

[文章编号] 1000- 4718(2005)04- 0636- 06

# 诱导人卵黄囊间质干细胞向成骨细胞及神经细胞定向分化\*

那晓东<sup>1</sup>, 余伟华<sup>1</sup>, 赵自平<sup>2</sup>, 朱美玲<sup>3</sup>, 钟小英<sup>4</sup>, 雷俊霞<sup>1</sup>, 宋新民<sup>5</sup>,  
黄春浓<sup>5</sup>, 张秀明<sup>1</sup>, 李艳<sup>1</sup>, 项鹏<sup>1</sup>, 李树浓<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup>中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080; <sup>2</sup>中南大学湘雅三医院骨科, 湖南 长沙 410013;

<sup>3</sup>深圳市宝安区血站, 广东 深圳 510020; <sup>4</sup>广东省计划生育研究所, 广东 广州 510600;

<sup>5</sup>中山大学中山医学院遗传学教研室, 广东 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 分离纯化及体外定向诱导人卵黄囊间质干细胞 (hYS- MSC) 分化为成骨细胞及神经细胞。方法: 卵黄囊细胞经贴壁培养、传代纯化得到 hYS- MSC, 检测其表面抗原表达, 对其进行核型分析、细胞周期检测并测定 AKP 活性; 采用地塞米松、 $\beta$ - 甘油磷酸钠、维生素 C 作成骨诱导剂,  $\beta$ - 巯基乙醇或复方丹参注射液作为神经诱导剂诱导 hYS- MSC 向成骨细胞及神经细胞定向分化。组织化学方法作成骨检测; 免疫组化方法检测 NSE、NF 及 GFAP 在神经诱导 hYS- MSC 中的表达。结果: hYS- MSC 易于纯化, 在培养过程中保持正常核型, 具有较大增殖能力。hYS- MSC CD29、CD44、CD166 及 CD105 表达阳性, CD34、CD45 和 CD86 为阴性; AKP 弱阳性。hYS- MSC 经成骨诱导 AKP 强阳性, 诱导两周后形成钙盐沉积形成的矿化区。hYS- MSC 经神经诱导可见 NSE、NF 或 GFAP 阳性细胞, 符合神经元及胶质细胞的生物学特征。结论: hYS- MSC 在体外培养过程中具有较大增殖能力并保持正常核型, 与成体 MSC 表型一致, 在体外可以诱导分化为成骨细胞、神经元及胶质细胞。

**[关键词]** 干细胞; 胎儿发育; 分化; 成骨细胞; 神经元

**[中图分类号]** R363

**[文献标识码]** A

## Osteogenic and neurogenic differentiation of human yolk sac mesenchymal stem cells

NA Xiao- dong<sup>1</sup>, YU Wei- hua<sup>1</sup>, ZHAO Zi- ping<sup>2</sup>, ZHU Mei- ling<sup>3</sup>, ZHONG Xiao- ying<sup>4</sup>,  
LEI Jun- xia<sup>1</sup>, SONG Xin- min<sup>5</sup>, HUANG Chun- nong<sup>5</sup>, ZHANG Xiu- ming<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>,  
XIANG Peng<sup>1</sup>, LI Shu- nong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathophysiology, Sun Yat- sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; <sup>2</sup>Department of Orthopaedics, The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China; <sup>3</sup>Baoan Blood Center, Shengzhen 510020, China; <sup>4</sup>Family Plannig Research Institute of Guangdong, Guangzhou 510600, China; <sup>5</sup>Department of Genetics, Sun Yat- sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To purify human yolk sac mesenchymal stem cells (hYS- MSC) and investigate its osteogenic and neurogenic differentiation potentials. **METHODS:** hYS- MSC were separated from yolk sac and purified via passage culture. The karyotype of hYS- MSCs was analyzed via G- banded characteristics. Flow cytometric analysis was used to determine the cell cycle and phenotype of hYS- MSC. The AKP expression of hYS- MSC was also tested. Osteogenic differentiation of hYS- MSCs was induced by  $10^{-8}$  mol/L dexamethasone, 10 mmol/L  $\beta$ - glycerophosphate and 50 mg/L vitamin C. Alizarin red S stain was used for

