

技术与方法

人胎盘底蜕膜间充质干细胞库的初步构建

肖桂清¹ 段训威² 唐燕程¹ 郑梦盈¹ 苏爱盟¹ 耿晓波¹ 刁勇^{3*}(福建省银丰干细胞工程有限公司, 福州 350100; ²泉州师范学院, 泉州 362000; ³华侨大学医学院, 泉州 362021)

摘要 该文探讨了建立生物学特性稳定的人胎盘底蜕膜间充质干细胞(DB-MSCs)库的可行性, 旨在为组织工程种子细胞提供更多来源。该研究采用组织块贴壁法从10例足月人胎盘底蜕膜组织中获取间充质干细胞, 并采用STR检测细胞是否均来源于母体组织。对分离得到的DB-MSCs采用-196 °C低温冻存, 并在一定时间复苏培养, 用倒置显微镜观察细胞形态, CCK8法检测细胞增殖能力, 流式细胞仪分析细胞周期和细胞表面标志物, 特定培养基诱导其成脂、成骨、成软骨分化。结果显示, 从底蜕膜组织中分离培养扩增获得数目稳定的DB-MSCs。STR分析证明, 所得细胞均来源于母体组织, 经冻存并复苏后的DB-MSCs形态和表面标志物保持不变, 并可稳定扩增8代以上, 倍增时间为(2.04±0.25)天, 大多数的细胞处于静止期(G₀/G₁), 复苏后的细胞保持了较强的成脂、成骨和成软骨分化能力, 在细胞中未发现细菌、真菌、支原体和内毒素等的污染。该研究初步建立了DB-MSCs库, 进一步明确了库存细胞的制备流程及其质量评价体系, 可为再生医学修复重建组织工程提供较好的种子细胞。

关键词 底蜕膜; 间充质干细胞; 生物学特性; 多向分化; 细胞库

Incipient Establishment of Human Placenta Decidua Basalis-Derived Mesenchymal Stem Cells Bank

XIAO Guiqing¹, DUAN Xunwei², TANG Yancheng¹, ZHENG Mengying¹, SU Aimeng¹,
GENG Xiaobo¹, DIAO Yong^{3*}(Fujian Yinfeng Stem Cell Engineering Co., Ltd, Fuzhou 350100, China; ²Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China;
³School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract The aim of this study was to explore the possibility of establishing the human placenta DB-MSCs (decidua basalis-derived mesenchymal stem cells) bank as to provide an alternative source for the seed cells of tissue engineering. DB-MSCs were harvested from the decidua basalis of 10 cases of full-term human placental by tissue explants adherent method, and STR (short tandem repeat) test was used to identify the cells derived from the maternal placenta surface. The proliferative ability of the cells was detected by CCK8 assay. Flow cytometry

收稿日期: 2020-12-23 接受日期: 2021-04-22

福建省自然科学基金(批准号: 2019J05094)、福建省科技计划高校产学研合作项目(批准号: 2018Y4009)和福建省中青年教师教育科研项目(批准号: JAT200544)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13328980958, E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

Received: December 23, 2020 Accepted: April 22, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (Grant No.2019J05094), the Project on the Integration of Industry, Education and Research of Fujian Province (Grant No.2018Y4009) and the Educational Research Project for Young and Middle-Aged Teachers of Fujian Province (Grant No.JAT200544)

*Corresponding author. Tel: +86-13328980958, E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

was applied to analyze cell cycle and stem cell markers. The results of STR analysis showed that the cells were derived from the maternal placenta. The phenotype and expansion possibility of DB-MSCs after cryopreservation were remained. It could expand for 8 generations. The doubling time was (2.04 ± 0.25) days. Cell cycle analysis showed majority cells stayed in the resting stage (G_0/G_1). The DB-MSCs kept stronger ability of adipogenesis, osteoblasts and chondrogenic differentiation. The bank of DB-MSCs has been incipiently established. This article further defines the inventory cell preparation process and its quality evaluation system which can provide eligible seed cells for tissue engineering.

