

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.010

猫骨髓间充质干细胞的体外分离培养、纯化、鉴定*

李俊义¹ 徐华林¹ 万京明¹ 姜彦² 李娜²

(1 山东省莱芜市人民医院耳鼻咽喉科 山东 莱芜 271100; 2 青岛大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科 山东 青岛 266003)

摘要 目的:分离、培养、纯化家猫的骨髓间充质干细胞,并对获得细胞的表面标志物进行鉴定,为进一步利用骨髓间充质干细胞的细胞移植实验奠定基础。**方法:**采用全骨髓贴壁法体外分离、培养、纯化家猫骨髓间充质干细胞,通过多次更换培养液获得较纯化的骨髓间充质干细胞,倒置相差显微镜下对细胞形态进行观察;根据第1、3、5、7、9代细胞的镜下增殖情况绘制出生长曲线;通过流式细胞仪检测细胞表面标志抗原 CD34、CD44 和 CD90 的表达率。**结果:**在倒置相差显微镜下观察,分离培养的骨髓间充质干细胞贴壁呈梭形或纺锤形;原代细胞生长丛集成片,5~7 d 达到融合,进行传代;培养到第三代以后,细胞出现相对均匀的梭形扁平外观,迅速增殖的细胞呈涡流样排列;第3、5代骨髓间充质干细胞增殖能力强于第7、9代;采用流式细胞仪分析结果显示细胞的 CD34、CD44 和 CD90 阳性率分别为 17.5%、97.9%和 91%,这与骨髓间充质干细胞表面抗原的表达一致。**结论:**分离培养的细胞具有骨髓间充质干细胞特性,成分相对单一,第3、5代细胞纯度高,增殖能力强,适用于进一步的实验研究。

关键词:家猫;骨髓间充质干细胞;分离培养;鉴定

中图分类号:S829.3;R-33;Q813;R331.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)01-48-05

Isolation, Cultivation and Identification of Cat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *in Vitro**

LI Jun-yi¹, XU Hua-lin¹, WAN Jing-ming¹, JIANG Yan², LI Na²

(1 Department of otorhinolaryngology, people's hospital of Laiwu city, Laiwu, Shandong, 271100, China; 2 Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method to isolate and culture cat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* and analyze their phenotypical properties after culture expansion as well as preliminary identification, so as to establish foundation for the further study of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation. **Methods:** Bone marrow mesenchymal stem cells from cats were isolated, cultured and purified by the whole bone marrow adherence method. The bone marrow mesenchymal stem cells were purified by discarding suspended cells through exchanging medium. The morphology of cultured bone marrow mesenchymal stem cells was observed under inverted phase contrast microscope. The growth curve of cell proliferation was obtained based on the observation of the proliferation status of 1st, 3rd, 5th, 7th, and 9th generation. The expressions of CD34 and CD44 and CD90 of cells were analyzed by using flow cytometry in order to identify bone marrow mesenchymal stem cells. **Results:** Bone marrow mesenchymal stem cells had spindle shape under inverted phase contrast microscope. The primary cells were confluent in single layer after being plated for 5-7 days, and then the cells were passaged. After extending to the third passage, cells appeared relatively uniform appearance with fusiform or flattened, which were rapid proliferated as arranged with swirl observed under inverted phase contrast microscope. Bone marrow mesenchymal stem cells of 3rd, 5th generation proliferated more rapidly than those of 7th and 9th generation. Flow cytometric analysis demonstrated the positive rate of CD34, CD44, CD90 were 17.5%, 97.9%, 91%, respectively, which was consistent with the surface antigen of bone marrow mesenchymal stem cells. **Conclusion:** Purified bone marrow mesenchymal stem cells can be obtained via this protocol. Cells of 3rd, 5th generation with high proliferation are fit to the further experiment.

