

# 脐带间充质干细胞移植治疗脊髓损伤的临床研究\*

杨华强<sup>1,2</sup> 张荣环<sup>3△</sup> 杜 玲<sup>1</sup> 李东升<sup>1</sup> 袁雅红<sup>1</sup> 刘 瑜<sup>2△</sup>

(1 湖北医药学院附属太和医院 细胞治疗中心 湖北 十堰 442000 ;

2 湖北医药学院附属太和医院 血液科 湖北 十堰 442000 3 湖北省十堰市妇幼保健院 妇保科 湖北 十堰 442000)

**摘要** 目的 探讨脐带间充质干细胞移植治疗脊髓损伤的疗效及安全性。方法 40 例脊髓损伤患者给予脐带间充质干细胞移植治疗,移植方法采用静脉输注联合腰穿鞘内注射的方法。术后随访 1 年余定期观察患者临床症状及各项指标的变化并进行综合分析。移植过程中为促进干细胞的生长和分化,根据患者病情及身体状况给予相应的康复功能锻炼。结果 与入院时比较,脐带间充质干细胞移植治疗 3、6、12 个月后,不完全性脊髓损伤患者针刺觉评分、轻触觉评分、运动评分均有明显改善( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),完全性脊髓损伤患者针刺觉评分、轻触觉评分、运动评分均无明显变化( $P > 0.05$ ),两组残损分级均无明显改善( $P > 0.05$ )。移植后各项生化指标正常,未出现严重的并发症和明显的不良反应。结论 脐带间充质干细胞移植治疗脊髓损伤近期疗效明显,可以改善患者的临床症状,提高患者的生存质量,是一种值得借鉴的治疗方法。

**关键词** 脊髓损伤 治疗 移植 脐带间充质干细胞

中图分类号:R657.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)03-518-04

## Clinical Study of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation Therapy for Spinal Cord Injury\*

YANG Hua-qiang<sup>1,2</sup>, ZHANG Rong-huan<sup>3△</sup>, DU Ling<sup>1</sup>, LI Dong-sheng<sup>1</sup>, YUAN Ya-hong<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>2△</sup>

(1 Center of Cell Therapy, Taihe Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, P.R. China;

2 Department of Hematology, Taihe Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, P.R. China;

3 Department of women's health, Maternal and Child Health Hospital, Shiyan, Hubei 442000, P.R. China)

**ABSTRACT Objective:** To observe the clinical effect and safety of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC) transplantation therapy for spinal cord injury. **Methods:** Forty patients with spinal cord injury were received UC-MSC transplantation by intravenous infusion and lumbar puncture intrathecal injections. All patients were followed up for more than one year after transplantation. Clinical symptoms and various index were observed and literature review was performed. All patients were received corresponding recovery function exercise according to the disease condition for promoting the stem cell growth and differentiation. **Results:** At the 1, 3 and 12 months after UC-MSC transplantation, the pin prick score, light touch score and motor score of the patients in the incomplete spinal cord injury group had the obvious improvement compared with those on admission ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ), while the pin prick score, light touch score and motor score of the patients in the complete spinal cord injury group had no obvious change. There was no obvious improvement in impairment classification in the two group ( $P > 0.05$ ). Various biochemical indicators were normal and the patients had no severe complications and clear side effects after transplantation. **Conclusions:** The UCB-MSC transplantation can ameliorate clinical manifestations and improve quality of life of spinal cord injury. It is convenient, safe and effective in the treatment of spinal cord injury.

