

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.043

嗅鞘细胞的不同纯化方法及结果*

丁冬¹ 郝铁成¹ 曹军¹ 牛建国² 何仲义^{2Δ}

(1 宁夏医科大学人体解剖与组织胚胎学系在读研究生 宁夏 银川 750004;

2 宁夏医科大学人体解剖与组织胚胎学系 宁夏 银川 750004)

摘要:培养的嗅鞘细胞的最终纯度受到多种因素的影响,如嗅鞘细胞的取材来源、分离方法等等;对培养的嗅鞘细胞进行纯化可获得高纯度的嗅鞘细胞。纯化嗅鞘细胞的方法有许多种,主要有单纯差速贴壁法、免疫吸附法、化学药物抑制法、无血清饥饿法等,现在的实验研究更趋向于以上 2-3 种方法联合应用对嗅鞘细胞进行纯化,这些联合纯化方案主要是在采用单纯差速贴壁方法的基础上再次运用其他一种或几种方法进行嗅鞘细胞的纯化。就获取的嗅鞘细胞的最终纯度而言,许多方法取得了可观的效果。但不同的纯化方法各有利弊,除了价格不同外,不同的纯化方法对嗅鞘细胞的生物活性造成不同程度的影响。因此在选择纯化方法时,应综合考虑各方面因素,根据研究目的和实际需要选择合理的方案进行纯化。本文通过查阅各数据库中与嗅鞘细胞的分离培养及纯化有关的文献和其他相关书籍,来探讨纯化嗅鞘细胞的不同方法以及这些纯化方法对嗅鞘细胞最终纯度的影响。

关键词:嗅鞘细胞;细胞培养;细胞纯化;纯化方法

中图分类号:R318.06 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3766-04

The Results of Olfactory Ensheathing Cells from Different Purification Methods*

DING Dong¹, HAO Tie-cheng¹, CAO Jun¹, NIU Jian-guo², HE Zhong-yi^{2Δ}

(1Department of Human Anatomy and Embryology, Grade 2011, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia, 750004, China;

2Department of Human Anatomy and Embryology, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia, 750004, China)

ABSTRACT: The final density of olfactory ensheathing cells can be determined by several factors, such as the source and dissociate methods of cells; high density olfactory ensheathing cells can be got by purifying them. There are many kinds of purification methods for olfactory ensheathing cells, including Different-Time adherence method, immunosorbent method, chemical drugs method, etc. The recent researches tend to combine 2 or 3 methods above to purify the olfactory ensheathing cells, these purification plans combine 1 or several other methods on the basis of Different-Time adherence method. In terms of the final purity of olfactory ensheathing cells, many methods have got considerable effects. But different purification methods have advantages and disadvantages, in addition to the different price, different purification methods have different influence to biological activities of olfactory ensheathing cells. So when choosing purification methods, various aspects should be considered, according to the research purpose and the actual need to select the reasonable plan for purification. This article researches some literatures and relative books about culturing and purifying the olfactory ensheathing cells from some database to explore the different methods of purifying the olfactory ensheathing cells and the effects to the olfactory ensheathing cells, final density of these methods.

Key words: Olfactory ensheathing cells; Cultivation; Purification

Chinese Library Classification(CLC): R318.06 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3766-04

促进周围神经损伤后再生的方法有多种,且大都在临床上取得了一定的效果。近些年来研究表明嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)可以促进中枢轴突的再生^[1]。因此有人提出通过 OECs 移植来促进周围神经损伤后再生的方法,并成为研究热点且被认为有很好的临床应用前景。获取高纯度的移植所需的 OECs 是进行实验研究和临床应用的基础和前提,然而对取自嗅球或嗅粘膜的 OECs 进行培养后含有很多杂质细

胞,这是很难避免的,其中最主要的是成纤维细胞和星形胶质细胞。因此对取材分离后的 OECs 进行纯化是获取高纯度 OECs 的关键。本文主要通过查阅相关文献及书籍,归纳总结几种不同的纯化 OECs 的方法以及最终结果。其中最主要的方法有差速贴壁法、免疫吸附法、化学药物抑制法等等,尤其是以上某几种方法的联合应用可以获得理想的高纯度的 OECs。

1 单一纯化方法作用后 OECs 纯度

* 基金项目:2011 年银川市科技发展项目(银财发[2011]265 号);2012 年宁夏自治区科技支撑项目(宁科计字[2012]17 号);

宁夏医科大学博士建设开放课题(KF2010-18)

