



低温冻存对兔脂肪间充质干细胞部分生物学特性的影响

刘琴, 陈芳, 杨丽君, 王丽平, 朱以良, 张宜

(解放军广州军区武汉总医院医学实验科, 武汉 430070)

【摘要】 目的 研究低温冻存对兔脂肪间充质干细胞部分生物学特性的影响。方法 采用组织块法分离培养兔脂肪间充质干细胞。用倒置显微镜观察原代细胞的细胞形态, 流式细胞仪检测兔脂肪间充质干细胞的免疫表型。取第3代兔脂肪间充质干细胞置于 -196°C 液氮保存半年, 37°C 复苏并传至第7代。实验分为两组, 实验组为冻存复苏后传至第7代的兔脂肪间充质干细胞, 对照组为未冻存的第7代兔脂肪间充质干细胞, 用MTT绘制其生长曲线; 添加成脂、成骨诱导液进行诱导, 油红O、茜素红染色和碱性磷酸酶活性检测分别进行鉴定。结果 体外培养的兔脂肪间充质干细胞呈梭形纤维样细胞形态, 生长力旺盛。流式细胞仪检测显示, 第3代兔脂肪间充质干细胞强表达CD44、CD90, 阴性表达造血细胞相关的表面标志CD45。两组细胞生长曲线呈典型的“S”形, 无统计学差异($P > 0.05$); 成脂诱导14 d后, 油红O染色呈阳性; 成骨诱导2周时茜素红染色阳性, ALP表达活性随成骨诱导时间延长不断增加且无统计学差异($P > 0.05$)。结论 冻存后的兔脂肪间充质干细胞体外生长及多向分化潜能未发生显著变化。

【关键词】 间充质干细胞; 免疫表型; 成脂诱导; 成骨分化; 低温冻存

【中图分类号】 Q95-33, R394.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0060-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.014

Effect of cryopreservation on some biological properties of rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells

LIU Qin, CHEN Fang, YANG Li-jun, WANG Li-ping, ZHU Yi-liang, ZHANG Yi

(Department of Medical Experiments, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of cryopreservation on some biological properties of rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells (rADMSCs). **Methods** rADMSCs culture was isolated by tissue explants adherent method. Morphology of the primary cells was observed by inverted microscopy. Immunophenotypes of the rADMSCs were determined using flow cytometry. The third passage cells were preserved in liquid nitrogen for 6 months, and then were thawed, and subcultured to passage 7. The growth curves of the cryopreserved cells were analyzed by MTT assay, and the cryopreserved cells were cultured in adipogenic and osteogenic medium, with non-cryopreserved rADMSCs as a control group. The adipogenic and osteogenic abilities of the rADMSCs were evaluated by oil red O staining, alizarin red staining and alkaline phosphatase activity assay, respectively. **Results** The rADMSCs cultured in vitro exhibited a spindle-shaped appearance and rapid growth expansion. Flow cytometry analysis revealed that the third passage rADMSCs were CD44- and CD90-positive, but negative for hematopoietic cells surface marker CD45. The growth curves of cells in the experimental and control groups were “S” shaped, showing a non-significant difference between the two groups ($P > 0.05$). The oil red O staining and alizarin red staining results were positive at 2 weeks after adipogenic and osteogenic induction. The ALP activities of the two groups were increased with osteogenic induction time, with a non-significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** Cryopreservation does not affect the growth and differentiation pluripotency of rADMSCs significantly.

