的吸光值。

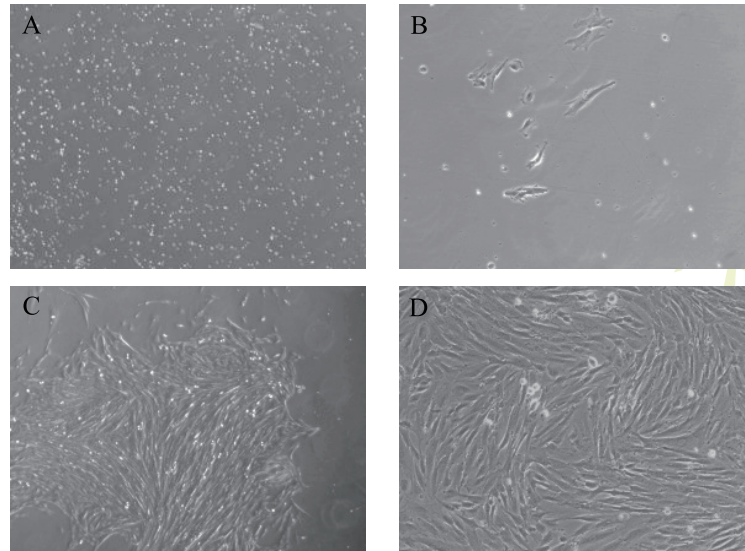
1.9 数据统计

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示,显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 细胞分离

原代分离培养的细胞可见有大量悬浮、遮光



A: MenSCs接种时细胞形态(40×); B: 72 h后全量换液细胞形态(100×); C: 7 d后细胞成长梭状(40×); D: MenSCs P3细胞成漩涡状排列(100×)。
A: morphology of MenSCs after seeding (40×); B: primary MenSCs culture 72 h after seeding(100×); C: primary MenSCs culture 7 d (40×); D: morphological changes of MenSCs at P3 (100×).

图1 MenSCs的形态学观察

Fig.1 Morphology of menstrual blood-derived mesenchymal stem cell

性强的圆形细胞(图1A), 72 h全量换液除去未贴壁的血细胞, 可见形成的散在分布的细胞, 形态呈现纤维细胞的梭状以及石子状的细胞散在贴壁(图1B)。7 d纤维状细胞数目明显增多, 呈现纤维样细胞长梭形、多角形外观, 有较长突起, 有较强的折光性(图1C)。12~14 d后, 细胞生长良好, 为长梭形细胞单层, 细胞呈漩涡状排列。随传代次数增多, 除去大部分杂质细胞, 细胞呈纺锤状(图1D)。经冻存复苏后细胞形态学方面无明显变化。

2.2 细胞生长动力学

细胞接种密度为 1×10^4 /孔, 细胞接种后, 第1天为潜伏适应期, 细胞增殖较慢, 从第2天起细胞增殖加快, 进入了对数生长期, 第5天起细胞生长进入平台期, 细胞数目维持在 1.4×10^5 /孔。至检测结束时, 未出现接触抑制期, 未出现典型细胞曲线的衰亡期(图2)。台盼蓝检测细胞活率可达到96%以上。

根据生长曲线以及Patterson公式计算得到, P4代MenSCs的群体倍增时间为32.2 h。

2.3 细胞表型鉴定结果

流式细胞结果表明, MenSCs均一地高表达CD105、CD29、CD90, 基本不表达CD45、CD14(图3)。其中, CD105被认为是间充质干细胞的特定表面抗原, CD29被认为是间充质干细胞表面黏附分子的特异性表面抗原, CD90被认为是包括T细胞、肝干细

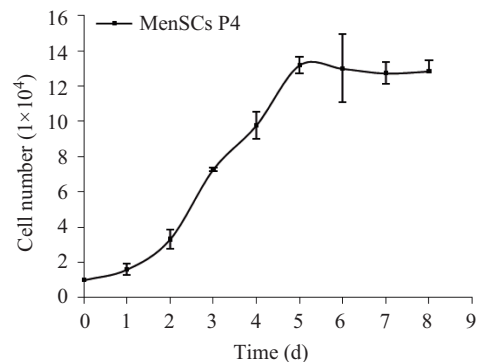


图2 MenSCs生长曲线

Fig.2 Cell growth curve of MenSCs

胞表面共同抗原, CD45被认为是白细胞表面共同抗原, CD14被认为是单核/巨噬细胞表面抗原。同时, MenSCs呈现HLA-DR阴性, 表明MenSCs具有较低的免疫源性。