Key words: Cat; Mesenchymal stem cells; Isolation and cultivation; Identification

Chinese Library Classification(CLC): S829.3; R-33; Q813; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-48-05

前言

21 世纪是生命科学的时代,人们期望利用干细胞进行能动性改造生物世界、治疗或缓解影响人类健康的一些疑难顽疾^[1-5]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,

BMSCs)主要存在于骨髓基质中,是具有自我复制能力和多向分化潜能的一类干细胞^[6-10],在骨髓中含量显著低于造血干细胞,含量稀少,生物体内的 BMSCs 数量很难满足于实验研究及临床治疗的需要。因此,探索一种适宜的体外分离培养生物特性稳定、活力强、纯度高的 BMSCs 实验方法对于进一步利用

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170895);山东省自然科学基金项目(ZR2009CM053)

作者简介:李俊义,男,医学博士,副主任医师,主要研究方向:鼻腔、鼻窦、鼻咽底疾病的内镜手术及微创治疗,E-mail:lijyent@163.com

(收稿日期:2017-06-11 接受日期:2017-07-06)

BMSCs 进行实验研究及临床治疗研究显得至关重要。本实验应用全骨髓贴壁培养法建立了一种快速、经济、简便、高效的原始 BMSCs 培养纯化扩增方法,并观察了其生物学特性,旨在为进一步探讨其作为种子细胞应用于进一步的细胞移植实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验仪器、试剂、实验动物

流式细胞仪(美国 Coulter),PBS 磷酸盐缓冲液(干粉)(青岛大学附属医院),L-DMEM 培养液(美国 GIBCO),胰蛋白酶(美国 Sigma),胎牛血清(FBS)(美国 Hyclon),封闭用正常山羊血清(武汉博士德公司),FITC 标记的羊抗鼠 IgG(美国 BELLANCOM),生物素标记山羊抗兔 IgG 二抗(美国 BELLANCOM),SABC 试剂盒(武汉博士德公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司),乙二胺四乙酸(EDTA)(美国 GIBCO)。家猫由青岛市实验动物和动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞的分离、接种、培养 家猫 BMSCs 的培养采用全骨髓细胞贴壁培养方法。选择成年家猫 2 只,雌雄不限,体重 1.5~2.0 kg,由青岛动物实验中心提供,颈椎脱臼法处死。将家猫双下肢浸入盛有体积分数 75%酒精的容器中浸泡消毒 10 min,剥除皮肤,从髌关节处剪下双下肢,浸泡于盛有青链霉素双抗的磷酸盐缓冲液的烧杯中。然后转移到微电脑净化工作台操作中,将附着在胫骨、股骨上的肌肉、结缔组织去除干净,磷酸盐缓冲液冲洗胫骨、股骨 3 次,用消毒剪刀剪掉胫骨、股骨的两侧干骺端,暴露骨髓腔,用注射器吸取含有青链霉素双抗混合液及体积分数为 15%小牛血清的 L-DMEM 培养液冲洗骨髓腔,冲出骨髓组织至无菌培养皿中,将骨髓腔冲洗液用吸管反复轻轻吹打混匀成单细胞悬液,收集到无菌离心管,室温静置 15 min,2000 r/min 离心 25 min,去除上清液。然后将悬液无菌条件下接种于 25 mL 细胞培养瓶中,置于 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 恒温细胞培养箱内孵育。48h 后半量换液,以后每 2-3 d 换液一次。换液后于显微镜下观察细胞生长情况及形态特征。

1.2.2 骨髓间充质干细胞的纯化、传代、扩增 收集到的细胞中除种子细胞骨髓间充质干细胞外,还包含有白细胞、红细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞等非种子细胞,这些非种子细胞会影响种子细胞的生长。白细胞、红细胞、淋巴细胞等造血系干细胞在培养液中呈颗粒状悬浮生长特点(图 1a),可以通过每次换液,去除掉这些非种子细胞。贴壁细胞主要是种子细胞,但也可能混有少部分单核细胞或巨噬细胞。倒置显微镜下观察培养的细胞,待细胞密度生长融合到 80%时开始细胞传代(图 1b)。轻轻摇晃培养瓶,吸除全部培养液,以去除悬浮生长的杂质细胞。以 37℃ 预热的 PBS 缓冲液轻轻冲洗吹打细胞数次,再次去除剩余的血清成分和贴壁不牢的可疑杂质细胞。使用 0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞 1-2 min,在倒置相差显微镜下观察消化情况,融合的细胞发生分离及皱缩,细胞变为单个的圆盘状时,加入等量的含有血清的培养液终止消化。作为种子细胞的骨髓间充质干细胞容易消化后从培养瓶底部分离,骨髓中的单核细胞及淋巴细胞贴壁牢固不易消化,不易从培养瓶底部分离,更