[作者简介] 刘琴(1986-), 女, 硕士, 从事细胞生物学和分子生物学方面的研究, E-mail: liuqin_0629@163.com

[通讯作者] 张宜(1965-), 男, 硕士, 主任药师, 从事药理学信息研究, E-mail: abcd1566@sina.com

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Immunophenotypes; Adipogenic induction; Osteogenic differentiation; Cryopreservation

脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)来源于脂肪组织,具有自我更新、多向分化潜能、对自体损伤小、免疫原性弱、自体移植不发生排斥反应等特点,是组织工程中最有应用前景的种子细胞之一,特别是在骨组织再生利用中具有重要的意义^[1-3]。兔脂肪间充质干细胞是体外研究组织工程以及间充质干细胞分化机制的常用间充质干细胞之一。但是,如何获得足量的兔脂肪间充质干细胞,解决兔脂肪间充质干细胞体外扩增、冻存及建立细胞库等问题一直是学者们研究的重要内容。目前,对于兔脂肪间充质干细胞体外扩增、诱导分化的研究已经较为详尽,而对于兔脂肪间充质干细胞低温保存、复苏方面的研究比较少。因此,本课题以兔脂肪间充质干细胞为研究对象,探讨低温保存是否对兔脂肪间充质干细胞的体外生长特性及多向分化潜能产生影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级日本大耳白兔 2 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg,由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供【SCXY(鄂)2011-0011】,实验在广州军区武汉总医院医学实验科进行【SYXK(鄂)2008-0007】。实验过程中对动物的处置符合赫尔辛基宣言动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂

DMEM/F12、PBS 购自 Hyclone, FBS 购自 Gibco, MTT、DMSO 购自 Sigma, 成脂、成骨诱导试剂盒购自 Cyagen 公司, FITC-CD90、FITC-CD44、FITC-CD45 及相应的同型对照购自美国 BD 公司, ALP 磷酸酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 通用细胞冻存液购自 Solarbio 公司。

1.2 方法

1.2.1 兔脂肪间充质干细胞的分离、培养

参考文献[4]。日本大耳白兔以 10% 的水合氯醛(2 mL/kg)腹腔注射麻醉,固定于手术台上,手术区脱毛备皮,1% 碘伏、75% 医用酒精依次消毒,铺单,取股沟处的脂肪组织,移入超净台上,PBS 漂洗 3~4 次,清除组织中肉眼可见的小血管、筋膜,剪碎至糜状,将组织块均匀地铺在 25 cm² 玻璃细胞培养瓶中,置 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养。30 min 后取出培养瓶,轻柔地加入 2~3 mL 含 10%

FBS 的 DMEM/F12 培养基浸润组织块,继续培养。每天观察细胞生长情况,每 3 d 更换培养液,7~8 d 时刮除组织块。倒置显微镜动态观察培养的兔脂肪间充质干细胞生长形态、结构的变化。待细胞达到 80%~90% 左右融合时用 0.25% trypsin-EDTA 进行 1:3 传代,记为第一代细胞(P1)。

1.2.2 细胞免疫表型的流式细胞分析

0.25% trypsin-EDTA 消化收集对数生长期的第 3 代细胞,细胞计数,每管含 5×10^5 个细胞,800 r/min,2 min,弃上清,每管加入 100 μ L PBS 重悬细胞,加入 CD90、CD44、CD45 抗体和相应的同型对照 10 μ L,室温避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2~3 次,用流式细胞仪检测。

1.2.3 细胞的冻存复苏及复苏率的检测

取经形态学和细胞免疫表型鉴定的第 3 代细胞,常规方法消化,收集细胞悬液,计数,每支细胞含量 1×10^6 个,1000 r/min,2 min,去上清后加入通用细胞冻存液,将冻存管置 4℃ 1 h, -20℃ 2 h,再置 -80℃ 过夜,第 2 天放入 -196℃ 液氮保存,6 个月取出冻存管,在 37℃ 水浴箱中快速解冻,接种至培养瓶内,加入适量 DMEM/F12,6 h 后换液,待细胞达 80%~90% 融合时以 1:3 进行常规传代。同时取复苏后部分细胞,制成单细胞悬液,用台盼蓝染色计数,计算细胞活力,活率 = 活细胞总数 / 细胞总数 $\times 100\%$,共 3 次,取 3 次平均值。

