

人关节软骨细胞的体外分离、培养与鉴定

童 迅^{1,2} 赵海恩¹ 张 栋¹ 赵新文¹ 曾照辉¹ 马保安^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院骨科 陕西 西安 710038 2 解放军第九七医院骨科 江苏 徐州 221006)

摘要 目的 研究人关节软骨细胞的体外分离、培养及鉴定方法,观察各代人关节软骨细胞的形态学特性。方法 取人创伤性截肢的无菌膝关节软骨,采用两步酶消化法分离培养人关节软骨细胞,并进行传代培养。通过倒置相差显微镜下观察细胞形态,绘制生长曲线,甲苯胺蓝染色及Ⅱ型胶原免疫组织化学染色对细胞进行鉴定。结果 两步酶消化法消化出的软骨细胞呈圆形,培养2-3天,细胞贴壁、变形,呈三角形或多角形,2周左右细胞融合成层,传代5次后出现去分化。软骨细胞增殖和生长缓慢。形态学、免疫组织化学染色显示细胞培养5代以内可以保持表型的稳定。结论 本研究采用胰蛋白酶及Ⅱ型胶原酶联合消化法获得大量高纯度、高活性的人关节软骨细胞。5代以内细胞生长良好,生物学特性明显,适合于实验研究,5代以后出现去分化现象。

关键词 人关节软骨 软骨细胞 细胞学

中图分类号: R318.17, Q813 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)16-3040-05

Isolation, Culture and Identification of Human Articular Chondrocytes In Vitro

TONG Xun^{1,2}, ZHAO Hai-en¹, ZHANG Dong¹, ZHAO Xin-wen¹, ZENG Zhao-hui¹, MA Bao-an^{1△}

(1 Department of Orthopaedics, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, China;

2 Department of Orthopaedics, the 97th hospital, PLA, Xuzhou, 221006, China)

ABSTRACT Objective: To study the methods for isolation, culture and identification of human articular chondrocytes in vitro, and observe the morphological characteristics of human articular chondrocytes in different generations. **Methods:** Cartilage was harvested under sterile conditions from human traumatic knee joints, human articular chondrocytes were isolated and cultured by using two-step enzymatic digestion, and the cells were subcultured. The cells were identified by observing cell morphology under phase-contrast microscope, drawing growth curve, toluidine blue staining and type II collagen immunohistochemistry staining. **Results:** The cells were round from the two-step enzymatic digestion, cells showed adhesion, deformation, triangle or multiangle after two-three days cultured and the cells formed a cohesive multiplayer on plastic surface about two weeks, and turned to dedifferentiation after five generations. The proliferation and growth of chondrocytes was slowly. Morphology and immunohistochemistry staining showed that stable phenotype could be maintained within five generations. **Conclusion:** In this study, a lot of highly pure and active human articular chondrocytes were obtained by using trypsin and type II collagenase digestion. Within five generations, the cells grew well with obviously biological characteristics, suitable for experimental study, and turned to dedifferentiation after five generations.

Key words: Human articular cartilage; Chondrocytes; Cytology

Chinese Library Classification(CLC): R318.17, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3040-05

前言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)又名退行性关节病、增生性骨关节炎,它以关节软骨的变性、软骨组织的破坏以及关节周围骨质的增生为特征。随着年龄的增长,骨关节炎的发生率逐渐增加,它是老年人疼痛和致残的主要原因。骨关节炎的确切病因尚不清楚^[1]。现已知道,骨关节炎发病的中心环节是关节软骨的退变。正常关节软骨由软骨细胞和软骨基质组成,软骨细胞是关节软骨的唯一细胞成分,其生物学特性的变化和骨关节炎的发生及发展密切相关^[2]。软骨细胞培养是研究软骨细胞增殖、分化等生物学行为及机制的最有力工具之一,也为骨关节炎的

研究提供了基础。目前国外有大量文献报道人软骨细胞的培养及其相关研究^[3,4],国内的研究多集中在动物软骨细胞的培养及其相关研究中^[5,6]。本实验研究了人软骨细胞的体外分离、培养及鉴定方法,观察各代人关节软骨细胞的形态学特性,为进一步研究人软骨细胞的其他生物学特性及骨关节炎的发病机制提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 从第四军医大学唐都医院骨科急诊截肢患者的手术废弃标本中获得无菌的正常膝关节软骨组织,并经患者知情同意。