作者简介:丁冬(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:周围神经损伤及修复,E-mail:dingdongzi123@163.com

Δ 通讯作者:何仲义,电话:0951-6980056,E-mail:hzy-008@163.com

(收稿日期:2013-11-13 接受日期:2013-12-12)

单独应用差速贴壁法是最早应用于纯化 OECs 的方法,此外还有单纯无血清条件培养液纯化法。

1.1 差速贴壁法

通过差速贴壁纯化法来纯化 OECs 最早是由 Nash 提出来的,2001 年 Nash 本人在其原有的纯化方法的基础上改良成为 18 h+36 h 的两次差速纯化法。单纯差速贴壁法原理是根据成纤维细胞、OECs 和星形胶质细胞贴壁时所需要的时间不同,经过 18 h 和 36 h 两个时段的差速贴壁后将星形胶质细胞和成纤维细胞从 OECs 中分离出去^[2]。原文报道改良 Nash 差速贴壁后 OECs 纯度可达到 93%。而国内外许多文献报道经 Nash 差速贴壁法纯化后检测 OECs 纯度仅有 72%-75%^[3]。张鹏等^[4]在 Nash 差速贴壁法的基础上再一次改良,发现运用 12 h+24 h 的两时间段差速贴壁法也可以达到原先 18 h+36 h 的纯化结果。田锋等^[5]通过实验在嗅黏膜 OECs 的纯化培养过程中将第 1 次差速贴壁的时间改为 24 h,不进行第 2 次差速贴壁,简化了 OECs 纯化培养的步骤。将 24 h 前贴壁细胞继续培养,除了成纤维样细胞外,未发现嗅鞘细胞。细胞纯度第 7 天可以达到 90%,细胞生长最为旺盛,第 14 d 可以达到 85%,细胞数量可以达到最多。迁荣军等^[6]将分离的 OECs 只进行 24 h 后一次差速贴壁,鉴定细胞最终纯度平均为 60.41%±4.32%。李佳等^[7]取成年 SD 大鼠嗅球,将分离消化所得细胞悬液进行接种然后分别于接种后 2 h、6 h 和 18 h 3 个时间点进行单步骤差速贴壁法去除成纤维细胞,纯化 OECs, OECs 纯度分别为(53±5)%、(73±8)%和(69±13)%,组间差异有统计学意义。

通过实验可以发现差速贴壁法易于操作,可重复性较其他方法好。但是,有实验发现从不同条件的实验标本培养出来的细胞状态差异很大。来源于 4~6 个月龄的实验标本中胎龄较小、取材耗时短所培养出的细胞的状态好、贴壁快;而胎龄较大、取材耗时较长时得到的细胞贴壁慢。因此需要根据实验过程中的观察到的实际情况调整差速贴壁的时间,因此这样就增加了操作的人为性因素。通过这种方法纯化后 OECs 的最终纯度在 70%-80%左右。

1.2 无血清条件培养液纯化

张鹏等^[4]用提前收集并制备的含有同源的 OECs 培养上清液的无血清条件培养液将单细胞混悬液直接种植于装有多聚赖氨酸包被的盖玻片的培养皿中,孵育两二天后再换成含体积分数为 0.1 胎牛血清 DMEM/F12 培养基继续培养 3 周,经免疫组化鉴定后嗅鞘细胞纯度 48%-52%。

应用无血清条件培养液去除杂质细胞具有以下几点优势:①无血清条件培养液作用缓和,能有效抑制成纤维等杂质细胞,但对 OECs 影响不大。因为在无血清条件培养液的作用时段内,大部分成纤维细胞处于细胞早期分裂的增殖活性期,此时细胞对血清的需求量很高,因此成纤维细胞生存和增殖分裂所需要的营养链可以被无血清培养液有效的阻断^[8,9]。这一点在相关研究中已得到证实。②无血清条件培养液干预纯化法同阿糖胞苷法相比,作用尺度较好掌握且对 OECs 的损伤小。③无血清条件培养液联合含有大量适合 OECs 生存和增殖所需的营养因子的同源 OECs 培养的上清液即可以限制成纤维细胞的生长,又可以最大限度的保护 OECs。④无血清条件培养液可以循环持续的收集和制备,大大减小了实验的成本。⑤此纯化

方案没有动用免疫抗体和化学试剂,其因此最后通过纯化得到的 OECs 很好的保持了其原有的生物活性,这就为进一步的 OECs 基础研究及临床移植应用排除了诸多不确定的干扰因素。此方法最大的不足就是纯化后所得 OECs 纯度较低,一般在 50%左右。

