

研究论文

体外培养传代人脂肪、脐带、胎盘间充质干细胞的遗传特性比较研究

刘宇¹ 马明¹ 侯俊² 高雪华² 陈思翔¹ 刘月¹ 邓银¹郑东明¹ 田奕¹ 张蓉^{3*} 陈静娴^{2*}⁽¹⁾成都中创清科医学检验所有限公司, 成都 610094; ⁽²⁾成都清科生物科技有限公司, 成都 610094;⁽³⁾四川大学基础医学与法医学院生物化学与分子生物学教研室, 成都 610041)

摘要 该文利用无血清培养基对脐带间充质干细胞(umbilical cord derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs)、脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs)和胎盘间充质干细胞(placenta derived mesenchymal stem cells, PMSCs)进行了体外传代培养, 通过比较此三种不同来源间充质干细胞生物学特性及遗传特性在传代过程中的变化及差异, 为间充质干细胞临床应用安全性及细胞来源的选择提供实验和理论依据。通过细胞形态观察、细胞周期检测、表面标记物检测、染色体核型分析、相关基因表达及细胞因子的定量分析, 结果发现, UC-MSCs和AD-MSCs在体外培养时呈长梭形旋涡状贴壁生长, 而PMSCs则呈短梭形旋涡状或网状贴壁生长, 细胞核较大。通过长期传代培养及细胞周期分析发现, PMSCs增殖活性最强, UC-MSCs次之, AD-MSCs最弱。三种细胞均表达CD73、CD90和CD105, 且阳性率大于98%; 均低表达CD11b、CD19、CD34和CD45, 且阳性率低于1%; HLA-DR均为阴性。三种细胞染色体核型稳定, 没有缺失、易位和倒位等现象。7种基因表达均有差异, 但在7代内各基因表达量仅有微小变化, 细胞因子在传代过程中均比较稳定。以上结果提示, 利用无血清培养基体外传代培养至7代以内, PMSCs比AD-MSCs和UC-MSCs更安全。

关键词 间充质干细胞; 脐带; 脂肪; 胎盘; 体外培养

Comparative Study on Genetic Traits of Human Adipose, Umbilical Cord and Placenta Derived Mesenchymal Stem Cells during Subculture *In Vitro*Liu Yu¹, Ma Ming¹, Hou Jun², Gao Xuehua², Chen Sixiang¹, Liu Yue¹, Deng Yin¹,Zheng Dongming¹, Tian Yi¹, Zhang Rong^{3*}, Chen Jingxian^{2*}⁽¹⁾Chengdu Zhongchuang Qingke Medical Diagnosis Test Center, Chengdu 610094, China;⁽²⁾Chengdu Qingke Biotechnology Co, Ltd, Chengdu 610094, China; ⁽³⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine and Forensic, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract We isolated and cultured human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs), adipose derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs), placenta derived mesenchymal stem cells (PMSCs) *in vitro* using the serum free culture medium. By comparison of the changes and differences in the biological characteristics

收稿日期: 2015-09-14 接受日期: 2015-11-20

四川省科技支撑计划项目科学基金(批准号: 2012ZZ0039)资助的课题

*通讯作者。Tel: 028-66070937, E-mail: zr1223@126.com; Tel: 028-61556097, E-mail: zcqh1234@126.com

Received: September 14, 2015 Accepted: November 20, 2015

This work was supported by the Grant from Sichuan Science-technology Support Plan Projects Science Foundation (Grant No.2012ZZ0039)

*Corresponding authors. Tel: +86-28-66070937, E-mail: zr1223@126.com; Tel: +86-28-61556097, E-mail: zcqh1234@126.com