**Key words:** Spinal cord injury; Treatment; Transplantation; Umbilical cord mesenchymal stem cells

**Chinese Library Classification(CLC):** R657.3 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2012)03-518-04

### 前言

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中神经系统的严重创伤,因高致残率和高病死率一直成为医学研究的热门课题。传统观点认为,SCI 发生后病变的神经细胞是不可修复和再生的,近年来大量研究发现干细胞具有多向分化潜能,在特定的环境中对神经系统缺血、损伤、变性等原因造成的功能障碍有明显的修复作用,并且具有来源广泛、可在体外扩增及定向诱

导分化、在神经组织中中长期生存并进行整合等特点,成为治疗 SCI 的新手段。我院自 2008 年 12 月至 2011 年 6 月使用脐带间充质干细胞(UC-MSC)治疗 40 例 SCI 患者,取得了较好效果,现报告如下。

### 1 资料和方法

#### 1.1 病例资料

40 例 SCI 均为我院 2008 年 12 月至 2011 年 6 月本院住

\* 基金项目 湖北省教育厅基金资助项目(B20092404)

作者简介 杨华强(1973-) 男,硕士,副主任医师,副教授,主要从事干细胞基础和临床应用研究

△通讯作者 张荣环、刘瑜 E-mail:yanghuaqiang2004@126.com telephone:13986871847

(收稿日期 2011-07-09 接受日期 2011-09-30)

院患者,其中男 30 例,女 10 例,年龄 24~56 岁,平均(32.12±13.42)岁。按病情分为 2 组:完全性脊髓损伤组 16 例,不完全性脊髓损伤组 24 例。所有患者入院以后均经过手术减压内固定、激素减轻脊髓水肿、营养神经、康复及支持对症治疗但症状无明显改善而采用 UC-MSC 移植治疗。UC-MSC 移植治疗均经医院伦理委员会批准、在上级卫生行政主管部门备案并且在患者知情同意情况下进行。

1.2 脐带间充质干细胞制备及移植方法

取足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带,以 PBS 充分冲洗,剔除脐动、静脉,剩余的间质组织切割成直径约 1~2mm 大小的组织块,置 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清、25mM 谷氨酰胺、100U / ml 青霉素,100μ g / ml 链霉素)中,于含有 5%CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度培养箱中培养,细胞达 80%汇合后,以 0.2%的胰酶 / EDTA 消化并按 1:3 的比例传代。收集第 3 代细胞,细胞总数为 (2~6)× 10<sup>7</sup>。流式细胞仪检测细胞表型并确定为脐带间充质干细胞。移植前由患者签署干细胞知情同意书。间充质干细胞治疗次数:4~6 次为 1 疗程,每次间隔 1 周,治疗途径采用静脉输注联合腰穿鞘内注射干细胞的方法,腰穿术后去枕平卧 6~8 小时,24 小时内严密观察患者生命体征的变化。

1.3 临床检查和评价方法

1.3.1 治疗前后所行检查 所有患者治疗前均常规行血液 HIV-DNA 抗体、梅毒抗体、肝炎标志物(甲、乙、丙、丁、戊 IgM 抗体)、Torch 5 项检查。干细胞治疗前及结束后测定免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)、补体 C3、补体 C4、T 细胞亚群,肝肾功能、血脂、血糖、电解质、血清酶学(方法均按试剂盒要求进行),血尿常规检查。所有患者治疗前后均经过全面的临床评价,均记录详

细的登记表。

1.3.2 功能评定 功能评定:①运动功能评定上下肢 10 块肌肉,分别是屈肘肌(C5)、伸腕肌(C6)、伸肘肌(C7)、屈指肌(C8)、小指展肌(Th1)、屈髋肌(L2)、伸膝肌(L3)、踝背屈肌(L4)、拇长伸肌(L5)、踝跖屈肌(S1),按照 Lovett 肌力标准(0~5 级),总分 100 分;感觉评定为皮节的痛觉和触觉,按 0、1、2 共 3 级,痛觉 112 分,触觉 112 分;②日常生活活动能力评定采用改良的 Barthel 指数(MBI),③膀胱功能:观察尿失禁次数、自主排尿情况、膀胱容量及残余尿量测定。两组均于入院当天、治疗后 3 月、6 月、12 月进行评定。主要观察指标:患者治疗前后神经功能评分。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 11.5 统计软件包进行随机区组设计的方差分析。