2 多种纯化方法联合应用纯化 OECs

主要包括二联纯化方法和三联纯化方法。

2.1 二联纯化方法纯化 OECs

主要是在单纯差速贴壁的基础上联合应用其他一种方法,如阿糖胞苷法、无血清饥饿法、添加神经营养因子法、胰酶限时消化法免疫吸附法等等对 OECs 进行纯化。

2.1.1 单纯差速贴壁联合阿糖胞苷法纯化 OECs 王斌等^[10]将分离的 OECs 差速贴壁 2 d 后换液并加入终浓度为 $(1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-6})$ mol/L 的阿糖胞苷持续作用 48 h,经免疫染色后发现阳性反应细胞很少,这与吴卫江等^[11]观察结果一致。因为阿糖胞苷所具有的毒性作用在抑制成纤维细胞生长的同时也对 OECs 产生了杀伤作用,也可能是因为不同状态的 OECs 对阿糖胞苷有不同的耐受程度。阿糖胞苷对来源于不同实验标本的 OECs 的作用时间和作用浓度不容易把握,因此我们认为用阿糖胞苷法对 OECs 进行纯化培养不太可行。

2.1.2 单纯差速贴壁联合无血清饥饿法纯化 OECs 张鹏等^[4]对分离的 OECs 培养后运用改良差速贴壁法(12 h+24 h)联合无血清饥饿法进行纯化,纯度可达 88%-92%。王斌等^[10]将分离的 OECs 差速贴壁 2 d 后在倒置显微镜观察,成纤维细胞快速生长时段内换用无血清的 DMEM/F12 培养基培养,成纤维细胞脱落后用含有 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基培养。无血清饥饿法培养至 3~6 d 时纯度约 90%,9 d 时约为 86%,但这种纯化方法得到的细胞状态差,镜下表现为细胞突起细、弯曲,胞体小,培养至 12 d 时纯度约为 56%,15 d 约为 17%。可见此种纯化方法可使 OECs 最高纯度保持在 90%左右。有学者认为无血清纯化培养法并没有提高 OECs 的纯度,但可以起到延长 OECs 高纯度持续时间的作用,其缺点是细胞增殖缓慢且状态下降。

2.1.3 单纯差速贴壁联合间断神经营养因子 3 (neurotrophic 3, NT3) 纯化 OECs 多种神经营养因子对体外培养的 OECs 具有明显的促进增殖的作用^[12,13]。王斌等^[10]将分离的 OECs 差速贴壁 2 d 后用含有终浓度为 50 ng/mL NT3 的 DMEM/F12 培养,48 h 后再用含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养。即含 NT3 和含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基间隔 48 h 交替使用。间断应用 NT3 法培养至 3~9 d 时 OECs 纯度约为 95%,培养至 12 d 时纯度约为 83%,且细胞状态良好,表现为细胞立体感强,细胞胞体大,突起长且笔直,培养至 15 d 纯度约为 66%。历强等^[14]运用同样的方法纯化 OECs,经鉴定后其最大纯度也可达到 95%。实验过程中发现随着培养时间的延长 OECs 分裂增殖能力逐渐减弱,细胞胞体逐渐变的细小,突起变细、弯曲,折光性逐渐减弱,甚至有细胞死亡脱落。原因可能是 NT3 虽然可以促进 OECs 的分裂增殖,但是不能代替血清中的某些成分,从而导致 OECs 生长增殖所需的营养成分缺失。在改用含 100 mL/L 的 FBS、NT3 的 DMEM/F12 培养基培养时发现成纤维细胞迅速

增殖,其增殖速度大大超过 OECs 的增值速度。这可能是 NT3 与血清中的某种成分结合后发生促进或协同促进作用,使成纤维细胞迅速增殖,并与 OECs 竞争有限的生长环境,从而导致 OECs 纯化培养失败。因此选择间断应用 NT3 对 OECs 进行原代纯化培养,即用含 NT3 的 DMEM/F12 培养液培养时 OECs 可以继续分裂增殖,成纤维细胞因为失去了含血清的培养环境,导致细胞增殖明显减弱,并伴随有少量细胞坏死脱落。当再改用含血清的培养基培养时,基于前期 OECs 的生长状态优于成纤维细胞,此时便出现 OECs 的高密度抑制作用,导致成纤维细胞增殖不明显,而由于血清的作用 OECs 状态渐恢复。当成纤维细胞开始增殖时继续改用含 NT3 的 DMEM/F12 培养基培养,这种间断改变培养基成分的纯化方法既可以维持 OECs 对成纤维细胞的高密度抑制作用,同时又保证了 OECs 的增殖和活性。由此可见间断应用 NT3 法纯化培养 OECs 可以在更长的时间内得到状态良好的高纯度的 OECs。

