

技术与方法

人脐带间充质干细胞分离鉴定及向角质形成细胞的诱导分化

魏奥 张东 刘乐 刘春霞 曹俊伟 孟凡华 张焱如*

(内蒙古农业大学生命科学院, 内蒙古自治区生物制造重点实验室, 呼和浩特 010018)

摘要 该研究从人脐带华通胶中获得了人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs), 通过基因鉴定和分化能力检测其纯度, 建立hUCMSCs系。检测结果表明, 获得的hUCMSCs表达转录因子SOX2、间充质干细胞表面标志物基因CD29、CD90和CD105, 不表达造血系细胞表面标志物基因CD34、CD45及人白细胞抗原基因HLA-DR。hUCMSCs可以向神经细胞和成骨细胞分化, 证明其多向分化潜能。P₃代hUCMSCs向角质细胞分化后, 免疫荧光染色鉴定结果为阳性, 实时荧光定量PCR检测表达角蛋白CK19基因, 随着诱导分化时间的增加而升高。该实验建立了hUCMSCs系和角质形成细胞的诱导分化体系, 为后续研究奠定基础。

关键词 人脐带间充质干细胞; 诱导分化; 角质形成细胞; 多向分化潜能

Isolation and Identification of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation into Keratinocytes

Wei Ao, Zhang Dong, Liu Le, Liu Chunxia, Cao Junwei, Meng Fanhua, Zhang Yanru*

(Inner Mongolia Agricultural University, College of Life Sciences, Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Biomanufacturing, Hohhot 010018, China)

Abstract In this study, human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) were divided from the umbilical cord matrix, purified by subculture, appraised by the expression of cell surface markers and differentiation abilities, and established hUCMSCs lines. The hUCMSCs expressed the transcription factor *SOX2*, mesenchymal stem cell surface marker genes *CD29*, *CD90* and *CD105*, and did not express hematopoietic cell surface marker genes *CD34*, *CD45* and human leukocyte antigen gene *HLA-DR*. They could be inducted to differentiate into neural cells, osteoblast and keratinocyte, demonstrating their multi-directional differentiation potential. After the keratinocyte induction, the differentiated cells expressed CK19 by immunostaining, and the expression of *CK19* gene was gradually increased with time by PCR. In summary, this investigation established the hUCMSC cell line, which could induce differentiation system of keratinocytes, and provided basis for subsequent experiments.

Keywords hUCMSCs; induced differentiation; keratinocytes; multi-directional differentiation potential

收稿日期: 2018-09-21 接受日期: 2019-01-16

内蒙古自治区自然科学基金面上项目(批准号: 2017MS0307)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4309245, E-mail: yanru1964@163.com

Received: September 21, 2018 Accepted: January 16, 2019

This work was supported by Inner Mongolia Autonomous Region Natural Fund Project (Grant No.2017MS0307)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4309245, E-mail: yanru1964@163.com

网络出版时间: 2019-05-09 11:14:30 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1114.002.html>

皮肤是人体的第一道防线, 容易受到各种疾病的伤害和损伤从而导致皮肤缺损。当皮肤发生大面积创伤, 植皮技术是最有效的医学手段。尽管植皮技术能够修复大面积的皮肤损伤, 但由于免疫排斥反应往往会导致移植手术的失败。随着组织工程学及再生医学的研究, 针对植皮技术的免疫排斥反应, 干细胞技术不仅可以弥补这一弊端, 而且可以在一定的条件下使其诱导成所需要的细胞的类型。角质形成细胞是皮肤屏障的主要组成成分, 为皮肤提供有利的物理屏障, 对皮肤缺损的治疗提供了新的手段。

人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)是一种从脐带华通胶中分离出来的新型干细胞, 最近几年来越来越多的学者开始致力于研究它在一些疾病中的治疗作用^[1-4]。hUCMSCs是具有高效增殖能力的专能干细胞, 移植后不具有致瘤性^[5]。另外在不使用免疫抑制剂的情况下, 异种移植hUCMSCs不会引起免疫反应^[6-7]。已经有研究证实, hUCMSCs具有向脂肪、软骨、成骨、神经元以及心肌细胞分化的能力^[8-10]。其独特的多潜能特性能在体外保留更长时间^[11], 但是关于其体外诱导分化为角质形成细胞研究尚少。本实验旨在探讨hUCMSCs分离培养以及定向诱导成角质形成细胞分化的可行性, 可望为后续临床研究角质形成细胞在皮肤损伤的治疗中提供稳定且充足的细胞来源。

