

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.007 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]  
张君红, 姜海行, 覃山羽, 孟云超, 宁琳. 全骨髓细胞贴壁法分离与培养大鼠骨髓间充质干细胞的多向分化能力[J].  
中国组织工程研究, 2012, 16(36):6685-6689.

## 全骨髓细胞贴壁法分离与培养大鼠骨髓间充质干细胞的多向分化能力\*☆

张君红, 姜海行, 覃山羽, 孟云超, 宁琳

**文章亮点:** ①雄性 SD 大鼠应选择体质量为 80-100 g, 体质量较大的大鼠骨髓分化能力欠佳。②在取材过程中需严格掌握大鼠处死至将细胞悬液放入培养箱内的时间, 一般控制在 40 min 以内。③冲洗骨髓腔时力度适中且在骨髓腔内旋转数次, 可使骨髓细胞充分脱落, 保证骨髓细胞的获得量。④传代时严格掌握消化时间, 0.25%的胰酶消化约 3 min, 吹打培养瓶底部的力度要轻柔, 时间为 2.0-3.0 min。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 全骨髓贴壁法; 成骨分化; 成脂分化; 生物学特征; 表面抗原; 生长曲线; 细胞形态

### 摘要

**背景:** 分离培养纯度较高的骨髓间充质干细胞是对其进行深入研究的前提。

**目的:** 观察全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特征。

**方法:** 选取体质量为 80-100 g 雄性 SD 大鼠, 采用全骨髓细胞贴壁培养法获取骨髓间充质干细胞。在取材过程中需严格掌握大鼠处死至将细胞悬液放入培养箱内的时间, 一般控制在 40 min 以内。使用基础培养基冲洗骨髓腔时力度适中且在骨髓腔内旋转数次, 可使骨髓细胞充分脱落, 保证骨髓细胞的获得量。

**结果与结论:** 原代骨髓间充质干细胞为贴壁生长的成纤维样细胞, 传代后的细胞形态均一, 呈漩涡状排列; 第 3 代骨髓间充质干细胞的生长曲线呈 S 形, 经历 3 个生长时期: 潜伏期、对数生长期和停滞期; 流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞表面抗原结果显示: CD29<sup>+</sup> 99.45%、CD34<sup>+</sup> 1.45%、CD44<sup>+</sup> 99.52%、CD45<sup>+</sup> 1.41%; 成骨、成脂诱导分化后, 矿化结节被茜素红染成橘红色, 脂滴被油红 O 染成红色。说明骨髓间充质干细胞能向成骨、成脂分化, 具有多向分化潜能, 符合国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会提出的鉴定动物来源骨髓间充质干细胞的最低标准。

### Multiple differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured by whole bone marrow adherence method

Zhang Jun-hong, Jiang Hai-xing, Qin Shan-yu, Meng Yun-chao, Ning Lin

### Abstract

**BACKGROUND:** Isolation and culture of highly purified bone marrow mesenchymal stem cells are the premise to study their function.

**OBJECTIVE:** To investigate the biological characteristics of rat bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured by whole bone marrow adherence method.

**METHODS:** Sprague-Dawley rats weighing 80-100 g were selected, and the bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from Sprague-Dawley rats by whole bone marrow adherence method. During isolation, the time period from sacrificing to putting the cell suspension into the incubator should be controlled strictly, generally less than 40 minutes. Moderate intensity was preferred to flush the bone marrow cavity with basal culture medium, and rotation for several times could make the bone marrow cells fully dropped off and ensure the quantity of cells.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The primary cultured bone marrow mesenchymal stem cells were the adherent fibroblast-like cells, and after passage, the cells were uniform and showed spindle shaped and typical swirl morphology. The growth curve of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells resembled S shape and had three periods: latent period, logarithmic growth phase and lag phase. Flow cytometry detection showed the content of surface antigen: CD29<sup>+</sup> (99.45%), CD34<sup>+</sup> (1.45%), CD44<sup>+</sup> (99.52%), CD45<sup>+</sup> (1.41%). After osteogenic and adipogenic differentiation, mineralized nodules were orange under alizarin red staining, and lipid droplets were red under oil red O staining. Bone marrow mesenchymal stem cells have the multiple differentiation potential and can differentiate into osteoblasts and adipocytes. The multiple differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells corresponds to the minimum standards for identifying the animal bone marrow mesenchymal stem cells raised by International Society of Cell Therapy and Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee.

