

人真皮成纤维细胞诱导分化研究*

郭常敏, 王达利[△], 魏在荣

(遵义医学院附属医院烧伤整形外科, 贵州遵义 563099)

摘要:目的 体外分离培养人包皮成纤维细胞(HFF),探讨其成骨、成脂、成软骨分化潜能,为骨创伤或其他修复治疗提供新的种子细胞来源。方法 采用机械法结合酶消化法分离、培养 HFF。取第 3 代细胞用免疫细胞化学法检测其波形蛋白(Vimentin)和角蛋白 19(CK19)的表达。通过向成骨、成脂、成软骨细胞诱导分化(诱导培养基根据说明书配制),鉴定其多向分化潜能。结果 原代细胞 24 h 内完全贴壁,细胞形态不规则,多为圆形或多角形,传代后细胞形态均一,基本为长梭形,鱼群样、漩涡样生长。免疫细胞化学结果显示该细胞表达 Vimentin,不表达 CK19,经诱导可以向成骨、成脂、软骨细胞方向分化。结论 HFF 在特定条件能多向分化,其本身也参与骨折愈合的全过程,加之来源方便,增殖能力强,有望为骨折或较大骨缺损患者修复治疗及组织工程学提供理想种子细胞。

关键词:成纤维细胞;真皮;波形蛋白;角蛋白 19;诱导分化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)02-0147-03

Induced differentiation of human dermal fibroblast*

Guo Changmin, Wang Dali[△], Wei Zairong

(Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099, China)

Abstract: Objective To separate and culture human foreskin fibroblasts(HFF) in vitro and to investigate the differentiation potentials of osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis to provide the new source of seed cells for bone trauma or other repair treatment. Methods The methanical method combined with the enzyme digestion method was adopted to separate and culture HFF. The third generation cells were taken for detecting the expression of Vimentin and CK19 by the immunocytochemical method. By the induction differentiation to osteoblast, adipoblast and chondroblast(the induction medium was prepared according to the instructions), the multi-directional differentiation potentials were identified. Results The primary cells were completely adherent within 24 h, the cell shapes were irregular, most of cells were round or polygonal, after passage, the cellular shapes were uniform, usually long spindle-shape, grew in fish shoal-like and swirl-like. The immunocytochemical results showed that these cells expressed Vimentin and not expressed CK19. After being cultured in inducing differentiation media, the cells were differentiated into the directions of osteoblasts, adipoblasts and chondroblasts. Conclusion HFF can multi-directionally differentiate under certain condition, which itself also participates in the whole process of fracture healing, together with a convenient source and high proliferation ability, HFF is expected to provide the ideal seed cells for the repair treatment of fracture or larger bone defect and the tissue engineering.

Key words: fibroblast; dermis; Vimentin; keratin-19; induction differentiation

真皮成纤维细胞是来源于中胚层间质细胞的终末分化细胞^[1],分布广泛,取材方便,是创伤修复中的主要细胞之一^[2]。之前普遍认为真皮成纤维细胞没有分化潜能,只能用于皮肤移植等简单的创面修复,近来有相关研究表明真皮成纤维细胞在特定条件下可以向成骨、成脂、成软骨、胰岛细胞、心肌细胞等方向分化。Hanna 等^[3]的动物实验已经证明真皮成纤维细胞可以作为诱导性多潜能干细胞(iPS)的种子细胞用于治疗镰刀形红细胞贫血。本实验选取人包皮成纤维细胞作为研究对象并对其进行免疫学鉴定及成骨、成脂、成软骨细胞方向诱导分化,以期为骨创伤或组织工程学种子细胞的来源提供稳定的诱导培养体系。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 经患者及家属知情同意,无菌条件下取本院附属医院泌尿外科正常成年男性包皮环切术后废弃包皮组织。患者无其他器质性疾 病。

1.2 主要实验试剂 0.4% I 型胶原酶、0.4% 中性蛋白酶、

0.125% 胰蛋白酶-0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国 Sigma 公司,完全培养液(L-DMEM 培养液中含 10% 胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、100 U/mL 的青霉素、链霉素)购自美国 Gibico 公司。免疫细胞化学小鼠抗人波形蛋白(Vimentin)、角蛋白 19(CK19)单克隆抗体、二步法抗兔(鼠)通用型免疫组织化学试剂盒购自基因科技(上海)有限公司,成骨、成脂、成软骨细胞诱导培养基购自美国 Cyagen 公司。

