

人胚胎干细胞源性间充质干细胞的研究进展

冯年花*

(首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心, 北京 100020)

摘要 人胚胎干细胞源性间充质干细胞(human embryonic stem cell derived mesenchymal stem cells, hESC-MSCs)是由胚胎干细胞诱导分化而来的间充质干细胞,具有成体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)相似的生物学特性和功能,由于其来源丰富、均一性好,受到广泛关注,是MSCs的一种新的获取途径。其应用避免了胚胎干细胞直接应用而面临的致瘤性问题,是胚胎干细胞应用于疾病治疗的一种新的形式,具有广阔的应用前景。然而,hESC-MSCs真正运用于临床治疗仍面临较多的问题需要解决。该文就hESC-MSCs的诱导分化、生物学特性、应用前景及目前尚存在的问题作一综述。

关键词 间充质干细胞; 人胚胎干细胞; 再生医学

Progress in the Study of Human Embryonic Stem Cell Derived Mesenchymal Stem Cells

Feng Nianhua*

(Medical Research Center, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

Abstract Human embryonic stem cell derived mesenchymal stem cells (hESC-MSCs) are a kind of mesenchymal stem cells (MSCs) differentiated from human embryonic stem cells (hESCs). hESC-MSCs possess similar properties with adult MSCs, and have attracted extensive attentions for its rich source and good homogeneity. So it is a new approach to obtain MSCs from hESCs. The application of hESC-MSCs avoid tumorigenesis caused by using hESCs directly. So it is a good format to adopt hESC-MSCs instead of hESCs in disease therapy. However, there are several problems remaining to be settled before its application. Here, we mainly described the differentiation, biological characteristics and application of hESC-MSCs, as well as challenges that should be overcome before used in clinic.

Keywords mesenchymal stem cells; human embryonic stem cells; regenerative medicine

干细胞是一种具有自我更新和多向分化潜能的细胞群体,近年来受到学者们的广泛关注。按照发育阶段,干细胞可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞(adult stem cells,

ASCs)。ESCs来自囊胚期的内细胞团,具有无限增殖和三胚层分化潜能^[1],一直是再生医学关注的焦点。然而,其来源受限,且面临免疫排斥^[2]和致瘤性^[3]等问题,极大地限制了其在临床上的运用。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是最具代表性的成体干细胞之一,存在于多种组织器官当中^[4-5],对组织损伤修复和疾病治疗具有良好的作用,无致瘤性^[6],是再生医学最具潜力的种子细胞之一。然而,间充质干细胞来源受限,在体外不能无限增殖,且不同供者来源的MSCs的生物学特性有一定差异,极大地影响了其后期应用。

收稿日期: 2014-09-03 接受日期: 2014-11-28

国家自然科学基金(批准号: 81170640)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-85231375, E-mail: leanne02@163.com

Received: September 3, 2014 Accepted: November 28, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170640)

*Corresponding author. Tel: +86-10-85231375, E-mail: leanne02@163.com

网络出版时间: 2015-02-28 15:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150228.1508.005.html>

近年来, 研究者通过定向诱导, 将人 ESCs 诱导分化为间充质干细胞, 即人胚胎干细胞源性间充质干细胞 (human embryonic stem cell derived mesenchymal stem cells, hESC-MSCs)。hESC-MSCs 与成体 MSCs 具有相似的生物学特性和功能, 来源丰富, 不产生畸胎瘤, 均一性好^[7-12]。hESC-MSCs 结合了 ESCs 和成体 MSCs 的优点, 克服了二者的不足, 有望取代传统的 ESCs, 成为干细胞研究和应用的热点。