Keywords decidua basalis; mesenchymal stem cells; biological characteristics; multipotent differentiation; cell bank

间充质干细胞是一类早期发育的中胚层多能干细胞,能够自我更新,可诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞、肌肉细胞等多种中胚层细胞^[1-2],是再生医学领域最有潜力的种子细胞,进而成为研究器官形成、药物筛选和细胞临床应用中很好的科学工具。越来越多的实验研究证实,间充质干细胞在治疗血液系统疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病、神经系统疾病等方面具有临床价值,全球相关的临床试验正如火如荼的进行^[3-4]。构建干细胞库是实现细胞临床应用的重要环节,全球干细胞临床应用正面临着种子细胞来源问题的严峻挑战。骨髓是间充质干细胞的主要来源,骨髓源间充质干细胞研究较早且较为深入,但其数量和增殖分化能力会受年龄限制,且其有创获取的方式易导致供体感染和出血等问题^[5]。因此,寻找一种新的间充质干细胞来源意义重大。

来源于底蜕膜的人胎盘底蜕膜间充质干细胞(decidua basalis-derived mesenchymal stem cells, DB-MSCs)具有来源充足、获取无创性、免疫原性低、增殖能力强、不受低血清及低氧影响等骨髓间充质干细胞无法比拟的优势^[6-7],在妊娠期胚胎植入、免疫耐受建立及正常妊娠维持中发挥重要作用^[8],其移植治疗移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)、出血性膀胱炎,效果明显,是干细胞临床应用理想的种子细胞^[9]。因此,构建DB-MSCs库具有重大战略意义^[10]。我们以国家《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》为依据,初步建立了DB-MSCs制备流程及质量评价系统,为临床应用DB-MSCs提供了安全保障。

1 材料与方法

1.1 标本来源

胎盘和母血来源于健康足月剖宫产产妇,共

10例,均与产妇签署知情同意书。母血检测HBV、HCV、CMV、HIV、EBV、HTLV、梅毒螺旋体等相关传染性指标均呈阴性。所有实验均通过了福建省银丰干细胞工程有限公司伦理部门批准。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂包括:人间充质干细胞培养基(美国Lonza公司),Pall Ultrosor G(美国Pall公司),DMSO(德国Sigma公司),PBS(美国Hyclone公司),胰蛋白酶(美国Hyclone公司),成脂、成骨和成软骨培养基(美国Hyclone公司),抗体CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、HLA-DR以及同型对照(美国Beckman Coulter公司),CCK8试剂盒(日本同仁化学研究所)。仪器包括:倒置相差显微镜(日本Olympus公司)、流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)、CO₂培养箱(美国Thermo公司)、生物安全柜(苏州苏信净化设备有限公司)、生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 DB-MSCs的制备

供体筛选应严格遵循医学标准,并建立相应的资料档案,包括基本信息:姓名、年龄、血型、既往病史、家族史等。取供体符合医学标准剖腹产的胎盘,进行ABO/Rh血型检测和微生物学检测。将胎盘组织用生理盐水洗净后,撕取底蜕膜组织,用生理盐水漂洗后,尽量剪碎,300 ×g离心6 min后,将收集的底蜕膜组织块铺瓶,静置30 min后,添加含2% Pall Ultrosor G的人间充质干细胞培养基,于37 °C、5% CO₂培养箱中培养,记为P0代。视细胞生长情况,每3天换液1次,待细胞生长至85%融合时,胰酶消化细胞,按1:3传代接种培养,传至P3代做细胞鉴定。取细胞上清液进行培养过程的污染检测,包括细菌、真菌、支原体和内毒素检测。

1.4 细胞STR鉴定

取 6×10^5 个P3代胎盘底蜕膜间充质干细胞及

其母血, 分别提取细胞DNA, 采用STR复合扩增试剂盒进行扩增, 将扩增产物进行STR位点和性别基因Amelogenin检测, 鉴定细胞是否来源于母体组织。

1.5 细胞的冻存、复苏和扩增

将P2或P3代胎盘底蜕膜间充质干细胞浓度调整至 2×10^6 个/mL, 保存于含10% DMSO的无血清冻存液中, 程序降温至 -80°C 后, 置于 -196°C 液氮中长期保存。细胞复苏于 37°C 恒温水浴锅中快速进行, 按 3×10^4 个/ cm^2 接种于T175细胞培养瓶中, 用含2% Pall Ultrosor G的人间充质干细胞培养基培养, 待复苏后的BD-MSCs生长至85%融合时, 1:3传代, 根据吸光度(D_{450})值, 绘制生长曲线, 计算细胞群体倍增时间。重复实验3次。