2.4 nestin阳性检测

采用免疫荧光的方法, 检测MenSCs中nestin蛋白的表达情况。免疫荧光显示, MenSCs自身表达nestin蛋白, 红色区域为细胞质nestin阳性表达, 蓝色为DAPI染核部分(图4)。

2.5 多向分化潜能

2.5.1 成骨分化 连续3周动态检测细胞成骨诱导结果。酶标仪495 nm半定量检测胶原染色结果, 表明第1周分化结束时, 成骨诱导组胶原表达明显高

于对照组($P<0.01$); 第2周分化结束时, 诱导组胶原染色表达持续升高且高于对照组($P<0.05$); 第3周分化结束时, 诱导组胶原表达量明显降低于对照组($P<0.05$)(图5A)。

酶标仪405 nm半定量检测ALP表达情况, 结果表明, 在第1周时, ALP表达量诱导组与对照组无明显差异, 随着分化时间的延长, 诱导组ALP表达量呈现上升趋势。在第2周结束时, 对照组ALP的表达量明显地高于分化组的表达量($P<0.01$)。在第3周结束时, ALP活性明显增加, 分化组的ALP活性达到最高值(图5B)。

茜素红染色表明, 诱导组细胞在第1周时未形成明显的成骨结节; 在第2周结束时, 诱导组细胞形成了明显的钙结节, 茜素红染色为阳性, 对照组细胞

未形成钙结节; 在第3周结束时, 分化组细胞钙结节明显变大(图5C)。酶标仪550 nm半定量分析茜素红染色结果显示, 第2周分化组细胞的钙结节表达量高于对照组细胞($P<0.05$); 第3周茜素红半定量分析明显高于对照组细胞($P<0.01$, 图5D)。

连续观察3周的结果表明, MenSCs成骨分化初期和中期时表达胶原, 后期胶原表达变弱, ALP的活性呈持续增加的状态。茜素红染色表明, 钙结节随着分化时间的增加而增多。MenSCs体现了较为典型的成骨分化特性。

2.5.2 成脂分化 检测细胞成脂诱导结果, 第1周显示细胞由长梭形变为圆形, 油红O染色无明显油滴出现。第2周结果同第1周。从第3周起细胞内有小油滴出现, 油红O染色后显示有脂质沉淀。随着培