[收稿日期] 2003- 09- 22 [修回日期] 2003- 11- 25

\* [基金项目] 国家重点基础研究项目资助 (No. 2001CB509904); 国家自然科学基金资助项目 (No. 30200064, No. 30400225); 广东省科技计划项目资助 (No. 2001A3020101); 广东省自然科学基金资助项目 (No. 04300227) 广州市科技攻关重大项目 (No. 2002U13E0011); 中国博士后科学基金资助项目 (No. 2003033427)

△通讯作者 Tel: 020- 87331621; E- mail: snli@gzsums.edu.cn

dentification of mineralization.  $\beta$ - mercaptoethanol or salviae miltiorrhizae were used to induce neurogenic differentiation of hYS- MSCs. The expressions of NSE, NF and GFAP were identified by immunohistochemical method. **RESULTS:** hYS- MSCs could be purified at passages 2 or 3. The cell cycle analysis suggested that hYS- MSCs showed strong proliferational potentials by which the cells kept normal diploid karyotype during the *in vitro* culture. Flow cytometry showed the phenotype of purified hYS- MSCs was uniformly positive for CD29, CD44, CD105, and CD166, and negative for reactivity to antigens CD34, CD45, or CD86. hYS- MSCs were weakly but clearly positive in AKP. Osteogenic differentiation was appeared after induction of osteogenic differentiation. hYS- MSCs, which were of spindle shape, uniform in size, were induced to pleomorphism osteoblast- like cells which expressed high level of AKP. Aggregates or nodules were formed at day 7 and calcium accumulation was detected by alizarin red S staining on day 10 or day 14. Neurogenic differentiation of hYS- MSCs was induced by  $\beta$ - mercaptoethanol or salviae miltiorrhizae. NSE, NF or GFAP positive cells were detected by immunohistochemical staining. **CONCLUSIONS:** hYS- MSCs have strong proliferation potential and the normal diploid karyotype is kept during the *in vitro* culture. The phenotype of hYS- MSCs is coincident with adult hMSCs. hYS- MSCs could be induced to differentiate into osteogenic or neurogenic cells.

[KEY WORDS] Stem cells; Fetal development; Differentiation; Osteoblasts; Neurons

来源于人体不同发育阶段的干细胞均可能成为组织工程研究的种子细胞,如何选择和获取理想的种子细胞是组织工程研究的关键与重点。人胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)虽然具有最大增殖潜能和全能分化能力,但由于其来源受限、目前对其定向分化的调控机制尚未阐明及其应用可能带来的伦理学争议,限制了其作为组织工程研究种子细胞的应用前景;在组织工程研究中发现,成体间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)可在体外培养扩增,并可定向诱导分化为多种组织细胞类型(如骨、软骨、肌肉、肌腱、神经等)<sup>[1-3]</sup>,但成体MSC发育分化接近终末状态,经过一段时间的体外培养后,容易衰老凋亡<sup>[4]</sup>。本室在大鼠和人成体MSC的体外培养过程中,亦观察到随着传代次数增加,MSC的增殖能力和贴壁生长能力减弱,胞体增大、胞浆丰富,以上现象表明成体MSC的增殖能力和自我更新能力有限(待发表资料)。基于以上原因,本研究试图从早期胚胎组织中获取更原始的MSC。在早期胚胎组织中,作为胎膜一部分的卵黄囊,其结构简单<sup>[5]</sup>,细胞成份较为单一,有利于从卵黄囊细胞中获取卵黄囊间质干细胞(human yolk sac mesenchymal stem cell, hYS- MSC),且来源于早期胚胎的卵黄囊细胞不表达主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)相关抗原<sup>[6,7]</sup>,用于异体移植有可能避免免疫排斥反应。本研究对hYS- MSC进行生物学特性检测并诱导其向成骨细胞和神经细胞定向分化,以期组织工程与基因治疗等研究提供理想的细胞来源。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

人卵黄囊取自胚龄4-6周的药物流产胚胎。

### 2 试剂

I型胶原酶、bFGF、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素C、地塞米松及 $\beta$ -巯基乙醇为Sigma公司产品。DMEM培养基(高糖)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶为Gibco公司产品。瑞氏-吉姆萨染色液、抗人神经丝蛋白(neurofilament, NF)、神经元特异烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)及胶质纤维酸性蛋白(gial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆抗体、生物素化二抗SABC试剂盒及DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。茜素红购自温州东升化工试剂厂。荧光标记小鼠抗人抗体CD34 PE、CD45 Percp、CD86 FITC、CD29 PE购自Phamingen公司,CD44 FITC、CD105 PE、CD166 PE购自Ansell公司。

