

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000339

BrdU 标记人脐带间充质干细胞及对细胞生物学行为影响的体外研究

高黎¹, 祝华¹, 张荣¹, 王莉佳¹, 邹琳², 符州³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014;

2. 重庆医科大学附属儿童医院分子生物中心, 重庆 400014;

3. 重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014; 儿科学重庆市重点实验室、
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地、重庆市干细胞治疗工程研究中心, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)标记人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)的方法及其对细胞存活、增殖以及凋亡的影响。**方法:**将 hUC-MSCs 分离培养并进行细胞表面标志物及多向分化潜能鉴定,取第 5 代细胞以终浓度分别为 10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$ BrdU 进行标记,采用空白 BrdU 作为对照组,分别培养 24、48、72 h 及 96 h 后,台盼蓝排斥实验检测细胞活力;MTT 法检测细胞增殖能力;AnnexinV-FITC 检测细胞存活率及凋亡率,免疫组化法检测各组标记率。**结果:**台盼蓝排斥实验检测细胞活力都在 96%以上,实验组与对照组比较均无统计学意义(不同浓度组间比较 $P=0.89$,各时间点比较 $P=0.61$,时间与不同浓度的交互作用 $P=0.89$)。MTT 结果显示 BrdU 对细胞增殖无抑制($P>0.05$)。不同浓度标记组间细胞增殖率及凋亡率的差异(增殖率 $F=12.02$, $P<0.001$,凋亡率 $F=6.14$, $P=0.009$)。**结论:** BrdU 标记 hUC-MSCs 是安全可靠的, BrdU 标记 hUC-MSCs 的最佳剂量和时间分别为 20 $\mu\text{mol/L}$ 、72 h,适于 hUC-MSCs 在临床前实验研究的体内示踪。

【关键词】人脐带间充质干细胞;5-溴脱氧尿嘧啶核苷;增殖;凋亡**【中图分类号】**R394.33**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-17

Effect of 5-bromo-2-deoxyuridine labeled umbilical cord mesenchymal stem cells on cell biology behaviors in vitro

Gao Li¹, Zhu Hua¹, Zhang Rong¹, Wang Lijia¹, Zou Lin², Fu Zhou³

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Development and Disorders, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; 2. Centre of Molecule Biology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; 3. Department of Respiration Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Stem Cell Therapy Engineering Research Center of Chongqing)

【Abstract】Objective: To explore the method of using 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) to label human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs), and to explore its effect on cell proliferation and apoptosis. **Methods:** hUC-MSCs were isolated and cultured by direct adherent method, then the surface marker and potential ability of multi-direction differentiation were analyzed. The fifth passage of cells were labeled with BrdU at concentrations of 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$, excluding BrdU as control group. Cells were cultivated respectively for 24, 48, 72, 96 h. Trypan blue testing was used to detect cell vitality, MTT method was used to analyze cell proliferation and AnnexinV-FITC assay was used to detect cell survival rate and apoptosis rate. **Results:** Trypan blue testing showed that the living cells was more than 96% and there was no statistical significance between experimental group and control group (comparison among different concentration groups, $P=0.89$; comparison among different time points, $P=0.61$; interaction between time and different concentrations, $P=0.89$). MTT method detected that there was no significant difference in proliferation activity between labeled cells and unlabeled cells ($P>0.05$). There were differences between cell proliferation and apoptosis rate (proliferation rate, $F=12.02$,

 $P<0.001$; apoptosis rate, $F=6.148$, $P=0.009$). **Conclusion:** The tracing method of BrdU labeling hUC-MSCs is safe and effective. The best labeling concentration and time is 20 $\mu\text{mol/L}$ and 72 h.**【Key words】**human umbilical cord mesenchymal stem cells; 5-bromo-2-deoxyuridine; proliferation; apoptosis

作者介绍: 高黎, Email: gaoli198736@163.com,

研究方向: 小儿呼吸

通信作者: 符州, Email: fu_zhou79@aliyun.com。

基金项目: 重庆医科大学附属儿童医院干细胞治疗专项研究资助项目(编号: 3000220)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000339.html>