1.1.2 实验试剂与仪器 DMEM/F12 培养基(HyClone);胰蛋白酶(Gibco);Ⅱ型胶原酶(Sigma);胎牛血清(PAA);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma);二甲基亚砜(DMSO, Sigma);兔抗-人Ⅱ型胶

作者简介 童迅(1974-)男,硕士,主治医师,研究方向:创伤、关节外科。E-mail: 1403539447@qq.com

△通讯作者:马保安 E-mail: maban@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2012-03-13 接受日期:2012-04-09)

原一抗(武汉博士德),DAB 显色试剂盒(美国 DAKO 公司)。无菌操作台(Thermo Electron MSC12);恒温摇箱(海尔 HRHPY);低温台式离心机(HERMLE Z-360 k);CO₂ 孵育箱(Thermo Forma);倒置相差显微镜(Olympus IX-70);酶标仪(Bio-Rad 680 型)。

1.2 方法

1.2.1 关节软骨细胞的分离 采用司徒镇强等^[7]的关节软骨细胞的体外分离方法,先将创伤性截肢取下的无菌膝关节软骨组织置于无菌培养皿中,用含青霉素钠/庆大霉素双抗液的 PBS 缓冲液冲洗数次后,在盛有 DMEM/F12 培养基的无菌培养皿中将软骨修剪至 1 mm³ 大小。将软骨碎块移入 50 ml 离心管中,低温离心 (1000 r/min 5 min),弃去上清液,加入 5 倍体积的 0.25 %胰蛋白酶,放入恒温摇箱中 37℃ 下振荡消化 40 min,轻轻吹打弃去上清液,D-Hanks 液冲洗 3 次,再加入 5 倍体积的 2 mg/ml 的 Ⅰ型胶原酶,放入恒温摇箱中 37℃ 下振荡消化 4-6 h,低温离心(2800 r/min 5 min),弃去上清液,DMEM/F12 培养液冲洗 3 次。加入含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,用吸管轻轻吹打,使细胞悬液分布均匀。

1.2.2 关节软骨细胞的原代及传代培养 将细胞以 1×10⁵/L 接种于 25 cm² 培养瓶内(5 ml/瓶),置于 37℃ 恒温 5 % CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。隔天换液 1 次,倒置相差显微镜观察并照相,记录细胞形态及贴壁生长情况。待软骨细胞汇合成片,长满大部分培养瓶壁后传代。传代时,弃去旧培养液,用 D-Hanks 液清洗细胞 2 次,培养瓶内加入 0.25 %胰蛋白酶 5 ml,室温下振荡 2-5 min。倒置相差显微镜下观察贴壁细胞已回缩,变成圆形,部分细胞开始浮游,加入 D-Hanks 液中中止消化。加入新的培养液,吹打均匀,使细胞彻底从培养瓶底脱落,收集细胞混和液,低温离心(2800 r/min 5 min),弃去上清液,D-Hanks 液清洗两次,加入含 10 %胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,用吸管轻轻吹打,使细胞悬液分布均匀。调整细胞浓度为 1×10⁵/L,将细胞接种于培养瓶内继续培养,或培养板内用于实验^[8]。

1.3 检测指标

1.3.1 倒置相差显微镜观察 在软骨细胞分离、培养以及传代培养的各个时期通过倒置相差显微镜观察正常软骨细胞的形态、贴壁生长情况、生长特性及细胞密度,并照相。

1.3.2 绘制细胞生长曲线 采用 MTT 比色法绘制软骨细胞生长曲线^[9]。取第 2、4、6 代软骨细胞按 1×10⁵/L 接种于 96 孔培养板中,5 孔作为空白调零孔,各代软骨细胞接种 70 孔,每孔 0.1 ml,共 3 块,隔日换液。连续观察 14 天,每日随机取 5 孔,加入

5 g/L 的 MTT 液 20 μL/孔,孵育 4 h 后,弃去上清液,加入 DM-SO 200 μL/孔,振荡 10 min 后酶标仪上测吸光度值(A),波长为 490 nm。取细胞数的平均值作为结果,在 Excel 表中绘制折线图来描绘细胞的生长情况。