1.6 复苏细胞表面标志物检测

取经冻存后复苏培养P3代胎盘底蜕膜间充质干细胞, 常规消化, 用PBS洗涤后, 调整细胞浓度至 4×10^6 个/mL, 每管加入100 μL 细胞悬液后, 分别加入10 μL CD90、CD73、CD105、CD34、CD45和HLA-DR抗体, 常温下避光孵育15 min。PBS洗涤1次, $300 \times g$ 离心6 min, 弃上清, 加500 μL PBS重悬细胞, 上流式细胞仪检测, 并分析数据。

1.7 细胞周期分析

取经冻存后复苏培养P3代胎盘底蜕膜间充质干

细胞, 常规消化, 取 1×10^6 个细胞, PBS洗涤后, 离心管中加500 μL PBS、5 mL 70%预冷的乙醇, 混匀, 4°C 固定过夜。 $300 \times g$ 离心6 min, 去除乙醇, PBS洗涤2次, 加入1 mL PBS重悬细胞, 再加入5 μL RNase A (10 g/L)混匀, 37°C 孵育30 min, 加入50 μL PI (0.1 g/L)轻轻吹打混匀, 室温避光孵育30 min, 上流式细胞仪检测并分析细胞周期。

1.8 细胞分化能力检测

取经冻存后复苏培养P3代胎盘底蜕膜间充质干细胞, 常规消化, 按 2×10^4 个/孔密度均匀接种至24孔板中。待细胞生长至70%~80%融合时, 分别更换成脂、成骨和成软骨培养基, 每3天换液1次。21天后用油红O染色检测成脂情况, 茜素红染色检测成骨情况, 艾茜蓝染色检测成软骨情况。

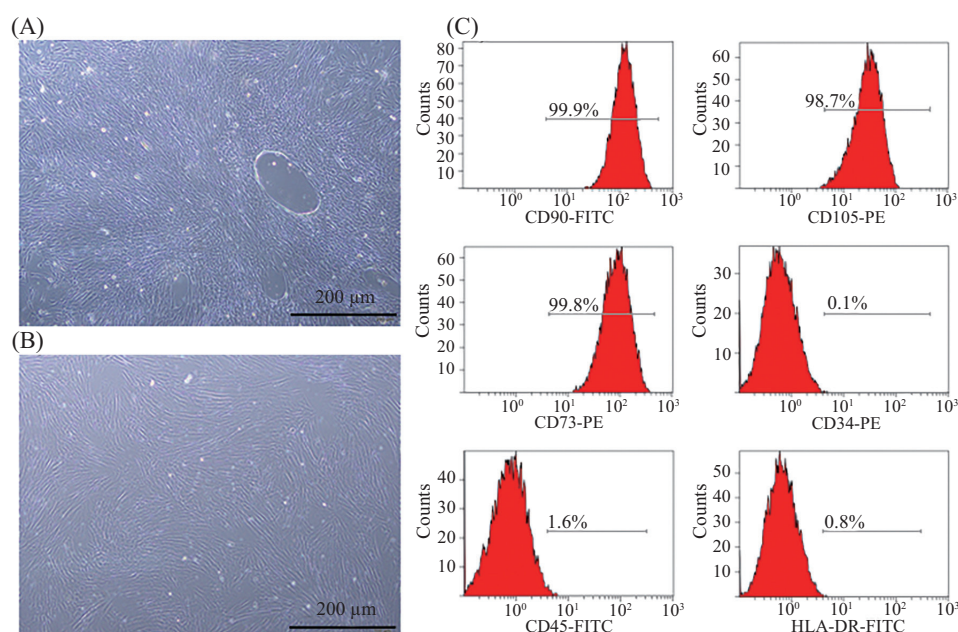
1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 17.0软件进行统计处理。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, 均具有统计学意义。

2 结果

2.1 DB-MSCs分离培养、鉴定

从胎盘底蜕膜获得的细胞为贴壁生长, 呈长梭形, 典型的成纤维样细胞形态, 并呈现轻微的旋涡状(图1A和图1B)。流式细胞术检测显示, 细胞稳定表



A: 原代DB-MSCs细胞形态; B: 第3代DB-MSCs细胞形态; C: DB-MSCs的细胞表型。

A: morphology of DB-MSCs in P0; B: morphology of DB-MSCs in P3; C: phenotype of DB-MSCs.

