DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.06.010

不同浓度的胎牛血清对骨髓间充质干细胞纯度及周期的影响

陈小丹，何家才

摘要 **目的** 比较含有体积分数为 0.10、0.15、0.20 的胎牛血清(FBS)的完全培养基对体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)纯度及细胞周期的影响，寻求适宜干细胞培养的 FBS 浓度。**方法** 用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠，采用全骨髓贴壁法分离培养大鼠 BMSCs。实验分为 A、B、C 3 组，分别为 FBS 体积分数是 0.10、0.15、0.20 的完全培养基培养的 BMSCs，比较各组细胞在第 2、3、4、5 代(P2，P3，P4，P5)的 CD45、CD29、CD90、CD44 的表达情况；消化 A 组 P3 细胞，用 3 种不同浓度的完全培养基连续培养 4 d，用流式细胞仪测其在培养后的 24、48、72、96 h 的细胞周期；收集 P3 BMSCs 制备细胞悬液接种到 6 块 96 孔板，每块板接种的 BMSCs 分别用 FBS 体积分数是 0.10、0.15、0.20 的完全培养基进行培养，每天取 1 块培养板用 CCK-8 检测其吸光度值(OD)。**结果** CD45 阴性表达，CD29、CD90、CD44 阳性表达，3 种完全培养基培养的 BMSCs 的表面标志物在前 2 代时差别较大，但在 P3，P4 时差别已较少，P4 时均可以获得较纯的 BMSCs；细胞周期结果显示，在同一时间点，G_0/G_1 期：A、B、C 3 组随着 FBS 浓度的增加，G_0/G_1 期降低且差异无统计学意义；G_2/M 期：在培养后的 24 h，A、B、C 3 组差异有统计学意义($P<0.05$，$F=12.412$)，但随着时间的延长，差异消失；S 期，3 组均无差别；$S+G_2/M$ 期随 FBS 浓度的增加而增高。细胞活力结果显示，在 24 h 时 A、B、C 3 组的 OD 值依次增大，差异有统计学意义($P<0.05$，$F=5.002$)，随时间的延长 3 组之间无明显差异。**结论** 这 3 种培养基在 P4 能获得较纯的 BMSCs；细胞周期及活力结果显示，3 种完全培养基均能促进 BMSCs 的增长，3 组之间不存在差异。体积分数为 0.10 的 FBS 已满足 BMSCs 的分离和扩增，要想在短期内获得较纯的 BMSCs，原代培养使用体积分数为 0.15，传代用 0.10 FBS 的完全培养基。

关键词 骨髓间充质干细胞；胎牛血清；细胞周期；表面标志
中图分类号 R-33
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)06-0742-06

2013-12-20 接收
基金项目：国家自然科学基金(编号：81371114)；安徽省自然科学基金(编号：11040606M173)；安徽医科大学博士科研资助基金(编号：XJ201034)；安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号：KJ2013A154)
作者单位：安徽医科大学口腔医学院，安徽医科大学附属口腔医院，安徽省口腔疾病研究中心实验室，合肥 230032
作者简介：陈小丹，女，硕士研究生；
何家才，男，教授，主任医师，硕士生导师，责任作者，E-mail：hejiacai@163.com

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem

Effect on gp91^{Phox} human coronary artery endothelial cells in the process of oxidative stress by valsartan

Wang Cheng[1,2], Han Weixing[1], Wu Jijun[1], et al
([1]*Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022;
[2]*Dept of Diagnostics, The First Clinical College of Anhui Medical University, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To study the effect on human coronary artery endothelial cells (HCAEC) gp91^{Phox} in the process of oxidative stress by valsartan. ***Methods*** The control group: adherent culture HCAEC *in vitro*, no other intervention; the experimental group: under the same conditions with valsartan (10 μmol/L) train for 24 hours. Using Western blot and cell immunofluorescence measure gp91^{Phox} levels in two groups of cells. The results were statistically analyzed and compared in both groups. ***Results*** The experimental group gp91^{Phox} level significantly lower than the control group in HCAEC($P<0.01$), the difference was statistically significant. ***Conclusion*** Valsartan can significantly decrease the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) oxidase subunit gp91^{Phox} expression in HCAEC, thus reduce oxidative stress level.

