

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

彭运^{1#} 陈凤^{2#*} 黄华鑫¹ 李彦洁¹ 彭凌²

(¹南华大学深圳市第三人民医院, 深圳 518112; ²深圳市第三人民医院, 深圳 518112)

摘要 该文旨在比较人脂肪间充质干细胞(hADSCs)和脐带间充质干细胞(hUMSCs)的生物学特性, 并鉴定其多向分化潜能。体外扩增培养hADSCs和hUMSCs, 绘制细胞生长曲线并计算群体倍增时间, 通过细胞集落实验比较两种细胞的增殖能力, 流式细胞仪和RT-PCR方法分别检测细胞表面抗原和多能性相关基因的表达, 采用成脂、成骨诱导分化试剂盒比较两种细胞的分化潜能。hADSCs和hUMSCs表达CD34、CD44、CD45、CD105的比例分别为2.7% vs 6.2%、92.3% vs 93.4%、1.3% vs 3.1%、99.4% vs 98.0%, 均表达*Oct4*和*Nanog*基因; 生长曲线均呈“S”型, 两种细胞的群体倍增时间差异不显著($P>0.05$); 随着代数数的增加, 两种细胞的增殖能力均变弱, 但P7的hADSCs的增殖能力要显著优于hUMSCs($P<0.05$); 经油红O、茜素红染色及RT-PCR和细胞免疫荧光方法检测特异基因的表达, 表明两种细胞均具备成脂、成骨分化的能力, hADSCs的成脂能力优于hUMSCs, 但两种间充质干细胞的成骨分化能力没有显著性差异。hADSCs和hUMSCs具有相似的生物学特性, 但hADSCs可能具备更强的增殖能力和成脂分化潜能。

关键词 脂肪间充质干细胞; 脐带间充质干细胞; 生物学特性; 多向分化潜能

Comparison of Biological Characteristics and Multiple Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells from Different Sources

PENG Yun^{1#}, CHEN Feng^{2#*}, HUANG Huaxin¹, LI Yanjie¹, PENG Ling²

(¹University of South China Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518112, China;

²Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518112, China)

Abstract This study aimed to compare the biological characteristics and differentiation potential of hADSCs (human adipose-derived mesenchymal stem cells) and hUMSCs (human umbilical cord mesenchymal stem cells). hADSCs and hUMSCs were cultured *in vitro*. Cell proliferation was characterized by construction of growth curves and calculation of the PDT (population doubling time). We also compared the cells' proliferative ability by colony forming assays, determined the cell surface antigens by flow cytometry, and tested the pluripotency-related genes by RT-PCR. Differentiation potential was compared by adipogenic, osteogenic induction and differentiation kits. The ratios of CD34, CD44, CD45, CD105 expressed in hADSCs versus hUMSCs were 2.7% vs 6.2%, 92.3%

收稿日期: 2020-01-29 接受日期: 2020-02-24

国家自然科学基金(批准号: 81800525、81873573)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0755-61235867, Email: 1148949465@qq.com

Received: January 29, 2020 Accepted: February 24, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81800525, 81873573)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-755-61235867, E-mail: 1148949465@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5216>

vs 93.4%, 1.3% vs 3.1%, and 99.4% vs 98.0%, respectively. All cells expressed *Oct4* and *Nanog* and presented an S-shaped growth curve. There was no significant difference in PDT between the two cell types ($P>0.05$). The proliferative ability of both cell types declined progressively with passaging, but the proliferative ability of hADSCs at passage 7 was significantly higher than hUMSCs ($P<0.05$). Results of oil red O, alizarin red staining, RT-PCR and cell immunofluorescence suggested that both cell types had the potential to differentiate into adipocytes and osteocytes. However, hADSCs had stronger adipogenic ability than hUMSCs, but there was no significant difference in osteogenic ability between the two cell types. In summary, while hADSCs and hUMSCs share key biological features, hADSCs seem to have stronger proliferative and adipogenic abilities.

