

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.005

脂肪干细胞上清液培养雪旺细胞的实验研究*

陈露露 沈尊理[△] 金羽青 刘璋寅 沈 华

(上海交通大学附属第一人民医院整形外科 上海 200080)

摘要 目的:研究应用脂肪干细胞上清液培养新生小鼠雪旺细胞的可行性。**方法:**取新生(出生 5-7 天) C57BL/6 小鼠的坐骨神经, 采用 0.2% 的复合胶原酶 NB4 消化法分离获取细胞, 然后应用雪旺细胞条件培养基(SCCM)和 C57BL/6 小鼠的脂肪干细胞上清液(ADSC-CM)分别培养雪旺细胞。用 0.2% 复合胶原酶 NB4 差速分离纯化这两种方法培养的雪旺细胞, 每 48 h 纯化 1 次, 共进行 2 次纯化。应用 P75 免疫荧光染色方法鉴别两组 P2 代雪旺细胞并比较两组雪旺细胞的纯度和生长情况。**结果:**脂肪干细胞上清液培养的雪旺细胞纯化两次后, 数量明显增多, 其纯度与雪旺细胞条件培养基相比没有明显差异($P > 0.05$)。**结论:**脂肪干细胞上清液可以较好的培养雪旺细胞, 可以作为一种新的廉价方便的培养基代替雪旺细胞条件培养基来培养雪旺细胞。

关键词:脂肪干细胞上清液; 雪旺细胞; 细胞分离纯化; 周围神经

中图分类号: Q253; Q813; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3018-03

An Experimental Study on Cultivating Schwann Cells in the Supernatant of the Culture Medium of Adipose-derived Stem cells(ADSC-CM)*

CHEN Lu-lu, SHEN Zun-li[△], JIN Yu-qing, LIU Zhang-yin, SHEN Hua

(Department of Plastic Surgery, Shanghai the First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To explore the possibility of cultivating newborn mouse's schwann cells in the supernatant of the culture medium of Adipose-derived stem cells (ADSC-CM). **Methods:** Sciatic nerves were harvested from 5 to 7 day-old C57BL/6 mice. Sciatic nerves were digested with 0.2% compound collagenase NB4 to obtain schwann cells. Schwann cells were cultured in two culture medium, one is conditional medium of Schwann cells (SCCM), the other is supernatant of the culture medium of Adipose-derived stem cells (ADSC-CM). 0.2% compound collagenase NB4 was used to purify these schwann cells by differential isolation once every 48 hours for two times total. P75 fluorescent immunostaining was performed to determine the purity and growth situation of schwann cells. **Results:** After two times purification, the numbers of these schwann cells in ADSC-CM were significantly improved, and the differences of purity of these two methods cultured schwann cells were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** ADSC-CM can have a good effect on culture schwann cells. As a new cheap convenient culture medium, it can replace SCCM to culture schwann cells.

Key words: The supernatant of the culture medium of Adipose-derived stem cells; Schwann cell; Cell separation and purification; Peripheral nerve

Chinese Library Classification: Q253; Q813; Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3018-03

前言

雪旺细胞(schwann cell, SC)是周围神经的胶质细胞,能够分泌多种神经营养因子和细胞外基质,营养神经元和促进轴突髓鞘化^[1],与周围神经的发生、发育、形态和功能方面密切相关^[2]。目前培养雪旺细胞多用专门的雪旺细胞培养基(SCCM, 含 10% FBS、10 $\mu\text{g/ml}$ 成纤维细胞生长因子、10 $\mu\text{g/ml}$ heregulin- β -1、2 μM forskolin、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素和低糖 DMEM)^[3],但此培养基价格昂贵,配制繁琐,应用受限。大量研究证实脂肪干细胞能够分泌多种生长因子^[4],因此我们尝试应用脂肪干细胞上清液作为培养基培养雪旺细胞,并且取得