1 hESC-MSCs的诱导

目前, hESC-MSCs 的诱导方法主要有三种: 拟胚体诱导法、饲养层法及培养基直接诱导法(图1)。

1.1 拟胚体诱导法

拟胚体是 ESCs 在悬浮培养条件下细胞聚集形

成的囊状结构。拟胚体状态下, ESCs 能够启动自发分化模式, 向三个胚层的细胞(如神经、心肌和肝脏细胞等)分化^[13-15], 是一种经典的诱导分化模式。2004年, Xu等^[16]将人 ESCs 在悬浮状态下培养 4 d 形成的拟胚体接种到明胶包被的培养皿中, 9 d 后, 拟胚体周围爬出成纤维样或间充质样形态的细胞, 这些细胞表达 CD29、CD44、CD71、CD90 和 CD106, 不表达 CD45 或 CD14, 且在特定诱导条件下能向成脂、成骨及成软骨细胞分化, 证实具有 MSCs 的特性, 从而首次获得了 hESC-MSCs, 为 MSCs 的获得开辟了一条新的途径。Hwang等^[18,17]利用类似的方法, 将悬浮培养 10 d 的拟胚体接种到明胶包被的培养皿中, 用间充质干细胞培养基, 即含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium) 继续培养 10 d, 获得了具有明确 MSCs 特性的细胞, 证实了

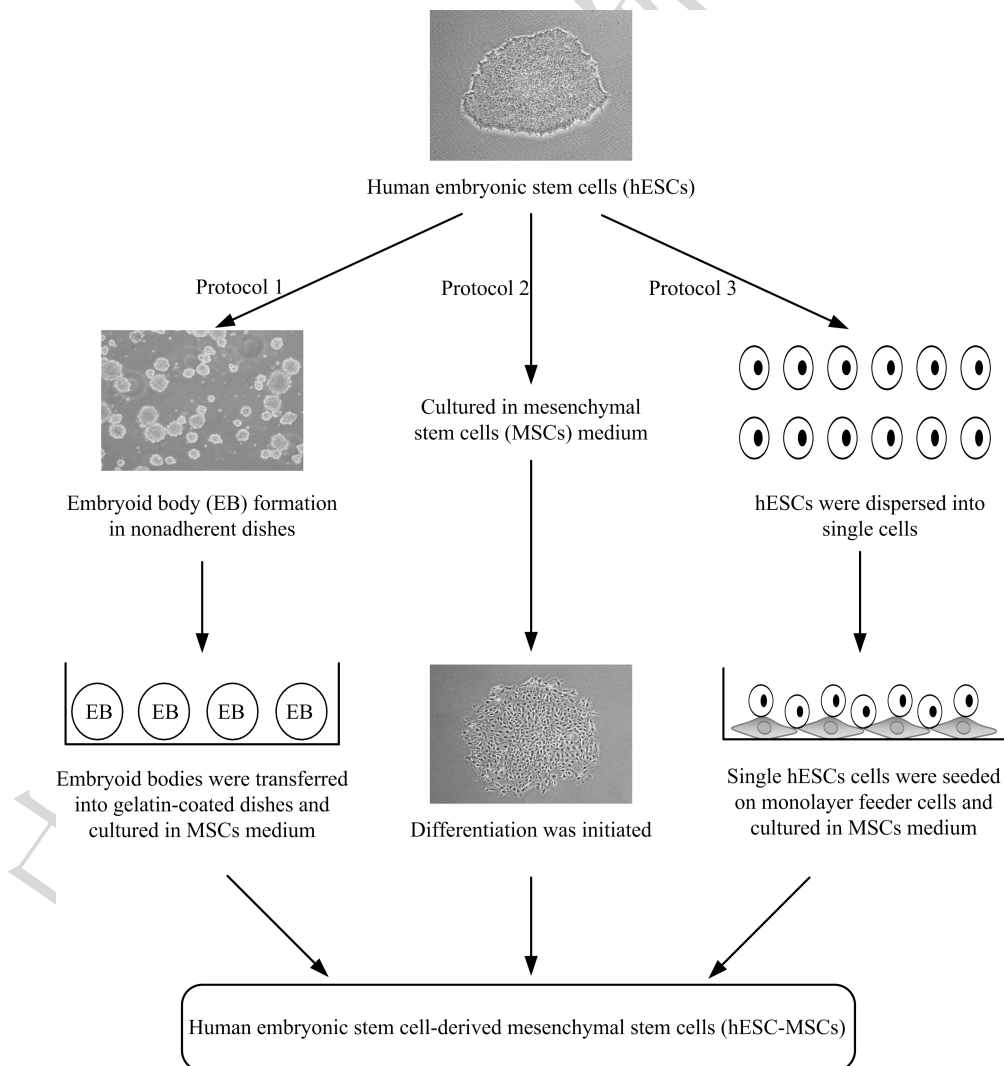


图1 人胚胎干细胞向间充质干细胞诱导分化的三种主要方法

Fig.1 Differentiation protocols of human embryonic stem cells to mesenchymal stem cells