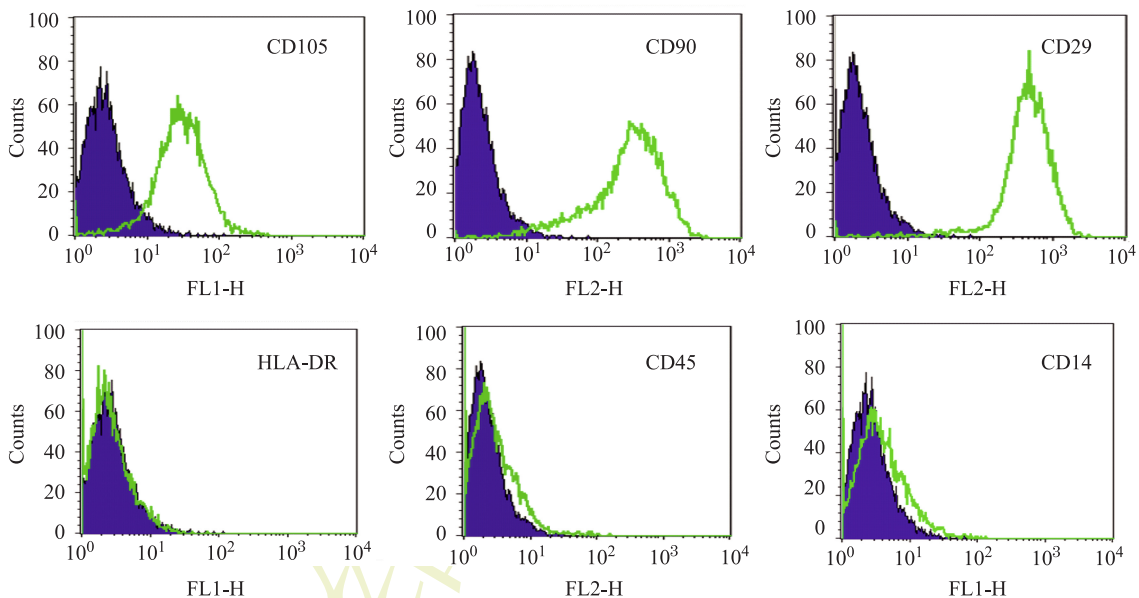


图3 流式细胞鉴定MenSCs免疫表型结果

Fig.3 Immunophenotypic characterization of MenSCs by flow cytometry

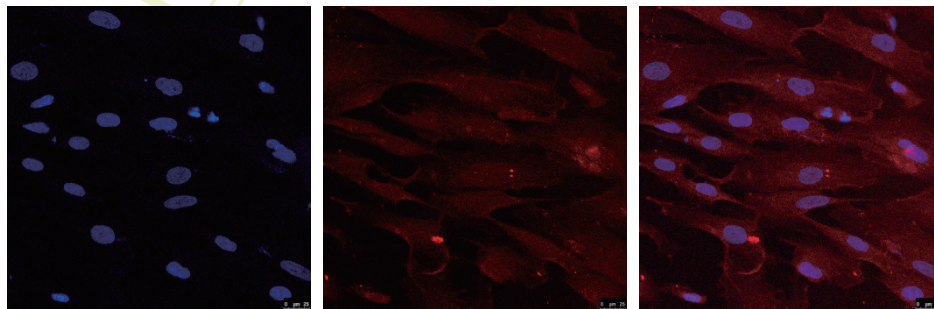
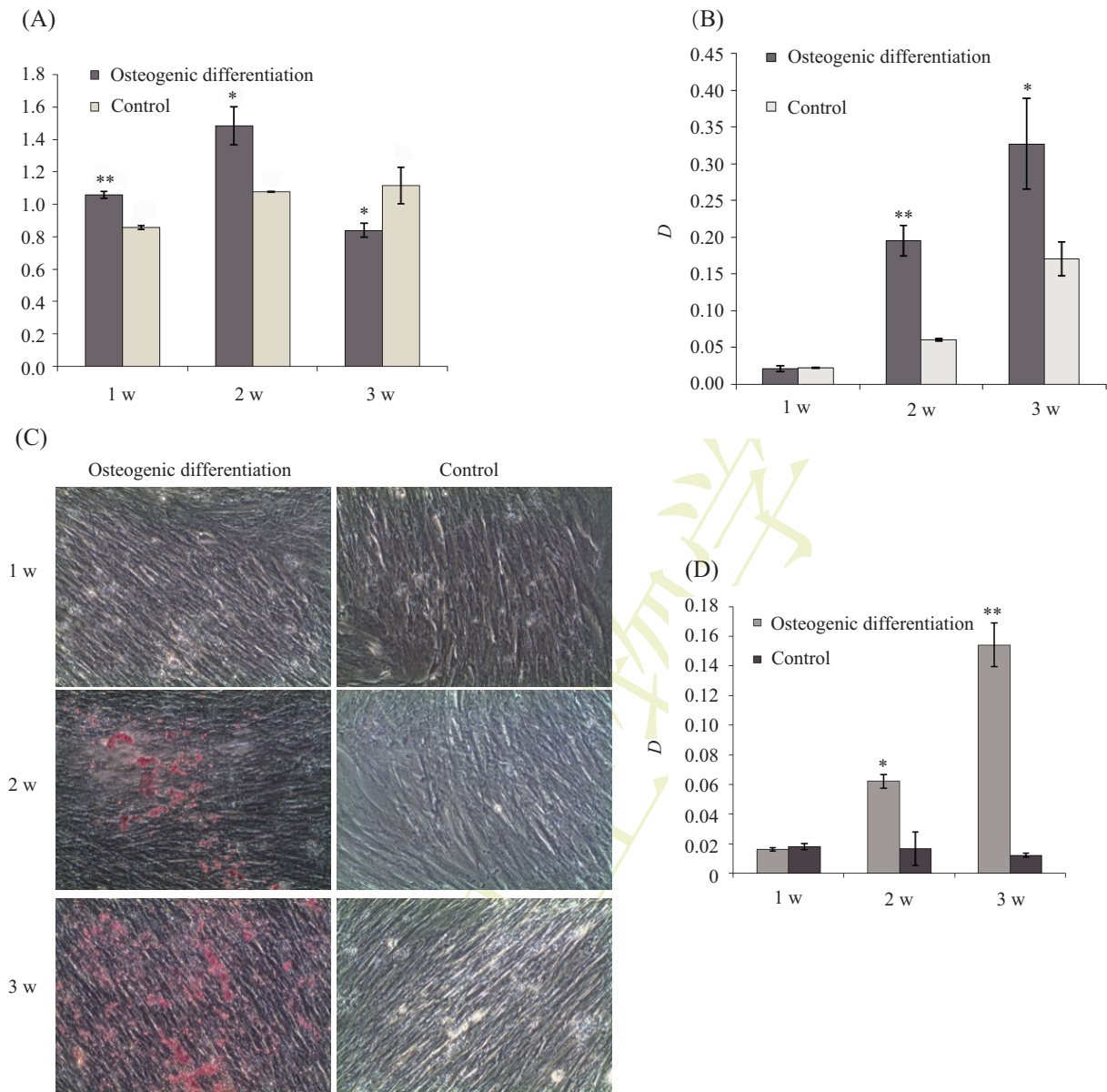