1.3 细胞分离培养 于超净台中将包皮组织用含 100 U/mL 双抗的磷酸盐缓冲液(D-PBS)清洗 3~5 次,剪切成 5 mm 左右的组织片,用 0.4% 的中性蛋白酶于 37 ℃ 消化 25~30 min,剪去表皮及皮下组织,将真皮组织剪为糊状后用 0.4% I 型胶原酶 37 ℃ 水浴摇床中消化 2 h,完全培养基终止消化,200 目筛网过滤,1 500 r/min 离心 10 min,倒掉上清,加入完全培养基重悬细胞,按 $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度接种于 75 mL 培养瓶中,放置于含 5% CO₂、37 ℃ 饱和湿度孵箱中培养。首次换液在培养 24 h 后,以后每隔 2~3 d 换液 1 次。待原代细胞生长融合达

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060157)。 作者简介:郭常敏(1987-),医师,在读硕士研究生,现工作于成都市第五人民医院。 △ 通讯作者,E-mail:daliwangzy@sina.com。

80%~90%时,倒掉培养基,用 D-PBS 清洗后,加入 0.125% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 37 °C 消化 30 s 至 1 min,倒置相差显微镜下观察,待胞质回缩,细胞变圆时加入完全培养基终止消化,离心并弃上清液,完全培养基重悬细胞并按照 1:2 的比例进行传代,置于上述孵箱中培养。

1.4 细胞形态及生长特点 细胞在原代培养 24 h 后倒置显微镜下首次观察细胞形态,以后每天观察,并拍照记录生长情况。

1.5 免疫细胞化学法检测 Vimentin 和 CK19 的表达 将第 3 代细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化后按 $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 在无菌小培养皿中爬片,培养至细胞融合约 70%~80% 时取出细胞爬片,以小鼠抗人 Vimentin 和 CK19 单克隆抗体作为一抗,二抗 (IgG) 为兔鼠通用型,采用 ABC 法进行免疫细胞化学检测,D-PBS 代替一抗,作为阴性对照。

1.6 细胞体外定向诱导分化 待第 3 代细胞生长融合至 85% 左右,常规消化、离心重悬细胞,按 $3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞生长融合至 80%~90% 进行如下诱导培养。

1.6.1 向成骨诱导分化 吸去完全培养液,每孔加入 2 mL 的成骨细胞分化诱导培养液(完全 L-DMEM 培养液 175 mL、20 mL 胎牛血清、20 μL 地塞米松、400 μL 维生素 C、2 mL β -磷酸甘油、1% 的双抗和 1% 谷氨酰胺)进行诱导。此后,每隔 3 d 更换成骨分化诱导液 1 次。分化诱导 21 d 后,吸去培养液,PBS 洗涤 2 次,4% 甲醛固定,1% 茜素红进行钙结节染色,光学显微镜下观察、拍照。

1.6.2 向成脂诱导分化 吸去完全培养液,每孔加入 2 mL 的成脂细胞分化诱导培养液 A(完全 L-DMEM 培养液 175 mL、20 mL 胎牛血清、200 μL 地塞米松、200 μL 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、200 μL 吡啶美辛、400 μL 胰岛素、1% 双抗和 1% 谷氨酰胺),诱导 3 d 后再换为含成脂分化诱导培养液 B(完全 L-

DMEM 培养液 175 mL、20 mL FBS、400 μL 胰岛素、1% 双抗和 1% 谷氨酰胺),24 h 后换为诱导液 A,如此循环 4 次后,最后用诱导分化培养基 B 继续维持 7 d,每 3 天换液 1 次。经诱导后见脂肪空泡形成,吸去培养液,PBS 洗涤 2 次,4% 甲醛固定,油红 O 染色,光学显微镜下观察、拍照。

