

人鼻腔纤毛上皮细胞的浸没培养*

矫健^{1,2} 孟娜^{1,2} 张罗^{1,2}

[摘要] 目的:浸没培养法培养人鼻腔纤毛上皮细胞,为纤毛相关研究及经鼻药物安全性评价等研究提供可靠的细胞学模型。方法:采用低温酶消化法,浸没培养人鼻腔纤毛上皮细胞,倒置相差显微镜观察细胞生长状况,扫描电镜及免疫细胞化学方法观察细胞融合及纤毛分化状态,高速数字化显微视频成像系统检测纤毛摆动频率。结果:①相差显微镜下,纤毛细胞数量逐渐增加,至 7~10 d 达到高峰后逐渐减少,纤毛细胞存活时间维持在 14~21 d;②细胞培养第 7 天,扫描电镜可见鼻腔上皮细胞表面覆盖纤毛或微绒毛,杯状细胞及无纤毛柱状上皮细胞相间排列;③细胞培养第 7 天,IV 型 β-微管蛋白、闭合小环蛋白-1 免疫荧光结果显示细胞融合及纤毛分化良好,纤毛细胞比例可达 20%~30%;④培养第 7、14、21 天纤毛摆动基础频率分别为(10.73±2.15)Hz、(9.92±1.97)Hz、(10.30±2.11)Hz,无明显统计学差异;⑤外源性刺激剂 100 μmol/L ATP 可明显增加纤毛摆动频率。结论:应用酶消化法浸没培养人鼻腔纤毛上皮细胞,细胞融合及纤毛分化状态良好,纤毛摆动活跃,对外源性刺激反应灵敏,是应用于纤毛相关研究及经鼻药物安全性评价等研究的一个较为理想的细胞模型。

[关键词] 人;鼻腔;纤毛;上皮细胞;细胞培养

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.018

[中图分类号] R765 **[文献标志码]** A

Submerged culture of human nasal ciliated epithelial cells

JIAO Jian^{1,2} MENG Na^{1,2} ZHANG Luo^{1,2}

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100730, China; ²Key Laboratory of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Ministry of Education, Beijing Institute of Otolaryngology)

Corresponding author: ZHANG Luo, E-mail:luozhang@trhos.com

Abstract Objective: To culture human nasal ciliated epithelial cells in a submerged fashion so as to establish a reliable cell culture model for research about cilia and safety evaluation of intranasal drugs. **Method:** We cultured the human nasal ciliated epithelial cells by low-temperature enzymatic digestion in a submerged fashion. And we observed the cell growth state under the inverted phase-contrast microscopy and the confluence and differentiation of ciliated cells by scanning electron microscopy and immunocytochemistry. At last we measured the ciliary beat frequency (CBF) of cultured epithelial cells by high-speed digital microscopic imaging system. **Result:** ① Under phase contrast microscopy, the number of ciliated cells increased with time, reached the maximum at 7-10 day, then decreased, and the survival time of ciliated epithelial cells maintained for 14-21 d; ② Under scanning electron microscopy at day 7, the cilia and small microvilli were observed to be covered on the surface of nasal ciliated epithelial cells at, and goblet cells and nonciliated columnar cells arranged alternately; ③ At day 7, Immunofluorescence of β-tubulin IV and ZO-1 showed a good confluence and differentiation of cilia, and the percentage of ciliated epithelial cells accounted for 20% - 30%; ④ Basal CBF of cultured epithelial cells was (10.73±2.15) Hz, (9.92±1.97) Hz, (10.30±2.11) Hz at day 7, 14 and 21, respectively, which showed no significant difference among them; ⑤ ATP, an exogenous stimulating agent, significantly increased the CBF of cultured epithelial cells at the concentration of 100 μmol/L. **Conclusion:** Human nasal epithelial cells cultured with enzymatic digestion in a submerged fashion manifest with good confluence and differentiation status, active cilia beat and sensitive response to exogenous stimuli. Therefore, it may serve as an ideal cell model for cilia-related research and safety evaluation of intranasal drugs.