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 是一类起源于中胚层的成体干细胞, 具有自我更新、高度增殖及多向分化的潜能, 广泛存在于骨髓、脂肪、胎盘、脐带血以及脐带等组织中^[1]。1991 年 McElreavey 首次从人脐带华尔通胶分离培养出一种具有多向分化潜能的成纤维样细胞, 即人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)^[2]。随着人们对 hUC-MSCs 的认识, 越来越多将其用于临床前的实验研究, 将 hUC-MSCs 用于组织再生工程会有良好的应用前景。寻找高效安全的标记方法, 在临床前的实验研究中有助于阐明 hUC-MSCs 在体内发挥作用的机理。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)是胸腺嘧啶核苷的类似物, 在细胞 DNA 合成期掺入到新合成的 DNA 中, 检测的准确性高、方法简便、迅速、安全且可以反映细胞在体内的增殖情况, 是 hUC-MSCs 在实验研究中用于体内示踪的理想标记方法。观察 BrdU 对 hUC-MSCs 的标记率及其对细胞存活、增殖以及凋亡的影响, 为追踪 BrdU 的标记 hUC-MSCs 在移植动物体内的动态变化过程提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12 培养基(美国 GIBCO 公司); 胎牛血清(美国 GIBCO 公司); 成骨诱导培养液(广州赛业生物科技有限公司); 成脂诱导培养液(广州赛业生物科技有限公司)。恒温恒湿培养箱(美国 Thermo 公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); 恒温摇床(哈尔滨市东明医疗仪器厂); 超净工作台(苏州净化设备厂); 培养瓶、培养皿、离心管(美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs 的分离、培养、鉴定 手术台取正常足月健康婴儿脐带组织(供者家属已签署知情同意书), 两端丝线结扎, 浸泡于 DMEM/F12 保存瓶。超净台内取出脐带, 剪开结扎丝线, D-Hanks 缓冲液洗涤残留血液, 剖开脐带, 去除血管及脐带外膜, 并将其剪碎至 1 mm × 1 mm 大小组织块, 并均匀接种于 75 cm² 的无菌培养瓶, 加入培养液 5 ml, 瓶底向上倒置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱内培养, 4 h 后翻转培养瓶, 24 h 后添加培养液。每 3 d 换液, 逐渐去除未贴壁组织块。约 12 d 后待细胞 80% 融合时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 按 2:1 的比例传代培养。实验中使用的 hUC-MSCs 均经过需氧菌、厌氧菌、真菌、支原体检测及微生物检测。经过分离传代培养后, 利用流式细胞仪检测第 3 代细胞的细胞表面抗原(hUC-MSCs 的特征性标记抗原): CD34⁻、CD45⁻、HLA-DR⁻、CD90⁺、CD73⁺、CD105⁺。同时利用成骨及成脂的条件性培养

基诱导分化第 3 代细胞, 7 d 后分别开始观察细胞的成骨及成脂分化能力。

1.2.2 BrdU 体外标记 hUC-MSCs 及免疫组织化学法检测

1.2.2.1 BrdU 标记 hUC-MSCs 的方法 取 p5 代细胞, 经胰酶消化及中止后, 调整细胞密度至 1 × 10⁴ 个/ml, 每孔 500 μl 接种于已放置细胞爬片的 24 孔板中, 在 24 h 后吸弃旧培养基。避光状态下, 对照组每孔加 500 μl 完全培养基, 实验组每孔加入 500 μl 含 BrdU 的完全培养基, 实验组分成 4 组, 终浓度分别是 10、15、20、25 μmol/L, 每组为 6 个复孔。分别在 24、48、72、96 h 后检测 hUC-MSCs 的 BrdU 阳性标记率。将标记的 hUC-MSCs, 连续传代培养, 分别检测传代过后的 BrdU 阳性标记率。

1.2.2.2 BrdU 免疫组织化学 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 0.25% TritonX100 + 5% DMSO 细胞打孔 15 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 2 mol/L 盐酸室温下变性 20 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 5% BSA 封闭 1 h; 加抗 BrdU 单克隆抗体抗 (1:200) 4 ℃ 过夜; 甩掉抗体, 加大鼠抗兔二抗室温孵育 20 min, DAB 显色。空白组以 PBS 替代抗 BrdU 单克隆抗体。显微镜下观察, 随机取 10 个非重叠视野(×100), 以染色阳性细胞核与细胞总数之比计算 BrdU 阳性标记率, 对 5 组免疫组化结果进行统计学分析。

1.2.3 台盼蓝排斥实验检测细胞活力 采用台盼蓝排斥法检测标记后细胞活性。于各个时间点, 收集各组 hUC-MSCs, 0.25% 胰酶消化后加入完全培养基制成 1 ml 细胞悬液, 加入预先配制的 0.4% 台盼蓝溶液 0.1 ml, 用血球计数板显微镜下观察细胞变化情况, 计数 200 个细胞中蓝染的细胞数, 计算活细胞率。