1.6.3 向成软骨诱导分化 取第 3 代生长融合至 85% 左右且生长状态良好的成纤维细胞,常规消化、离心,D-PBS 洗剂,重新离心,离心后细胞团块约 2 mm,注意保持细胞团不被打散,加入成软骨诱导培养基(基础培养基 194 mL、维生素 C 600 μL 、地塞米松 20 μL 、丙酮酸钠 200 μL 、脯氨酸 200 μL 、TGF- β 3 2 mL、胰岛素-转铁蛋白-硒纳添加物 2 mL 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度孵箱中,3 d 换 1 次成软骨诱导培养液,换液时轻弹离心管壁使细胞团块脱壁悬浮,每次换液加诱导培养基 1 mL。常规诱导 3 周后弃培养基,D-PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,石蜡包埋切片,脱蜡蒸馏水冲洗。阿利辛蓝染色液浸染 30 min,终止染色、镜检、拍照。

2 结果

2.1 细胞的形态及生长特点 HFF 细胞为贴壁生长的长梭型细胞,24 h 后贴壁,原代细胞呈多角形集落样生长,细胞体积较小,贴壁 3 d 以后体积较大,胞质丰富,胞核清晰。传代后细胞生长均一,基本未见三角形细胞,多以长梭形为主,鱼群样,漩涡样生长,第 3~5 天增殖明显。见图 1、2。

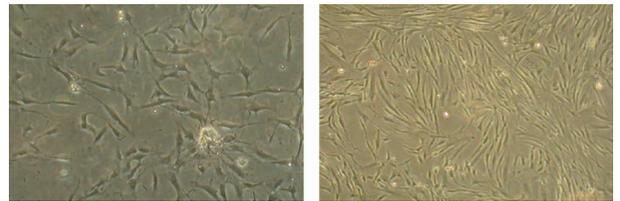
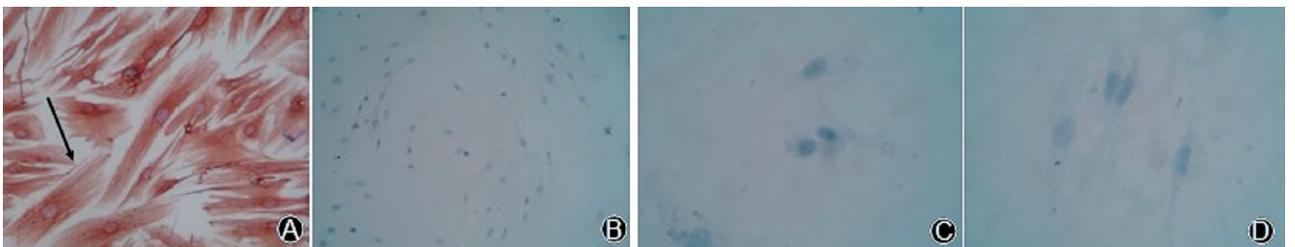


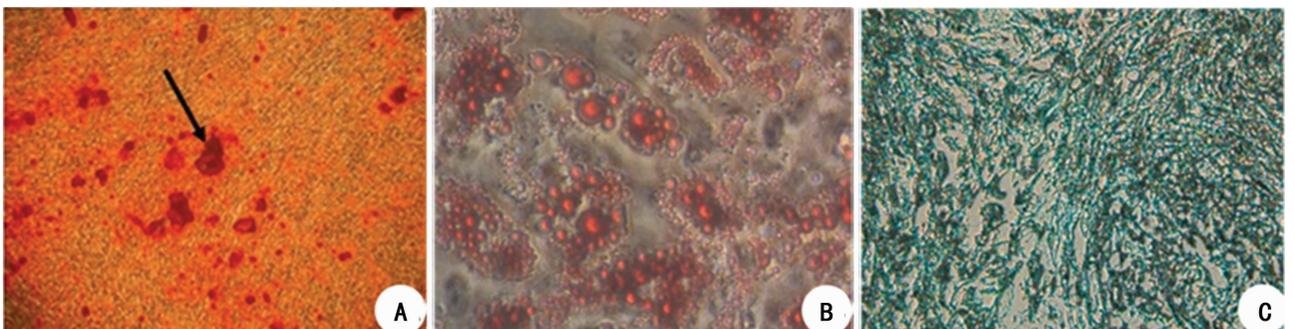
图 1 HFF 原代第 3 天

图 2 HFF 第一代第 3 天



A:加入小鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体细胞呈阳性表达[箭头所指为 Vimentin 阳性表达(棕红色)];B:PBS 代替一抗未见 vimentin 表达;C:加入小鼠抗人 CK19 单克隆抗体细胞阴性表达;D:PBS 代替一抗 CK19 阴性表达。