Key words human; nasal cavity; cilia; epithelial cells; cell culture

* 基金项目:国家杰出青年科学基金(No:81025007);国家自然科学基金(No:81100704);北京市自然科学基金重点项目(No:7131006);北京市科技新星计划(No:Z111107054511061);高等学校博士学科点专项科研基金(No:20111107120004);首都卫生发展科研专项(No:2011-1017-03);卫生部 2012 年度公益性行业科研专项(No:201202005);北京市卫生系统高层次卫生技术人才学科带头人基金(No:2009-02-007)

¹首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科(北京,100730)

²北京市耳鼻咽喉科研究所 教育部耳鼻咽喉科学重点实验室

通信作者:张罗, E-mail:luozhang@trhos.com

鼻腔黏液纤毛传输系统(mucociliary transport, MT)是人体重要的机械防御机制,也是呼吸道防御系统的第一道防线,主要由呼吸道表面的黏液毯及其下方的纤毛上皮层组成。纤毛通过周期性的协同摆动为表面的黏液运动提供动力,将附着于黏液的异物颗粒、细菌和坏死细胞碎屑等排出呼吸道,从而维持呼吸道的干净通畅。黏液纤毛传输系统功能障碍与多种呼吸系统疾病发病密切相关,如慢性鼻窦炎、哮喘等^[1],深入研究鼻腔黏液纤毛传输系统病理生理机制对相关疾病的诊疗具有重要意义。

经鼻给药作为一种无创给药途径近年来受到广泛关注,其优点为操作简便、药物起效迅速、无首过代谢、患者耐受性好等^[2],是临床上多种鼻用药物、某些全身性疾病治疗用药、流感疫苗等类型疫苗的常用给药途径,还可作为中枢神经系统用药通路^[3]。经鼻药物的安全性是药物的研发和使用过程中一个重要参数,药物对鼻腔黏液纤毛传输系统可能产生的影响,特别是对纤毛运动的抑制作用,是鼻用药物安全性评价的一个重要指标。因此,建立一种简单有效的纤毛细胞体外培养模型,对于深入研究黏液纤毛传输系统及评价经鼻药物安全性等具有重要意义。本实验应用低温酶消化法,建立人鼻腔纤毛上皮细胞浸没培养体系,并对培养细胞的生长状态、形态及功能进行鉴定,旨在为纤毛相关研究及经鼻药物纤毛毒性评价等研究提供良好的技术平台。

1 材料与方法

1.1 实验材料

标本来源:人鼻腔钩突和下鼻甲黏膜,取自首都医科大学附属北京同仁医院鼻科住院接受鼻内镜手术的慢性鼻窦炎患者。主要试剂:DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM/F12(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F12), HBSS(Hanks' balanced salt solution)平衡盐溶液和抗生素购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Hyclone 公司;人胎盘胶原(human placental collagen)、蛋白酶 XIV 型(protease, type XIV)、IV 型 β -微管蛋白(β -tubulin IV)抗体购自美国 Sigma 公司;支气管上皮细胞培养液(Bronchial Epithelial Cell Growth Medium, BEGM)及细胞因子(BEGM SingleQuots)套装购自美国 Lonza 公司;闭合小环蛋白-1(zona occludens-1, ZO-1)抗体购自美国 Invitrogen 公司;DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)购自中国碧云天生物技术研究所;其他试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 人鼻腔纤毛上皮细胞培养

无菌条件下取人鼻腔钩突和(或)下鼻甲黏膜,在加有抗生素的 HBSS 中冲洗 3 遍,每次 10 min,

置于消化液(DMEM, 0.05% protease)中,4℃ 消化过夜,5% FBS 终止消化后震荡分离上皮细胞,1000 r/min、5 min 离心收集上皮细胞,加有抗生素的 DMEM/F12 : BEGM(1 : 1)培养液重悬细胞,细胞悬液移入塑料培养皿中 37℃ 孵育 1 h,以移除成纤维细胞,以 5×10^5 /ml 密度将细胞接种于四孔培养板中预铺有人胎盘胶原的盖玻片上,加入培养液(DMEM/F12 : BEGM 1 : 1, 100 IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)中,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 换液 1 次。

