

人胚胎干细胞向肌腱细胞分化方法的专家共识

陈晓¹, 邹晓晖², 俞光岩³, 傅歆⁴, 曹彤⁵, 肖殷⁶, 欧阳宏伟¹

1. 浙江大学医学院干细胞与再生医学系 浙江大学李达三·叶耀珍干细胞与再生医学研究中心
浙江省组织工程与再生医学技术重点实验室, 浙江 杭州 310058
2. 浙江大学医学院附属第一医院中心实验室, 浙江 杭州 310003
3. 北京大学口腔医学院口腔颌面外科, 北京 100081
4. 中国医学科学院整形外科医院研究中心, 北京 100144
5. 新加坡国立大学口腔医学院口腔科学系干细胞实验室, 新加坡 119083
6. 澳大利亚昆士兰科技大学健康与生物医学研究所, 澳大利亚 布里斯班 QLD 4059

[摘要] 胚胎干细胞具有无限增殖能力,可能为组织工程提供肌腱细胞或肌腱祖细胞的来源。为规范人胚胎干细胞来源的肌腱细胞的分化方法,提高人肌腱细胞的纯度,保证分化方法的可重复性,使其更系统、规范和有效地应用于临床和生物安全性评价体系中,科技部国际合作专项有关专家制定了《人胚胎干细胞向肌腱细胞分化方法共识》。共识建议通过两步法将人胚胎干细胞诱导为肌腱细胞:首先利用不同材料表面将人胚胎干细胞诱导为成体间充质干细胞,然后采用高密度种植形成无支架组织工程肌腱,并利用静态或动态力学刺激在体内外环境下将成体间充质干细胞诱导成肌腱细胞。由此建立的体外组织工程肌腱可作为检测评价模型,对小分子化合物、医用材料和药物进行肌腱相关的毒理学系统分析和安全性评价。



[关键词] 胚胎干细胞; 腱/细胞学; 间质干细胞; 组织工程; 细胞分化; 细胞培养技术

[中图分类号] R573.3 **[文献标志码]** A

Expert consensus on induction of human embryonic stem cells into tenocytes

CHEN Xiao¹, ZOU Xiaohui², YU Guangyan³, FU Xin⁴, CAO Tong⁵, XIAO Yin⁶, OUYANG Hongwei¹ (1. Center of Stem Cell and Tissue Engineering, Dr. Li Dak Sum & Yip Yio Chin Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Key Laboratory of Stem Cell of Zhejiang Province, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 2. Central Laboratory, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

收稿日期:2016-02-20 接受日期:2016-03-10

基金项目:科技部国际科技合作专项重点项目(2011DFA32190)

第一作者:陈晓(1982-),男,博士,副教授,博士生导师,从事干细胞与再生医学、肌腱组织工程研究;E-mail: chenxiao-610@zju.edu.cn;http://orcid.org/0000-0002-4438-5286

通讯作者:欧阳宏伟(1971-),男,博士,教授,博士生导师,从事干细胞与组织工程、运动医学研究;E-mail: hwoy@zju.edu.cn;http://orcid.org/0000-0003-0627-2536

Peking University School of Stomatology, Beijing 100081, China; 4. Research Center of Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100144, China; 5. Faculty of Dentistry Research Laboratories, National University of Singapore, Singapore 119083, Singapore; 6. Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, Kelvin Grove QLD 4059, Australia)

Corresponding author: OUYANG Hongwei, E-mail: hwoy@zju.edu.cn, <http://orcid.org/0000-0003-0627-2536>

[**Abstract**] Embryonic stem cells have unlimited proliferative capacity, which may provide a source of tendon stem/progenitor cells for tissue engineering. Experts of International Science and Technology Collaborative Program of Ministry of Science and Technology have developed a protocol consensus on differentiation of human embryonic stem cells into the tendon cells. The consensus recommends a protocol of two-step generation of human embryonic stem cells into tendon cells: the human embryonic stem cells are first differentiated into mesenchymal stem cells on different material surfaces; then with the scaffold-free tissue engineering tendon formed by high-density planting, the mesenchymal stem cells are induced into tendon cells under static or dynamic mechanical stimulation *in vivo* and *in vitro*. Tissue engineering tendon established *in vitro* by the protocol can be used as a model in toxicological analysis and safety evaluation of tendon-relevant small molecule compounds, medical materials and drugs.

