

细胞支架研究进展

张 涛 姬振伟 钱济先[△]

(第四军医大学唐都医院全军骨科中心、全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038)

摘要 :目前细胞培养通常采用二维平面培养技术 ,但由于在培养板和培养瓶二维细胞培养并不能完全模拟体内细胞的三维生长环境 因此所得的试验数据与在体情况有偏差。然而细胞支架材料却能为细胞提供一个良好的三维生长环境 ,更利于细胞粘附、生长和增殖。目前可用于细胞支架材料的来源有天然和人工两大类 ,现将细胞支架研究进展综述如下。

关键词 细胞支架 ;组织工程 ;丝素 ;透明质酸 ;PLGA

中图分类号 :Q813 ,R318 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)01-165-04

The Research Progress of Cellular Scaffold

ZHANG Tao, JI Zhen-wei, QIAN Ji-xian

(Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: The cells training of nowadays usually takes a two-dimensional training, but because of the training boards and training bottles of the two-dimensional cells training that can't simulate the body of 3-D environment, thus the data of the experiment deviates from the data of the vivo situation. However, the cellular scaffold can provide a good 3d environment for the training cells growing, and it is more conducive to the training cells growth, clinging and propagation. Currently the source of the cellular scaffold can be classified into two categories: natural material and artificial material.

Key words: cellular scaffold; tissue engineering; silk fibroin; hyaluronan; PLGA

Chinese Library Classification: Q813, R318 **Document code**: A

Article ID:1673-6273(2011)01-165-04

细胞培养是众多医学生物学实验中必不可少的重要组成部分,目前绝大多数细胞培养通常采用二维平面培养技术,虽然能够获得比较满意的实验结果,但由于在培养板和培养瓶内培养细胞并不能完全模拟体内细胞的三维生长环境,因此以此为基础获得试验数据难免与在体内环境下得到的结果有差异。相比之下,细胞支架材料则能为细胞提供一个良好的三维生长环境,更利于细胞粘附、生长和增殖,也有利于获得更加真实合理的实验结果。

细胞支架材料是组织工程领域的重要组成部分,理想的细胞支架材料应具有以下特点:①良好的生物相容性,在体内不引起炎症或致畸反应,②适当的生物可降解性,且降解速率与细胞组织生成同步,③无免疫原性、无毒性,④维持支架能维持细胞形态和表型,并促进细胞粘附与增殖,诱导组织再生,⑤具有一定孔隙率、比表面积,⑥具有一定机械强度,⑦易加工成形,并可在一定时间内保持外观和结构的完整性^[1,2]。目前可用于细胞支架材料的来源有天然和人工两大类,现将细胞支架研究进展综述如下。

1 天然来源的支架

1.1 丝素蛋白(Silk fibroin, SF)

SF 是蚕丝脱胶后得到的天然高分子纤维蛋白,主要以无规线团、 α 螺旋和 β 折叠链的构象形式存在,力学性能主要取决于 β 折叠及其沿纤维轴方向高度聚集态结构^[3]。Charu 等^[4]发现 SF 具有良好的机械性能,且可被氨基酸侧链修饰而改变表面特性、固定细胞生长因子,多种细胞可在 SF 支架上良好生长。G.Chang 等^[5]发现多孔 SF 支架更利于细胞增殖和细胞外基质合成,是良好的椎间盘细胞支架。Rao 等^[6]对比研究不同丝胶比例的三维多孔混合 SF 支架,发现丝胶蛋白越多,支架孔隙率越高,机械特性越强,且细胞培养显示支架降解率低,细胞粘附良好,但伴有轻微炎症反应。总之研究表明 SF 支架具有良好的生物相容性、细胞粘附性和较好的抗张强度,但其亲水性差,且降解缓慢。

1.2 胶原蛋白(collagen):