图 3 HFF vimentin 及 CK19 表达情况(光学显微镜 $\times 100$)



A:HFF 成骨诱导 21 d 后进行茜素红染色阳性(箭头所指);B:HFF 成脂诱导 21 d 后油红 O 染色呈阳性;C:HFF 成软骨诱导 21 d 后阿利辛蓝染色阳性。

图 4 HFF 多向诱导分化($\times 100$)

2.2 Vimentin 和 CK19 的表达 细胞免疫化学法检测真皮成纤维细胞特异性标志物 Vimentin 表达阳性,对照组为阴性,HFF 不表达表皮细胞特异性标志物 CK19,见图 3。

2.3 体外诱导 HFF 细胞向成骨、成脂、成软骨细胞分化 向成骨方向诱导:成骨诱导 1 周可见钙盐及钙结节出现,随着诱导时间延长,钙盐沉积增加。诱导培养至 3 周末进行茜素红染色可见细胞外基质中存在大量钙结节(图 4A)。向成脂方向诱导中:成脂诱导中细胞体积逐渐变大,至 1 周左右出现小脂滴,随着诱导时间延长脂滴增多,3 周末出现脂肪细胞,油红 O 染色阳性(图 4B)。向成软骨诱导:见细胞团块由之前的 2 mm 增加至 3.5 mm 左右,经包埋、切片,阿利辛蓝染色阳性(图 4C)。

3 讨 论

骨折是最简单最常见的骨创伤,其最常见的愈合过程经血肿形成期、纤维骨痂形成期、骨性骨痂形成期、改造塑形期几个阶段,成纤维细胞参与骨折愈合的全过程,发挥了极其重要的作用^[4]。并且,在骨折愈合后骨断端却没有瘢痕形成,不存在成纤维细胞,因此有学者推断成纤维细胞有可能分化成了骨细胞,成纤维细胞可能也具备多向分化潜能。

成纤维细胞起源于间充质细胞,主要存在于体内疏松结缔组织中,广泛分布于人体,在组织创伤修复中起主要作用。成纤维细胞取材方便,体外培养增殖能力强,不易老化,被视为有效且数量大的“种子细胞库”^[5]。以往的观点认为成纤维细胞是终末分化细胞,不具备多向分化潜能,科学家们将成纤维细胞作为种子细胞,利用导入基因的方法产生诱导多能干细胞。2007 年 Okita 等^[6]、Yu 等^[7]分别将 Sox2、Klf4、c-Myc、Oct4 基因和 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 基因导入真皮成纤维细胞,成功诱导出多能干细胞,此后众多科学家将不同的基因组合导入成纤维细胞,添加不同试剂,使多能干细胞转化率和有效性明显提高^[8]。目前对成纤维细胞的认识和应用又达到一个新的层面,Brendel 等^[9]的研究表明,成纤维细胞在一定条件下可以向其他细胞分化,具有多向分化潜能。最近,有更多的学者发现成纤维细胞的多向分化潜能,Chen 等^[10]的报告也表明成纤维细胞能够分化成其他细胞。Yamanaka^[11]的实验也证实成纤维细胞能够向三胚层组织细胞分化。上述实验均已经证明成纤维细胞具有多向分化潜能。因此,当骨折较严重或骨折块缺损时就可以用成纤维细胞诱导分化成骨以取代自体骨或异体骨移植,从而减少手术创伤和排斥反应,目前所面临的问题是成纤维细胞在怎样的环境下可以诱导分化为成骨、成脂、成软骨等细胞,为了探讨这一问题,进行了本实验。

本实验分离出的 HFF 细胞为贴壁生长的长梭型细胞,贴壁 24 h 后以多角形为主,细胞体积较小,贴壁 3 d 以后及传代后体积较大,胞质丰富,胞核清晰,呈漩涡状或鱼群状生长。Vimentin 作为成纤维细胞的相对特异性标志^[12],通过免疫细胞化学法对其鉴定呈阳性表达,而表皮细胞的标志物 CK19 不表达,说明分离出的细胞为成纤维细胞。根据 Heng 等^[13]、tenning 等^[14]、Estes 等^[15]的研究表明成软骨细胞的诱导需要添加地塞米松、TGF- β 、抗坏血酸以及 BMP-6 等。邓丹等^[16]对脂肪来源于干细胞的研究中也提到相关诱导液的添加物,本课题组前期研究中^[17]亦用到诱导培养基。本实验参照干细胞诱导分化研究,进行多向诱导分化。所用诱导培养基均为市场所售,根据说明书具体配制,应用即可。参照干细胞的诱导条件对 HFF 细胞进行 3 周的成骨、成脂和成软骨诱导分化,分别用茜素红、油红 O 和阿利辛蓝进行染色,结果呈阳性,说明培养体系成立,为骨创伤或组织工程修复种子细胞的来源提供了一