换培养瓶以清除培养细胞中的巨噬细胞、单核细胞等粘附能力强的非种子细胞。这样通过换液和消化后使种子细胞得以纯化(图 1c)。纯化后的骨髓间充质干细胞用吸管吹打均匀制成单细胞悬液(图 1d),将细胞按 1:3 比例分瓶接种于新的 25 mL 细胞培养瓶中,加入适量的培养液,置于 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 恒温细胞培养箱内孵育培养传代。第一次传代标记为 P1 (Passage 1),1 d 后接种的部分细胞开始贴壁(图 1e),贴壁细胞呈长条状或多边形,以后每 2 d 更换一次培养液,待细胞再次增殖融合铺满瓶底时(图 1f),再按照上述方法进行传代,标记为 P2,以后以此类推,重复以上操作,经多次传代扩增培养,使 BMSCs 逐渐得到纯化和扩增。

1.2.3 骨髓间充质干细胞的生长曲线描绘 分别取 P1、P3、P5、P7、P9 生长状态良好 BMSCs,微电脑净化工作台使用 0.25%胰蛋白酶消化后加入 L-DMEM 培养液,制成单细胞悬液,调整细胞密度至 1.0×10⁷/L,分别接种于 5 个已标记代数的 24 孔培养板中,每孔细胞悬液 1.0 mL。每天每板分别取 3 孔培养细胞消化,制成均匀的单细胞悬液,倒置相差显微镜下细胞计数板行细胞计数,计算细胞数均值,连续计数 9 d(消化 8 次)。以细胞数均值为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线。

1.2.4 骨髓间充质干细胞的鉴定 采用流式细胞仪分析鉴定家猫的第三代骨髓间充质干细胞表面标志物 CD34、CD44 和 CD90。

1.2.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件分析,实验数据资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以重复测量的方差分析及单因素方差分析进行统计学处理,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的原代培养及传代

全骨髓贴壁法体外培养的 BMSCs 在培养瓶接种培养 48h 后,在光学显微镜下观察,细胞逐渐贴壁,细胞呈多边形或梭形,贴壁细胞随着培养时间增长逐渐繁殖分散,贴壁细胞体逐渐增大,可出现清晰的纤维状组织。吸除更换培养液后,悬浮生长的杂质细胞明显减少。培养至 4-5 d,细胞形态变得较为均匀一致呈细长梭形或纺锤样,细胞逐渐丛集成片,呈菊花状、漩涡状或指纹状(图 2a,b)。培养至 5-7 d,培养的 BMSCs 达到 80%-90%融合,细胞生长密集,界限不清,这时可以传代。这样经过不断换液、传代、纯化后,非种子细胞逐渐明显减少,种子细胞 BMSCs 得到了进一步的纯化及扩增,贴壁生长的细胞胞核明显,核仁清晰,形态变得更加均匀一致,在倒置相差荧光显微镜下观察迅速增殖的细胞呈涡流样或纤维样排列(图 2c,d)。

