

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.004

雪旺氏细胞与同种异体骨支架的体外共培养研究*

周翔¹ 段春光¹ 贾帅军² 孟国林¹ 唐鹏¹ 魏琳岚³ 雍志军¹ 刘建^{1△}

(1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032; 2 武警陕西省总队医院骨科 陕西 西安 710054;

3 西安卫星测控中心教导大队 陕西 西安 414012)

摘要 目的:探讨雪旺细胞(Schwann's cells, SCs)在同种异体骨支架上的生物相容性,体外构建组织工程骨神经化模型。**方法:**利用新鲜人体骨骼制备同种异体骨支架材料,检测其物理性能;采用优化方法提取新生SD大鼠坐骨、臂丛神经培养SCs,实验分为三维培养实验组(SCs+同种异体骨)、二维培养对照组(SCs+胶原玻片),S-100抗体免疫荧光染色鉴定SCs纯度;细胞计数法检测两组细胞增殖特点;细胞接种后第3、7天取样,扫描电镜观察。**结果:**同种异体骨支架具有良好的三维孔隙结构,适宜细胞贴附生长;S-100免疫荧光染色证实SCs纯度>95%;扫描电镜检测显示两组SCs均可正常粘附增殖,细胞间排布规律相似,培养早期实验组SCs胞体更加细长,伪足更加明显,随着培养时间的延长表现出较强的迁移能力;细胞增殖检测:两组SCs生长曲线特征基本一致,支架材料对SCs无毒性作用。**结论:**同种异体骨支架SCs具有良好的生物相容性,其三维立体多孔结构有利于SCs的粘附与迁移,初步构建了体外组织工程骨神经化模型。

关键词:同种异体骨;雪旺细胞;组织工程骨神经化;生物相容性

中图分类号:Q 95-3, R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)13-2412-05

In Vitro Culture of Schwann Cells on Allogeneic Bone Scaffolds*

ZHOU Xiang¹, DUAN Chun-guang¹, JIA Shuai-jun², MENG Guo-lin¹, TANG Peng¹, WEI Lin-lan³, YONG Zhi-jun¹, LIU Jian^{1△}

(1 Department of orthopedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Orthopaedics, Shannxi Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

3 Xi'an Satellite Control Center, Xi'an, Shaanxi, 414012, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the biocompatibility between *in vitro* cultured Schwann cells (SCs) and allogeneic bone scaffolds. **Methods:** Allograft bone scaffold materials were prepared from fresh human bones and the physical properties were tested. SCs were isolated from extracted sciatic and brachial plexus from newborn SD rats. Two culture conditions were used: three-dimensional (SCs plus allogeneic bone scaffold) and two-dimensional culture model (SCs plus collagen glass). The purity of SCs was identified with immunofluorescence staining by anti-S-100 antibody. The cells were evaluated for proliferation by cell counting and also imaged with scanning electron microscopy. **Results:** Allogeneic bone scaffolds had the special three-dimensional pore structure, which supported the adhesion and growth of SCs. The purity of SC was >95%. SCs cultured in both three-dimensional and two-dimensional models proliferated well at the similar rate and shared the similar distribution characteristics. Compared with the two-dimensional model, the cells cultured in the three-dimensional model showed slender cell bodies and more cellular pseudopods at the early stage of incubation, and enhanced capability of migration at the later stage of incubation. **Conclusions:** Allogeneic bone scaffold and SCs have good biocompatibility and the *in vitro* model of tissue engineering neural bone is successfully established.

Key words: Allogeneic bone; Schwann cells; The nervalization of bone tissue engineering; Biocompatibility

Chinese Library Classification: Q95-3, R318.08 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)13-2412-05

前言

创伤、感染、肿瘤术后等原因造成的大段骨缺损一直是困扰骨科医生的难题,治疗方法包括截骨延长、自体及异体骨移植等,其中骨移植被认为是首选疗法^[1]。组织工程骨技术^[2]的出现为修复大段骨缺损提供了良好途径,近年来组织工程骨神经化研究日渐受到关注。有研究显示组织工程骨复合感觉神经束