### 3 方法

**3.1 人卵黄囊细胞的分离** 取胎龄4-6周的药物流产胚胎,经消毒后置超净工作台中,显微镜下解剖分离卵黄囊,卵黄囊经0.1%的I型胶原酶消化1h后,4℃低温离心收集卵黄囊细胞。

**3.2 hYS- MSC的纯化与传代培养** 将一个卵黄囊消化得到的细胞(约 $1 \times 10^5$ 个卵黄囊细胞)和15%胎牛血清FBS的DMEM 5 mL种入6孔板中,置37℃,5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度下培养,24h后去除非贴壁细胞,贴壁细胞中加入含5  $\mu$ g/L bFGF的上述培养液继续培养,每3d换液1次,倒置显微镜观察,标记集落密集生长区。至7-10d集落接近亚融合时,用2.5

g/L胰蛋白酶消化并冲洗标记区集落进行传代培养, 每瓶种入  $2 \times 10^5$  个细胞, 每 3- 5 d 传代 1 次。

**3.3 hYS- MSC 的染色体核型分析** 取传代培养的 hYS- MSC (P10) 加入 0.02 mg/L 的秋水仙胺 2- 3 h, 在室温下加入 0.075 mol/L 的 KCl 30 min 低渗处理后, 用醋酸和甲醇的混合液 (3: 1) 处理 30 min 固定, 染色体标本置空气干燥后, 采用胰蛋白酶/G 带法进行核型分析。

**3.4 hYS- MSC 的细胞周期分析** 取生长至亚融合状态的传代细胞 (P10), 细胞经 0.25% 胰酶消化、离心洗涤后重悬于 0.5 mL PBS 中, 加入 70% 乙醇后置于 - 20 °C 固定 18 h。洗涤细胞, 加入 10 g/L RNase 20  $\mu$ L, 37 °C 孵育 30 min 后洗涤细胞, 加入 50 mg/L 碘化丙啶 (PI) 于 4 °C 避光染色 30 min, FACSVantage 检测, 计数 10 000 个细胞, 计算反应增殖活力的增殖指数 [PrI,  $PrI = (S + G_2 + M) \%$ ]。

**3.5 hYS- MSC 的流式细胞仪分析** 用胰酶消化第 10 代 hYS- MSC, 经 PBS 洗涤后重悬细胞, 分别加入荧光标记 CD34、CD45、CD86、CD29、CD44、CD105、CD166 的抗体, 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤细胞, 离心后弃上清去除未标记抗体。重悬细胞, 进行流式细胞仪检测。

**3.6 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 染色** 将成骨诱导前后的 hYS- MSC 爬片置于孵育液 (含 2% 巴比妥钠 2 mL, 3%  $\beta$ - 甘油磷酸钠 2 mL, 2% 氯化钙 4 mL, 5% 硫酸镁 0.2 mL, 蒸馏水 1 mL, pH 9.4) 中, 37 °C 孵育 30 min, 流水冲洗后, 加入 2% 硝酸钴 3 min 后冲洗, 1% 硫化铵 0.5- 1 min, 冲洗后 2% 甲基绿复染, 甘油明胶封片, 镜下观察, 胞浆中棕黑色颗粒示酶活性所在部位。

**3.7 hYS- MSC 的诱导分化** 取第 10 代的 hYS- MSC 制备细胞爬片, 加入含 15% FBS 及成骨诱导剂 ( $10^{-8}$  mol/L 地塞米松、10 mmol/L  $\beta$ - 甘油磷酸钠和 50 mg/L 维生素 C) 的 DMEM 继续培养, 进行成骨诱导; 加入 100 ng/L 的 bFGF 预诱导 24 h, 撤离血清加入 5 mol/L  $\beta$  巯基乙醇 ( $\beta$ - mercaptoethanol,  $\beta$ - ME) 或 1% (V: V) 丹参注射液继续诱导 2 h, 观察细胞形态改变。