拟胚体诱导法的可重复性。在拟胚体诱导法中, 拟胚体的形成主要起启动分化的作用, 其形成时间具有较大的弹性。有研究者用间充质干细胞培养基分别培养7 d^[18]、10 d^[19]和14 d^[20]的拟胚体, 均能获得hESC-MSCs。由此可见, 后期间充质干细胞培养基的筛选培养可能对hESC-MSCs的获得具有重要的作用。

1.2 饲养层法

有研究者采用小鼠骨髓基质细胞系作为饲养层, 诱导获得MSCs细胞^[21-23]。骨髓基质细胞是骨髓中的结缔组织细胞, 能支持血细胞的生长, 常被用于血细胞的体外培养和造血诱导分化过程^[24-25]。2005年, Barberi等^[21]将人ESC系H1/H9接种到OP9细胞上, 并用 α -MEM(α -modified minimum essential)+20%胎牛血清进行诱导, 40 d后, 获得了CD73阳性的细胞, 这些细胞表达MSCs的标志分子CD105、基质细胞抗原(stromal cell antigen, STRO-1)、CD106、CD29、CD44、CD54和CD166, 不表达造血细胞的标志分子CD34、CD45、CD14, 能在MSCs培养基中进行扩增, 并且具有向成脂、成骨和成软骨细胞分化的能力。Trivedi等^[22]在该诱导方法上稍加改进, 将人ESC接种到辐照过的OP9细胞上, OP9细胞丧失增殖能力, 从而降低了其对分化过程的干扰, 8 d后即可获得CD73阳性细胞, 大大缩短了诱导时间。此外, 不同的基质细胞系对hESC-MSCs的诱导具有相似的作用。Undale等^[23]用灭活的M2-10B4(小鼠骨髓纤维原细胞)作为支持细胞, 同样诱导获得了CD73阳性的hESC-MSCs细胞。然而, 在诱导过程中, 由于诱导MSCs与基质细胞具有类似的形态, 因此, 分化过程不易观察, 获得的细胞需通过流式细胞进行分选纯化, 增加了细胞的损失和实验步骤, 且获得的细胞容易被动物源性成分污染, 不利于hESC-MSCs的后期应用。

1.3 培养基直接诱导法

在培养人ESC的过程中, ESCs克隆的中部或边缘会出现自发分化的细胞, 这些细胞具有多向分化能力, 能够分化为神经元、心肌细胞等。将这部分细胞分离出来并用MSCs培养基(高糖DMEM+10% FBS)培养4周后, 培养皿中出现多层的上皮样细胞。这些上皮样细胞具有较强的存活能力, 经传代后, 能形成均一的指纹样形态。流式结果显示, 这些细胞表达CD44、CD71、CD105、CD73、CD166、人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I类抗原HLA-

ABC, 但不表达造血谱系标志分子CD45和CD34, 且具有成脂、成骨分化能力, 证明获得的细胞是具有双向分化能力的MSCs^[7,11,26-27]。这一结果说明, 胚胎干细胞能自发分化为间充质干细胞。受到该结果的启示, Trivedi等^[9]和Gruenloh等^[12]将ESC换液频率由每天换液调整为每3~5 d换液, 在这种培养条件下, 克隆边缘的细胞开始分化, 爬出成纤维样的细胞; 9~10 d后, 这部分细胞的比例达40%~50%, 数次传代后, 细胞形态逐渐统一, 并具有MSCs的表型特征及多向分化能力。仔细分析可以发现, 该诱导方法和拟胚体法具有相同的原理, 都是先启动ESC分化, 分离获得早期的分化细胞后进行体外扩增, 只是启动ESC分化的方法不同。随后, Karlsson等^[10]和de Peppo等^[28]直接将未分化的ESC接种到MSCs培养基中培养, 亦获得大量纯化的hESC-MSCs细胞, 省去了启动分化的步骤。这可能是因为, 一方面, MSCs培养基的血清中含有大量中胚层诱导因子, 能够启动ESC向中胚层细胞分化^[29]; 另一方面, 相对于其他分化后的细胞而言, MSCs具有较强的增殖能力, 能够竞争性抑制其他细胞的生长, 在传代过程中不断发挥筛选作用^[10]。此外, 研究者通过在培养基中加入各种细胞因子和生长因子, 如碱性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor basic, bFGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF), 促进诱导过程中hESC-MSCs的存活和增殖, 优化诱导条件, 提高诱导效率^[30-37]。