[**Key words**] Embryonic stem cells; Tendons/ cytology; Mesenchymal stem cells; Tissue engineering; Cell differentiation; Cell culture techniques

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2016,45(2):105-111.]

随着体育锻炼和竞赛活动明显增加和社会老龄化趋势明显,运动损伤越来越多,其中韧带肌腱损伤占 50% 以上^[1]。目前,临床上对肌腱损伤的治疗尚停留在理疗、手术缝合以及肌腱移植修复阶段。由于成体肌腱不具备完全再生能力,修复后肌腱的质量远不如正常肌腱,即使是自体肌腱移植修复也只能达到正常肌腱力学性能的 40% 左右,常导致再修复断裂^[2-4]。因此,寻找新型的、可促进肌腱生理性再生修复的方法具有极其重要的临床价值和社会意义。近年来,研究者开始尝试采用肌腱组织工程技术来治疗和修复肌腱缺损。目前用于肌腱组织工程研究的干细胞主要为成体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)及肌腱干细胞(tendon stem cells)^[5]。然而,已有研究发现,以上述干细胞作为种子细胞修复后的肌腱在力学性能,特别是在微观结构上与正常肌腱仍有显著区别:修复后的肌腱生成大量小直径胶原纤维,导致其愈合后力学性能低下^[6]。

已有研究结果表明,家畜或人体胚胎皮肤受

损后,可以达到无疤痕的功能性愈合,而成体皮肤受损后很难完全愈合并恢复正常生理功能^[7-10]。胚胎肌腱具有再生能力,移植于成体环境仍可再生,提示胚胎来源的肌腱细胞可能存在再生记忆功能^[11]。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)作为一种来源于胚胎的亚全能性干细胞,不仅具有分化为不同类型细胞的能力和无限增殖的潜能,而且可能具有胚胎细胞的再生记忆能力。小鼠和人的 ESC 已广泛用于疾病模型研究^[12-14]。本课题组前期实验结果证明 ESC 应用于肌腱组织工程可提供充足可再生的种子细胞来源^[15-17]。

人 ESC 的生物学特性、体外培养方法及其质量控制见《人胚胎干细胞向成纤维细胞分化方法的专家共识》^[18]。人 ESC 的肌腱组织工程的关键是将人 ESC 诱导分化为理想的肌腱细胞。为规范人 ESC 来源的肌腱细胞(ES-tenocytes, ES-T)的分化方法,提高人 ES-T 的纯度,保证分化方法的可重复性,使其更系统、规范和有效地应用于临床和生物安全性评价体系中,科技部国际

科技合作专项重点项目“创建基于人胚胎干细胞的预测健康安全新体系”的专家经反复讨论,制定了《人胚胎干细胞向肌腱细胞分化方法共识》(以下简称《共识》)。《共识》建议通过两步法将人 ESC 诱导为 ESC 来源的间充质干细胞(hESC derived mesenchymal stem cells, hESC-MS C)及肌腱细胞,在体内和体外递进式诱导人 ESC 向肌腱分化,实现肌腱再生。因此建立的体外组织工程肌腱可作为检测评价模型,对小分子化合物、医用材料和药物进行肌腱相关的毒理学系统分析和安全性评价。

1 第一步:hESC-MS C 的分化及鉴定方法

1.1 hESC-MS C 培养和传代

1.1.1 hESC-MS C 第 1 代培养 培养孔用质量分数为 0.1% 明胶包被,将 hESC 接种在丝裂霉素处理过的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast,MEF)饲养层上,用细胞培养基[含 80% DMEM/F-12, 20% Knock-out 血清替代品、1 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、4 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2)]于条件为 37 $^{\circ}$ C 和含 5% 二氧化碳的细胞培养箱内培养 3 ~ 5 d,当细胞增殖密度为 100% 时刮下收集细胞。以增殖密度达到 100% 的两孔(孔径为 34.8 mm)细胞为标准将 hESC 接种至 0.1% 明胶包被的 T75 培养瓶中,用低糖 DMEM 细胞培养基(含体积分数 20% FBS、10 ng/mL FGF-2、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)培养细胞。

