

不同脱细胞方式下所得胞外基质存在的差异

范利梅¹, 夏荣¹, 窦晓晨² (¹安徽医科大学第二附属医院口腔科, 安徽省合肥市 230601; ²安徽医科大学附属口腔医院种植科, 安徽省合肥市 230032)

文章亮点:

1 常用的脱细胞方法有机械法、酶消化法、化学去垢剂法等, 这些方法或多或少会影响胞外基质的生物性能, 但是目前对脱细胞方法的研究多集中在组织器官的脱细胞处理及其形态学和生物力学分析, 缺少探讨这些脱细胞方法对所得无定形胞外基质生物学效应的直接影响。

2 实验的创新在于分别采用冻融法、胰酶法、去垢剂法、弱碱法制备胞外基质, 发现物理冻融法能够更好地保留胞外基质成分和活性, 所构建基质涂层更有利于细胞的增殖。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 成骨细胞; 细胞外基质; 脱细胞方法; 胰酶法; 冻融法

主题词:

成骨细胞; 细胞外基质

基金资助:

安徽医科大学校级科研基金(2012xkj073): 生物自组装型表面改性材料的初步构建

摘要

背景: 比起单一或复合的生物活性分子材料, 脱细胞胞外基质更接近天然生物体内的细胞外环境, 在组织工程中得到越来越多的重视和应用, 但脱细胞方法会影响所得胞外基质的结构和成分, 目前缺少脱细胞方法对胞外基质影响的研究。

目的: 分析不同脱细胞方法所得胞外基质的成分和作为修饰表面对细胞生物学效应的影响。

方法: 取生长良好的第3代SD乳鼠成骨细胞, 分别采用冻融法、胰酶法、去垢剂法、弱碱法脱去细胞留下基质, 形成4组胞外基质, 通过酶联免疫吸附实验分析胞外基质的生物成分。分别在4组胞外基质表面接种成骨细胞, 以常规培养的细胞为对照, 进行MTT比色实验、碱性磷酸酶活性检测, 对比5组成骨细胞的生物活动。

结果与结论: 冻融法组胶原成分与胞体残留成分较多, 去垢剂法组和弱碱法组次之, 胰酶法组最少。冻融法组接种第3, 5, 7天的细胞A值高于对照组($P < 0.05$), 去垢剂法组接种第3, 5, 7天的细胞A值低于对照组($P < 0.05$)。胰酶法组接种第5, 7天的细胞碱性磷酸酶活性低于对照组($P < 0.05$); 弱碱法组接种第7天的细胞碱性磷酸酶活性低于对照组($P < 0.05$); 去垢剂法组接种第3, 5, 7天的细胞碱性磷酸酶活性低于对照组($P < 0.05$)。表明4种方法中, 冻融法脱细胞能够获得更多的胞外基质, 所构建基质涂层更有利于细胞的增殖。

范利梅, 夏荣, 窦晓晨. 不同脱细胞方式下所得胞外基质存在的差异[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(30): 4863-4867.

Effect of different decellularizing methods on cell-secreted extracellular matrix *in vitro*

Fan Li-mei¹, Xia Rong¹, Dou Xiao-chen² (¹Dentistry Department, the Second Hospital of Anhui Medical University, Anhui 230061, Hefei Province, China; ²Implantology Department, Dental Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui 230032, Hefei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Compared with single or composite biomolecular materials, decellulazied matrices are more biomimetic to natural ectocytic surroundings. So cell-secreted extracellular matrix is paid more and more attention in the field of tissue engineering, and the composition of these matrices are influenced by decellulezired preparation methods more or less. But there are few studies about the biological effect of different decellulazried methods on the extracellular matrix.

OBJECTIVE: To investigate the composition of cell-secreted extracellular matrices *in vitro* by different decellularizing methods and their effects as surface modification on cytobiological reaction.

METHODS: After the treatment of different decellularizing methods (freeze/thaw cycles, trypsin, weak alkali, detergents), the extracellular matrix was obtained and grouped into four kinds. The biological composition of the extracellular matrix was determined by ELISA assay. Then osteoblasts were seeded onto the four kinds of extracellular matrix surfaces. Cells cultured normally served as controls. The effect of extracellular matrix coatings on cell growth and differentiation were determined by MTT test and alkaline phosphatase activity test.