Key words valsartan; HCAEC; oxidative stress; gp91^{Phox}

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cells, BMSCs)是成熟体细胞的亚群,又称为基质干细胞,是治疗中应用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的基础。MSCs具有黏附能力并且能够在体外扩增;多分化潜能:在特定的生理或是实验条件下能分化为特定的功能细胞、组织、器官,同时免疫抑制的能力[1];这些特点使其成为组织工程再生医学中理想的种子细胞[2]。然而BMSCs的含量极低,因此很难在短期内获得大量的BMSCs。分离扩增大量的原始干细胞成为研究和应用干细胞的先决条件。但其增殖和生长受很多因素影响,因此找到一个既简单又可行的方法是在短期内获得大量BMSCs的重要问题。目前,体外培养BMSCs的完全培养液中大部分都加FBS,而文献[3-6]报道中关于BMSCs体外培养的胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的浓度不尽一致。不同浓度的FBS对其生物学特性研究较少,该文探讨3种不同浓度的FBS对BMSCs的纯度及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康SD大鼠15只,4周龄,普通级,体重75~100 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 *L*-DMEM培养基、FBS、胰蛋白酶(澳洲Hyclone公司);荧光标记抗大鼠CD29-PE、CD45-PE(美国Biolegend公司);CD44-FITC、CD90-FITC(美国Santa Cruz公司);Axiovert200倒置相差显微镜(德国Zelss公司);流式细胞仪(美国BD公司);超净工作台(中国苏州净化公司)、CO_2细胞培养箱(美国Thermo公司);冷冻离心机(美国Beckman公司);酶联免疫检测仪(美国BioTek公司);CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(上海贝博生物试剂公司);细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs分离、培养 以颈椎脱臼法处死大鼠,置于体积分数为75%乙醇溶液中消毒5~7 min,在超净台中取出股骨和胫骨,然后放到另一杯乙醇溶液内消毒5~6 s后用PBS洗3遍,再置于PBS内。用注射器抽吸完全培养基反复冲洗骨髓腔,直至股骨和胫骨两端发白,然后按细胞浓度1×10^9/L将细胞悬液加入至培养瓶内,随后将培养瓶置于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱内培养。2 d后首次半量换液,以后每3 d全量换液1次,每次换液去除悬浮的杂细胞。

1.2.2 BMSCs的传代培养 当细胞生长至80%~90%融合时,用PBS洗细胞2~3次,然后加入胰蛋白酶1 ml消化1.5~2.0 min,在镜下见间隙增宽,细胞变圆,有少量细胞悬浮时立刻加含体积分数为0.10 FBS的完全培养基终止消化。然后制备成细胞悬液,离心,去上清液,以相应的培养基重悬细胞后并按1×10^7/L传代,记为第1代(P1),以此类推第2、3、4、5代记为P2、P3、P4、P5。传代时严格控制胰酶的时间,将淋巴细胞、单核细胞等去除。

1.2.3 BMSCs的鉴定 实验分为A、B、C 3组分别为用0.10、0.15、0.20的完全培养基培养的BMSCs,取A、B、C原代第72小时和第9天的细胞,在倒置显微镜下观察细胞的生长情况并拍照记录细胞形态。

1.2.4 流式细胞仪检测BMSCs表面标志 取A、B、C 3组原代细胞,2 d后首次半量换液,以后2~3 d全量换液1次,当细胞长至80%~90%融合时,用0.25%的胰酶消化传代记为P1,然后依次传代下去记为P2、P3、P4、P5。用PBS洗洗涤这3种培养基培养的2、3、4、5代细胞2~3次,弃上清液,余100 μl,配成终浓度为1×10^6/ml的细胞悬液。分别加入CD29-PE、CD45-PE(1.25 μl),CD44-FITC、CD90-FITC(20 μl),及同型对照,4 ℃避光孵育30 min,之后再用PBS洗细胞2~3次,弃上清液,加入500 μl PBS,制备成单细胞悬液,上流式细胞仪,检测PE、FITC标记的细胞占细胞总数的百分比进行表面抗原测定。