**3.8 矿化检测** 分别于成骨诱导培养 3.7 及 14 d 取出细胞爬片以 10% 中性甲醛固定, 蒸馏水洗片, 加入 0.1% 茜素红染色。镜下观察染色呈橙红色结节

部位为矿化区域。

**3.9 免疫组化染色检测 NF、NSE 及 GFAP 的表达** hYS- MSC 加入神经诱导剂培养 2 h 后进行免疫组化检测。细胞经含 1%  $H_2O_2$  的丙酮固定, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 3 次; 2% 正常羊血清封闭 10 min; 分别加入抗人 NF、NSE 及 GFAP 一抗, 4 °C 过夜, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 3 次; 滴加生物素化二抗, 37 °C 20 min; 滴加试剂 SABC, 37 °C 20 min, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 3 次; DAB 显色, 树脂封片, 显微镜观察。

## 结 果

### 1 hYS- MSC 的形态学观察、细胞周期及染色体核型分析

hYS- MSC 培养 1 h 后可见部分细胞贴壁, 2 h 后贴壁完成, 细胞呈梭形, 5- 7 d 可形成由 10- 20 个大小与形状均一的细胞组成的集落, 继续培养, 集落增大, 2 周左右组成集落的细胞增多并可相互融合, 符合间质干细胞的特点 (图 1a)。传代细胞与原代细胞大小形态相似, 核型分析结果显示, 原代及传代培养的 hYS- MSC 均维持正常二倍体核型: 46, XX。无染色体畸变 (图 1b)。细胞周期分析显示, P10 代 hYS- MSC 生长至亚融合状态时, 细胞增殖指数 (PrI) =  $(S + G_2 + M) \%$  为 27.32%, 其中 24.7% 的细胞处于 S 期, 提示 hYS- MSC 是一种增殖能力较强的细胞 (图 2)。

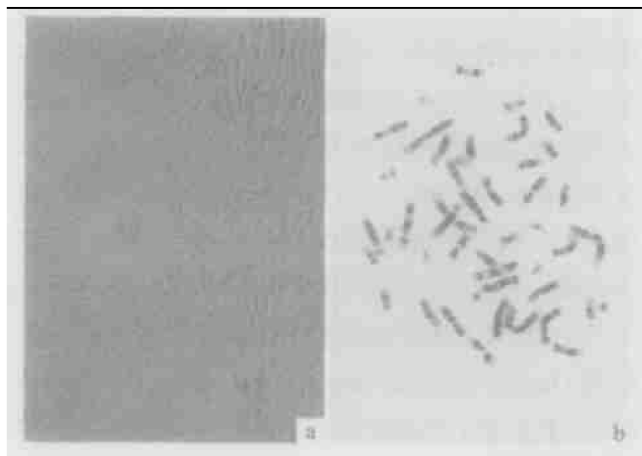


Fig 1 Morphology and G- banded karyotype of pure hYS- MSC. a: morphology of hYS- MSC ( $\times 40$ ); b: G- banded karyotype of hYS- MSC ( $\times 1000$ ).

图 1 纯化卵黄囊间质干细胞及其核型

### 2 hYS- MSC 的表面标记检测

流式细胞仪分析显示: 纯化的 hYS- MSC 为均一

细胞群体,不表达 CD34、CD45 和 CD86;表达 CD29、CD44、CD105 和 CD166。

### 3 hYS- MSC 诱导分化前后的 AKP 活性测定

原代和传代培养 hYS- MSC 的 AKP 染色所形成的阳性颗粒较小、颜色浅,AKP 活性为弱阳性(图 3a);hYS- MSC 经成骨诱导 3 d 后,AKP 活性增高至强阳性(图 3b)。

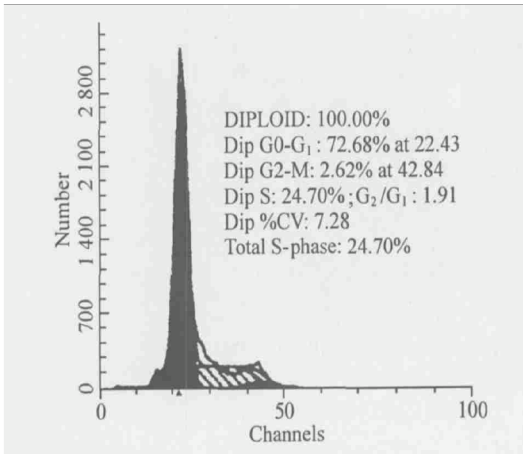


Fig 2 Cell cycle analysis of hYS- MSC (P10).