Keywords adipose-derived mesenchymal stem cells; umbilical cord mesenchymal stem cells; biological characteristics; differentiation potential

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源广泛,几乎分布在机体的所有组织器官中,如骨髓、脂肪、胎盘、脐带、牙髓、羊膜等组织^[1]。在一定条件下, MSCs 可以向脂肪、骨、软骨、肌肉、神经、肝脏等组织器官分化^[2],因此在临床研究中具有重要价值。目前,大量的研究表明, MSCs 在治疗移植物抗宿主病^[3]、软骨^[4]和脊髓^[5]等组织损伤的修复、系统性红斑狼疮等^[6]自身免疫性疾病中,具有良好的疗效。随着对干细胞研究的不断深入,用于临床的干细胞种类不断增加,因此,充分地认识不同组织来源间充质干细胞的异同,建立能确保产品安全有效的质量控制体系至关重要。相较于应用和研究最广泛的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),来源于脂肪的间充质干细胞(human adipose-derived mesenchymal stem cells, hADSCs)和来源于脐带的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUMSCs)容易获得,在采集过程中对人体造成的损伤相对较小,可能具有更大的应用潜能。阐明不同组织来源间充质细胞之间的差异性,对于选择合适的种子细胞用于组织工程研究具有深远的意义。本研究通过比较hADSCs和hUMSCs的生长特性、表面标记、多能性相关基因的表达和多向分化的能力,为丰富对间充质干细胞的认识和其临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人脐带组织来源于深圳市第三人民医院妇产科的健康产妇足月剖宫产的胎儿,按照团队成员已经发表的文献方法进行分离培养^[7];人脂肪组织来源的原代间充质干细胞购自深圳市北

科生物科技有限公司;本研究内容取得病人知情同意书且已通过医院伦理委员会审核。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、成脂和成骨诱导分化试剂盒均购自Gibco公司;PE偶联小鼠抗人CD34(652802)、CD44(555479)、CD45(555483)、CD105(560839)抗体均购自BD BIOSCIENCES PHARMINGEN公司;兔来源的PPAR γ (ab178860)、CEBP β (ab32358)、FABP4(ab92501)、RUNX2(ab192256)及OPN(ab8448)一抗均购自Abcam公司;RNA提取及反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;引物序列参考文献的报道^[8-10],由生工生物工程(上海)有限公司合成,序列详细信息如表1所示。

仪器包括:超净工作台、-80 °C冰箱、CO₂培养箱(Thermo Scientific);倒置显微镜(Life technologies);梯度扩增PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司, ETC811);凝胶图像分析仪(美国BIO-RAD)和流式细胞分析仪(BD FACSCanto™ II)。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖能力测定 取第3代的hADSCs和hUMSCs按照 1×10^4 个/孔分别接种至24孔板中,每天随机取3孔细胞用胰酶消化,锥虫蓝染色后采用自动细胞计数仪进行计数,取其平均数绘制生长曲线(横坐标为培养时间,纵坐标为细胞数平均值)。按照公式 $PDT=t\lg 2/(\lg N-\lg N_0)$ 计算细胞群体倍增时间。其中, t 为细胞培养时间; N_0 为细胞培养开始时的细胞数量; N 为细胞培养终止时细胞数量。取第4代和第7代的hADSCs和hUMSCs进行细胞集落实验,胰酶消化后制成单细胞悬液,每100 mm培养皿接种100个细胞,连续培养16天后,用4%多聚甲醛固定15 min,随后吉姆萨染色30 min, PBS清洗后于显

表1 成脂、成骨及多能性相关基因的引物序列

Table 1 Primers for expression of adipogenic, osteogenic and pluripotent related genes

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Oct4</i>	F: CCG AAA GAG AAA GCG AAC CAG; R: ATG TGG CTG ATC TGC TGC AGT
<i>Sox2</i>	F: CCC CCG GCG GCA ATA GCA; R: TCG GCG CCG GGG AGA TAC AT
<i>Nanog</i>	F: CAG AAG GCC TCA GCA CCT AC; R: CTG TTC CAG GCC TGA TTG TT
<i>GAPDH</i>	F: CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT C; R: GTG GTC GTT GAG GGC AAT G
<i>LPL</i>	F: GAG ATT TCT CTG TAT GGC ACC; R: CTG CAA ATG AGA CAC TTT CTC
<i>PPARγ</i>	F: GCT GTT ATG GGT GAA ACT CTG; R: ATA AGG TGG AGA TGC AGG TTC
<i>ALP</i>	F: ATG TCA TCA TGT TCC TGG GAG AT; R: TGG AGC TGA CCC TTG AGG AT
<i>OCN</i>	F: AAG AGA CCC AGG CGC TAC CT; R: AAC TCG TCA CAG TCC GGA TTG