1.1.2 hESC-MS C 第 2 代培养 每三天换液一次。在接种后 24 ~ 48 h 内即可观察到 hESC 贴壁,48 h 后可观察到在 hESC 周围出现克隆细胞生长(图 1A)。持续培养一周后细胞增殖密度可达到 90% 以上。细胞在高增殖密度状态下继续培养两周,可观察到培养瓶中含有多种不同形态的细胞混合生长。经胰酶消化后,按 1:3 比例传代。

1.1.3 hESC-MS C 稳定培养 培养获得的第 2 ~ 3 代细胞(细胞呈较均一的成纤维样细胞)再以 $5 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种至培养皿上,直至单克隆细胞长出,即得到 MSC,命名该细胞为 hESC-MS C,标记为 P0 代。经胰酶消化后,按 1:3 比例传代,传代后贴壁的细胞标记为 P1 代,每三天换液一次。

1.1.4 hESC-MS C 的传代 当 hESC-MS C 细胞增殖密度达到 90% 及以上时进行传代,吸去培养液,每孔(孔径为 34.8 mm)加入 1 mL 胰酶,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,吸去胰酶溶液,再加入 1 mL hESC-MS C 培养液(含体积分数 10% FBS,100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素,低糖 DMEM 培养基),用 1 mL 移液枪吹打细胞,200 $\times g$ 离心 5 min。吸除上清液后用人 hESC-MS C 培养液重悬细胞,按 1:6 比例接种。次日观察人 hESC-MS C 贴壁情况,每三天更换 hESC-MS C 培养液。一般 3 ~ 5 d 可传代一次,hESC-MS C 可稳定传代 20 次及以上。

1.2 hESC-MS C 细胞冻存和复苏

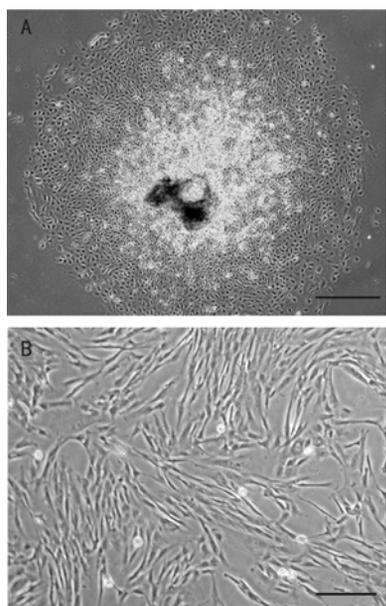
1.2.1 细胞冻存 当细胞增殖密度为 70% ~ 90% 时冻存,冻存液(40% FBS,20% DMSO,低糖 DMEM)从 -20 $^{\circ}$ C 取出,4 $^{\circ}$ C 解冻。细胞如上述经胰酶消化离心后,去上清液,用 hESC-MS C 培养液将细胞重悬。细胞冻存密度为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6/\text{mL}$ 及以上,每个冻存管分装 1 mL,每管各加 500 μL 冻存液。将细胞放至梯度降温冻存盒内,-80 $^{\circ}$ C 冻存过夜,于液氮中长期保存。

1.2.2 细胞复苏 提前将培养基加至培养皿上,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱预热,将细胞冻存管从液氮罐中取出后,快速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中,当 hESC-MS C 悬液融解至 50% 时(1 min 之内),将悬液转移到离心管内,加入 9 倍体积的 hESC-MS C 培养液,200 $\times g$ 离心 5 min 后吸去上清液,加入适量 hESC-MS C 培养液重悬后接种于培养皿上。

1.3 hESC-MS C 的质量控制

1.3.1 细胞形态 ESC 贴壁分化第 1 代时(图 1A),细胞应贴壁生长,呈现不同细胞形态;hESC-MS C 传至第 2 代时,细胞应贴壁生长,形态均一(同质性超过 95%),呈长梭形及不规则三角形(图 1B),形态与骨髓来源 MSC(bMSC)及脂肪来源 MSC(ADSC)类似。