2.2 骨髓间充质干细胞的生长曲线

通过对 P1、P3、P5、P7、P9 五代 BMSCs 细胞计数,绘制的生长曲线符合 Logistic 生长曲线(图 3)。传代后的第 1~2 天 BMSCs 细胞扩增较为缓慢,为生长滞缓期。传代后的第 3~6 天 BMSCs 细胞扩增迅速,是 BMSCs 的快速增长期。传代后的第 7~8 天 BMSCs 细胞扩增比较平缓,进入平台期。传代后的第 9 天 BMSCs 细胞数量不增反减,但减少数量不大。随传代次数不断增加,BMSCs 的增殖能力有开始减弱趋势。P3、P5 代 BMSCs 增殖能力最强,P1 次之,P7、P9 代 BMSCs 和 P3、P5 代 BMSCs 增殖能力相比有所减弱。

各组细胞数据分析:P1、P3、P5、P7、P9 五组 BMSCs 细胞在各时间点比较差异有显著性意义($P=0.02 < 0.05$),见表 1。

2.3 骨髓间充质干细胞的鉴定

采用流式细胞仪分析鉴定家猫的第三代骨髓间充质干

胞表面标志物 CD34、CD44 和 CD90。鉴定结果表明培养细胞的 CD34、CD44 和 CD90 阳性率分别为 17.5%、97.9%和 91%，这与骨髓间充质干细胞相对特异性标志表达一致，这就证明了培养的细胞就是骨髓间充质干细胞。

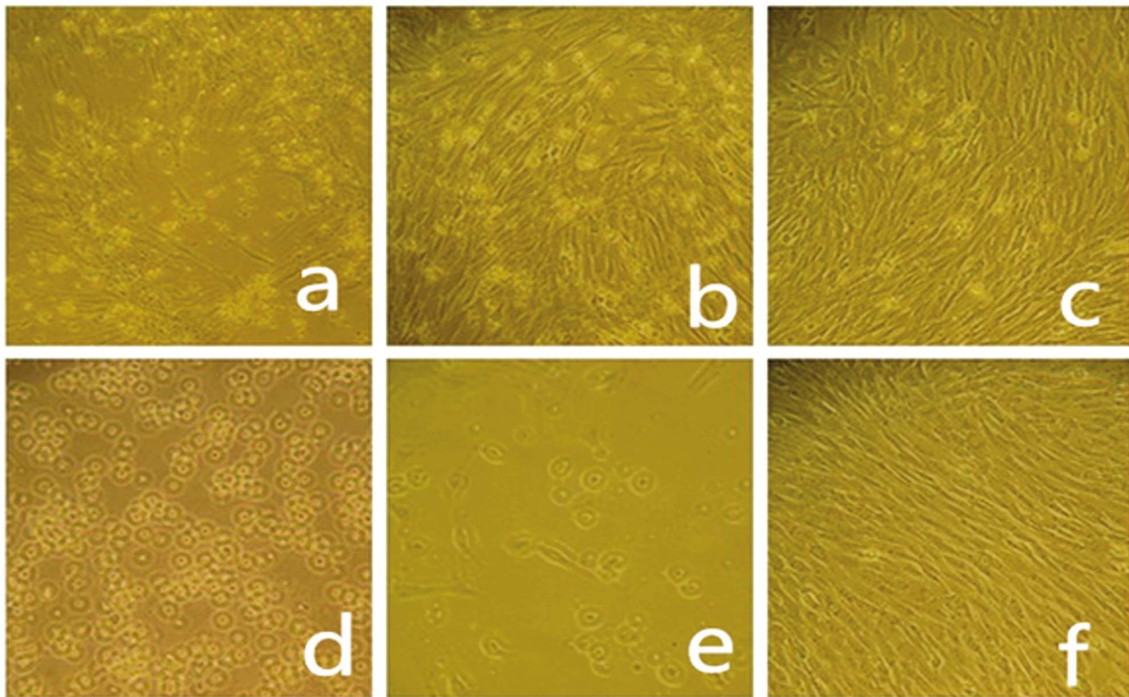


图 1 纯化、传代、扩增过程中的 BMSCs(200×)。a:造血干细胞在培养液中呈颗粒状悬浮生长;b:生长融合到瓶底 80%左右的 BMSCs;c:纯化后的 BMSCs;d:吹打均匀的 BMSCs 单细胞悬液;e:1d 后接种的部分 BMSCs 开始贴壁;f:再次增殖融合铺满瓶底的 BMSCs。

Fig.1 BMSCs during purification, passage, and amplification. (200×). a: Hematopoietic stem cells were suspended in granules in culture medium; b: BMSCs was cultured and fused to 80% of culture flasks; c: Purified BMSCs; d: BMSCs was triturated into single cell suspension; e: Partial inoculation of BMSCs began to adhere to the wall after 1 day; f: BMSCs again proliferated confluent in culture flasks.