上述三种诱导方法均能获得具有MSCs基本表型和分化能力的hESC-MSCs, 但三种诱导方法获得的hESC-MSCs之间是否存在其他差异尚未见报道。在诱导过程中, 诱导条件不同, 可能导致获得的细胞与成体MSCs存在差异。Boyd等^[38]采用内皮细胞生长培养基对hESC进行诱导培养, 最终获得的细胞具有MSCs的表型和成骨、成软骨分化能力, 但不能分化为成脂细胞。因此, 标准化的hESC-MSCs诱导和鉴定体系有待进一步的研究和完善。培养基直接诱导法是文献中应用最多的一种方法, 其优点主要表现在以下几个方面: 首先, 步骤简单, 不需要采用流式细胞术分选细胞; 其次, 不需要基质细胞, 能够避免其他细胞的污染, 更易获得无动物源性的细胞来源; 此外, 培养基直接诱导法效率较高。Domev等^[39]的结果显示, 饲养层法和培养基直接诱导法获得的hESC-MSCs中的

CD73阳性细胞率分别为 $26\% \pm 7\%$ 和 $49\% \pm 12\%$, 而培养14 d的拟胚体中只有4%的细胞显示CD73阳性。

2 hESC-MSCs的生物学特性

2.1 hESC-MSCs具有MSCs的表型特征

2006年, 国际干细胞协会对人MSCs的鉴定做了规定, 且要求以下三点同时满足。(1)MSCs在标准培养条件下能贴壁生长; (2)MSCs表达CD105、CD73和CD90, 不表达CD45、CD14、CD11b、HLA-DR、CD79 α 或CD119, 其中CD105、CD73、CD90的阳性率应 $\geq 95\%$, 其他阴性标志物的阳性率应 $\leq 2\%$; (3)MSCs在体外能向成脂细胞、成骨细胞及成软骨细胞分化^[40]。目前, 对hESC-MSCs的鉴定均参照上述标准。

2.2 hESC-MSCs具有低免疫原性及免疫调节活性

研究表明, hESC-MSCs具有骨髓间充质干细胞相似的免疫学特性^[41]。一方面, 在体外培养条件下, 将hESC-MSCs与小鼠脾脏来源的淋巴细胞共培养后, 与阳性对照组相比, 淋巴细胞不被活化, 没有明显的增殖反应, 说明hESC-MSCs不引起免疫反应, 即不具有或者有极低的免疫原性; 另一方面, hESC-MSCs能明显抑制共刺激因子对淋巴细胞的活化, 抑制其增殖, 从而抑制免疫反应。小鼠体内实验也证实了这一结果, 将hESC-MSCs和ESCs分别注射到四氯化碳诱导的肝损伤小鼠腹膜下, 一个月后发现, hESC-MSCs并不会诱导体内抗体的产生, 且注射hESC-MSCs的小鼠肝损伤部位的炎性浸润明显比对照组低, 说明hESC-MSCs能够抑制炎症细胞的浸润, 调节免疫反应。这可能是因为hESC-MSCs能够分泌一些具有酶活性的生物活性因子, 下调相关基因的表达, 破坏自然杀伤细胞(NK细胞)与靶细胞之间的突触连接, 降低细胞毒性因子的产生, 从而抑制淋巴细胞的增殖和细胞毒性反应, 发挥免疫调节作用^[34,42]。

2.3 hESC-MSCs不具有致瘤性

Olivier等^[7]发现, hESC-MSCs在体外培养条件下会发生衰老, 不能无限增殖; 而Lian等^[31]将hESC-MSCs接种到裸鼠肾包膜皮下后, 不产生畸胎瘤。这些研究说明, hESC-MSCs具有较高的生物安全性, 这也是hESC-MSCs未来能够应用于临床的前提和基础。