RESULTS AND CONCLUSION: The residual components were the most in the freeze-thaw group, followed by

范利梅, 女, 1984年生, 安徽省合肥市人, 2010年安徽医科大学毕业, 硕士, 现于安徽医科大学第二附属医院口腔科工作, 主要从事口腔修复学、生物材料的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.30.017

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)30-04863-05

稿件接受: 2014-06-16

Fan Li-mei, Master, Dentistry Department, the Second Hospital of Anhui Medical University, Anhui 230061, Hefei Province, China

Accepted: 2014-06-16

the detergent and weak alkali groups, and the least in the trypsin group. Compared with the control group, the absorbance value of cells were lower in the freeze-thaw and detergent groups at days 3, 5, 7 after inoculation (both $P < 0.05$); the alkaline phosphatase activity was lower in the trypsin group at days 5, 7 after inoculation ($P < 0.05$), in the weak alkali group at 7 days after inoculation ($P < 0.05$), and in the detergent group at days 3, 5, 7 after inoculation ($P < 0.05$). Therefore, we can harvest more extracellular matrices by the freeze-thaw method, and the extracellular matrix coating synthesized by the freeze-thaw method is more helpful for cell growth than others.

Subject headings: osteoblasts; extracellular matrix

Funding: the Research Fund of Anhui Medical University, No. 2012xkj073

Fan LM, Xia R, Dou XC. Effect of different decellularizing methods on cell-secreted extracellular matrix in vitro. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(30):4863-4867.

0 引言 Introduction

胞外基质作为细胞自身分泌代谢的产物, 含有多种生物活性分子, 对细胞的生物学行为起到重要的调节作用。各种胞外基质分子(如胶原、纤连蛋白、生长因子等)的生物材料研究都已获得了较为肯定的结果^[1-11]。但是从仿生的角度, 完整的胞外基质更接近天然生物体内的细胞外环境和成分, 更能够参与促进组织愈合, 同时具有低抗原性和可降解性, 成为生物材料领域的又一热点。一方面保有组织形态的胞外基质, 如脱细胞处理的真皮、血管、膀胱等作为相应组织的替代物相继开发成功, 它们无论在动物实验及临床应用上都显示出了良好的应用前景^[12-21]。另一方面通过脱细胞得到的无定形胞外基质, 既可以作为植入体表面改性材料, 也可以作为不规则缺损的植入材料, 也成为了生物材料学界备受关注的新型材料^[22-29]。

脱细胞胞外基质是通过脱出组织细胞的方法得到完整的胞外基质, 最大程度保留了其生物活性, 去除组织的移植免疫原性。常用到的脱细胞方法有机械法、酶消化法、化学去垢剂法等, 这些方法或多或少会影响胞外基质的生物性能, 但是目前对脱细胞方法的研究多集中在组织器官的脱细胞处理及其形态学和生物力学分析^[30-40], 缺少探讨这些脱细胞方法对所得无定形胞外基质生物学效应的直接影响。实验采用不同方法脱细胞, 分析所得胞外基质的成分, 并将所得的胞外基质作为生物反应表面接种细胞, 观察其上细胞的生物行为, 从而评估各种构建方式, 为进一步筛选高效、安全的脱细胞方法提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞-材料学体外对照观察实验。

时间及地点: 于2013年7至12月在安徽医科大学口腔医学院中央与地方共建口腔医学中心实验室完成。

材料: SPF级SD乳鼠由安徽省实验动物中心提供。

实验方法:

成骨细胞的培养: 采用改良组织块法培养成骨细胞^[41-45], 取2只新生1-3 d SD乳鼠断颈处死, 放入体积分数75%乙醇中浸泡消毒5 min, 无菌操作取下颅盖骨组织,

不同脱细胞方式下所得胞外基质差异实验的主要试剂:

试剂	来源
新生小牛血清	杭州四季青
高糖 DMEM 培养基	HyClone
胰蛋白酶	Solarbio
兔抗鼠 Collagen I 抗体、兔抗鼠 actin 抗体、羊抗兔 IgG 抗体、TAB 显色试剂盒	镇江厚普生物科技有限公司
碱性磷酸酶测定试剂盒	南京建成生物研究所