2.1.4 单纯差速贴壁联合胰酶限时消化法纯化 OECs 徐朝伟等^[15]对分离后培养的 OECs 经 6 h、24 h 两次差速贴壁去除杂质细胞,培养至 12 d 左右经胰酶限时消化,留成纤维细胞于瓶壁,重悬的细胞进行鉴定,其纯度为(83.7±7.7)%。这与杨博宇等^[16]采用差速贴壁与化学药物并胰酶消化法纯化新生大鼠 OECs 所得结果类似,纯化后 OECs 最终纯度在 80%-90%左右。胰酶限时消化的基本原理就是根据 OECs 与成纤维细胞的贴壁能力不同,选择合适的胰酶消化时间段,经特定时间的胰酶消化后,贴壁能力弱的 OECs 比贴壁能力相对强的成纤维细胞要提前脱落,从而弃去贴壁的成纤维细胞。

2.1.5 单纯差速贴壁与免疫吸附法联合纯化 OECs 苗宗宁等^[17]将一定浓度的神经生长因子受体 P75(neuro growth factor receptor P75,NGFRP75)单抗包被培养皿后,再用含终浓度为 2×10^{-7} mol/L 的阿糖胞苷的 DF12 培养基干预,获得最终 OECs 最终纯度为 90%以上。康新等^[18]将分离的 OECs 培养 7 d 后采用胰酶限时消化法重悬细胞并接种到事先被 P75 抗体包被的培养皿中,最终鉴定 OECs 纯度可达 90.40%~94.56%。免疫吸附法的基本原理即根据 NGFRP75 是神经营养因子低亲和力受体,也是 OECs 细胞膜表面特异性的标记物,能与相应的抗体发生特异性结合^[19]。因此,这种高特异性的抗原抗体反应能保证包被在培养皿上的 NGFRP75 抗体可将 OECs 吸附在培养皿的表面。待大量的 OECs 贴壁,然后通过培养液的作用使其快速生长增殖。采用免疫吸附法纯化可以获得较高纯度的 OECs,缺点是价格昂贵,操作繁琐。

综上所述,以单纯差速贴壁法为基础联合其他方法的二联纯化方案并非都具有较强的实用性。①差速贴壁联合阿糖胞苷方案中化学药物 Art-c 的应用剂量及作用时段很难控制,且在抑制成纤维细胞生长的同时对 OECs 也造成无法避免的杀伤,因此很难获得较高纯度的 OECs,实验中不建议应用此方法纯化。②差速贴壁联合无血清饥饿法的二联纯化方案可使 OECs 最高纯度保持在 90%左右。但有学者认为无血清纯化培养法只是起到了延长 OECs 纯度持续时间的作用,并没有提高 OECs 的纯度,其缺点是细胞状态下降和增殖速度缓慢。③差速贴壁联合间断应用 NT3 的二联纯化方案通过维持 OECs 对成纤维细胞的高密度抑制作用,最终所得 OECs 的纯度可在 90%以

上,同时又保证了 OECs 的增殖速度和活性。由此可见间断使用 NT3 纯化培养 OECs 可以在相对较长的时间内得到状态良好且高纯度的 OECs。④差速贴壁联合胰酶限时消化的二联纯化方案可是 OECs 纯度保持 80%-90%,且操作方法简便易行,价格低廉。同差速贴壁联合间断应用 NT3 的二联纯化方案具有较好的实验可行性。⑤应用免疫吸附法的二联纯化方案虽也可获取 90%左右的 OECs 纯度,但操作繁琐且价格昂贵。因此本人认为各种二联方案的可行性由大到小依次为差速贴壁联合间断应用 NT3,差速贴壁联合胰酶限时消化,差速贴壁联合无血清饥饿法,应用免疫吸附法的二联纯化方案,单纯差速贴壁联合阿糖胞苷法。