显微镜下统计直径大于2 mm的克隆数目; 每组实验重复3次。

1.2.2 细胞表面抗原检测 取第3代的hADSCs和hUMSCs, 胰酶消化, 收集细胞用PBS重悬, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 取各管200 μ L细胞悬液按照BD公司提供的抗体使用说明书分别加入小鼠抗人CD34、CD44、CD45、CD105的单克隆抗体, 室温下避光孵育0.5 h, PBS洗涤后重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

1.2.3 多能性相关基因的表达 取第4代的hADSCs和hUMSCs, 按照北京全式金生物技术有限公司的试剂盒说明书进行总RNA的提取和反转录。随后, 进行PCR扩增检测*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*基因的表达。反应程序为: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, T_m (*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*为60 °C)退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 最后72 °C终延伸10 min; 取5 μ L反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 观察2种细胞中与多能性相关基因的表达情况。

1.2.4 成脂及成骨分化 取第4代的hADSCs和hUMSCs, 以 1×10^5 个/孔密度分别接种到6孔板中, 待细胞融合约80%后, 分化组分别加入成脂、成骨诱导分化液, 对照组加入普通培养液, 每3天换液1次, 成脂、成骨组分别在第10天、第18天停止诱导。成脂诱导结束后, 采用RT-PCR检测*LPL*、*PPAR γ* 基因的表达, 并通过细胞免疫荧光检测PPAP γ 、CEBP β 、FABP4的表达; 同时, 4%多聚甲醛室温固定30 min后, 进行油红O染色。成骨诱导结束后, 进行茜素红染色, 采用RT-PCR检测*ALP*、*OCN*基因的表达, 并通过细胞免疫荧光检测RUNX2和OPN的表达。最后, 通过ImageJ软件统计油红O染色和茜素红染色中阳性染色细胞所占百分比, 比

较分析hADSCs和hUMSCs的成脂肪分化和成骨分化能力。

1.2.5 统计学分析 所有数据均采用SPSS 19.0统计软件进行分析。实验数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 对两组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种间充质干细胞的增殖能力比较

两种细胞生长曲线均呈“S”型, 1~2天细胞处于潜伏期, 增殖不明显, 2~5天进入对数期, 增殖加速, 6~7天细胞进入平台期, 增殖缓慢(图1A)。通过生长曲线计算群体倍增时间, 第3代hADSCs和hUMSCs的PDT分别约等于1.91天和1.97天, 二者之间无显著性的差异($P > 0.05$)(图1B)。细胞集落实验显示, 随着代数增加, 两种细胞形成的克隆数目减少, 第4代的hADSCs和hUMSCs形成克隆的数目无显著性差异($P > 0.05$), 而传代至第7代的hADSCs形成克隆的数目显著高于相同代数的hUMSCs($P < 0.05$)(图2)。

2.2 两种间充质干细胞的表面标记物检测

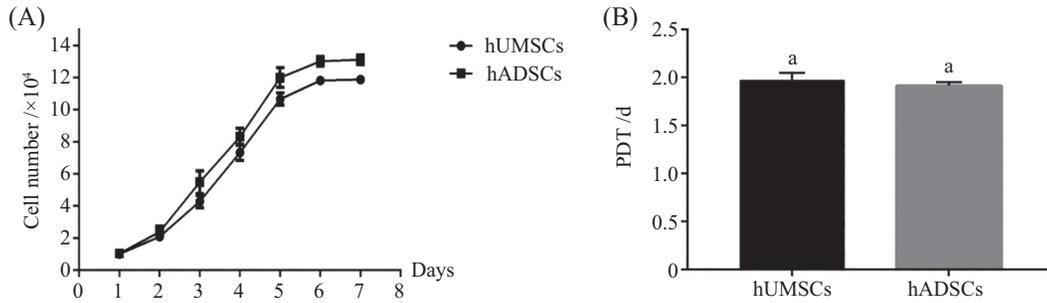
流式细胞仪检测结果显示, hADSCs和hUMSCs的细胞表型相似, 表面标记抗体CD34、CD44、CD45、CD105在hADSCs和hUMSCs的表达率分别为2.7% vs 6.2%、92.3% vs 93.4%、1.3% vs 3.1%、99.4% vs 98.0%(图3)。