后植入动物骨缺损处,其成骨能力较单纯组织工程骨植入明显增强,证实了组织工程骨神经化有促进新骨形成作用^[3]。Wang^[4]等的研究也证实神经对骨代谢具有重要调节作用。然而既往组织工程骨神经化研究多为骨缺损动物模型体内植入完整的神经束以促进局部成骨,虽成骨效果确切,但神经束取材受限、植入后成活率较低、支配促成骨区域有限。因此本研究设计利用SCs在同种异体骨支架上构建组织工程骨神经化模型,希望该

* 基金项目:国家 863 项目(2012AA020502-6);全军医学科技青年培训项目(13QNPI30)

作者简介:周翔(1988-),男,硕士,研究方向:组织工程骨神经化,电话:18792470331 E-mail: 535539643@qq.com

△通讯作者:刘建(1958-),博士生导师,主任医师, E-mail: ZX2011382@126.com

(收稿日期:2013-12-25 接受日期:2014-01-20)

复合体植入体内后可以诱导自身神经均匀长入从而完成工程骨神经重建。设计从形态学、细胞增殖方面评定 SCs 与同种异体骨的生物相容性,及 SCs 支架三维培养状态下生长迁移规律。

1 材料和方法

1.1 实验材料、仪器

SD 大鼠 (1-3 天) 购自第四军医大学实验动物中心; DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、II 型胶原酶、多聚赖氨酸 (PLL)、阿糖胞苷 (Arab-c)、谷氨酰胺 (Gsn)、S-100 抗体、DAPI (sigma 公司, USA), 牛垂体提取物 (BPE)、腺苷酸环化酶激活剂 (forskolin) (Sciencell 公司, USA), 鼠尾胶原 (自制), CO₂ 细胞培养箱 (Nuair, USA), 解剖显微镜、倒置相差显微镜 (Nikon Japan), 激光共聚焦显微镜 (Olympus FV1000 Japan), 扫描电镜 (Hitachi, S-3400N, Japan)。

1.2 同种异体骨支架材料的制备及检测

1.2.1 材料制备 同种异体骨支架材料的获取、加工储存参照“第四军医大学全军骨科研究所综合骨库同种骨技术标准”进行^[5]; 新鲜尸体经相关部门审核并由家属知情同意捐献获得, 取髂骨、椎体近皮质部松质骨, 经脱脂、脱蛋白、脱钙处理, 制成 $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ 骨块, -70°C 深低温冷冻干燥, 60Co 射线消毒, 4°C 保存备用。

1.2.2 支架材料物理性能检测

孔径观察: 扫描电镜观察材料三维孔隙结构特征, 通过电镜图片分析材料表面孔径大小范围。

孔隙率测定: 随机取 6 块材料, 计算材料外观体积 V_1 , 浸入盛有体积为 V_2 的无菌水量筒内, 抽真空至量筒无气泡冒出, 此时量筒读数为 V_3 ; 孔隙率 $P = (V_1 + V_2 - V_3) / V_1 \times 100\%$ ^[6]。

1.3 大鼠 SCs 的培养、纯化鉴定

1.3.1 原代 SCs 的培养、纯化 将出生 1-3 天的 SD 乳鼠浸入 75% 的酒精 3min 消毒处死, 显露并切取双侧坐骨、臂丛神经, 解剖显微镜下充分剥除神经外膜, D-Hanks 液冲洗至纯白色后剪碎至糜状, 加入等体积 0.25% 胰蛋白酶、0.2% II 型胶原酶, 37°C 消化 25min, 终止消化后 1000r/min 离心 8min, 弃上清, 加培养基制成 1×10^5 个/ml 浓度的细胞悬液, 接种至培养瓶, 于 37°C 5% CO₂ 孵育箱中培养 30min, 转移细胞悬液到 0.01% 多聚赖氨酸 (PLL) 包被过的新培养瓶中继续培养, 因 SCs 贴壁开始于接种后数小时、多数成纤维细胞接种后 10-30min 即可完成贴壁^[7], 因此利用两种细胞贴壁速度的差异, 可将 SCs 与成纤维细胞分离, 提高 SCs 纯度, 2-3d 换液一次。