2.2 三联纯化方法纯化 OECs

三联纯化方案纯化 OECs 的实验少有报导,主要是在差速贴壁的基础上联合其他两种方法进行纯化。杨博宇等^[16]在其实验中通过比较证实了差速贴壁+化学药物+胰酶限时消化法的三合一操作技术,是一种高效率的纯化培养嗅球 OECs 的方法,通过这种方法纯化 OECs 的纯度达 85%以上。本人认为,三联纯化方案中比较可行的操作是在相对简单的二联纯化方案的基础上增加一种纯化方法,比如在差速贴壁联合胰酶限时消化的基础上在并用 NT3 的方案是一种理想的纯化方案,但其结果是否优于其他二联方案仍需通过实验证明。

3 结语

OECs 能够促进中枢及周围神经损伤后再生及修复的结论已经得到证实,此治疗方案应用于临床面临的关键问题是如何获得高纯的 OECs。近年来,科研工作者们尝试了许多种纯化 OECs 的方法并取得了显著的成果。目前的研究现状主要趋向于在差速贴壁的基础上联合应用其他一种方法的二联纯化方案来获取高纯度的 OECs,大量实验证实这些二联纯化方案各有利弊,可行性不一。而且也有研究人员提出在保证获得高纯度 OECs 的前提下,还应该避免纯化 OECs 的方案对 OECs 的活性产生不良影响。本人认为,在选择纯化方法时还应考虑其他可能影响 OECs 最终纯度的因素,比如 OECs 的来源^[20,21]、取材方法等的不同。有报道称来源于成年 SD 大鼠和新生 SD 大鼠的 OECs 贴壁时间不同,因此在选择差速贴壁时间段时应考虑这点。所以 OECs 的纯化还应遵循个体化的原则,综合考虑各方面因素,从而选择一种最合适的纯化方案。

参考文献(References)

- [1] Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon [J]. Orthop Res, 2005, 23 (2): 287-289
- [2] Nash HH, Borke RC, Anders JJ. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb[J]. Glia, 2001, 34(2): 81-87
- [3] 范志海,沈忆新,陆政峰,等.成年大鼠嗅球嗅鞘细胞的分离、培养、纯化与生物学特性的研究[J].苏州大学学报:医学版,2007, 27(4):547-551
Fan Zhi-hai, Shen Yi-xin, Lu Zheng-feng, et al. In adult rat olfactory bulb of olfactory ensheathing cell isolation, culture, purification and biological characteristics research [J]. Journal of suzhou university, medical sciences, 2007, 27(4): 547-551