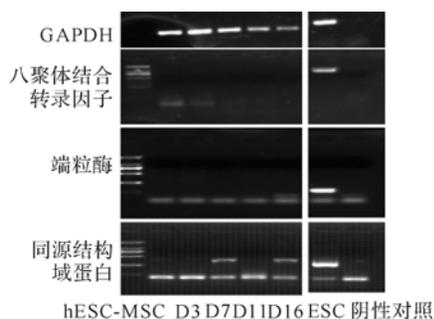
1.3.2 标志基因的表达 Trizol 法提取人 hESC-MS C 及 ESC 总 RNA,取 1 μg 总 RNA 用于 RT-PCR 及定量 PCR 检测。保持未分化状态的 hESC-MS C 高表达人 MSC 相关基因,表达 I 型胶原(COL I)基因、成纤维细胞标志基因波形蛋白(VIM)基因^[16,19],不表达或低表达 ESC 干性关键转录因子八聚体结合转录因子(OCT4)、同源结构域蛋白(NANOG)、端粒酶(TELOMERASE)基因(图 2)^[15-17,19],不表达分化基因 II 型胶原(COL



A: 第1代 ESC 细胞贴壁生长, 呈现不同细胞形态(倒置相差显微镜观察, 标尺 = 200 μm); B: 第2代 hESC-MSC 呈长梭形或不规则三角形, 细胞形态均一(倒置相差显微镜观察, 标尺 = 50 μm).

图1 ESC 向 MSC 分化克隆形态

Figure 1 Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells



D3 ~ D16; 诱导 hESC-MSC 形成细胞片的时间。

图2 hESC-MSC 向肌腱细胞分化标志物的基因检测

Figure 2 human embryonic stem cells-mesenchymal stem cells engineered tendons do not express ESC markers

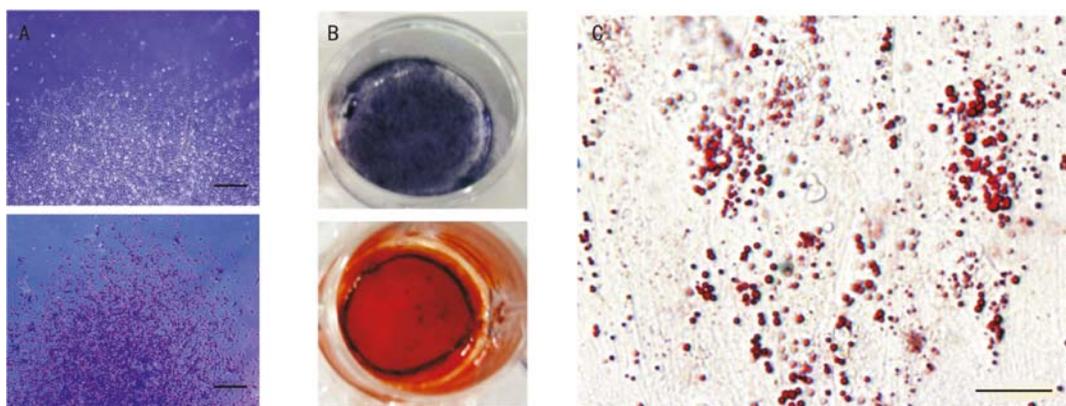
II) 基因、ALP 基因、骨钙素(OCN)基因^[19]。

1.3.3 标志蛋白的表达 将人 hESC-MSC 用 4% 多聚甲醛固定后做免疫荧光染色和流式细胞术分析, 并以人 bMSC 作为阳性对照。已知正常人来源的 MSC 不表达 OCT4、NANOG 和造血细胞标志物 CD45 及 CD34, 高表达成纤维细胞标志物 VIM^[16,19] 和间充质干细胞标志物 CD44、CD90 和 CD105^[20]。与人 MSC 类似, hESC-MSC 应不表达

或低表达 OCT4、NANOG^[15]、CD45 及 CD34, 高表达 VIM、基质细胞抗原(STRO-1)、CD29、CD44、CD90、CD105 和 CD146^[16,19]。

1.3.4 单克隆形成能力检测 hESC-MSC 具有 bMSC 和 ADSC 类似的单克隆形成能力, 使用第 6~9 代单层培养获得的 hESC-MSC。细胞以 $2 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度接种在直径为 10 cm 的培养皿中, 并培养 14~20 d, 1% 结晶紫染色可见 hESC-MSC 形成单克隆, 见图 3A。计数其克隆形成效率, 其克隆形成效率与 bMSC 类似^[16]。

