

脐带间充质干细胞在颅脑损伤模型鼠体内的迁徙与定位

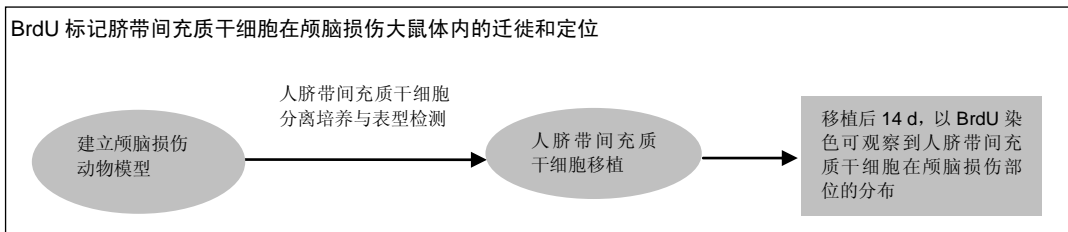
刘红林, 刘志军, 陈小兵, 胡文忠, 丁丙谦(河南大学淮河医院神经外科, 河南省开封市 475000)

引用本文: 刘红林, 刘志军, 陈小兵, 胡文忠, 丁丙谦. 脐带间充质干细胞在颅脑损伤模型鼠体内的迁徙与定位[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):31-35.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.006

ORCID: 0000-0003-4229-7570(刘红林)

文章快速阅读:



刘红林, 男, 1972 年生, 江苏省丰县人, 汉族, 2007 年郑州大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事显微神经外科方面的研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)01-00031-05

稿件接受: 2015-11-18

http://www.crter.org

文题释义:

脐带间充质干细胞: 具有较高的分化潜能, 可向多个方向进行分化, 在骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、内皮和心肌等组织工程方面具有广阔的临床应用前景。从人脐带中分离出间充质干细胞, 细胞含量、增殖能力优于骨髓间充质干细胞, 免疫原性比骨髓间充质干细胞低, 并且具有取材方便, 无伦理学争议等优点。
BrdU 标记法: 是近年来出现的一种新型的标记方法, 当细胞处于 DNA 合成期而同时又有 BrdU 存在时, BrdU 会掺入新合成的 DNA 中, 随后通过抗 BrdU 单克隆抗体进行免疫细胞化学染色进行示踪。与同位素和荧光标记技术相比较, BrdU 标记和检测的方法简便, 准确性及标记率高, 是反映细胞增殖及跟踪监测移植细胞的理想指标, 但 BrdU 标记细胞如果发生凋亡或死亡, 其释放的 BrdU 则可掺入到处于细胞循环 S 期的任何细胞, 从而难以区分移植细胞和宿主细胞。

摘要

背景: 选择有效的手段, 标记和追踪细胞在体内的分布、分化及转归, 才能深入探讨细胞发挥治疗效果的具体机制。

目的: 了解 BrdU 标记脐带间充质干细胞在颅脑损伤大鼠体内的迁徙和定位情况。

方法: 分离培养人脐带间充质干细胞并进行细胞表面标志物鉴定, 取第 3 代人脐带间充质干细胞采用 BrdU 进行标记, MTT 法检测细胞增殖能力。将 BrdU 标记的人脐带间充质干细胞经尾静脉注射到颅脑损伤模型大鼠体内, 移植后 14 d 取损伤处脑组织制备组织切片, 倒置荧光显微镜下观察人脐带间充质干细胞的迁徙和定位情况。

结果与结论: 经流式细胞仪检测, 细胞表达 CD29、CD44、CD105, 不表达造血细胞表面特异性标志 CD34 和 CD45。通过生长曲线可以发现, 细胞在接种 1-3 d 处于调整期, 第 3-5 天进入对数生长期。移植后 14 d 在脑损伤部位可以观察到 BrdU 染色阳性细胞, 表明移植的人脐带间充质干细胞在大鼠体内发生迁徙, 经过大鼠的外周血液循环迁徙达到颅脑损伤部位, 实现对损伤部位的有效修复。