- [4] 张鹏,沈忆新,陆政峰,等.改良差速贴壁+无血清条件培养液纯化培养大鼠嗅鞘细胞术[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(1): 65-70
Zhang Peng, Shen Yi-xin, Liu Zheng-feng, et al. The skill of purificating and cultivating rat olfactory ensheathing cells by improved adhesion after different periods with serum-free conditioned medium[J]. China tissue engineering research and clinical rehabilitation, 2009, 13(1): 65-70
- [5] 田锋,姜曙祥,贺西京,等.经改良的取材和差速贴壁法培养纯化嗅黏膜嗅鞘细胞[J].细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(12): 1189-1191
Tian Feng, Jiang Shu-xiang, He Xi-jing, et al. Cultivate and purificate olfactory ensheathing cells from olfactory mucosa by the method of improved isolate and adhesion after different periods [J]. Journal of cellular and molecular immunology, 2009, 25(12): 1189-1191
- [6] 迁荣军,周迎春,赵洪洋,等.新生大鼠嗅鞘细胞的改良培养方法研究[J].神经解剖学杂志, 2012, 28(3): 307-311
Qian Rong-jun, Zhou Ying-chun, Zhao Hong-yang, et al. The research of improved culture method of olfactory ensheathing cells from newborn rats[J]. Neuroanatomy magazine, 2012, 28(3): 307-311
- [7] 李佳,张旭,余清,等.用于移植的嗅鞘细胞的纯化培养方法研究[J].中国神经免疫学和神经病学杂志, 2009, 16(4): 289-292
Li Jia, Zhang Xu, Yu Qing, et al. The research to purification and culture method of olfactory ensheathing cells used for transplantation [J]. Chinese journal of neuroimmunology and neurology, 2009, 16(4): 289-292
- [8] 历俊华,万虹,翟晶,等.无血清饥饿法去除神经组织培养中的成纤维细胞[J].首都医科大学学报, 2004, 25(2): 205-207
Li Jun-hua, Wan Hong, Zhai Jing, et al. Starvation method without serum to remove fibroblasts in the nervous tissue culture [J]. Journal of capital university of medical sciences, 2004, 25(2): 205-207
- [9] Ito D, Fujita N, Ibanez C, et al. Serum-free medium provides a clinically relevant method to increase olfactory ensheathing cell numbers in olfactory mucosa cell culture[J]. Cell Transplant, 2008, 16 (10): 1021-1027
- [10] 王斌,贺西京,历强,等.不同纯化方法体外培养人胚嗅球嗅鞘细胞[J].四川大学学报(医学版), 2008, 39(6): 1023-1026
Wang Bin, He Xi-jing, Li Qiang, et al. Cultivate olfactory ensheathing cells from human embryo olfactory bulb by different purification methods[J]. Journal of sichuan university (medical edition), 2008, 39 (6): 1023-1026
- [11] 吴卫江,惠国桢,陆华,等.人胚嗅鞘细胞不同取材及培养方法对纯度的影响[J].中华实验外科杂志, 2004, 21(7): 841-844
Wu Wei-jiang, Hui Guo-zhen, Lu Hu, et al. The influence of different material and culture methods toward olfactory ensheathing cells from human embryo to the purity [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2004, 21(7): 841-844
- [12] Yan H, Bunge MB, Wood PM, et al. Mito genic response of adult rat olfactory ensheathing glia to four growth factors [J]. GLIA, 2001, 33 (4): 334-342
- [13] Bianco JJ, Perry C, Hark in DG, et al. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose[J]. GLIA, 2004, 45(2): 111-123
- [14] 历强,贺西京,饶国洲,等.差速贴壁结合神经营养因子3体外纯化培养人胚嗅鞘细胞 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(10): 923-925
Li Qiang, He Xi-jing, Rao Guo-zhou, et al. Adhesion after different periods combining neurotrophic 3 purificatein and cultivate olfactory ensheathing cells from human embryo [J]. Journal of cellular and molecular immunology, 2007, 23(10): 923-925
- [15] 徐朝伟,李佳,付裕,等.胰酶限时消化在嗅鞘细胞培养中的运用[J].中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 18(6): 425-427
Xu Chao-wei, Li Jia, Fu Yu, et al. The effect of pancreatic enzyme digestion at cultivating olfactory ensheathing cells [J]. Chinese journal of neuroimmunology and neurology, 2011, 18(6): 425-427
- [16] 杨博宇,王锋,王玮,等.以差速贴壁与化学药物并胰酶限时消化法纯化新生大鼠嗅鞘细胞: 优于单一差速贴壁和化学药物法吗?[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(49): 9761-9764
Yang Bo-yu, Wang Feng, Wang Wei, et al. Purificate olfactory ensheathing cells from newborn rats by method of adhesion after different periods combine chemical drugs and pancreatic enzyme :Is it better than method of adhesion after different periods combine chemical drugs?[J]. China research and clinical rehabilitation, 2009, 13(49): 9761-9764
- [17] 苗建宗,祝建中,钱寒光,等.免疫吸附法纯化人胚嗅鞘细胞的实验研究[J].中国交通医学杂志, 2006, 20(2): 171-173
Miao Jian-zong, Zhu Jian-zhong, Qian Han-guang, et al. Study of purificating olfactory ensheathing cells from human embryo by immune adsorption method [J]. China transportation medical journal, 2006, 20(2): 171-173
- [18] 康新,魏婷,吴卫江,等.人嗅黏膜嗅鞘细胞的分离、培养及生物学特性[J].中风与神经疾病杂志, 2012, 29(2): 143-146
Kang Xin, Wei Ting, Wu Wei-jiang, et al. The isolation, culture and biological characteristics of olfactory ensheathing cells from Human olfactory mucosa [J]. Journal of stroke and neurological diseases, 2012, 29(2): 143-146
- [19] Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(4): 487-500
- [20] 常瑞,梅强,贺西京,等.不同来源嗅鞘细胞的生长特性和生物学活性观察[J].生物骨科材料与临床研究, 2007, 4(5): 16-20
Chang Rui, Mei Qiang, He Xi-jing, et al. Growth characteristics and biological active observation of olfactory ensheathing cells from different sources[J]. Biological bone materials and clinical research, 2007, 4(5): 16-20
- [21] 常瑞,阴小龙,程延,等.不同来源嗅鞘细胞修复脊髓损伤的效果比较[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(28): 5505-5509
Chang Rui, Yin Xiao-long, Cheng Yan, et al. Comparison of effect of repairing spinal cord injury with olfactory ensheathing cells from different sources[J]. China tissue engineering research and clinical rehabilitation, 2009, 13(28): 5505-5509