

# 人骨髓间充质干细胞分离培养方法的改进\*★

王承云<sup>1</sup>, 石磊<sup>2</sup>, 夏春<sup>2</sup>, 郑欣鹏<sup>3</sup>, 张兵<sup>3</sup>, 林飞太<sup>3</sup>, 王少杰<sup>2</sup>

## Improvement of methods to isolate and culture human mesenchymal stem cells

Wang Cheng-yun<sup>1</sup>, Shi Lei<sup>2</sup>, Xia Chun<sup>2</sup>, Zheng Xin-peng<sup>2</sup>, Zhang Bing<sup>3</sup>, Lin Fei-tai<sup>3</sup>, Wang Shao-jie<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The methods to isolate mesenchymal stem cells (MSCs) can be classified to be several kinds. However, the method of acquisition in surgery is still less. The isolated MSCs from the patients who receive the replacement operation can offer some data which may reveal the causes or clues of some diseases.

**OBJECTIVE:** To isolate and culture MSCs with an improved technique of differential anchoring velocity and adherence, in order to identify MSCs.

**METHODS:** The bone marrow blood was collected in the femur marrow cavity during the hip joint replacement. MSCs were isolated by adherence method in the special medium and the mix medium was flushed 36-48 hours after the inoculation to isolate MSCs from the marrow mixture. In the long-time culture *in vitro*, the special medium was used to weed other cells out. The anchored cell was cultured and identified when the amount was large enough.

**RESULTS AND CONCLUSION:** MSCs can be isolated from the bone marrow in long cavitas medullaris, and can be cultured into colonies by using adherence method. The morphological features and surface molecules are identified consistent with MSCs, and can obtain standard MSCs, so as to do the follow-up experiment.

Wang CY, Shi L, Xia C, Zheng XP, Zhang B, Lin FT, Wang SJ Improvement of methods to isolate and culture human mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(32): 5896-5900. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 当前分离培养骨髓间充质干细胞方法的有多种,但在外科手术中进行获取的方法仍然较少,而外科分离所得细胞对于相应疾病的具有揭示原因和提供研究线索的价值。

**目的:** 在骨科手术中以直接贴壁差速贴壁分离培养纯化与鉴定骨髓间充质干细胞。

**方法:** 在骨科关节置换等大手术中吸取少量人骨髓血,采用直接贴壁法分离骨髓间充质干细胞,在贴壁后 36-48 h 行洗盘处理,并通过长期体外培养,特定培养基自身的筛选作用对细胞进行筛选,当细胞生长达到足量时进行鉴定。

**结果与结论:** 采用直接贴壁法能够在长骨髓腔内混合血中分离培养骨髓间充质干细胞并形成集落,其形态学表现和表面分子经鉴定符合骨髓间充质干细胞特点,能够获得符合要求的人骨髓间充质干细胞,从而进行后续实验。

**关键词:** 人骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 鉴定; 流式细胞术; 干细胞分离与培养

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.32.002

王承云, 石磊, 夏春, 郑欣鹏, 张兵, 林飞太, 王少杰. 人骨髓间充质干细胞分离培养方法的改进[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32):5896-5900. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

干细胞研究是当前基础研究的重要方向。通常干细胞分为两类,即胚胎干细胞和成体干细胞。为避免相关研究带来伦理学方面的压力,成体干细胞往往是当前研究的一个主要方向。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓基质细胞中具有多向分化潜能的成体干细胞,它可以向骨、软骨、肌组织、脂肪、神经等多种组织分化<sup>[1-4]</sup>,因其干细胞突出的优越性成为包括骨组织工程种子细胞在内的理想来源,成为干细胞研究的热点。近年来国内外学者对其成骨诱导的生物学特性及在骨组织工程中的应用进行了广泛而深入的研究<sup>[5]</sup>。对于该细胞的分离培养,业已形成了较为成熟的一套方法<sup>[6-8]</sup>。作者根据课题要求,结合本临

床科室的工作特点,以在髋关节置换过程中取股骨髓腔内骨髓血为主的混合物进行BMSCs的分离培养方式获得BMSCs,以期对骨科手术中获取BMSCs的方法予以补充和完善,为更进一步的干细胞研究提供参考。