图4 免疫荧光nestin阳性染色细胞

Fig.4 MenSCs expressed nestin detected by immunofluorescence staining



A: MenSCs成骨诱导后天狼星红染色半定量检测; B: 第四代MenSCs成骨诱导后ALP检测; C: MenSCs成骨诱导后茜素红染色; D: MenSCs成骨诱导后茜素红染色半定量检测。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与Control组比较。

A: the quantitative measuring D of Sirius Red; B: ALP measurements of MenSCs osteogenic differentiation; C: Alizarin Red Staining of MenSCs osteogenic differentiation; D: the quantitative measuring D of Alizarin Red. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control group.

图5 MenSCs成骨诱导分化检测

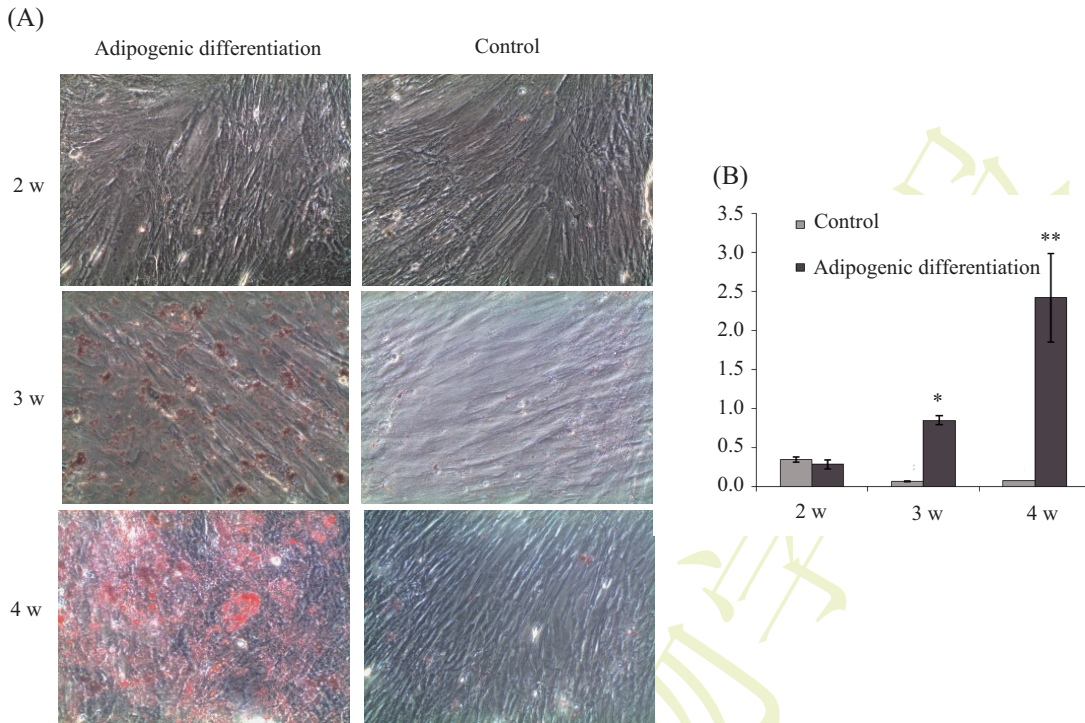
Fig.5 Detection of the MenSCs osteogenic differentiation