1.2.5 不同浓度的FBS对BMSCs细胞周期的影响 取生长转态良好的P3细胞,用PBS洗细胞2次,然后用0.25%的胰酶消化1.5~2.0 min,按细胞浓度为1.0×10^9/L传代至12个一次性细胞培养瓶,每4瓶分为一组,随机分为3组,3~5 h后细胞铁贴壁,弃去原培养液,分别加入含体积分数为0.10、0.15、0.20的FBS的*L*-DMEM培养液,在5% CO_2、37 ℃培养箱内孵育,分别将相应培养基孵育24、48、72、96 h的BMSCs用PBS洗洗涤细胞2~3次,70%乙醇固定过夜,次日PBS冲洗去乙醇,加入100 μl RnaseA,混匀,37 ℃水浴30 min,然后加入40 μl PI染液,4 ℃避光30 min,然后上机检测相应培养基孵育后的24、48、72、96 h的BMSCs的周期。

1.2.6 不同浓度的FBS对BMSCs活力的影响 收集P3 BMSCs,调整细胞数制备细胞悬液,以密度为

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5×10^4/ml 接种于 6 个 96 孔板中，每孔加 FBS 体积分数是 0.10、0.15、0.20 的完全培养基制备的细胞悬液 100 μl，置 5% CO_2、37 ℃培养箱内孵育。于第 1、2、3、4、5、6 天各取 1 块板，每孔加 10 μl CCK-8 溶液，37 ℃孵育 3 h，用酶联免疫检测仪测定波长为 450 nm 时各孔的吸光度值(optical density，OD)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用单因素方差及 t 检验分析多组间的差异。

2 结果

2.1 流式细胞术检测 BMSCs 表面标志 BMSCs 经流式细胞仪检测结果显示，单标时 CD29 阳性率 97.77%，CD90 阳性率 98.04%，CD44 阳性率 99.38%，CD45 阳率 1.96%；双标结果进一步显示 BMSCs 高表达 CD29、CD90、CD44，低表达 CD45，见图 1。取分别用含体积分数为 0.10、0.15、0.20 3 种完全培养基培养的 P2～P5 BMSCs 进行流式细胞术进行分析，A、B、C 3 组细胞表面标志物在 P3、P4 均能获得较纯的 BMSCs，其表达率依次为：CD45 平均表达率为 4.29%、3.28%、1.80%；CD29 为 93.23%、95.43%、93.94；CD44 为 91.27%，95.31%、94.92；CD90 为 95.55%、95.66%、95.05%，见表 1。

2.2 BMSCs 的形态学观察 原代培养：用 3 种含不同体积分数的完全培养基培养的 BMSCs 在刚接种到各自的培养瓶时，细胞呈大小不一的圆形，悬浮于培养液内。72 h 后半量换液去除没有贴壁的细胞，此时可见到多数细胞贴壁，呈圆形、类圆形，多角形，少数细胞伸展成长梭形，A、B、C 3 组的贴壁细胞数依次增加，见图 2a、b、c。以后每 2 d 全量换液，不断地去除杂细胞。到第 9 天时，细胞已铺满瓶底，呈现形态均一的长梭形，排列成漩涡状，鱼群状，A、B、C 3 组均已铺满瓶底，C 组密度最大，其次 B 组，A 组相对 B、C 两组较疏，见图 2d、e、f。