胶原蛋白是一种细胞外基质糖蛋白,其特有的三股螺旋结构由 3 条 α 肽链形成的多肽链亚基相互缠绕形成。胶原蛋白具有较好的膨胀性和弹性强度,可与细胞表面整合素相互作用促进细胞的粘附与生长^[7]。Yates^[8]等将牛关节软骨细胞移植在胶原海绵支架上培养 4 周,发现胶原海绵支架有利于软骨细胞的粘附、增殖、分化和表型的保持。Atsushi 等^[9]将 II 型胶原凝胶与兔软骨细胞混合后移植修复兔膝关节软骨缺损,获得良好的效果。然而研究表明胶原蛋白存在加工性能差、缺乏柔韧性、抗拉强度低、易生物降解等缺点,因此对胶原结构进行修饰或构建复合细胞支架显得尤为必要。

1.3 透明质酸(hyaluronan, HA)及其衍生物:

HA 分布广泛,在机体发挥着调节细胞外液、润滑和促进创

作者简介 张涛(1985-)男,硕士研究生,医师,主要从事椎间盘退变与修复研究。电话:13619217780,029-84777591,

E-mail: zhangtao977456@163.com

[△]通讯作者 钱济先, E-mail: qianjx@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-10-04 接受日期 2010-10-28)

伤愈合、运输养分和细胞粘附等重要功能^[10]。Jeong 等^[11]将软骨细胞培养于 HA 最小交联三维支架,发现该支架能促进软骨细胞的生长和分化。E. Karna 等^[12]发现 IL-1 β 能够下调 II 型胶原 mRNA 表达水平,抑制脯氨酰氨基酸二肽酶的活性,从而抑制胶原的合成,而 HA 却能逆转该过程,促进胶原的合成。在胶原降解中,NO 是下游信号分子,可由 IL-1 诱导,但 HA 却能阻止 IL-1 诱导的胶原降解^[13]。Davide 等^[14]在透明质酸酯化衍生物(HYAFF-11)支架上培养软骨细胞,发现在 HYAFF-11 支架上 II 型胶原 mRNA 表达上调,单层细胞培养 21 天后 Sox9mRNA 持续表达。HYAFF-11 能明显改善 HA 的机械性能,使其具有良好的应用价值。

1.4 纤维蛋白凝胶(fibrin glue) :

纤维蛋白凝胶是细胞外基质(ECM)的重要组分。纤维蛋白抗原性小,免疫原性很低,具有良好的生物相容性^[15]。研究表明骨髓间充质干细胞(BMSCs)能够在纤维蛋白凝胶表面生长并逐渐黏附于其上,且细胞的形态、生长、增殖和分化活性良好。Homminga 等^[16]发现软骨细胞在纤维蛋白凝胶中能够保持细胞形态和增殖活性,并能产生 ECM。纤维蛋白凝胶支架也能促进培养于其上的细胞分泌产生 TGF- β 和 PDGF^[17],从而促进蛋白多糖和 I 型胶原的生成,且具有良好的可塑性、吸附性和组织相容性。Scotti 等^[18]将猪软骨细胞埋置于纤维蛋白凝胶上,细胞存活且合成能力增强,ECM 粘多糖(GAGs)及 I 型胶原均表达增加。纤维蛋白在体内的降解是物理性过程,无毒性代谢产物生成,但其存在降解速度太快、机械强度差等缺点。因此有必要对纤维蛋白凝胶进行化学修饰或与其他生物材料整合成复合凝胶,从而克服各自理化、生物学缺点,制成新型组织工程支架。

1.5 壳聚糖(chitosan,CS) :

壳聚糖是一种天然有机高分子聚合物。Yamane 等^[19]研究发现软骨细胞在壳聚糖 / 透明质酸混合细胞支架上能够增殖并维持其表型,同时见 I 型胶原的表达。Ragety 等^[20]发现在结合 I 型胶原的壳聚糖支架上细胞粘附及分布明显提高,而在乙酰化的壳聚糖支架上细胞粘附明显减少,但 I 型胶原并没有提高 MSCs 的粘附,表明经脱乙酰化处理的壳聚糖才可用于组织工程材料。壳聚糖具有的獨特分子结构和良好的生物相容性,易于加工成型,来源广泛且价格便宜,是理想的细胞外基质材料,可应用于生物医学工程领域。

