

酶消化及差速贴壁法原代培养新生C57小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞****☆

王庭阔, 孙虹

Primary culture of fibroblasts from cochlear duct membrane of neonatal C57 mouse using enzyme digestion and differential adhesion methods

Wang Ting-kuo, Sun Hong

Abstract

BACKGROUND: There has been no specific method for culturing fibroblasts from cochlear duct membranes so far.
OBJECTIVE: To provide good cell model *in vitro* via culturing fibroblasts from lateral wall of cochlear duct membrane of neonatal C57 mouse by enzyme digestion and differential adhesion methods and to identify its biological features.
METHODS: Tissues from lateral wall of cochlear duct membrane were acquired from neonatal C57 mouse using operating microscope. Fibroblasts from lateral wall of cochlear duct membrane were cultured by trypsin digestion combined with differential adhesion methods. The growth condition was observed by inverted phase contrast microscope and hematoxylin-eosin staining, and cell growth curve was drawn, then the immunocytochemistry was employed to classify cell types.
RESULTS AND CONCLUSION: After passage and purification, the shape of fibroblasts from lateral wall of cochlear duct membrane was fusiform and triangle, with "S" type cell growth curve. Immunocytochemiscal detection showed that vimentin could be detected in cultured cells, and brown cytoplasmic pigment could be seen. The results demonstrated that fibroblasts can be cultured from lateral wall of cochlear duct membrane of mice.

Wang TK, Sun H. Primary culture of fibroblasts from cochlear duct membrane of neonatal C57 mouse using enzyme digestion and differential adhesion methods. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4398-4401. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 目前对耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞的培养没有特定的方法。
目的: 采用酶消化与差速贴壁相结合的方法, 原代培养新生 C57 小鼠膜蜗管外侧壁成纤维细胞, 提供良好的体外细胞模型。
方法: 显微解剖分离新生 C57 小鼠膜蜗管外侧壁组织, 对膜蜗管外侧壁组织进行胰蛋白酶消化与差速贴壁相结合的方法培养成纤维细胞, 倒置相差显微镜下观察细胞生长状态, 苏木精-伊红染色, 绘制细胞生长曲线, 免疫组织化学染色鉴别细胞来源。
结果与结论: 膜蜗管外侧壁组织来源传代纯化的成纤维细胞呈梭形和三角形, 生长曲线成 S 形, 免疫组织化学检测波形蛋白, 细胞胞浆中呈棕黄色阳性反应。结果证实培养出小鼠膜蜗管外侧壁成纤维细胞。
关键词: 血迷路屏障; 离子通道; 细胞模型; 原代培养; 小鼠; 成纤维细胞
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.007

王庭阔, 孙虹. 酶消化及差速贴壁法原代培养新生 C57 小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4398-4401. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

Department of
Otorhinolaryngology-
Head & Neck
Surgery, Third
Xiangya Hospital,
Central South
University, Changsha
410013, Hunan
Province, China

Wang Ting-kuo☆,
Studying for
doctorate, Attending
physician,
Department of
Otorhinolaryngology-
Head & Neck
Surgery, Third
Xiangya Hospital,
Central South
University, Changsha
410013, Hunan
Province, China
wtk711112@163.com

Correspondence to:
Sun Hong, Doctor,
Professor,
Department of
Otorhinolaryngology-
Head & Neck
Surgery, Third
Xiangya Hospital,
Central South
University, Changsha
410013, Hunan
Province, China
shjhaj@vip163.com

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
30371531*; the
Natural Science
Foundation of Hunan
Province, No.
02JJY2050*; the
Scientific Research
Fund of Health
Department of Hunan
Province, No.
B2006-063*; the
Science and
Technology Planning
Project of Hunan
Province, No.
2007SK2001*