1 材料与方法

1.1 材料

正常足月分娩经检测免疫四项均为阴性的健康男婴脐带取自内蒙古妇幼保健医院手术室, 本实验经产妇同意及内蒙古妇幼保健医院伦理委员会批准。脐带采集后, 保存在含1%双抗的磷酸盐缓冲液中, 6 h之内送达实验室并完成实验。

1.2 实验主要试剂及仪器

DMEM/F12(1:1)培养基购于Hyclone公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、地塞米松、L-抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、 β -巯基乙醇、全反式维甲酸、100 \times 胰岛素转铁蛋白硒(insulin-transferrin-selenium, ITS)、100 \times 亚油酸牛血清白蛋白(linoleic acid-bovine serum albumin, LA-BSA)、4%多聚甲醛溶液、茜素红S购于Sigma公司。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购于Gibco公司。尼

氏染色液购于南京森贝伽公司。兔抗人细胞角蛋白单克隆抗体CK19、FITC标记鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体PAN-CK、Hoechst 33342购于Abcam公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗、DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒购于上海碧云天生物技术公司。封闭用正常山羊血清工作液购于北京康为世纪公司。Trizol、反转录试剂盒、Ex TaqTM Version 2.0 plus dye、SYBR Premix Ex TaqTM II购于TaKaRa公司。PCR仪购于ABI公司。生物芯片分析仪购于Agilent公司。CO₂恒温培养箱购于Thermo公司。倒置显微镜购于Olympus公司。低速离心机购于Eppendorf公司。

1.3 细胞培养方法

无菌条件下在超净台中用眼科剪沿脐带静脉纵向剪开, 剔除动脉和静脉。将剩余的脐带组织剪成若干长2.0 cm的小段, 分离中间的胶状物(即华通胶)。将胶状物剪成0.5~1.0 cm的小段, 用手术刀在其表面划出数条交叉的划痕, 组织块不要割透。在T25的卡式瓶中加入1 mL完全培养液(DMEM/F12+10% FBS+0.1%青霉素和0.1%链霉素), 使培养液浸润瓶底。将华通胶刀口面向下放入培养瓶, 并用无菌镊子轻轻按压组织块, 使其与瓶底接触牢固。将卡氏瓶放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、100%湿度的培养箱中, 1 h后取出, 沿瓶壁缓缓加入2 mL完全培养液, 放入培养箱继续培养; 4 h后再缓缓加入2 mL完全培养液, 放入培养箱继续培养; 第2天继续缓缓加入2 mL完全培养液继续培养。每日观察, 在4天之内首次全量换液。每2~3天换液, 直到组织块周围析出的细胞达到70%汇合。将析出过细胞的组织块取出, 进行二次贴壁培养。待细胞长至70%~80%汇合时进行细胞消化、接种传代培养。

1.4 hUCMSCs干细胞转录因子及表面标志物的鉴定

取生长良好的P₃代细胞用Trizol法提取细胞总RNA, 依照试剂盒反转录成cDNA, 根据NCBI公布的人mRNA基因序列, 用Primer Premier 5.0软件设计引物。引物序列见表1。引物由上海生物工程股份有限公司合成。

1.5 hUCMSCs向神经细胞的诱导分化培养

全反式维甲酸诱导分化培养, 取hUCMSCs P₃代细胞以2 \times 10⁴细胞数接种到两个35 mm的培养皿中分成分化组和诱导组, 均用完全培养液培养至细胞60%汇合。分化组更换为神经诱导培养液(含

表1 hUCMSCs干细胞转录因子及表面标志物、成角质基因PCR引物序列

Table 1 PCR primers for expression of hUCMSCs stem cell transcription factor and surface markers, and keratin genes