图1 人胎盘底蜕膜间充质干细胞的形态和细胞表型

Fig.1 Phenotype and morphology of DB-MSCs

达间充质干细胞特异性表面标志物CD73、CD90和CD105,但不表达造血细胞标志物CD34、CD45和HLA-DR(图1C)。STR鉴定结果(表1)显示,我们分离得到的间充质干细胞与相应的母血检测的等位基因全相合,且无异基因混合细胞(图2)。锥虫蓝染色结果显示传代细胞存活率 $\geq 98\%$,经冻存复苏后 $\geq 83\%$ 。

2.2 DB-MSCs的细胞周期

流式细胞仪检测DB-MSCs DNA含量,Modfit软件分析细胞周期,发现其 G_0/G_1 期占72.74%、 G_2/M 期占13.73%,S期占8.13%(图3),表明大部分细胞处于静止期,仅少数细胞处于活跃的增殖期。

2.3 DB-MSCs的生长曲线

细胞生长曲线呈“S”形,传代2天后进入对数生长期,7天后达平台期。经过计算得到DB-MSCs的平均倍增时间为 (2.04 ± 0.25) 天($n=3$,图4)。

2.4 DB-MSCs的分化潜能

成脂诱导约7天,倒置显微镜观察,可见细胞质内出现微小脂滴,且随着时间的推移,脂滴数目增

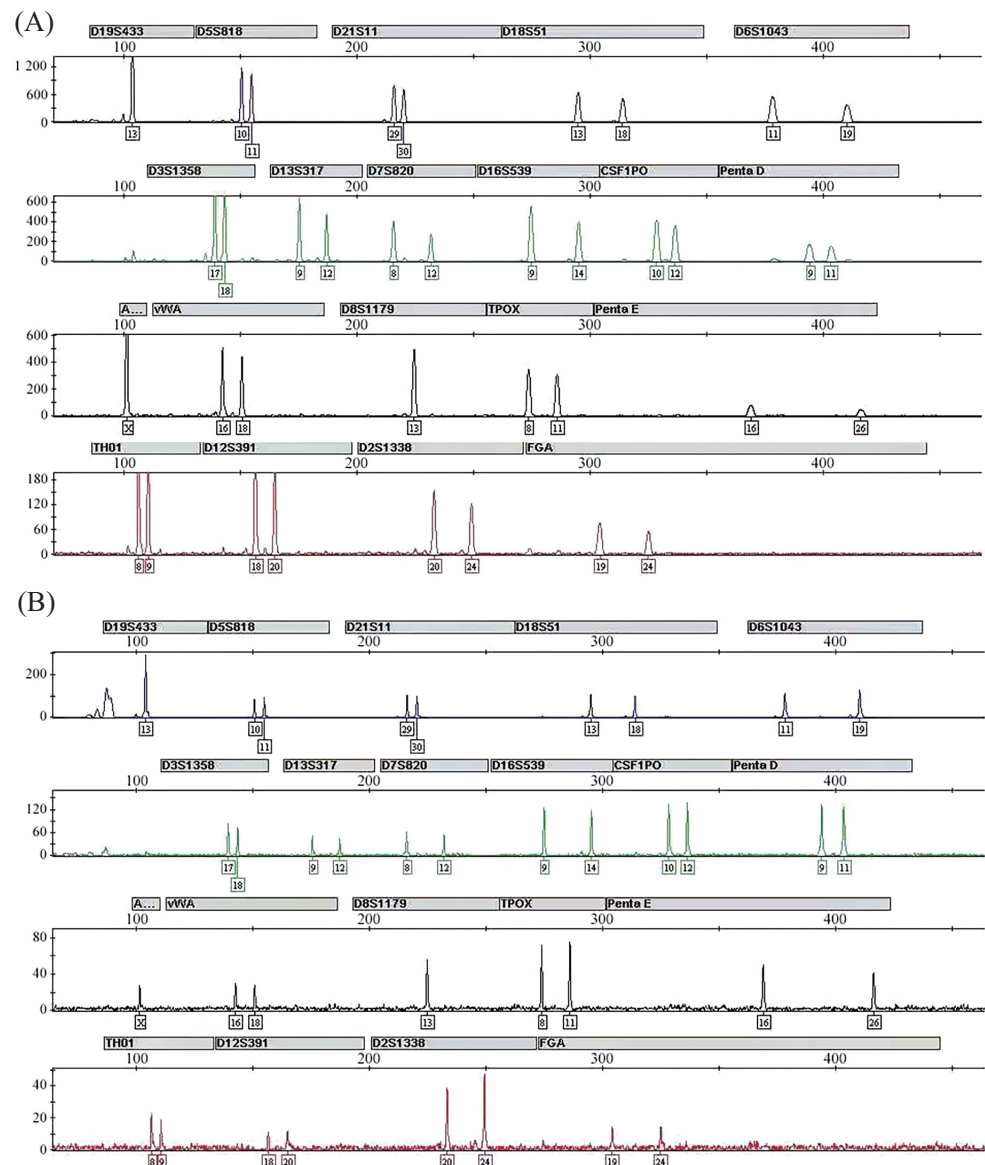
多,进而增大融合,细胞由长梭形逐渐变为多边形,16天后,融合脂滴充盈整个细胞,油红O染色处理细胞,显示大量红色脂滴(图5A)。成骨诱导后培养7天,可见胞质内颗粒增多;10天后,细胞基质矿化物出现;15天后,细胞逐渐融合,出现成骨细胞特有的多层小结结构;21天后,结节明显钙化,茜素红染色处理,呈现红色结节(图5B)。成软骨诱导2~3天,可见细胞团脱壁漂浮;诱导过程中,直径有所增大,表面光滑呈胶质样;21天后,DB-MSCs分化为软骨细胞,经艾茜蓝染色呈蓝色(图5C)。