1.3.5 多潜能分化能力鉴定^[16,19] ①鉴定成骨分化。收集消化后细胞, 按 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 换用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液, 加入成骨诱导体系 1×10^{-7} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 g/mL 抗坏血酸磷酸盐, 每三天换液一次, 维持 2~3 周。用 ALP 试剂盒及茜素红染色检测成骨细胞分化(见图 3B), 定量 PCR 检测骨分化相关基因 Runx2、OCN 的表达上调。②鉴定成脂分化。收集消化后细胞, 按 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 换用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液, 加入脂肪诱导液(0.5 mmol/L 1- α -甲基-3-异丁基黄嘌呤, 1 mmol/L 地塞米松, 10 g/mL 胰岛素和 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛), 维持两周, 每三天换液一次。油红 O 染色后倒置相差显微镜下观察细胞内脂肪小滴形成情况(图 3C)。③鉴定成软骨分化。收集消化后细胞, $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ MSC + 0.5 mL 含 TGF- β 1 体系软骨诱导液(含胰岛素 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 转铁蛋白 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 亚硒酸 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白, 1 mmol/L 丙酮酸盐, 50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸磷酸盐, 1×10^{-7} mol/L 地塞米松, 2.5% FBS, 10 ng/mL TGF- β 1), 加入 15 mL 聚丙烯管中, 200 $\times g$ 离心 5 min, 将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养 24 h, 2~3 d 换液一次, 3 周后组织切片, 用 HE 及番红染色。定量 PCR 检测软骨分化相关基因 SRY 促 HMG 盒 9 (Sox9)、聚集蛋白聚糖 (aggrecan) 的表达上调。④微生物及内毒素测定。方法同人 ESC 测定方法。此外, 如 ES-T 来源于使用 MEF 滋养层培养法培养的人 ESC, 则需进行小鼠源性病毒的全面检测; 细胞培养过程中如使用 FBS, 需进行牛源特定病毒的检测; 传代过程中如使用胰酶等猪源材料, 至少应检测猪源细小病毒。



A: hESC-MSC 形成单克隆, 细胞呈克隆样生长(倒置相差显微镜, 标尺 = 500 μm); B: ALP 及茜素红染色可见红色钙结节, 显示成骨分化; C: 油红 O 染色可见细胞内红色油滴, 显示成脂分化(倒置相差显微镜, 标尺 = 20 μm)。

图 3 hESC-MSC 增殖及多向分化潜能检测

Figure 3 Proliferation and differentiation potential of human embryonic stem cells-mesenchymal stem cells