广西医科大学第一附属医院消化内科, 广西壮族自治区南宁市 530021

张君红女, 1973 年生, 广西壮族自治区桂林市资源县人, 汉族, 2012 年广西医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事干细胞移植在急慢性肝损伤中作用及其机制研究。  
Junjun12162001@163.com

通讯作者: 姜海行, 博士, 教授, 广西医科大学第一附属医院消化内科, 广西壮族自治区南宁市 530021

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344 (2012)36-06685-05

收稿日期: 2012-06-15  
修回日期: 2012-06-23  
(20120316014/M · C)

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Zhang Jun-hong☆, Doctor, Attending physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Junjun12162001@163.com

Corresponding author: Jiang Hai-xing, Doctor, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0897008\*

Received: 2012-06-15  
Accepted: 2012-06-23

Zhang JH, Jiang HX, Qin SY, Meng YC, Ning L. Multiple differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured by whole bone marrow adherence method. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(36): 6685-6689.

## 0 引言

骨髓间充质干细胞移植治疗肝纤维化及其他各种疾病有着潜在的应用前景, 多项研究显示移植骨髓间充质干细胞是安全有效的<sup>[1-4]</sup>。但骨髓间充质干细胞在骨髓中含量极少, 贴壁的骨髓间充质干细胞仅占骨髓中有核细胞的0.001%。因此在体外成功分离培养, 获得大量、活性好及性能稳定的骨髓间充质干细胞是对其深入研究的前提。本实验采用全骨髓细胞贴壁法分离、培养SD大鼠骨髓来源的间充质干细胞, 观察其生物学特性, 为下一步实验提供功能稳定的种子细胞。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察实验。

**时间及地点:** 于2011-05/11在广西医科大学实验中心完成。

**材料:**

**实验动物:** 体质量为80-100 g的SD雄性大鼠10只, 6-8周龄, 由广西医科大学实验动物中心提供。

**主要试剂与仪器:**

试剂及仪器	来源
低糖 DMEM 培养基	Gibco 公司
优质胎牛血清	Hyclone 公司
成骨细胞、成脂细胞诱导液	广州赛业科技有限公司
胰蛋白消化酶	Sigma 公司
FITC anti- rat CD29、CD44	Biolegend 公司
Mouse anti rat CD45FITC	AbD Serotec 公司
Mouse anti rat CD34-FITC	BD 公司
荧光倒置相差显微镜	Zeiss 公司

**实验方法:**

**骨髓间充质干细胞分离、培养、纯化及传代:** 采用全骨髓细胞贴壁法在无菌条件下分离、培养健康雄性SD大鼠骨髓间充质干细胞, 具体操作如下: 将大鼠断颈处死, 小心分离皮肤及皮下组织, 剔除股骨周围肌肉、肌腱、组织等, 避免损伤血管, 将股骨浸泡在含有PBS的玻璃皿中, 直

至将股骨表面的肌肉、软骨全部剔除, 然后将股骨移至分装有基础培养基的玻璃皿中, 剪断股骨, 用L-DMEM基础培养基小心反复冲洗骨髓腔至变白, 收集骨髓混合液, 1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心4 min, 弃上清液, 加入体积分数为10%胎牛血清L-DMEM培养基制成细胞悬液, 置于37 °C, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养。倒置相差显微镜下动态观察细胞形态学变化。24-48 h后全部更换培养基, 去除未贴壁细胞, 以后每2 d换液1次。待细胞长满至瓶底80%-90%时, 用0.25%胰蛋白酶消化3 min, 在显微镜下观察发现细胞质回缩、细胞间隙增大后加入胎牛血清五六滴终止消化, 轻柔吹打全部瓶底约3 min, 避免产生气泡, 将细胞悬液移入带盖的无菌刻度离心管中, 800-1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心4 min, 按1:2比例传代, 首次传代时间需五六天, 两三天可传代1次。使用第3, 4代细胞用于实验。