2.5 DB-MSCs库的初步构建

取P2或P3代各项指标均合格的人胎盘底蜕膜间充质干细胞作为种子细胞(表2),保存于预冷的含10% DMSO的无血清培养液中,调整细胞密度至 2×10^6 个/mL,分装于标记冻存日期且贴有相应条形码的细胞冻存管中,程序降温至 -80°C 后,转移至 -196°C 液氮中长期保存。按ABO/Rh血型进行分类保存,建立可供检索的细胞信息档案,完成人胎盘底蜕膜间充质干细胞种子库的初步构建。

表1 6号样本的STR位点及Amelogenin位点检测结果
Table 1 Genotyping results of STR and Amelogenin loci of sample-6

基因座 Loci	等位基因 Allele	
	母血 Maternal blood	胎盘底蜕膜间充质干细胞 DB-MSCs
D19S433	13	13
D5S818	10, 11	10, 11
D21S11	29, 30	29, 30
D18S51	13, 18	13, 18
D6S1043	11, 19	11, 19
D3S1358	17, 18	17, 18
D13S317	9, 12	9, 12
D7S820	8, 12	8, 12
D16S539	9, 14	9, 14
CSF1P0	10, 12	10, 12
PentaD	9, 11	9, 11
Amelogenin	X	X
vWA	16, 18	16, 18
D8S1179	13	13
TP0X	8, 11	8, 11
PentaE	16, 26	16, 26
TH01	8, 9	8, 9
D12S391	18, 20	18, 20
D2S1338	20, 24	20, 24
FGA	19, 24	19, 24



A: 6号样本对应母血的STR图谱; B: 6号样本DB-MSCs的STR图谱。方框里的英文是STR基因座, 对应的峰下面阿拉伯数字表示该基因座的等位基因。
A: STR map of maternal blood of sample-6. B: STR map of DB-MSCs of sample-6. The English name in the box is the name of STR locus, and the Arabic number below the corresponding peak represents the allele of the locus.