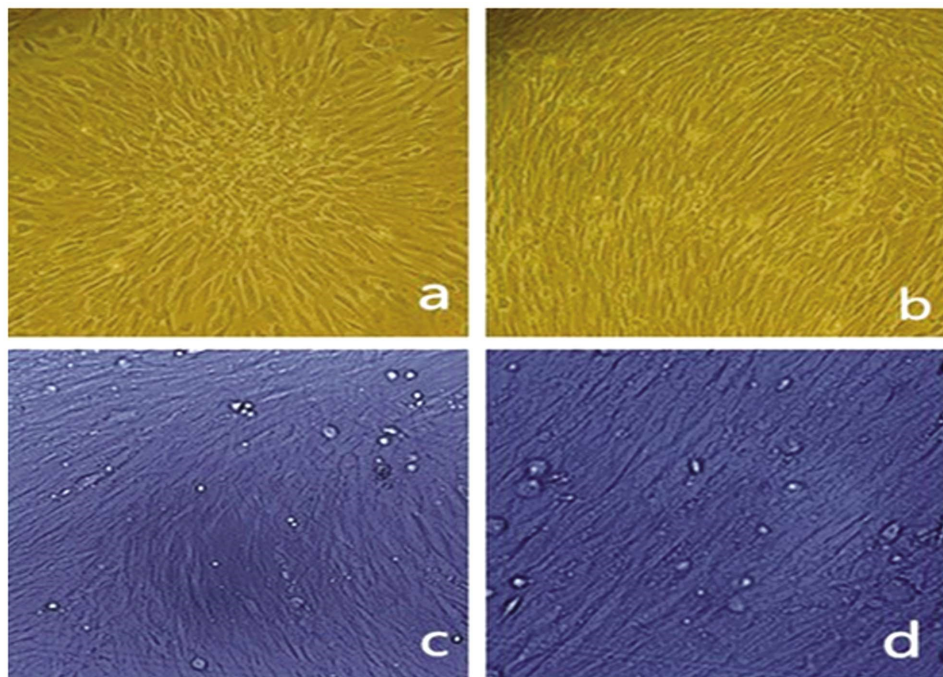


图 2 a、b 为原代 BMSCs;c、d 为传代扩增倒置相差荧光显微镜下的 BMSCs(200×)。a:菊花状生长的 BMSCs;b:指纹状生长的 BMSCs;c:倒置相差荧光显微镜下观察迅速增殖的 BMSCs 呈涡流样排列;d:倒置相差荧光显微镜下观察迅速增殖的 BMSCs 呈纤维样排列。

Fig.2 a and b were primary BMSCs; c and d were passaged and amplified BMSCs under inverted phase difference fluorescence microscopy. (200×). a: Cultured BMSCs like chrysanthemum; b: Cultured BMSCs like a fingerprint; c: The rapidly proliferating BMSCs were arranged in a vortex under inverted phase difference fluorescence microscopy; d: The rapidly proliferating BMSCs showed a fibrillar arrangement under inverted phase difference fluorescence microscopy.