成纤维细胞于培养第 3 天始逐渐增多, 加入终浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的阿糖胞苷 (Arab-c) 纯化处理 24h, 间隔 10h 后再予 Ara-c 处理 24h 以抑制成纤维细胞增殖, 培养基中添加 Gsn、BPE $20 \mu\text{g/ml}$ 及 forskolin $5 \mu\text{mol/L}$ ^[8] 以促进 SCs 增殖及提高活性。

1.3.2 SCs 免疫荧光染色及纯度计算 取 P2 代 SCs 以 1×10^5 /ml 细胞密度接种在包被胶原的玻片上, 以 S-100 抗体 + DAPI 双标免疫荧光法进行细胞免疫学标记, 操作过程严格避光, 激光共聚焦荧光显微镜下, 同一视野在不同波长激发光摄片, 呈红光反应的是 S-100 抗体阳性, 呈蓝光反应的是 DAPI 阳性, 随

机选取 6 张图片, 纯度计算公式如下: 雪旺细胞纯度 = S-100 抗体阳性细胞数 / DAPI 阳性细胞数 $\times 100\%$ 。

1.4 SCs 接种: 构建细胞三维及二维培养模型

实验组: SCs+ 支架材料, 材料经培养基浸泡 12h, 无菌吸水纸吸干置入 24 孔培养板, 将 P2 代的 SCs 制成 1×10^5 个/ml 的细胞悬液, 每个材料接种 $20 \mu\text{L}$ 悬液, 静置细胞培养箱中, 4h 后取出并翻转材料, 再滴加 $20 \mu\text{L}$ 细胞悬液 (4×10^3 个细胞 / 材料), 继续孵育, 4h 后添加含 10% FBS 的培养基 2.5 ml/孔 ; 对照组: SCs+ 胶原玻片, 同批 SCs 以 4×10^3 个 / 孔接种在 24 孔板内, 孔底铺有鼠尾胶原 (取自成年 SD 鼠尾腱) 预包被的玻片, 隔日换液观察。

1.5 细胞增殖检测

细胞接种材料后 1-8 天, 每组每天随机取 3 份样本, PBS 冲洗、0.125% 胰酶消化, 移液管轻柔冲洗支架材料及胶原玻片并收集细胞, 每份细胞悬液样本离心后定容至 1ml, 血球计数板计数, 每份样本重复计数 3 次, 根据计算所得每组每天细胞数绘制两组 SCs 生长曲线。

1.6 SEM 观察

细胞接种后第 3、7 天, 每组取 3 份样本 PBS 漂洗, 戊二醛固定过夜, 临界干燥法脱水干燥, 真空喷金, 扫描电镜观察细胞形态及与材料表面粘附情况。

1.7 统计学分析

所得结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 spss16.0 统计软件, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 同种异体骨扫描电镜观察

大体观察可见同种异体骨支架材料呈疏松多孔状, 色泽较白, 质地较为坚硬。扫描电镜 (SEM) 可见材料具有较多三维孔隙结构, 骨小梁、小梁间隙、管腔等结构较为完整, 孔间连通性良好, 通过电镜图片分析材料孔径范围: $300-800 \mu\text{m}$ (图 1), 排除法检测材料孔隙率 (porosity) = $78.26 \pm 2.95\%$ 。

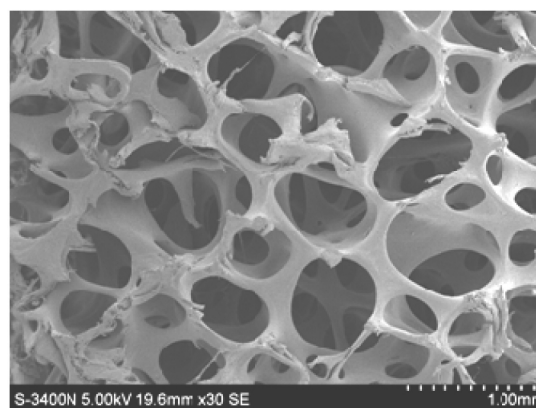


图 1 同种异体骨扫描电镜照片

Fig.1 Allogeneic bone under scanning electron microscope

2.2 SCs 倒置相差显微镜观察

原代 SCs 接种 4h 后开始贴壁生长, 贴壁细胞呈双极突起, 胞体梭形或三角形, 边缘有亮带, 立体感强, 胞核卵圆形, 随着培养时间的延长梭形细胞逐渐增多, 两端突起延长并相互连