Received: 2010-01-05
Accepted: 2010-03-20

0 引言

近年来发现, 内耳高度调节的离子出入转运维持了听传导必需的内耳液体组成, 其中任一离子通道紊乱都会破坏动态平衡。各种因素影响短期和长期的听力和/或前庭的细胞功能^[1-7], 成为内耳液体离子动态平衡急剧功能紊乱的诱发机制, 使内耳功能发生障碍^[8-9]。以往大多数研究由于受到活体研究方法的局限, 对血迷路屏障及其离子通道的分子生物机制了解不多。为此实验通过原代培养遗传背景清晰的小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞, 为今后运用分子生物学等方法研究血迷路屏障及其离子通道提供理想的体外细胞模

型。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外培养鉴定。

时间及地点: 于2009-01/05在中南大学湘雅三医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 新生3 d的C57小鼠20只, 由中南大学试验动物部提供, 动物质量合格证号: SCXK(沪)2009-0004, 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准^[10]。

主要试剂: DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、鼠尾胶原、兔抗鼠波形蛋白、DAB显色剂均为Sigma公司产品。

实验方法:

耳蜗膜蜗管外侧壁细胞的分离培养^[11]:将出生 3 d 的 C57 小鼠用体积分数 75% 的乙醇喷洒消毒 3 次, 30 s/次。快速断头, 沿小鼠枕骨大孔剪开头盖骨, 去除头盖骨, 去除干净脑组织, 在解剖显微镜下分离膜蜗管周缘, 取出膜蜗管置于 D-Hank's 液中去掉蜗壳, 游丝镊去除蜗神经, 分离迷路膜蜗管外侧壁组织, 剪成 0.5 mm 3 的小块。0.25% 胰酶消化 25 min (37 °C), 去除未消化的纤维, 10% 胎牛血清 DMEM 终止消化。1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞。每隔 30 min 将含细胞的培养液移入另一个培养皿, 将 3 次下沉的细胞放在一起培养, 加含青霉素 100 U/mL 的体积分数 10% 胎牛血清 DMEM 2 mL^[12], 每日均更换一半培养基。培养 6 d 后消化细胞, 80% 变圆, 终止消化, 收集消化细胞继续培养。

细胞形态学观察:倒置显微镜及苏木精-伊红染色观察细胞形态变化。

细胞生长曲线测定:取生长良好的小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞消化, 按每孔 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 作传代培养接种细胞 36 孔, 24 h 后开始计数细胞, 以后每隔 24 h 计数 1 次, 每次取 3 孔细胞, 分别进行计数。计算平均值。根据细胞计数结果, 以单位细胞数(细胞数/mL)为纵坐标, 以时间为横坐标绘制生长曲线。

细胞鉴定:选用波形蛋白对纯化的成纤维细胞进行免疫化学反应^[13-16]。小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞经兔抗鼠波形蛋白免疫组化染色, DAB 显色, 在光学显微镜下观察鉴定, 数码相机成像系统照相。

主要观察指标:小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞的形态及生长曲线; 小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞的免疫细胞化学染色结果。

设计、实施、评估者:设计为通讯作者, 实施、评估为第一作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

2 结果

2.1 小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁细胞形态学观察 接种 2 h 细胞开始向周边扩散, 24 h 细胞成长梭形、三角形或星形, 胞体丰满, 胞浆均匀核椭圆形或圆形, 核仁清晰, 见图 1。在倒置相差显微镜下为梭形或多突起不规则形, 细胞小而透亮, 分散生长, 细胞群无明显边界, 呈网织状分布。早期混杂少量的上皮样细胞及极少量的

胶质细胞, 一般经过传 1 代后, 上皮细胞与胶质细胞消失。



Figure 1 Morphology of fibroblasts from lateral wall of mice cochlear duct membrane at 24 h after culture (×100)

图 1 培养 24 h 的小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞形状(×100)

苏木精-伊红染色后细胞多为长梭形, 细胞走向趋于一致, 多呈平行排列并有一定弧度。高倍镜下可见长梭形细胞中央有青紫色圆形或卵圆形核, 部分细胞可见向外伸出两三个长短不一的突起, 伊红着色的胞浆, 可见细胞呈梭形或三角形, 见图 2。