了满意的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

5~7 d 龄 C57BL/6 小鼠 20 只(上海中科院试验动物养殖中心)、DMEM 培养基(Gibco)、复合胶原酶 NB4(Serva)、胎牛血清(FBS, Hyclone)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2)、0.25% trypsin-EDTA(Gibco)、雪旺细胞培养液(SCCM)、兔抗 S100 β 多克隆抗体(Dake, UK)、兔抗 P75NTR 多克隆抗体(Abcam, UK)。

1.2 方法

1.2.1 脂肪干细胞的取材

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30872630)

作者简介:陈露露(1990-),女,硕士,主要研究方向:周围神经组织工程,电话:021-6306930, E-mail:cll0517@126.com

Δ 通讯作者:沈尊理, Email:zunlishen1964@gmail.com

(收稿日期:2013-10-28 接受日期:2013-11-25)

小鼠颈椎脱臼处死,置于75%酒精中浸泡10 min后,无菌条件下取其皮下脂肪组织,置入一次性离心管中,向管中加入含2%FBS的冷PBS洗去血液。剪碎至1 mm×1 mm×1 mm大小,加入0.2%复合胶原酶NB4(用DMEM培养基配制)放入二氧化碳培养箱中孵育。每隔5 min振荡1次,消化约1.5 h后反复吹打约3 min,充分分散组织。以1500 rpm、37℃、离心5 min,弃上清,加入DMEM培养基8 mL重悬细胞,按大约 $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度将细胞接种到培养瓶中,置于37℃、5% CO₂孵育箱培养。

1.2.2 脂肪干细胞上清液的收集

待原代细胞长满至培养瓶底的80%左右,吸去上清液,放入-20℃保存待用。PBS漂洗一次后,加37℃、0.25% trypsin-EDTA消化约2分钟,轻轻拍打瓶壁促进细胞从瓶底脱离,加入含血清的DMEM培养基终止trypsin-EDTA消化,收集吹打后所得细胞,以1500 rpm、37℃、离心5 min,用培养液重悬,1:2的比例进行传代接种,置于37℃、5% CO₂培养箱继续培养,每2 d换液一次,将上清液吸去,放入-20℃保存待用。待细胞增殖并覆盖瓶底80%左右时,用同样方法消化传代,收集上清液,放入-20℃保存待用。

1.2.3 雪旺细胞的培养和纯化

1) 细胞培养瓶的铺盘:用DMEM培养液配制的400 μg/ml层粘连蛋白(laminin)按100 μg/cm²比例加入培养瓶中,放在37℃培养箱过夜后,吸出laminin,培养瓶置于4℃无菌保存备用。

2) 取材:实验分两组,SCCM组为对照组,脂肪干细胞上清液组为实验组,每组均取10只5~7 d小鼠的双侧坐骨神经约8 mm。将小鼠颈椎脱臼处死后,置于75%酒精中浸泡10 min,无菌条件下取双侧坐骨神经,置入一次性离心管中。每管放置20段坐骨神经。向管中加入含2%FBS的冷PBS洗去血液。解剖显微镜下,尽量剔除神经外膜,加入0.2%复合胶原酶NB4(用DMEM培养基配制),放入二氧化碳培养箱中孵育。每隔5 min振荡1次,消化约1.5 h。然后反复吹打约3 min,充分分散组织。以1500 rpm离心5 min,弃上清。实验组中加入含10%FBS的脂肪干细胞上清液3 mL重悬细胞,对照组中加入含10%FBS的SCCM培养基3 mL重悬细胞。两组均按细胞数 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$,接种于4个25 cm²细胞培养瓶,置于37℃、5% CO₂孵育箱培养。

3) 初步纯化:细胞培养48 h左右,细胞已基本全部贴壁。吸去培养液,加入2 mL 0.2%中性蛋白酶,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育10~20 min,轻轻振荡拍打后,移入15 mL离心管中,离心1500 rpm、5 min后,弃上清。实验组中加入含10%FBS的脂肪干细胞上清液3 mL重悬细胞,对照组中加入含10%FBS的SCCM培养基3 mL重悬细胞。按细胞数 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$,接种于培养瓶中置于37℃、5% CO₂孵育箱培养。