关键词:

干细胞; 脐带干细胞; 脐带间充质干细胞; 颅脑损伤; 干细胞标记示踪技术; 细胞迁徙; 细胞定位

主题词:

脐带; 间质干细胞移植; 颅脑损伤; 细胞运动; 组织工程

Migration and localization of umbilical cord mesenchymal stem cells implanted into brain injury model rats

Abstract

BACKGROUND: Choosing an effective means to label and trace the distribution, differentiation and migration of cells *in vivo* help to further explore the specific mechanism of cells that exert a therapeutic effect.

OBJECTIVE: To understand the migration and localization of BrdU-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells in brain injury model rats.

METHODS: Human umbilical cord blood samples were obtained, and the isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cells was carried out. The primary and passage culture were performed. The phenotype of cells was detected by flow cytometry. Passage 3 human umbilical cord mesenchymal stem cells were labeled using BrdU, and the cell proliferation was detected using MTT method. BrdU-labeled cells were injected into brain injury rats *via* the tail vein. At 14 days after transplantation, brain tissues in the injury region were cut into sections and the migration and location of the umbilical cord mesenchymal stem cells were observed under inverted

Liu Hong-lin, Liu Zhi-jun,
Chen Xiao-bing, Hu
Wen-zhong, Ding Bing-qian
(Department of
Neurosurgery, Huaihe
Hospital of Henan University,
Kaifeng 475000, Henan
Province, China)

Liu Hong-lin, Master,
Associate chief physician,
Department of Neurosurgery,
Huaihe Hospital of Henan
University, Kaifeng 475000,
Henan Province, China

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Craniocerebral Trauma; Cell Movement; Tissue Engineering

fluorescence microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Cell surface specific markers CD45 and CD34 were detected by flow cytometry, but the cells could not express CD44, CD105 and CD29. Based on the cell growth curve, the cells came into a conditioning period at 1–3 days of seeding and came into a logarithmic phase at 3–5 days. BrdU-positive cells were visible at the injury region after 14 days, indicating that in the rats, transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells migrated from the peripheral blood to the site of brain injury to achieve the effective repair of injured parts.

Cite this article: Liu HL, Liu ZJ, Chen XB, Hu WZ, Ding BQ. Migration and localization of umbilical cord mesenchymal stem cells implanted into brain injury model rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):31-35.

0 引言 Introduction

随着社会的快速发展, 颅脑损伤发生率不断提高^[1], 治疗后容易产生各种后遗症, 严重影响到患者的日常生活, 并给患者家庭以及全社会造成十分沉重的负担。临床大多采用常规神经营养、高压氧以及康复锻炼等方式治疗颅脑损伤, 这些方法虽然可以从一定程度上改善患者的神经功能, 但往往无法获得理想的效果^[2-3]。干细胞相关理论及技术的发展, 为颅脑损伤的治疗提供了新的思路。干细胞移植后, 在体内分化形成新的神经元, 与宿主神经纤维之间发生紧密的联系, 逐渐构成新的神经环路, 有效恢复缺损的神经功能, 达到治疗疾病的目的^[4-6]。目前需要选择有效的手段, 标记和追踪细胞在体内的分布、分化及转归, 才能深入探讨细胞发挥治疗效果的具体机制^[7]。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, 方法简便, 可以反映细胞在体内的增殖情况, 是用于体内示踪的理想标记方法。脐带间充质干细胞表达多种胚胎干细胞的特有分子标志, 且无伦理问题的限制, 是具有临床应用前景的多能干细胞。实验即用BrdU标记脐带间充质干细胞, 了解脐带间充质干细胞在颅脑损伤大鼠体内的迁徙和定位情况。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 单一样本观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年4至7月在河南大学淮河医院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雌性SD大鼠10只, 7周龄, 体质量(250±10) g, 由四川省抗生素工业研究所实验动物中心提供, 批号200232。