网络出版时间: 2015-12-16 16:09:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151216.1609.002.html>

and genetic characteristics among the three sources of mesenchymal stem cells (MSCs), we can provide experimental evidence and theoretical basis for clinical application of MSCs. By cell morphology observation, cell cycle detection, surface marker detection, chromosome karyotype analysis, gene expression and cytokine analysis, it was found that AD-MSCs and UC-MSCs were long spindle shaped adherent growth when cultured *in vitro*, while PMSCs was short spindle shaped or reticular cell adherent growth, and the nucleus was larger. Based on the long-term subculture and cell cycle analysis, we found that the ability of proliferation and differentiation of PMSCs were strongest, and UC-MSCs were stronger than AD-MSCs. The expressions of CD105, CD90 and CD73 were positive in all three kinds of cells, and the positive rate was 98%. The expressions of CD11b, CD19, CD34 and CD45 were lower than 1%, and the HLA-DR were all negative. The chromosomes in three kinds of cells were stable, and there were no signs of deletion, translocation and inversion. The expression of the 7 genes was different, but within the 7th passage, the expression of the gene was only slightly changed, and the cytokines in the passage were relatively stable. Our results demonstrated that within the 7th passage, PMSCs are safer than AD-MSCs and UC-MSCs while cultured *in vitro* with serum-free medium.

Keywords mesenchymal stem cells; umbilical cord; adipose; placenta; culture *in vitro*

成体间充质干细胞可以从多数组织中获得, 其分化谱系也涉及脂肪细胞、骨细胞、肌细胞、神经细胞、肝细胞等^[1-6], 其中, 研究较早、较深入的是人骨髓源间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)。BMSCs具有体外培养方法简单、增殖速度快等特性, 被认为是一种理想的种子细胞^[7]。但是, 成人的BMSCs含量很低, 而且随着年龄增大, 其数量逐渐减少, 增殖分化能力也随之衰退^[8], 且多次取材会对患者造成损伤, 这些都制约了BMSCs的应用。与BMSCs相比, 其他更多的成体间充质干细胞突显出了各自的优势, 本研究选择的脐带间充质干细胞(umbilical cord derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs), 由于其细胞形态、增殖能力、免疫表型等与BMSCs具有高度相似性, 而且有更强的增殖分化能力, 且支持造血和抑制免疫作用^[9-11]; 脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs)来源丰富, 取材容易, 有较低的免疫原性, 也是应用前景广泛的干细胞^[12-13]; 胎盘间充质干细胞(placenta derived mesenchymal stem cells, PMSCs)也是分化潜能大、增殖能力很强的成体间充质干细胞^[14]。本文通过比较三种间充质干细胞的生物学特性及遗传特性, 包括细胞形态、增殖能力、免疫表型、相关基因和细胞因子表达量等方面的差异, 研究三种间充质干细胞优势和劣势, 拟为临床应用间充质干细胞的安全性提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

脐带采自剖宫产手术健康足月新生儿, 新生儿性别为女; 脂肪组织来自2例腹部脂肪抽吸术的健康成年女性患者; 胎盘采自健康足月新生儿, 新生儿性别为男。上述三者均无传染病和内分泌疾病, 经家属签字同意捐献, 并得到成都中创清科医学检验所伦理委员会批准。纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、神经生长因子(beta-nerve growth factor, β -NGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、白血病抑制因子(leukaemia inhibitor factor, LIF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)6种细胞因子检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司; 酶标仪购自上海科华生物工程股份有限公司; CD19-FITC、CD34-FITC、CD11b-PE、CD35-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、HLA-DR-PE和流式细胞仪购自Beckman Coulter公司; 细胞恒温培养箱购自Thermo公司; 荧光定量PCR仪、Fast SYBR Green Master mix购自Applied Biosystem公司; 显微设备购自Olympus公司; 核型分析仪购自Leica公司; 秋水仙素、甲醇、冰乙酸均为分析纯。

1.2 三种间充质干细胞的分离培养

1.2.1 UC-MSCs分离培养 在生物安全柜中将脐带用生理盐水冲洗干净后, 剥离羊膜上皮, 去除脐动

脉和脐静脉。将脐带胶质剪碎加入30 mL II型胶原酶,置于恒温振荡仪内持续消化6 h, 100目筛网过滤收集细胞。室温下1 200 r/min离心10 min后,弃上清。用D-Hank's液轻柔冲洗细胞3次,无血清培养基重悬细胞,在37 °C、体积分数为5%的CO₂恒温培养箱内培养6~7 d后,全量换液,弃未贴壁细胞,根据黏附性差异使UC-MSCs与其他组织细胞分离,分离后细胞经过表面标志物鉴定,从而确定为UC-MSCs。将其消化后在细胞瓶内接种1×10⁶细胞,利用无血清培养基培养,以后每隔3~4 d换液1次。