1.6 藻酸盐类(alginate) :

藻酸盐是一类从海藻中提取的带有二价阴离子的天然线性多糖。海藻酸盐水溶液最为突出的特点是遇到一定浓度的钙等二价阳离子时,会形成稳定的海藻酸钠、钙混合盐凝胶。藻酸盐水凝胶在体内可以酶降解方式形成甘露糖醛酸和葡萄糖醛酸^[21]。藻酸盐载体对细胞有较强的吸附性,凝胶化后可减少细胞从多孔支架的逸出,且包埋在水凝胶中的细胞可进行营养和代谢物质的交换。Paige 等^[22]把牛关节软骨细胞与海藻酸盐水溶液混合后注射到无胸腺小鼠体内,6 周后发现透明软骨的形成。Bidarra 等^[23]将 MSCs 固定于精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)修饰的藻酸盐微球体,发现 MSCs 代谢活跃、存活率达 90%,可诱导向成骨细胞分化,且碱性磷酸酶(ALP)、I 型胶原、

Runx 2 表达上调。藻酸盐水凝胶来源丰富,易塑形,具有很好的亲水性,易于被细胞吸附,但也存在体内难以降解,组成成分不稳定,体内吸收差等缺点,因而其应用受到一定限制。

1.7 琼脂糖(agarose) :

琼脂糖也是一种从海藻中分离出来的多糖化合物。琼脂糖凝胶具有热可逆性,即在冷水中溶胀,在加热时凝胶溶解。Enders 等^[24]将软骨移植植物锚定于琼脂糖培养板,4℃时溶解为凝胶封闭移植植物与培养板之间的间隙,分离的软骨细胞限定于移植植物中间,有效阻止软骨细胞外溢,培养 4 周新生软骨有蛋白聚糖和 I 型胶原的生成。Tran 等^[25]发现成年牛软骨细胞能在琼脂糖支架上成活、增殖并能产生大量富含蛋白聚糖和 I 型胶原的软骨组织产物。琼脂糖凝胶呈疏松状,具有较好的亲水性、良好的惰性,主要靠糖链之间的次级键(如氢键)来维持网状结构,一般情况下较为稳定但不耐高温,可作为细胞支架材料,但应用较少。

1.8 小肠粘膜下层(small intestinal submucosa,SIS) :

SIS 是经机械方法去除小肠粘膜层和肌层而获得的一层呈半透明状、厚约 100 μ m 的胶原基质,是一种天然细胞外基质生物材料。SIS 中含有丰富的蛋白多糖、胶原蛋白和纤维粘连蛋白,能促进细胞与组织间的黏附、增殖和分化。SIS 内含多种生长因子,如 VEGF、PDGF、TGF- β 和 FGF-2 等,在组织的修复和重构中有着重要的促进作用^[26]。Tan 等^[27]在体外小肠粘膜支架上培养口腔粘膜上皮细胞,显示 SIS 是一种较好的上皮组织工程材料。SIS 具有适当的机械特性,有良好的组织相容性,且其结构具有自我调节能力,在体内能引导、支持宿主细胞生长,但其主要缺点是降解过快。

2 人工合成的支架

2.1 聚乳酸 (poly lactic acid,PLA)、聚羟基乙酸 (poly glycolic acid,PGA) :