## 1 对象和方法

**设计:** 细胞学体外观察。

**时间和地点:** 于2010-01/11在厦门大学医学院/厦门大学附属中山医院完成。

**对象:** 选择2010-02/11间在厦门大学附属中山医院骨科11例股骨头坏死患者作为实验组,其中男10例,女1例;平均年龄52.13(39~71)岁;Ficat分期自II~V期不等;在行人工股骨头置换及全髋关节置换过程中获取以骨髓血为主的混合物。以同期股骨颈骨折患者9例为对照组,

其中男7例,女2例;平均年龄65.36(41~79)岁,骨折组患者同样根据病情及手术适应证施行人工股骨头置换及全髋关节置换,术中获取以骨髓血为主的混合物。病程1~7 d。Garden分型I~IV型不等。由实验参与者及骨科各工作组参与手术取材。术前与患者签署知情同意书,并得到医院伦理委员会同意。

#### 实验方法:

**手术取材:**实验组及对照组于手术中截取股骨头后,安置远端假体前行股骨髓腔扩容时挤出骨髓为取材目标。扩髓时根据截断位置不同和个体差异,扩髓所得混合血可出现以脂肪组织为主的淡黄色,亦可呈以血性为主的暗红色,混有脂肪颗粒和骨髓粒,外观更接近于扁骨穿刺抽取所得血样。混合血性状差异大,一般随假体扩髓深入,骨髓血性状逐渐由混有大量骨碎屑,呈细沙样的外观,逐步过渡到暗红色血样,质稍稀,含少量骨髓微粒及脂肪油滴样。个别样本可由于带出较多髓腔内纤维结缔组织和脂肪而髓腔内血量少呈浓稠的黏液态。

由洗手护士在10 mL注射器中吸取肝素钠注射液1 mL(12 500 U:2 mL),润滑针筒后抽取针头后备用。术中扩髓时挤出骨髓腔内容物后用预先装有肝素钠的针筒吸取髓腔内容物,取体积4~7 cm<sup>3</sup>的血性混合物组织。由洗手护士按无菌要求传递到手术台下,将混合有肝素钠的骨髓样本转移入15 mL离心管中,立即封口后送入细胞间备铺盘。

**原代接种:**在60 mm无菌塑料培养皿中加入培养基3 mL,培养基为低糖型DMEM培养基,含体积分数10%超级澳洲胎牛血清,青霉素、链霉素含量为2 U/L。向每盘培养液中加入仅进行抗凝处理的骨髓血样本1 mL,立即混匀后标记批次等信息,放入37 °C恒温冰箱,体积分数5% CO<sub>2</sub>。为保证样品培养阳性率,可以在1个批次的骨髓血样本中铺较多培养盘。实验中通常将一个骨髓血样本原代铺12盘左右,以便后续不同操作时每个操作组内都有较多盘,提高培养率。

**第一次洗盘:**根据时间点不同,将第1次洗盘时间通常分为3个批次,即24, 36, 48 h,该数据的取得与多数文献中关于其他物种骨髓间充质干细胞的贴壁时间及运用密度梯度离心等方法贴壁时换液时间有较大差异<sup>[9-13]</sup>。此外也曾在72 h或更长时间进行首次洗盘,但经统计研究培养未发现改善。

考虑到不同样本中骨髓间充质干细胞的生

长状况等主要参数因患者个体差异性而明显不同,故设计实验时用同一样本在不同时间洗盘,消除其他可能影响结果的因素。将骨髓血接种至培养皿后开始计算,第6, 12, 24, 36, 48, 72小时进行洗盘,观察细胞贴壁的培养阳性数。使得原代培养时铺盘18盘,按不同时间点进行洗盘,每个样本取3盘进行洗盘,洗盘后再经7~10 d的培养,观察各个批次的细胞分离阳性率,进行比较,见表1。

表1 不同初次洗盘时间与细胞培养阳性率之间的关系  
Table 1 Relationship between the first flush time and the positive culture rate

First flush time (h)	Positive numbers	Negative numbers	Total numbers
6	1	17	18
12	3	15	18
24	6	12	18
36	10	8	18
48	10	8	18
72	9	9	18
Total	39	33	72

洗盘时用灭菌PBS缓冲液。每次2 mL,洗涤2次,使培养皿中各个位置的残余血样初步被清洗到后马上吸出,加入培养基4 mL后,放入培养箱中继续培养。

**常规细胞培养基传代:**洗盘后的细胞逐渐形成集落,随着时间推移,集落形成单位缓慢变大,10~14 d可增殖形成大而清晰的细胞集落形成单位,经过换液使视野更加清楚。换液时除完全更换培养基外,通常用PBS缓冲液洗涤培养皿2次,以尽量去除贴壁较差的杂质细胞。