1.3.3 甲苯胺蓝染色 对各代关节软骨细胞用爬片技术,即取生长状态良好的各代关节软骨细胞,经 0.25 %胰蛋白酶消化后,制成细胞悬液,以 1×10⁵/L 接种于预置有盖玻片的 24 孔板中培养。待细胞基本生长成单层后,取出盖玻片,以 4 %多聚甲醛固定 20 min,自来水冲洗 15 min,双蒸水冲洗 3 次,1 %甲苯胺蓝染色 30 min,双蒸水洗去多余的染液,无水乙醇脱水,中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察并拍照记录。

1.3.4 Ⅰ型胶原免疫组织化学染色 对各代细胞采用爬片技术,待细胞基本生长成单层后,取出盖玻片,以 4 %多聚甲醛固定 20 min。3 %过氧化氢室温下孵育 10 min,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min,滴加正常非免疫动物血清室温下孵育 10 min。除去血清,滴加 1:100 兔抗-人 Ⅰ型胶原-抗 4℃ 过夜。PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min。滴加生物素标记的二抗,室温下孵育 10 min,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色,苏木精复色,无水乙醇脱水,中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察并拍照记录。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

经过两步酶消化法分离得到的原代软骨细胞为球形,呈悬浮状态,大小均一,具有较强的折光性。软骨细胞贴壁较慢,培养 24 h 后,细胞逐渐开始贴壁,贴壁后的软骨细胞大部分呈圆形、椭圆形或短梭形(见图 1a) 2-3 天后贴壁的细胞逐渐变形为多角形或三角形,胞核为圆形或椭圆形,胞浆丰富(见图 1b)。培养 5 天后,软骨细胞呈不规则的卵圆形,可见成簇现象(见图 1c),1 周后细胞增殖明显,细胞间有突起相连接,部分区域软骨细胞呈集落生长,周围有基质样物质沉积。细胞疏密不一,有的区域可见大量基质包绕的结节样细胞群落(见图 1d)。约 2 周左右,细胞基本爬满瓶底,此时软骨细胞可变为圆形,胞体丰满,胞质均匀,核大而圆并且互相连接成“铺路石”样结构。传代后第 1 代细胞贴壁时间较原代细胞短,增殖速度加快,约 7-8 天铺满培养瓶瓶底,细胞仍以椭圆形为主。但随传代次数增加,细胞中梭形细胞逐渐增多,增殖与分泌能力下降,传代周期延长。

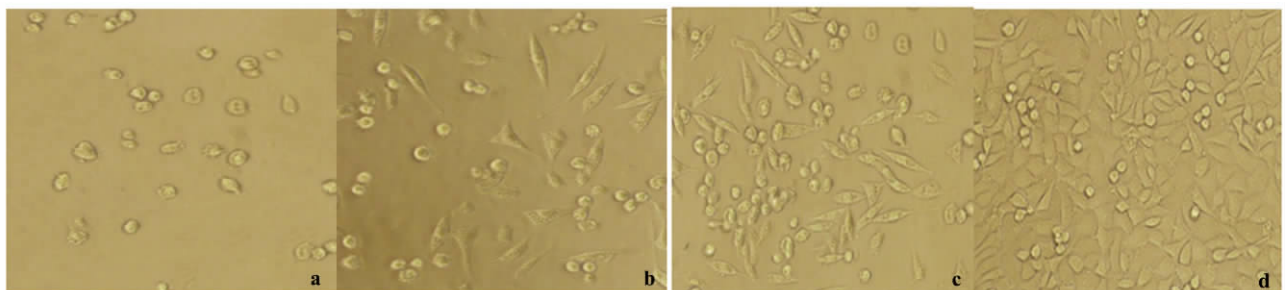


图 1 正常软骨细胞形态(光学显微镜,×100)

Fig. 1 Morphology of cartilage cells (Optical microscope, ×100)