4) 进一步纯化:待雪旺细胞培养48 h后,用0.2%中性蛋白酶重复步骤3纯化雪旺细胞。

1.2.4 雪旺细胞的鉴定

雪旺细胞经两次纯化后,接种到6孔板中,置于37℃、5% CO₂孵育箱中培养至细胞长成单层时,PBS漂洗3次,用4%多

聚甲醛固定20 min,PBS漂洗3次,10%羊血清37℃封闭30 min,然后加入P75抗体(1:500,一抗,兔抗鼠),置于4℃冰箱过夜,加入羊抗兔抗体(1:500二抗,荧光素标记),37℃避光作用45 min,加入DAPI染核10 s。

1.3 统计学分析

分别从实验组和对照组中随机取10张100倍视野相片计数,蓝色荧光的细胞核为细胞总数,以红色荧光的雪旺细胞除以细胞总数,得到雪旺细胞的纯度,并对两组雪旺细胞纯度进行统计学比较。

2 结果

2.1 细胞培养和纯化

细胞根据形态不同分为雪旺细胞和成纤维细胞,雪旺细胞呈梭形,双极或三级样,中部较亮,折光性强。成纤维细胞胞体扁平、体积较大、折光性差。从图1可发现脂肪干细胞上清液(ADSC-CM)组和SCCM组的P0雪旺细胞数量(100,107)和纯度(60%,62%)均不高,两组中均有多量的成纤维细胞。两组细胞分别培养48 h后,均用0.2%NB4纯化,作用15~20 min,大多数雪旺细胞漂起,变圆变亮,而成纤维细胞没有明显变化。经过两次纯化后,两组雪旺细胞数量(250,220)和纯度(91%,89%)均明显增加,成纤维细胞则明显减少。

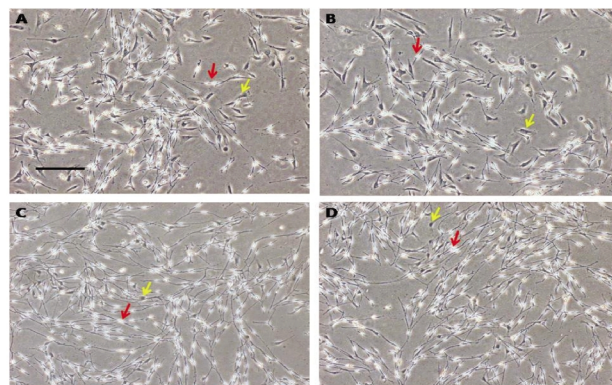


图1 原代雪旺细胞的分离纯化和扩增(×40)

Fig. 1 Cell separation, purification and expansion of primary schwann cells(×40)

A:脂肪干细胞上清液(ADSC-CM)培养48 h的原代P0细胞。B:SCCM培养基培养48 h的原代P0细胞。C:应用脂肪干细胞上清液培养的P2代细胞。D:SCCM培养基培养的P2代细胞。(红色箭头所示为雪旺细胞,黄色箭头所示为成纤维细胞,标尺为100 μm)
A: 48 h of primary cells in ADSC-CM. B: 48 h of primary cells in SCCM. C: P2 cells in ADSC-CM. D: P2 cells in SCCM. (Red arrows represent schwann cells, yellow arrows represent fibroblast, scale bar 100 μm)

2.2 雪旺细胞的鉴定

细胞纯化两次后用雪旺细胞特异性标志物P75,标记雪旺细胞。两组在荧光显微镜下可见雪旺细胞胞核为蓝色,较小,胞体为红色,双极或三级(图2),与根据形态判断雪旺细胞的结果相吻合。成纤维细胞呈扁平多角形,胞核及核仁清晰,大而不透光,胞浆不着色,多位于雪旺细胞下。两次纯化以后雪旺细胞的数量明显增加而成纤维细胞数量则明显减少。