1.2.4 MTT 绘制生长曲线

将实验分为两组,实验组为冻存 6 个月复苏后传至第 7 代的细胞(P7),调整细胞密度为 1×10^4 / mL,接种到 96 孔板(每孔 200 μ L),并设调零孔和对照孔,连续测 8d;对照组为未经低温冻存的第 7 代细胞,以相同的细胞密度接种到 96 孔板。从接种后的第 2 天起,每天同一时间取样,用 PBS 冲洗 1~2 次,各滴加 50 μ L MTT 溶液(5g/L),37℃ 孵育 4 h 后吸弃各孔内的液体,加入 150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,采用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光值,计算出各组的均值,以时间(d)为横坐标,吸收值(A)为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.5 细胞分化潜能的检测

根据成脂、成骨分化诱导试剂盒说明书介绍的方法,实验组与对照组分别进行体外成脂、成骨诱导分化实验,诱导 2 周后分别进行油红 O 染色、茜素红染色。

1.2.6 ALP 活性测定

实验组与对照组细胞分别成骨诱导 3、5、7、9、11、13、15、17 d, 取每组 4 孔细胞, 按 ALP 试剂盒检测各组细胞的碱性磷酸酶活性, 检测结果单位换算为 $U/10^4$ 个细胞。碱性磷酸酶活性为金氏单位/g, 换算公式为每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为一个金氏单位, 参考文献[5]。

1.2.7 统计学分析方法

采用 SPSS 10.01 统计软件包进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用配对 t 检验, P 值 < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 兔脂肪间充质干细胞的生长特性

将组织块接种到培养瓶 2~3 d 后, 可见少量细胞从组织块中爬行出来, 形态以长梭形为主, 少数为

圆形、多角形。培养 3~4 d 后, 在光镜下可见更多的细胞从组织块中爬行出来, 细胞大小比较均一, 形态多为典型的长梭形, 见图 1A。12~14 d 后, 细胞数量明显增多, 细胞形态变为均一的长梭形, 并达到 80% 左右融合, 见图 1B。细胞传至第 3 代时, 可见大量成纤维细胞样的细胞呈明显的漩涡状生长, 见图 1C(图 1 见彩插 9)。

2.2 细胞免疫表型的分析

流式细胞仪分析第 3 代细胞的细胞表型, 检测结果显示: 培养的细胞强烈表达间充质干细胞相关的标志物 CD44、CD90, 阳性率分别达 97.60%、99.96%; 低表达造血干细胞相关的标志物 CD45, 阳性率低于 0.19%, 见图 2。表明分离培养的细胞是具有均一间充质干细胞表面特征的细胞群。

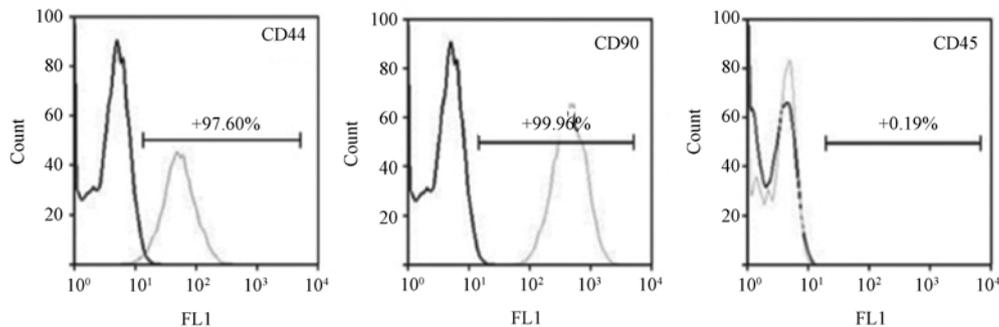


图 2 流式细胞仪检测第 3 代兔脂肪间充质干细胞细胞表型

Fig. 2 Cell genotype of the third passage rADMSCs detected by flow cytometry

2.3 兔脂肪间充质干细胞冻存复苏培养观察

取冻存 6 个月的第 3 代兔脂肪间充质干细胞复苏, 台盼兰染色后细胞存活率可达 83%。复苏的细胞 6 h 内贴壁, 少许悬浮, 贴壁细胞以长梭形为主, 生长状态良好, 5~6 d 达到 80%~90% 融合, 与冻存前兔脂肪间充质干细胞在形态上无明显差别, 见图 3(彩插 9)。传代后细胞增殖速度较快, 形态较均一, 以长梭形为主。