1.3.2 主要试剂与仪器 青霉素、链霉素(石药集团中诺药业(石家庄)有限公司), DPBS平衡液(上海弘顺生物科技有限公司), MTT(上海江莱生物科技有限公司), 二甲亚砜(杭州伟进生物科技有限公司), BrdU(北京杰辉生物技术有限公司), 超净工作台(苏州博兰特实验室系统工程有限公司), 全自动酶标仪(上海昨非实验室设备有限公司), 二氧化碳培养箱(北京博宇腾辉科贸有限公司), 流式细胞仪(上海众生生命科学发展有限公司), ELISA试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司), 倒置荧光显微镜(大悦

维佳(北京)科技有限公司), 冰冻切片机(广州市瑞品生物技术有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的分离培养与表型检测 在超净工作台中利用止血钳将脐带标本夹出, 置于添加青霉素、链霉素、DPBS的培养皿中, 剪成15 cm左右长的片段, 用DPBS冲洗, 加入胰酶消化。消化结束之后用移液枪将细胞转移至离心管中, 添加15倍体积DPBS进行离心, 弃上清。利用DPBS平衡液进行清洗, 收集细胞进行原代和传代培养。流式细胞仪对第3代细胞进行表型检测。取第3代细胞, 胰酶消化, 离心, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 添加20 $\mu\text{mol/L}$ BrdU对人脐带间充质干细胞进行标记。

1.4.2 人脐带间充质干细胞体外生长曲线绘制 取BrdU标记第3代人脐带间充质干细胞与未标记细胞接种于96孔板上, 每孔接种1 mL, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱中进行培养。每天在各培养孔中添加MTT液, 置于培养箱中继续培养4 h, 每孔添加100 μL 二甲亚砜, 充分溶解还原产物, 利用全自动酶标仪检测各孔吸光度(A值)。连续检测5 d, 绘制两组人脐带间充质干细胞的体外生长曲线。

1.4.3 动物模型的建立 对大鼠进行常规腹腔内注射麻醉, 待达到麻醉效果之后, 利用液压颅脑损伤仪给予峰值冲击压力处理。将大鼠头部的打击管与液压冲击管一端紧密连接, 液压冲击管注入37 °C生理盐水, 调整打击锤的高度, 释放打击锤, 利用液压冲击力形成脑损伤, 建立液压颅脑损伤模型。打击后观察大鼠生命体征, 如呼吸停止、心脏骤停, 应立即给予胸廓挤压。生命体征恢复后, 用庆大霉素盐水冲洗伤口, 骨蜡封闭骨孔, 缝合切口。手术完成之后, 对动物进行流食喂养, 待恢复活动之后予以普通喂食、饮水。

1.4.4 人脐带间充质干细胞移植 颅脑损伤模型建立24 h之后开始进行细胞移植, 动物麻醉后固定在立体定向仪上, 经尾静脉注射经BrdU标记的人脐带间充质干细胞0.5 mL($2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$)。

1.4.5 组织学观察 细胞移植后14 d将动物处死, 进行灌注固定, 获得脑组织标本, 于室温条件下, 固定过夜后进行常规脱水等处理, 冰冻切片机制备组织切片, 切片厚度为5 μm , 倒置荧光显微镜下观察人脐带间充质干细胞的迁徙和定位情况。

1.5 主要观察指标 ①人脐带间充质干细胞形态。②人脐带间充质干细胞体外生长曲线。③人脐带间充质干细胞在颅脑损伤大鼠体内的迁徙和定位情况。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞形态学观察 经传代培养, 脐带间充质干细胞与成纤维细胞类似, 细胞呈现出长梭形(图1)。