基因 Genes	引物序列(5'→3') Sequences of primers (5'→3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	产物大小(bp) Product size (bp)	GenBank登录号 GenBank login ID
SOX2	F: GAC AGT TAC GCG CAC ATG AA R: CTG GAG TGG GAG GAA GAG GT	54	314	NM_003106.3
CD29	F: TAC TTG TGA AGC CAG CAA CG R: CCA ACA GTC GTC AAC ATC CTT	51	310	NM_002211.3
CD34	F: CAA GCC ACC AGA GCT ATT CC R: AAT TCG GTA TCA GCC ACC AC	55	313	NM_001025109.1
CD45	F: ACT CTT GGC ATT TGG CTT TG R: TCA GAC TCC AAG TTC CTC AGC	54	241	NM_001267798.1
CD90	F: GAA TAC CAG CAG TTC ACC CAT C R: ATG CCC TCA CAC TTG ACC A	56	276	NM_001311160.1
CD105	F: GCC AGC ATT GTC TCA CTT CA R: AAC TTG TCA CCC CTG TCC TCT	54	251	NM_000118.3
HLA-DR	F: TGA CCA ATC AGG CGA GTT TA R: GGG CTC TCT CAG TTC CAC AG	53	259	NM_019111.4
GAPDH	F: GAG AAG GCT GGG ACT CAC TT R: CTG ATG ATC TTG AGG CTG TTG	55	129	NM_001289746.1
CK19	F: GCC ACT ACT ACA CGA CCA TCC R: AAT CCA CCT CCA CAC TGA CC	55	333	NM_002276.4

DMEM/F12、10% FBS、0.1%青霉素、0.1%硫酸链霉素、 1.5×10^{-5} g/L EGF、 5×10^{-6} mol/L全反式维甲酸), 对照组继续更换为完全培养基培养。此时记为第1天, 每隔2天换1次液, 培养至10天, 鉴定。

1.6 hUCMSC向成骨细胞的诱导分化培养

取hUCMSCs P₃代细胞以 2×10^4 细胞数接种到两个35 mm的培养皿中, 成分化组和对照组待细胞生长至70%汇合时, 分化组更换为成骨诱导培养液(含DMEM/F12、10% FBS、0.1%青霉素、0.1%硫酸链霉素、 10^{-7} mol/L地塞米松、 10^{-2} mol/L β -甘油磷酸钠、 5×10^{-5} mol/L抗坏血酸)培养, 对照组继续更换为完全培养基培养。每隔2天换1次液, 培养至21天, 鉴定。

1.7 hUCMSCs向角质形成细胞的诱导分化培养

取hUCMSCs P₃代细胞, 以 6×10^4 细胞数接种到6孔板, 成分化组和对照组。均用完全培养液培养至细胞60%汇合。分化组更换为角质形成细胞诱导培养液(含45% ADSC-CM、30% MCDB201、20% DMEM/F12、5% FBS、0.1% PS、1×ITS、1×LA-BSA、 10^{-7} mol/L地塞米松、 5×10^{-6} mol/L全反式维甲酸、 5×10^{-4} g/L抗坏血酸和 5×10^{-6} g/L EGF)培养, 对照组继续更换为完全培养基培养此时记为第1天。培养至7、14、21天时, 进行免疫荧光染色检测及鉴