2.3 两种间充质干细胞的多能性相关基因的表达

进一步检测与多能性相关的*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*基因的表达, 结果表明, hADSCs和hUMSCs均表达*Oct4*、*Nanog*, 但未发现*Sox2*基因的表达(图4)。

2.4 成脂及成骨分化

hADSCs和hUMSCs在加入成脂诱导分化液3

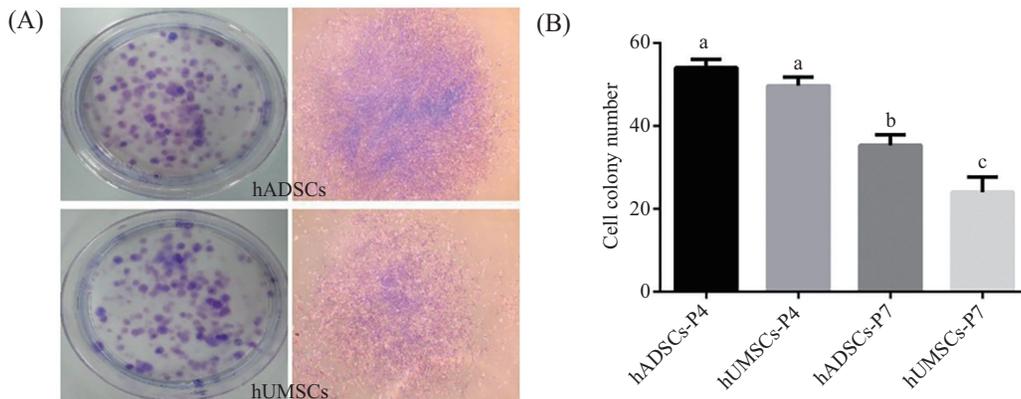


A: 脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的细胞生长曲线图; B: 脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的群体倍增时间; 图中标记为相同字母表示没有显著性差异($P>0.05$); 图中标记为不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

A: the growth curve of the hADSCs and hUMSCs; B: the population doubling time of hADSCs and hUMSCs. Bars labeled with same letters are no significantly different ($P>0.05$). Bars labeled with different letters are significantly different ($P<0.05$).