第2代正常的软骨细胞经培养后,潜伏期在1-3天左右。第3天细胞开始增殖,5天左右增殖明显,呈指数增长。8-10天增殖趋缓,呈平台期。第10天后,由于细胞的相互接触而产生接触抑制,细胞增长进入停滞期。12天后呈下降趋势。第4、6代软骨细胞的生长曲线与第2代基本相同,但增殖高峰低,平台期时间短,且这一变化随传代次数增多而愈加明显(见图2)。

2.3 甲苯胺蓝染色

正常原代软骨细胞的甲苯胺蓝染色可见细胞内有蓝紫色异染颗粒,并且有少量的异染颗粒出现在细胞周围。集落样生长区域和多层生长区域的软骨细胞这一表现尤为明显,异染颗粒呈紫红色可以出现在部分细胞内及细胞外基质中。经多次传代培养后,软骨细胞甲苯胺蓝染色正染呈浅蓝色(见图3)。

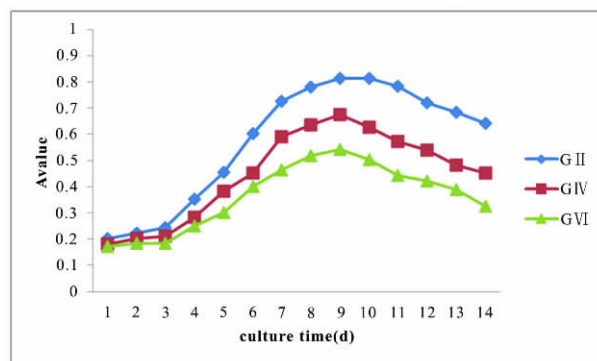


图 2 各代软骨细胞生长曲线

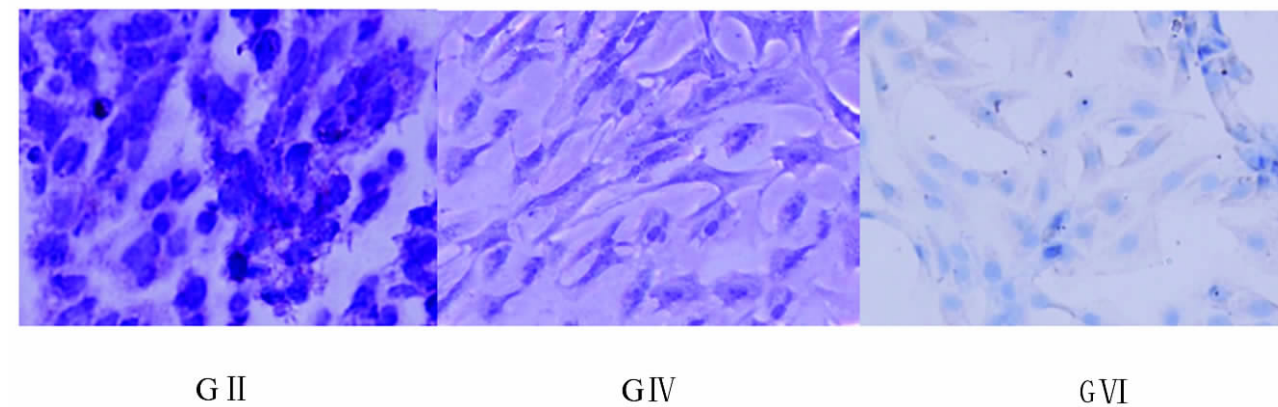


图 3 软骨细胞甲苯胺蓝染色($\times 200$)
Fig. 3 Toluidine blue staining of cartilage cells($\times 200$)

2.4 型胶原免疫组织化学染色

正常的原代软骨细胞 型胶原免疫组织化学染色见细胞及胞外基质为棕黄色,呈阳性,细胞核周围呈黄褐色,可见黄褐

色颗粒在细胞周围。细胞经传代后棕黄色着色渐减弱,5代以后软骨细胞呈成纤维化,突起增多,染色变淡(见图4)。



图 4 软骨细胞 型胶原免疫组织化学染色($\times 200$)

Fig. 4 Type collagen immunohistochemistry staining of cartilage cells($\times 200$)