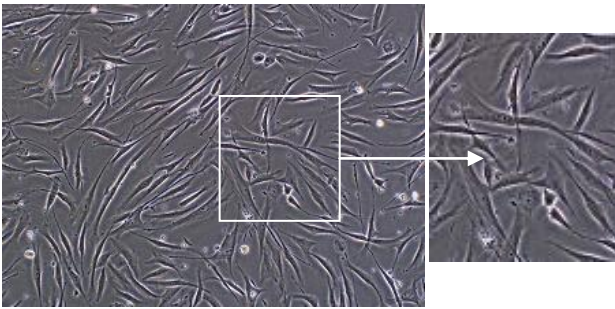


图1 人脐带间充质干细胞形态(x100)
Figure 1 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells (x100)
图注: 第3代脐带间充质干细胞为长梭形, 单层生长。

2.2 人脐带间充质干细胞免疫分型 经流式细胞仪检测, 细胞不表达造血细胞表面特异性标志CD34和CD45, 但可以表达CD29、CD44、CD105(图2)。

2.3 人脐带间充质干细胞生长曲线 MTT检测不同时间人脐带间充质干细胞生长吸光度(A值), 并绘制细胞生长曲线。通过曲线可以发现, 标记组与未标记组细胞在接种1-3d处于调整期, 并于第3-5天进入对数生长期, 生长曲线基本重合, 两组细胞不同时间的吸光度值经比较差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表1, 图3。

表1 两组人脐带间充质干细胞培养不同时间点吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Absorbance values of human umbilical cord mesenchymal stem cells at different culture time

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
标记组	0.18±0.01	0.21±0.02	0.26±0.03	0.34±0.05	0.41±0.05
未标记组	0.17±0.01	0.23±0.03	0.25±0.03	0.35±0.05	0.42±0.06

2.4 人脐带间充质干细胞在颅脑伤大鼠体内的迁徙和定位情况 细胞移植14 d, 在大鼠脑损伤部位可以观察到BrdU染色阳性细胞(图4), 提示移植的人脐带间充质干细胞可以在脑损伤大鼠体内发生迁徙和定位, 经动物外周血液循环达到颅脑损伤部位。

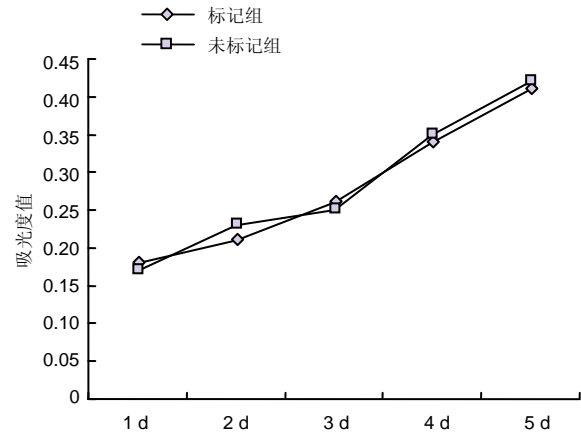


图3 两组人脐带间充质干细胞体外生长曲线
Figure 3 Growth curve of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*

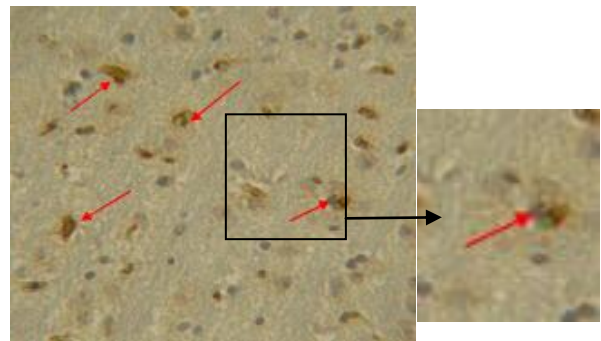


图4 人脐带间充质干细胞在颅脑损伤部位的分布(BrdU染色, x100)
Figure 4 BrdU staining results of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the site of brain injury (x100)
图注: 图中箭头指示部位为经 BrdU 标记和染色呈阳性的人脐带间充质干细胞。