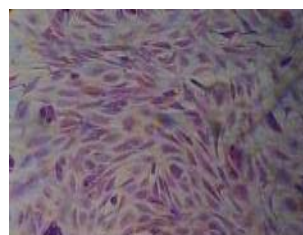


Figure 2 Fusiform and triangle fibroblasts from lateral wall of mouse cochlear duct membrane (Hematoxylin-eosin staining, ×200)

图 2 梭形和三角形的小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞(苏木精-伊红染色, ×200)

2.2 小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞的生长曲线 接种后 24 h 细胞生长缓慢, 48 h 后细胞增殖明显加快, 第 6 天细胞增殖减缓, 细胞倍增时间为 60.2 h。本组细胞可传 5~7 代, 最长生长 46 d, 生长曲线成 S 形, 见图 3。

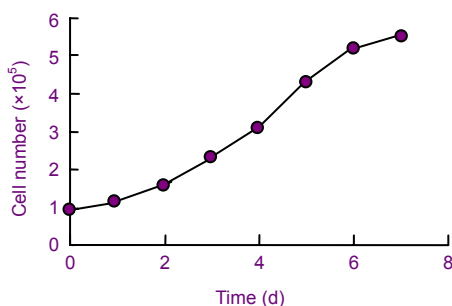


Figure 3 Cell growth curve of fibroblasts from lateral wall of mouse cochlear duct membrane

图 3 小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞的生长曲线

中南大学湘雅三医院耳鼻喉-头颈外科, 湖南省长沙市 410013

王庭阔☆, 男, 1971 年生, 湖南省沅陵县, 土家族, 中南大学湘雅三医院在读博士, 主治医师, 主要从事耳科临床方面的研究。
wtk711112@163.com

通讯作者: 孙虹, 博士, 教授, 中南大学湘雅三医院耳鼻喉-头颈外科, 湖南省长沙市 410013
shihaj@vip163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04398-04

收稿日期: 2010-01-05
修回日期: 2010-03-20
(20100105022/N · Z)

2.3 细胞的鉴定 波形蛋白在小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞胞浆内表达, 显微镜下可见胞浆内有棕色或棕黄色颗粒, 为阳性表达, 见图4; 阴性对照不显色, 见图5。



Figure 4 Positive reaction with brown cytoplasmic pigment in fibroblasts from lateral wall of mice cochlear duct membrane (Vimentin immunocytochemistry, ×100)
图 4 小鼠耳蜗膜蜗管外侧壁成纤维细胞胞浆内棕黄色颗粒阳性表达(波形蛋白免疫组化染色, ×100)

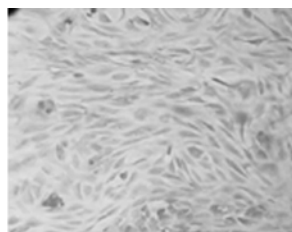


Figure 5 No staining can be seen in the negative control fibroblasts (Immunocytochemistry, ×100)
图 5 成纤维细胞阴性对照不显色(免疫组化染色, ×100)