3 讨论

正常的软骨是一种特殊类型的结缔组织。软骨细胞和基质是其主要成分,不含纤维血管组织。软骨细胞是软骨组织的唯一细胞成分。基质的主要化学成份是软骨粘蛋白和水分。基质

由软骨细胞产生和分泌。胶原纤维包埋于基质中,主要有间质型胶原、Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ、Ⅼ、Ⅽ、Ⅾ、Ⅿ、ⅰ、ⅱ、ⅲ、ⅴ、ⅵ、ⅶ、ⅷ、ⅸ、ⅹ、ⅺ、ⅻ、ⅼ、ⅽ、ⅾ、ⅿ、ⅿ、ⅿ等。蛋白多糖以硫酸糖胺多糖为主。软骨可分为透明软骨、弹性软骨和纤维软骨。关节软骨是透明软骨的一种。关节软骨细胞排列成长圆柱体,由浅层到深层逐渐由扁平状至椭圆或圆形的细胞组

成,随着时间的推移表面的关节软骨逐渐被深层新生的软骨所代替。因为关节软骨没有神经支配,也没有血管,再加上细胞有丝分裂活动极低,所以其自身修复能力差。临床上由于外伤或疾病造成的关节软骨缺损自身很难修复,可导致不可逆的病损,最终发展为骨关节炎。

体外培养软骨细胞是研究正常软骨细胞生物学特性及骨关节炎发病机制的重要手段,同时也是软骨组织工程的基础和关键环节。研究表明,软骨细胞生物学变化和骨关节炎的发生发展密切相关。而且骨关节炎的发生往往伴随软骨的磨损和软骨细胞的退变^[10]。

长久以来,由于认为软骨细胞不具备分裂增殖的能力,所以未能开展其体外培养的研究。1967年 Manning^[11]报道采用胰蛋白酶和细菌胶原酶联合消化关节软骨,把软骨细胞从坚韧的软骨基质中分离出来,从而获得数量充足且纯度比较高的软骨细胞,通过体外培养发现了软骨细胞具备分裂增殖的能力,从此开创了软骨细胞的体外培养技术。这种酶消化法延用至今,虽然人们先后进行了不同的改进,软骨细胞的收获量也有提高,但还不是十分理想。目前通过细胞酶消化分离原代软骨的方法有很多,常用的有 Green 法^[12]和 Klagabrun 法^[13]等。由于软骨细胞是软骨组织中唯一的细胞成分,本实验采用两步酶消化法中第一步使用低浓度的胰蛋白酶除去软骨组织中的滑膜及结缔组织,使胶原酶能更好的与软骨组织中的胶原纤维网络接触,第二步再使用高浓度 Ⅰ型胶原酶把基质消化后,大量高纯度的软骨细胞就可以分离出来。

软骨细胞属低氧、低代谢细胞。它适合在 pH 7.2-7.4、体积分数 5%-60% 的 CO₂、6%-91% 的 O₂ 浓度和低钙环境中生长。在软骨细胞培养液中加入一定质量分数的 MgCl₂ 可以提高软骨细胞的活性。软骨细胞长期单层培养或经过反复传代后,其生物性状不稳定。在细胞密度低的情况下,由于细胞易与基质间失去联系,基质中的细胞因子无法提供反馈调节,细胞出现反分化现象,表现为成纤维细胞样,Ⅰ型胶原的合成能力下降,Ⅱ型胶原的合成能力增加,细胞密度高时,大多数细胞能保持正常形态,有助于自分泌因子维持其表型并保持基质新陈代谢的平衡^[14]。

软骨细胞可以产生大量软骨粘蛋白和 Ⅱ型胶原。在软骨细胞体外培养过程中,由于细胞外环境与体内内环境差异的存在,软骨细胞的表型难以保持长久的稳定,进而细胞逐渐丧失其生物学特性,细胞形态、代谢、分化、增殖等都将发生一系列变化。软骨细胞由多角形、小圆形向椭圆形、梭形或成纤维样变化,细胞的代谢逐渐由无氧糖酵解变为有氧糖氧化,而且软骨细胞丧失了合成软骨粘蛋白的能力,合成胶原的类型也从 Ⅱ型变为 Ⅰ型、Ⅲ型。此时软骨细胞不再具有原细胞的特性及生理功能,这些变化称之为软骨细胞的反分化^[15]。本实验观察到,正常的软骨细胞在原代和 5 代以内绝大部分呈圆形或多角形,细胞外基质富含胶原,具有典型的软骨细胞生物学特征,并有良好的附壁生长和增殖活性。但是随着传代次数的增加,细胞中圆形、多角形的数量逐渐减少,梭形成纤维样细胞渐出现。5 代以后增殖与分泌能力下降,传代周期延长。