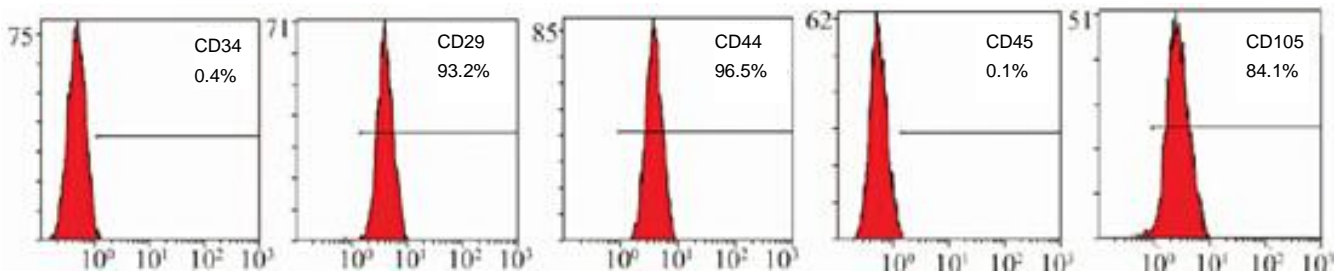


图2 人脐带间充质干细胞表面特异性标志表达
Figure 2 Immune genotyping of human umbilical cord mesenchymal stem cells

3 讨论 Discussion

干细胞具有强大的分化能力,可以在一定条件下分化为神经元细胞,代替脑内死亡的神经细胞,达到修复神经损伤的目的^[8-12]。人脐带间充质干细胞可以通过旁分泌机制,调控细胞的生物学活性^[13]。而且,人脐带间充质干细胞还具有较强的黏附性,低密度培养时能够迅速贴壁,具有快速增殖能力^[14-26]。彭余江等^[18]用神经生长因子基因转染人脐带间充质干细胞,用于治疗神经系统损伤有较好效果。

干细胞移植后可以发生一定的迁移和定位^[17-22],因此需要采用一种有效、安全的标记方法来追踪其在体内的变化,了解细胞的迁徙和定位情况^[23-24, 27]。Cheng等^[26]用超顺磁性氧化铁标记的干细胞移植治疗创伤性脑损伤,磁共振加权成像(SWI)对所标记的干细胞进行追踪,在移植后的第1, 3周,可以观察到病变左半球顶叶皮质存在低信号强度图像,说明细胞发生了迁移。BrdU属于胸腺嘧啶核苷的类似物,具有与胸腺嘧啶核苷相似的功能,可以参与细胞合成DNA。利用BrdU对处于DNA合成期的干细胞进行标记。将细胞置于含有BrdU的某种培养基中培养,当细胞的DNA复制时, BrdU可替代胸腺嘧啶脱氧核苷酸掺入到DNA的子链中。只要细胞不死亡,这种BrdU在细胞核的DNA中长期存留。因此,可以将该技术应用到跟踪检测移植细胞的存活、分化和功能状态,通过检测BrdU在特定部位阳性表达,了解不同干细胞的迁徙和定位^[26-32]。汤华军等^[29]将75只SD大鼠随机分为脑出血组、假手术组和正常组,脑出血组采用自体血注入法复制脑出血模型,各实验大鼠腹腔注射溴脱氧核苷尿嘧啶(BrdU)标记神经干细胞,运用免疫组化染色观察神经干细胞增殖及迁徙分布情况。结果脑出血组侧脑室下区室管膜上皮的BrdU阳性细胞数比假手术组和正常组显著增加($P < 0.05$), BrdU阳性细胞沿胼胝体迁徙,最后散在分布于出血灶及周边区,可见脑出血后神经干细胞可增殖并沿胼胝体向出血灶及周边区迁徙,参与出血性脑损伤神经功能的修复。袁源等^[32]学者利用人脐带间充质干细胞移植治疗脑挫伤模型大鼠,术后观察穿刺道损伤皮质存在大量的呈BrdU阳性表达细胞,说明细胞可以在宿主体内很好的存活并发生迁移,另外还可以表达胶质细胞特异性蛋白GFAP以及神经元特异性标志物NSE。实验利用BrdU标记人脐带间充质干细胞,通过观察曲线可以发现,标记与未标记组细胞均在接种1-3 d处于调整期,并于第3-5天进入对数生长期,生长曲线基本重合,两组细胞不同时间的吸光度值经比较差异均无显著性意义,表明BrdU标记不会对人脐带间充质干细胞的增殖产生明显影响。将BrdU标记人脐带间充质干细胞经尾静脉移植到颅脑损伤大鼠,移植后14 d在脑损伤部位可以观察到BrdU染色阳性细胞,表明移植的人脐带间充质干细胞在大鼠体内发生了迁徙,经过大鼠的外周血液循环迁徙达到颅脑损伤部位,实现对损伤部位的有效修复。