1.3 扫描电镜观察

将培养 7 d 的人鼻腔上皮细胞用 2.5% 的戊二醛固定,由中国医学科学院基础医学研究所电镜室常规电镜标本制作,JEOL JSM-6000F 型扫描电镜下拍摄照片,观察细胞形态及分化情况。

1.4 免疫细胞化学染色

将培养的人鼻腔上皮细胞用甲醇 : 丙酮(1 : 1)固定,PBS 冲洗 3 次,穿膜液 0.3% Triton X-100 室温作用 5 min,5% 脱脂奶粉室温孵育 20 min 以封闭非特异性抗原;加入一抗(小鼠来源 β -tubulin IV 抗体 1 : 500 稀释,兔来源 ZO-1 抗体 1 : 100 稀释),4℃ 冰箱孵育过夜;滴加二抗(1 : 800 羊抗小鼠 FITC, 1 : 500 羊抗兔 Rhodamine)37℃ 避光孵育 40 min;DAPI 复染细胞核,贴片,封固,使用 Olympus IX 81 共聚焦显微镜照相,获得染色结果。

1.5 纤毛摆动频率测定

按照 Jiao 等^[4]的方法测量纤毛摆动频率,室内温度保持在(25±1)℃,将盖玻片取出,放置在特定的加药槽内,应用日本 Olympus 倒置相差显微镜观察纤毛上皮细胞图像,高速 CCD 摄像机(TM-6710, 美国 Pulnix 公司)捕捉相差图像,输入小型计算机工作站,采样速度 240 帧/s。采用特定的软件系统 IPLab V4.0 对图像进行处理分析,播放连续的数字化图像,选取对比度清晰的纤毛运动测量点(region of interest, ROI),由计算机软件获得连续数字化图像中固定 ROI 的灰度值(大小为 3×3 像素),然后在 Excel 软件中绘制灰度值与连续图像的对应曲线,特定的频率计算器软件计算每秒纤毛摆动频率。

1.6 统计学方法

应用 Prism 4.0 统计软件,实验结果采用均数±标准误表示。图 3 统计学方法采用单因素方差分析,组间比较采用 Bonferroni 检验;图 4 统计学方法采用重复测量方差分析,组间比较采用 Bonferroni 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养的人鼻腔上皮细胞生长状态及细胞融合、纤毛分化情况

倒置相差显微镜下,接种的人鼻腔上皮细胞种

植于铺有人胎盘胶原的盖玻片上,24 h 后大部分细胞均可贴壁,48 h 后即可见纤毛细胞生长且纤毛摆动活跃,随后数天上皮细胞增殖旺盛,逐渐生长融合呈多角形铺路石样外观,纤毛细胞数量也逐渐增加,摆动活跃,频率稳定。培养 7~10 d,纤毛细胞数量达到高峰,而后开始逐渐减少,纤毛细胞存活时间维持在 14~21 d。

细胞培养第 7 天,扫描电镜可见部分鼻腔上皮细胞表面覆盖纤毛或微绒毛,杯状细胞及无纤毛柱状上皮细胞相间排列(图 1a、b)。

培养至第 7 天的上皮细胞行免疫荧光细胞化学染色,红色荧光代表经 ZO-1 抗体染色后相邻上皮细胞间的紧密连接,其勾勒出细胞边界,显示细胞融合良好。绿色荧光为经抗 β -tubulin IV 抗体染色后的纤毛,显示纤毛分化状态,蓝色荧光为 DAPI 染色显示细胞核,计数后纤毛细胞比例在 20%~30%(图 2)。此外,细胞培养体系中杯状细胞比例大概在 5%~10%,非纤毛上皮细胞占 60%~70%。