图1 两种间充质干细胞的增殖活性检测

Fig.1 Proliferation activity of two kinds of mesenchymal stem cells

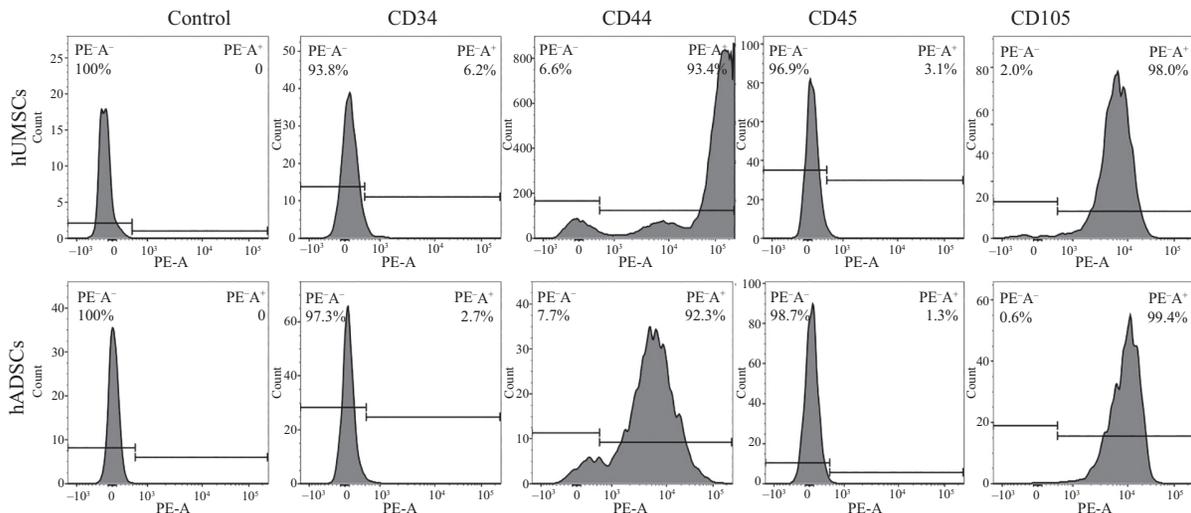


A: 脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的克隆形态; B: 脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的克隆形成数目; 图中标记为相同字母表示没有显著性差异($P>0.05$); 图中标记为不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

A: the colony morphology of hADSCs and hUMSCs; B: the colony number of hADSCs and hUMSCs. Bars labeled with same letters are no significantly different ($P>0.05$). Bars labeled with different letters are significantly different ($P<0.05$).

图2 两种间充质干细胞的克隆形成能力测定

Fig.2 Colony forming ability of two kinds of mesenchymal stem cells

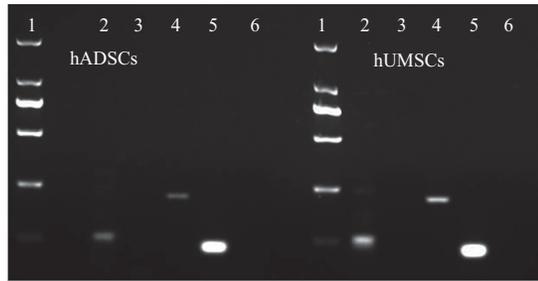


流式细胞分析脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的表面标记物CD34、CD44、CD45和CD105。

Flow cytometry analyze the surface marker CD34, CD44, CD45, CD105 of hADSCs and hUMSCs.

图3 两种间充质干细胞的表面标记表达

Fig.3 Expression of surface markers in two kinds of mesenchymal stem cells

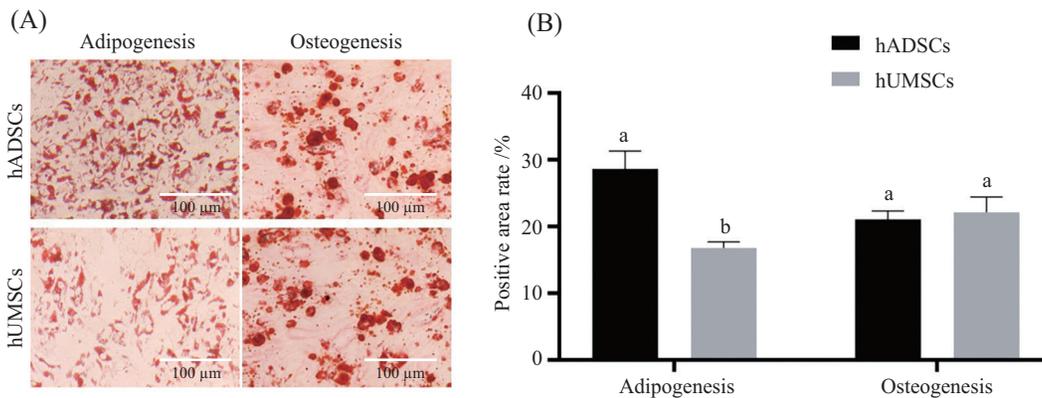


脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的多能性相关基因的电泳分析图。泳道1为DL2000 marker; 泳道2~6分别为*Oct4*(102 bp)、*Sox2*(448 bp)、*Nanog*(215 bp)、*GAPDH*(81 bp)和阴性对照。

RT-PCR analysis the pluripotent related genes expression of hADSCs and hUMSCs. lane 1 is DL2000 marker; lane 2-6 is *Oct4* (102 bp), *Sox2* (448 bp), *Nanog* (215 bp), *GAPDH* (81 bp) and negative control, respectively.