3 讨论

耳蜗膜蜗管外侧壁细胞原代培养主要有两种方法: 一是组织块外植培养法^[17], 让细胞从组织块周边生长出来; 但成纤维细胞与上皮细胞混杂生长, 生长速度慢, 中央部分细胞无法游出, 出现凋亡、坏死, 周边混杂细胞纯化得到成纤维细胞较少。二是酶消化法, 文献^[11, 18]用0.25%的胰酶及IV型胶原酶消化将耳蜗外侧壁组织, 通过差速贴壁分离成纤维细胞与上皮细胞。作者在此基础上, 通过多次摸索得出如下经验: ①避免杂细胞的干扰: 耳蜗外侧壁组织主要是纤维结缔组织, 有上皮组织, 还要神经、血管。采用0.25%的胰酶消化、血清终止反应、差速贴壁^[19-22], 30 min/次, 3次, 开始3次贴壁的主要是成纤维细胞, 含有少量的上皮细胞、神经细胞, 六七天传代, 0.25%胰蛋白酶消化待大部分成纤维细胞脱壁而上皮细胞未脱壁时, 去除胰酶, 终止反应, 两三代即可得到纯化较高的成纤维细胞。②消化酶的浓度和作用时间^[23]、温度应严格控制。多次实验后作者发现, 0.25%的胰酶37℃消化15 min, 消化程度、时间及温度合适, 既可尽可能消化成纤维细胞以利于成纤维细胞的暴露, 又可避免过度消化影响目的细胞的活

性。按本文介绍方法原代培养成功率可达80%。

耳蜗膜蜗管成纤维细胞在大体形态上同动物其他部位来源的成纤维细胞没有差异, 实验中呈梭形或三角形, 具有其他成纤维细胞不具有的参与内耳离子转运及参与组成血迷路屏障。成纤维细胞来源于间质, 具有间质细胞的标志, 表达波形蛋白。波形蛋白是中间丝的其中一种蛋白质。中间丝是真核生物细胞的重要结构性特征。它们与微管及肌动蛋白微细丝, 组成细胞骨架。作者根据文献^[13-16]选用波形蛋白对纯化的成纤维细胞进行免疫化学反应, 发现胞浆内有均匀的阳性颗粒, 结合细胞形态及生长曲线判定为成纤维细胞。

Spicers等^[24]将膜蜗管成纤维细胞分为5型: I型分布在血管纹外侧, II型分布在耳蜗螺旋突周围, III型位于螺旋韧带近骨侧, IV型位于基底膜内侧, V型分布在前庭膜上方。它们与Na-K-ATP酶和钙ATP酶活性相关。各型成纤维细胞有不同的超微结构、酶活性及相应的功能^[25-29]。实验观察到的膜蜗管成纤维细胞属于何型, 有待进一步的实验鉴别。膜蜗管成纤维细胞同外沟细胞所构成的跨细胞离子通道, 是钾离子自外淋巴液向内淋巴液转运的外侧循环通路, 对维持内/外淋巴液的钾离子电化学梯度, 乃至听觉发生具有重要作用^[30-31]。分离、培养膜蜗管成纤维细胞, 为体外研究内耳离子转运机制及进一步的听觉生理、病理研究提供了技术方法和途径。

4 参考文献

- [1] Suzuki M, Yamasoba T, Ishibashi T, et al. Effect of noise exposure on blood labyrinth barrier in guinea pigs. *Hear Res*. 2002;164 (122):12-18.
- [2] Wang SQ, Song RX, Yao K, et al. Zhongguo Anquan Shengchan Kexue Jishu. 2009;5(3):96.
王世强, 宋瑞祥, 姚琨, 等. 我国纺织噪声暴露现状及听力损失情况预测[J]. 中国安全生产科学技术, 2009, 5(3):96.
- [3] Li ZH, Xu Z, Chen Y, et al. Zhonghua Er Ke Xue Zazhi. 2009;7(1): 32-33.
李宗华, 徐展, 陈阳, 等. 西安市中学生听力现状调查[J]. 中华耳科学杂志, 2009, 7(1):32-33.
- [4] Wei JZ, Su JP, Tang XL. Zhonghua Er Ke Xue Zazhi. 2008, 6(3):323-324.
韦嘉章, 苏纪平, 唐小兰. 机械敏感性钾通道TREK-1在耳蜗血管纹内皮细胞的表达[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(3):323-324.
- [5] Blondeau N, Pétrault O, Manta S, et al. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res*. 2007;101(2):176-184.
- [6] Zhang XJ, Huang ZW, Yang K, et al. Tinglixue ji Yanyu Jibing Zazhi. 2008;16(2):147.
章晓军, 黄治物, 杨琨, 等. 氯化物协同转运蛋白 KCC2在正常大鼠内耳中的表达及意义[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2008, 16(2):147.
- [7] Li Q, Huang DL. Nanfang Yike Daxue Xuebao. 2007;27(12):1920.
李琦, 黄德亮. 醛固酮对豚鼠耳蜗水通道及离子通道蛋白的作用[J]. 南方医科大学学报, 2007;27(12):1920.
- [8] Juhn SK, Hunter BA, Odland RM. Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *Int Tinnitus J*. 2001;7(2):72-83.
- [9] Chu HQ, Xiong H, Han F, et al. Tinglixue ji Yanyu Jibing Zazhi. 2007;15(4):305-306.
褚汉启, 熊浩, 韩芳, 等. KCNQ1 在小鼠耳蜗血管纹的表达及在听觉中的意义[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(4):305-306.
- [10] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [11] Zhang PZ, Chen J, Xue T, et al. Zhonghua Er Ke Xue Zazhi. 2008; 6(3):325-326.
张鹏志, 陈俊, 薛涛, 等. 大鼠耳蜗血管纹边缘细胞原代培养及心钠素的表达[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(3):325-326.