表 1 3 种不同浓度的胎牛血清中第 2、3、4、5 代 BMSCs 免疫表型流式检测结果

表面标志	FBS 体积分数	传代次数 2	3	4	5	平均值
CD45(%)	0.10	14.44	1.96	0.55	0.22	4.29
	0.15	10.98	1.41	0.54	0.20	3.28
	0.20	5.94	0.80	0.31	0.18	1.80
CD29(%)	0.10	81.96	97.77	97.60	95.59	93.23
	0.15	89.38	97.13	97.74	97.48	95.43
	0.20	94.31	91.19	96.81	93.45	93.94
CD44(%)	0.10	68.43	99.38	99.13	98.10	91.27
	0.15	86.61	98.03	98.29	98.30	95.31
	0.20	87.11	97.30	96.80	98.47	94.92
CD90(%)	0.10	89.97	98.04	98.85	95.35	95.55
	0.15	90.51	97.35	99.07	95.72	95.66
	0.20	89.72	98.03	99.06	93.39	95.05

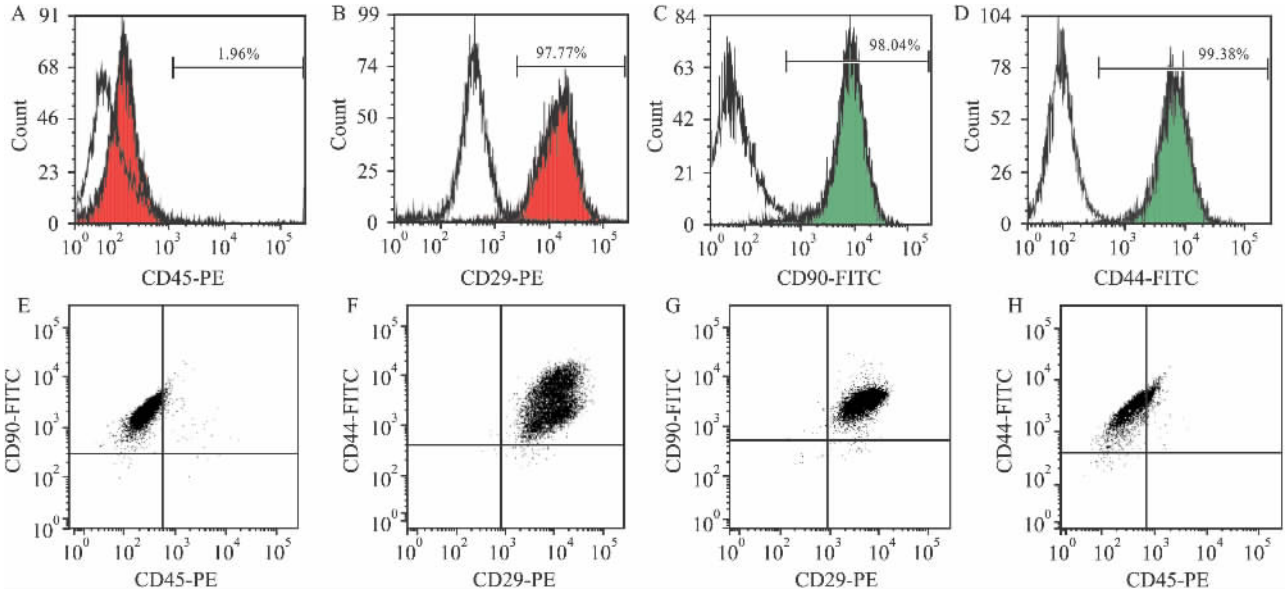

图 1 流式细胞术检测细胞(P3)表面标志结果

A、B、C、D 分别为单标时 BMSCs 表面抗原 CD45、CD29、CD90、CD44 的表达情况；E、F、G、H 分别为双标时 CD45 与 CD90、CD29 与 CD44、CD29 与 CD90、CD45 与 CD44 表达情况