2 结果

2.1 治疗前后神经功能评定情况

与入院时比较,UC-MSC 治疗 3、6、12 个月后,不完全性脊髓损伤患者痛觉评分、轻触觉评分、运动评分均有明显改善(F=4.14 P<0.05 F=4.18 P<0.05 F=4.44 P<0.01),完全性脊髓损伤患者针刺觉评分、轻触觉评分、运动评分均无明显变化(F=5.24 P>0.05 F=4.66 P>0.05 F=5.74 P>0.05),2 组残损分级均无明显改善(F=4.37 或 4.45 P>0.05),见表 1。经过系统康复训练,不完全脊髓损伤患者的 MBI 评分均有显著提高,治疗前后比较,均 P<0.01,差异有显著性意义。

表 1 40 例患者 UC-MSC 治疗前后疗效的评估

| Table 1 The evaluation of clinical effect of UC-MSC transplantation therapy in 40 patients with SCI between prior-treatment and post-treatment |    |                                |               |              |                |                           |
|--|----|--------------------------------|---------------|--------------|----------------|---------------------------|
| Injury type  | n  | Evaluation time                | Algesia score | Touch score  | Movement score | Impairment classification |
| Incomplete injury  | 24 | Prior-treatment                | 80.18± 16.12  | 62.24± 16.24 | 65.26± 16.24   | C                         |
|  |    | Post-treatment (three months)  | 85.14± 16.14  | 66.23± 17.25 | 68.24± 17.23   | C                         |
|  |    | Post-treatment (six months)    | 90.16± 17.12  | 72.12± 18.26 | 74.23± 16.29   | D                         |
|  |    | Post-treatment (twelve months) | 95.12± 17.24  | 76.24± 19.25 | 81.21± 18.12   | D                         |
| Complete injury  | 16 | Prior-treatment                | 56.12± 12.13  | 50.12± 10.14 | 56.36± 13.12   | A                         |
|  |    | Post-treatment (three months)  | 57.15± 11.12  | 52.16± 11.12 | 57.17± 12.19   | A                         |
|  |    | Post-treatment (six months)    | 59.14± 10.13  | 53.17± 10.16 | 59.15± 13.16   | B                         |
|  |    | Post-treatment (twelve months) | 62.13± 12.16  | 55.24± 10.10 | 61.16± 12.15   | B                         |

2.2 膀胱恢复自主排尿平均时间和膀胱残余尿量测定

24 例不完全性脊髓损伤患者恢复自主排尿时间平均为(50.7± 7.8)d,16 例完全性脊髓损伤患者为(60.8± 8.9)d,经统计学分析 P<0.05,差异有显著性意义。采用间歇清洁导尿方法

训练膀胱功能,两组患者残余尿量均有减少,但不完全性脊髓损伤治疗前后比较 F=4.40 P<0.05,差异有显著性意义,完全性脊髓损伤治疗前后比较 F=5.36 P>0.05,见表 2。

表 2 40 例患者 UC-MSC 治疗前后残余尿量的变化情况

Table 1 The changes of residual urine volume of UC-MSC transplantation therapy in 40 patients with SCI between prior-treatment and post-treatment

| Time                              | Residual urine volume |                 |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|
|                                   | Incomplete injury     | Complete injury |
| Prior-treatment                   | 218.16± 21.12         | 222.23± 20.15   |
| Post-treatment<br>(three months)  | 206.12± 18.16         | 218.20± 19.14   |
| Post-treatment<br>(six months)    | 192.10± 14.15         | 215.18± 18.16   |
| Post-treatment<br>(twelve months) | 170.11± 11.16         | 210.14± 14.16   |

2.3 干细胞移植的不良反应

所有患者 UC-MSC 移植后血液分析、免疫功能及各项生化指标均未发生明显异常,腰穿术后 5 例患者发生轻微低颅压头痛,经平卧休息、补液及对症治疗后头痛缓解,3 例患者在腰穿鞘内给予干细胞治疗后出现低至中等度发热,行对症治疗后发热在 48 小时内完全缓解,余无其他不适感,无严重不良反应发生。

