

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.010

人脐带间充质干细胞条件培养基联合白藜芦醇对人滋养层细胞的作用*

张 珣¹ 李 惠¹ 章宜芬¹ 范 竞¹ 李长印¹ 蔡金洋^{2Δ}

(1 南京中医药大学附属医院病理科 江苏 南京 210000; 2 南京医科大学 江苏 南京 211166)

摘要 目的:探讨人脐带间充质干细胞条件培养基联合白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞凋亡的影响。**方法:**通过 CCK8 细胞活力检测试剂盒测定白藜芦醇及其与人脐带间充质干细胞条件培养基共同处理人绒毛膜外滋养层细胞 HTR8 后对细胞增殖及活性的影响;细胞迁移试验检测白藜芦醇和人脐带间充质干细胞条件培养基对细胞迁移能力的影响;显微镜观察细胞形态,并用流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化;Western blot 检测白藜芦醇和人脐带间充质干细胞条件培养基对细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 以及迁移相关蛋白 MMP-9 表达的影响。**结果:**白藜芦醇能够抑制 HTR8 细胞增殖,抑制细胞迁移及 MMP-9 蛋白的表达,改变 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达诱导细胞凋亡的作用。而人脐带间充质干细胞条件培养基能够逆转白藜芦醇对细胞的抑制作用。**结论:**人脐带间充质干细胞条件培养基能够通过调控 Bax、Bcl-2、MMP-9 的蛋白表达逆转白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞的抑制作用。人脐带间充质干细胞条件培养基可作为潜在的治疗人绒毛膜外滋养层细胞功能障碍的临床手段,孕妇需要小心使用白藜芦醇。

关键词:白藜芦醇;人脐带间充质干细胞条件培养基;人绒毛膜外滋养层细胞;细胞迁移;细胞凋亡

中图分类号:R-33;R329.2;R331.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1253-06

The Effects of Resveratrol and Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Conditional Medium on Human Chorionic Trophoblast Cells*

ZHANG Xiang¹, LI Hui¹, ZHANG Yi-fen¹, FAN Jing¹, LI Chang-yin¹, CAI Jin-yang^{2Δ}

(1 Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210000, China;

2 Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China)

ABSTRACT Objective: This study was aimed to assess the potential effects of resveratrol and human umbilical cord mesenchymal stem cells conditional medium on human chorionic trophoblast cells. **Methods:** The in vitro cultured HTR8 cells were treated with resveratrol and human umbilical cord mesenchymal stem cells conditional medium. Cell viability was analyzed by CCK8 assay. The cell migration was detected by the cell scratch test. The cell morphology changes were observed by light microscope and the cell apoptosis was detected by flow cytometer. The protein expressions of Bax, Bcl-2 and MMP-9 were measured by Western blot. **Results:** We found that resveratrol inhibited the cell viability and migration of HTR8 cells by decrease the expression of MMP-9. Meanwhile, resveratrol increased the apoptosis of HTR8 cells by inducing the imbalance between Bax and Bcl-2. However, these effects of resveratrol can be reversed by human umbilical cord mesenchymal stem cells conditional medium. **Conclusion:** Human umbilical cord mesenchymal stem cells conditional medium could relieve the inhibitory effect of resveratrol on human chorionic trophoblast cells by regulating the protein expressions of Bax, Bcl-2 and MMP-9. Pregnant women need to be careful when taking resveratrol and human umbilical cord mesenchymal stem cells conditional medium may be a potential therapeutic strategy for the dysfunction of chorionic trophoblast cells.

Key words: Resveratrol; Human umbilical cord mesenchymal stem cells conditional medium; Human chorionic trophoblast cells; Cell migration; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.2; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1253-06

前言

妊娠早期,来源于胎盘的绒毛膜外滋养层细胞侵入子宫蜕膜螺旋小动脉并介导动脉的重塑过程,最终形成低压、高血流量的子宫动脉向胎盘提供血液和营养,这一过程对于促进胎儿

的正常生长发育十分重要^[1-3]。子宫螺旋动脉重塑的缺陷可导致多种临床妊娠并发症,例如早产,先兆子痫和胎儿生长受限等,严重影响母婴健康^[4-6]。脐带作为与胎盘紧密相连的组织,其中含有丰富的具有自我更新以及多向分化潜能的间充质干细胞^[7-9]。有研究表明,脐带间充质干细胞能够分泌多种因子,参与调控