接,细胞之间首尾相连、并排排列或成栅栏状,图中未见明显成纤维细胞聚集生长现象(图2)。

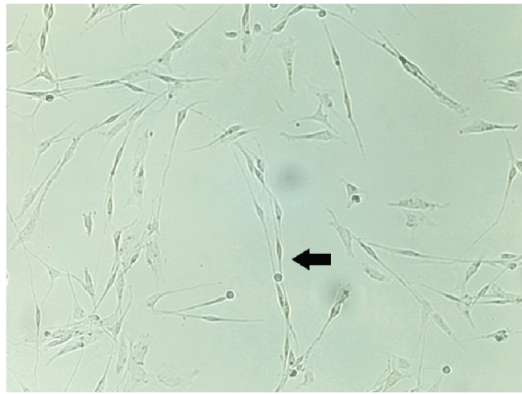


图2 SCs 培养后 5d,倒置显微镜照片($\times 200$)

Fig.2 Rat SCs under inverted phase contrast microscope after 5 days of culture ($\times 200$)

2.3 SCs 细胞 S-100 抗体免疫荧光染色、激光共聚焦观察及纯度计算

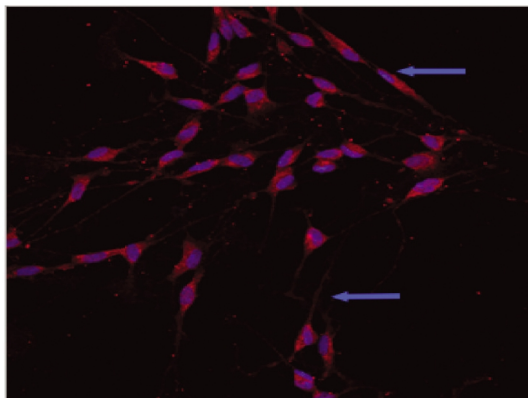


图3 SCs 培养 5d,S-100+DAPI 免疫荧光化学染色观察
(荧光显微镜 $\times 400$)

Fig.3 Immunofluorescence staining of SCs by anti-S-100 antibody and DAPI after 5 days of culture (Fluorescent microscope $\times 400$)

SCs 激光共聚焦荧光显微镜观察:S-100 蛋白特异性分布于中枢及周围神经系统的星形胶质细胞、雪旺细胞、神经元细胞等,成纤维细胞无 S-100 蛋白表达,因此是目前最准确的 SCs 鉴定靶点^[9]。图中呈红色 S-100 抗体阳性反应的是 SCs 胞质,呈蓝色 DAPI 阳性反应的是 SCs 和成纤维细胞胞核,SCs 边界清楚,胞体呈梭形或三角形,两端及细胞之间有大量特征性红色丝状细胞突起相互连接,彼此排布呈肩并肩、首尾相连状(图3),与倒置显微镜结果相符,而胞质不显色,扁平宽大不规则、两个以上突起、缺乏立体感是成纤维细胞,图中明显未见成纤维细胞生长。结合免疫荧光结果及 SCs 形态特征分析计算:SCs 纯度:95.89 $\pm$ 3.45%,优于相关文献报道^[10],纯度符合组织工程种子细胞要求。

2.4 细胞增殖检测(细胞计数法)

两组均从第3天开始进入对数生长期(图4),倍增时间约为2天,第7天进入平台期。第1、2、7天两组细胞数基本持平,

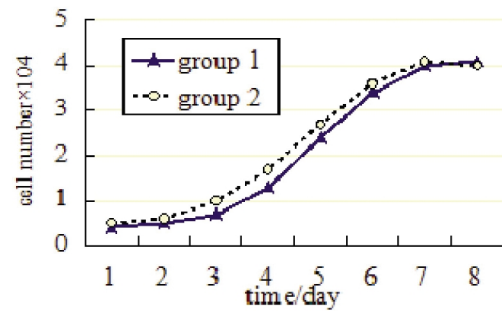


图4 SCs 生长曲线(1组:SCs+ 支架材料 2组:SCs+ 胶原玻片)