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

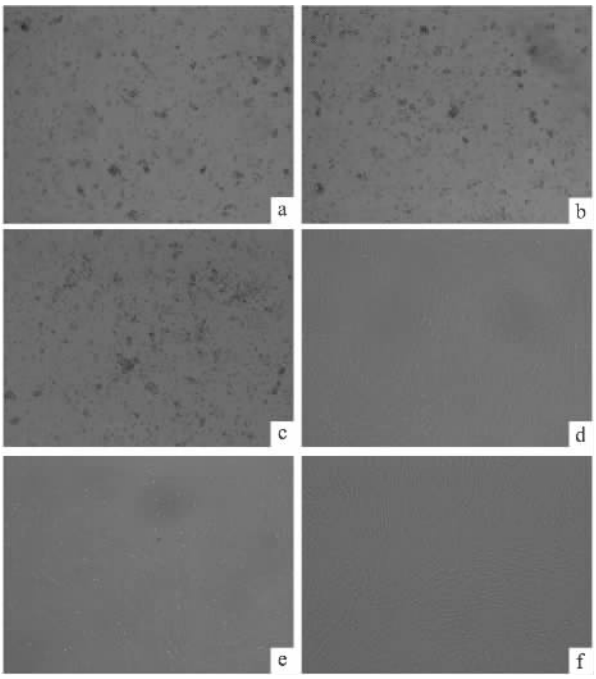

图2 BMSCs的形态学观察图 ×100

a、b、c: A、B、C 3组BMSCs培养后72 h; d、e、f: A、B、C 3组BMSCs第9天

2.3 流式细胞仪检测BMSCs周期变化 表2显示,3种完全培养基中的BMSCs的G_0/G_1期随浓度的增加而降低,但差异无统计学意义,同一浓度随时间的延长也是降低;G_2/M期在24 h后0.10与0.15组无差异,0.15与0.20和0.10与0.20组有差异($F=12.412$,$P<0.05$),但随时间的延长无差异。24、48、72、96 h 4个时间点S期的结果在3种完全培养基中差异无统计学意义,$S+G_2/M$期在4个时间点随浓度的增加而增加。3种完全培养基培养24、48、72、96 h的BMSCs的细胞周期见图3。

2.4 随着时间变化3种不同浓度培养基中的BMSCs的活力情况 在接种到96孔板的第1天A、B、C 3组的OD值依次增大,三者之间差异有统计学意义($P<0.05$,$F=5.002$),随着时间的延长三者的OD值无明显差异,见图4。

3 讨论

MSCs存在于许多组织器官内,首次是在骨髓内被鉴定出来,主要特点是体外培养时具有黏附、自我更新能力,保持未分化特点,分化为成骨、成软骨和脂肪细胞[7],这是MSCs最基本的功能,此外还可以向管状上皮细胞[8],肝细胞等[9]分化,因具有以上