PLA 有 PLLA(聚左旋乳酸)、PDLA(聚右旋乳酸)、PDLLA(聚消旋乳酸)三种立体构型。PLLA、PDLA 结晶性较高,机械强度大,PDLLA 为非晶态,机械强度差。PLLA、PDLA 在强度上可用作支架材料,但其高结晶性会干扰可控降解、引起迟发性炎症反应,而且亲水性较差,对细胞诱导能力较差,影响生物相容性。Ricotti 等^[28]研究显示骨骼肌细胞在聚乳酸超薄膜上能够粘附、铺展、并产生细胞基质,具有较好生物相容性,可用于肌肉组织工程及药物缓释系统。PGA 是目前广泛应用的细胞培养支架之一,但其存在亲水性差和细胞粘附力弱等缺点。因此可采用卵磷脂、多聚赖氨酸及纤维粘连蛋白等对 PGA 支架进行包埋,从而增加其亲水性和细胞吸附性。Endres 等^[29]将冷冻干燥非纺织 PGA-HA 复合支架移植入退变后切除的新西兰大白兔椎间盘,发现移植的聚合物结构能够诱导组织再生并提高组织含水量。总之 PGA、PLA 具有一定生物相容性和机械强度,可用于组织工程细胞支架,但需要对其进行化学修饰、包埋或与其它支架材料复合,使其成为良好的组织工程材料。

2.2 聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG) :

PEG 是一种聚醇高分子化合物,链末端可以引入功能化基团,使得 PEG 在多肽、蛋白的修饰和药物的缓释控制方面具有广阔的应用前景^[30]。Scott 等^[31]发现含有胶原的低浓度 PEG 凝

胶其机械强度随 PEG 浓度增加而增强,化学共轭胶原明显降低其硬度,在该支架上 PC12 细胞神经轴突随 PEG 的减少和胶原的增加而明显增加,证实低硬度三维 PEG 材料适宜于神经轴突生长和表达。试验表明 PEG 具有一定的生物相容性和机械强度,可用于组织工程材料,但生物不能降解也限制了其应用范围。

2.3 聚羟基乙酸聚乳酸聚合物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]:

PLGA 是一种广泛应用的组织工程材料,由乳酸(LA)和羟基乙酸(GA)直接熔融共聚而成^[32],具有良好的机械强度、生物相容性和可控性^[33],已被广泛应用于组织工程支架材料、手术缝合线、药物缓释载体、医疗缝合补强材料和骨折内固定材料等。但其亲水性较低、细胞粘附力弱,不利于细胞的粘附和生长^[34]。Wang 等^[35]在体内用填充有纤维蛋白凝胶、BMSCs 及质粒 DNA 编码的 TGF- β 1 的 PLGA 海绵复合体修复全层软骨缺损,显示了良好的修复效果。Woo 等^[36]将包含 β -葡聚糖的多孔静电纺丝 PLGA 薄膜应用于皮肤损伤的试验研究,证实该 PLGA 薄膜能促进创伤愈合,且安全有效。尽管 PLGA 细胞粘附力弱,但与其他材料聚合仍是一种理想的合成的细胞支架材料。

3 展望

尽管细胞支架材料种类繁多,应用范围广泛,但由于各具优缺点,目前还没有一种材料能够完全符合细胞支架材料的要求,因而也一定程度限制了各种支架材料的应用领域。随着组织工程的迅猛发展,对细胞支架材料也提出了更高的要求,近年来对细胞支架材料的研究进行了大量的工作,也取得了一定的进展,但也存在着问题。目前对单种支架材料和两种复合支架材料研究较多,且取得了一定成果,但并不能完全满足试验预期结果,因此对多种支架材料进行聚合或化学修饰,从而改善其理化和生物学特性将是今后细胞支架材料研究的主要方向。

参考文献(References)