* 基金项目:南京医科大学科技发展基金面上项目(2017NJMU017);江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发[2018]87号);

南京中医药大学中医学优势学科三期项目开放课题(ZYX03KF030)

作者简介:张珣(1984-),女,硕士,助理研究员,主要研究方向:病理学,E-mail: carriezhang2223@163.com

Δ 通讯作者:蔡金洋,男,硕士,实验师,主要研究方向:生殖医学,E-mail: jycail@njmu.edu.cn

(收稿日期:2019-08-31 接受日期:2019-09-25)

细胞的增殖、迁移及血管生成等多种生物学过程^[10-12]。此外,脐带间充质干细胞可能也参与调节人绒毛膜外滋养层细胞的功能,但机制尚不明确^[13]。

白藜芦醇(Resveratrol, Res)是芪类化合物,属于植物中天然合成的非类黄酮多酚类化合物,目前已经在 185 种植物中鉴定到白藜芦醇的存在^[14]。越来越多的研究表明,白藜芦醇具有抗肿瘤、抗氧化、抗糖尿病以及神经保护等诸多作用^[15-17],在临床上被广泛应用。但是,白藜芦醇是否适于孕产妇服用仍存在争议,并且目前尚无白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞功能影响的相关研究。因此,本研究拟联合人脐带间充质干细胞条件培养基探讨白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞功能的影响。

1 材料方法

1.1 材料

人绒毛膜外滋养层细胞 HRT-8 购自上海哲哉生物科技有限公司。脐带标本由南医科大学附属逸夫医院提供,经产妇及家属知情同意,并经医院伦理委员会批准,采集足月剖宫产健康婴儿脐带组织。

1.2 主要试剂和仪器

白藜芦醇(MCE 公司);胎牛血清、 α -MEM (Gibco 公司);DMEM 高糖培养基(Gibco 公司);PBS(广州洁特生物);胰酶消化液、蛋白酶抑制剂(Gibco 公司);蛋白 Marker(Bio-rad);RIPA 蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);CCK8 检测试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司);凋亡检测试剂盒及间充质相关蛋白标记物流式抗体(上海翊圣生物科技有限公司);抗人 MMP-9 抗体(Abcam 公司);抗人 Bax 抗体、抗人 Bcl-2 抗体、抗人 Actin 抗体(Proteintech 公司);倒置显微镜(Nikon 公司);Tanon-4500SF 数码化学发光成像系统(上海天能科技有限公司);BioTek Synergy2 酶标仪(BioTek 公司);Eppendorf 5810R 低温离心机(Eppendorf 公司);FACSVerse 流式细胞仪(BD 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 人脐带间充质干细胞的分离、培养及鉴定 取新鲜脐带组织,用含有 1%双抗的 PBS 反复冲洗,去除脐带动静脉及脐带血迹后,将脐带剪成 1 mm $\times$ 1 mm 大小的小块,置于培养皿中,使用含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基,对组织块进行全贴壁培养,待细胞融合度达到 80%以上进行传代,倒置显微镜观察培养细胞的形态及贴壁能力。细胞传至第 5 代,采用流式细胞仪检测人脐带间充质干细胞的细胞阳性标志物 CD44、CD90 及阴性标志物 CD34、CD45。

1.3.2 人脐带间充质干细胞条件培养基的制备 取第 5 代人脐带间充质干细胞进行重悬并将细胞浓度调整为 $5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,取 3 mL 细胞悬液接种于 60 mm 培养皿内,待细胞完全贴壁后更换培养基为无血清 DMEM/F12,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后收集培养基,3000 r/min 离心 20 min,0.22 μm 滤器过滤,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.3.3 白藜芦醇抑制中浓度(IC₅₀)的确定 将人绒毛膜外滋养层细胞 HRT-8 细胞按照 1000/孔的量接种于 96 孔板,按白藜芦醇的浓度随机分为 6 组:(1). Ctrl 组(对照组);加入不含白藜芦醇的完全培养基培养;(2). Res 2.5 μM 组:加入白藜芦醇浓度为 2.5 μM 的完全培养基培养;(3). Res 12.5 μM 组:加