图 2 卵黄囊间质干细胞(P10)细胞周期分析

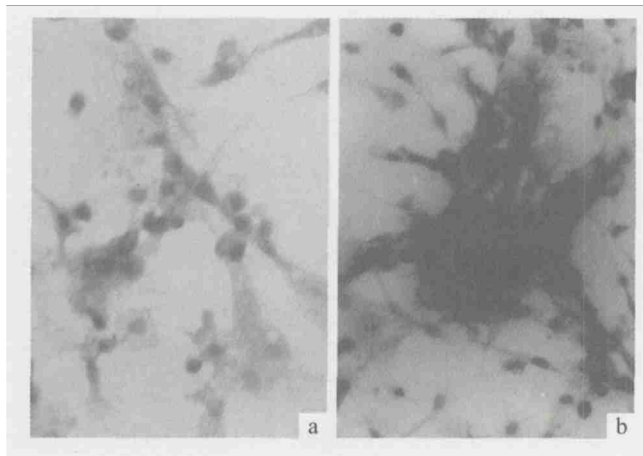


Fig 3 AKP expression of hYS- MSC. a: before induction of osteogenic differentiation; b: 7 d after induction of osteogenic differentiation (Ca-Co histochemical staining,  $\times 100$ ).

图 3 诱导成骨前后卵黄囊间质干细胞 AKP 表达的检测

### 4 hYS- MSC 的多向分化潜能

hYS- MSC 经成骨诱导 3- 5 d 后,部分细胞的细胞体积明显增大,细胞形态由梭形向星形或多角形转化,星形细胞可连接成网形成类骨结节样结构。随着诱导时间延长,类骨结节样结构逐渐增大,诱导 10- 14 d 后,茜素红染色可见细胞外基质中有钙盐

沉积形成矿化区(图 4)。经预诱导 24 h 的 hYS- MSC 加入神经诱导液 30 min 后即可可见细胞形态发生明显改变,大部分细胞胞质向核收缩,胞体变圆,折光性增强,细胞形成细长突起,呈双极或多极,与神经元形态类似,细胞间突起相互连接成网,免疫组化染色为 NSE 及 NF 阳性细胞;亦有少量细胞形成粗长突起,形态由梭形向星形或多角形变化,免疫组化染色为 GFAP 阳性细胞(图 5)。