3 hESC-MSCs的应用前景

hESC-MSCs具有MSCs的生物学特性, 同时又

克服了成体MSCs来源受限的问题, 因此受到广大研究者的青睐, 在基础和临床领域均具有极大的应用前景。

3.1 基础研究方面

首先, hESC-MSCs属于早期中胚层祖细胞, 随着诱导体系的不断完善, 其诱导过程可作为早期中胚层分化的模型, 通过研究该诱导过程中相关信号分子的时序变化, 有助于阐明ESCs向中胚层诱导分化的相关机制。其次, hESC-MSCs可以作为ESCs的饲养层细胞或为ESCs的培养提供条件培养基^[7,16,32,43-44]。目前, 培养ESCs的饲养层细胞大部分是异种或异体细胞, 不利于后期ESCs的临床应用。将ESCs自身来源的MSCs作为饲养层细胞, 支持自身的生长, 来源丰富稳定, 且可避免动物源性成分的污染, 可为ESCs的基础研究和临床应用提供有利的条件。此外, hESC-MSCs具有向成脂、成骨和成软骨细胞分化的能力。建立相应的定向诱导体系, 有利于成脂、成骨和成软骨分化机制的研究。Song等^[45]利用hESC-MSCs成脂诱导分化体系, 发现bFGF能够促进hESC-MSCs向脂肪细胞分化。

3.2 临床应用方面

3.2.1 hESC-MSCs用于骨损伤性疾病的修复 hESC-MSCs具有成骨和成软骨分化能力, 能促进骨损伤的修复^[19]。Arpornmaeklong等^[26]将hESC-MSCs移植到颅骨缺损模型小鼠缺损部位后, 移植细胞能迁移到损伤区域边缘, 形成骨小结, 新生骨内有骨髓、松散的纤维组织和血管浸润, 缺损的颅骨组织得到修复。Harkness等^[46]也观察到类似的结果。Undale等^[23]将hESC-MSCs细胞移植到大鼠骨折模型后2周, 在骨折部位能够观察到明显的新生骨形成, 说明hESC-MSCs能够促进骨折愈合。

3.2.2 hESC-MSCs用于肌肉损伤的修复 将hESC-MSCs移植到大鼠的损伤的跟腱处, 4周后, 在移植部位能观察到存活的hESC-MSCs细胞, 与对照组相比, hESC-MSCs能明显提高损伤部位组织的形成速率, 促进跟腱的愈合^[33]。Ninagawa等^[47]发现, hESC-MSCs在体内具有骨骼肌分化潜能, 将hESC-MSCs移植到小鼠胫骨前肌损伤模型中, 能观察到60%以上的hESC-MSCs向骨骼肌细胞分化, 损伤肌肉的周围恢复了神经支配, 肌肉功能逐渐恢复。这一结果说明, hESC-MSCs能够明显促进损伤肌肉的功能恢复。

3.2.3 hESC-MSCs可用于缺血损伤性疾病的修复 Liu等^[48]将hESC-MSCs移植到脑缺血大鼠体内,细胞能自发迁移到梗死区域,直接分化为神经元及血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)阳性的血管内皮细胞,修复损伤区域,缩小梗死面积,促进大鼠运动功能的恢复。同时, MSCs也能通过间接释放血管生成因子,促进血管新生,修复缺血性疾病。研究发现, hESC-MSCs能够通过旁分泌作用,促进大鼠下肢缺血损伤区域内促血管生成因子的分泌,活化细胞增殖相关的信号通路,加速血管生成,促进组织损伤修复^[49]。Simpson等^[50]也观察到, hESC-MSCs能够阻止心室壁梗死的进一步恶化,提高舒张末压,刺激内皮细胞的生长,增强新生血管的形成,修复梗死区域。这些结果都表明, hESC-MSCs对于缺血性疾病有较好的修复效果。