2.2 体外培养的人鼻腔上皮细胞纤毛摆动基础频率及对外源性刺激剂反应性

分别在细胞培养的第 7、14、21 天随机选取 10 个人鼻腔纤毛上皮细胞培养体($n=10$),每个细胞培养体随机录制 10 个纤毛摆动频率影像(240 帧/s,每次录制 3 s),取其算术平均数即为该天数的纤毛摆动基础频率。如图 3 所示,在接种的第 7、14、21 天纤毛摆动基础频率分别为(10.73±2.15)Hz、(9.92±1.97)Hz、(10.30±2.11)Hz,各个时间点间无明显统计学差异。

纤毛摆动除以基础频率自发性摆动外,受到各种生理刺激后的应激性摆动也是反映其功能的一个重要性指标。ATP 是公认的纤毛摆动的强刺激剂,因此本实验中我们选用 100 μ mol/L ATP 作用于培养的人鼻腔上皮细胞,分别检测加药前纤毛摆动基础频率及加药 1、2、3、4、5 min 纤毛摆动频率,结果显示 ATP 作用后 1、2、3、4、5 min 纤毛摆动频率分别增加为加药前基础频率的(147.5±40.1)%、(155.3±

40.6)%、(156.2±42.1)%、(155.6±40.0)%、(153.0±44.6)%,各个时间点纤毛摆动频率较加药前均有明显增加。同时选用 HBSS 作为对照,用以排除加药时的机械刺激对纤毛摆动频率影响,结果显示 HBSS 作用 1~5 min,纤毛摆动频率分别为加药前的(103.1±5.7)%、(101.0±3.7)%、(96.5±6.1)%、(96.6±3.0)%、(96.2±4.8)%,各个时间点较加药前均无明显变化,证实加药刺激本身对纤毛摆动无明显影响(图 4)。

3 讨论

纤毛上皮细胞的体外培养是呼吸生理学基础研究及纤毛相关疾病临床应用研究的重要方法之一,对于研究呼吸道黏膜的生理学、病理学、免疫学及相关疾病的发病机制、病理生理变化及评价外源性感染、药物等对呼吸道上皮的影响等都是极为重要的手段。呼吸道上皮细胞体外培养的主要目标是尽可能地保持在体呼吸道上皮细胞的组成、形态及生化特性^[5],主要的体外培养方法包括组织块培养法和酶消化培养法^[6]。

组织块培养法是较早建立的呼吸道上皮细胞培养体系之一,通常将组织标本剪切成体积小于 1 mm³的组织块,接种于铺被或者未铺被基质的塑料支持物中进行培养。其优点是重复性高,培养的细胞组成与体内相似度高,并且上皮细胞的纤毛活性能够维持较长时间;缺点是培养的细胞成分复杂,尤其是掺杂的一些非上皮细胞会使某些实验结果难以解释,此外该方法较酶消化法操作复杂,耗时较长^[5-6]。尽管不如酶消化法应用普遍,组织块培养法也是一种比较理想、常用的呼吸道上皮细胞培养模型,目前多用于研究上皮细胞对病原体 and 过敏原反应性以及变应性鼻炎上皮屏障功能等^[7]。我室在前期研究工作中已经成功建立兔气管和人鼻腔纤毛上皮细胞的组织块培养体系,得到分化良好的纤毛细胞,纤毛摆动活跃,为深入研究黏液纤毛传输系统功能及鼻内用药对纤毛清除功能的影响提供了良好的方法和途径^[8,9]。