1.2.4 MTT 法检测标记细胞增殖能力 取第 5 代 hUC-MSCs 以 1 000 个细胞每孔接种于 96 孔板中, 每孔体积 200 μl。标记组和未标记组每组 42 孔细胞, 以无细胞的完全培养液作为空白对照组, 培养 1、2、3、4、5、6、7 d 后同一时间点每组各取 6 孔细胞, 吸弃旧培养液, 加入 180 μl 新鲜培养液、20 μl MTT 液(5 g/L), 孵育 4 h 后吸弃液体, 每孔中加入二甲亚砜 100 μl, 轻轻振荡 10 min 充分溶解细胞代谢产物, 以空白孔调零, 用酶标仪检测 590 nm 吸光度值 A_{590 nm}。以吸光度值为纵坐标, 天数为横坐标, 绘制生长曲线。

1.2.5 细胞存活率与凋亡率分析 取 BrdU 标记 3 d 的 hUC-MSCs, 无菌的去离子水按 1:4 稀释结合缓冲液备用, 用预冷 4 ℃ 无菌的 PBS 缓冲液充分洗涤细胞 2 次, 取总数约为 1 × 10⁶ 个/ml 的细胞待检测; 用 250 μl 结合缓冲液重悬细胞并使其浓度为 2~5 × 10⁵ 个/ml; 取 195 μl 的细胞悬液加入 5 μl AnnexinV-FITC, 轻轻混匀后间隔 3 min, 再加入 10 μl 浓度为 20 μg/ml 的碘化丙锭溶液; 混匀后于室温避光孵育 10 min; 加 300 μl 结合缓冲液, 轻轻混匀, 流式细胞仪进行检测分析。计算细胞存活率、凋亡率, 并进行统计学分析。

1.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素及重复测量的方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 分离、培养、鉴定

原代培养的细胞约 24 h 内贴壁生长, 培养 96 h 后在倒置显微镜下观察可见脐带组织碎块周围有三角形和成纤维样细胞出现, 培养 12 d 后, 细胞融合度达到 80%~90%, 成纤维细胞样细胞呈漩涡式生长, 经过连续传代 10 次, 细胞变为形态更为均一的成纤维样, 细胞形态无明显改变、无衰老。流式细胞仪检测 hUC-MSCs 细胞表面抗原 CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR 表达率分别是 0.19, 0.19, 99.96, 99.10, 99.42, 0.10 (图 1), 符合 hUC-MSCs 的细胞表面标志物。成骨诱导: 诱导第 10 天可观察到细胞上方有悬浮的白色钙结节, 第 20 天茜素红染色可见白色钙结节呈铁锈红染色 (图 2)。成脂诱导: 诱导第 5 天观察到细胞胞质中开始有脂滴形成, 第 15 d 油红 O 染色可见胞质中脂滴红染 (图 3)。

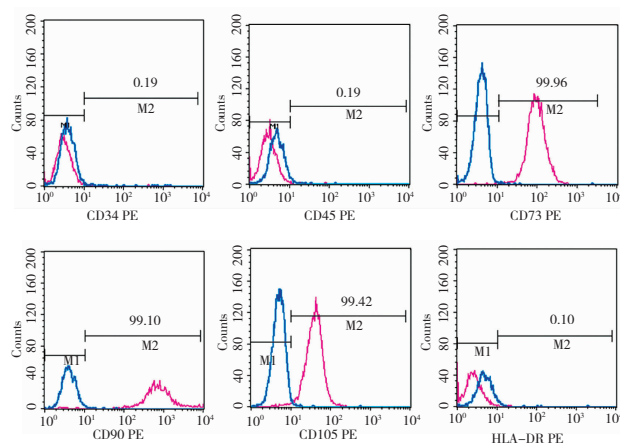


图 1 流式细胞术检测 hUC-MSCs 细胞表面标志物

Fig.1 Surface marker detected by flow cytometry

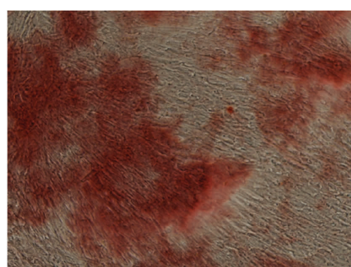


图 2 成骨分化 (茜素红染色 100 ×)

Fig.2 Osteogenic differentiation (Alizarin red staining 100 ×)