2.4 生长曲线

采用 MTT 法绘制冻存前后兔脂肪间充质干细胞的生长曲线, 两组均呈典型的“S”形, 接种细胞经 2 天左右的潜伏期后在第 4 天进入对数生长期, 随着培养时间的增加而增殖, 在第 7 天进入平台期, 冻存后兔脂肪间充质干细胞的增殖能力与冻存前没有显著差异 ($P > 0.05$), 见图 4。

2.5 油红 O 染色

为鉴定复苏兔脂肪间充质干细胞向脂肪细胞的分化能力, 取复苏后传代至第 7 代的细胞及未冻存的第 7 代兔脂肪间充质干细胞, 做成细胞爬片, 加入

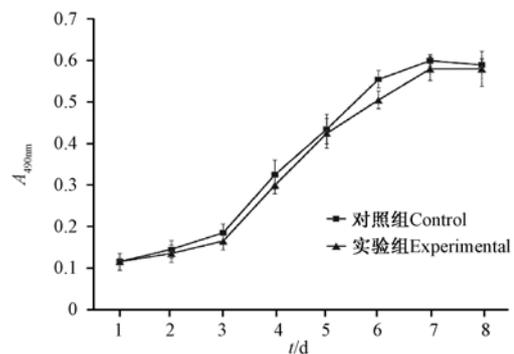


图 4 兔脂肪间充质干细胞冻存前后细胞的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of the rADMSCs before and after cryopreservation

成脂诱导液培养, 诱导 3~4 d 后少量细胞形态由长梭形逐渐变为多角形、不规则形。诱导 5~6 d 后脂质内出现少量的脂滴。10~12 d 时细胞形态以多角形、不规则形为主, 细胞内出现大量脂滴。2 周时油红 O 染色, 两组细胞内均出现大量红染颗粒, 见图 5

(彩插 9)。表明冻存复苏的兔脂肪间充质干细胞可被诱导为脂肪细胞。

2.6 茜素红染色

为鉴定复苏兔脂肪间充质干细胞向成骨细胞的分化能力,取复苏后传代至第 7 代的细胞及未冻存的第 7 代兔脂肪间充质干细胞,做成细胞爬片,加入成骨诱导液培养,诱导 5~6d 后,可见细胞部分形态由长梭形变为不规则形、类圆形、多角形。10~12d 后可见不规则形、多角形细胞堆积,呈明显的簇状生长。2 周时小心吸弃诱导培养液,用 4% 多聚甲醛固定后加入茜素红染色,两组细胞均可见桔红色的钙结节,见图 6(彩插 9)。表明复苏冻存后的兔脂肪间充质干细胞可被诱导为成骨细胞。

2.7 碱性磷酸酶活性测定

冻存后兔脂肪间充质干细胞的碱性磷酸酶表达活性存在明显的变化趋势。成骨诱导 1 d 时即可检测到低水平表达的碱性磷酸酶,3 d 后碱性磷酸酶值开始持续增加,13 d 左右达到峰值,之后缓慢下降,与冻存前兔脂肪间充质干细胞碱性磷酸酶表达变化趋势无显著差异($P > 0.05$),见图 7。

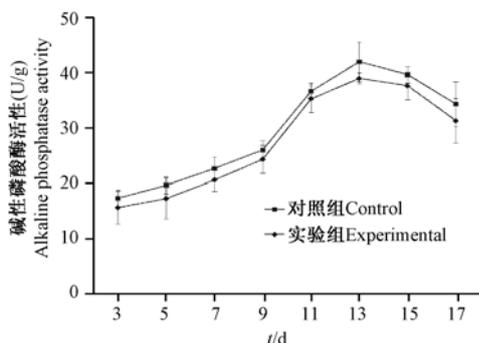


图 7 冻存前后兔脂肪间充质干细胞的碱性磷酸酶活性

Fig. 7 Alkaline phosphatase activity of rADMSCs before and after cryopreservation.