1.2.2 AD-MSCs分离培养 取成人吸脂术后的脂肪组织,磷酸盐缓冲液(PBS)反复浸泡、冲洗3次,去除血液,加入等体积0.1% I型胶原酶,37 °C水浴震荡消化1 h,低糖DMEM终止消化,2 000 r/min离心5 min,弃上清。低糖DMEM重悬沉淀,200目滤网过滤,沉淀加入3 mL低糖DMEM,吹打均匀后移入培养瓶,37 °C、体积分数为5%的CO₂恒温培养箱内培养24 h后,首次换液,去除残余的红细胞及未贴壁细胞。根据黏附性差异使AD-MSCs与其他组织细胞分离,分离后的细胞经过表面标志物鉴定,从而确定为AD-MSCs。将其消化后在细胞瓶内接种1×10⁶细胞,利用无血清培养基培养,以后每隔3~4 d换液1次。

1.2.3 PMSCs分离培养 在无菌条件下剪取胎盘绒毛膜组织,冲洗,去除血迹,剪成碎片,加入30 mL II型胶原酶,置于恒温振荡仪内持续消化6 h,100目筛网过滤收集细胞。室温下1 200 r/min离心10 min后,弃上清。用D-Hank's液轻柔冲洗细胞3次,无血清培

养基重悬细胞,在37 °C、体积分数为5%的CO₂恒温培养箱内培养6~7 d后全量换液,弃未贴壁细胞。根据黏附性差异使PMSCs与其他组织细胞分离,分离后细胞经过表面标志物鉴定,从而确定为PMSCs。将其消化后在细胞瓶内接种1×10⁶细胞,利用无血清培养基培养,以后每隔3~4 d换液1次。

1.3 三种细胞形态观察和流式细胞术检测

1.3.1 细胞形态观察 三种间充质干细胞均在贴壁细胞生长到汇合度为80%左右时,对细胞形态进行观察并拍照。

1.3.2 流式细胞术检测 PBS冲洗待测细胞2次后,利用0.25%胰蛋白酶消化3 min,离心,弃上清液后,利用PBS将细胞浓度调整到1×10⁶/mL,分别加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗体CD19-FITC、CD34-FITC、CD11b-PE、CD35-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE或HLA-DR-PE,25 °C避光孵育30 min, PBS冲洗3次后,利用流式细胞仪检测。

1.4 染色体核型分析

分别在三种间充质干细胞处于对数生长期时,在瓶内滴加秋水仙素至终浓度为0.04 mg/L,继续在恒温培养箱中培养3.5 h,胰蛋白酶消化,收集所有细胞。PBS冲洗3次后,加入5 mL浓度为0.075%的KCl低渗液,37 °C水浴15 min,1 500 r/min离心8 min后,弃上清。在细胞中滴加2 mL固定液,37 °C水浴3 min,离心弃上清,重复1次,用8 mL卡诺氏固定液固定30 min。重悬细胞后,在每块玻片上滴加细胞悬液,自然风干后