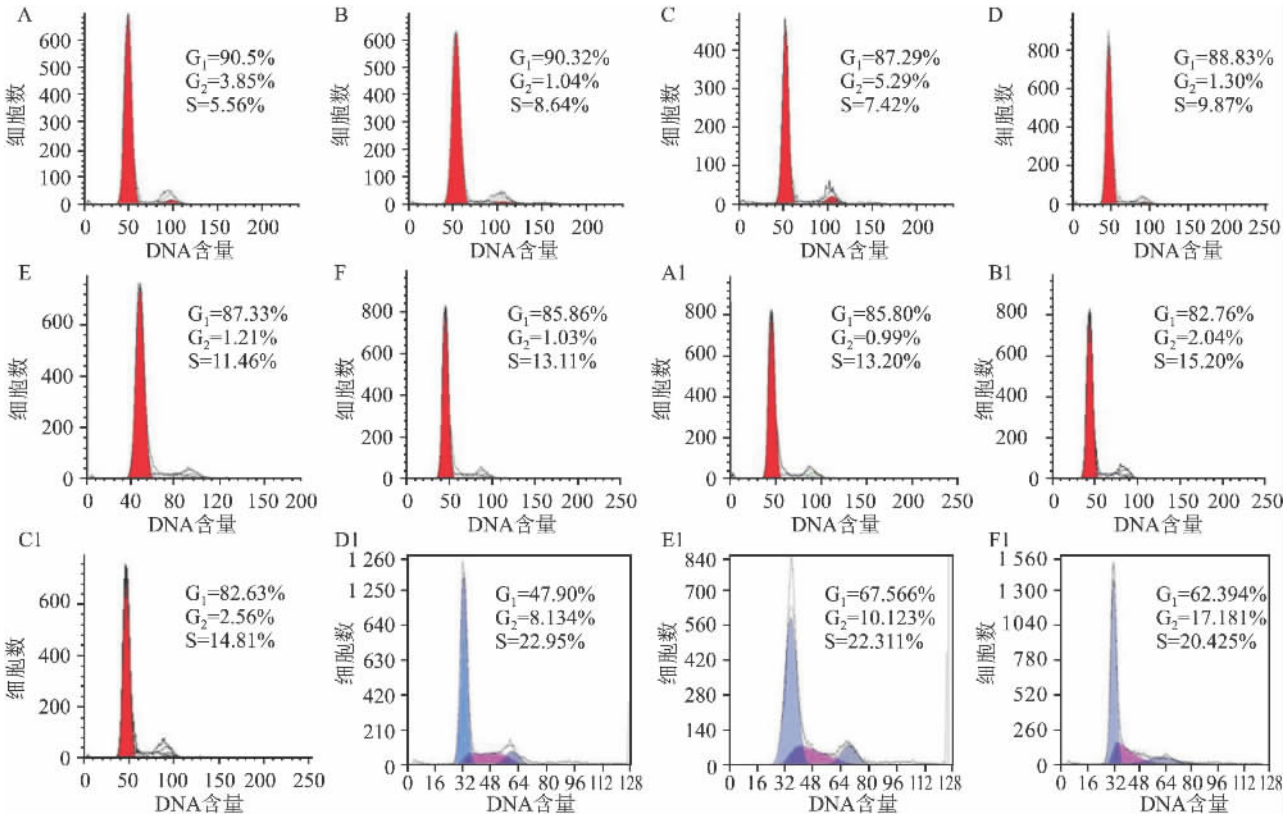

图3 流式细胞术检测3种完全培养基中24、48、72、96 h的BMSCs的细胞周期

24 h: A(0.10)、B(0.15)、C(0.20); 48 h: D(0.10)、E(0.15)、F(0.20); 72 h: A1(0.10)、B1(0.15)、C1(0.20); 96 h: D1(0.10)、E1(0.15)、F1(0.20)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2 细胞周期结果($n=4$,%,$\bar{x}\pm s$)

细胞周期分布	FBS体积分数	时间(h) 24	48	72	96
G_0/G_1	0.10	90.80±0.76	89.53±0.94	83.88±2.84	68.11±3.17
	0.15	90.19±1.13	87.55±1.58	80.23±3.35	63.80±3.63
	0.20	88.45±1.96	86.60±1.75	80.09±3.19	62.09±2.25
G_2/M	0.10	2.74±0.36*	0.81±0.43	1.40±0.59	7.53±0.69
	0.15	1.82±1.11*	0.90±1.18	1.67±0.72	10.40±0.59
	0.20	4.77±0.53	1.48±1.07	1.82±0.13	11.54±3.55
S	0.10	6.46±1.09	9.66±0.66	14.72±2.26	24.36±2.74
	0.15	7.89±1.61	11.55±2.25	18.10±2.68	25.81±3.20
	0.20	6.78±1.88	11.92±2.26	18.08±3.10	26.37±3.39