3 讨论

体外获得足够量的、生物学性状稳定的兔脂肪间充质干细胞是其应用于骨组织工程^[6-8],以及脂肪间充质干细胞成骨机制^[9]、成软骨机制^[10]等研究的先决条件。但兔脂肪间充质干细胞随着传代时间的增加,其增殖、分化能力均逐渐下降;另一方面,若同一课题组不同研究者要进行长期的、连续实验,则需重新分离细胞,浪费动物和经费,限制兔脂肪间充质干细胞的广泛应用。低温冻存是长期保存细胞的重要方法,可在一定程度上弥补以上不足之处。

本实验采用组织块贴壁法分离培养兔脂肪间充质干细胞,细胞状态良好,形态呈典型的成纤维样。关于脂肪间充质干细胞的分子特征,目前尚无研究发现它有特异性的细胞表型标志物,并且不同的研究结果有着不同的说法。Gronthos^[11]及 Gu 等^[12]认为人脂肪间充质干细胞表达 CD34。但是, Zuk 等^[13]和 Dominici 等^[14]的研究结果与之相反。Yoshimura 等^[15]认为脂肪间充质干细胞表达 CD34、CD90,不表达 CD31、CD45、CD106、CD146。而 Varma MJ 等^[16]认为脂肪间充质干细胞表达 CD34、CD54、CD90、CD105、CD117、HLA-ABC、HLA-DR,阴性表达 CD31、CD45、CD106、CD146、CD166。Lindros 等^[17]及 Baer 等^[18]认为供体的不均匀性、脂肪间充质干细胞的体外分离方法与抗体的来源、抗体的质量、检测方法的敏感性、细胞培养的条件、鉴定细胞的代数可能是导致研究结果不一致的原因。实验选用具有鉴别意义的细胞表型标记物 CD90、CD44、CD45 作为兔脂肪间充质干细胞的表型鉴定^[19],流式细胞仪检测结果显示,第 3 代细胞高表达间充质干细胞相关的表面抗原 CD44、CD90,阳性率超过 90%;不表达造血细胞相关的表面抗原 CD45,阳性率低于 1%,与文献^[20]报道的研究结果基本一致。

二甲基亚砜是细胞冻存液的主要成分,是一种重要的渗透型细胞保护剂。二甲基亚砜能够降低未结冰溶液中电解质的浓度,在缓慢降温过程中,可使细胞内水分渗出细胞外,防止细胞内液冰晶形成、渗透压改变、细胞结构紊乱等导致的损伤。复苏时 1~2 min 内复温,可使细胞外结晶在短时间内融化,避免细胞内再形成结晶^[21]。将第 3 代经形态学及表面抗原鉴定的兔脂肪间充质干细胞冻存于液氮中,6 个月后复苏,复苏率达 83%,复苏的细胞贴壁快,生长状态良好,5~7 d 达到 80%~90% 融合,细胞形态以长梭形为主。传代后,细胞的生长曲线呈典型的“S”形。冻存后细胞的形态、生长曲线与冻存前不存在明显的差别,表明低温冻存不会影响兔脂肪间充质干细胞的自我更新和增殖能力。

为证实冻存复苏多次传代后的兔脂肪间充质干细胞仍具有向脂肪细胞、成骨细胞分化的能力,对冻存复苏传代至第 7 代及未冻存的第 7 代兔脂肪间充质干细胞分别进行成脂、成骨诱导。脂滴是成脂诱导过程中形成的特异性物质。细胞外基质钙化是骨组织矿化的标志,是成骨分化的终末期表现^[22]。碱性磷酸酶是成骨过程中分泌的特异性蛋白质,其高表达是成骨细胞早期分化的特异性标志^[23-24]。实验针对以上指标进行了验证,结果显示,成脂诱导的