3 讨论

脊髓损伤(Spinal cord injury,SCI)是中枢神经系统的一种严重创伤,多系车祸、坠落伤等造成脊柱脱位、骨折所致。脊髓损伤传统治疗仅限于脊柱骨折脱位的复位固定、解除脊髓压迫、对症及康复治疗,疗效较差。其后随着医学的发展,医学先驱们先后试用了手术吻合、手术减压、神经移植、大网膜移植、药物治疗、局部冷冻、物理康复以及应用酶制剂来抑制和消除结缔组织瘢痕等多种方法治疗脊髓损伤,虽然这些方法在不同程度上缓解了脊髓损伤的病理改变,但脊髓损伤导致大量患者截瘫的局面并没有改变,从而也给社会和家庭带来沉重的经济负担和精神负担<sup>[1]</sup>。近 10 年来由于现代医学技术和再生医学的迅速发展,以干细胞为基础的细胞疗法在神经系统疾病中的治疗研究也应运而生<sup>[2-3]</sup>。

间充质干细胞是一种来源于中胚层,具有多向分化潜能的一类干细胞,存在于人体骨髓、脂肪组织、新生儿的脐带、胎盘等组织中,研究证明间充质干细胞不仅具有向骨、软骨、脂肪及成肌细胞分化的潜能,还具有向神经元分化的潜能。由于其具有获取方便、来源丰富、容易扩增、免疫原性低及多向分化潜能等优点,使得间充质干细胞广泛应用于心血管系统疾病、神经系统疾病、骨骼肌肉相关疾病、肝病、糖尿病等多种疾病的临床试验中,并且取得初步疗效,展示了其广泛的临床应用前景<sup>[3-4]</sup>。韩明远等<sup>[5]</sup>用 UC-MSC 移植治疗 Wistar 脊髓损伤模型大鼠,移植后对实验动物通过运动功能评分(BBB)评分、电诱发电位与运动诱发电位观察大鼠后肢功能恢复情况,并且分别于损伤后 2、4、6、8、10 周随机于细胞移植组抽取大鼠 2 只,免疫组织化学染色观察人 UC-MSC 存活、迁移、分化,通过胶原纤维酸性蛋白阳性细胞染色比较各组损伤局部胶质瘢痕形成面积。结果显示未经体外诱导的人 UC-MSC 可在损伤大鼠脊髓体内向神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞分化,减小胶质瘢痕,并

促进脊髓损伤大鼠神经功能的恢复。韩明远等人<sup>[6]</sup>还观察蛛网膜下腔途径移植人 UC-MSC 修复大鼠脊髓损伤的疗效,结果表明 UC-MSC 可经蛛网膜下腔途径到达脊髓损伤局部并促进大鼠脊髓损伤的功能恢复。阮智等<sup>[7]</sup>用异体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤,并观察其治疗作用,结果表明与对照组比较,细胞移植组大鼠运动功能明显改善,脊髓组织中脑源性神经生长因子、神经生长因子蛋白含量明显增高( $P<0.05$ ),并且移植组大鼠脊髓囊腔较小,NF200 表达明显增加,胶质纤维酸性蛋白表达减少。提示异体骨髓间充质干细胞移植能增加损伤脊髓神经生长因子含量、抑制胶质瘢痕形成、促进神经轴突再生、改善大鼠脊髓损伤后运动功能恢复。王颖等<sup>[8]</sup>观察大鼠脊髓损伤后不同时期局部移植人 UC-MSC 修复脊髓损伤的效果,探讨 UC-MSC 局部移植治疗脊髓损伤 SCI 的最佳移植时机,大鼠 SCI 后局部移植的 UC-MSC 能长期存活、抑制胶质瘢痕形成、改善后肢运动功能,SCI 后 1w 移植的效果优于 SCI 后 3d 和 3w 时移植的效果。谢遵伟等<sup>[9]</sup>用骨髓间充质干细胞经静脉途径或蛛网膜下腔治疗 11 例脊髓损伤患者,13 例对照组仅给予综合康复治疗,两组均于入院当天、治疗后 7、15、30、60、90d 进行运动与感觉、日常生活能力、膀胱功能评定。结果治疗组 11 例患者均有不同程度的感觉、运动和自主神经功能改善,但与对照组比较差异不显著,这可能与治疗组病例数较少有关。