- [12] Oh HY, Jin X, Kim JG, et al. Characteristics of primary and immortalized fibroblast cells derived from the miniature and domestic pigs. BMC Cell Biol. 2007;8:20.
- [13] Hong H, Dong NG, Shi JW. Di'er Junyi Daxue Xuebao. 2009;30(2): 125-126.
洪昊,董念国,史嘉玮.TGF- β 1调控组织工程瓣膜力学性能机制研究[J].第二军医大学学报,2009,30(2):125-126.
- [14] Guo JQ, Sheng MX, Wang LJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(18):3575-3578.
郭君其,盛明雄,王灵杰,等. 苦杏仁甙抑制成人肾脏成纤维细胞的增殖[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(18):3575-3578.
- [15] Zhu ZC, Zhang JS, Li XJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008,12(11):2168.
朱子诚,张金嵩,李秀娟,等. 胰岛素样生长因子 I 对豚鼠膜成纤维细胞增殖的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(11): 2168.
- [16] Li B, Zheng YL. Guoji Yanke Zazhi. 2008;8(12):2449-2451.
李蓓,郑燕林. 甲状腺相关眼病患者及正常人眼眶成纤维细胞的培养和鉴定[J].国际眼科杂志, 2008,8(12):2449-2451.
- [17] Horowitz JC, Rogers DS, Simon RH, et al. Plasminogen activation-induced pericellular fibronectin proteolysis promotes fibroblast apoptosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;38(1):78-87.
- [18] Suzuki M, Ikeda K, Sunose H, et al. ATP-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in the cultured marginal of the strial vascularis of guinea pigs. Hear Res. 1995;86(1-2): 68-76.
- [19] Zhang P, Shen YX, Lu ZF, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(1):67-69.
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[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(1): 67-69.
- [20] Peng H, Wan CT, Yin D, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(1):40-42.
彭昊,万昌涛,尹东,等. 改良Nash差速贴壁联合阿糖胞苷法体外分离培养大鼠嗅球及嗅黏膜源性嗅鞘细胞[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(1): 40-42.
- [21] Xie Y, Zhu TY, Zhao DL. Zhongyiyao Daobao. 2008;14(12):70.
谢艳,朱太咏,赵东亮. 成肌细胞体外培养中两种纯化方法的比较[J]. 中医药导报, 2008,14(12):70.
- [22] Nash HH, Borke RC, Anders JJ. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. Glia. 2001;34(2):81-87.
- [23] Zhong Q, Yan FH, Li YF, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(50):9804-9805.
钟泉,闫福华,李艳芬,等. Beagle犬牙龈成纤维细胞的体外分离培养[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(50):9804-9805.
- [24] Spicer SS, Schulte BA. Differentiation of inner ear fibrocytes according to their ion transport related activity. Hear Res. 1991; 56(1-2):53-64.
- [25] Schulte BA. Immunohistochemical localization of intracellular Ca-ATPase in outer hair cell, neurons and fibrocytes in the adult and developing inner ear[J]. Hear Res. 1993;65(1-2):262-273.
- [26] García Berrocal JR, Méndez-Beneggasi I, Martí C, et al. Intervention of spiral ligament fibrocytes in the metabolic regulation of the inner ear. Acta Otorinolaringol Esp. 2008; 59(10):494-499.
- [27] Qu C, Liang F, Smythe NM, et al. Identification of CIC-2 and CIC-K2 chloride channels in cultured rat type IV spiral ligament fibrocytes. J Assoc Res Otolaryngol. 2007;8(2):205-219.
- [28] Qu C, Liang F, Hu W, et al. Expression of CLC-K chloride channels in the rat cochlea. Hear Res. 2006;213(1-2):79-87.
- [29] Chu HQ, Xiong H, Han F, et al. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2007; 23(9):1826-1827.
褚汉启,熊浩,韩芳,等. 编码Na-K-2Cl的基因缺陷小鼠出现听觉和平衡功能障碍及内耳形态异常[J].中国病理生理杂志,2007,23(9): 1826-1827.
- [30] Rivas A, Francis HW. Inner ear abnormalities in a Kcnq1 (Kvlt1) Knockout mouse: a model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Otol Neurotol. 2005;26 (3):415-424.
- [31] Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ. Targeted disruption of the Kvlt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. J Clin Invest. 2000;106(12):1447-1455.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金(30371531), 课题名称“耳蜗兴奋性损伤后神经营养-3 对神经元的保护作用研究”; 湖南省自然科学基金(02JJY2050), 课题名称“神经营养-3 和尼莫地平对抗耳蜗兴奋性损害的实验研究”; 湖南省卫生厅科研基金(B2006-063), 课题名称“羟基磷灰石纳米载体介导神经营养-3 基因治疗神经性耳聋”; 湖南省科技厅科技计划重点项目(2007SK2001), 羟基磷灰石纳米载体介导内耳基因转染的关键技术研究。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 该实验运用胰酶消化联合差速贴壁法获得原代细胞较单一方法多、纯, 操作简便, 易掌握, 兼具经济、实用之优点, 适合广泛推广。