3.2.4 hESC-MSCs应用于其他损伤性疾病和肿瘤的治疗 当移植到四氯化碳诱导的小鼠肝损伤模型时, hESC-MSCs能够准确地归巢到损伤区域,并分化为甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)阳性的肝细胞,从而治疗急性肝损伤^[51]。将hESC-MSCs移植到肺动脉高压模型小鼠中,移植3周后发现,与对照组相比, hESC-MSCs移植组的右心室收缩压、右心室肥大程度及肺动脉壁厚度均有所降低,说明hESC-MSCs对肺动脉高压亦有良好的治疗效果^[35]。此外, hESC-MSCs还能抑制肿瘤细胞的生长。Bak等^[52]将hESC-MSCs注射到胶质瘤大脑内,这些hESC-MSCs能迁移到肿瘤发生部位,抑制肿瘤的生长并延长受体的存活时间。

3.2.5 hESC-MSCs有望用于治疗免疫性疾病 一方面, hESC-MSCs不具有其来源细胞的免疫原性^[41];另一方面, hESC-MSCs具有免疫调节作用,能抑制过度的免疫反应。通过混合淋巴细胞实验证实, hESC-MSCs可分泌一些免疫相关的具有酶活性的生物活性因子^[42],强烈抑制淋巴细胞的增殖,抵抗体内的炎性浸润,减轻炎性反应,调节免疫反应^[41]。因此, hESC-MSCs有望用于一些免疫性疾病如移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)等的治疗。此外,在移植干细胞或器官时,利用MSCs的免疫调节作用,将MSCs与目的细胞或器官共移植,能够诱导免疫耐受,减少因免疫排斥反应产生的细胞及组织损伤,提高目的细胞及移植器官的存活率,增强移植效果^[53-55]。

4 存在的问题及展望

随着研究的不断深入, hESC-MSCs的优势逐渐显示出来,然而,也面临着一系列的问题,如:(1) hESC-MSCs面临了MSCs特性鉴定的普遍问题,即目前没有特异性的鉴定标志,这就导致各实验室获得的hESC-MSCs可能存在差异。(2)诱导体系成分不明确,无论是拟胚体法、饲养层法还是培养基直接诱导法,其诱导体系均含不明确成分,极大地影响了诱导过程的稳定性,不利于分化机制的研究。(3) hESC-MSCs和成体MSCs之间是否存在差别。(4) hESC-MSCs存在核型变异的风险^[56]。在无限传代过程中,有部分ESC子代细胞可能会发生染色体缺失或突变,影响其来源的hESC-MSCs的核型稳定性,影响临床应用。(5)hESC-MSCs的研究尚处于起步阶段,还有一部分问题未明确,如不同的诱导方法获得的hESC-MSCs是否存在差异?不同代数之间的hESC-MSCs是否存在差异?在数次传代后hESC-MSCs的干细胞生物学特性是否会消失?这些问题仍需进一步的深入探索。

和成体MSCs相比, hESC-MSCs来源于ESCs,不需要取供体自身细胞,避免了侵入性的操作,其来源丰富,且不产生畸胎瘤,克服了ESCs直接应用面临的致瘤性问题。随着多能干细胞技术的不断更新, ESCs来源的MSCs将展现出更大的优势,为干细胞治疗提供丰富的种子细胞来源,具有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- 1 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 2 Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Govaert JA, Cao F, Ransohoff K, Sheikh AY, *et al.* Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(35): 12991-6.
- 3 Lee AS, Tang C, Cao F, Xie X, van der Bogt K, Hwang A, *et al.* Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle* 2009; 8(16): 2608-12.
- 4 Wang S, Cheng H, Dai G, Wang X, Hua R, Liu X, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res* 2013; 1532: 76-84.
- 5 Bao XJ, Liu FY, Lu S, Han Q, Feng M, Wei JJ, *et al.* Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and anti-inflammatory and angiogenesis effects in an intracerebral hemorrhage rat model. *Int J Mol Med* 2013; 31(5): 1087-96.