表1 相对荧光定量引物列表

Table 1 List of relative fluorescence quantitative PCR primers

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence	产物长度 Product length
P16-F	5'-GCA GCA TGG AGC CTT CGG-3'	197 bp
P16-R	5'-CCG TAA CTA TTC GGT GCG T-3'	
P21-F	5'-TGT CCG TCA GAA CCC ATG-3'	219 bp
P21-R	5'-GTG GGA AGG TAG AGC TTG G-3'	
P53-F	5'-AGG GAT GTT TGG GAG ATG TAA G-3'	179 bp
P53-R	5'-TGT GAG GTA GGT GCA AAT GC-3'	
TERT-F	5'-CTA CGG CGA CAT GGA GAA CAA G-3'	150 bp
TERT-R	5'-CCA TAC TCA GGG ACA CCT CG-3'	
K-ras-F	5'-TTG ATT TGT CAG CAG GAC CA-3'	149 bp
K-ras-R	5'-GAG AGT TTC ACA GCA TGG ACT G-3'	
Nanog-F	5'-ATG CCT GGT GAA CCC GAC-3'	292 bp
Nanog-R	5'-AGG ACT GGA TGT TCT GGG T-3'	
CCNE-F	5'-AAG GTT TCA GGG TAT CAG TGG TG-3'	185 bp
CCNE-R	5'-TTT GCT CGG GCT TTG TCC-3'	
β-actin-F	5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3'	265 bp
β-actin-R	5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3'	

用吉姆萨染液染色10 min, 分别用电子显微镜观察分析。

1.5 基因表达分析

利用Primer Premier 5.0软件设计P16、P21、P53、TERT、K-ras、CCNE和Nanog 7个基因的相对荧光定量引物(表1)。分别将细胞培养至汇合度为80%左右, 胰蛋白酶消化收集细胞。PBS冲洗3次后, Trizol处理提取RNA, RT-PCR合成cDNA第一条链。以其为模板进行PCR扩增。扩增反应总体积为20 μ L体系, 其中包括Fast SYBR Green Master mix 10 μ L, 上、下游引物各1 μ L, cDNA模板2 μ L, 加入灭菌双蒸水至总体积为20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C延伸60 s, 进行40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸1 min。实验结束后分别对三种间充质干细胞实验结果进行分析。

1.6 细胞因子检测

胰蛋白酶消化后, 5 000 r/min离心5 min, 收集细胞培养上清液。按照ELISA检测试剂盒说明书指示, 对三种间充质干细胞进行细胞因子的定量检测。

2 结果

2.1 三种细胞传代后形态学、表面标记物和细胞周期的比较

三种细胞在接种原代细胞48 h后, 大部分细胞

为贴壁生长。UC-MSCs和AD-MSCs均为长梭形, 成漩涡状或放射状排列(图1A和图1B)。而PMSCs为梭形或短梭形, 细胞成漩涡状或网状排列(图1C和图1D)。在传代培养过程中UC-MSCs和AD-MSCs至第7代时, 均出现生长速度变慢的现象。AD-MSCs在第10代后, 生长速度更慢, 导致细胞数量不足。而PMSCs在传代培养至第10代后生长速度略有减慢。