入白藜芦醇浓度为 12.5 μM 的完全培养基培养;(4). Res 25 μM 组:加入白藜芦醇浓度为 25 μM 的完全培养基培养;(5). Res 50 μM 组:加入白藜芦醇浓度为 50 μM 的完全培养基培养;(6). Res 100 μM 组:加入白藜芦醇浓度为 100 μM 的完全培养基培养;按上述方法分为 6 组,每孔加入 200 μL 相应培养基,每组设置 6 个复孔,培养 72 h 后取出,每孔加 10 μL CCK-8 试剂,放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞活力 将人绒毛膜外滋养层细胞 HRT-8 细胞按照 1000/孔的量接种于 96 孔板,按不同处理随机分为 5 组:(1).对照组:加入完全培养基培养;(2). Res 25 μM 组:加入白藜芦醇浓度为 25 μM 的完全培养基培养;(3). Res 25 μM +MSC 40 %组:加入白藜芦醇浓度为 25 μM 且含 40 %人脐带间充质干细胞条件培养基的完全培养基;(4). Res 25 μM +MSC 60 %组:加入白藜芦醇浓度为 25 μM 且含 60 %人脐带间充质干细胞条件培养基的完全培养基;(5). Res 25 μM +MSC 80 %组:加入白藜芦醇浓度为 25 μM 且含 80 %人脐带间充质干细胞条件培养基的完全培养基。按上述方法分为 5 组,每孔加入 200 μL 相应培养基,每组设置 6 个复孔,在 72 h 后取出,每孔加 10 μL CCK-8 试剂后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值。

1.3.5 流式检测细胞凋亡 将人绒毛膜外滋养层细胞 HRT-8 细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h 后按上述方法随机分为 5 组,并更换为对应培养基培养,培养 48 h 后,使用 0.25 %胰蛋白酶消化,收集细胞,按试剂盒说明书操作,常规离心收集各组细胞,每份细胞标本总数达到 3×10^5 以上。用预冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次后加入 500 mL 缓冲液重悬细胞和 5 μL FITC 标记的 Annexin V 试剂混匀后,再加入 5 μL PI,混匀后避光条件下室温孵育 15 min。1 h 内用流式细胞仪检测 5 组细胞的凋亡率。

1.3.6 细胞迁移实验 取 HRT-8 细胞接种于 6 孔板内,待细胞融合达 90%左右时,按上述方法随机分为 5 组,用 200 μL 枪头在每孔细胞中央划一横线,并更换为对应无血清培养基培养,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 后于倒置相差显微镜下观察细胞迁移情况并拍照。

1.3.7 Western blot 将 HRT-8 细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h 后。按上述方法随机分为 5 组,并更换为对应培养基培养,48 h 后,提取总蛋白后测定蛋白的浓度。SDS-PAGE 分离蛋白并转至 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭后,加入抗人的 MMP9 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体(均为 1:1000 稀释)以及 Actin 抗体(1:2000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜,漂洗再加二抗,发光显影。采用图像分析软件对条带进行灰度分析,量化表达的蛋白。

1.4 数据分析

统计学方法采用 Graphpad Prism6 统计软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,采用 t 检验,显著性差异采用单因素方差分析。 $*P<0.05$ 具有统计学意义上的差异; $**P<0.01$ 具有显著性差异; $***P<0.001$ 具有极显著性差异。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞鉴定

为了制备人脐带间充质干细胞的条件培养基,我们首先分

离纯化人脐带间充质干细胞,并用流式细胞仪检测间充质干细胞的阳性标志物 CD44、CD90 及阴性标志物 CD34、CD45 的表达情况。结果显示,分离纯化获得的人脐带间充质干细胞高表