养时间油滴变大、变多, 对照组并未染上色(图6A), 异丙醇溶解后550 nm的 D 值分析可得, 第3周和第4周、对照组与分化组相差明显($P < 0.05$), 且随着分化时间的延长分化效果明显(图6B)。

3 结论

细胞治疗需要约 1×10^9 干细胞, 意味着需要有足够来源和高度再生能力的高质量干细胞^[16], 因此必

须找到理想的种子细胞。研究表明, 子宫内膜中存在具有高度增殖能力、自我更新和分化潜能的干细胞, 但是直接获得子宫内膜基底层干细胞是一个具有侵害性的过程。女性经血中含有脱落的子宫内膜, 提示我们可以直接从女性经血中获得子宫内膜干细胞。研究证实了女性经血中存在子宫内膜干细胞, 且由于子宫内膜在每个月经周期中都自我更新, 是较为年轻的组织^[13]。经血源子宫内膜干细胞具有来



A: MenSCs成脂诱导后油红O染色; B: MenSCs成脂诱导后油红O染色半定量检测。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与Control组比较。

A: Oil Red Staining of MenSCs adipogenic differentiation; B: the quantitative measuring D of Oil Red. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control group.

图6 MenSCs成骨诱导分化检测

Fig.6 Detection of the MenSCs adipogenic differentiation

源广泛、不会对供者造成伤害、来源成本较低的有点,属于人体废弃物,不受伦理道德争议,且其增殖速度快,具有多向分化的潜能。

经血源子宫内膜干细胞的研究较新,国内外相关报道并不多见,本实验验证了经血源子宫内膜的基本生物学特性,证实健康女性经血中存在间充质干细胞,具有贴壁性,细胞形状为长梭形。流式细胞分析鉴定细胞表达间充质表面抗原,高表达整合素CD29和黏附分子CD90。不表达如白细胞表面共同抗原CD45以及单核/巨噬细胞表面抗原CD14。从细胞贴壁性及表面抗原表达两方面可证明该细胞为MenSCs。器官移植以及细胞治疗中最大的阻碍之一是人体的免疫源性,目前一般认为,MHC-II的表达可推测其免疫原性强弱^[17],本实验中流式细胞仪分析证实MenSCs基本不表达HLA-DR,具有较低的免疫源性,由此可推测MenSCs在临床治疗中,异体移植无免疫排斥反应或者免疫排斥反应较低。本实验中的MHC-II不表达,证实了该细胞的较低的免疫原性。此外,本实验中生长曲线显示, MenSCs潜伏期较短,倍增时间为32.2 h,比一般间充质干细胞的倍增时间短,证实了该细胞的活力。

nestin蛋白又叫巢蛋白,是一种第VI类中间丝蛋白, nestin是神经干细胞、胰腺干细胞的标志分子。在向神经方向分化和胰岛方向分化时, nestin的阳性表达是最早一个先导蛋白的表达,随着分化的成熟,该蛋白的表达呈下调趋势^[18]。本实验中免疫荧光证实了细胞的nestin的阳性表达情况,神经方向为外胚层方向分化的典型代表,胰岛方向分化为内胚层的典型代表。nestin阳性表达为该细胞向神经细胞以及胰岛方向分化提供了支持。