本文 40 例脊髓损伤患者经常规治疗临床症状无明显改善而采用 UC-MSC 移植治疗,4~6 次为一疗程,移植途径采用静脉输注加鞘内注射的方法,治疗后 3、6、12 个月定期随访,不完全性脊髓损伤患者痛觉评分、轻触觉评分、运动评分均以及残余尿量较治疗前有明显改善,不完全性脊髓损伤治疗后自主排尿的时间较完全性脊髓损伤明显缩短,说明该治疗方法近期有效,其疗效与病情的轻重、治疗的早晚、干细胞治疗的次数及综合治疗的情况等有关。结合国内外学者的动物实验和临床研究结果,我们分析间充质干细胞治疗脊髓损伤的可能机制是:①移植的间充质干细胞可以自我分辨并迁移到损伤的神经部位,通过细胞替代作用更换机体已经死亡或受损的神经细胞,修复受损神经网络;②中枢神经系统(包括脑和脊髓)损伤后,损伤中心周边的大量神经细胞虽然健存,但受到损伤的影响,转入休眠或功能抑制状态。移植的干细胞可以分泌大量神经生长因子,激活这些神经细胞,从而改善机体的神经功能<sup>[2,10-12]</sup>。干细胞



和再生医学是目前医学研究热点,本文40例患者采用UC-MSC移植治疗获得了较好效果,提示我们可以在立足于基础研究,经过认真严格的预实验,进行大量谨慎、安全地选择病种的基础上,对于传统治疗方法疗效不好的神经系统疑难疾病,我们可以在力所能及的范围内进行一些主动尝试,利用间充质干细胞在再生医学中的治疗技术,让那些绝望的患者和家属看到希望和光明。本文由于病例数量有限和随访时间较短,其远期疗效及副作用还需要进一步观察。