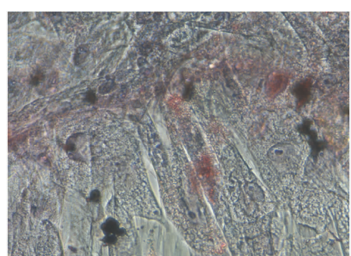


图 3 成脂分化 (油红 O 染色 200 ×)

Fig.3 Adipogenic differentiation (Oil Red O staining 200 ×)

2.2 BrdU 免疫组织化学染色及阳性标记率

免疫组织化学染色可见 BrdU 阳性细胞, 棕色部位为阳性表达 (图 4), BrdU 标记时间及浓度对细胞标记率的影响 (表 1)。不同标记时间之间具有显著性差异 ($F=328.27, P=0.000$); 72 h 与 96 h 组之间采用成对比较无统计学差异 ($P=0.104$)。不同标记浓度之间具有明显统计学差异 ($F=2461.62, P=0.000$)。不同浓度和标记时间对细胞的标记率之间存在交互效应 ($F=40.39, P=0.000$)。终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 标记 72 h 的 hUC-MSCs, 连续传代培养 4 代后, BrdU 阳性标记率为 40%。

表 1 不同浓度 BrdU 标记 hUC-MSCs 细胞阳性标记率

Tab.1 Positive rate of labeled hUC-MSCs under different concentrations of BrdU

BrdU 浓度	时间 (h)				合计	F 值	P 值
	24	48	72	96			
对照	$\bar{x}$	0.00	0.00	0.00	0.00		
	s	0.00	0.00	0.00	0.00		
10	$\bar{x}$	38.50	41.70	57.80	62.00	92.24	0.000
	s	4.29	5.07	2.69	2.71	3.69	
15	$\bar{x}$	39.20	69.40	86.10	85.90	195.15	0.000
	s	5.95	4.82	3.56	3.65	4.49	
20	$\bar{x}$	63.10	84.50	86.10	86.70	52.38	0.000
	s	5.85	4.82	3.57	6.07	5.07	
25	$\bar{x}$	67.70	83.10	89.57	90.30	40.65	0.000
	s	5.90	7.21	2.49	3.89	4.87	
合计	$\bar{x}$	41.70	55.70	63.90	64.90	328.27 ^a	0.000 ^a
	s	24.70	32.51	34.40	34.54	31.54	
F 值	0.08	510.4	1853.1	999.10	2461.62 ^a	$F=40.391$	
P 值	0.988	0.000	0.000	0.000	0.000 ^a	$P=0.000b$	

注: a, 主效应的 F 和 P 值; b, 交互效应的 F 和 P 值

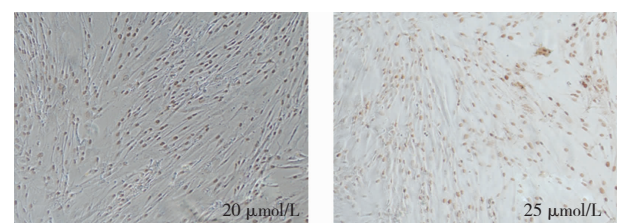


图 4 BrdU 标记细胞免疫组织化学 (100 ×)

Fig.4 Immunohistochemistry of BrdU labeled cells (100 ×)

2.3 BrdU 标记组与对照组细胞活力比较

BrdU 标记 24、48、72、96 h 后, 各组细胞及对照组活性均在 96% 以上, 24 h BrdU 不同浓度实验组与对照组比较 F 值 0.081, P 值 0.988; 48 h BrdU 不同浓度实验组与对照组比较 F 值 0.221, P 值 0.924; 72 h BrdU 不同浓度实验组与对照组比较 F 值 0.551, P 值 0.700; 96 h BrdU 不同浓度实验组与对照组比较 F 值 0.128, P 值 0.971。不同标记浓度组间比较: $P=0.892$, 不同时间点组间比较 $P=0.612$, 时间与浓度之间的交互作用: $P=0.896$, 无统计学差异。

表 2 AnnexinV-FITC 检测 BrdU 标记 hUC-MSCs 存活率及凋亡率

Tab.2 Survival and apoptosis rate of BrdU labeled cells detected by AnnexinV-FITC assay

	对照	10 $\mu\text{mol/L}$	15 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$	F 值	P 值
存活率	91.23 $\pm$ 1.65	91.22 $\pm$ 0.39	87.64 $\pm$ 0.62	88.15 $\pm$ 0.44	82.64 $\pm$ 1.87 ^a	12.02	0.001
凋亡率	4.32 $\pm$ 0.82	8.06 $\pm$ 0.81	5.39 $\pm$ 0.23	6.80 $\pm$ 1.45	12.08 $\pm$ 1.96 ^b	6.14	0.009