Fig.4 Growth curves of SCs of two groups (group 1:SCs plus allogeneic bone scaffold group 2:SCs plus collagen glass)

差异无统计学意义($P>0.05$),第3-6天对照组细胞数略多于实验组,差异有统计学意义($P<0.05$)。第8天实验组细胞数略高于对照组,差异无统计学意义($P>0.05$),结果提示,两组细胞生长周期总体趋势基本相符,未见明显毒性反应,SCs 可以在支架材料上正常粘附扩增。

2.5 扫描电镜观察

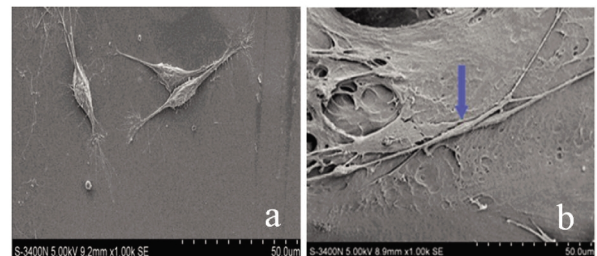


图5a 第3天 SCs 扫描电镜照片(二维胶原对照组) 图5b 第3天 SCs 扫描电镜照片(三维支架实验组)

Fig.5a Scanning electron microscopy image of SCs after 3 days of culture in 2D control group

Fig.5b Scanning electron microscopy image of SCs after 3 days of culture in 3D culture group

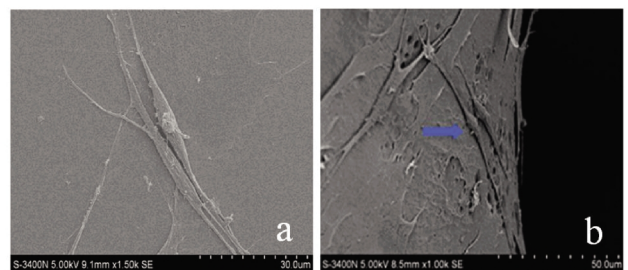


图6a 第7天 SCs 扫描电镜照片(二维胶原对照组) 图6b 第7天 SCs 扫描电镜照片(三维支架实验组)

Fig.6a Scanning electron microscopy image of SCs after 7 days of culture in 2D control group

Fig.6b Scanning electron microscopy image of SCs after 7 days of culture in 3D culture group

第3天,两组 SCs 细胞均呈梭状,可见明显伪足及微绒毛,实验组 SCs 沿材料孔旁骨梁平行生长,胞体长 50-80 μm ,两端神经突起明显长于对照组且可见分支,SCs 神经突起状况可直接反应细胞活性及迁移能力(图5a、5b)。第7天,两组 SCs 胞体长度、细胞排布等细胞形态学特征相似,实验组可见材料孔边

缘 SCs 形态良好并向支架材料孔内平行迁移生长 (图 6a、6b)。两组 SCs 均贴附良好、形态正常,表现出较强的细胞活性,未见明显细胞固缩或崩解现象,细胞梭形形态、串珠及肩并肩特征性排布方式较之前相差显微镜、免疫荧光检测结果未见明显改变;相较二维培养,三维培养下支架材料对 SCs 形态、细胞分裂、排布方式未见明显不利影响,培养早期三维培养组 SCs 更富有活力,且随着培养时间的延长表现出较强的迁移生长能力。