达细胞阳性标志 CD44、CD90,不表达阴性标志物 CD34、CD45 (见图 1)。

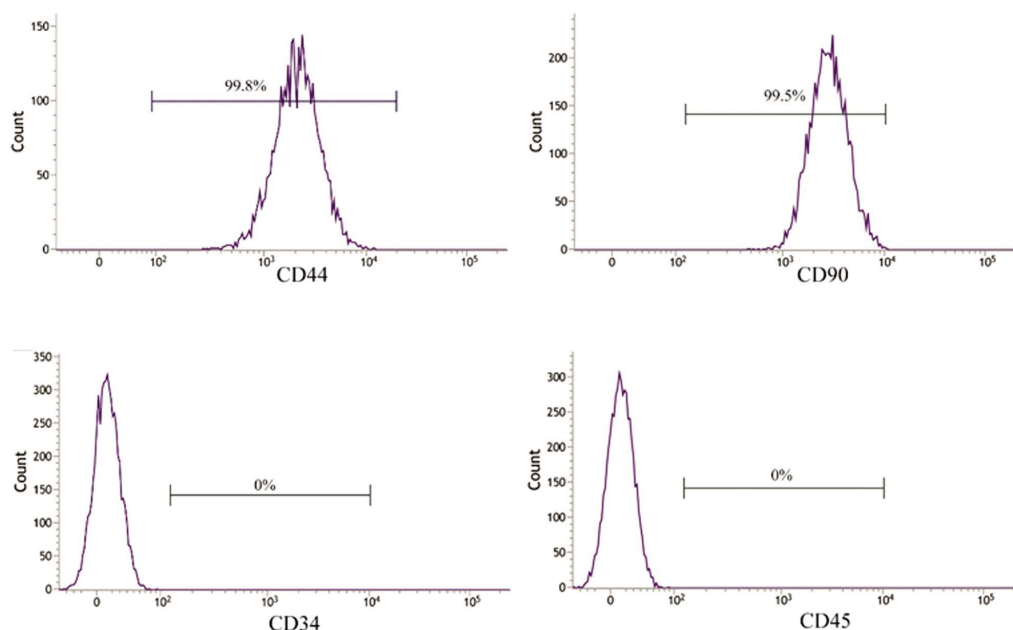


图 1 人脐带来源的间充质干细胞的流式鉴定

Fig.1 Flow cytometry identification of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

2.2 人脐带间充质干细胞的条件培养基能够挽救白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞活力的抑制作用

为了检测白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞的影响,我们首先通过 CCK8 细胞活力实验确定白藜芦醇的使用剂量。结果显示,与空白对照组相比,白藜芦醇处理能够显著抑制人绒毛膜外滋养层细胞的细胞活力,并且其抑制效应呈剂量依赖性,随着白藜芦醇浓度的升高,抑制效果逐渐增强,25 μM 为白藜

芦醇的抑制中浓度(IC_{50})(见图 2)。接着,我们采用 CCK8 细胞活力实验探究联合使用人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞活力的影响,结果显示,随着人脐带间充质干细胞的条件培养基的浓度逐渐升高(40%、60%、80%),白藜芦醇对于人绒毛膜外滋养层细胞活力的抑制作用逐渐减弱(见图 3)。

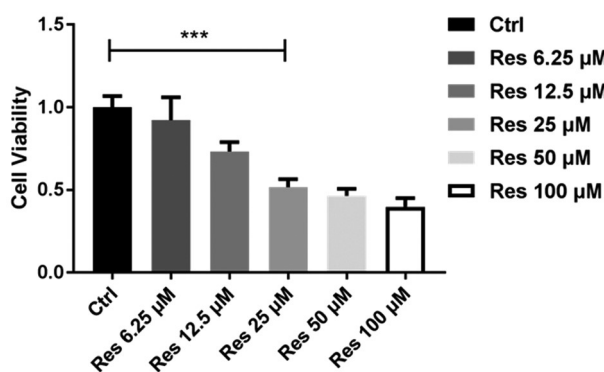


图 2 白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞抑制中浓度的确定

Fig.2 Determination of semi-inhibitory concentration of resveratrol on human chorionic trophoblast cells

Note: Detection of cell viability by CCK-8. *** $P<0.001$.

2.3 人脐带间充质干细胞的条件培养基能够挽救白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞迁移的抑制作用

人绒毛膜外滋养层细胞的迁移能力对于其侵入子宫蜕膜螺旋小动脉并介导动脉的重塑过程至关重要^[18,19],因此,我们研究了白藜芦醇以及人脐带间充质干细胞条件性培养基对于人绒毛膜外滋养层细胞迁移能力的影响。结果显示,相比于对照

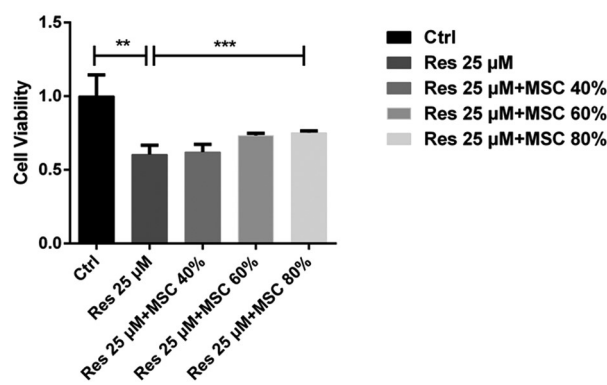


图 3 人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞活力的影响

Fig.3 Effect of conditioned medium of human umbilical cord mesenchymal stem cells and resveratrol on viability of human chorionic trophoblast cells