定, 并利用实时荧光定量PCR检测角质形成细胞特异基因CK19的相对表达量。

2 结果

2.1 hUCMSCs的体外分离培养

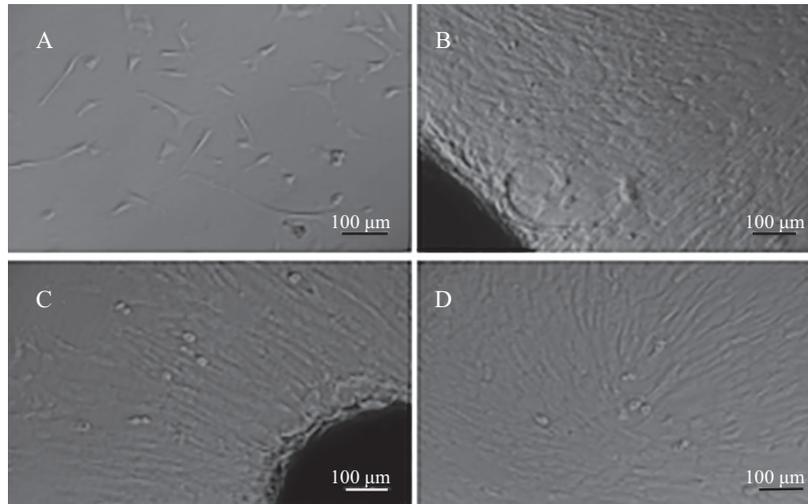
处理过的华通胶组织块培养第9天时, 组织块周围长出少量细胞(图1A), 培养到第15天时, 细胞达到80%汇合(图1B), 此时将组织块取出进行二次贴壁。第2天便有少量细胞从组织块周围长出(图1C), 5天后二次贴壁获得的细胞更纯且呈漩涡状生长(图1D)。

2.2 hUCMSCs干细胞转录因子基因的鉴定

经PCR检测, 所分离的细胞表达干细胞转录因子SOX2, 以及间充质干细胞表面标志物CD90和CD105及整合素受体CD29; 不表达造血系细胞表面标志物CD34和CD45及人白细胞抗原HLA-DR。初步确定分离得到的细胞为脐带间充质干细胞(图2)。

2.3 hUCMSCs向神经细胞、成骨细胞、角质形成细胞分化

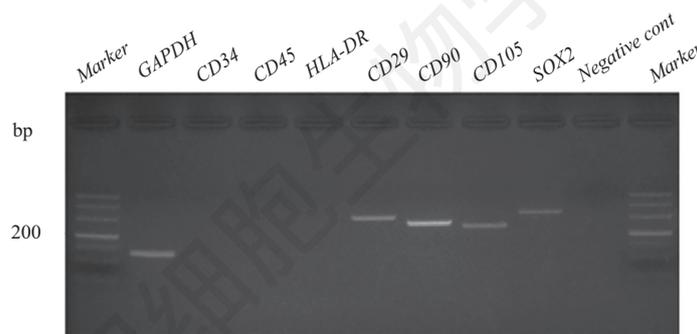
2.3.1 hUCMSCs向神经细胞分化 全反式维甲酸诱导hUCMSCs向神经细胞分化培养: 培养至第10天时, 分别对两组细胞进行尼氏染色, 分化组细胞形态变得细长、立体感很强, 可以观察到细胞周围出现



原代细胞培养9天时有少量细胞从组织块爬出(A), 15天时细胞达到大量汇合(B)。组织块二次贴壁2天时有细胞少量出现(C), 培养5天时细胞更纯且呈漩涡状生长(D)。

When the primary cells were cultured for 9 days, a small amount of cells climbed out of the tissue block (A), and the cells reached a large amount of confluence on day 15 (B). When the tissue block was attached again, a small amount of cells appeared on day 2 (C), and the cells were more pure and spirally growing on day 5 (D).

图1 hUCMSCs的原代培养
Fig.1 Primary culture of hUCMSCs



PCR检测结果显示, hUCMSCs细胞表面标志物CD90、CD105和CD29, 转录因子SOX2为阳性表达, 而CD34、CD45及HLA-DR为阴性表达。

The results of PCR showed that hUCMSCs expressed cell surface markers CD90, CD105, CD29, transcription factors SOX2, and did not express CD34, CD45 and HLA-DR.