3 讨论

组织工程骨神经化^[1]是利用组织工程技术修复骨缺损的新兴分支,以支架材料、种子细胞、生长因子三要素作为研究对象,通过重建新生骨神经支配,增强组织工程骨的成骨及体内存活能力。国际上,神经化骨骼学(Neuro-osteology)的概念早于 1998 年已经提出,该理论指出神经对骨组织的发育、形成及代谢具有决定性影响^[2]。有研究表明,骨修复过程中肽能神经可长入骨痂并在局部分泌神经肽调节骨再生^[13-14],动物模型也表明骨组织的支配神经受到破坏后骨组织密度显著降低,其力学性能也显著下降^[15],以上研究证实了神经对骨代谢的重要调节作用。基于以上事实我们认为组织工程骨神经化是提高大段骨缺损骨组织修复质量的一个关键环节,具有重要发展前景。

3.1 SCs 的纯化培养体系的建立及性能评价

原代 SCs 培养中常因贴壁困难、细胞凋亡、成纤维细胞大量增殖导致培养失败,因此促进 SCs 贴壁、提高细胞活性及纯度是 SCs 培养的核心问题,本实验综合应用复合酶消化、原代差速、传代双向差速、Ara-C 抑制成纤维、添加 Gsn+BPE+forskolin 的优化方法培养纯化 SCs^[8,16];倒置显微镜、扫描电镜形态学结果、免疫荧光纯度鉴定结果、细胞增殖检测结果显示:SCs 胞体圆润(细胞活性高)、纯度高($95.89 \pm 3.45\%$)、增值较快(倍增时间 2 天),该优化培养体系可为组织工程神经化研究提供足够数量、高纯度、高活性的 SCs。再者,SCs 作为外周神经胶质细胞广泛用于神经损伤重建研究,其通过机械性引导,分泌神经生长因子(NGF)、促突起生长因子(NPF)、轴突诱导因子,促进髓鞘化等方式引导神经轴突再生^[17-18],重建骨组织神经支配从而发挥间接促成骨作用。体外细胞联合培养研究也证实 SCs 可促进骨髓间充质干细胞及成骨细胞增殖分化,直接发挥促成骨作用^[19],因此 SCs 是构建组织工程骨神经化模型的首选种子细胞。

3.2 同种异体骨支架性能检测及优越性

本研究显示材料表面粗糙,具有较高孔隙率 ($78.26 \pm 2.95\%$)、较大的孔径($300-800 \mu\text{m}$)及良好的孔间连通性,这些结构特征均有利于 SCs 的粘附迁移,提高神经化模型的成神经能力。材料制备过程中保留下来的部分骨形态发生蛋白等骨生长因子,可诱导间充质干细胞、骨祖细胞等向成骨、成软骨方向转化,诱导成骨活性较高^[20],实验组细胞增殖检测结果表明支架材料对 SCs 粘附增殖无明显不良影响,同种异体骨与 SCs 具有良好的生物相容性,是组织工程骨神经化体内、体外实验的良好支架材料。

3.3 SCs 与骨支架的体外培养及生物相容性探讨

胶原蛋白是人和脊椎动物体内含量较多的蛋白质,具有良

好的生物相容性、可降解性、低免疫原性^[21],因此本实验以自制鼠尾胶原包被玻片作为二维培养对照组,从细胞形态、粘附排布规律、增殖特点等方面对比评价 SCs 与同种异体骨支架的生物相容性,及 SCs 在不同培养模式下细胞活性及增殖迁移的异同。

倒置显微镜、激光共聚焦结果可见较低细胞接种密度下,SCs 长梭状细胞形态,串珠样、肩并肩排布规律未随着 2D 或 3D 培养模式的改变而发生明显改变,该生长特性很有利于 SCs 在支架材料上均匀分布,充分发挥其促神经、促成骨功能。SEM 观察显示在 2D 或 3D 两种培养模式下 SCs 均贴附紧密、形态良好,未见明显固缩成团、脱落崩解等凋亡及毒性反应迹象,三维支架培养早期 SCs 胞体长度较长($50-80 \mu\text{m}$),且发现明显的 SCs 沿材料孔径伸出长长的突起,向材料内部迁移生长现象。细胞增殖生长曲线显示 2D 或 3D 培养组细胞生长曲线总体趋势基本一致,支架材料对 SCs 粘附增殖无明显不良影响。

综上所述,本实验建立了优化的 SCs 纯化培养体系,证实了 SCs 与同种异体骨之具有良好的生物相容性,并对较低种植密度 SCs 在同种异体骨支架上的生长增殖规律进行了初步探讨,为下一步体内实验的进行提供了技术基础及思路。