Note: Detection of cell viability by CCK-8. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

组细胞,白藜芦醇处理组细胞的迁移能力明显受到抑制,当加入不同浓度(40%、60%、80%)的人脐带间充质干细胞条件性培养基后,相比于白藜芦醇处理组细胞,随着人脐带间充质干细胞条件性培养基浓度的升高,人绒毛膜外滋养层细胞的迁移能力逐渐恢复(见图 4)。

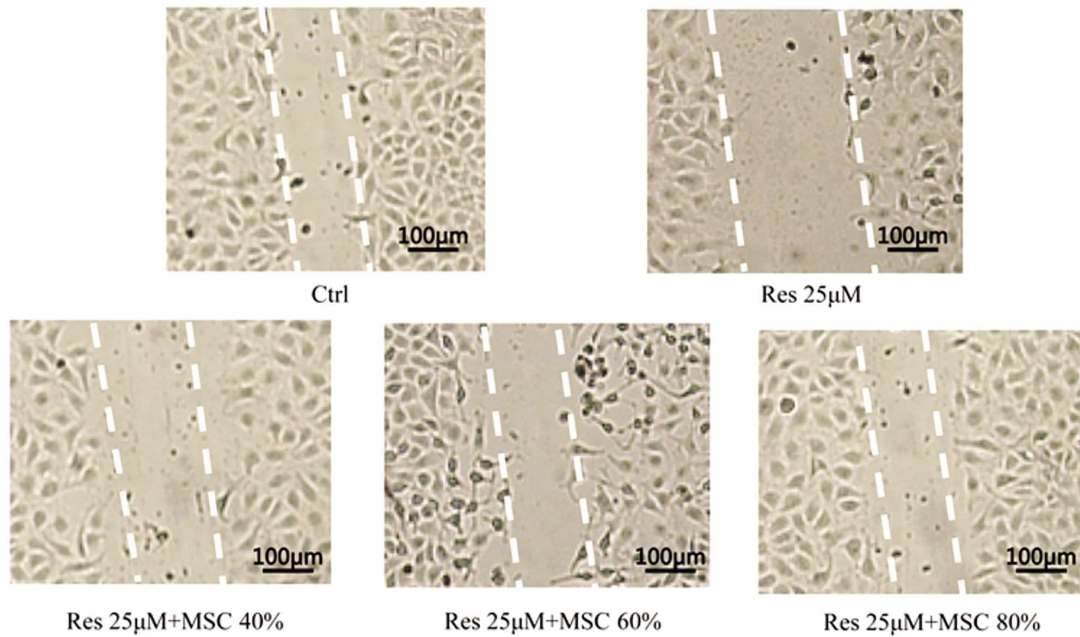


图4 人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞迁移的影响

Fig.4 Effects of conditioned medium of human umbilical cord mesenchymal stem cells and resveratrol on migration of human chorionic trophoblast cells

2.4 人脐带间充质干细胞的条件培养基降低白藜芦醇处理对细胞形态产生的影响

与此同时,我们对上述处理后人绒毛膜外滋养层细胞进行形态学观察,结果发现,相比于空白对照组,单独使用 25 μ M Res 处理后,呈现细胞凋亡的形态学特征,贴壁细胞量减少,细

胞皱缩、变圆、脱落。而联合使用人脐带间充质干细胞的条件培养基和 Res 后,随着加入的人脐带间充质干细胞的条件培养基浓度的升高(40 %、60 %、80 %),细胞的形态逐渐恢复正常(见图5)。