除去附着的血管及结缔组织, 用Hank液清洗3次, 剪成 1 mm^3 大小的碎块。用0.25%胰蛋白酶在 37°C 条件下消化20 min; 中止消化后用弯吸管吸取碎骨片, 均匀接种于25 mL的培养瓶中, 翻转培养瓶在体积分数5% CO_2 的培养箱中孵育二三小时, 转正培养瓶并加入含有体积分数20%小牛血清的高糖DMEM培养液后继续培养, 3 d后换液, 7-10 d后待细胞融合成单层后再传代培养。取第3代细胞用DMEM培养液将成骨细胞浓度调整为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 取1 mL/孔接种与多个24孔板中, 培养三四天直至细胞长满表面, 待用。

胞外基质表面的分组构建: ①冻融法组: 取3板上述成骨细胞, 吸出长满成骨细胞培养板中的培养液, 0.01 mol/L PBS漂洗3次后, 反复快速冻融3次, PBS漂洗3次, 备用。②胰酶组: 取3板上述成骨细胞, 吸出长满成骨细胞培养板中的培养液, 0.01 mol/L PBS漂洗3次后, 每孔加入300 μL 胰酶20 min, 加入培养基中和, 吸出培养基, PBS漂洗3次, 备用。③去污剂法组: 取3板上述成骨细胞, 吸出长满成骨细胞培养板中的培养液, 0.01 mol/L PBS漂洗3次后, 每孔加入500 μL 0.1% TritonX-100, 4°C 过夜, PBS漂洗3次, 备用。④弱碱法组: 取3板上述成骨细胞, 吸出长满成骨细胞培养板中的培养液, 0.01 mol/L PBS漂洗3次后, 每孔加入500 μL 20 mmol/L氨水, 4°C 过夜, PBS漂洗3次, 备用。

ELISA检测胞外基质成分: 4组胞外基质各取3孔, 吸出培养液, PBS漂洗3次, 每孔加入1:500 I型胶原(collagen type I)一抗500 μL , 4°C 过夜。弃孔内溶液, PBS漂洗3次, 每孔加入1:500二抗在 37°C 孵育1 h。弃孔内溶液, PBS漂洗3次, 加入新鲜配制TAB 500 μL , 室

表 1 ELISA 检测不同方法制备胞外基质中 I 型胶原、肌动蛋白的吸光度值

Table 1 The absorbance values of type I collagen and actin on extracellular matrix surfaces detected by ELISA assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	I 型胶原	肌动蛋白
胰酶法组	0.356±0.034	0.339±0.039
冻融法组	1.223±0.085	1.576±0.126
去污剂法组	1.097±0.067	0.945±0.090
弱碱法组	0.707±0.064	0.725±0.070

表注: ①对于 I 型胶原, 冻融法组最多, 去污剂法组、弱碱法组次之, 胰酶法组最少。②对于肌动蛋白, 结果相似: 冻融法组最多, 去污剂法组、弱碱法组次之, 胰酶法组最少。

表 3 不同方法制备胞外基质表面细胞的碱性磷酸酶活性

Table 3 Alkaline phosphatase activity on extracellular matrix coatings prepared by different methods ($\bar{x} \pm s, n=3, A$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组	0.348±0.021	0.459±0.027	0.526±0.014	0.427±0.015
胰酶法组	0.398±0.011	0.480±0.030	0.496±0.005 ^a	0.374±0.009 ^a
冻融法组	0.338±0.016	0.416±0.076	0.470±0.042	0.403±0.025
弱碱法组	0.338±0.009	0.501±0.015	0.503±0.005	0.368±0.022 ^a
去污剂法组	0.310±0.016	0.284±0.033 ^a	0.422±0.026 ^a	0.402±0.021 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

温下显色 10 min, 弃孔内溶液, 蒸馏水漂洗 3 次, 酶标仪 450 nm 波长测定吸光度值。

细胞接种: 取生长良好的第 3 代成骨细胞, 用 DMEM 培养液将细胞浓度调整为 $5 \times 10^7 L^{-1}$, 以 500 μL /孔接种于各组胞外基质和空白 24 孔板(对照组)。