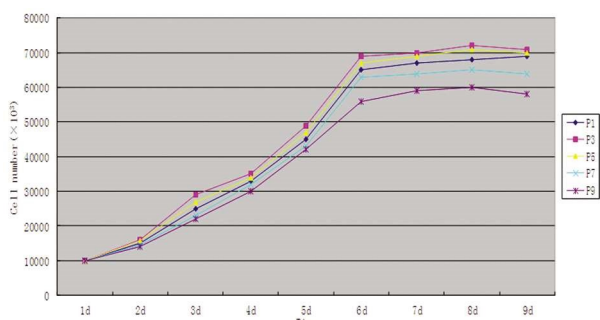


图3 P1、P3、P5、P7、P9 五代 BMSCs 的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of P1, P3, P5, P7 and P9 BMSCs

表 1 P1、P3、P5、P7、P9 五组 BMSCs 细胞在各时间点计数

Table 1 Number of P1, P3, P5, P7 and P9 BMSCs at each time point($\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^6$)

Group	Time(d)									
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	
P1	10.0± 0.5	15.0± 0.5	25.0± 0.9	33.0± 0.5	45.0± 0.0	65.0± 0.8	67.0± 0.5	68.0± 0.9	69.0± 0.0	
P3	10.5± 0.0	16.0± 0.7	29.0± 0.5	35.5± 0.8	49.0± 0.3	69.0± 0.5	70.0± 0.8	72.0± 0.0	71.0± 0.8	
P5	10.0± 0.5	15.8± 0.2	27.0± 0.5	34.0± 0.0	47.5± 0.5	67.0± 0.2	69.5± 0.5	71.0± 0.5	70.0± 0.5	
P7	10.0± 0.5	14.5± 0.5	23.0± 0.0	32.5± 0.5	43.0± 0.5	63.0± 0.5	64.0± 0.0	65.0± 0.5	64.0± 0.0	
P9	10.0± 0.3	14.0± 0.9	22.0± 0.0	30.5± 0.0	42.0± 0.9	56.0± 0.7	59.0± 0.6	60.5± 0.3	58.0± 0.7	

既往对鼠和兔间充质干细胞研究较多^[13,24-27]，而对家猫 BMSCs 研究很少。为了得到基因工程、组织工程和细胞移植需要的单一细胞，人们尝试用各种方法分离、纯化 BMSCs，但到目前为止，BMSCs 体外分离培养、纯化扩增及细胞鉴定尚缺乏严格、统一的标准^[28]。目前较为常用的 BMSCs 分离方法主要有：渗透压筛选法、免疫磁珠法、特制培养板筛选法、流式细胞分离法、密度梯度离心法和全骨髓贴壁法。有报道不同分离方法获得的 BMSCs 的生物学特性没有实质性的差别。全骨髓贴壁接种法操作简便、对细胞损伤小、目前应用最为广泛^[29]，故在实验中我们采用了操作过程简单、实用的全骨髓贴壁培养法。该方法采用 BMSCs 在培养瓶中黏附贴壁生长的特点对其进行分离，这种方法分离的 BMSCs 生长均匀，对细胞干扰小，增殖能力强，细胞活性比较高，一般原代细胞首次融合仅需 5~7 d。由于 BMSCs 的生存生长过程中需要与其伴生的其他非种子细胞分泌某些营养因子，并且非种子细胞含有的促黏附物质及若干生长因子亦可能促进了 BMSCs 的贴壁生长，因此该方法在很大程度上模拟了体内骨髓间充质干细胞的生长微环境，有利于 BMSCs 的培养。密度梯度离心法所获细胞较全骨髓法所获细胞贴壁要慢，分离液及长时间的操作容易损伤种子细胞^[30]，并且在离心过程中会除去 BMSCs 生长所需要的生长因子及黏附分子，以上因素均不利于 BMSCs 的培养。通过免疫磁珠法和流式细胞分离法获得的 BMSCs 纯度较高，但会影响细胞的活性，严重时可使细胞完全失活，且成本较高，操作复杂。

采用全骨髓贴壁培养法对猫 BMSCs 进行培养时，从骨髓腔冲洗收集到的细胞中除种子细胞 BMSCs 外，还包含有非种子细胞。因此，早期培养的细胞是一个含有多种非种子细胞的异质细胞群，这些杂质细胞也是体外培养中最常见的污染细胞。为了得到单一种子细胞，在实验中，通过间断换液去除在培养液中悬浮生长的白细胞、红细胞、淋巴细胞、造血干细胞。对