#### 参考文献(References)

- [1] 王连仲,王永才,闻华,等. 干细胞移植治疗脊髓损伤的临床应用现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(36):7193-7196  
WANG Lian-zhong, WANG Yong-cai, WEN Hua, et al. Clinical application of stem cell transplantation in treating spinal cord injury[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009,13(36):7193-7196(In Chinese)
- [2] Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(10):2183-2200
- [3] Harris DT. Non-haematological uses of cord blood stem cells [J]. Br J Haematol, 2009, 147(2):177-184
- [4] 许怡薇,冯凯,石炳毅. 干细胞在再生医学领域的临床应用现状及其前景[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(36):7163-7166  
XU Yi-wei, FENG Kai, SHI Bin-yi. Clinical application and prospect of stem cells in the field of regeneration medicine[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(36):7163-7166 (In Chinese)
- [5] 韩明远,冯世庆,李辉,等. 移植人脐带间充质干细胞修复大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(19):3483-3489  
HAN Ming-yuan, FENG Shi-qing, LI Hui, et al. Transplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010,14(19) :3483-3489(In Chinese)
- [6] 韩明远,冯世庆,李辉,等. 蛛网膜下腔移植人脐带间充质干细胞修复大鼠脊髓损伤[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(11):1645-1647  
HAN Ming-yuan, FENG Shi-qing, LI Hui, et al. Transplantation of human umbilical cord derived- mesenchymal stem cells via subarachnoid space way for the treatment of spinal cord injury in rats[J]. Chin J Exp Surg, 2010,27(11):1645-1647(In Chinese)
- [7] 阮智,黄慧,孙建华,等. 异体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(36) :6729-6732  
RUAN Zhi, HUANG Hui, SUN Jian-hua, et al. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for spinal cord injury in rats[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010,14(36) :6729-6732(In Chinese)
- [8] 王颖,冯世庆,赵鹏,等. 大鼠脊髓损伤后不同时期移植人脐带间充质干细胞的修复效果观察 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010,20(11) :918-925  
WANG Ying, FENG Shi-qing, ZHAO Peng, et al. Repairing effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation at different time points after spinal cord injury in adult rats[J]. Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(11) :918-925(In Chinese)
- [9] 谢遵伟,崔贵祥,李义召,等. 自体骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤疗效观察 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(7) :1277-1279  
XIE Zun-wei, CUI Gui-xiang, LI Yi-zao, et al. Curative effect of autologous mesenchymal stem cell transplantation on spinal cord injury[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 11(7) :1277-1279(In Chinese)
- [10] Yamasaki TR, Blurton-Jones M, Morrisette DA, et al. Neural stem cells improve memory in an inducible mouse model of neuronal loss [J]. J Neurosci, 2007, 27(44):11925-11933
- [11] Pueyo R, Junqué C, Vendrell P, et al. Neuropsychologic impairment in bilateral cerebral palsy[J]. Pediatr Neurol, 2009, 40(1):19-26
- [12] Leu S, Lin YC, Yuen CM, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats[J]. J Transl Med, 2010, 8(1):63-67
- [12] 邓建军,喻韬,万朝敏,等. 儿科学临床实习存在的问题及对策[J]. 西部医学, 2010,22(1):193-195  
Deng Jian-jun, Yu Tao, Wang Chao-min, et al. The problems and strategies in clinical internship teaching of pediatrics [J]. Medical J West China, 2010,22(1):193-195
- [13] 于波,王雅洁,李阳,等. PBL教学法在我国医学教育应用中存在的问题[J]. 医学教育探索, 2009,1(8):61-63  
Yu Bo, Wang Ya-jie, Li Yang, et al. Problems related to the PBL process in present stage of medical education of our country[J]. Researches in Medical Education, 2009,1(8):61-63
- [14] 门鹏,谢百治. 基于 STRUTS 架构的 PBL 教学网站建设方案[J]. 中国医学教育技术, 2005,19(3):207-211  
Men Peng, Xie Bai-zhi. The design of constructing a PBL instructional website based on STRUTS framework [J]. China Medical Education Technology, 2005,19(3):207-211
- [15] Bosse HM, Huwendiek S, Skelin S, et al. Interactive film scenes for tutor training in problem-based learning (PBL): dealing with difficult situations[J]. BMC Med Educ, 2010,10(5):52
- [7] Kritikos VS, Woulfe J, Sukkar MB, et al. Intergroup peer assessment in problem-based learning tutorials for undergraduate pharmacy students [J]. Am J Pharm Educ, 2011,75(4):73
- [8] Papinczak T. An exploration of perceptions of tutor evaluation in problem-based learning tutorials[J]. Med Educ, 2010,44(9):892-899
- [9] Schmidt HG, Rotgans JJ, Yew EH. The process of problem-based learning: what works and why[J]. Med Educ, 2011,45(8):792-806
- [10] 王萍玉,谢书阳. 医学统计学 PBL 法对医学创新人才的培养[J]. 现代生物医学进展, 2010,10(18):3557-3559  
Wang Ping-yu, Xie Shu-yang. Application of Problem-based Learning Teaching Mode in Medical Statistics to Cultivating Innovative Talents[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(18):3557-3559
- [11] 张敏,陈立军,靳秋月,等. 基于 PBL 模式的综合性生物化学实验探索[J]. 现代生物医学进展, 2009,9(17):3335-3337  
Zhang Min, Chen Li-jun, Jin Qiu-yu, et al. Study of PBL teaching mode in integrated biochemistry experiment[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9(17):3335-3337

(上接第 557 页)