图2 人胎盘底蜕膜间充质干细胞的STR分析

Fig.2 STR analysis of human placenta decidua basalis-derived mesenchymal stem cells

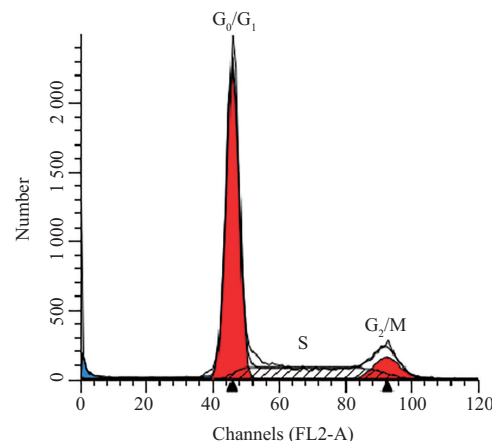


图3 人胎盘底蜕膜间充质干细胞的细胞周期

Fig.3 Cell cycle of human placenta decidua basalis-derived mesenchymal stem cells

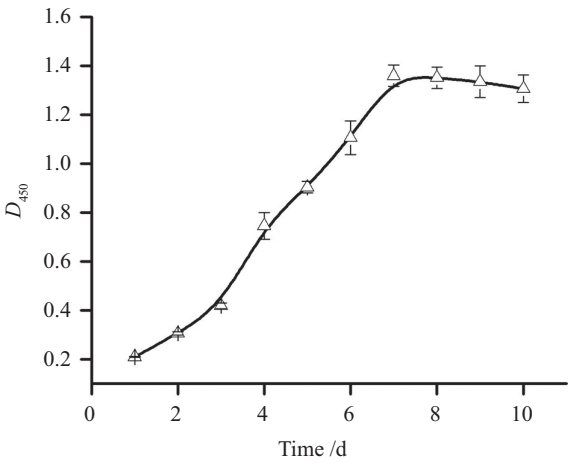
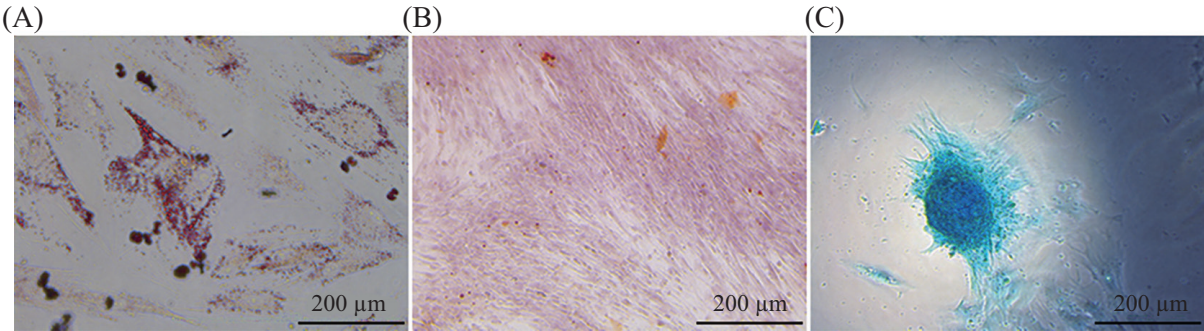


图4 人胎盘底蜕膜间充质干细胞的生长曲线

Fig.4 Growth curve of human placenta decidua basalis-derived mesenchymal stem cells



A: 成脂诱导; B: 成骨诱导; C: 成软骨诱导。

A: adipogenic differentiation; B: osteogenic differentiation; C: chondrogenic differentiation.

图5 人胎盘底蜕膜间充质干细胞的诱导分化

Fig.5 Induced differentiation of human placenta decidua basalis-derived mesenchymal stem cells

表2 人胎盘底蜕膜间充质干细胞质量评价标准

Table 2 Quality evaluation standard of human placenta decidua basalis-derived mesenchymal stem cells	
检测项目	标准要求
Inspection item	Standard request
Cellular morphology	Adherent growth, typical fibroblast morphology
Cellular viability	Survival rate of passage cells≥95%; Survival rate of frozen/thawed cells≥80%
Cell growth curve	“S” curve of growth
Surface markers	CD73 ⁺ ≥95%, CD90 ⁺ ≥95%, CD105 ⁺ ≥95%; CD34 ⁺ ≤2%, CD45 ⁺ ≤2%, HLA-DR ⁺ ≤2%
STR identification	100% (compared with maternal blood)
Differentiation potential	Differentiate into adipogenesis, osteoblasts and chondrogenic
Bacteria	Negative
Fungi	Negative
Mycoplasma	Negative
HBV, HCV, CMV, HIV, EBV, HTLV, TP	Negative
Endotoxin	≤0.5 EU/mL