**鉴定步骤:**常用的骨髓间充质干细胞所表达的表面分子标志物有CD29、CD44、CD90等,阴性分子标志物有CD34、CD45等<sup>[14-16]</sup>。将培养良好形态正常的间充质干细胞用胰酶消化吹打下来后进行离心洗涤,再加入PBS再次离心洗涤。将再次洗涤后的细胞加入100 μL PBS后吹打制成悬液,向其加入FITC标记的表面分子抗体5 μL,放置于4 °C冰箱内孵育30 min,即可通过流式细胞仪进行检测鉴定。

原则上每个表面标志物分子都需要设立一个不加荧光抗体的空白对照,同时设立一个结合有FITC荧光但却没有特异性的抗体作为阴性对照。正常情况下,无荧光抗体的空白对照应该呈很低的荧光水平,即本底水平。无特异性结合的荧光FITC阴性对照应该由于没有结合到细胞上,也呈很低水平的荧光反应,只有特

<sup>1</sup> 福建医科大学研究生院,福建省福州市 350108;  
<sup>2</sup> 厦门大学附属中山医院关节外科,福建省厦门市 361004;  
<sup>3</sup> 厦门大学医学院,福建省厦门市 361005

王承云★,男,1983年生,甘肃省兰州市人,汉族,福建医科大学在读硕士,主要从事骨与关节外科基础和临床研究。hanson19830920@126.com

通讯作者:夏春,教授,博士,主任医师,硕士生导师,厦门大学附属中山医院关节外科,福建省厦门市 361000  
Chunxia99@yahoo.com.cn

中图分类号:R394.2  
文献标识码:A  
文章编号:1673-8225(2011)32-05896-05

收稿日期:2011-02-28  
修回日期:2011-03-28  
(20110130009/GW·L)

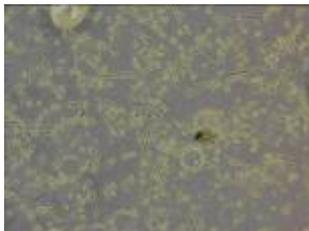
异合性结合有目标细胞上表面抗原的抗体荧光能够表达出较高水平的荧光反应。由于CD29、CD45、CD34、CD90能够公用一个阴性对照，故可以将这4个表面分子结合在一起分析，CD44单独进行阴性对照和空白对照。

**主要观察指标：**BMSCs细胞培养与鉴定结果。

## 2 结果

**2.1 BMSCs细胞分离培养结果** 股骨头坏死组和骨折组的意义在于区别两组细胞在分离纯化培养与鉴定阶段是否存在差异，结果显示两组在细胞培养阶段无差别，且最后分离培养成功率和效率也无统计学差异。间接说明该分离方法对临床上常见髋关节置换适应证的病例，如股骨颈骨折、股骨头坏死等疾病中，分离培养的BMSCs效率是相近的。

原代细胞初次洗盘后再培养3~6 d可见贴壁生长，见图1。



**Figure 1** Appearance of primary adherent cells of mesenchymal stem cells shows typical long spindle. Because of the short time, there are still impurity cells, and the floating fat dots and bone fragment can be seen (x100)

**图1** 骨髓间充质干细胞原代贴壁细胞外观呈典型长梭形，由于筛选作用时间短，周围仍有较多杂质细胞，可见漂浮的油滴及碎骨屑(x100)

表1中所示，按照行x列资料的 $\chi^2$ 检验，可得第36小时组和第48小时组细胞贴壁培养阳性率较其他组大( $P < 0.05$ )，6 h细胞贴壁阳性率小于其他组( $P < 0.05$ )，其余组间比较无显著性意义，暂不能说明贴壁培养率的差异性。72 h洗盘组虽然相对培养率与36 h组和48 h组无差别，但由于骨髓血贴壁时间较长，血细胞贴壁牢固，对后续洗涤和筛选都不利。

经多次换液和洗涤，所得目的细胞形态规则，生长良好，杂质已去除，所以此时易于进行细胞集落形成单位计数和拍照，见图2。

经统计，原代细胞培养23 d可形成(380±95)个细胞集落形成单位/mL，即每(4±2)×10<sup>4</sup>个骨髓间充质干细胞有1个细胞集落形成单位，随着不断换液培养，贴壁细胞增殖速度逐渐加快，各细胞集落形成单位之间逐渐相连，同时细胞形态由稀疏时的多角形变为纺锤状，呈漩