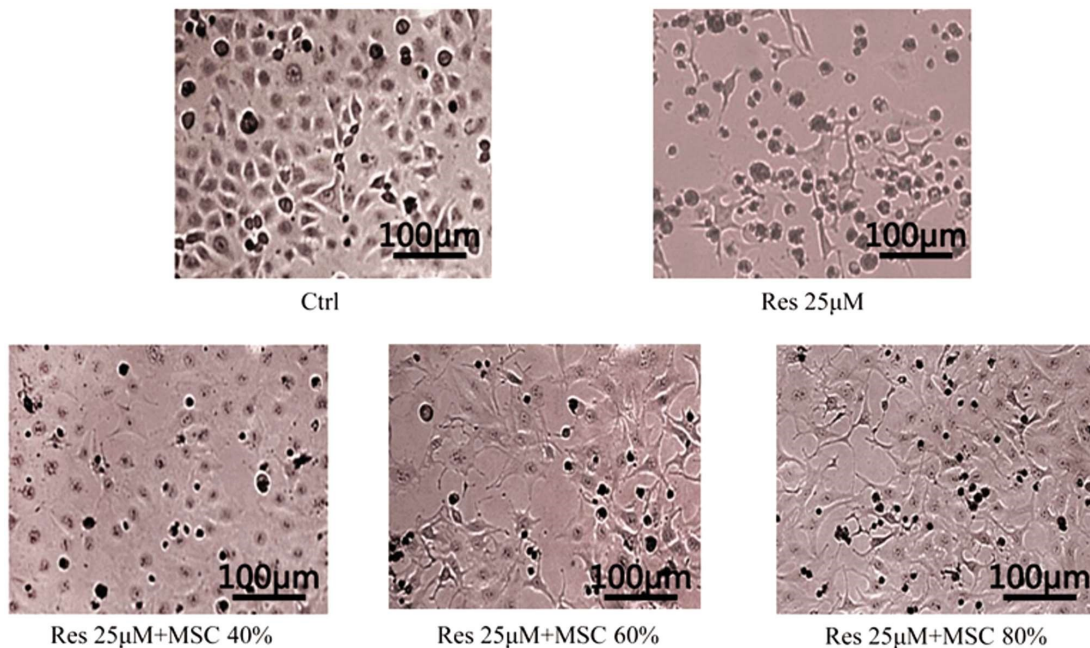


图5 人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞形态的影响

Fig.5 Effects of conditioned medium of human umbilical cord mesenchymal stem cells and resveratrol on the morphology of human chorionic trophoblast cells

2.5 人脐带间充质干细胞的条件培养基降低白藜芦醇处理对细胞凋亡的影响

为了进一步验证形态学的实验结果,我们使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞凋亡的影响。结果显

示,与空白对照组相比,单独使用 25 μ M Res 处理后,细胞凋亡比例显著升高,而联合使用人脐带间充质干细胞的条件培养基和 Res 后,随着加入的人脐带间充质干细胞的条件培养基浓度的升高(40 %、60 %、80 %),细胞的凋亡比例逐渐下降(见图6)。

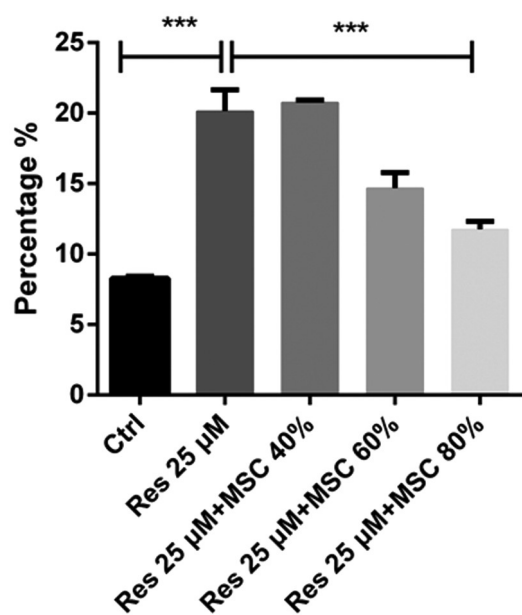


图6 人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of conditioned medium of human umbilical cord mesenchymal stem cells and resveratrol on apoptosis of human chorionic trophoblast cells

Note: Detection of cell apoptosis by flow cytometry. *** $P < 0.001$.