本实验 MTT 比色法结果显示,5 代以内软骨细胞的生长

曲线呈 "S" 型,软骨细胞生长的潜伏期在 1-3 天左右,在这一时期内的软骨细胞增殖缓慢。第 3 天开始细胞增殖,呈指数增长,指数增长期在第 4-8 天之间。此期活力最高,是进行各种实验最佳和最主要的阶段。随后进入平台期,平台期为第 8-10 天。第 10 天后,由于细胞的相互接触而产生接触抑制,进入停滞期,停滞期的时间为第 10-12 天。12 天以后细胞增殖呈下降趋势。

软骨细胞无特异性标志物,Ⅰ型胶原为软骨细胞的基因表达产物,可以通过其来确定软骨细胞的表型。通过对软骨细胞分泌的基质成分氨基多糖的甲苯胺蓝染色和基因表达产物 Ⅰ型胶原的免疫组织化学染色,再结合取材部位和培养过程中的观察,可以做出鉴别。本实验观察到,甲苯胺蓝染色可见软骨细胞内有蓝紫色异染颗粒,并且有少量的异染颗粒出现在细胞周围,而 Ⅰ型胶原免疫组织化学染色见软骨细胞及胞外基质为棕黄色,呈阳性,细胞核周围呈黄褐色,在细胞周围可见黄褐色颗粒。再结合所取材的部位以及培养过程中的观察,证实了本实验所观察的细胞为软骨细胞。

甲苯胺蓝染色可见正常原代软骨细胞内有蓝紫色异染颗粒,并有少量的异染颗粒出现细胞周围。经多次传代培养后,正常软骨细胞甲苯胺蓝染色正染呈浅蓝色。Ⅰ型胶原免疫组织化学染色显示正常的原代软骨细胞及胞外基质着色为棕黄色,呈阳性,细胞核周围呈黄褐色,可见黄褐色颗粒在细胞周围。经传代后棕黄色着色渐减弱,5 代以后软骨细胞呈成纤维化,突起增多,染色变淡。正常的软骨细胞在体外培养时无法长期保持其自然表型,随着培养时间的延长和传代次数的增加,其分泌和增殖能力下降,逐渐走向衰老和反分化。正常关节软骨细胞 5 代以内细胞生长良好,生物学特性明显,适合于实验研究,5 代以后细胞出现反分化现象。

本实验采用两步酶消化法从人创伤性截肢的无菌膝关节软骨中分离出大量高纯度的软骨细胞。经过体外培养及传代,观察软骨细胞的活性及形态学特性,并通过甲苯胺蓝染色和 Ⅰ型胶原的免疫组织化学染色鉴定为软骨细胞,为进一步研究人软骨细胞的其他生物学特性及进行软骨细胞移植提供了实验基础,而且对于研究骨关节炎病变的发病机制和临床治疗具有重要意义。

参 考 文 献(References)

- [1] 邱贵兴,荣国威.骨科学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2002:506
- [2] Qiu Gui-xing, Rong Guo-wei. Orthopaedics [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2002:506
- [3] Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in Osteoarthritic cartilage[J]. *Curt Drug Targets*, 2007, 8(2):333-345
- [4] Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, et al. Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro [J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20:245-259
- [5] Vonwill D, Schuler M, Barbero A, et al. An RGD-restricted substrate interface is sufficient for the adhesion, growth and cartilage forming capacity of human chondrocytes[J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20:316-328
- [5] 余振华,朱顺叶,张珑娟.大鼠胫骨生长板软骨细胞的分离与培养鉴