注:a、b 分别代表 25 $\mu\text{mol/L}$ BrdU 标记组与对照组存活率和凋亡率相比有统计学差异

2.4 BrdU 标记组与对照组细胞生长曲线

MTT 检测后绘制细胞生长曲线图(图 5),BrdU 标记组与对照组接种 1 d 后开始增殖,4 d 进入对数增长期,5 d 达高峰后开始下降。被标记的细胞与对照组相比细胞仍呈长梭形、漩涡状生长。BrdU 标记 hUC-MSCs 不同浓度组间比较: $P < 0.001$,标记不同时间组间比较 $P < 0.001$,时间与不同浓度之间的交互作用: $P = 0.573$ 。

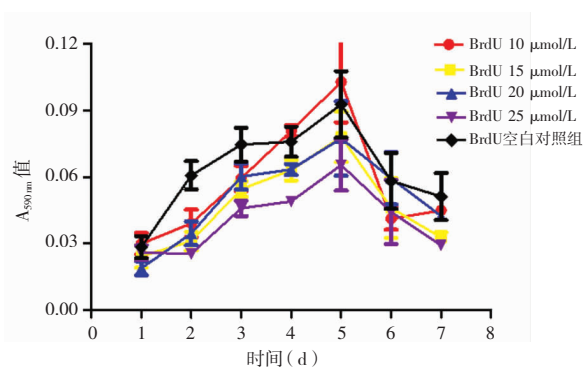


图 5 BrdU 标记后细胞生长曲线

Fig.5 Growth curve of BrdU labeled cells

2.5 BrdU 标记组与对照组细胞存活率与凋亡率

AnnexinV-FITC 检测细胞存活率与凋亡率(表 2),10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ BrdU 标记组与对照组之间进行两两比较均无统计学差异($P > 0.05$)。25 $\mu\text{mol/L}$ BrdU 标记组与 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ BrdU 标记组及对照组之间运用 LSD 检验方法进行两两比较(凋亡率 P 值分别为 0.041、0.003、0.012、0.001,存活率 P 值分别为 0.006、0.000、0.003、0.000),有统计学差异。

3 讨论

间充质干细胞是一类具有自我复制和多向分化潜能的成体干细胞^[3],广泛分布于胎儿和成体的骨髓、骨膜、松骨质、脂肪、滑膜、骨骼肌、胎肝、乳牙、脐带、脐带血中。目前临床及科研最常应用的是骨髓来源和脐带来源的 2 种间充质干细胞,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)曾被认为是最适合用于临床的间充质干细胞而得到广泛研究。但是, BM-MSCs 来源有限、要通过有创手术获得^[4]、同时研究发现随着捐献者年龄

的增大 BM-MSCs 增殖能力减弱^[5],随着对 BM-MSCs 认识的更加深入, BM-MSCs 并不是最适宜的间充质干细胞来源。hUC-MSCs 来源于分娩时遗弃的脐带,取材方便,来源广泛,不存在伦理学问题;原代培养即可获取大量细胞,细胞增殖能力强、扩增速度快,分离成功率高;同时 hUC-MSCs 分化潜能介于胚胎干细胞和成体干细胞之间,既不会发生自发分化又不会无限增殖而形成畸胎瘤;免疫源性低,可用于同种异体细胞移植;因此鉴于脐带来源的 MSCs 的质量高、纯净、数量多等诸多优点,近年已成为干细胞研究及应用的热点。目前,有研究已经表明 hUC-MSCs 在肿瘤^[6]、神经系统疾病^[7]、肝脏^[8]及免疫缺陷疾病(移植物抗宿主病^[9]和系统性红斑狼疮^[10])都有较好的治疗效果,但是具体作用机制尚不清楚,需要不断深入研究。