定的科学基础。成软骨诱导培养过程中,需注意勿将细胞团块摇散,每次换液前加入 TGF- β 3,成脂诱导过程中注意两种培养基不同成分勿混淆,整个细胞培养过程中严格注意操作,防止污染。

创伤和烧伤是日常生活常见的皮肤损伤,愈合后常留有瘢痕,影响患者功能、美观,造成心理压力。本实验进行了向成骨、成脂、成软骨方向的诱导分化,其他实验也未见诱导成纤维细胞向上皮细胞分化,如果提供特定的微环境,真皮成纤维细胞是否可以向上皮细胞分化。如果可以,皮肤组织损伤则可以达到无瘢痕愈合,为瘢痕的治疗提供新的希望和前景。

参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Usategui A, del Rey MJ, Pablos JL. Fibroblast abnormalities in the pathogenesis of systemic sclerosis[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2011, 7(4): 491-498.
- [3] Hanna J, Saha K, Pando B, et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration[J]. Nature, 2009, 462(7273): 595-601.
- [4] Siddappa R, Fernandes H, Liu J, et al. The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2007, 2(3): 209-220.
- [5] Han X, Han J, Ding F, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells [J]. Cell Res, 2011, 21(10): 1509-1512.
- [6] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells [J]. Nature, 2007, 448(7151): 313-317.
- [7] Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [8] 施昱晟, 顾鸣敏. 诱导多能干细胞的研究现状及应用前景 [J]. 诊断学理论与实践, 2012, 11(3): 312-316.
- [9] Brendel C, Kuklick L, Hartmann O, et al. Distinct gene expression profile of human mesenchymal stem cells in comparison to skin fibroblasts employing cDNA microarray analysis of 9 600 genes[J]. Gene Expr, 2005, 12(4/5/6): 245-257.
- [10] Chen FG, Zhang WJ, Bi D, et al. Clonal analysis of nestin (-) vimentin (+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis [J]. J Cell Sci, 2007, 120 (Pt 16): 2875-2883.
- [11] Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors [J]. Cell Prolif, 2008, 41 Suppl 1: 51-56.
- [12] 杨志明. 组织工程学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 155-158.
- [13] Heng BC, Cao T, Lee EH. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro [J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1152-1167.

面积收缩率大于或等于 90% 时,判断为创面愈合^[6]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。干预前创面面积指标比较,方差不齐时采用单因素方差分析,方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 检验分析。干预后的各项检测指标的组间比较进行重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

干预期间,观察组各时相点创面收缩率均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验第 30 天时,观察组创面达愈合标准。见表 1。

表 1 创面面积收缩率变化情况($\bar{x} \pm s, n=39$)

组别	创面收缩率(%)			
	10 d	20 d	25 d	30 d
观察组	25.71±1.69	51.27±2.79	74.45±3.36	93.33±1.96
对照组	15.02±1.06	32.18±1.29	51.53±1.64	66.76±2.02

3 讨论

溃疡型淋巴结核由于脓腔壁与周围正常组织粘连较重,且与脓腔相连的窦道具有深、长、多的特点,如需完全彻底清除病灶,患者将承受手术范围大、组织损伤程度重、易伤及神经血管等风险,因此临床上一般不主张手术治疗^[7]。目前对溃疡型淋巴结核的治疗多采用早期积极抗结核治疗及全身支持治疗,后期局部脓腔穿刺抽液及腔内注入异烟肼、链霉素等疗法,但此方法因为结核病灶未清除,留有残腔,局部引流不完全,且易合并感染,很难取得满意效果^[8]。