冻存前后的兔脂肪间充质干细胞油红 O 染色为阳性。成骨诱导的冻存前后的兔脂肪间充质干细胞茜素红染色为阳性,细胞碱性磷酸酶活性均随着时间的增加明显升高,且冻存前后细胞的碱性磷酸酶活性无显著差异 ($P > 0.05$),表面冻存复苏多次传代后的兔脂肪间充质干细胞具有向脂肪细胞、成骨细胞分化的潜能,与报道的冻存复苏多次传代后的脐带间充质干细胞具有多向分化潜能相符合^[25]。

综上所述,低温冻存可作为长期保存兔脂肪间充质干细胞的一种有效方法,冻存复苏传代后的兔脂肪间充质干细胞保持着干细胞的生物活性,具有较强的增殖能力和向脂肪细胞、成骨细胞分化的能力,为今后建立兔脂肪间充质干细胞库以及兔脂肪间充质干细胞在组织工程、疾病、干细胞分化机制等领域中的应用提供实验依据。

(本文图 1,3,5,6 见彩插 9。)

参 考 文 献

- [1] Fakhry M, Hamade E, Badran B, et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts [J]. *World J Stem Cells*, 2013, 5(4):136-148.
- [2] Dorronsoro A, Fernández-Rueda J, Fechter K, et al. Human mesenchymal stromal cell-mediated immunoregulation: mechanisms of action and clinical applications [J]. *Bone Marrow Res*, 2013, 2013:203643.
- [3] 石金鑫, 刘剑锋, 王海滨, 等. 棕色脂肪干细胞与白色脂肪干细胞移植对心肌梗死大鼠心功能的影响 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(15):18-21.
- [4] Priya N, Sarcara S, Majumdar AS, et al. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and liposyrate [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012 July 27;1-9.
- [5] 野向阳, 李相军, 徐岩, 等. 人脐带间充质干细胞体外成骨及其免疫学特征 [J]. *中国组织工程研究*, 2009, 13(36):7029-7033.
- [6] Tang ZB, Cao JK, Wen N, et al. Posterolateral spinal fusion with nano-hydroxyapatite-collagen/PLA composite and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(4):325-336.
- [7] Mohan BG, Suresh Babu S, Varma HK, et al. In vitro evaluation of bioactive strontium-based ceramic with rabbit adipose-derived stem cells for bone tissue regeneration [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24(12):2831-2844.
- [8] Arrigoni E, de Girolamo L, Di Giancamillo A, et al. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization [J]. *J Orthop Sci*, 2013, 18(2):331-339.
- [9] Xu L, Sun X, Cao K, et al. Hypoxia induces osteogenesis in rabbit adipose-derived stem cells overexpressing bone morphogenetic protein-2 [J]. *Oral Dis*, 2013, doi: 10.1111/odi.12148. [Epub ahead of print].
- [10] 杨军, 张传辉, 李建军, 等. 动态压力联合胰岛素样生长因子 1 基因转染促进兔脂肪间充质干细胞低氧诱导因子 1 α 的表达 [J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(45):3220-3224.
- [11] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189(1):54-63.
- [12] 顾繁, 高建华, 鲁峰. hASCs 的单克隆培养及干细胞相关标志物表达的实验研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(6):1067-1069.
- [13] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12):4279-4295.
- [14] 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):315-317.
- [15] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(1):64-76.
- [16] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(1):91-104.
- [17] Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(2):269-291.
- [18] Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity [J]. *Stem Cells Int*, 2012, 2012:812693.
- [19] Zuk P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review [J]. *ISRN Stem Cells*, 2013, 2013:1-35.
- [20] Wang Y, Zhao Z, Ren Z, et al. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 514(1):96-101.
- [21] 王璇, 刘奕杉, 马艳, 等. 不同组织冻存体系对牙周膜干细胞体外扩增的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(32):5855-5862.
- [22] Yu J, Deng Z, Shi J, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(11):3097-3105.
- [23] Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, et al. Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(23):4493-4502.
- [24] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7):1330-1337.
- [25] 陈妍, 潘丽杰, 袁杰, 等. 冻存脐带间充质干细胞向成骨细胞的分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(36):6436-6442.

[收稿日期] 2013-11-29