因此首先要选择有效的手段,标记和追踪 hUC-MSCs 在体内的分布、分化及转归,才能深入探讨 hUC-MSCs 发挥治疗效果的具体机制。目前,常用的细胞标记方法有荧光染料标记(DAPI 标记、DiI 标记)^[11]、核素标记(³H-TdR 标记)^[12]、Y 染色体标记^[13]、报告基因转染(绿色荧光蛋白)、磁标记细胞 MRI 活体示踪成像^[14]以及 BrdU 标记等。荧光染料标记法快速、高效,但是随着细胞在体内凋亡,细胞碎裂,染料释放在组织中会将周围细胞标记出现假阳性结果。绿色荧光蛋白标记细胞鉴于其标记率低,不适用于体内示踪。核素标记(³H-TdR 标记)广泛应用于研究染色体复制,但是其放射性污染目前不考虑用于体内示踪。磁标记法标记效率高、对细胞毒性小,操作简便,鉴于后续检查需用 MRI 活体示踪成像,较为困难。其中 BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,当细胞处于 DNA 合成期而同时又有 BrdU 存在时, BrdU 就会掺入到新合成的 DNA 中,经免疫组织化学染色可观察在细胞内 BrdU 的掺入情况,进而反映细胞增殖及示踪监测移植细胞动态变化。因此 BrdU 标记方法简便、安全,而且具有较高标记率,目前使用较为广泛。鉴于 hUC-MSCs 是近年来才在干细胞

研究中获得重点关注,因此目前仍缺乏关于 BrdU 标记 hUC-MSCs 较为全面及科学的报道。于是本实验利用台盼蓝排斥实验、MTT 法及 AnnexinV-FITC 法,较为全面的探讨 BrdU 标记 hUC-MSCs 的有效性和安全性。本实验发现 BrdU 标记 hUC-MSCs 是极其有效,阳性标记率都超过 83%且细胞活性都高达 96%。虽然 MTT 实验发现 BrdU 有所减缓 hUC-MSCs 在被标记后早期的(72 h 内)生长速度,但是对细胞生长曲线的高峰期时间和细胞数量并无影响,说明在 BrdU 标记 hUC-MSCs 后 3~6 d 内保持良好的稳定性,因此利用 BrdU 标记可以在较长时间内追踪和观测 hUC-MSCs 的生物学活性。同时作者发现 BrdU 必须控制在一定浓度范围内,因为 AnnexinV-FITC 实验发现其终浓度超过 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,可能会影响 hUC-MSCs 的存活率。本实验采用 BrdU 标记 hUC-MSCs,在综合分析后认为 BrdU 终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$,标记时间在 72 h 时,hUC-MSCs 阳性标记率可达 $(86.7 \pm 2.5)\%$,并且细胞形态、生长、增殖、凋亡均不受影响,且在体外连续传代 4 次 BrdU 阳性标记率仍在 40%,可以保证 hUC-MSCs 具有较高的阳性标记率,而且还具有较高的稳定性和安全性,这为后续实验奠定了坚实的基础。

hUC-MSCs 相对于其他来源的干细胞有着来源丰富、细胞分离培养效率高、易于扩增培养、不具有成瘤性,会在组织工程学及再生医学的发展中发挥作用。实验证实 BrdU 标记 hUC-MSCs 方法安全高效,为追踪 hUC-MSCs 在移植动物体内的动态变化过程提供可靠依据。

参 考 文 献

- [1] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood[J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1669-1675.
- [2] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord [J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, 19(1): 29(s).
- [3] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord potentials[J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1017-1026.
- [4] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells(CFU-F) and their progeny[J]. *Blood*, 1980, 56(2): 289-301.
- [5] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 82(4): 583-590.
- [6] Rachakatla RS, Pyle MM, Ayuzawa R, et al. Combination treatment of human umbilical cord matrix stem cell-based interferon-beta gene therapy and 5-fluorouracil significantly reduces growth of metastatic human breast cancer in SCID mouse lungs[J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(7): 662-670.
- [7] Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005 (1049): 67-83.
- [8] Zhang Y, Cai W, Huang Q, et al. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells[J]. *Hepatology*, 2014, 59(2): 671-682.
- [9] Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14(9): 1031-1038.
- [10] Sun L, Akiyama K, Zhang H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1421-1432.
- [11] Kruyt MC, De Bruijn J, Veenhof M, et al. Application and limitations of chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine for tracing cells used in bone tissue engineering[J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(1): 105-115.
- [12] Ding W, Bai J, Zhang J, et al. In vivo tracking of implanted stem cells using radio-labeled transferrin scintigraphy[J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31(6): 719-725.
- [13] Zhao DC, Lei JX, Chen R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats[J]. *World J Gastroenterology*, 2005, 11(22): 3431-3440.
- [14] Schafer R, Ayturan M, Bantleon R, et al. The use of clinically approved small particles of iron oxide(SPIO) for labeling of mesenchymal stem cells aggravates clinical symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis and influences their in vivo distribution[J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(8): 923-941.

(责任编辑:关蕴良)