与体积分数(0.20)比较:* $P<0.05$

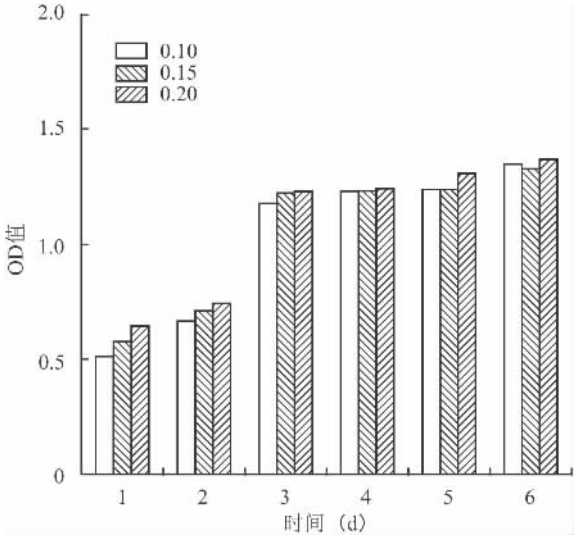

图4 3种培养基中的BMSCs在培养1、2、3、4、5、6 d的活力变化情况

功能因此被广泛的应用于组织工程、基因治疗、细胞治疗,被用来运送生物制剂和检测新植入材料的生物相容性。

目前分离BMSCs的方法有全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠法、骨髓过滤装置[10],后3种方法易损伤细胞活性,过程繁杂,前2种方法培养的细胞在前2代有差别,但至P3均已无差异。因此该文选取简单易行且能够获得足够数量与纯度的第一种方法。

至目前,对BMSCs的鉴定尚没有统一的方案。一般是通过以下方法来鉴定:首先,黏附能力;其次:多分化潜能;最后:表面标志,BMSCs无特异性表面标志,因属于非造血干细胞所以不表达CD11、CD14、CD34和CD45,高表达CD29[11]、CD44、CD73、CD271[12]、CD90、STRO-1和CD1偶05/SH2。因为抗大鼠的抗体非常少,因此本文选择CD45-PE、CD29-PE、CD44-FITC、CD90-FITC做为鉴定干细胞的标志。本文实验结果显示,CD45呈低表达而CD44、CD90、CD29高表达。细胞周期结果显示,P3细胞85%以上处于G_0/G_1期,说明是干细胞。

FBS含有BMSCs生长和增殖所需要的物质如生长因子:TGF-β1、β3、FGF-2等,因此都要在基础培养液里加FBS[13],但是关于适宜浓度,不同的文献报道不尽一致。有的实验结果显示11% FBS的完全培养基最适合BMSCs的增殖[3],有的研究结果显示15%[4]、20%[5]的完全培养基中BMSCs显示出最高的增殖能力,还有报道10%~20%有利于BMSCs的增殖,传统的培养基是DMEM加10%的FBS。本实验结果与传统的结论一致,10%的完全培养基已经适合BMSCs的体外扩增培养。不同的结果也许是由于每1批次的FBS不同,枪头准确性,或是BMSCs培养传代的过程中胰酶消化时间,传代方法不同等原因,这些都会影响其相关特性和分化的能力,进行实验前建议进行FBS批次的检测。

细胞周期包括间期和分裂期2个阶段,间期包括G_0/G_1期、S期、G_2/M期,在此期间进行着复杂的物质合成和能量储备。不同浓度FBS对BMSCs周期的影响是不同的,主要发生在间期内。该实验结果显示随着时间的增加,3种完全培养基G_0/G_1期减少,S期+G_2/M期减低,均能促进BMSCs的增殖,3期中只有G_2/M期在24 h时3组之间差异有统计学意义,3组的G_0/G_1期、S期、G_2/M期在其余各个时间点差异均无统计学意义。

FBS内含有营养物质和生长因子,浓度的不同会影响BMSCs的增殖、分化、基因表达、稳定性和活力。OD值可以间接反应细胞的活力。不同浓度的FBS对BMSCs活力的影响在第1天有差异,但在以后的5 d 3组活力相当,没有差异,说明含体积分数为0.10 FBS的完全培养基已满足BMSCs的活力,与细胞周期结果吻合。

参考文献

[1] Lin R,Ma H,Ding Z,et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Favor the Immunosuppressive T Cells Skewing in a Helicobacter Pylori Model of Gastric Cancer[J]. Stem Cells Dev,2013,22(21):2836-48.

[2] Muñoz Ruiz M,Regueiro J R. New tools in regenerative medicine: gene therapy[J]. Adv Exp Med Biol,2012,741:254-75.