2.6 人脐带间充质干细胞的条件培养基能够逆转白藜芦醇处理对细胞凋亡、迁移相关蛋白表达的影响

接着,我们采用 Western blot 试验进一步探究人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞功能影响的分子机制。结果显示,单独白藜芦醇处理组,促凋亡蛋白 Bax 的表达量显著升高,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著降低,且与细胞迁移侵袭相关的 MMP9 蛋白的表达量也显著降低。当联合使用人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇后,随着人脐带间充质干细胞的条件培养基浓度的升高(40%, 60%, 80%),促凋亡蛋白 Bax 的表达量逐渐降低,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量以及与细胞迁移侵袭相关的 MMP9 蛋白的表达量逐渐升高(见图7)。

3 讨论

白藜芦醇在妊娠孕产妇中的作用一直存在争议, Nagarkatti 等人研究发现,白藜芦醇能够保护孕妇和胎儿免于四氯二苯并-p-二恶英(TCDD)引起的免疫毒性的影响,白藜芦醇在体内作为芳香烃受体拮抗剂,中和 TCDD 引起的多脏器细胞凋亡损伤^[20]。Davidge 等人研究发现,在缺氧大鼠模型中,母鼠妊娠过程中给予白藜芦醇处理能够改善不良妊娠结局,白藜芦醇处理后,死胎率由 45%降低至 5%,且白藜芦醇处理后并不影响大鼠胎儿的器官发育^[21]。Frias 等人研究发现,妊娠期间使用白藜芦醇补剂在给母体带来好处的同时可能对胎儿存在潜在风险^[22],使用白藜芦醇补剂后,能够降低高脂饮食雌性日本猕猴的孕前体重,提高猕猴对胰岛素的敏感性和降低胎盘炎症,但是出现胎儿胰腺肿大且增殖迅速的现象。而目前关于白藜芦醇对于胎盘发育的研究相对较少。我们的研究表明,白藜芦醇能够显著抑制人绒毛膜外滋养层细胞的细胞活力,其半抑

制浓度为 25 μ M。并且,白藜芦醇能够抑制人绒毛膜外滋养层细胞的细胞迁移,促进细胞凋亡。以上结果提示,在妊娠期服用白藜芦醇可能存在一定的风险,可能影响螺旋动脉的重塑而影响胎盘的植入。

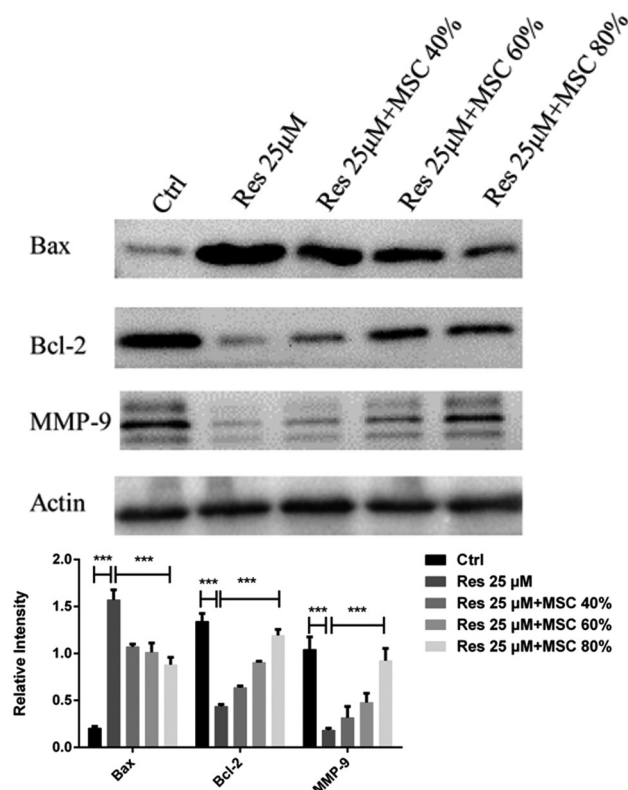


图7 人脐带间充质干细胞的条件培养基和白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞迁移、凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of conditioned medium of human umbilical cord mesenchymal stem cells and resveratrol on migration and expression of apoptosis-related proteins in human chorionic trophoblast cells

Note: The protein levels of Bax, Bcl-2 and MMP-9 by Western blot.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