3 讨论

BMSCs 属于未分化的前体干细胞，其细胞表型分化尚不成熟，可塑性较强，具有作为种子细胞的良好先决条件，是细胞移植、组织工程和基因工程中种子细胞的最佳选择之一^[11-13]。BMSCs 可以从治疗目标体内获得，因此不涉及医学伦理道德方面的问题，且在进行自体或异体移植时一般不会出现免疫排斥反应^[14,15]，同源性的 BMSCs 移植方式及治疗途径趋于多样化，其治疗修复受损伤的组织及器官亦趋于多样化^[16-23]。如何体外分离、培养、纯化并使其快速高效扩增是目前临床推广和应用和组织工程技术应用的前提。

于贴壁生长的杂质细胞成纤维细胞(骨髓中的单核细胞及淋巴细胞)，可利用成纤维细胞贴壁牢固粘附能力强、不易消化、不易从培养瓶底部分离的特点，通过控制消化时间、更换培养瓶及传代以清除培养细胞中的成纤维细胞。通过采取这些实验措施使家猫 BMSCs 逐渐得以纯化。本实验采用全骨髓贴壁法对猫 BMSCs 进行体外分离培养，既能达到实验所需种子细胞的纯度，又避免影响种子细胞的活性，而且操作相对简便，成本相对较低。经过 3~4 代传代后即可得到纯度较高的 BMSCs，其细胞形态学特征呈细长梭形或纺锤样，细胞丛集成片生长，呈涡流状、菊花状或指纹状形态鲜明的细胞群落。我们看到骨髓间充质干细胞作为干细胞家族中的一员，具备自我克隆复制增殖生长能力，菊花状、涡流状或指纹状的中心就是克隆扩增最旺盛的区域。

通过对骨髓间充质干细胞的生长曲线的绘制，我们观察到 P3、P5 代 BMSCs 增殖能力最强，P1 代次之，P7、P9 代和 P3、P5 代 BMSCs 增殖能力相比明显减弱。了解这些特点将为我们下一阶段的实验打下基础，后期实验我们所选用的都是增殖能力强、扩增迅速的 P3、P5 代细胞，P3、P5 代 BMSCs 更适合用于实验研究。

本实验中，家猫 BMSCs 的培养采用全骨髓细胞贴壁培养法，种子细胞的取材来源于家猫的股骨骨髓，组织含量较少，但最终成功地培养出纯度较高的 BMSCs。通过形态学观察以及细胞表面标志物检测，结果显示本实验培养扩增的细胞符合 BMSCs 的形态及细胞表面标志物特征，得到的种子细胞为 BMSCs。此方法分离 BMSCs 操作相对简便，成本相对较低，不易发生污染，是一个较好的分离方法，为下一步应用 BMSCs 进行实验研究打好了基础，也为 BMSCs 在细胞生物工程中的培养扩增应用提供了一定的实验依据。

参考文献(References)