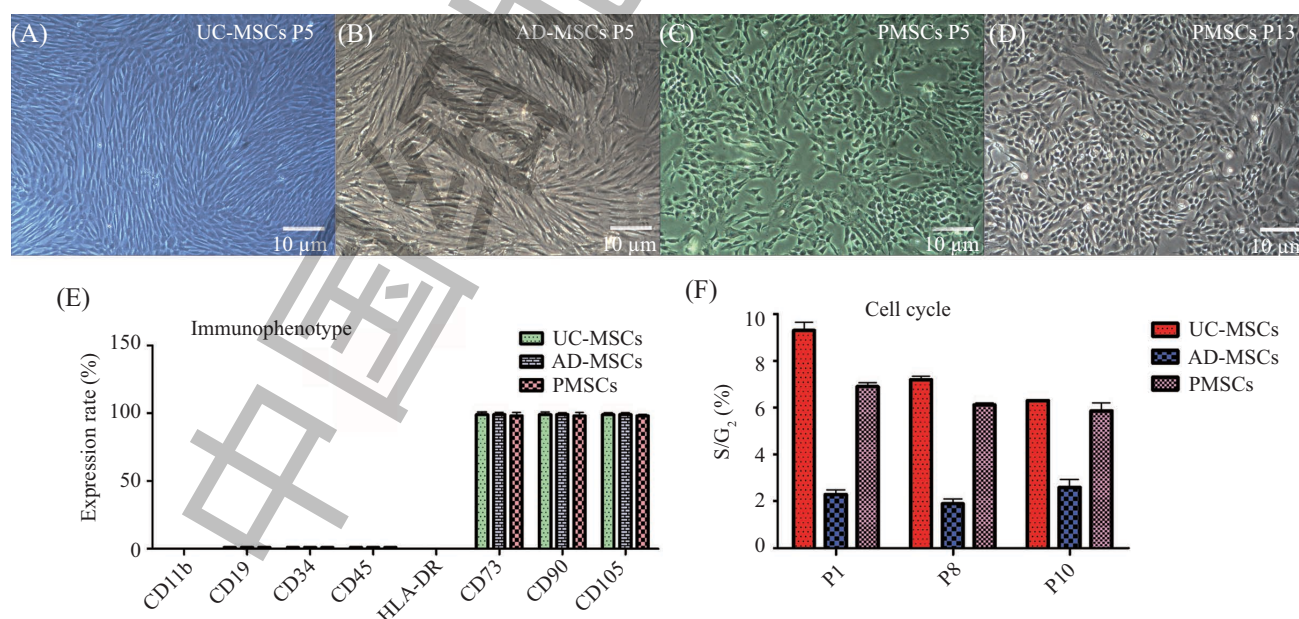
应用流式细胞术检测结果发现, 三种细胞表面标记物CD11b、CD19、CD34和CD45含量在1%以下, 均为低表达, HLA-DR为阴性; 而UC-MSCs、AD-MSCs两种细胞CD73、CD90和CD105表达量为99%以上, 为高表达; PMSCs表面标记物CD73、CD90和CD105表达量则为98%以上(图1E)。流式细胞术分析细胞周期显示, 在传代过程中UC-MSCs和PMSCs处于增殖期的细胞比AD-MSCs多(图1F)。

2.2 三种细胞核型比较

对UC-MSCs第1、3、5、7、10、13、17、20代, AD-MSCs第1、3、5、7、10代和PMSCs第1、3、5、7、10、13、17、20代细胞的染色体核型分析, 结果发现, 间充质干细胞在传代过程中细胞核型均未见异常, 没有缺失、易位和倒位等变化。图2显示了三种间充质干细胞第10代染色体核型分析结果。

2.3 三种细胞相关基因表达量比较

对UC-MSCs第1、3、5、7、10、13、17、20代,

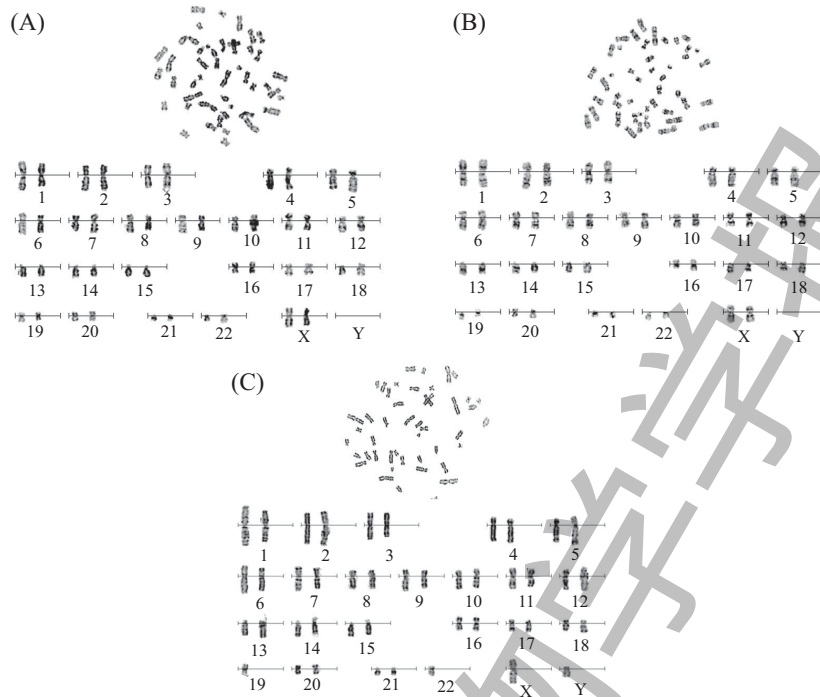


数据以mean $\pm$ S.D.形式表示。

Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments independent.