3 讨论

3.1 建立干细胞库的意义

为抢占干细胞技术的制高点, 世界各国制订战略规划, 发布专项政策, 大幅度增加资金投入建设干细胞库。2004年, 世界首个胚胎干细胞库在英国建立, 该库的目标是为科研工作贮存和提供干细胞系^[1]。我国自2001年开始规划建设储存造血细胞样本资源的脐带血造血干细胞库。于2005年, 开始建立人类骨髓和脐带间质干细胞库^[12]。干细胞库的建立为干细胞技术产业化提供了良好的平台, 为临床应用与新药研发提供了来源合法、高质量的干细胞“种子”。目前, 干细胞已广泛应用于血液系统疾病、分泌系统疾病、神经系统疾病、心血管系统疾病、免疫系统疾病等多领域疾病的治疗研究中, 并取得了令人瞩目的成果。

3.2 BD-MSCs的分离培养及鉴定

获得稳定扩增、高纯度BD-MSCs是建立BD-MSCs库的基础。本研究从人胎盘底蜕膜组织中分离得到的细胞, 呈成纤维样细胞形态, 贴壁生长; 细胞高表达间充质干细胞标志CD73、CD44和CD105, 不表达造血干细胞和血细胞标志CD34、CD45和HLA-DR; 三系分化实验证实其具有良好的成骨、成软骨、成脂能力; 生长曲线测定发现, BD-MSCs增殖能力强, 倍增时间快于其他文献报道的骨髓、脂肪、牙髓以及长骨来源的间充质干细胞^[13-15], 且细胞周期与其他来源的间充质干细胞类似^[16-17]; 分离所得DB-MSCs完全符合ISCT定义的间充质干细胞的最低标准^[18]。细胞STR检测显示, 其与相应的母血检测的等位基因全相合, 进一步证实, 本研究获得的细胞是来自母体的人胎盘底蜕膜间充质干细胞。

3.3 复苏后DB-MSCs的扩增培养及鉴定

HOOGDUIJN等^[19]研究发现, DB-MSCs能够耐受低温冷冻保存。本研究冻存复苏后的DB-MSCs可继续传代培养8代以上, 细胞的倍增时间为(2.04±0.25)天, 表明DB-MSCs经冻存复苏后仍保持良好的扩增能力; 三系分化实验结果显示, 复苏后的DB-MSCs仍具有较强的成脂、成骨和成软骨的分化能力; 流式检测结果显示, 冻存复苏的DB-MSCs与未经冻存的DB-MSCs细胞表面标志物表达相同, 表明冻存复苏后的DB-MSCs具有稳定扩增的能力, 且保持了较高的纯度, 可为细胞库提供充足稳定的细胞来源。

综上所述, 从胎盘底蜕膜中可分离培养得到数量丰富的人胎盘底蜕膜间充质干细胞, 细胞经传代、冻存、复苏后可保持细胞高活性状态, 增殖能力旺盛, 细胞形态均一, 具有与骨髓间充质干细胞相似的生物学特性, 可作为一种新的人间充质干细胞种群用于建细胞库。本研究从DB-MSCs库的细胞来源、扩增、保存、数量、纯度和定向分化等方面证实了建立DB-MSCs库的可行性, 并初步建立了DB-MSCs库。以收集丰富的、行将丢弃而无法等效再现的胎盘底蜕膜样本为基础, 构建干细胞库, 不仅是对我国生物资源的保护, 而且可以为科研、临床提供充足的干细胞样本, 意义重大。

参考文献 (References)