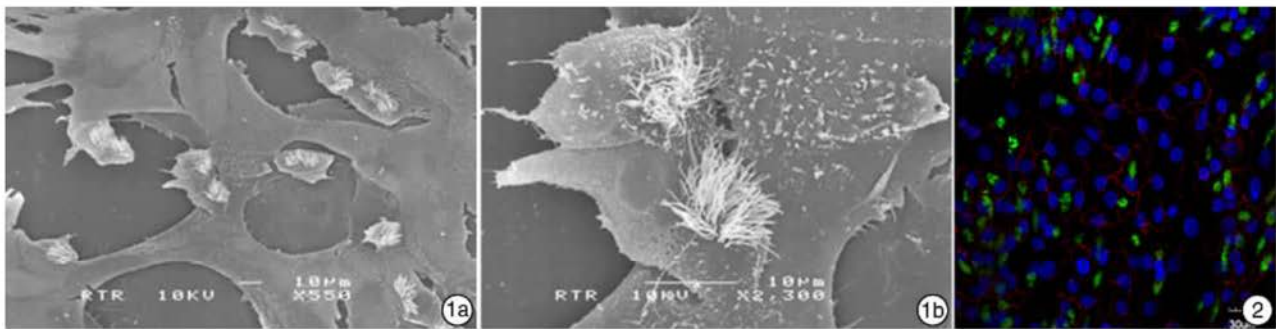


图 1 培养 7 d 的人鼻腔上皮细胞扫描电镜图像 1a:×550,1b:×2 300; 图 2 培养 7 d 的人鼻腔上皮细胞共聚焦图像 红色、绿色、蓝色荧光分别展示细胞紧密连接、纤毛分化及细胞核状态。

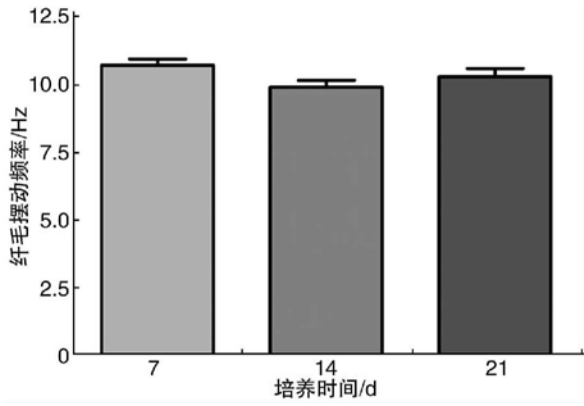
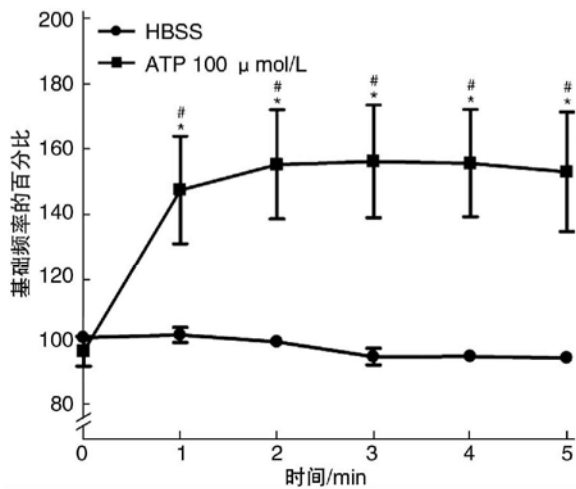


图 3 培养 7、14、21 d 的人鼻腔上皮细胞纤毛摆动基础频率 (n=10)



代表各个时间点 HBSS 和 ATP 作用两组间纤毛摆动频率变化值有统计学意义; * 代表 ATP 作用后各个时间点纤毛摆动频率变化值较用药前有统计学意义。

图 4 ATP 对体外培养的人鼻腔上皮细胞纤毛摆动的影响 (n=6)

酶消化培养法是目前最为常用的纤毛上皮细胞培养方法,其中以浸没贴壁培养(submerged adherent culture)和气液界面贴壁培养(air-liquid interface adherent culture, ALI adherent culture)两种方法应用尤为普遍。酶消化培养法的基本原理是用蛋白酶(protease)或者链霉蛋白酶(pronase)消化分散组织,形成单个细胞或细胞团后用于细胞培养,通常采用低温酶消化能够较好地保持细胞活性。酶消化法可以快速有效分离组织获得大量细胞及细胞团,有助于培养细胞的快速增殖;可以通过优化细胞培养技术如采用预贴壁法及无血清培养技术减少成纤维细胞的数量从而获得单纯的上皮细胞群体;此外,这种方法相对组织块培养法操作简单,因此被广泛应用。浸没培养与气液界面培养是相对而言的,浸没培养是将培养物完全浸入培养液中,细胞所需营养可以从细胞层的两面即细胞表面和细胞基底面来供给;而气液界面培养是在细