涡状、螺旋状密集排列，见图3。



**Figure 2** After a period time of culture, the impurity cells were reduced, and the mesenchymal stem cells grew into colonies as radial order. Some cells moved out of the colonies and grew in other place (x40)

**图2** 经过进一步的培养周围杂质细胞已明显减少，间充质干细胞呈集落生长，形成中心放射性生长，部分细胞游出集落，在远处贴壁进一步生长(x40)



**Figure 3** After a long time to wipe out the impurity cells, the mesenchymal stem cells grew into big colonies among which they were connected with each other (x40)

**图3** 经过进一步换液筛选杂质细胞明显退化，去除后可见骨髓充质干细胞形态良好，集落生长进一步明显化，呈漩涡状紧密相连(x40)

原代培养20~34 d细胞集落形成单位生长密集，中心出现较密的立方形细胞，提示细胞生长受限，已向垂直纵向排列，此时需进行消化传代，见图4。经统计，细胞平均传代时间为：第1代32.1 d；第2代22.4 d；第3代19.7 d。



**Figure 4** The cells arranged closely, because of the limited space, the appearance of mesenchymal stem cells missed typical long spindle but came into polygon. It is indicated that the growth of cells were restricted, needing passage (x40)

**图4** 视野内细胞排列密集，由于空间拥挤，细胞外观失去长梭形纺锤形样，向垂直方向发展，呈多角形，提示细胞生长受限，需传代处理(x40)

## 2.2 BMSCs鉴定结果 结合FITC的单抗后进行流式

细胞仪检测结果, 见图5~7, 通过本方法培养的骨髓间充质干细胞达到了鉴定要求, 其表面分子标志物确如文献所述, 即CD29、CD44、CD90呈阳性, CD45、CD34呈阴性。表明本方法培养的骨髓间充质干细胞达到了鉴定要求。

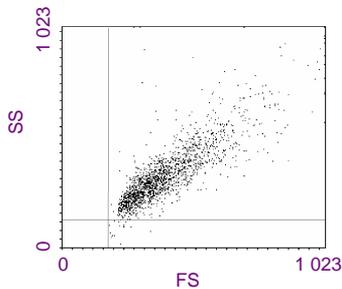
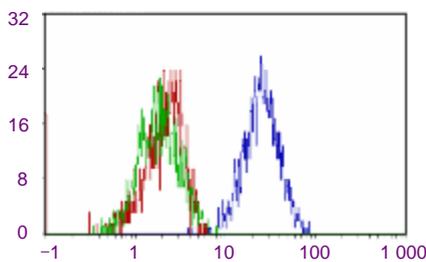
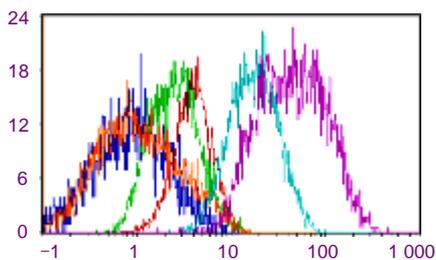


Figure 5 Scatterplot chart of the flow cytometric intraoperative positive CD 44 outcome of mesenchymal stem cells  
图 5 骨髓间充质干细胞 CD44 阳性标志物流式细胞术散点图



The blue line referred to the CD44 marker whose peak was about 12 units. And the blank control and negative control peaked at about 2 units. There was statistical difference between the groups upon which we can draw the conclusion that the CD44 was indeed positive

Figure 6 Histogram of the positive CD44 marker of mesenchymal stem cells  
图 6 骨髓间充质干细胞 CD44 阳性标志物鉴定直方图



The blue line (CD29) and purple line (CD90) had the high peak and mean value. The green line (CD34) and orange line (CD45) had low mean value, which was different from the former two CDs and which was familiar with the controls. The chart stated that the CD29/CD90 were positive and the CD34/CD45 were negative in surface molecular markers

Figure 7 Histogram of the positive markers of CD29 and CD90 of mesenchymal stem cells, the negative markers of CD34 and CD45 of mesenchymal stem cells  
图 7 骨髓间充质干细胞 CD29、CD90 阳性标志物, CD34、CD45 阴性标志物鉴定