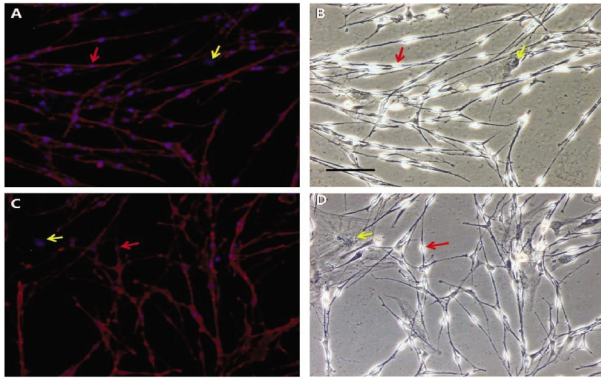


图2 细胞纯化两次后的免疫荧光染色($\times 100$)

Fig. 2 Fluorescent immunostaining of P2 schwann cells ($\times 100$)

A: 应用脂肪干细胞上清液培养的 P2 代雪旺细胞的 P75 染色(红色); B 为 A 白光照片,可见纯化两次后雪旺细胞数量和纯度明显增加;C: 应用 SCCM 培养基培养的 P2 代雪旺细胞的 P75 染色(红色);D 为 C 的白光照片。(红色箭头所示为雪旺细胞,黄色箭头所示为成纤维细胞,标尺为 100 μm)

A: P75 fluorescent immunostaining of P2 schwann cells in ADSC-CM (red).B:white photo of A.C: P75 fluorescent immunostaining of P2 schwann cells in SCCM(red).D:white photo of C. (Red arrows represent schwann cells, yellow arrows represent fibroblast, scale bar 100 μm)

2.3 雪旺细胞纯度计算

培养的雪旺细胞经免疫荧光染色后进行纯度计算,纯度值以均数 $\pm$ 标准差表示,全部数据采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。两组第二代(P2)细胞的纯度均显著高于原代未纯化细胞(表 1),差异有统计学意义($P < 0.05$);两组间比较,原代(P0)和第二代(P2)细胞纯度差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 两组雪旺细胞的纯度比较($n=10$)

Table 1 Comparison of the purity of schwann cells between two groups

组别(Group)	P0	P2
脂肪干细胞上清液组(ADSC-CM)	59.9 $\pm$ 0.3	91.4 $\pm$ 0.5
SCCM 组(SCCM)	62.4 $\pm$ 0.2	89.8 $\pm$ 0.4

注:两组比较差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

Note: there are no statistical differences in two groups, $P > 0.05$.

3 讨论

雪旺细胞作为周围神经系统的主要细胞形态,能够包绕轴突形成髓鞘,对周围神经系统功能有着非常重要的作用。雪旺细胞之间能够形成郎飞结,促进神经动作电位的快速传导。当神经受损发生 wallerian 变性时,雪旺细胞能够与巨噬细胞一起吞噬髓鞘碎片并且在神经基膜管内形成纵向排列的柱状细胞突起或特有的 Bungner 带指引轴突向靶器官再生^[5]。神经受损后,雪旺细胞中的神经营养因子如脑源性神经营养因子^[6],睫状神经营养因子^[7],碱性成纤维细胞生长因子都会有明显升高从而促进轴突出芽生长^[8]。

雪旺细胞作为种子细胞,在周围神经的损伤修复中起着关

键作用^[9]。工程化的周围神经损伤修复中,只有在合成导管或者生物导管中加入足够量的雪旺细胞,才能够明显促进周围神经的再生^[10]。研究发现雪旺细胞数量上至少达到 $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 才能够保证其保护神经元、促进神经轴突再生的作用^[11]。Brookes 等^[12]研究发现移植的外源性雪旺细胞中如果混杂有成纤维细胞,会显著阻止雪旺细胞介导的轴突再生。因此神经损伤修复中所需的雪旺细胞必须要大量而且高纯度。