图1 三种细胞生长状态、细胞表面标记物及细胞周期结果的比较

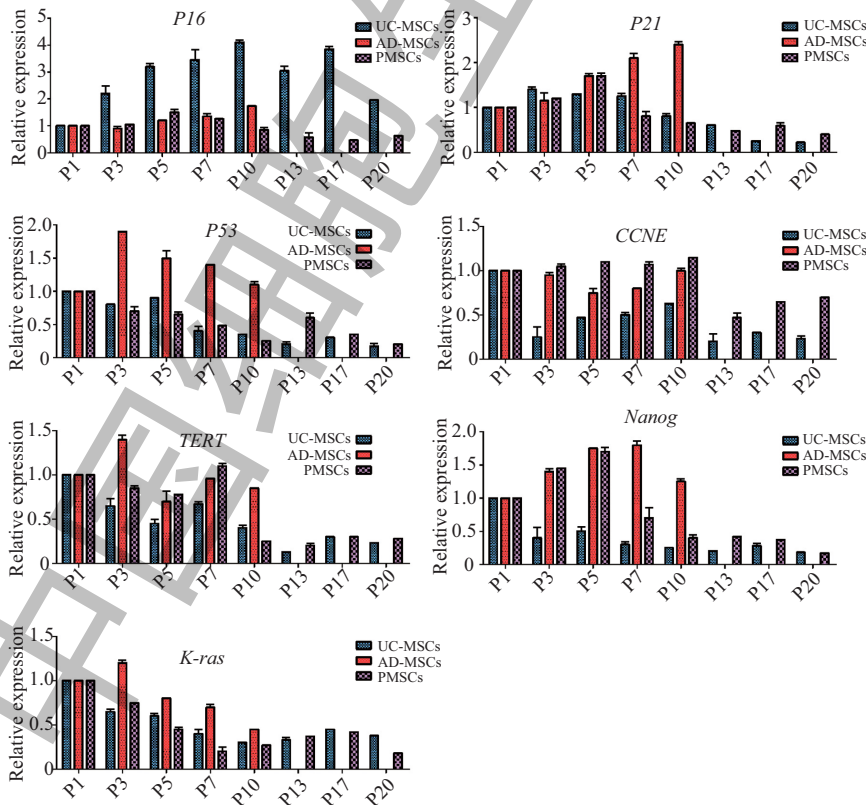
Fig.1 Comparison of cell morphology, cell cycle and cell surface markers among 3 kinds of cells



A: AC-MSCs核型是46 XX; B: AD-MSCs核型是46 XX; C: PMSCs核型是46 XY。
A: the UC-MSCs karyotype was “46 XX”; B: the AD-MSCs karyotype was “46 XX”; C: the PMSCs karyotype was “46 XY”.