### 3 讨论

根据取材对象不同将BMSCs的获取主要划分为3类: 第一, 新生动物或胚胎动物的骨髓。由于动物来源稳定, 且研究取材是不涉及伦理学问题, 故取材技术较为成熟。经长期研究发现, BMSCs的主要生物学指标与取材对象年龄关系较为重要, 故动物取材的优点明显。第二, 流产或引产胎儿骨髓。该方法在获取人类BMSCs方面具有明显优点, 即能取到年龄足够小、生物学活力强的细胞。但主要问题是存在明显的伦理学问题, 相关研究在西方国家存在审查限制。且胎儿由于发育期间形态变化较大, 来源亦不稳定, 取材对象受到了相当的限制。第三, 临床患者骨髓取血分离培养。多为通过扁骨穿刺取红骨髓后, 进行后续处理, 分离培养间充质干细胞。

本实验因课题要求需要取股骨头坏死患者及股骨颈骨折患者股骨髓腔内间充质干细胞。经长时间摸索和调整, 成功取得目的细胞, 不仅提供了获得目的细胞的系统方法和详细操作, 由于取材部位的特殊性, 也为骨科学干细胞研究提供了更为贴近临床疾病病理模型的细胞。

目前BMSCs分离方法有贴壁筛选法、密度梯度离心法、特制培养板筛选法、磁珠分离法等<sup>[11, 15-18]</sup>。特制培养板筛选法比较繁琐, 且分离效果一般, 常规应用不多。磁珠分离法成本较高, 分离效果虽然好, 分离纯度高, 但细胞损失较大, 后续培养往往比较困难; 而且磁珠成分对于细胞是否有毒性作用还有待长期观察统计。密度梯度离心法常规的有Percoll分离液和Ficoll分离法, 原理相同, 都是将骨髓组织用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心, 以去除血细胞成分, 分离液成分有所区别。但密度梯度离心对分离对象有所要求, 需要骨髓血质均一, 无黏稠固体混合物和杂质。本实验曾用Percoll法对多个样本进行密度梯度离心分离干细胞, 但均未获得阳性结果, 推测可能正是因本方法取材的特殊性限制。

全骨髓法是常用的贴壁筛选方法, 必要时用培养液稀释骨髓后直接培养, 通过换液去除血细胞成分而得到骨髓间充质干细胞, 但是由于混杂各种细胞成分, 其分离培养效果需要讨论。在较长时间的培养中, 能够通过培养基筛选的办法进行有效分离。只是所需时间很长, 操作也较繁琐。对于无法用其他方法分离的样本, 是一种值得应用的方法。

鉴于以上原因, 本实验采用贴壁筛选法。因为本培养方法并没有特别的细胞筛选操作, 主要靠细胞培养基的自筛选作用。随着培养的进行, 不适宜的细胞会自行退化, 其贴壁能力较间充质干细胞也明显较差, 经多次传代及洗涤后, 能够有效地将杂质细胞洗涤除去。但在

洗涤过程中仍有一些特点。由于骨科手术中对患者的适应证有一定要求, 故取材患者年龄往往较大, 细胞贴壁能力较弱, 所以总体上在原代细胞培养上, 要遵从“宁少勿多”的洗盘原则, 即保持柔和洗涤, 避免细胞损失, 可以暂不除去杂质细胞。因为原代细胞贴壁较差, 培养皿上还有较多杂质细胞, 也影响细胞贴壁, 容易使目的细胞在洗盘过程中洗脱损失。但经过传代后的间充质干细胞往往有较好的贴壁性能, 且经过较为纯化的培养, 细胞就不易损失, 届时, 所遵从的传代洗涤原则则变为“变少为多”, 在这一原则指导下才能尽快实现细胞筛选。

在第1次洗盘中, 可以进行第1次除油处理。由于骨髓内容物中存在较多脂肪, 长时间不予去除会影响细胞生长。但所存油脂漂浮于培养基的表面, 单纯换液无法有效除去漂浮的脂肪油滴。这里作者借鉴兄弟实验室免疫组织化学的办法, 用同样的吸油纸, 经剪裁和高压除菌后烘干, 于第1次洗盘时进行除油。用除油纸吸取培养皿中的浮油, 待肉眼下未再见脂肪油滴后开始进行第1次洗盘换液。

综上所述, 在骨科手术中对股骨髓腔内容物进行收取和处理, 经过长时间的贴壁培养和换液洗涤和传代, 能够有效筛选BMSCs的可靠性, 在体外可稳定传代, 增殖速度可, 经半年以上培养, 表面分子标志和形态学表现和无明显退化。本方法由于使用术中被动丢弃的髓腔血, 实验未造成额外创伤; 对于人BMSCs的获取, 特别是与临床结合紧密的骨科工作人员, 提供了一条方便可靠的道路; 对于患者本身, 经体外培养扩增的BMSCs有可能为作为供体供患者本身所利用, 绕开了相关免疫学难题, 对将来的组织工程等临床应用具有更好的可操作性和应用前景。

#### 4 参考文献

[1] Friedenstain AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *J Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.