胞浸没培养形成单细胞融合后(通常 7~10 d),将细胞表面的培养液移去,将细胞置于气液界面继续培养,气液培养需要使用带有多微孔膜的通透性支持物培养细胞,通透性支持物可以有效改善极性细胞的培养,因为这些支持物允许细胞从其基底面和顶面分泌和吸收分子,从而以更为自然的方式进行代谢;同时提高了细胞的分化水平,使得体外生长的细胞在形态和功能上更为接近体内的细胞。气液培养可以满足多种特殊需要细胞功能研究比如转导和渗透性研究、细胞极性、胞吞作用、药物运输、转移潜力和侵袭、趋药性/动力研究及共培养研究等,因为在通透性支持物上生长的细胞可以很方便且无干扰地接近其基底面和顶面的细胞膜结构。气液界面培养法目前被认为是呼吸道上皮细胞培养的“金标准”^[6]。

比较两种培养技术,气液界面培养可以更好地模拟在体上皮细胞生长状态,培养的上皮细胞形态、分化状况及生物学特性更接近在体,但是,细胞培养技术较浸没培养操作复杂,细胞增殖慢,细胞生长周期长,且需要特殊的培养材料。浸没培养的上皮细胞不能很好地反映上皮细胞天然体征,且黏液纤毛分化状态受到一定抑制,上皮细胞纤毛随培养时间延长逐渐减少,但是细胞增殖快,细胞之间连接紧密,且操作较为简便,不需要特殊的培养材料,因此能够满足除特殊需要如运输、吸收和分泌等细胞功能研究外的多种呼吸道上皮细胞相关研究需求。两种培养技术各有优劣,互为补充,可满足不同的研究需求。

研究表明,体外培养上皮细胞的增殖及分化状态受细胞分离条件(消化酶种类及消化条件)、培养液成分(培养液种类,生长因子及激素等添加剂)、细胞支持底物、细胞接种密度等诸多条件影响,在本实验中,我们优化了浸没培养的实验条件,采用 0.05%蛋白酶低温消化,人胎盘胶原作支持底物,DMEM/F12 : BEGM(1 : 1)加细胞因子添加剂无血清培养等培养条件,培养的上皮细胞融合及纤毛分化状态良好,培养第 7 天的上皮细胞纤毛密度可达 20%~30%,纤毛细胞存活时间能够维持 14~21 d;纤毛摆动活跃,基础频率维持在 10 Hz 左右,这与成体呼吸道上皮细胞纤毛摆动频率 9~15 Hz 非常接近,并且纤毛对外源性刺激药物反应灵敏,说明经该方法培养的纤毛细胞分化、形态及功能状态良好,可以满足纤毛相关实验尤其是鼻用药物安全性评价等多种实验需求。

综上所述,本实验中我们成功建立了人鼻腔上皮细胞的浸没培养体系,为纤毛相关疾病深入研究及药物安全性评价等实验需求提供了一个简便可靠的细胞培养技术平台。结合组织块培养、气液界面培养等多种体外培养技术,将满足呼吸道生理