- 定[J].中华实验外科杂志,2008,25(10):1309-1310
- Yu Zhen-hua, Zhu Shun-ye, Zhang Long-juan. Primary culture and identification of rat tibial growth plate chondrocytes [J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(10):1309-1310
- [6] 胡志俊,胡波,唐德志,等.兔膝关节软骨细胞的分离培养及形态学特征[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(46):8555-8558
- Hu Zhi-jun, Hu Bo, Tang De-zhi, et al. Isolation, culture and morphological characteristics of rabbit articular cartilage cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14 (46): 8555-8558
- [7] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2006:157-159
- Si Tu-zheng-qiang, Wu Jun-zheng. Cell Culture [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2006:157-159
- [8] 秦俊,陈廖斌,汪晖,等.人膝关节软骨细胞的体外培养[J].武汉大学学报(医学版),2007,28(2):129-133
- Qin Jun, Chen Liao-bin, Wang Hui, et al. Culture in Vitro of Human Osteoarthritis Chondrocytes[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2007, 28(2):129-133
- [9] Lin Z, Willers C, Xu J, et al. The chondrocyte: biology and clinical application[J]. Tissue Eng, 2006, 12(7):1971-1984
- [10] Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, et al. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures[J]. Tissue Eng, 2006,12(4):691-703
- [11] Manning WK, Bonner WM Jr. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage[J]. Arthritis Rheum, 1967,10(3):235-239
- [12] Green WT Jr. Behavior of articular chondrocytes in cell culture[J]. Clin Orthop Relat Res,1971,75:248-260
- [13] Klagsbrun M. Large-scale preparation of chondrocytes [J]. Methods Enzymol, 1979,58(8):560-564
- [14] 俞永林,任志伟,乔健,等.兔关节软骨细胞的分离培养及生物学特征[J].复旦学报(医学版),2006,33(6):753-756
- Yu Yong-lin, Ren Zhi-wei, Qiao Jian, et al. Isolation, culture and biological characteristics of rabbit articular chondrocytes [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2006, 33(6):753-756
- [15] Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 228(1-2):79
- (上接第 3028 页)
- [7] 樊斌,李德卫,冯渊,等.大鼠肝移植急性排斥反应模型的建立[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(5):774-777
- Fan Bin, Li De-wei, Feng Yuan, et al. Establishment of an acute rejection model of rat orthotopic liver transplantation[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2011,15 (5):774-777 (In Chinese)
- [8] 彭勇,龚建平,刘长安,等.大鼠原位肝移植模型制作过程中麻醉方法的选择[J].中国普通外科杂志,2003,12(9):673-676
- Peng Yong, Gong Jian-ping, Liu Chang-an, et al. Selection of anesthetic method in setting up the animal model of orthotopic liver transplantation in rats [J]. Chinese Journal of General Surgery,2003,12(9):673-676(In Chinese)
- [9] 王振猛,唐乙,宋少华,等.大鼠原位肝移植模型的手术技巧[J].临床军医杂志,2008,36(4):638-640
- Wang Zhen-meng, Tang Yi, Song Shao-hua, et al. Operation skills for Orthotopic Liver Transplantation in Rats [J]. Clin J Med Offic, 2008, 36(4): 638-640(In Chinese)
- [10] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplantation in the rat[J]. Surgery, 1983, 93(1): 64-69
- [11] Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, et al. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats[J]. Physiol Gastrointest Liver Physiol,2001, 280(6): 1076-1082
- [12] Tokunaga Y, Ozaki N, Wakashiro S, et al. Effects of perfusion pressure during flushing on the viability of the procured liver using noninvasive fluorometry[J]. Transplantation, 1998, 45(6):1031-1035
- [13] 王轩,杨甲梅,严以群,等.大鼠原位肝移植不同术式的探讨[J].中华器官移植杂志,1998,19(2):76-78
- Wang Xuan, Yang Jia-mei, Yan Yi-qun, et al. Studies on the ways of orthotopic liver transplantation in rats [J]. Chin J Organ Transplant, 1998,19(2):76-78(In Chinese)
- [14] 彭承宏.血管4点和8点牵引吻合技巧[J].中国实用外科杂志,2006,26(3):225
- Peng Cheng-hong. 4 and 8 point traction technique in vascular anastomosis [J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2006, 26 (3): 225 (In Chinese)
- [15] Kashtl A, Mehmbi A, Pahlavan PS, et al. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat[J]. Transplant Proc, 2005, 37(1):185-188