**MTT法绘制骨髓间充质干细胞生长曲线:** 使用对数生长期的第3代骨髓间充质干细胞, 以0.25%胰酶消化, 计数, 以 $0.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于96孔培养板, 每孔设有3个复孔, 每孔加样0.2 mL。待细胞贴壁后每孔加20 μL 5 g/L的MTT溶液, 以10%培养液为空白对照, 置于37 °C, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4 h。4 h后吸尽原培养液, 每孔中二甲基亚砜150 μL, 置室温10 min, 使结晶物充分溶解。15 min内用酶标仪于490 nm处测定吸光度值。每次取1板, 取平均值, 连续测8 d。以培养时间为横轴, 吸光度值为纵轴, 绘制生长曲线。

**骨髓间充质干细胞的表面抗原鉴定:** 取处于对数期生长期的第3代骨髓间充质干细胞, 以0.25%胰酶消化, 收集 $1 \times 10^5$ 细胞, 制成细胞悬液, 低速离心4 min, 将Annexin-V-FITC/PI双染试剂盒中的Biding buffer 0.5 mL加入细胞中, 取0.2 mL加入混有缓冲液的细胞悬液, 分别加入CD29、CD34、CD44、CD45 FITC一抗10 μL, 室温孵育15-30 min, 上机进行检测。并将未加一抗的细胞悬液做空白对照。用FCS ExpressV 3.0软件分析。

### 骨髓间充质干细胞的成骨、成脂诱导分化:

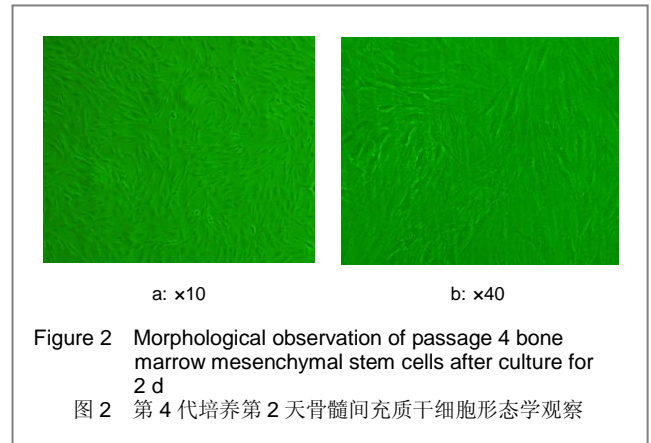
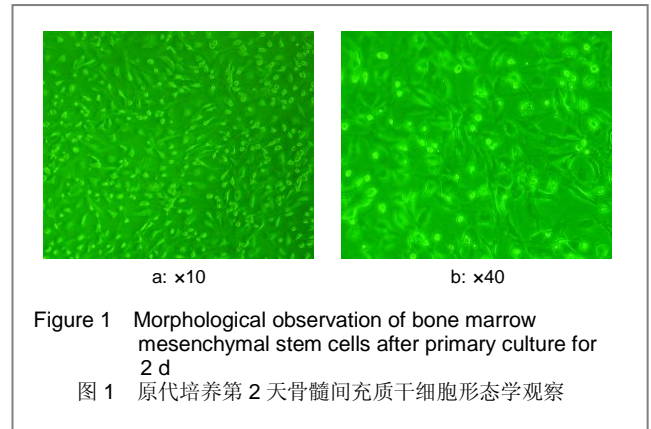
**成骨诱导分化:** 骨髓间充质干细胞达到80%–90%融合时, 使用胰酶消化, 接种于6孔板中, 每孔约 $3 \times 10^3$ 个细胞, 每孔加入2 mL含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液。放入37 °C, 体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。24 h后, 移去旧培养液, 每孔加入2 mL的成骨诱导液(地塞米松、维生素C、甘油磷酸钠)。每隔两三天换液, 诱导2周。2周后, 钙结节形成, 进行茜素红染色。具体步骤如下: 吸去原诱导液, PBS洗两次; 加入40 g/L多聚甲醛2 mL, 固定30–60 min; 吸去固定液, PBS清洗, 加入0.1%茜素红染色液数滴染色6–10 min; 用PBS洗2–5次, 去除残留的染色液和残渣; 苏木精复染5 min左右, 流水冲洗后在光学显微镜下观察染色情况。以不加入诱导液的细胞为阴性对照。