- [1] Lin CY, Kikuchi N, Hollister SJ. A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity[J]. Journal of Biomechanics, 2004,37:623-636
- [2] Takezawa T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior [J]. Biomaterials, 2003,24:2267-2275
- [3] Chen X, Shao ZZ, Knight D, Vollrath F. Proteins [J]. Struct Funct Bioinf, 2007,68:223-231
- [4] Charu Vepari, David L, Kaplan. Silk as a Biomaterial [J]. Prog Polym Sci, 2007,32(8-9):991-1007
- [5] G. Chang, H.J. Kim, D. Kaplan, et al. Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus [J]. Eur Spine J, 2007,16: 1848-1857
- [6] Rao J, Shen J, Quan D, et al. Property studies on three-dimensional porous blended silk scaffolds [J]. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2009,23(10):1264-70
- [7] E. Karna, W. Mityk, S. Wolczynski, et al. Hyaluronic acid counteracts interleukin-1-induced inhibition of collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes [J]. Pharmacological Research, 2006,54: 275-281
- [8] Yates KE, Allemann F, Glowacki J. Phenotypic analysis of bovine Chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes[J]. Cell Tissue Bank, 2005,1:45-54
- [9] Atsushi F, Yasuo N. Repair of full-thickness articular cartilage defects using injectable type II collagen gel embedded with cultured chondrocytes in a rabbit model[J]. J Orthop Sci, 2008,3:225-232
- [10] Collis L, Hall C, Lange L, et al. Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: implications for an intracellular mode of action[J]. FEBS Lett, 1998,440:444-449
- [11] Jeong Yeon Kang, Chung Wook Chung, Dae-Duk Kim, et al. Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009,369: 114-120
- [12] E. Karna, W. Mityk, S. Wolczynski, et al. Hyaluronic acid counteracts interleukin-1-induced inhibition of collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes [J]. Pharmacological Research, 2006,54: 275-281
- [13] Arkadiusz S, Wojciech M, Robert C, et al. Hyaluronic acid abrogates nitric oxide-dependent stimulation of collagen degradation in cultured human chondrocytes[J]. Pharmacological Research, 2009,60:46-49
- [14] Davide G, Serena U, Paola B, et al. Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds [J]. Biomaterials, 2003,24:3265-3275
- [15] Wang Ya, Feng Yang. Application of fibrin glue in tissue engineering[J]. International Journal of Stomatology, 2008,35:31-33
- [16] Homminga GN, Buma P, Koot HW, et al. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro[J]. Acta Orthop Scand, 1993,64(4):441-445
- [17] Li Hua Zhuang, Hou Yue, Guo Zhi-liang, et al. The expression of hTGF- β 1 gene in bone marrow mesenchymal stem cells transfected with Ad-hTGF- β 1 autografted into the intervertebral disc [J]. The Journal of Cervicodynia and Lumbodynia, 2006, 27(3):179-182
- [18] Scotti C, Mangiavini L, Boschetti F, et al. Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009, 24:79-90
- [19] Shintaro Yamane, Norimasa Iwasaki, Tokifumi Majima, et al. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2005,26: 611-619
- [20] Ragety GR, Griffon DJ, Lee HB, et al. Effect of collagen II coating on mesenchymal stem cell adhesion on chitosan and on reacylated chitosan fibrous scaffolds [J]. J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(8): 2479-90
- [21] Li Z, Ramay HR, Hauch KD, et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005,26(18):3919-3928
- [22] Palge KT, Cima LG, Yaremchuk HJ, et al. Injectable cartilage [J]. Plast Reconstr Surg, 1995,88(5):1390-1398
- [23] Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, et al. Immobilization of human mesenchymal stem cells within RGD-grafted alginate microspheres and assessment of their angiogenic potential [J]. Biomacromolecules, 2010,11(8):1956-64
- [24] Enders JT, Otto TJ, Peters HC, et al. A model for studying human articular cartilage integration in vitro [J]. J Biomed Mater Res A,