主要观察指标:

碱性磷酸酶活性检测: 接种后第 1, 3, 5, 7 天, 从各组 3 孔中吸取培养液 30 μL , 置入另一块 96 孔板中, 用碱性磷酸酶检测试剂盒进行测定吸光度值。

MTT 检测: 在接种后第 1, 3, 5, 7 天, 从每组各取 3 孔, PBS 漂洗 3 次, 每孔加入 500 μL 培养液和 50 μL MTT 底物, 继续培养 4 h, 吸除培养液, 每孔加入 500 μL 溶解液, 继续培养 20 min, 振荡 3 min, 每孔取出 150 μL 加入 96 孔板, 用酶标仪以 490 nm 波长测吸光度值。

统计学分析: 采用 SPSS 20.0 进行统计分析, 多组比较采用方差分析, 两组比较采用 *t* 检验。

2 结果 Results

2.1 ELISA 检测胞外基质成分 方差分析显示, 4 组基质化表面的 I 型胶原、actin 含量差异有显著性意义。①对于 I 型胶原, 冻融法组最多(1.223±0.085), 去污剂法组(1.097±0.067)、弱碱法组(0.707±0.064)次之, 胰酶法组(0.356±0.034)最少。②对于肌动蛋白, 结果相似: 冻融法组最多(1.576±0.126), 去污剂法组(0.945±0.090)、弱碱法组(0.725±0.070)次之, 胰酶法组(0.339±0.039)最少。但两两比较时, 冻融法组所得 I 型胶原与去污剂法组比较差异

表 2 不同方法制备胞外基质表面细胞增殖的 MTT 吸光度值

Table 2 MTT test about cell growth on extracellular matrix coatings prepared by different methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组	0.695±0.028	0.949±0.035	0.980±0.031	1.137±0.062
胰酶法组	0.652±0.030	0.930±0.013	1.117±0.011	1.132±0.043
冻融法组	0.664±0.016	1.161±0.051 ^a	1.358±0.023 ^a	1.654±0.055 ^a
弱碱法组	0.662±0.024	0.892±0.037	1.081±0.061	1.101±0.015
去污剂法组	0.615±0.050	0.657±0.061 ^a	0.772±0.052 ^a	0.751±0.032 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

无显著性意义(表 1)。

2.2 MTT 检测细胞增殖 方差分析显示, 接种第 3, 5, 7 天 4 组细胞增殖差异有显著性意义。冻融法组接种第 3, 5, 7 天的细胞吸光度值均高于对照组($P < 0.05$); 去污剂法组接种第 3, 5, 7 天的细胞吸光值均低于对照组($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 碱性磷酸酶活性检测 方差分析显示, 接种后第 1, 3, 5 天 4 组胞外基质组间细胞碱性磷酸酶活性差异有显著性意义, 第 7 天 4 组胞外基质组间细胞碱性磷酸酶活性差异无显著性意义。胰酶法组第 5, 7 天的细胞碱性磷酸酶活性低于对照组($P < 0.05$); 弱碱法组在第 7 天的细胞碱性磷酸酶活性低于对照组($P < 0.05$); 去污剂法组第 3, 5, 7 天的细胞碱性磷酸酶活性低于对照组($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论 Discussion

胞外基质是由生物自组装的水凝胶体系, 混合有多种生物分子, 它作为细胞分泌代谢的产物, 同时也对细胞生物学行为起到重要的调节作用, 细胞与胞外基质相互作用, 相互依存, 相互影响, 有利于保持细胞特定的形态、代谢、增殖、分化、迁移及信息传递。基于此, 许多学者都会选用胞外基质中的各种生物分子进行修复缺损和材料改良等研究。然而比起单一或复合的生物活性分子材料, 理论上完整的胞外基质更接近天然的生物体内的胞外环境, 最大程度保留了其生物活性, 因此在组织工程中得到越来越多的重视和应用。