图4 两种间充质干细胞的多能性相关基因的表达

Fig.4 RT-PCR analysis pluripotent related genes expression in two kinds of mesenchymal stem cells



A: 分别采用油红O和茜素红染色的方法鉴定脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的成脂分化和成骨分化情况; B: 通过ImageJ软件统计阳性染色细胞所占百分比, 比较分析两种间充质干细胞向脂肪和骨分化的能力。图中标记为相同字母表示没有显著性差异($P>0.05$); 相同组中标记为不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

A: oil red O, alizarin red staining to assess adipogenesis and osteogenesis of hADSCs and hUMSCs; B: ImageJ software to count the percentage of positive stained cells, to analyze and compare the ability of adipogenesis and osteogenesis between hADSCs and hUMSCs. Bars labeled with same letters are no significantly different ($P>0.05$); Bars labeled with different letters in same groups are significantly different ($P<0.05$).

图5 组织染色鉴定两种间充质干细胞的多向分化潜能

Fig.5 Multipotent differentiation potential of two kinds of mesenchymal stem cell were identified by immunostaining

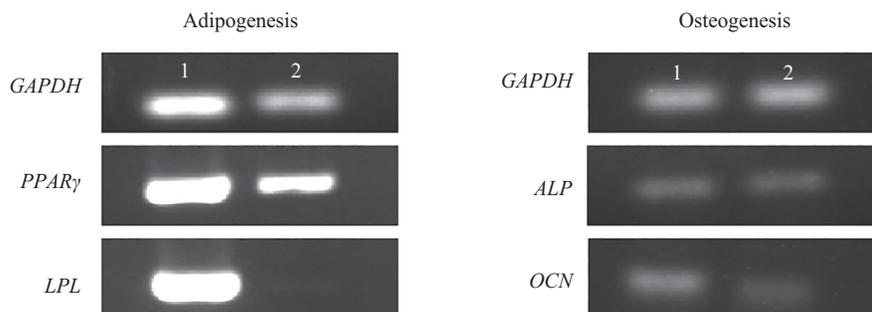
天, 可见少量脂滴于胞浆中, hADSCs形成脂滴的时间更早一些, 分化诱导10天, 油红O染色呈现为强烈的红色(图5A)。其中, hADSCs分化组的阳性染色细胞百分比显著高于hUMSCs分化组($P<0.05$)(图5B); RT-PCR鉴定*PPAR γ* 和*LPL*基因的表达, 发现诱导后的hADSCs和hUMSCs均高表达*PPAR γ* , 但*LPL*仅在hADSCs中高表达, 在hUMSCs中只有微弱的表达(图6); 细胞免疫荧光实验显示, 诱导后的hADSC和hUMSCs均表达*PPAR γ* 、*CEBP β* 、*FABP4*, 但*FABP4*在hADSC的成脂分化中表达更明显(图7)。

hADSCs和hUMSCs在加入成骨诱导分化液后, 形态逐渐变为短梭形, 诱导10天左右可见高折光性的结晶颗粒出现, 第18天行茜素红染色, 均可见胞质

内有大量的橘红色钙结节(图5A), 比较两组间充质干细胞的阳性染色细胞百分比, 未发现显著性差异($P>0.05$)(图5B); RT-PCR检测特异基因*ALP*和*OCN*在诱导后的hADSCs和hUMSCs中的表达, 二者间无明显差异(图6); 细胞免疫荧光实验发现, hADSCs和hUMSCs的诱导产物均表达*RUNX2*, 但均微弱表达*OPN*(图7)。

3 讨论

间充质干细胞是一类广泛存在于机体组织中的成体干细胞, 具有自我更新和跨胚层分化的特性, 在治疗组织损伤修复、免疫相关疾病和退行性疾病中具有广阔的应用前景。随着研究的深入, 应用于