**成脂肪细胞诱导分化:** 骨髓间充质干细胞达到80%–90%融合时, 使用胰酶消化, 接种于6孔板, 每孔约 $2 \times 10^4$ 个细胞, 每孔加入2 mL完全培养液。放入37 °C, 体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养; 每3 d进行换液, 待细胞达到100%融合时, 每孔加入2 mL成脂细胞诱导液(地塞米松、胰岛素、消炎痛、IBXM)开始诱导; 两三天更换诱导液1次, 第5天左右出现较多脂滴, 但体积比较小, 继续诱导, 此后脂滴逐渐增大, 2周左右即可进行油红O染色。具体步骤如下: 吸去原诱导液, 用PBS清洗2次; 加入40 g/L多聚甲醛2 mL, 固定60 min; 吸去固定液, PBS洗数次, 加入现配和过滤后油红O染色液数滴, 以覆盖培养板为宜, 染色60 min; 用PBS清洗2–5次, 去除残留的染色液和残渣; 体积分数为50%乙醇清洗, 加入PBS, 苏木精复染2 min左右; 在光学显微镜下观察染色情况。以不加入诱导液的细胞为阴性对照。

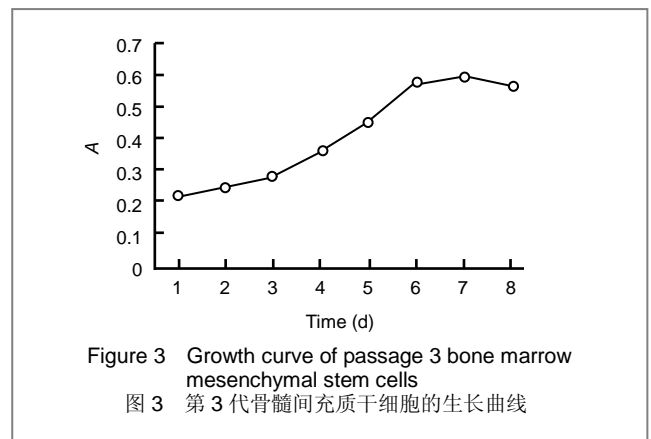
## 2 结果

**2.1 骨髓间充质干细胞形态学观察** 原代骨髓间充质干细胞悬液接种至培养瓶内, 在倒置相差显微镜下观察刚接种时的细胞大小不等, 呈圆形, 并伴有许多血细胞, 如沙砾状, 不能辨认细胞种类, 4–6 h后细胞开始贴壁, 24–48 h后换液, 可见少部分圆形、椭圆形细胞贴壁, 单个细胞存在, 部分可形成克隆, 此时可见较多漂浮不贴壁细胞, 见图1。48 h以后贴壁细胞开始增大, 伸出伪足, 呈成纤维样, 出现单个或多个细胞克隆增殖, 形成散在的集落, 第3, 4天贴壁的细胞伸展为梭形或多角形等, 5 d左右即可形成明显集落, 六七天可铺满瓶底。1:2传代后8 h左右细胞贴壁生长, 24 h后快速分裂增