图2 hUCMSCs特异基因表达
Fig.2 hUCMSCs cell-specific gene expression

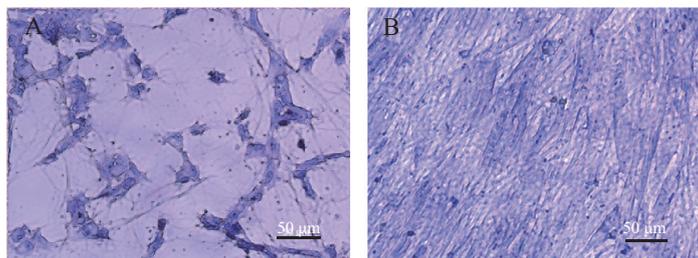
大量丝状纤维, 表现出神经细胞特有的形态, 而对照组细胞未见着色, 证明经过添加了全反式维甲酸的神经过诱导培养, hUCMSCs成功被诱导分化为神经细胞(图3)。

2.3.2 hUCMSCs向成骨细胞的诱导分化 培养到第21天时, 分别对两组细胞进行茜素红S染色鉴定, 分化组细胞出现被茜素红S染液染成红色的钙化结节, 而对照组细胞未见着色(图4), 说明通过成骨诱导培养后的细胞可以形成钙化基质, 具有成骨细胞表型。

2.3.3 hUCMSCs向角质形成细胞的诱导分化 随着诱导天数的增加, 分化组细胞由长梭形逐渐分化

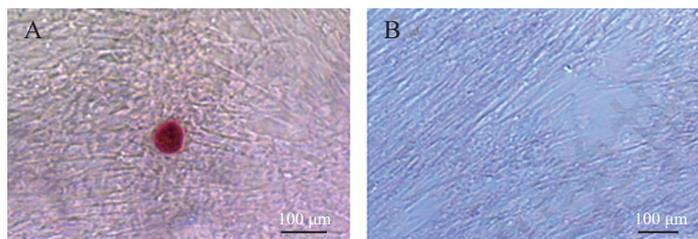
呈角质形成细胞特有的圆形、椭圆形、三角形和多角形态, 并逐渐聚集生长; 对照组细胞形态无明显变化, 仍保持长梭形涡旋状生长(图5A)。分别对培养的两组细胞, 选取3个时间点进行免疫荧光染色。结果显示, 分化组中有大量细胞的胞质中可以检测到广谱角蛋白(PAN-CK)的存在, 高倍镜下可辨别出绿色荧光来自细胞的胞质(图5B)。而对照组中, 仅有细胞核被Hoechst 33342染料染成蓝色。这证明, 经过角质形成细胞诱导分化培养, hUCMSCs逐渐分化为可分泌细胞角蛋白的上皮细胞。

分化组中CK19的相对表达量与对照组相比, 随着培养时间的增加而增加。这证明, hUCMSCs经过



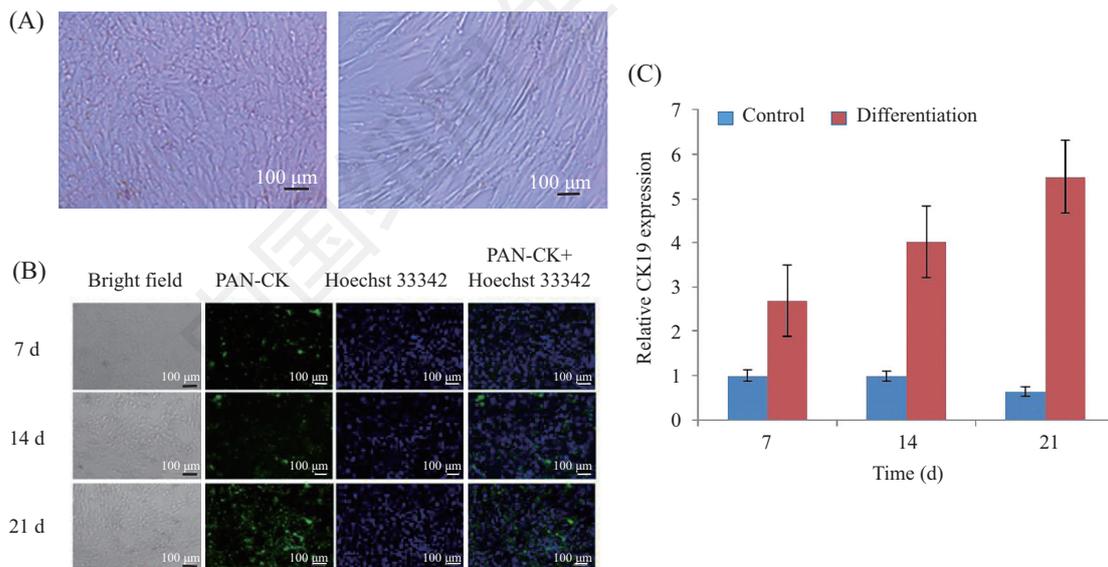
P₃ hUCMSCs向神经细胞诱导培养10天后, 进行尼氏染色出现大量丝状纤维(A), 而对照组(B)未见着色。
P₃ hUCMSCs were induced to neural cells for 10 day, and a large number of filamentous fibers were stained by Nissl staining (A), while no staining was observed in the control group (B).