作者贡献: 实验设计为刘红林、刘志军,实验实施为刘红林、陈小兵,实验评估为刘红林、胡文忠,资料收集为刘红林、丁丙谦。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: ①实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。②脐带标本的采集河南大学淮河医院伦理委员会批准,并经产妇(或家属)书面同意用于科学研究。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 张润,秦琨,法志强,等.Catwalk系统评估脐带间充质干细胞移植治疗大鼠脑损伤后运动功能的恢复情况[J].南方医科大学学报,2012,32(4):449-455.
- [2] 江伟,沈洁,史源,等.人脐带间充质干细胞的分离鉴定及其修复缺血缺氧脑损伤作用[J].吉林大学学报:医学版,2011,37(2):215-219,后插2.
- [3] 袁源,但齐琴,刘佳,等.携带脑源性神经营养因子基因人脐带干细胞改善脑损伤大鼠神经功能的实验研究[J].中华行为医学与脑科学杂志,2011,20(2):115-118.
- [4] 李长栋,荔志云,季玮,等.大黄素甲醚对脑损伤大鼠 bcl-2、bax 表达变化的影响[J].中华神经外科疾病研究杂志,2015,14(3):200-203.
- [5] 李静,杨波,刘献志,等.人脐带沃顿胶间充质干细胞移植对创伤性脑损伤大鼠脑损伤区微循环的影响[J].中华神经医学杂志,2013,12(9):880-884.
- [6] 阮光萍,姚翔,刘菊芬,等.人脐带间充质干细胞的作用:细胞移植、免疫调节及充当基因治疗靶细胞[J].中国组织工程研究,2014,18(41):6714-6718.
- [7] Heng BC, Phan TT, Liu H, et al. Can the therapeutic advantages of allogenic umbilical cord blood-derived stem cells and autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells be combined and synergized. ASAIO J. 2006;52(6):611-613.
- [8] 袁源,但齐琴,刘佳,等.人脐带干细胞携带NGF基因脑内移植对脑损伤大鼠神经行为学的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2011,20(4):298-301.
- [9] Wu KH, Tsai C, Wu HP, et al. Human application of ex vivo expanded umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: enhance hematopoiesis after cord blood transplantation. Cell Transplant. 2013;22(11):2041-2051.
- [10] 李长栋,荔志云,白海,等.大黄素甲醚联合脐带间充质干细胞移植对创伤性脑损伤大鼠MMP-9和TIMP-1蛋白酶的影响[J].创伤外科杂志,2013,15(4):306-309.
- [11] Roszek K, Bomastek K, Drożdżal M, et al. Dramatic differences in activity of purines metabolizing ecto-enzymes between mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood and umbilical cord tissue. Biochem Cell Biol. 2013;91(6):519-525.