[3] Li X,Zhang Y,Qi G. Evaluation of isolation methods and culture conditions for rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Cytotechnology,2013,65(3):323-34.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] Eslaminejad M B, Nazarian H, Falahi F, et al. *Ex vivo* expansion and differentiation of mesenchymal stem cells from goat bone marrow [J]. Iran J Basic Med Sci, 2009, 12(2): 70 – 9.

[5] Heidari B, Shirazi A, Akhondi M M, et al. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue [J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2013, 5(2): 104 – 17.

[6] 贾贵清,张明鸣,杨 平,等. 不同分离及培养方法对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和生物学特性的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(4): 719 – 23.

[7] Smajilagić A, Aljićević M, Redžić A, et al. Rat bone marrow stem cells isolation and culture as a bone formative experimental system [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2013, 13(1): 27 – 30.

[8] Wan J X, Zou Z H, You D Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into tubular epithelial-like cells *in vitro* [J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(2): 129 – 38.

[9] Feng Z, Li C, Jiao S, et al. *In vitro* differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes [J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(112): 2081 – 6.

[10] Otsuru S, Hofmann T J, Olson T S, et al. Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device [J]. Cytotherapy, 2013, 15(2): 146 – 53.

[11] Agorogiannis G I, Alexaki V I, Castana O, et al. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012, 250(3): 455 – 7.

[12] Arufe M C, De la Fuente A, Fuentes I, et al. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes [J]. Cell Biochem, 2010, 111(4): 834 – 45.

[13] McCarty R C, Gronthos S, Zannettino A C, et al. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Physiol, 2009, 219(2): 324 – 33.

Effect of different concentrations of fetal bovine serum on bone marrow mesenchymal stem cell purity and cycle

Chen Xiaodan, He Jiacai

(*Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To compare the influence of three kinds of complete media with 0.10, 0.15, 0.20 fetal bovine serum (FBS) on purity and cycle of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) cultured *in vitro* and to seek suitable FBS concentration for the cultivation of the stem cells. ***Methods*** SD rats were executed by cervical dislocation method and used whole bone marrow adherence to isolate rat BMSCs. Experiment was divided into A, B, C, 3 groups. Compared the expression of CD45, CD29, CD90, CD44 in the three groups in 2, 3, 4, 5 passages (P2, P3, P4, P5); the cells of P3 in group A were digested and cultured in three different concentration of complete culture media for four days, measuring cell cycle in 24, 48, 72, 96 h by flow cytometry instrument. BMSCs of P3 were collected and inoculated to 6 pieces of 96-well plates, then vaccinated with complete media with 0.10, 0.15, 0.20 FBS in every plate, one culture plate was taken out for optical density (OD) meaturement every day with CCK-8. ***Results*** CD45 was negative, CD29, CD90, CD44 were positive. The difference of BMSCs surface markers cultured in the three kinds of complete media was bigger in the first two passages, but the difference was less in P3, P4, all could obtain pure BMSCs in P4 relatively; according to the results of the cell cycle at the same time, G_0/G_1 phase: with the increase of concentration of fetal bovine, G_0/G_1 phase reduced and had no diference in A, B, C groups; G_2/M phase: there was difference between them after 24 h ($P<0.05$, $F=12.412$), but with the extension of time, the differences disappeared; S phase: there was no difference in the three groups; $S+G_2/M$ phase increased with the concentration of FBS. According to the result of cell vitality, the OD of ABC three groups increased in turn in 24 h, and there was difference ($P<0.05$, $F=5.002$), but with the extension of time, there was no obvious difference between them. ***Conclusion*** The three kinds of culture media in P4 can obtain pure BMSCs, cell cycle and vitality show three complete media can promote the growth of BMSCs. There is no difference between them. Culture media with 0.10 FBS can satisfy the isolation and amplification of BMSCs, in order to obtain pure BMSCs in the short term, using culture media with 0.15 and 0.10 FBS in the primary culture and subculture respectively.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; fetal bovine serum; cell cycle; surface marker

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net