- [1] Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015)[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 82
- [2] De Becker A, Van Riet I. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Hematology: From Laboratory to Clinic and Back Again [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(15): 1713-1729
- [3] 王煜, 闵祥辉, 张勤, 等. 骨髓间充质干细胞与施万细胞联合移植对大鼠周围神经损伤端侧吻合的修复效果研究[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 1(32): 6206-6209
Wang Yu, Min Xiang-hui, Zhang Qin, et al. Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Combined with Schwann Cells Transplantation on the End-to-side Anastomosis of Peripheral Nerve Injury in Rats[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 1(32): 6206-6209
- [4] 冯焯军, 陈明. 骨髓间充质干细胞在神经修复中的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2016, 11(5): 426-428
Feng Ye-jun, Chen Ming. Research progress of bone marrow mesenchymal stem cells in neural repair [J]. *Neural Injury And Functional Reconstruction*, 2016, 11(5): 426-428
- [5] Jo H, Jung M, See DJ, et al. The effect of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation for restoration of olfactory disorder[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467: 395-399
- [6] 荣为为, 韩明子, 金世柱, 等. 骨髓间充质干细胞在组织工程研究中的应用新进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(5): 982-984+992
Rong Wei-wei, Han Ming-zi, Jin Shi-zhu, et al. New Application of Mesenchymal Stem Cells in the Field of Tissue-engineering Scientific Research [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17 (5): 982-984 +992
- [7] Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Mesenchymal stem cell: history, biology and clinical application [J]. *Rev Invest Clin*, 2006, 58 (5): 498-511
- [8] Ladage D, Brixius K, Steingen C, et al. Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms [J]. *Endothelium*, 2007, 14(2): 53-63
- [9] Alexanian AR, Maiman DJ, Kurpad SN, et al. In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 1231-1252
- [10] Dezawa M. Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases [J]. *Med Mol Morphol*, 2008, 41(1): 14-19
- [11] Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004, 5: 209-214
- [12] Tuan R S, Boland G, Tull R. Adult mesenchymal stem cells and cell based tissue engineering[J]. *J Arthritis Res Ther*, 2003, 1L: 32-45
- [13] 李倩晓, 那荣妹, 刘百亭, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞原代培养条件的选择[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(5): 1084-1087
Li Qian-xiao, Na Rong-mei, Liu Bai-ting, et al. Selection of primary culture conditions of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2017, 37(5): 1084-1087
- [14] Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(1): 111-121
- [15] Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience[J]. *J Intern Med*, 2007, 262(5): 509-525
- [16] Marta E. Castro-Manrreza, Juan J. Montesinos. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 394917
- [17] Montesinos JJ, Mora-García Mde L, Mayani H, et al. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity [J]. *Stem Cells Dev*, 2013 Sep 15;22(18): 2508-2519
- [18] Anna Földes, Kristóf Kádár, Beáta Kerémi, et al. Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin-Their Potential for Anti-inflammatory and Regenerative Actions in Brain and Gut Damage[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(8): 914-934
- [19] Gabriela Kmiecik, Valentina Spoldi, Antonietta Silini, et al. Current View on Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Tissues[J]. *Stem Cell Rev*, 2015, 11 (4): 570-585
- [20] Hamid Saeed, Muhammad Ahsan, Zikria Saleem, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics-an update[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 41
- [21] Vasileios Karantalis, Joshua M. Hare. Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease [J]. *Circ Res*, 2015, 116 (8): 1413-1430
- [22] Ki-Jong Rhee, Jong In Lee, Young Woo Eom. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 30015-30033
- [23] Fernando Ezquer, Flavia Bruna, Sebastián Calligaris, Paulette Conget, Marcelo Ezquer. Multipotent mesenchymal stromal cells: A promising strategy to manage alcoholic liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(1): 24-36
- [24] Zhu X L, Yan T, Yao W J, et al. Optimization of the method for isolating and culturing rat mesenchymal stem cells [J]. *J South Med Univ*, 2014, 34(11): 1621-1626
- [25] Gong Yu, Wang Hong-fei, Xia Hai-jun. Culturing bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats using whole bone marrow adherence method[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2014, 18(1): 51-56
- [26] Kentaro Akiyama, Yong-Ouk You, Takayoshi Yamaza, et al. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(5): 40
- [27] 宋明艳, 李娜, 姜彦, 等. 全骨髓贴壁法体外分离培养兔骨髓间充质干细胞[J]. *山东医药*, 2014, 54(27): 31-33
Song Ming-yan, Jiang Yan, Li Na, et al. Isolation and culture of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells in vitro by whole bone marrow adherence method[J]. *Shandong Medical Journal*, 2014, 54(27): 31-33
- [28] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(4): 505-517
- [29] Wang X, Hisha H, Mizokami, et al. Mouse mesenchymal stem cells can support human hematopoiesis both in vitro and in vivo: the crucial role of neural cell adhesion molecule[J]. *Haematologica*, 2010, 95 (6): 884-891
- [30] Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction [J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(5): 739-751