封闭负压吸引技术是一种利用负压吸引装置与医用高分子泡沫材料连接,间歇地或持续地在创面处产生低于大气压的压力,从而促进创面愈合的物理疗法,具有疗效明显、操作简便和成本低廉等优点,在慢性难愈性创面治疗中得以广泛应用^[9]。本研究结果表明,观察组创面收缩率显著高于对照组($P < 0.01$),说明封闭负压吸引技术对溃疡型淋巴结核创面的愈合具有显著的促进作用,其原因在于封闭负压吸引技术对创面及创周组织的血流量和组织缺氧程度的影响不同。郑敏等^[10]在对猪的新鲜和肉芽创面模型研究时发现,持续负压下局部血流量迅速增加,峰值可达到基线血流的 4 倍。同时,封闭负压吸引技术可降低创面氧分压,在创面周围形成局部缺氧环境,迅速诱导血管内皮生长因子 mRNA 的表达^[11],促进血管生长,增加创面血供,利于组织修复。显然,这些因素决定了观察组创面愈合的速度优于对照组。

利福霉素是一种强效抗结核药物,具有高效杀灭结核杆菌的作用。局部使用利福霉素,药物浓度高,可有效杀灭局部组织及渗出物中的结核杆菌,消除炎性反应^[12]。本研究通过观

察创面面积收缩率发现观察组创面愈合的速度明显优于对照组,这说明持续利福霉素溶液冲洗创面,可始终保持药液在创面的有效浓度,持续发挥杀菌作用。反观对照组,创面的利福霉素药液会很快被外层敷料吸附及渗出液稀释,而迅速降低,不能发挥持续的杀菌作用。

综上所述,封闭负压引流和利福霉素联合干预疗法可迅速地增加创面血流量、提高创面血管化程度,减轻炎性反应,显著促进溃疡型淋巴结核创面的愈合,具有广泛的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 田磊,徐宁. 病灶清除加腔内填塞换药治疗脓肿、溃疡型淋巴结核[J]. 临床军医杂志,2009,37(5):884-885.
- [2] Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing [J]. *Curr Opin Cell Biol*,2001,13(2):167-171.
- [3] Fleischmann W, Strecker W, Bombelli M, et al. Vacuum sealing as treatment of soft tissue damage in open fractures[J]. *Unfallchirurg*,1993,96(9):488-492.
- [4] Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, et al. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation [J]. *Ann Plast Surg*,1997,38(6):553-562.
- [5] Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience [J]. *Ann Plast Surg*,1997,38(6):563-576.
- [6] 邓贱晚,王维平. 创面封闭负压引流技术促进伤口愈合的作用机制研究进展 [J]. 中山大学研究生学刊:自然科学、医学版,2004,2(2):1-7.
- [7] 张自鹏,陈绍宗,李学拥,等. 封闭负压引流联合局部给药治疗兔耳缺血性创面的实验研究 [J]. 现代生物医学进展,2011,11(10):1851-1854,1876.
- [8] 彭卫生. 新编结核病学 [M]. 北京:中国医药科技出版社,1994.
- [9] 马玛,朱莉贞,潘毓萱. 结核病学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [10] 郑敏,甘秀妮. 局部氧疗联合封闭负压引流对豚鼠Ⅲ期压疮创面愈合的影响 [J]. 上海交通大学学报:医学版,2012,32(7):911-916.
- [11] 许龙顺,陈绍宗,乔骋,等. 负压对创面血流量的影响 [J]. 第四军医大学学报,2000,21(8):976-978.
- [12] 莫晨玲. 利福霉素钠胸腔内注射治疗结核性胸膜炎疗效观察 [J]. 实用新医学,2009,10(8):321-322.

(收稿日期:2013-09-20 修回日期:2013-10-24)

(上接第 149 页)

- [14] Hennig T, Lorenz H, Thiel A, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6 [J]. *J Cell Physiol*,2007,211(3):682-691.
- [15] Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult

stem cells by bone morphogenetic protein 6 [J]. *Arthritis Rheum*,2006,54(4):1222-1232.

- [16] 邓丹,刘伟,曹谊林. 脂肪来源于细胞的特性鉴定 [J]. 组织工程与重建外科杂志,2009,5(5):295-297.
- [17] 王达利,朱晶晶,邓呈亮,等. 人瘢痕疙瘩来源于细胞的生物学特性鉴定 [J]. 中华烧伤杂志,2011,27(3):210-214.

(收稿日期:2013-09-19 修回日期:2013-11-02)