目前雪旺细胞取材多来自新生和成年动物的周围神经,由于取材来源有限所以要求我们在体外能够扩增出大量的雪旺细胞以满足临床需要。而雪旺细胞在培养过程中一直混杂有成纤维细胞^[13],且成纤维细胞的生长速度明显快于雪旺细胞。因此用普通的低糖 DMEM+10%FBS 培养基会更加促进成纤维细胞的生长导致雪旺细胞的生长相对受抑制,从而无法获得大量高纯度的雪旺细胞。其他方法如无血清培养法、组织块差速贴壁法等,多存在成本昂贵,方法繁冗等特点^[14]。1996 年, Casella 等^[15]研究发现在低糖 DMEM 里加入 heregulin/forskolin 生长因子能够更好的培养雪旺细胞,所以目前培养雪旺细胞多采用条件培养基 SCCM (含 10%FBS、10 $\mu\text{g/ml}$ 成纤维细胞生长因子、10 $\mu\text{g/ml}$ heregulin- β -1、2 μM forskolin、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素和低糖 DMEM)^[16]。此培养基能够更好地促进雪旺细胞生长,但这种 SCCM 条件培养基的三种生长因子价格均较昂贵,浓度配制也较繁琐。因此寻找一种更加高效、快速、经济的雪旺细胞培养基来培养雪旺细胞具有重要研究意义。

Yoshihiro 等^[17]研究发现脂肪干细胞能够分泌多种生长因子包括 BDNF、NGF、VGF 等,这些生长因子对雪旺细胞的生长具有明显促进作用^[15-17]。将脂肪干细胞移植到受损坐骨神经能够促进神经再生^[18,19]。所以本实验试用脂肪干细胞上清液来培养雪旺细胞,用 89%复合胶原酶 NB4 差速分离纯化这两种方法培养的雪旺细胞^[20],并对雪旺细胞的生长特点,表型鉴定进行了研究。我们发现纯化两次后雪旺细胞的表型并没有发生改变,仍然表达雪旺细胞的特异性标志 P75,同时其数量和纯度都有非常明显的提高,和 SCCM 培养基培养的雪旺细胞在统计学上无显著性差异。

在脂肪干细胞培养的各种实验研究中,实验者多数时候将其上清液舍去,造成不必要的浪费。本实验研究表明,可以将舍弃的脂肪干细胞上清液收集起来,代替昂贵的雪旺细胞条件培养基,从而更加经济、方便、高效的获得大量的雪旺细胞。

参考文献(References)

- [1] Lisa N.Pettingill, Ricki L. Minter, Robert K.Shepherd. Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro [J]. Neuroscience, 2008,152(3):821-828
- [2] Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38 (12):1995-1999
- [3] Casella GT, Bunge RP, Wood PM. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro[J]. Glia, 1996, 17(4):327-338
- [4] Yoshihiro Sowa, Tetsuya Imura, Toshiaki Numajiri. Adipose-Derived Stem Cells Produce Factors Enhancing Peripheral Nerve Regeneration: Influence of Age and Anatomic Site of Origin [J]. Stem cell and development, 2012,21(11):1852-1862

(下转第 3028 页)

- enriched in side population and aldehyde dehydrogenase bright overlapping population[J]. PLoS One, 2013,8(8):e68187
- [5] J. Di, T. Duiveman-de Boer, P.L. Zusterzeel, et al. The stem cell markers Oct4A, Nanog and c-Myc are expressed in ascites cells and tumor tissue of ovarian cancer patients [J]. Cell Oncol (Dordr), 2013,36(5):363-374
- [6] Z. Zhang, Y. Zhu, Y. Lai, et al. Follicle-stimulating hormone inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the OCT4 stem cell signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2013,43(4):1194-1204
- [7] L. Yang, D. Lai. Ovarian cancer stem cells enrichment [J]. Methods Mol Biol, 2013,1049:337-345
- [8] M. Morotti, C.M. Becker, M.V. Menada, et al. Targeting tyrosine-kinases in ovarian cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013,22(10):1265-1279
- [9] Y.F. Chen, Z. Dong, Y. Xia, et al. A nucleoside analog inhibits microRNA-214 through targeting heat-shock factor 1 in human epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Sci, 2013,doi: 10.1111
- [10] M. Nishimura, E.J. Jung, M.Y. Shah, et al. Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment [J]. Cancer Discov, 2013,[Epub ahead of print]
- [11] P.J. Zhang, J. Zhao, H.Y. Li, et al. CUE domain containing 2 regulates degradation of progesterone receptor by ubiquitin-proteasome[J]. EMBO J, 2007,26(7):1831-1842
- [12] H.Y. Li, H. Liu, C.H. Wang, et al. Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PP1 [J]. Nat Immunol, 2008,9(5):533-541
- [13] X. Pan, T. Zhou, Y.H. Tai, et al. Elevated expression of CUEDC2 protein confers endocrine resistance in breast cancer [J]. Nat Med, 2011,17(6):708-714
- [14] Y.F. Gao, T. Li, Y. Chang, et al. Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability[J]. Nat Cell Biol, 2011,13(8):924-933
- [15] P.M. Bareiss, A. Paczulla, H. Wang, et al. Quintanilla-Martinez, K. Schulze-Osthoff, F. Essmann, and C. Lengerke, SOX2 Expression Associates with Stem Cell State in Human Ovarian Carcinoma[J]. Cancer Res, 2013,73(17):5544-5555
- [16] L. Farrand, S. Byun, J.Y. Kim, et al. Piceatannol Enhances Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer via Modulation of p53, X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), and Mitochondrial Fission[J]. J Biol Chem, 2013,288(33):23740-23750
- [17] J. Man, X. Zhang. CUEDC2: an emerging key player in inflammation and tumorigenesis[J]. Protein Cell, 2011,2(9):699-703