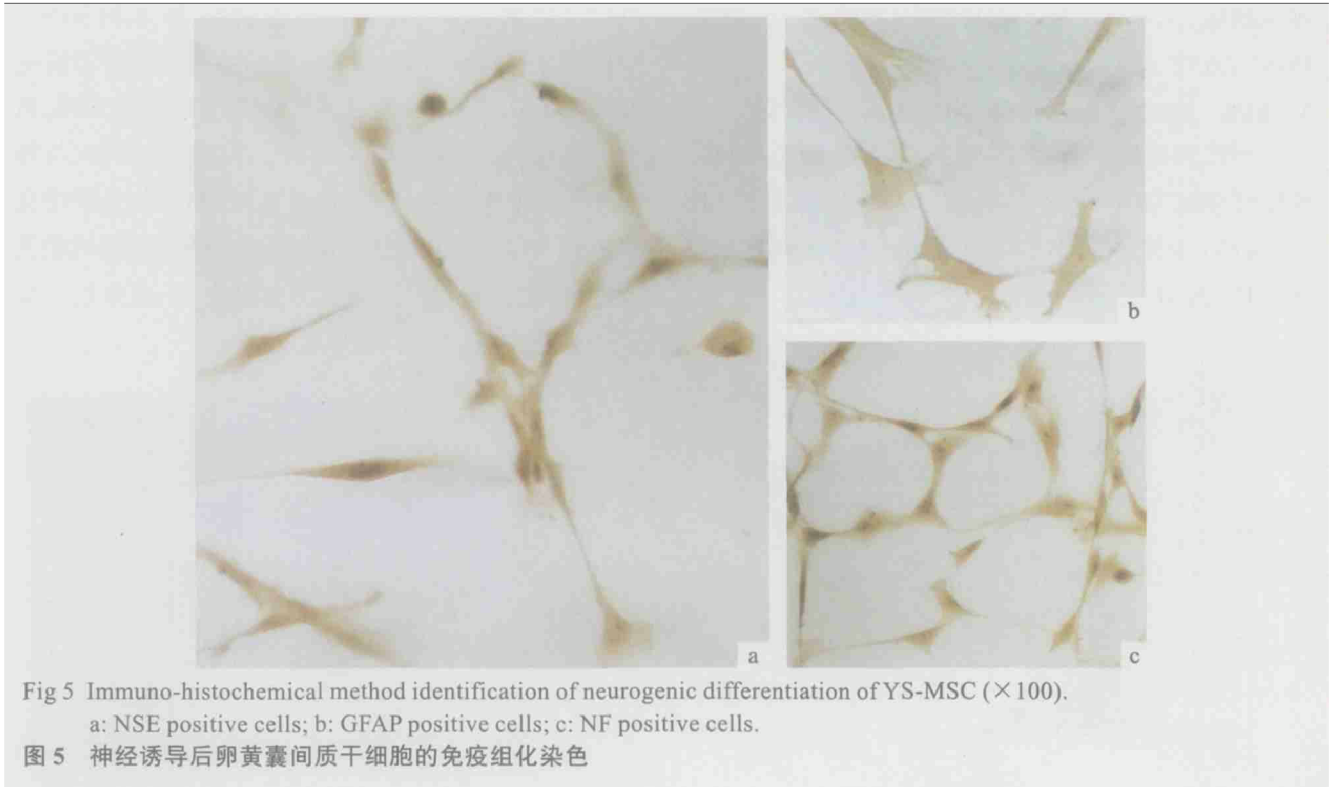
Fig 4 The mineralization assay of hYS- MSC after induction of osteogenic differentiation (alizarin red staining,  $\times 100$ ).

图 4 成骨诱导后卵黄囊间质干细胞外基质的矿化检测

## 讨 论

最近 10 余年,组织工程研究进展迅速,其中种子细胞为工程化组织提供源动力,是组织工程研究的关键与重点。理想的种子细胞应具备易于获取、可在大量扩增的同时保持较强自我更新能力及定向分化的可调控性等特点。在组织工程的研究中发现,来自成体的 MSC 可经体外培养得到大量扩增,但由于其发育分化接近终末状态,经过一段时间的体外培养后,容易衰老凋亡。此外,MSC 在体内的数量随着年龄增长而减少<sup>[8,9]</sup>,以骨髓为例,在骨髓中 MSC 的比例分别为:新生儿 1/10 000;青少年 1/100 000;中年人 1/400 000;老年人: 1/1 000 000- 1/2 000 000。与成体 MSC 相比,来自胚胎发育早期的 MSC 具有更大的增殖潜能和可塑性,同时,由于其抗原表达水平低,更有利于避免异体移植中存在的免疫排斥反应,有望成为组织工程研究的理想种子细胞。

hYS- MSC 由胚外中胚层间叶细胞发育而成,本实验观察发现,原代培养的 hYS- MSC 贴壁生长,具有集落形成能力,随着培养时间延长,集落相互融



合,呈旋涡状生长,经 2-3 次传代后即可纯化。由于目前还未明确 MSC 特异性标记分子,尚无直接方法分选或鉴定间质干细胞,一般认为整合素家族成员 CD29、粘附分子 CD44、CD166 及 CD105 等是 MSC 的重要标志物<sup>[10-12]</sup>,另外 MSC 为非造血系细胞,不表达造血干/祖细胞标志抗原 CD34、白细胞共同抗原 CD45 和共刺激分子 CD86。经流式细胞仪检测分析,纯化的 hYS-MSc 不表达 CD34、CD45 和 CD86,表达 CD29、CD44、CD105 和 CD166,原代和传代 hYS-MSc AKP 弱阳性。以上结果与文献报道的 MSC 表型一致,符合 MSC 的特征。在 hYS-MSc 的传代培养过程中观察到传代 10 次时,其增殖能力无改变,细胞周期分析显示,体外培养的 hYS-MSc 增殖指数明显高于成体 MSC(2% - 6%),并且在传代培养过程中维持正常二倍体核型。以上现象提示:hYS-MSc 是一种具有较大增殖能力和自我更新能力的原始 MSC,有望成为组织工程研究的理想种子细胞。另外,与成体 MSC 相比,来自早期胚胎组织的 hYS-MSc 处于相对原始状态,已有研究表明,卵黄囊细胞不表达 MHC 相关抗原<sup>[6,7]</sup>,因此,hYS-MSc 用于异体移植时有可能避免免疫排斥反应,无需进行严格的组织配型;hYS-MSc 不表达共刺激分子 CD86,提示 YS-MSc 是一种免疫缺陷的细胞,能逃避 T 淋巴细胞识别,更有利于提高异体移植的成功率<sup>[13]</sup>。