殖, 细胞为梭形, 类似成纤维细胞, 旋涡状或放射状生长, 平均两三天可传1代。传代3次后, 细胞形态均一, 见图2, 可用于后续实验。



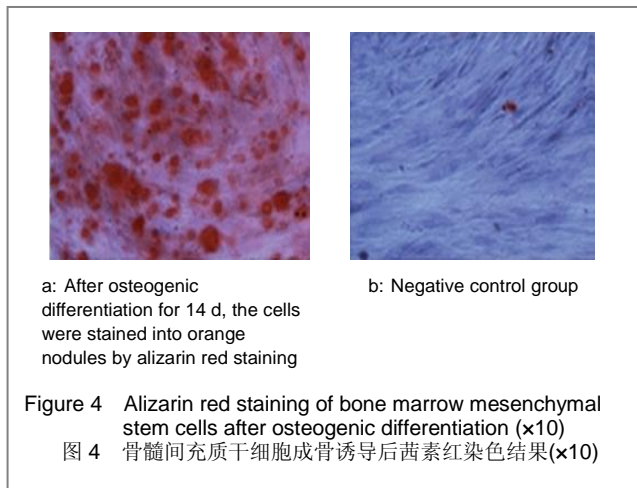
**2.2 绘制骨髓间充质干细胞生长曲线** MTT法连续检测8 d骨髓间充质干细胞的吸光度值, 绘制生长曲线呈S形, 第1, 2天细胞贴壁生长, 增殖速度较慢, 进入潜伏期; 第3–5天细胞生长迅速, 呈指数增长, 形成细胞克隆进入对数生长期; 第6–8天细胞生长处于平台期, 进入停滞生长的停滞期, 见图3。



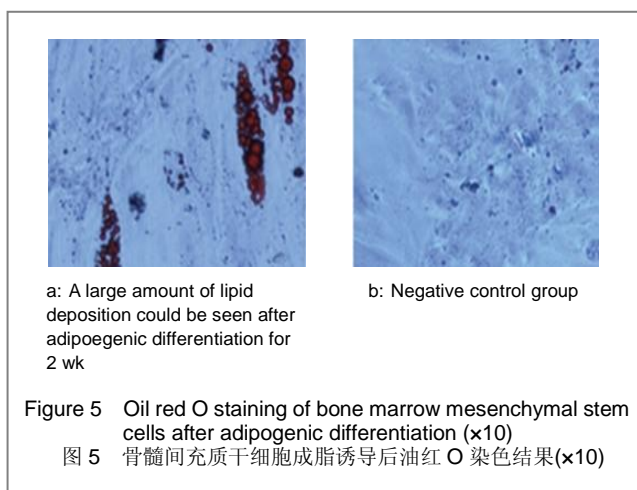
**2.3 骨髓间充质干细胞表面抗原流式细胞仪鉴定结果**

流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达率分别为: CD29<sup>+</sup> 99.45%、CD34<sup>+</sup> 1.45%、CD44<sup>+</sup> 99.52%、CD45<sup>+</sup> 1.41%。CD29及CD44表达阳性, 而CD34、CD45表达阴性。

**2.4 骨髓间充质干细胞成骨诱导分化茜素红染色及成脂细胞诱导分化后油红O染色形态学变化** 成骨诱导培养第3天, 细胞体积增大, 呈短梭形, 诱导第7天, 细胞呈多角形, 细胞内颗粒增多, 第14天胞质内充满颗粒, 细胞呈集落样生长, 细胞内可见钙质沉积, 随后钙结节形成, 经茜素红染色呈橘红色结节, 见图4。



成脂细胞诱导分化培养第3天后, 细胞内有小脂滴出现, 约第10天脂质增加并融合, 细胞由长梭形变为圆形, 2周左右可见大量脂质沉积, 油红O染色呈红色, 见图5。