[2] Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, et al. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(3): 255-268.

[3] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893):41-49.

[4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *J. Science*, 1999, 284(5411): 143-147.

[5] Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, et al. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther*. 2001;3(6):857-866.

[6] Zhang HT, Pei GX, Chen B. *Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi*. 2006;8(1):56-58.  
张洪涛, 裴国献, 陈滨. 人骨髓基质干细胞体外诱导培养的新方法研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(1):56-58.

[7] Anselme K, Broux O, Noel B, et al. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2002; 8(6):941-953.

[8] Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Tekmerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*. 2002;20(6):592-596.

[9] Xie F, Teng L, Cai L, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(6):951-956.  
解芳, 滕利, 蔡磊, 等. 犬骨髓间充质干细胞分离纯化和成骨诱导分化: Ficoll液密度梯度离心法体外分离的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):951-956.

[10] Yin HY, Liu GP, Cui L, et al. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*. 2007;3(5):277-279, 295.  
尹宏宇, 刘广鹏, 崔磊, 等. Percoll法分离犬骨髓单个核细胞与体外成骨诱导培养的实验研究[J]. 组织工程与重建外科, 2007, 3(5):277-279, 295.

[11] Wang Y, Wang ZW, Lu YH, et al. *Nantong Daxue Xuebao*. 2005; 25(3):157-160.  
王勇, 王志伟, 陆玉华, 等. 成人骨髓间充质干细胞的体外分离培养和生物学特性[J]. 南通大学学报: 医学版, 2005, 25(3):157-160.

[12] Kuznetsov, Sergei A, Mankani, Mahesh H, et al. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation*. 2000;70(12):1780-1787.

[13] Chen HY, Niu P, Zhao S, et al. *Jiepu Kexue Jinzhan*. 2007; 13(2): 190-192.  
陈欢意, 牛平, 赵帅, 等. 改良贴壁培养法简单的骨髓基质干细胞分离纯化法[J]. 解剖科学进展, 2007, 13(2):190-192.

[14] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143.

[15] Xia WJ, Xu R, Ye X, et al. Biological appraisal of human bone marrow mesenchymal stem cells during ex-vivo expansion. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008;16(3): 639-644.

[16] Deng JP, Dai ZQ, Liu S, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(3):579-582.  
邓近平, 戴钟铨, 刘收, 等. 红细胞裂解法分离及培养大鼠骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(3):579-582.

[17] Pan H, Wang DW, Li HB, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(42):8487-8490.  
潘华, 王大伟, 李红波, 等. 密度梯度离心与贴壁法相结合体外分离培养骨髓基质干细胞: 1~3代细胞生长特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(42):8487-8490.

[18] Rose FR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *J Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292:1.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 2009 厦门科技基金资助课题子课题 (3502Z20094008), 课题名称: 股骨头坏死间充质干细胞成骨与凋亡过程中 NF-kappaB 调控 caspase-3 的研究。

**作者贡献:** 第二作者进行实验设计, 第一作者进行实验实施及过程改进, 实验评估为第三作者, 资料收集为第一、二、三、七作者等, 第一作者成文, 第三作者审校, 第一作者对文章负责。

**致谢:** 对参与手术取髓工作、提供技术性帮助的厦门大学附属中山医院骨科各手术组以及厦门大学医学院兄弟实验室表示感谢。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 以“人骨髓间充质干细胞, 分离”为关键词检索 CNKI 期刊全文数据库 2002/2010 文章, 查询结果显示, 未发现自骨科手术中取长骨骨髓分离培养的文章。

实验通过骨科手术中取长骨骨髓组织直接接种于培养皿、贴壁筛选法分离培养骨髓间充质干细胞, 并比较初次洗盘时间对培养阳性率的影响, 对寻求简便、经济、实用的人骨髓间充质干细胞体外分离法。