- 6 Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 2010; 19(4): 491-502.
- 7 Olivier EN, Rybicki AC, Bouhassira EE. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(8): 1914-22.
- 8 Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, Bae J, *et al.* *In vivo* commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(52): 20641-46.
- 9 Trivedi P, Hematti P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* 2008; 36(3): 350-9.
- 10 Karlsson C, Emanuelsson K, Wessberg F, Kajic K, Axell MZ, Eriksson PS, *et al.* Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors—potential in regenerative medicine. *Sem Cell Res* 2009; 3(1): 39-50.
- 11 Yen BL, Chang CJ, Liu KJ, Chen YC, Hu HI, Bai CH, *et al.* Brief report—human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. *Stem Cells* 2009; 27(2): 451-6.
- 12 Gruenloh W, Kambal A, Sondergaard C, McGee J, Nacey C, Kalomoiris S, *et al.* Characterization and *in vivo* testing of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(11/12): 1517-25.
- 13 Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, *et al.* Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36(1): 22-9.
- 14 Huber I, Itzhaki I, Caspi O, Arbel G, Tzukerman M, Gepstein A, *et al.* Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *Faseb J* 2007; 21(10): 2551-63.
- 15 Tan JC, Li Y, Qu WY, Liu LY, Jiang L, Sun KL. Derivation of embryonic stem cell line from frozen human embryos and neural differentiation. *Neuroreport* 2008; 19(15): 1451-5.
- 16 Xu C, Jiang J, Sottile V, McWhir J, Lebkowski J, Carpenter MK. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* 2004; 22(6): 972-80.
- 17 Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Elisseff J. Biomaterials directed *in vivo* osteogenic differentiation of mesenchymal cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(15/16): 1723-32.
- 18 Brown SE, Tong W, Krebsbach PH. The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 2009; 189(1/2/3/4): 256-60.
- 19 Hu J, Smith LA, Feng K, Liu X, Sun H, Ma PX. Response of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells to osteogenic factors and architectures of materials during *in vitro* osteogenesis. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(11): 3507-14.
- 20 Lee EJ, Lee HN, Kang HJ, Kim KH, Hur J, Cho HJ, *et al.* Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(2): 705-15.
- 21 Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2005; 2(6): e161.
- 22 Trivedi P, Hematti P. Simultaneous generation of CD34+ primitive hematopoietic cells and CD73+ mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells cocultured with murine OP9 stromal cells. *Exp Hematol* 2007; 35(1): 146-54.
- 23 Undale A, Fraser D, Hefferan T, Kopher RA, Herrick J, Evans GL, *et al.* Induction of fracture repair by mesenchymal cells derived from human embryonic stem cells or bone marrow. *J Orthop Res* 2011; 29(12): 1804-11.
- 24 Bornhauser M. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood cells on feeder layers. *Methods Mol Biol* 2003; 215: 341-49.
- 25 Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: Efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005; 105(2): 617-26.
- 26 Arpornmaeklong P, Brown SE, Wang Z, Krebsbach PH. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18(7): 955-68.
- 27 Chen W, Zhou H, Weir MD, Tang M, Bao C, Xu HH. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(7/8): 915-27.
- 28 de Peppo GM, Sjoval P, Lenneras M, Strehl R, Hyllner J, Thomsen P, *et al.* Osteogenic potential of human mesenchymal stem cells and human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors: A tissue engineering perspective. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(11): 3413-26.
- 29 Bettiol E, Sartiani L, Chicha L, Krause KH, Cerbai E, Jaconi ME. Fetal bovine serum enables cardiac differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation* 2007; 75(8): 669-81.
- 30 Sze SK, de Kleijn DP, Lai RC, Khia WTE, Zhao H, Yeo KS, *et al.* Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(10): 1680-8.
- 31 Lian Q, Lye E, Suan YK, Khia WTE, Salto-Tellez M, Liu TM, *et al.* Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24-differentiated human ESCs. *Stem Cells* 2007; 25(2): 425-36.
- 32 Choo A, Ngo AS, Ding V, Oh S, Kiang LS. Autogenic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. *Methods Cell Biol* 2008; 86: 15-28.
- 33 Chen JL, Yin Z, Shen WL, Chen X, Heng BC, Zou XH, *et al.* Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles. *Biomaterials* 2010; 31(36): 9438-51.
- 34 Giuliani M, Oudrhiri N, Noman ZM, Vernochet A, Chouaib S, Azzarone B, *et al.* Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood* 2011; 118(12): 3254-62.
- 35 Zhang Y, Liao S, Yang M, Liang X, Poon MW, Wong CY, *et al.* Improved cell survival and paracrine capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells promote therapeutic potential for pulmonary arterial hypertension. *Cell*