白细胞介素-24 对喉癌细胞的增殖抑制效应及机制*

王睿¹ 王郡甫² 刘娣³ 苏庆红² 周鹏² 陈雪梅⁴ 许晓群²

[摘要] 目的:研究腺病毒介导的人白细胞介素-24(Ad-mda-7/IL-24)基因对喉癌细胞 Hep-2 增殖抑制效应及机制。方法:将携带有 hIL-24 基因的重组复制缺陷型腺病毒(Ad-hIL-24)感染喉癌细胞 Hep-2,并以正常人脐静脉内皮细胞 HUVEC 为对照,采用 RT-PCR 方法检测 Hep-2、HUVEC 细胞中外源性 hIL-24 表达,以及 Bcl-2 和 Bax 的变化;采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞的生长和凋亡情况。结果:腺病毒介导的 hIL-24 mRNA 能在 Hep-2 细胞和 HUVEC 细胞中表达;在 Hep-2 细胞中,抗凋亡分子 Bcl-2 表达降低,而促凋亡分子 Bax 表达增强;在 HUVEC 细胞中 Bcl-2 表达没有变化,Bax 表达有所增强。MTT 法显示 Ad-hIL-24 能明显抑制喉癌细胞 Hep-2 的生长。在 Hep-2 细胞中,显微镜下可见明显的细胞凋亡。结论:Ad-hIL-24 能抑制喉癌细胞 Hep-2 生长和诱导 Hep-2 细胞凋亡,但对正常细胞无毒性作用。

[关键词] 白细胞介素-24;腺病毒;喉癌细胞;凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.12.019

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

The inhibitory effect of interleukin-24 on the proliferation of laryngeal cancer cells and its mechanism

WANG Rui¹ WANG Junfu² LIU Di³ SU Qinghong²
ZHOU Peng² CHEN Xuemei⁴ XU Xiaoqun²

(¹Department of Neurosurgery, Heze Municipal Hospital, Heze, 274000, China; ²Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences; ³Laboratory Medicine, Tengzhou Central People's Hospital; ⁴Department of Otolaryngology, the Second Hospital of Shandong University)

Corresponding author: CHEN Xuemei, E-mail: chxmsd@163.com; XU Xiaoqun, E-mail: xuxiaoqunsd@163.com

* 基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(No:BS2009SW007);山东省自然科学基金(No:ZR2010CM067, ZR2009CM036, ZR2012HL23);山东省大型科学仪器升级改造技术研究专项(No:2013SJGZ09)

¹菏泽市立医院神经外科(山东菏泽,274000)

²山东省医学科学院基础医学研究所

³滕州市中心人民医院检验科

⁴山东大学第二医院耳鼻咽喉科

通信作者:陈雪梅, E-mail: chxmsd@163.com;

许晓群, E-mail: xuxiaoqunsd@163.com

学、病理学,药物筛选及毒理学研究等众多领域的研究需求。

参考文献

[1] ANTUNES M B, GUDIS D A, COHEN N A. Epithelium, cilia, and mucus: their importance in chronic rhinosinusitis[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2009, 29: 631-643.

[2] COSTANTINO H R, ILLUM L, BRANDT G, et al. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects[J]. Int J Pharm, 2007, 337: 1-24.

[3] ILLUM L. Nasal drug delivery: new developments and strategies [J]. Drug Discov Today, 2002, 7: 1184-1189.

[4] JIAO J, WANG H, LOU W, et al. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide signaling pathway in mouse nasal and tracheal epithelial cells[J]. Exp Cell Res, 2011, 317: 2548-2553.

[5] DIMOVA S, BREWSTER M E, NOPPE M, et al.

The use of human nasal in vitro cell systems during drug discovery and development[J]. Toxicol In Vitro, 2005, 19: 107-122.

[6] BUKOWY Z, ZIETKIEWICZ E, WITT M. In vitro culturing of ciliary respiratory cells—a model for studies of genetic diseases[J]. J Appl Genet, 2011, 52: 39-51.

[7] LIU Z, LU X, WANG H, et al. Group II subfamily secretory phospholipase A₂ enzymes: expression in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps [J]. Allergy, 2007, 62: 999-1006.

[8] 王奎吉, 张罗, 韩德民, 等. 呼吸道纤毛上皮细胞的组织块法培养[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13(12): 833-837.

[9] 宋晓红, 张罗, 韩德民, 等. 鼠尾胶原为底物的人鼻腔纤毛上皮细胞培养模式的建立[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14(2): 107-111.

(收稿日期:2013-06-21)