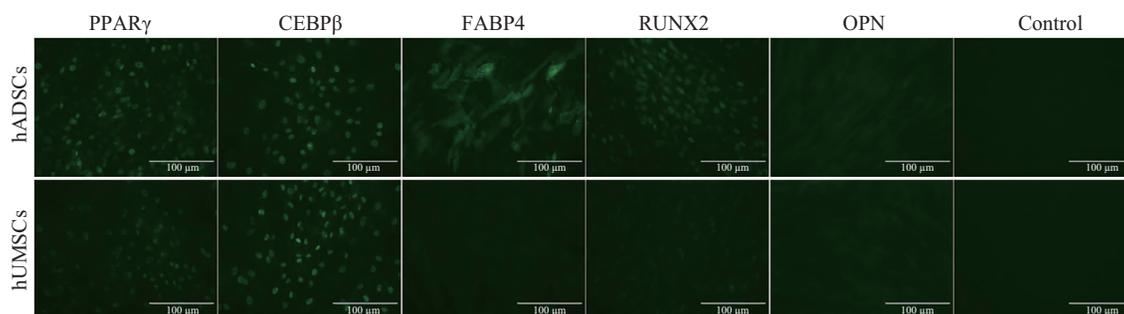


采用RT-PCR方法鉴定脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的成脂分化和成骨分化能力。泳道1为hADSCs; 泳道2为hUMSCs。

The expression of adipogenic and osteogenic genes was detected by RT-PCR. lane 1 is hADSCs; lane 2 is hUMSCs.

图6 RT-PCR鉴定两种间充质干细胞的多向分化潜能

Fig.6 Multipotent differentiation potential of two kinds of mesenchymal stem cells were identified by RT-PCR



采用细胞免疫荧光鉴定脂肪间充质干细胞和脐带间充质干细胞的成脂分化和成骨分化能力。PPAR γ 、CEBP β 、FABP4为成脂分化标志物; RUNX2、OPN为成骨分化标志物。

Immunocytochemistry was used to identified the adipogenic, osteogenic differentiation abilities of hADSCs and hUMSCs. Adipogenic differentiation markers: PPAR γ , CEBP β , FABP4; Osteogenic differentiation markers: RUNX2, OPN.

图7 细胞免疫荧光鉴定两种间充质干细胞的多向分化潜能

Fig.7 Multipotent differentiation potential of two kinds of mesenchymal stem cells were identified by immunocytochemistry

临床的间充质干细胞种类在不断增加, 亟需对MSCs的使用进行规范化, 这主要基于对MSCs的充分认识, 只有充分认识到来自不同组织的MSCs的差异性, 才可以更好地确定临床适用症。

本研究比较了人脂肪源性间充质干细胞和人脐带间充质干细胞的生长曲线、群体倍增时间、克隆形成能力、表面抗原、多能性基因和成脂成骨分化能力的差异性。两种间充质干细胞生长趋势与正常细胞生长规律一致, 较早代数的hADSCs和hUMSCs在群体倍增时间和克隆形成能力上没有显著性差异, 但随着代数的增加, 两种细胞的增殖能力均下降, hADSCs形成克隆的能力显著优于hUMSCs, 这可能与脂肪干细胞在传代多次后还具有很高的端粒酶活性有关^[11], 此外, 也有研究表明, 脂肪干细胞在体外耐受细胞凋亡的能力更强^[12]。间充质干细胞具有独特的细胞表型, 目前人类公认的MSCs应高表达CD73、CD90、CD105, 而应低表达或不

表达CD14、CD45、CD34、CD19、CD79等^[13], 此外, 研究也证明, MSCs在体外扩增培养过程中可表达CD29、CD44、CD73等^[14-15]。结合文献的报道, 本研究挑选了报道的较多的CD34、CD44、CD45、CD105进行验证, 发现hADSCs和hUMSCs表达间充质干细胞标记物CD44、CD105的比例大于92%, 表达造血干细胞的标记物CD34和CD45的比例在7%以下, 提示本研究使用的细胞具有间充质细胞的特性。Oct4、Sox2、Nanog等常被用来评判干细胞是否具有多能性, 本研究中, hADSCs和hUMSCs均表达Oct4和Nanog, 表明它们具有干细胞特性, 但未检测到Sox2的表达。Sox2在体外主要在未分化的胚胎干细胞、胚胎癌细胞中表达, 会随着它们的分化逐渐降低表达水平^[16], 我们之所以检测不到Sox2基因的表达, 有可能是因为研究中使用的细胞处于已经分化的状态。我们进一步比较两种细胞向脂肪和骨分化的能力, 结果发现, 在特定条件下, hADSCs和