联合使用人脐带间充质干细胞条件性培养基后,能够明显改善由白藜芦醇诱导的人绒毛膜外滋养层细胞的细胞活力、细胞迁移的抑制作用,并能够显著降低凋亡水平。这一结果一方面揭示了白藜芦醇的体内研究并没有体现出对胎盘植入产生明显影响的原因,另一方面也进一步证实了人脐带中富含的间充质干细胞能够分泌一些因子,促进胎盘的发育过程,逆转外界不良因素对胎盘的影响。研究表明,人脐带间充质干细胞的功能主要包括:减少 IL-1 β 等促炎症因子的分泌,激活 AKT/mTOR 信号通路抑制人上皮细胞细胞的凋亡^[23];分泌可溶性因子改善辐射引起的鼻粘膜损伤^[24];人通过 TLR4/NF- κ B 信号通路减少炎症和减轻肾纤维化水平^[25];减弱单侧输尿管梗阻大鼠模型中肾间质纤维化的程度并抑制肾小管上皮细胞的凋亡促进其增殖^[26]。以上的研究与本文的研究结果一致,有助于进一步理解人脐带间充质干细胞条件培养基逆转白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞抑制作用的可能分子机制,而人脐带间充质干细胞条件培养基中的功能性的有益成分需要进一步探究。

综上所述,白藜芦醇能够抑制人绒毛膜外滋养层细胞的细胞活力、细胞迁移并会诱导细胞凋亡,而人脐带间充质干细胞

的条件培养基能够逆转白藜芦醇对人绒毛膜外滋养层细胞活力和迁移的抑制作用,降低细胞的凋亡水平。本研究将为白藜芦醇在孕产妇中的应用提供一定的指导意义,并为人脐带间充质干细胞及其条件培养基用于临床相关疾病治疗奠定一定的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP, et al. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 349(2): 138-144
- [2] Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies [J]. *Placenta*, 2006, 27(9-10): 939-958
- [3] Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Early Development of the Human Placenta[J]. *Pathol Hum Placenta*, 2000, 32(5): 42-49
- [4] Lyall F, Bulmer J, Pijnenborg R, et al. L3. Trophoblast invasion and spiral artery transformation in pre-eclampsia and fetal growth restriction[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2011, 1(3-4): 239-240
- [5] Barrientos G, Pussetto M, Rose M, et al. Defective trophoblast invasion underlies fetal growth restriction and preeclampsia-like symptoms in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat [J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(7): 509-519
- [6] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1-2): 233-238
- [7] 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
- [8] Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 50-60
- [9] Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 781-792
- [10] Ayuzawa R, Doi C, Rachakatla RS, et al. Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(1): 31-37
- [11] Ganta C, Chiyo D, Ayuzawa R, et al. Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation[J]. *Cancer research*, 2009, 69(5): 1815-1820
- [12] Maurya DK, Doi C, Kawabata A, et al. Therapy with un-engineered naive rat umbilical cord matrix stem cells markedly inhibits growth of murine lung adenocarcinoma[J]. *BMC cancer*, 2010, 10: 590
- [13] Huang Y, Wu Y, Chang X, et al. Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Human Trophoblast Cell Functions In Vitro [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 9156731
- [14] Riviere C, Pawlus AD, Merillon JM. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(11): 1317-1333
- [15] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 337-342
- [16] Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudoux JL. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(1): 7-21
- [17] Oyenih O, Oyenih AB, Adeyanju AA, et al. Antidiabetic Effects of Resveratrol: The Way Forward in Its Clinical Utility [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 9737483
- [18] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1592-1594
- [19] Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, et al. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy [J]. *Placenta*, 1980, 1(1): 3-19
- [20] Singh NP, Singh US, Nagarkatti M, et al. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) protects pregnant mother and fetus from the immunotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(2): 209-219
- [21] Bourque SL, Dolinsky VW, Dyck JR, et al. Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia[J]. *Placenta*, 2012, 33(5): 449-452
- [22] Frias A, Roberts V, Pound L, et al. Resveratrol supplementation during pregnancy: maternal and placental benefits with a potential fetal risk [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014, 210(1): S4
- [23] Xie J, Liu B, Chen J, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviated inflammation and inhibited apoptosis in interstitial cystitis via AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 546-552
- [24] Duan HG, Ji F, Zheng CQ, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells improves nasal mucosa damage by radiation [J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(6): 999-1007
- [25] Liu B, Ding F, Hu D, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium attenuates renal fibrosis by reducing inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition via the TLR4/NF-kappaB signaling pathway in vivo and in vitro [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 7
- [26] Liu B, Ding FX, Liu Y, et al. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium Attenuate Interstitial Fibrosis and Stimulate the Repair of Tubular Epithelial Cells in an Irreversible Model of Unilateral Ureteral Obstruction [J]. *Nephrology*, 2017, 23(8): 728-736