脱细胞基质的研究出现在 20 世纪 90 年代初, 是通过脱出组织细胞的方法去除组织的移植免疫原性。其研究多见于脱细胞处理的真皮、血管、膀胱等组织和器官, 作为相应组织的替代物和支架材料, 显示出了良好的应用前景。而由目标细胞产生的无定形胞外基质, 既可以作为植入体表面改性材料, 也作为不规则缺损的植入材料, 近年来成为生物材料领域的又一热点。人们希望在去除胞外基质免疫原性的同时最大程度保留其生物活性, 诱导周围细胞生长和组织愈合。不可忽略的是脱细胞方法或多或少会影响所得胞外基质的结构和成分, 然而目前对脱细胞方法的研究多集中在对组织器官的脱细胞处理及其形态学和生物力学分析, 缺少研究这些脱细

胞方法对所得胞外基质生物效应的直接影响。因此实验着重以脱细胞方法作为研究方向, 采用目前国内外常用的主要脱细胞方法(冻融法、酶消化法、化学去垢剂法、弱碱法)构建无组织形态的胞外基质表面, 测定所得胞外基质成分的差异, 观察细胞在不同组别表面的生物行为, 分析不同脱细胞方法的生物效应, 初步探讨脱细胞基质的优化构建, 为筛选高效和安全的脱细胞方法提供依据。

肌动蛋白是胞体的重要成分; I型胶原是成骨细胞分泌的胞外基质的主要成分之一。实验中ELISA法标识并定量检测脱细胞后的基质化表面所含胞体成分肌动蛋白和I型胶原, 来分析不同方法的去除细胞胞体和保留基质成分的能力。结果显示, 冻融法组所留的胶原成分较多, 但胞体残留成分也相应较多; 去污剂法组和弱碱法组次之, 胰酶法组最少。

MTT比色实验是一种检测细胞存活和生长的方法, 以吸光度值反映活细胞的增殖情况。而在评估种植体材料的生物活性时, 一个重要指标就是观察材料是否有利于细胞的增殖。实验结果表明各组增长趋势相似, 到第3, 5, 7天, 各组表面的细胞增殖出现显著性差异。与对照组比较, 冻融法组的细胞增殖较多, 在第3, 5, 7天出现显著性差异, 这可能是因为冻融法能获得更多的胞外基质, 其中含有较多促进细胞黏附和生长的物质, 如胶原、生长因子等。而在第3, 5, 7天, 去污剂法组胞外基质表面的细胞增殖数均低于对照组, 这提示TritonX-100脱细胞后可能残留一定程度的细胞毒性, 不利于细胞的增殖。

碱性磷酸酶是成骨细胞分化和功能成熟的主要特征酶之一, 对碱性磷酸酶活性的检测是鉴定成骨细胞和评价其功能活性的重要指针之一。研究中, 在接种后第1, 3, 5天, 各组的碱性磷酸酶活性出现显著性差异, 但在第7天这种显著性差异消失, 这可能提示随着接种时间的延长, 不同脱细胞方法对碱性磷酸酶活性的影响力的差异变得越来越小。与对照组比较时, 除冻融法组以外, 其余各组的碱性磷酸酶活性在不同时间点都不同程度地低于对照组, 不利于成骨活性的维持。

同时在实际制备过程中, 每种脱细胞方法都各有特点和局限性, 如冻融组的胞外基质表面对水流等外力的抵抗力减弱, 易剥脱漂浮, 在操作过程中可能会发生胞外基质成分的丢失; 而胰酶的脱细胞效果受到时间、温度, 甚至细胞数量的影响, 效力过强可能会破坏胞外基质的黏附成分, 较弱又无法脱去细胞, 使用较难掌控; TritonX-100和氨水处理后虽较易获得稳定的基质表面, 但可能残留细胞毒性作用。

上述结果证实物理冻融法能够更好地保留胞外基质成分和活性, 构建方法对胞外基质这类生物材料的生物学效应产生不可忽视的影响。要获得比较理想的脱细胞效果, 并能最大程度地保存原有的结构和功能以适合组织工程及临床治疗的需要, 需要对不同脱细胞方法进行甄选, 有时

甚至需要几种脱细胞方法的联合应用。如何根据临床应用的实际需求, 在获得胞外基质时合理运用脱细胞方法还有待进一步的探索。

致谢: 衷心感谢安徽医科大学口腔医学院中央与地方共建口腔医学中心实验室的老师与同学指导和帮助。

作者贡献: 范利梅、夏荣进行实验设计, 实验实施为范利梅, 实验评估为范利梅、窦晓晨, 范利梅成文。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学要求。