hYS-MSc 在胚胎发育过程中分化为成血管细胞和造血干细胞,启动胚胎血管发生和造血组织发育,以往关于卵黄囊的研究主要集中在造血与成血管方面。本研究对 hYS-MSc 进行成骨和神经诱导,发现在成骨诱导剂的作用下 hYS-MSc 可逐步分化发育为成骨细胞,进一步形成类骨结节样结构并可见细胞外基质钙盐沉积形成的矿化区;在神经诱导剂的作用下 hYS-MSc 发生明显形态变化,表现出神经元和神经胶质细胞的形态特点,免疫组化染色结果显示,诱导后的 hYS-MSc 表达 NF、NSE 及 GFAP 等神经细胞特异性蛋白。以上结果提示,YS-MSc 具有良好的可塑性,可在分化诱导剂的作用下定向分化为特定的组织细胞类型,由于人 YS-MSc 同时具备高增殖潜能与低抗原性,预示其作为组织工程研究的种子细胞具有广阔的应用前景。

#### [参 考 文 献]

- [1] 李中,张成,陈国俊,等. 体外培养诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为肌样细胞的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(9): 1165-1169.
- [2] 陈文芳,王连唐,石慧娟,等. 骨髓间充质干细胞定向分化为软骨细胞[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(7): 1195-1199.
- [3] 董燕湘,董晓先,何慧华,等. 大鼠骨髓间质干细胞用肾上腺素类激素诱导为神经细胞的研究[J]. 中国病理生

- 理杂志, 2004, 20(5): 733– 736.
- [4] Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life– span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(6): 592– 596.
- [5] Pereda J, Correr S, Motta PM. The structure of the human yolk sac: a scanning and transmission electron microscopic analysis[J]. *Arch Histol Cytol*, 1994, 57(2): 107– 117.
- [6] Parr EL, Blanden RV, Tulsi RS. Epithelium of mouse yolk sac placenta lacks H – 2 complex alloantigens[ J]. *J Exp Med*, 1980, 152(4): 945– 955.
- [7] Plendl J, Gilligan BJ, Wang SJ, et al. Primitive endothelial cell lines from the porcine embryonic yolk sac[ J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, 38(6): 334– 342.
- [8] Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, et al. Bone tissue– engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age[ J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(6): 911– 920.
- [9] Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, et al. Age– related changes in osteogenic stem cells in mice[ J]. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(5): 568– 577.
- [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[ J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143– 147.
- [11] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[ J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41– 49.
- [12] Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow– derived stem cells reveals a lack of distinction[ J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(5): 739– 751.
- [13] Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A, et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non– human primates[ J]. *Transplantation*, 2001, 72(3): 377– 384.

## 《微循环学》出版

由著名微循环学专家田牛教授所著的《微循环学》一书,已于近期由原子能出版社正式出版发行。全书共分为六大部分:(1)总论(1~ 5章),(2)微循环的基础(6~ 13章),(3)器官微循环(14~ 31章),(4)微循环的改变(32~ 36章),(5)临床微循环(37~ 42章),(6)主要疾病的微循环的改变(43~ 56章)。全书共140万字,反映了作者近40年来的研究成果,资料丰富全面,论断合理有据,并有多幅实拍的珍贵微循环图像,是一部比较系统、完整的微循环学专著,可供微循环专业人员阅读,也可作为临床、基础医学的有关专家、研究生、大专院校师生参考。该书大16开本,定价280元,邮寄费30元。邮购款请邮至北京2108信箱发行部收,邮编:100037,电话:010– 68417733转2153。联系人:封春瑞。转帐开户行:北京银行紫竹支行,帐号:01091049400120109003266,户名:原子能出版社。