课题评估的“金标准”: 评价细胞培养的“金标准”即制备方法简单、高效、可重复性好。实验符合该标准。

课题的倚倚与不足: 实验中的耳蜗膜蜗管成纤维细胞属于何型, 有待进一步鉴别, 不利于各型成纤维细胞研究。

提供临床借鉴的价值: 该实验成功培养耳蜗膜蜗管成纤维细胞, 为耳科临床积累基础研究资料。



2010 年本刊“组织工程”栏目组稿重点: 本刊学术部①

内容简介	网站点击更多
组织工程技术 ○ 生物反应器技术: 关节软骨构建与生物反应器, 肝脏构建与生物反应器, 血管构建与生物反应器, 骨及肌肉力学环境与生物反应器。 ○ 组织构建与生物活性因子: 血管内皮细胞生长因子, 血小板源性生长因子, 碱性成纤维细胞生长因子, 转化生长因子- β , 骨形态发生蛋白, 表皮生长因子, 胰岛素样生长因子, 神经胶质生长因子, 软骨调节素, 角朊细胞生长因子等。 ○ 组织构建与生物力学: 骨力学实验, 皮肤生物力学实验, 韧带和肌腱生物力学实验, 血管生物力学实验, 肌肉生物力学实验, 关节软骨力学实验, 细胞膜力学性质实验。 ○ 组织构建与骨质疏松。 ○ 组织构建与中医药。 ○ 组织构建与血管化。	www.crter.org/Html/2010_04_30/2_85506_2010_04_30_107062.html