学术术语: 胞外基质-是由生物自组装的水凝胶体系, 混合有多种生物分子, 它作为细胞分泌代谢的产物, 同时也对细胞生物学行为起到重要的调节作用, 细胞与细胞外基质相互作用, 相互依存, 相互影响, 有利于保持细胞特定的形态、代谢、增殖、分化、迁移及信息传递。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Morra M. Biochemical Modification of titanium surfaces: peptide and ECM proteins. *Eur Cell Mater.*2006;12:1-15.
- [2] Kim S, Myung WC, Lee JS, et al. The effect of fibronectin-coated implant on canine osseointegration. *J Periodontal Implant Sci.*2011;41(5):242-247.
- [3] Lamberg A, Schmidmaier G, Soballe K. Locally delivered TGF-beta1 and IGF-1 enhance the fixation of titanium implants: a study in dogs. *Acta Orthopaedica.*2006;77(5):799-805.
- [4] Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC, et al. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials.*2009;30(10):1898-1909.
- [5] Culpepper BK, Bonvallet PP, Reddy M S, et al. Polyglutamate directed coupling of bioactive peptides for the delivery of osteoinductive signals on allograft bone. *Biomaterials.* 2013; 34(5):1506-1513.
- [6] Shekaran A, Garcia AJ. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 96(1):261-272.
- [7] Baas J, Jakobsen T, Elmengaard B, et al. The effect of adding an equine bone matrix protein lyophilisate on fixation and osseointegration of HA-coated Ti implants. *J Biomed Mater Res A.*2012;100(1):188-194.
- [8] 毛晶晶, 何家才, 郑先雨, 等. 富血小板纤维蛋白在犬上颌窦底提升中促骨缺损修复的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(2): 176-179
- [9] 孔丽, 唐旭炎, 李全利. 新型纳米复合材料对犬下颌槽骨缺损的修复效果[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(12):1245-1248.
- [10] 周允芝, 唐旭炎, 宁天云, 等. 类釉原蛋白寡肽仿生修饰钛表面的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(2):124-127.
- [11] 杨全全, 何家才, 杨瑞, 等. 富血小板纤维蛋白修复牙种植体周围骨缺损的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(5):581-584.
- [12] 陈永吉, 曾宪涛, 解龙川, 等. 异种脱细胞真皮基质在牙种植术中的临床应用[J]. 临床口腔医学杂志, 2011, 27(4):240-242.