hUMSCs均能向脂肪细胞和骨细胞分化。两种细胞诱导分化后的茜素红染色结果和表达成骨相关基因的水平均相近,表明它们的成骨分化能力相当。但值得注意的是,hADSCs较hUMSCs的成脂分化能力更强,油红O染色阳性的脂滴数量明显更多,表达成脂相关基因*LPL*的水平更高,这可能与MSCs的来源有关,已有研究报道,脂肪源性的间充质干细胞向脂肪细胞分化的能力更强^[14,17],可能与脂肪间充质干细胞高表达脂肪酸结合蛋白FABP4有关^[18],我们的细胞免疫荧光实验也表明,成脂诱导后的hADSCs表达FABP4较hUMSCs明显。

综上,我们发现,脂肪源性间充质干细胞较脐带间充质干细胞具有更强的体外增殖能力和成脂能力。但用于临床治疗的干细胞除了要考虑它们的生物学特性和分化潜能外,还应考虑其分离培养的难易程度、免疫原性、伦理道德限制等方面的因素,结合以往研究人员报道的实验结果,我们认为两种间充质干细胞都可以作为种子细胞用于组织工程研究。

参考文献 (References)

- [1] BROWN C, MCKEE C, BAKSHI S, et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(9): 1738-55.
- [2] HAN Y, LI X, ZHANG Y, et al. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine [J]. *Cells*, 2019, 8(8): E886.
- [3] ZHAO L, CHEN S, YANG P, et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 182.
- [4] FAHY N, ALINI M, STODDART MJ. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: implications for cartilage tissue engineering [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(1): 52-63.
- [5] KHAN S, MAFI P, MAFI R, et al. A systematic review of mesenchymal stem cells in spinal cord injury, intervertebral disc repair and spinal fusion [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(4): 316-23.
- [6] PELTZER J, ALETTI M, FRESCALINE N, et al. Mesenchymal stromal cells based therapy in systemic sclerosis: rational and challenges [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2013.
- [7] ZENG W, XIAO J, ZHENG G, et al. Antioxidant treatment enhances human mesenchymal stem cell anti-stress ability and therapeutic efficacy in an acute liver failure model [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11100.
- [8] 胡培, 王小莉, 李东升, 等. 人脐带间充质干细胞的分离培养与鉴定[J]. *生物技术通讯*(HU P, WANG X L, LI D S, et al. Isolation and identification of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Letters in Biotechnology*), 2014, 25(1): 87-90.
- [9] OHLSTEIN J F, STRONG A L, MCLACHLAN J A, et al. Bisphenol A enhances adipogenic differentiation of human adipose stromal/stem cells [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 53(3): 345-53.
- [10] KANG K S, HONG J M, KANG J A, et al. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions [J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e6.
- [11] PENG L, JIA Z, YIN X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(4): 761-73.
- [12] ERTAS G, URAL E, URAL D, et al. Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue [J]. *ScientificWorldJournal*, 2012, 2012: 105698.
- [13] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-7.
- [14] 刘超, 张丽君, 陶昊, 等. 基于细胞生物学方法比较5种不同组织来源间充质干细胞的特征[J]. *中国组织工程研究*(LIU C, ZHANG L J, TAO H, et al. Comparing biological characteristics of five kinds of mesenchymal stem cells [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2019, 23(33): 5334-40.
- [15] 张飞, 王武, 李慧娟, 等. 两种方法培养人胎盘间充质干细胞的生物特性比较[J]. *中国组织工程研究*(ZHANG F, WANG W, LI H J, et al. Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells isolated using two culture methods: a comparative study [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2018, 22(33): 5292-6.
- [16] FENG R, WEN J. Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development [J]. *Biol Chem*, 2015, 396(8): 883-91.
- [17] 王之发, 翁雁鸣, 刘彦普, 等. 兔骨髓干细胞和脂肪干细胞增殖和分化能力的比较[J]. *现代生物医学进展*(WANG Z F, WENG Y M, LIU Y P, et al. Comparison of proliferation and differentiation capacity of rabbit's mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2013, 13(11): 2026-30.
- [18] REBELATTO C K, AGUIAR A M, MORETTO M P, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue [J]. *Exp Biology Medicine* (Maywood), 2008, 233(7): 901-13.