- [1] 彭运, 陈凤, 黄华鑫. 比较两种不同来源间充质干细胞的生物学特性及多向分化潜能[J]. 中国细胞生物学学报(PENG Y, CHEN F, HUANG H X. Comparison of biological characteristics and multiple differentiation potential of mesenchymal stem cells from different sources [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2020, 42(4): 24-30.
- [2] MAROFI F, VAHEDI G, HASANZADEH A, et al. Mesenchymal stem cells as the game-changing tools in the treatment of various organs disorders: mirage or reality [J]? J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1268-88.
- [3] HAN Y, LI X, ZHANG Y, et al. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine [J]. Cells, 2019, 8(8): 886-917.
- [4] BROWN C, MCKEE C, BAKSHI S, et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential [J]. J Tissue Eng Regen M, 2019, 13(9): 1738-55.
- [5] 黄里, 陈小, 项鹏. 间充质干细胞临床转化: 进展与挑战[J]. 中国细胞生物学学报(HUANG L, CHEN X, XIANG P. Clinical translation of mesenchymal stem cells: progress and challenge [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2019, 40(S1): 117-27.
- [6] WU C G, CHEN L, HUANG Y Z, et al. Comparison of the proliferation and differentiation potential of human urine-, placenta decidua basalis-, and bone marrow-derived stem cells [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 1-11.
- [7] AHMADBEIGI N, SHAFIEE A, SEYEDJAFARI E, et al. Early spontaneous immortalization and loss of plasticity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Cell Proliferat, 2011, 44(1): 67-74.
- [8] 王华阳, 董召刚, 曲迅. 蜕膜间充质干细胞免疫调节作用及临床应用研究进展[J]. 基础医学与临床(WANG H Y, DONG S G, QU X. The progress of studies on immunomodulation and clinical application of decidual mesenchymal stem cell [J]. Basic & Clin Med), 2012, 32(3): 106-10.
- [9] BAYGAN A, ARONSSON-KURTTILA W, MORETTI G, et al. Safety and side effects of using placenta-derived decidual stromal cells for graft-versus-host disease and hemorrhagic cystitis [J]. Front Immuno, 2017, 8: 795-804.
- [10] 刘淑丹, 马会明, 梁雪云, 等. 胎盘间充质干细胞促进高糖条件下人角质形成细胞增殖与迁移[J]. 中国细胞生物学学报(LIU

- S D, MA H M, LIANG X Y, et al. Influence of placenta mesenchymal stem cells on proliferation and migration of keratinocytes under high glucose conditions [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2018, 40(12): 1983-91.
- [11] 陈海丹. 伦理争论与科技治理——以英国胚胎和干细胞研究为例[J]. *自然辩证法通讯*(CHEN H D. Ethical debate and technological governance: based on the embryo and stem cell research in Britain [J]. *J Dialect Nat*), 2019, 41(12): 40-6.
- [12] 王佃亮. 脐带间充质干细胞库的建设运营及问题解决策略——《脐带间充质干细胞》连载之二[J]. *中国生物工程杂志* (WANG D L. Construction, operation and problem solving strategies of umbilical cord mesenchymal stem cell bank: “umbilical cord mesenchymal stem cell” serial 2 [J]. *Chin Biotechnol*), 2018, 38(9): 106-9.
- [13] GALE A L, LINARDI R L, MCCLUNG G, et al. Comparison of the chondrogenic differentiation potential of equine synovial membrane-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 178-87.
- [14] PARK S, LEE D R, NAM J S, et al. Fetal bovine serum-free cryopreservation methods for clinical banking of human adipose-derived stem cells [J]. *Cryobiology*, 2018, 81: 65-73
- [15] TOOSI S, NADERI-MESHKIN H, KALALINIA F, et al. Long bone mesenchymal stem cells (Lb-MSCs): clinically reliable cells for osteo-diseases [J]. *Cell Tissue Bank*, 2017, 18(4): 489-500.
- [16] CHUBINSKIY-NADEZHGIN V I, SUDARIKOVA A V, SHILINA M A, et al. Cell cycle-dependent expression of bk channels in human mesenchymal endometrial stem cells [J]. *Sci Rep-UK*, 2019, 9(4): 19-24.
- [17] CHANDRAVANSHI B, BHONDE R R. Human umbilical cord-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in treating diabetes [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2018, 46(5): 399-412.
- [18] DOMINICI M, LE B K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytptherapy*, 2006, 8(4): 315-7.
- [19] HOOGDUIJN M J, WITTE S F, LUK F, et al. Effects of freeze-thawing and intravenous infusions of mesenchymal stromal cell gene expression [J]. *Stem Cell Rev*, 2016, 25: 586-97.