2010,94(2):509-14

- [25] Tran-Khanh N, Chevrier A, Lascau-Coman V, et al. Young adult chondrocytes proliferate rapidly and produce a cartilaginous tissue at the gel-media interface in agarose cultures [J]. Connect Tissue Res, 2010,51(3):216-23
- [26] McDevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM. Transforming growth factor-beta in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa[J]. J Biomed Mater Res A, 2003,67(2):637-640
- [27] Tan B, Wei RQ, Yang ZM, et al. Experiment of oral mucosa epithelial cells cultured on small intestinal submucosa in vitro [J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2010,28(1):76-80
- [28] Ricotti L, Taccola S, Pensabene V, et al. Adhesion and proliferation of skeletal muscle cells on single layer poly (lactic acid) ultra-thin films[J]. Biomed Microdevices, 2010,12(5):809-19
- [29] Endres M, Abbushi A, Thomale UW, et al. Intervertebral disc regeneration after implantation of a cell-free bioresorbable implant in a rabbit disc degeneration model[J]. Biomaterials, 2010,31(22):5836-41
- [30] Davis ME, Hsieh PC, Grodzinsky AJ, et al. Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials[J]. Circ Res, 2005,97:8-15

- [31] Scott R, Marquardt L, Willits RK, et al. Characterization of poly (ethylene glycol) gels with added collagen for neural tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2010,93(3):817-23
- [32] Singh L, Kumar V, Ratner BD. Generation of porous microcellular85/15 poly(DL-lactide-co-glycolide) foams for biomedical applications[J]. Biomaterials, 2004,25(13):2611
- [33] Yao L, Wang S, Cui W, et al. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth [J]. Acta Biomaterials, 2009,5 (2): 580-588
- [34] Kuo CK. Cartilage tissue engineering:its potential and uses [J]. Curr Opin Rheumatol, 2006,18(1):64-73
- [35] Wang W, Li B, Li Y, et al. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly (lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes[J]. Biomaterials, 2010,31(23):5953-65
- [36] Woo YI, Park BJ, Kim HL, et al. The biological activities of (1,3)-(1,6)-beta-d-glucan and porous electrospun PLGA membranes containing beta-glucan in human dermal fibroblasts and adipose tissue-derived stem cells[J]. Biomed Mater, 2010,5(4):104-109

(上接第 175 页)

- [29] 李则宣. 创伤后应激障碍的生物学机制研究[J].中华精神科杂志, 2003,(04):65-67
Li Ze-xuan [J]. The biological Mechanism of Post-trauma Stress Disorder[J]. Chin J Psychiatry, 2003,(04):65-67
- [30] 刘媛, 王正国, 伍亚民. 创伤后应激障碍的中枢神经系统机制[J].中国临床神经科学, 2008,16(4):442-446
Liu Yuan, Wang Zheng-guo, Wu Ya-min. The Central Nervous Mechanism of Post-trauma Stress Disorder [J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2008,16(4):442-446
- [31] Broekman BF, Olff M, Boer F. The genetic background to PTSD[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2007,31(3):348-62
- [32] Norrholm SD, Ressler KJ. Genetics of anxiety and trauma-related disorders[J]. Neuroscience, 2009,164(1):272-87
- [33] Su TP, Zhang L, Chung MY, et al. Levels of the potential biomarker p11 in peripheral blood cells distinguish patients with PTSD from

those with other major psychiatric disorders [J]. J Psychiatr Res, 2009,43(13):1078-85

- [34] Zhang L, Li H, Su TP, et al. p11 is up-regulated in the forebrain of stressed rats by glucocorticoid acting via two specific glucocorticoid response elements in the p11 promoter [J]. Neuroscience, 2008,153 (4):1126-34
- [35] Zhang L, Li H, Benedek D, et al. A strategy for the development of biomarker tests for PTSD[J]. Med Hypotheses, 2009,73(3):404-9
- [36] Ursano RJ, Zhang L, Li H, et al. PTSD and traumatic stress from gene to community and bench to bedside[J]. Brain Res, 2009,1293:2-12
- [37] 肖冰, 韩芳, 石玉秀. 创伤后应激障碍模型大鼠杏仁核 COX 及 Caspase 3 mRNA 表达的变化[J].解剖科学进展, 2009,(04):353-356
Xiao Bing, Han Fang, Shi Yu-xiu. Expression of COX and caspase 3 mRNA in amygdala of posttraumatic stress disorder rat[J]. Progress of Anatomical Science, 2009,(04):353-356