图2 三种第10代间充质干细胞的核型分析

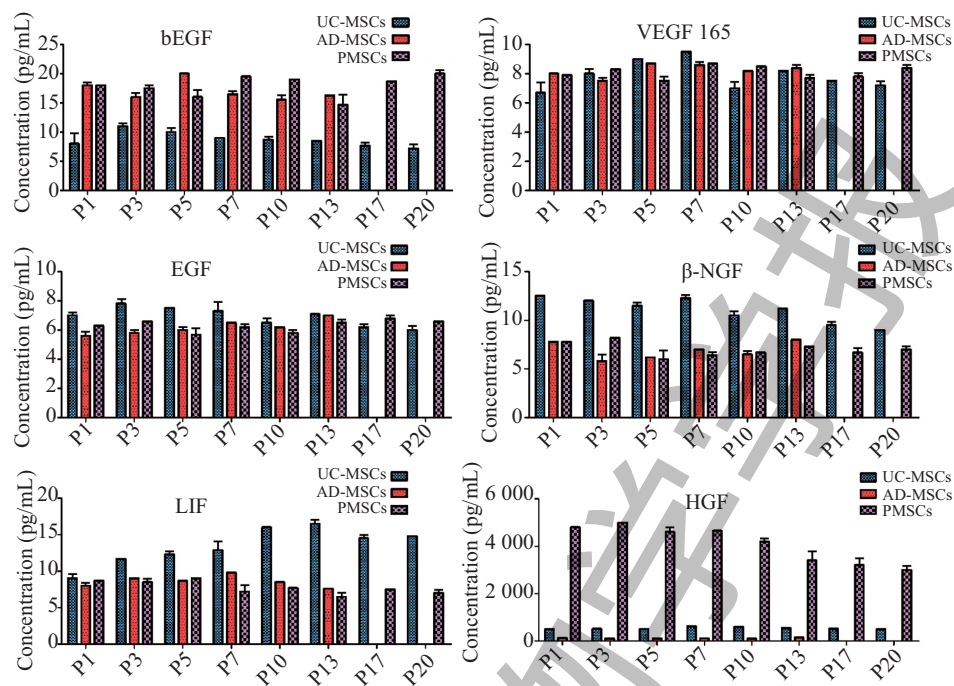
Fig.2 Analysis of chromosome nuclear type in 3 kinds of cells at tenth generation



数据以mean±S.D.形式表示。
Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent.

图3 三种细胞基因表达量的比较

Fig.3 Comparison of the gene expression among 3 kinds of cells



数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示。

Each point represents the $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ of three experiments independent.

图4 三种细胞的细胞因子含量的比较

Fig.4 Comparison of the cytokine level among 3 kinds of cells

AD-MSCs第1、3、5、7、10代和PMSCs第1、3、5、7、10、13、17、20代细胞进行了*P16*、*P21*、*P53*、*CCNE*、*Nanog*、*TERT*和*K-ras*等七个基因表达量进行了表达量检测, 设定原代细胞表达量为单位1与各代细胞进行比较, *P16*和*P21*基因在三种细胞传代至7代内表达均有不同程度的增加, 而*P53*、*CCNE*、*Nanog*和*TERT* 4个基因表达量都相对较稳定, *K-ras*基因在传代过程中表达量有所减少(图3)。

2.4 三种细胞细胞因子含量比较

对UC-MSCs第1、3、5、7、10、13、17、20代, AD-MSCs第1、3、5、7、10代和PMSCs第1、3、5、7、10、13、17、20代进行了bFGF、NGF、EGF、LIF、VEGF165和HGF细胞因子进行了含量检测, 以原代细胞含量为标准, 三种细胞在传代过程中细胞因子含量基本保持稳定(图4)。

3 讨论

本研究通过贴壁法成功从脐带、脂肪、胎盘组织中分别分离培养出了间充质干细胞。三种间充质干细胞(UC-MSCs、AD-MSCs、PMSCs)在体外传代培养过程中均贴壁生长, 成漩涡状或网状排列, 其中UC-MSCs和AD-MSCs细胞形态均为长梭形, 核染

色质都较细, 但AD-MSCs细胞体积比UC-MSCs大。PMSCs与上述两种细胞有一些差异, 为梭形或短梭形生长, 细胞核较UC-MSCs、AD-MSCs略大且核仁明显。但三种细胞在体外传代培养过程中细胞形态均无明显变化。

本研究选择了CD73、CD90和CD105这三种MSC应该表达的免疫表型以及一些已知细胞的特异性表型来辅助判断培养物中细胞是否均一。流式细胞术结果显示, 三种细胞CD73、CD90和CD105阳性率均高于98%, CD11b(单核细胞及巨噬细胞标志物)、CD19(B细胞标志物)、CD34(造血祖细胞及内皮细胞标志物)、CD45(白细胞标志物)阳性率低于1%, HLA-DR(MHC-II类分子)阴性。此结果符合间充质干细胞和组织委员会确立的人类MSC判定标准^[15], 说明本次实验中应用的三种细胞为高度均一的。流式细胞术分析细胞周期结果显示, PMSCs和UC-MSCs处在增殖期的细胞较AD-MSCs多, 说明AD-MSCs增殖活性相对偏低。