(上接第 3020 页)

- [5] Christine Radtke, Peter M. Vogt. Peripheral Nerve Regeneration: A Current Perspective[J]. Eplasty, 2009, 9:e47
- [6] Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, et al. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA[J]. J Cell Biol, 1992,119:45-54
- [7] Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo [J]. Neuron, 1992, 9:295-305
- [8] Laquerriere A, Peulve P, Jin O, et al. Effect of basic fibroblast growth factor and alpha-melanocytic stimulating hormone on nerve regeneration through a collagen channel [J]. Microsurgery, 1994, 15: 203-210
- [9] Christine Webber, Douglas Zochodne. The nerve regenerative microenvironment: Early behavior and partnership of axons and Schwann cells [J]. Experimental Neurology, 2010,223:51-59
- [10] Mosahebi A, Woodward B, Wiberg M et al. Retroviral labeling of Schwann cells: in vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration [J]. Glia, 2001, 1:8-17
- [11] Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration [J]. Annu Rev Neurosci, 2007, 30:209-233
- [12] Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells.I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve[J]. Brain Res, 1979,1:105-118
- [13] 胡棠,熊良俭,劳杰,等.从成年大白鼠坐骨神经分离培养雪旺细胞的方法学[J].中华显微外科杂志,2002,25:197-200
- Hu Tang, Xiong Liang-jian, Lao Jie, et al. A methodology of cultivation Schwann cells from adult rat sciatic nerve [J]. Chinese Journal of Microsurgery, 2002,25:197-200
- [14] 沈尊理,Berger Alfred,Hierner Robea 等.无血清法培养新生和成年鼠雪旺细胞[J].中华手外科杂志,2001,17:54-55
- Shen Zun-li, Berger Alfred, Hierner Robea, et al. Serum free method to cultivate new and adult rat schwann cells [J]. Chinese Journal of Hand Surgery, 2001,17:54-55
- [15] Lisa N. Pettingill, Ricki L. Minter, Robert K. Shepherd. Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro [J]. Neuroscience, 2008,152 (3): 821-828
- [16] Peter Arthur-farraj, Katharina wanek, Janina hantke, et al. Mouse Schwann Cells Need Both NRG1 and Cyclic AMP to Myelinate [J]. Glia, 2011,59:720-733
- [17] Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system [J]. Organogenesis, 2010, 6:107-114
- [18] Seigo Suganuma, Kaoru Tada, Katsuhiko Hayashi, et al. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration [J]. The Japanese Orthopaedic Association, 2013,18(1): 145-151
- [19] Hakan Orbay, Ahmet Cagri Uysal, Hiko Hyakusoku. Differentiated and undifferentiated adipose- derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps [J]. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2012, 65:657-664
- [20] Yu-Qing Jin, Wei Liu, Tan-Hui Hong, et al. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2008, 170(1):140-148