### 3 讨论

骨髓间充质干细胞是一种来源于中胚层具有多向分化潜能的骨髓内造血干细胞以外的非造血干细胞, 在特定的诱导条件下可诱导分化软骨、骨骼、肝脏、心肌、脂肪等多种组织细胞<sup>[6-7]</sup>。新近研究表明骨髓间充质干细

胞移植后向损伤部位迁移并增殖, 可转化为胰腺干细胞, 参与组织再生, 具有治疗急性胰腺炎的潜能<sup>[8]</sup>; 本课题组前期研究表明大鼠骨髓间充质干细胞在体外经肝细胞生长因子诱导后可向肝样细胞分化<sup>[9]</sup>, 表达肝细胞标记物, 如白蛋白、细胞角蛋白等。其还可通过调控肝星状细胞RhoA、P27的表达抑制肝星状细胞的增殖<sup>[10]</sup>。目前有4种获取骨髓间充质干细胞的方法: 包括密度梯度离心法、全骨髓贴壁培养法、流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法<sup>[11]</sup>。但后两种分离方法价格昂贵, 操作复杂, 影响细胞的活性及获得量, 细胞被污染的风险较大, 众多学者通常采用全骨髓贴壁法和密度梯度离心法分离纯化骨髓间充质干细胞。杨丽等<sup>[12]</sup>研究指出: 密度梯度离心法所获得的细胞纯度虽然相对较高, 但贴壁细胞数量较少, 细胞生长缓慢且活性较低, 该方法获取的原代细胞首次融合需21 d以上。其中的原因可能在骨髓分离的过程中失去了促进骨髓间充质干细胞贴壁的一些生长因子及促黏附物质, 丧失了骨髓中原有的微环境, 因此该法所分离的骨髓间充质干细胞生长速度较全骨髓贴壁法慢。此外, 密度梯度离心法在原代培养时所获得的骨髓间充质干细胞虽然比全骨髓贴壁法纯, 但在传代后细胞的纯度并没有太大区别, 特别是传代三四代后。

本实验采用全骨髓贴壁培养法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞, 该操作虽然相对简便, 但在操作过程中需注意以下事项: ①将大鼠体质量控制在80-100 g, 体质量较大的大鼠骨髓分化能力欠佳, 影响后续的传代。②在取材过程中需严格掌握大鼠处死至将细胞悬液放入培养箱内的时间, 一般控制在40 min以内, 时间过长会影响骨髓干细胞的增殖及活性, 故要求术者熟练掌握大鼠股骨的解剖, 分离股骨时避免损伤血管。③使用基础培养基冲洗骨髓腔时力度适中且在骨髓腔内旋转数次, 可使骨髓细胞充分脱落, 保证骨髓细胞的获得量。作者还观察到了使用SD雌性大鼠分离后的细胞悬液因含有较多脂滴, 贴壁细胞不牢固且传代困难的现象, 可能与雌性大鼠体内的雄激素、雌激素等水平与雄性大鼠存在差异有关。

刚分离的骨髓细胞悬液接种至塑料培养瓶内, 有利于原代细胞的贴壁。在倒置相差显微镜下观察接种4-6 h后细胞开始贴壁, 48 h以后贴壁细胞开始增大, 伸出伪足, 呈成纤维样, 多个细胞克隆增殖, 形成散在的集落, 三四天时贴壁的细胞伸展为梭形或多角形等, 5 d左右呈放射性集落状生长, 逐渐连接成片。1:2传代, 此时可用玻璃培养瓶, 传代后的细胞在玻璃及塑料培养瓶中的生长状态无差异。传代时严格掌握消化时间,