参考文献(References)

- [1] 李东亚,郑欣,陈一心. 骨组织工程支架材料应用于大段骨缺损的实验研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2013, 15(1):87-90
Li Dong-ya, Zheng Xin, Chen Yi-xin. Progress in the experimental research of bone tissue-engineering scaffolds for treating large bone defects[J]. Journal of traumatic surgery, 2013, 15(1):87-90
- [2] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors [J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(5):307-314
- [3] 张元平,崔继秀,裴国献,等. 组织工程骨体内植入运动与感觉神经束后的成骨效果[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, (1): 60-65
Zhang Yuan-ping, Cui Ji-xiu, Pei Guo-xian, et al. Osteogenesis effects of tissue-engineered bone after sensory and motor nerve tract implantations [J]. Chinese journal of orthopaedic trauma, 2005, 7(1): 60-65
- [4] Wang T, Cao J, Du Z J, et al. Effects of sympathetic innervation loss on mandibular distraction osteogenesis[J]. J Craniofac Surg, 2012, 23 (5):1524-1528
- [5] 李丹,毕龙,胡蕴玉,等. 综合骨库在现代矫形外科中的应用 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(21):1639-1643
Li Dan, Bi Long, Hu Yun-yu, et al. Effect of multi - variety bone bank in contemporary orthopaedics [J]. Orthopedic journal of china, 2009, 17(21):1639-1643
- [6] 杨渊,林春博,陈维平. 脱钙松质骨的骨支架材料制备及生物学检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47): 8769-8772
Yang Yuan, Lin Chun-bo, Chen Wei-ping. Preparation and biological detection of demineralized cancellous bone scaffolds [J]. Journal of tissue engineering research and clinical rehabilitation, 2010, 14(47): 8769-8772
- [7] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安市:世界图书出版公司, 2010: 66-68
Situ Zhen-qiang, Wu Jun-zheng. Cell culture [M]. Xi'an: World