- [12] Weiwei Li, Min Li, Yantian Chen, et al. Various Seeding Methods for Tissue Development of Human Umbilical-cord-derived Mesenchymal Stem Cells in 3-Dimensional PET Matrix. *Biotechnology and bioprocess engineering*. 2014;19(1):108-117.
- [13] Li WW, Li M, Chen YT, et al. Various seeding methods for tissue development of human umbilical-cord-derived mesenchymal stem cells in 3-dimensional PET matrix. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2014;19(1): 108-117.
- [14] 袁源. 脐带间充质干细胞的生物学特性、向神经样细胞的分化及细胞移植治疗颅脑损伤的研究[D]. 天津:天津医科大学, 2006.
- [15] 李晓红, 陈翀, 涂悦, 等. 温敏脐带间充质干细胞联合亚低温对重型创伤性脑损伤大鼠认知功能的影响[J]. *中华创伤杂志*, 2014, 30(5):455-459.
- [16] Hua J, Gong J, Meng H, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow. *Cell Biol Int*. 2014; 38(2):198-210.
- [17] 梁璐, 陈小军, 吴昊, 等. 人脐带间充质干细胞在小鼠体内的迁移变化及宿主的免疫反应[J]. *郑州大学学报:医学版*, 2010, 45(1): 33-36.
- [18] 彭余江, 李慧勇, 何玺君, 等. 神经生长因子转染的人脐带间充质干细胞促进中枢神经系统损伤修复的实验研究[J]. *浙江医学*, 2015, 37(3):197-199, 215.
- [19] 张德双, 王华, 白小红, 等. 脐带间充质干细胞移植治疗新生儿缺氧缺血性脑损伤的最新研究进展[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(14):1112-1114.
- [20] Hattapatka T, Moretti P, Lavrentieva A, et al. Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011; 17(4): 485-493.
- [21] 张琴芬, 屠文娟, 李红新, 等. 人脐带间充质干细胞联用神经节苷酯GM1治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤[J]. *中国儿童保健杂志*, 2014, 22(8):819-821, 825.
- [22] Hollweck T, Marschmann M, Hartmann I, et al. Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds. *Biomed Mater*. 2010;5(6): 065004.
- [23] Lee HJ, Lee JK, Lee H, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol Aging*. 2012;33(3):588-602.
- [24] 李长栋, 孙建军, 荔志云, 等. DAPI标记脐带间充质干细胞在颅脑创伤模型大鼠脑内的迁徙和分布[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(7):615-618.
- [25] Yun SP, Lee SJ, Oh SY, et al. Reactive oxygen species induce MMP12-dependent degradation of collagen 5 and fibronectin to promote the motility of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Br J Pharmacol*. 2014;171(13):3283-3297.
- [26] Cheng JL, Yang YJ, Li HL, et al. In vivo tracing of superparamagnetic iron oxide-labeled bone marrow mesenchymal stem cells transplanted for traumatic brain injury by susceptibility weighted imaging in a rat model. *Chin J Traumatol*. 2010;13(3):173-177.
- [27] Ziv-Polat O, Margel S, Shahar A. Application of iron oxide nanoparticles in neuronal tissue engineering. *Neural Regen Res*. 2015; 10 (2): 189-191
- [28] 黄霞, 潘兴华, 庞荣清, 等. 脐带间充质干细胞培养中的染色标记及示踪技术[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(23):3751-3755.
- [29] 汤华军, 范光碧, 郑宇杰, 等. 脑出血后大鼠神经干细胞增殖及迁徙途径的实验研究[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2015, 33(2): 189-192.
- [30] Wang F, Zhang YC, Zhou H, et al. Evaluation of in vitro and in vivo osteogenic differentiation of nano-hydroxyapatite/chitosan/poly(lactide-co-glycolide) scaffolds with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(3):760-768.
- [31] Liu S, Hou KD, Yuan M, et al. Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. *J Biosci Bioeng*. 2014;117(2):229-235.
- [32] 袁源, 杨树源, 张建宁. 人脐带间充质干细胞移植治疗大鼠创伤性脑损伤[J]. *中国工程组织研究与临床康复*, 2011, 15(45):8424-8428.