- [13] 邹嘉平,杨契超.异种脱细胞真皮基质修复膜修复鼓膜穿孔的临床应用[J].南京医科大学学报:自然科学版, 2011,31(1):94-95, 122.
- [14] 刘广毅,杨军成.脱细胞异体真皮基质修复口腔组织缺损的疗效观察[J].四川医学,2012,33(7):1206-1207.
- [15] 张毓姣,沈国良,林伟,等.异种脱细胞真皮基质与薄自体皮复合移植用于深度烧伤创面治疗[J].浙江临床医学, 2012,14(12): 1519-1520.
- [16] 余勇,赵慧,许瑾,等.脱细胞异体真皮支架与自体皮片复合移植的临床应用[J].蚌埠医学院学报,2012,37(10):1189-1190.
- [17] 刘立强,马莲.异种脱细胞真皮基质用于牙槽嵴裂植骨术的效果观察[J].北京口腔医学,2012,20(6):338-340.
- [18] 王乾锋,刘宏伟.脱细胞真皮基质作为GTR屏障膜治疗II度根分叉缺损的实验研究[J].口腔颌面外科杂志, 2013,23(5): 347-351.
- [19] 周瑜,叶茂昌,李容新,等.应用改良型异种脱细胞真皮基质修复重建小型舌鳞癌切除术后的缺损[J].中国口腔颌面外科杂志, 2014, 12(1):56-60.
- [20] 王永前,李森恺.脱细胞膀胱黏膜下基质异种移植的实验研究[J].军事医学,2013,37(9):696-699.
- [21] 韦殿闯.磨颞术联合DR脱细胞异种皮移植术在四肢深II度烧伤创面的运用[J].广西医科大学学报,2013,30(5):793-794.
- [22] Datta N,Pham QP,Sharma U,et al.In vitro generated extracellularmatrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation.Proc Natl Acad Sci U S A.2006;103(8):2488-2493.
- [23] Pham QP,Kasper FK,Scott BL,et al.The influence of an in vitro generated bone-like extracellular matrix on osteoblastic gene expression of marrow stromal cells. Biomaterials. 2008; 29(18): 2729-2739.
- [24] 范利梅,唐旭炎,李全利,等.骨髓基质细胞在胞外基质涂层钛表面的黏附和铺展[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(21): 4029-4032.
- [25] 范利梅,唐旭炎,李全利,等.钛表面胞外基质涂层对骨髓基质细胞增值和分化的影响[J].安徽医科大学学报, 2009,44(5): 551-553.
- [26] Thibault RA,Scott Baggett L,Mikos AG,et al.Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements.Tissue Eng A.2010;16(2):431-440.
- [27] Decaris ML,Mojadedi A,Bhat A,et al.Transferable cell-secreted extracellular matrices enhance osteogenic differentiation.Acta Biomater.2012;8(2):744-752.
- [28] Decaris ML,Leach JK.Design of experiments approach to engineer cell-secreted matrices for directing osteogenic differentiation.Ann Biomed Eng.2011;39(4):1174-1185.
- [29] Prewitz MC,Seib FP,von Bonin M,et al.Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments.Nat Methods.2013;10(8):788-794.
- [30] 孙亨,王艳霞,吴江.组织脱细胞方法的研究进展[J].四川解剖学杂志,2011,19(4):24-30.
- [31] 陈博,彭代智.组织和器官脱细胞方法的研究进展[J].中华损伤与修复杂志:电子版, 2012,7(6):58-63.
- [32] 赵宇,于森,柏树令.脱细胞技术及其在组织工程中的应用研究进展[J].中国修复重建外科杂志,2013,27(8):950-954.
- [33] 张红霞,翟万银,张红锋.适用于不同尺寸血管的脱细胞方法研究[J].华东师范大学学报:自然科学版,2012,58(4):50-60.
- [34] 阴洪,任先军,蒋涛.脱细胞技术在同种异体组织工程支架中的研究进展[J].中国矫形外科杂志,2012,20(11):1010-1012.
- [35] 陈博,彭代智,左海斌,等.新生小牛皮皮肤的形态学和生物力学特点及脱细胞方法探索[J].重庆医学,2012,41(11):1043-1046,封2.
- [36] 杨召,马信龙,李秀兰,等.不同脱细胞方法对周围神经生物力学性能的影响[J].中国生物医学工程学报,2011,30(1):155-159.
- [37] 贾桦,王莹,佟雷,等.不同脱细胞方法制备的AECM成分分析及比较[J].牡丹江医学院学报,2013,34(4):1-4.
- [38] 许海委,徐宝山,杨强,等.不同脱细胞方法对猪尾纤维环生物力学特性及组织结构的影响[J].医用生物力学, 2013,28(4): 448-453.
- [39] 范雪梅,李胜平,徐惠成.交联剂对脱细胞膀胱基质生物力学性能的影响[J].北京生物医学工程,2013,32(4):370-374.
- [40] 孙飞,潘枢,史宏灿,等.去污剂-联合酶法行兔脱细胞组织工程气管制备及性能评价[J].中华胸心血管外科杂志, 2014,30(1): 38-41,55.
- [41] 唐孝明,万伦,刘仲前,等.改良组织块法大鼠成骨细胞培养的研究[J].四川医学,2004,25(5):45-45,245.
- [42] 胡静,郑洪新.改良成骨细胞体外培养和鉴定方法[J].中国老年学杂志,2006,26(1):76-78.
- [43] 李晓峰,赵劲民,苏伟,等.大鼠成骨细胞的原代培养和鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(6):990-994.
- [44] 王双利,查振刚,刘宁,等.改进酶消化法培养SD大鼠成骨细胞及其鉴定[J].实用医学杂志,2008,24(6):915-918.
- [45] 程浩,张延芳,许巍.新生大鼠成骨细胞原代培养与鉴定[J].中国组织工程研究,2013,17(41):7199-7204.