0.25%的胰酶消化约3 min, 吹打培养瓶底部的力度要轻柔, 时间为两三分钟, 时间过长则会导致细胞受损难以继续传代, 传代3次后, 细胞形态均一, 生长性状稳定。使用MTT法检测骨髓间充质干细胞的吸光度值大小可反应细胞代谢活性的强弱。从绘制的生长曲线来看骨髓间充质干细胞的生长经历了3个生长时期: 第一二天细胞贴壁生长, 增殖速度较慢, 进入潜伏期; 第3-5天细胞呈指数迅速增长并形成细胞克隆, 进入对数生长期; 第6-8天细胞生长处于平台期, 进入停滞生长的停滞期。符合文献报道的细胞生长规律。目前尚未发现可作为骨髓间充质干细胞标志物的特异性抗原<sup>[13]</sup>, 不能仅通过骨髓间充质干细胞的表面标记物对其进行鉴定。通过以下3个特征来判断其是否为骨髓间充质干细胞<sup>[14]</sup>, 分别是细胞贴壁生长、流式细胞法检测细胞分化表型以及具有多向分化潜能的重要特征。本实验利用流式细胞仪鉴定表面抗原其结果为: CD29、CD44表达阳性, 阳性率高达99%以上, CD34、CD45表达阴性(< 2%), 充分证明其不是来源于造血细胞及内皮细胞。同时使用成骨、成脂诱导液对其进行诱导, 结果表明骨髓间充质干细胞经过两种诱导液诱导后使用茜素红及油红O染色可分别形成橘红色矿化结节及红色椭圆形脂滴空泡, 说明骨髓间充质干细胞能向成骨、成脂分化, 具有多向分化潜能, 符合国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会提出的鉴定动物来源骨髓间充质干细胞的最低标准<sup>[13]</sup>。

综上所述, 本实验使用全骨髓细胞贴壁法成功的分离培养和纯化了SD大鼠骨髓间充质干细胞, 总结了操作过程中的注意事项, 观察了其生长规律、细胞形态等一般生物学特性, 鉴定了其细胞表面标记物及具有多向分化的潜能, 为深入研究骨髓间充质干细胞的功能提供了良好的细胞基础。

#### 4 参考文献

- [1] Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, et al. Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology*. 2009;49(6): 1992-2000.
- [2] Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One*. 2011; 6(4):e19195.
- [3] Gupta DK, Sharma S, Venugopal P, et al. Stem cells as a therapeutic modality in pediatric malformations. *Transplant Proc*. 2007;39(3):700-702.
- [4] Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010;363(22):2091-2101.
- [5] Rajasekhar VK, Vemuri MC. Molecular insights into the function, fate, and prospects of stem cells. *Stem Cells*. 2005; 23(8):1212-1220.
- [6] Papayannopoulou T, Scadden DT. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*. 2008;111(8):3923-3930.
- [7] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4): 567-582.
- [8] Lai W, Deng MM. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*. 2011;19 (28):2942-2946.  
赖薇, 邓明明. 骨髓间充质干细胞治疗急性胰腺炎的潜能[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19 (28):2942-2946.
- [9] Qin SY, Jiang HX, Yu B, et al. *Guangxi Yike Daxue Xuebao*. 2009, 26(1):23-26.  
覃山羽, 姜海行, 于冰, 等. 大鼠骨髓源性肝干细胞形态学特征的研究[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(1):23-26.
- [10] Su SB, Jiang HX, Wang DX, et al. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*. 2009;17(32): 3283-3291.  
苏思标, 姜海行, 王东旭, 等. 骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞 RhoA、P27的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(32): 3283-3291.
- [11] Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med*. 2007;140:67-81.
- [12] Yang L, Zhang RH, Xie HJ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009;13(6):1064-1068.  
杨丽, 张荣华, 谢厚杰, 等. 建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(6): 1064-1068.
- [13] 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. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [14] Gnecci M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol*. 2009;482:281-294.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金声明:** 广西自然科学基金课题(0897008), 课题名称: 骨髓干细胞移植抗肝纤维化机制研究。

**作者贡献:** 实验设计为张君红、姜海行, 实验实施为张君红、孟云超、宁琳, 实验评估为覃山羽, 资料收集为张君红、孟云超。张君红成文, 姜海行、覃山羽审校, 张君红、姜海行对文章负责。

**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。

**伦理要求:** 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。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。