2 第二步:hESC-MSC 向肌腱细胞的分化方法

肌腱细胞的分化方法采用高密度种植形成无支架组织工程肌腱, 并利用静态或动态力学刺激在体内外环境诱导成肌腱。

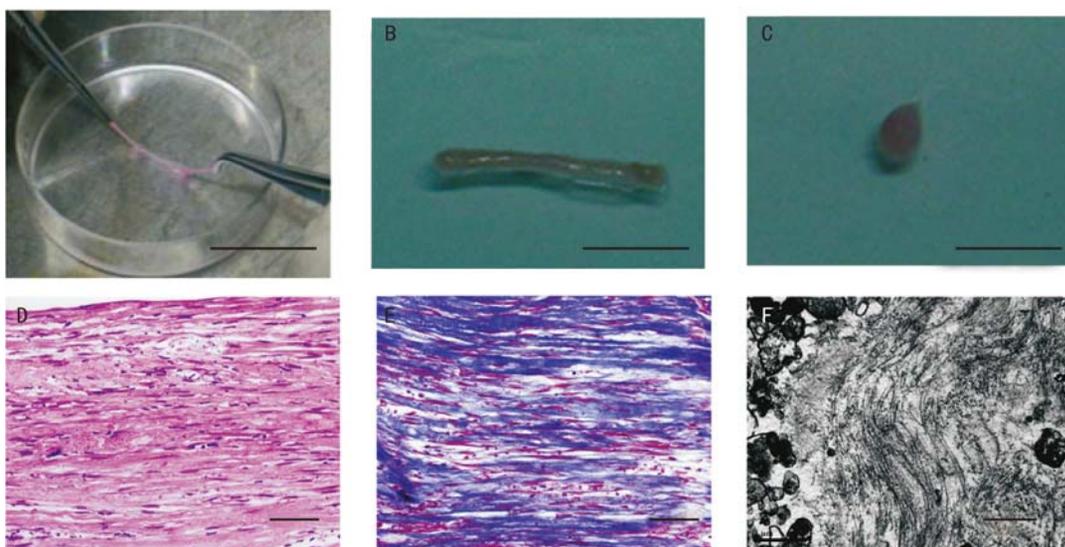
2.1 无支架组织工程肌腱的制备

常规培养 hESC-MSC, 培养基中加入 50 g/mL 维生素 C, 防止细胞老化和促进细胞外基质分泌。三天更换一次培养基, 培养 2~3 周后细胞分泌的细胞外基质逐渐累积和细胞一起在培养皿底部形成连续的细胞片。当细胞片形成后, 可以从培养

板上分离下来, 用 1 mL 枪头尖端沿培养皿的一边, 用向上剪切力慢慢卷起细胞片, 形成长条形组织。继续培养一周, 使细胞片光滑面与粗糙面充分融合形成组织工程肌腱。组织学检测组织工程肌腱的结构特征, 透射电镜检测其胶原纤维形成情况。详见图 4。

2.2 体外力学刺激诱导 hESC-MSC 肌腱分化

将组织工程肌腱两端固定在架子两端, 拉伸 10%。以静态力学或者动态力学刺激培养 14 d 后, 可形成长条形肌腱(图 4A, 4B), 未经力学刺激的大体形态见图 4C; 组织化学染色结果显示该



A: 卷起连续的细胞片构建组织工程肌腱; B: 组织工程肌腱体外静态力学刺激两周后组织形态; C: 组织工程肌腱体外未经力学刺激的大体形态; 标尺 = 1 cm。D 和 E: 光镜下观察力学刺激两周后组织工程肌腱经 HE 染色(D)和 Masson 三色染色(E)均可见大量梭形细胞和胶原纤维束, 标尺 = 50 μm 。F: 机械应力两周后, 透射电镜下观察组织工程肌腱纵切面可见波浪状的胶原纤维, 标尺 = 1 μm 。

图 4 hESC-MSC 向肌腱细胞的分化过程中大体形态和组织学表现^[15]

Figure 4 *In vitro* construction of engineered tendon using human embryonic stem cells-mesenchymal stem cells

组织中胶原束和大量梭形细胞沿拉力方向排列(图4D,4E),电镜下呈波浪状(图4F)。

2.3 体内动态力学刺激诱导 hESC-MSC 肌腱分化

将长约 3 cm 的组织工程肌腱两端缝合在裸鼠背部的脊上韧带,位于项筋膜的第十胸椎水平和骶棘肌筋膜的第十二骶椎水平。鼠的活动可为组织工程肌腱提供体内循环机械刺激。4 周后可见图 4D、4E、4F 肌腱组织形态学表现。

2.4 hESC-MSC 向肌腱分化的质量控制

2.4.1 细胞及组织形态 细胞在体内外经过力学拉力刺激后变得更加紧密,形成了一条吊带样的组织(图 4B,5A)^[15-16]。HE 染色和 Masson 三色染色结果显示形成了致密的组织,其主要由纺锤形肌腱细胞和波浪状胶原纤维束构成(图 4D,5B)。透射电镜观察显示有类似肌腱组织波浪状的胶原纤维形成(图 4F,5C,5D)。

2.4.2 标志基因的表达 Trizol 法提取诱导后总 RNA 用于定量 PCR 检测。肌腱主要由 I 型胶原组成,肌腱细胞高表达 I 型胶原,其特异表达基因包括肌腱调节素(tenomodulin)、碱性螺旋—环—螺旋转录因子 SCLERAXIS(SCX)、同源异型盒基因 SIX1、眼缺失蛋白 2(EYA2) 和 Eph 受体酪氨