图3 hUCMSCs向神经细胞诱导分化
Fig.3 Neural induced differentiation of hUCMSCs



P₃ hUCMSCs成骨诱导培养21天后, 进行茜素红染色显示钙化结节(A), 对照组未见着色(B)。
P₃ hUCMSCs were induced to osteoblast for 21 days, alizarin red staining showed calcified nodules (A), while no staining in the control group (B).

图4 hUCMSCs向成骨细胞诱导分化
Fig.4 Osteoblast induced differentiation of hUCMSCs



A: P₃ hUCMSCs向角质细胞培养随诱导天数的增加, 细胞由长梭形变成角质形成细胞特有的多边形(左)对照组仍保持长梭形(右)。B: 从hUCMSCs向角质诱导培养的第7、14、21天进行免疫荧光染色, 结果表明分化组中有大量细胞的胞质中可以检测到PAN-CK的存在, 高倍镜下可辨别出绿色荧光来自细胞的胞质。而对照组中, 仅有细胞核被Hoechst 33342染料染成蓝色。C: 在hUCMSCs向角质诱导培养的第7、14、21天提取RNA, 以定量RT-PCR检测CK19表达情况, 结果表明分化组中CK19的表达量与对照组相比, 随着培养时间的增加而增加。

A: P₃ hUCMSCs were induced into keratinocytes. The cells changed from long fusiform to keratinocyte-specific polygons with the increase of induction days (LEFT). The control group still maintained a long fusiform shape (RIGHT). B: immunofluorescence staining was performed on day 7, 14 and 21. PAN-CK could be detected in the cytoplasm of a large number of cells in the differentiation group, and green fluorescence could be discerned under high magnification. The cytoplasm from the cells. In the control group, only the nuclei were stained blue by Hoechst 33342 dye. C: RNA extracted from hUCMSCs to keratin-induced culture on day 7, 14 and 21, was applied for testing the relative expression of CK19 with RT-PCR. The expression level of CK19 in the differentiation group increased as the culture time increased compared with the control group.

图5 hUCMSCs向角质形成细胞诱导分化
Fig.5 Keratinocyte induced differentiation of hUCMSCs

诱导培养,成功分化为角质形成细胞,并大量表达其特异性基因CK19(图5C)。

3 讨论

由烧伤、急性创伤、某些疾病导致的皮肤缺损,尤其是大面积烧伤,一直以自体皮移植作为首选方案,而自体皮不足是临床遇到的主要问题。随着细胞培养技术和组织工程的出现,使许多脏器或组织体外重建成为可能^[12]。从脐带华通胶中能分离培养出大量的间充质干细胞,多次传代后仍保持稳定的活性及分化能力,这使得脐带华通胶间充质干细胞成为细胞替代治疗的理想种子细胞^[13]。人正常皮肤的表皮细胞包括角质形成细胞、黑素细胞、Langerhans细胞、Markel细胞,而角质形成细胞占表皮细胞的绝大部分^[14]。在人表皮中不同分化时期的角质形成细胞表达不同的角蛋白,CK19是分子量为40 kDa的一种角蛋白,是角蛋白家族中最小的成员,有研究表明,CK19主要在表皮基底层细胞中表达,且在体外培养时有一定的慢周期和强增殖能力,具有一定表皮干细胞特性^[15]。所以本实验中选择具有相对特异性的CK19作为体外培养角质形成细胞的标记基因。PAN-CK由外胚层来源的上皮细胞分泌而来,免疫荧光染色显示,实验组中PAN-CK表达量逐日增多。实时荧光定量PCR检测随着诱导时间的增加,实验组细胞呈现角质形成细胞一般生长规律的细胞,进一步证明这些由hUCMSCs分化而来的细胞是角质形成细胞。