- Transplant 2012; 21(10): 2225-39.
- 36 Zhang S, Jiang YZ, Zhang W, Chen L, Tong T, Liu W, *et al.* Neonatal desensitization supports long-term survival and functional integration of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in rat joint cartilage without immunosuppression. *Stem Cells Dev* 2013; 22(1): 90-101.
- 37 Chen X, Yin Z, Chen JL, Liu H, Shen W, Fang Z, *et al.* Scleraxis overexpression hESC-MSCs for Tendon Tissue Engineering with Knitted Silk-Collagen Scaffold. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(11/12): 1583-92.
- 38 Boyd NL, Robbins KR, Dhara SK, West FD, Stice SL. Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(8): 1897-907.
- 39 Domev H, Amit M, Laevsky I, Dar A, Itskovitz-Eldor J. Efficient engineering of vascularized ectopic bone from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(21/22): 2290-302.
- 40 Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 41 Tan Z, Su ZY, Wu RR, Gu B, Liu YK, Zhao XL, *et al.* Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells *in vivo* and *in vitro*. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; 12(1): 18-27.
- 42 Kimbrel EA, Kouris NA, Yavarian G, Chu J, Qin Y, Chan A, *et al.* Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev* 2014; 23(14): 1611-24.
- 43 Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, *et al.* An autogenic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(3): 306-14.
- 44 Wang Q, Fang ZF, Jin F, Lu Y, Gai H, Sheng HZ. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* 2005; 23(9): 1221-7.
- 45 Song X, Li Y, Chen X, Yin G, Huang Q, Chen Y, *et al.* bFGF promotes adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells. *Genet Mol Biol* 2014; 37(1): 127-34.
- 46 Harkness L, Mahmood A, Ditzel N, Abdallah BM, Nygaard JV, Kassem M. Selective isolation and differentiation of a stromal population of human embryonic stem cells with osteogenic potential. *Bone* 2011; 48(2): 231-41.
- 47 Ninagawa NT, Isobe E, Hirayama Y, Murakami R, Komatsu K, Nagai M, *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells promote muscle regeneration and accelerate functional recovery of injured skeletal muscle. *Biores Open Access* 2013; 2(4): 295-306.
- 48 Liu YP, Seckin H, Izci Y, Du ZW, Yan YP, Baskaya MK. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29(4): 780-91.
- 49 Laurila JP, Laatikainen L, Castellone MD, Trivedi P, Heikkilä J, Hinkkanen A, *et al.* Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cell transplantation in a rat hind limb injury model. *Cytotherapy* 2009; 11(6): 726-37.
- 50 Simpson DL, Boyd NL, Kaushal S, Stice SL, Jr Dudley SC. Use of human embryonic stem cell derived-mesenchymal cells for cardiac repair. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109(1): 274-83.
- 51 Su Z, Wu R, Tan Z, Li Y, Chen L, Luo J, *et al.* Early homing behavior of Stro-1- mesenchyme-like cells derived from human embryonic stem cells in an immunocompetent xenogeneic animal model. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 616-22.
- 52 Bak XY, Lam DH, Yang J, Ye K, Wei EL, Lim SK, *et al.* Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells as cellular delivery vehicles for prodrug gene therapy of glioblastoma. *Hum Gene Ther* 2011; 22(11): 1365-77.
- 53 Guo K, Ikehara S, Meng X. Mesenchymal stem cells for inducing tolerance in organ transplantation. *Front Cell Dev Biol* 2014; 2: 8.
- 54 Xu L, Liu Z, Wu Y, Yang X, Cao Y, Li X, *et al.* Cotransplantation of human umbilical cord mesenchymal and haplohematopoietic stem cells in patients with severe aplastic anemia. *Cytotechnology* 2014; Nov 19. [Epub ahead of print]
- 55 Xia X, Yin T, Yan J, Yan L, Jin C, Lu C, *et al.* Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis and follicle survival in human cryopreserved ovarian cortex transplantation. *Cell Transplant* 2014; doi: 10.3727/096368914X685267.
- 56 Karagiannidou A, Varela I, Giannikou K, Tzetis M, Spyropoulos A, Paterakis G, *et al.* Mesenchymal derivatives of genetically unstable human embryonic stem cells are maintained unstable but undergo senescence in culture as do bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Reprogram* 2014; 16(1): 1-8.