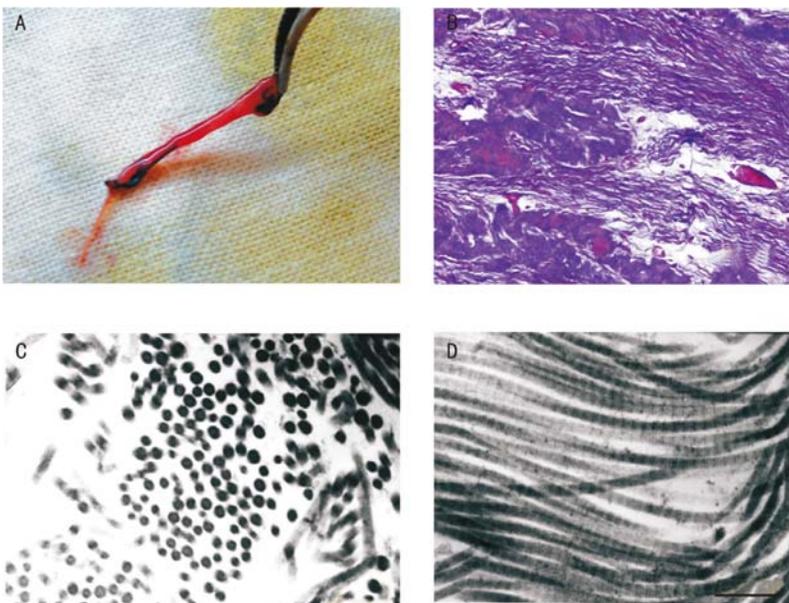
酸激酶 A4(EPHA4)^[21],不表达或低表达 OCT4、NANOG、TELOMERASE 基因(图 2)。因此,诱导后细胞高表达 I a1 型胶原、I a2 型胶原、肌腱调节素、SCX、SIX1、EPHA4 及 EYA2 基因。

2.4.3 标志蛋白的表达 将体内外诱导后形成细胞片的细胞用 4% 多聚甲醛固定后做免疫荧光染色,以正常肌腱干细胞为阳性对照。与人肌腱细胞相似,诱导后细胞应表达 I 型胶原、I4 型胶原、EPHA4 及肌腱调节素,见图 6。

致谢 感谢美国南加州大学奥斯特鲁夫牙科学院颌面分子生物学中心施松涛教授和美国加州大学圣地亚哥分校生物科学部分子生物学系徐洋教授在本共识撰写中提出的宝贵建议!

参考文献

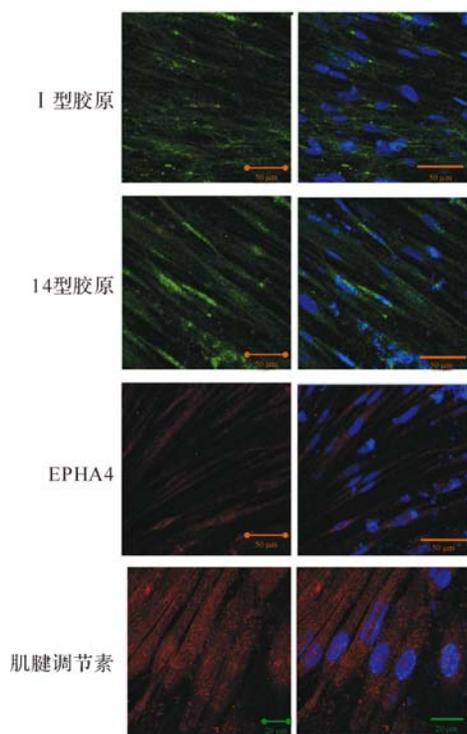
- [1] LJUNGQVIST A, SCHWELLNUS M P, BACHL N, et al. International Olympic Committee consensus statement: molecular basis of connective tissue and muscle injuries in sport[J]. *Clin Sports Med*, 2008, 27(1):231-239.
- [2] CHEN X, SONG X H, YIN Z, et al. Stepwise differentiation of human embryonic stem cells promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(6):1276-1287.
- [3] CHEN X, ZOU X H, YIN G L, et al. Tendon tissue engineering with mesenchymal stem cells and biografts: an option for large tendon defects? [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009, S1: 23-32.
- [4] MURRAY M M. Current status and potential of primary ACL repair[J]. *Clin Sports Med*, 2009, 28(1):51-61.
- [5] GASPAR D, SPANOUES K, HOLLADAY C, et al. Progress in cell-based therapies for tendon repair [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84: 240-256.
- [6] LU P, ZHANG G R, SONG X H, et al. Col V siRNA engineered tenocytes for tendon tissue engineering [J]. *PLoS*



A:力学刺激 4 周后体内异位组织工程肌腱大体形态;B:光镜下观察组织工程肌腱中波浪型胶原纤维束形成;标尺 = 200 μm 。C 和 D:透射电镜下观察体内组织工程肌腱横切面(C)、纵切面(D)的胶原纤维,标尺 = 210 nm。