脂肪间充质干细胞可分泌多种细胞生长因子,在角质形成细胞诱导分化培养基中添加本实验制备的蒙古羊脂肪间充质干细胞条件培养基(ADSC-CM),为角质形成细胞诱导分化提供了多种安全、温和的生长因子。其他细胞诱导时只需定期更换新鲜的诱导培养液即可,细胞长满不会出现大片死亡的现象。但是在hUCMSCs向角质形成细胞诱导过程中发现,当细胞长满皿底后就全部成片脱落死亡;对照组中的hUCMSCs仅在长满皿底后部分脱落,而且可以再次贴壁生长。出现这种现象的原因可能是角质形成细胞在发生接触抑制后,启动了类似皮肤生理过程的细胞凋亡程序从而导致细胞大片死亡。通过对诱导组的细胞在生长对数期进行传代,并降低接种密度以延长生长和传代时间来解决这个问题。在诱导添加剂中加入全反式维甲酸可以促进

干细胞向外胚层细胞分化^[16],在临床应用中全反式维甲酸多用于皮肤病的治疗,因而本实验选择它作为角质形成细胞诱导添加剂。在向神经细胞诱导时加入全反式维甲酸能够明显增加神经细胞的数量,相对于已报道添加 β -巯基乙醇诱导hUCMSCs向神经细胞分化的方法而言^[17],此细胞培养过程较为温和,而且随着培养时间的增加细胞没有出现大量死亡的现象。

由于细胞分化是一个复杂的生物学变化,所以目前尚不清楚它的关键调控因子或信号通路。通过细胞形态学观察、蛋白质水平的免疫荧光染色以及分子水平的实时荧光定量PCR的检测,结果显示实验组与对照组在细胞形态、蛋白表达量及基因表达量有明显的不同,可确定hUCMSCs经诱导后成功分化为角质形成细胞。为后续皮肤大面积损伤的临床应用奠定基础。

4 结论

我们通过实验摸索,成功从人脐带华通胶获得间充质干细胞,并经过阅读文献分析对比确定了向角质形成细胞安全有效的诱导分化培养基,成功将hUCMSCs诱导成为角质形成细胞,为后续的皮肤损伤修复、异体移植等医学难题提供了前期的研究基础和一定的实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23(2): 220-9.
- 2 Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Sung MS. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: potential therapeutic application for parkinsonism. *Stem Cells* 2006; 24(1): 115-24.
- 3 Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24(3): 781-92.
- 4 Troyer DL, Weiss ML. Concise review: wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26(3): 591-9.
- 5 Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human wharton's jelly. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(6): 708-18.
- 6 Li G, Zhang XA, Wang H, Wang X, Meng C, Chan C, *et al.* Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta:

- implication in the migration. *Proteomics* 2009; 9(1): 20-30.
- 7 Bieback K, Kern S, Kocaömer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 2008; 18(1 Suppl): S71-6.
- 8 Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, *et al.* CD105⁺ cells from Wharton's jelly show *in vitro* and *in vivo* myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* 2006; 18(6): 1089-96.
- 9 Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay G, Demiralp D, *et al.* Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys. *Stem Cells* 2007; 25(2): 319-31.
- 10 Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, *et al.* The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2017-24.
- 11 Fong CY, Chak LL, Biswas A, Tan JH, Gauthaman K, Chan WK, *et al.* Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 1-16.
- 12 Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; 44 Suppl 1: 60-9.
- 13 Nerem RM. Cellular engineering. *Ann Biomed Eng* 1991; 19(5): 529-45.
- 14 Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, *et al.* Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2015; 17(1): 18-24.
- 15 Michel M, Török N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, *et al.* Keratin 19 as biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*, keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell science* 1996; 109: 107.
- 16 Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(1): 142-50.
- 17 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.

中国细胞生物学杂志