- Publishing Corporation, 2010: 66-68
- [8] Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW. Integrated culture and purification of rat Schwann cells from freshly isolated adult tissue[J]. Natural protocol, 2012, 118, 10-1038
- [9] Michetti F, Cazzolo D. S-100B protein in biological fluids: a tool for perinatal medicine[J]. Clin Chem, 2002, 48(12): 2097-2104
- [10] Niapour A, Karamali F, Karbalaie K, et al. Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells [J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(6): 781-786
- [11] 裴国献, 金丹, 陈滨, 等. 骨组织工程研究中的血管、神经化问题[J]. 中国创伤骨科杂志, 2000, 2(4): 333-313
Pei Guo-xian, Jin Dan, Chen Bin, et al. The research of bone tissue engineering composited with vessel and nerve [J]. Chinese journal of orthopaedic trauma, 2000, 2(4): 333-313
- [12] Kjaer I. Neuro-osteology [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1998, 9(2): 224-244
- [13] Lerner U H, Persson E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2008, 8(2): 154-165
- [14] Wang L, Zhao R, Shi X, et al. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro [J]. J Bone Miner Res, 2009, 45 (2): 309-320
- [15] Offley SC, Guo TZ, Wei T, et al. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 257-267
- [16] Wei Y, Zhou J, Zheng Z, et al. An improved method for isolating Schwann cells from postnatal rat sciatic nerves [J]. Cell Tissue Res, 2009, 337(3): 361-369
- [17] Alexandms AL, Isabelle F, Monique DD, et al. Schwann cells genetically engineered to express PSA show enhanced migratory potential without impairment of their myelinating ability in vitro [J]. GLIA, 2006, 53(8): 868-878
- [18] Sangsanoh P, Suwantong O, Pavasant P, et al. In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds [J]. Biomacromolecules, 2007, 8(5): 1587-1594
- [19] 姜晓锐, 张鑫鑫, 肖剑晖等. 大鼠雪旺细胞对两种来源的成骨细胞增殖分化影响的研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2010, 12(6): 551-556
Jang Xiao-rui, Zhang Xin-xin, Xiao Jian-hui, et al. Proliferation and differentiation of osteoblasts from two sources co-cultured with rat Schwann cells[J]. Chinese journal of orthopaedic trauma, 2010, 12(6): 551-556
- [20] 双峰, 赵彦涛, 侯树勋. 同种异体骨脱钙骨基质研究现状 [J]. 临床军医杂志, 2012, 40(2): 480-481
Shuang Feng, Zhao Yan-tao, Hou Shu-xun, et al. The research status allograft decalcified bone matrix [J]. Clinical journal of medical officer, 2012, 40(2): 480-481
- [21] 施洪臣, 周强, 刘伟等. I 型骨胶原膜的制备及其生物相容性研究 [J]. 四川医学, 2007, 28(4): 345-347
Shi Hong-chen, Zhou Qiang, Liu Wei, et al. Study on preparing and the biocompatibility of I-collagen membrane of bone [J]. Sichuan medical journal, 2007, 28(4): 345-347
-
- (上接第 2408 页)
- [7] Wang Guan-yu. The application of chaotic oscillators to weak signal detection [J]. IEEE Transactions on Industrial Electronics, 2001, 6(2): 440-444
- [8] Iwona C, Jerzy KW, Halina B, et al. Prognostic significance of heart rate turbulence in patients undergoing coronary artery bypass grafting [J]. Am J Cardiol, 2003, 91(12): 1471-1474
- [9] Jonas Perrersson, Olle Pahlm, Elena Carro, et al. Changes in high-frequency QRS components are more sensitive than ST-segment deviation for detecting acute coronary artery occlusion [J]. Am J Cardiol, 2000, 36(6): 1827-1834
- [10] Vincent M Crasset, Fabrice Juryst, Paul Linkowski, et al. Influence of specific sleep stages and autonomic nervous system on QT interval and repolarization dynamicity (QT/RR) in healthy volunteers [J]. Am J Cardiol, 2003, 41(6): 123-123
- [11] Shyu L, Hu Weichih. Intelligent Hybrid Methods for ECG Classification-A Review [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2008, 28(1): 1
- [12] Shi Zhen-wei, Zhang Chang-shui. Fast nonlinear autocorrelation algorithm for source separation [J]. Pattern Recognition, 2009, 42(9): 1732-1741
- [13] Jie Lian, Lian Wang, Dirk Muessig. A Simple Method to Detect Atrial Fibrillation Using RR Intervals [J]. Am J Cardiol, 2011, 107 (10): 1494-1497
- [14] Jeffrey Goldberger, Haris Subacius, Jason Ng. Heart rate versus RR interval recovery after exercise: which is more physiology [J]. Am J Cardiol, 2012, 59(13): 1944-1944
- [15] Liu Cheng-yu, Li Li-ping, Zhao Li-na, et al. A Combination Method of Improved Impulse Rejection Filter and Template Matching for Identification of Anomalous Intervals in RR Sequences [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2012, 32(4): 245-250
- [16] Marcus Karlsson, Rolf H?rmsten, Annika Rydberg, et al. Automatic filtering of outliers in RR intervals before analysis of heart rate variability in Holter recordings: a comparison with carefully edited data [J]. BioMedical Engineering OnLine 2012, 11(2): 1-12
- [17] Mohammad Reza Homaeinezhad, Ali Ghaffari, Reza Rahmani. Review: Multi-lead Discrete Wavelet-based ECG Arrhythmia Recognition via Sequential Particle Support Vector Machine Classifiers [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2012, 32(6): 381-396
- [18] Liu Huang-wen, Sun Ji, Liu Lu, et al. Feature selection with dynamic mutual information [J]. Pattern Recognition, 2009, 42(7): 1330-1339
- [19] Zhang Zheng-bo, Shen Yin-Hong, Wang Wei-de. Design and implementation of sensing shirt for ambulatory cardiopulmonary monitoring [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2011, 31(3): 207-216
- [20] Liu Shing-Hong. Motion artifact reduction in electrocardiogram using adaptive filter [J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2011, 31(1): 67-72