图 5 组织工程肌腱体内异位移植后大体形态和组织学表现^[16]

Figure 5 *In vivo* remodeling of engineered tendons after ectopic subcutaneous implantation



诱导后 hESC-MSC 表达 I 型胶原、14 型胶原、EPHA4 及肌腱调节素,激光共聚焦显微镜下呈现绿色、红色荧光为目标蛋白,蓝色荧光为细胞核,标尺 = 50 μm 。EPHA4: Eph 受体酪氨酸激酶 A4。

图 6 hESC-MSC 细胞诱导后激光共聚焦显微镜下形态学表现

Figure 6 human embryonic stem cells-mesenchymal stem cells engineered tendons expressed tendon related genes

One, 2011, 6(6):e21154.

- [7] ROLFE K J, IRVINE L M, GROBBELAAR A O, et al. Differential gene expression in response to transforming growth factor-beta1 by fetal and postnatal dermal fibroblasts[J]. **Wound Repair Regen**, 2007, 15(6):897-906.
- [8] HANTASH B M, ZHAO L, KNOWLES J A, et al. Adult and fetal wound healing [J]. **Front Biosci**, 2008, 13: 51-61.
- [9] FANG Z, ZHU T, SHEN W L, et al. Transplantation of fetal instead of adult fibroblasts reduces the probability of ectopic ossification during tendon repair[J]. **Tissue Eng Part A**, 2014, 20(13-14):1815-1826.
- [10] TANG Q M, CHEN J L, SHEN W L, et al. Fetal and adult fibroblasts display intrinsic differences in tendon tissue engineering and regeneration[J]. **Sci Rep**, 2014, 4: 5515. doi:10.1038/spep05515.
- [11] FAVATA M, BEREDJIKLIAN P K, ZGONIS M H, et al. Regenerative properties of fetal sheep tendon are not adversely affected by transplantation into an

adult environment [J]. **J Orthop Res**, 2006, 24(11):2124-2132.

- [12] CARR A J, SMART M J, RAMSDEN C M, et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration [J]. **Trends Neurosci**, 2013, 36(7):385-395.
- [13] YANG G, SI-TAYEB K, CORBINEAU S, et al. Integration-deficient lentivectors: an effective strategy to purify and differentiate human embryonic stem cell-derived hepatic progenitors [J]. **BMC Biol**, 2013, 11: 86. doi:10.1186/1741-7007-11-86.
- [14] MAROOF A M, KEROS S, TYSON J A, et al. Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells[J]. **Cell Stem Cell**, 2013, 12(5): 559-572.
- [15] CHEN X, YIN Z, CHEN J L, et al. Force and scleraxis synergistically promote the commitment of human ES cells derived MSCs to tenocytes [J]. **Sci Rep**, 2012, 2(12):1411-1411.
- [16] CHEN X, SONG X H, YIN Z, et al. Stepwise differentiation of human embryonic stem cells promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors [J]. **Stem Cells**, 2009, 27(6):1276-1287.
- [17] CHEN X, YIN Z, CHEN J L, et al. Scleraxis-overexpressed human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells for tendon tissue engineering with knitted silk-collagen scaffold [J]. **Tissue Eng Part A**, 2014, 20(11-12):1583-1592.
- [18] 傅 歆, 邓旭亮, 李盛林, 等. 人胚胎干细胞向成纤维细胞分化方法的专家共识 [J]. **中华医学杂志**, 2014, 94(40):3130-3134.
- FU Xin, DENG Xuliang, LI Shenglin, et al. Expert consensus on differentiation of human embryonic stem cells into fibroblasts [J]. **Nat Med J China**, 2014, 94(40):3130-3134. (in Chinese)
- [19] BARBERI T, WILLIS L M, SOCCI N D, et al. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells [J]. **PLoS Med**, 2005, 2(6):554-560.
- [20] BI Y, EHIRCHIOU D, KILTS T M, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche [J]. **Nat Med**, 2007, 13(10):1219-1227.
- [21] HOFFMANN A, PELLE G, TURGEMAN G, et al. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells [J]. **J Clin Invest**, 2006, 116(4):940-952.

[本文编辑 沈 敏 周明杰]