本实验深入检测了MenSCs的成骨分化潜能,连续3周动态检测MenSCs的成骨成脂分化过程,在成骨分化过程中, MenSCs展示了典型的成骨分化特性,分化初始阶段细胞分泌表达一型胶原。而一型胶原是成骨的主要标志^[19],可作为干细胞向骨细胞分化的标志。ALP为碱性磷酸酶,广泛分布于人体的各个组织中,是成骨细胞以及成骨分化的标志性酶。它的作用是水解有机磷酸盐释放出无机磷,并启动钙化进程,是骨形成的标志之一。钙结节作为检测成骨方向分化的经典指标。

对于成脂方向的验证,选择较为经典的油红O染色。本实验中MenSCs在2周左右表现出小脂滴,

随着时间的增长油滴数目进一步增大。第4周时, 可见大部分细胞出现红色的油滴, 证实了该细胞向成脂方向的分化能力。相比于成骨分化, MenSCs的成脂分化出现的时间较晚。本文现阶段更为侧重体外研究方面, 在后续的深入研究中会针对于成骨分化方向进行动物学实验, 已验证其体内生物学功能。其成骨和成脂机理方面的研究尚有不足, 在今后的研究中应进一步完善其成骨和成脂机理方面的研究, 为临床应用奠定一定的基础。

综上所述, 可成功从健康女性的月经血中分离出MenSCs, 且该干细胞表达典型的间充质干细胞表面抗原, 表达nestin蛋白, 体外具有较短的群体倍增时间。此外, MenSCs具有的成骨分化以及成脂分化特性。MenSCs具有来源广、易分离、无伦理道德方面争议等优势, 具有增殖速度快、多向分化潜能等特点。对于MenSCs的研究, 目前国内都尚在起步阶段, 相关研究有待进一步深入。

致谢——

感谢亚洲干细胞库(上海坤爱生物科技有限公司)为基础研究提供的细胞样本和材料。

参考文献 (References)

- Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(9): 726-3.
- Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- Arai S, Minjares C, Nagafuchi S, Miyazaki T. Improved experimental procedures for achieving efficient germ line transmission of nonobese diabetic (NOD)-derived embryonic stem cells. *Exp Diabetes Res* 2004; 5(3): 219-26.
- Wolff E, Gao X, Yao K, Andrews Z, Du H, Elsworth J, *et al.* Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J Cell Mol Med* 2011; 15(4): 747-55.
- Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: A challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histo-pathol* 2009; 24(1): 107-16.
- Ichima TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion Rde N, Paris E, *et al.* Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol* 2010; 260(2): 75-82.
- Vaananen HK. Mesenchymal stem cells. *Ann Med* 2005; 37(7): 469-79.
- Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BM-SCs) in bone engineering: Limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* 2000; 32 (1): 160-5.
- Zhang MJ, Liu B, Xia W, Sun ZY, Lu KH. Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? . *Med Hypotheses* 2009; 72(3): 252-4.
- 杨 华. 子宫内膜成体干细胞研究现状. 现代妇产科进展(Yang Hua. Endometrial mesenchymal stem cells research progress. *Prog Obstet Gynecol*) 2012; 21(6): 486-9.
- Schüring AN, Schulte N, Kelsch R, Röpke A, Kiesel L, Götte M. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril* 2011; 95(1): 423-6.
- Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, *et al.* Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal Cells. *Stem Cells* 2008; 26(7): 1695-704.
- Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant* 2008; 17(3): 303-13.
- Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, *et al.* Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Transl Med* 2007; 5: 57.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, *et al.* Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomized controlled trial. *Lancet* 2006; 9569(367): 113-21.
- 张 启. 骨髓间充质干细胞免疫排斥的研究进展. 医学综述 (Zhang Qi. Bone marrow mesenchymal stem cells between the research progress of immune rejection. *Med Recapitulate*) 2009; 15(9): 1297-300.
- 李东培, 汪华侨, 姚 志. 巢蛋白的表达模式及其功能. 解剖学研 (Li Dongpei, Wang Huaqiao, Yao Zhi. Nestin protein expression patterns and their functions. *Anat Res*) 2004; 26(3): 216-7.
- Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata R, *et al.* Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int* 2004; 28(4): 255-65.