染色体核型分析结果显示, 形态、结构、数目均未见异常, 说明UC-MSCs在体外传代至20代以内、AD-MSCs10代以内、PMSCs20代以内染色体核型均稳定。

UC-MSCs、AD-MSCs *P16*基因表达量较原代细胞均有上调趋势, PMSCs在第7代前也呈上调趋势, 三种细胞*P21*基因表达在第7代或第10代前较原代都有上调趋势。有研究发现, *P16*基因随年龄增长其表达逐渐上调^[16], 不少国外学者在体外培养的高代次AD-MSCs也检测到*P16*基因表达上调, 与本研究结果相似。由于*P16*和*P21*基因为抑癌基因, 直接参与细胞周期调控, 对细胞增殖与分化起负调控作用。这两种基因表达量在AD-MSCs传代过程中保持上调趋势, 推测这可能是细胞传代后增殖活性受到抑制而导致AD-MSCs传代至第10代后细胞生长速度很慢, 细胞数量不足的原因。也有可能AD-MSCs细胞功能衰退较UC-MSCs和PMSCs要快一些。而在PMSCs和AD-MSCs体外传代培养10代以内, *P53*、*CCNE*、*Nanog*和*TERT*四个基因表达量都相对稳定。*K-ras*基因在三种细胞传代过程中表达量均有不同程度的下降, 其原因有待进一步研究。

6种细胞因子定量结果显示, UC-MSCs的 β -NGF、LIF表达量较AD-MSCs、PMSCs高。PMSCs的HGF表达量比其他两种细胞高得多。三种间充质干细胞各自在体外传代培养过程中细胞因子的表达量都很稳定, 但是三种细胞之间相比较其细胞因子的表达量有一定差异, 说明来源不同的间充质干细胞对不同细胞因子的分泌能力也有所不同, 这体现了不同组织细胞具有不同的功能。

总而言之, 三种间充质干细胞在体外传代培养过程中生物学特性有一定的差异, 但差异不大, 并且基本稳定。UC-MSCs和PMSCs的细胞增殖活性比AD-MSCs高一些。遗传特性方面, 三种细胞的染色体核型均保持稳定; 相关基因表达量显示在各自传代过程中以及三种细胞相比较都存在一定差异; 不同的间充质干细胞对不同细胞因子的分泌能力有所不同。三种间充质干细胞在体外传代至7代以内遗传特性基本稳定, 就其临床应用的安全性而言, PMSCs比AD-MSCs和UC-MSCs更安全。

参考文献 (References)

- Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006; 13(6): 419-25.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999; 14(5): 700-9.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61(4): 364-70.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417): 1168-70.
- Kadiyals S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant* 1997; 6(2): 125-34.
- Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, *et al.* Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 2009; 18(4): 405-22.
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121(2): 368-74.
- Fukuchi Y, Nakajima H, Suqiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22(5): 649-58.
- Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91(8): 1017-26.
- Hsieh JY, Fu YS, Chang SJ, Tsuang YH, Wang HW. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev* 2010; 19(12): 1895-910.
- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26(3): 591-9.
- 赵春华. 干细胞原理、技术、与临床. 北京: 化学工业出版社 (Zhao Chunhua. Stem cell principle, technology and clinical. Beijing: Chemical Industry Press) 2006: 17-9.
- Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Oqawai R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(1): 50-8.
- Prather WR, Toren A, Meiron M. Placental-derived and expanded mesenchymal stromal cells (PLX-I) to enhance the engraftment of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8(8): 1241-50.
- Dominici M, Le Blanc K, 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.
- Lee J, Lee CG, Lee KW, Lee CW. Cross-talk between BubR1 expression and the commitment to differentiate in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 2009; 41(12): 873-9.