·基础研究·

低强度脉冲超声对人脐带干细胞体外增殖和成软骨分化的影响*

陈侠甫[1] 金旭红[1,3] 黄邓高[2] 邢 势[1] 王和杰[1] 卓泽铭[1] 车家驹[1]

摘要

目的：研究低强度脉冲超声（LIPUS）对体外培养人脐带间充质干细胞（hUCMSCs）增殖和成软骨分化的影响。

方法：将P_4代hUCMSCs随机分为对照组（C组）L30组（30mW/cm^2）、L_{50}组（50mW/cm^2）、L_{80}组（80mW/cm^2），对照组予超声假照处理，各LIPUS刺激组分别刺激5、10、20min/d。LIPUS刺激后观察细胞生长情况，连续刺激1—5天后采用CCK-8检测细胞增殖活性；连续刺激并成软骨诱导培养2周后分别采用ELISA法检测软骨特异性胞外糖胺多糖（GAG）和II型胶原蛋白（Col2）的浓度，以及细胞阿利新蓝染色和Col2、DAPI荧光染色观察上述两种软骨特异性蛋白的分布水平。

结果：①LIPUS刺激5d后观察刺激5min/d时L50组细胞集落更为密集，细胞增殖活性组内比较高于L30组和L80组（P<0.05），组间比较高于对照组（P<0.05），刺激10min/d、20min/d时各实验组随着刺激强度增加细胞增殖受到抑制，以L80组抑制增殖效果最显著（P<0.05）。②LIPUS刺激并成软骨诱导5min/d时L30组细胞更为扁平宽大且阿利新蓝染色面积及Col2荧光强度较L50组、L80组及对照组更大，进一步分析胞外分泌GAG和Col2蛋白的含量为实验组高于对照组，以L30最为显著（P<0.05），刺激10min/d、20min/d时各实验组之间以及与对照组组间无显著性差异。

结论：①适宜参数的LIPUS刺激促进细胞增殖，以（50mW/cm^2、5min/d）最为显著，但随着刺激强度增大和刺激时间的延长，细胞的增殖能力下降；②在细胞诱导因子的协同作用下，在不影响细胞增殖率的情况下适宜参数（30mW/cm^2、5min/d）的低强度脉冲超声可促进人脐带间充质干细胞成软骨分化。

关键词 低强度脉冲超声；脐带间充质干细胞；组织工程；细胞增殖；成软骨分化

中图分类号：R493 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-1242（2019）-05-0508-07

Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondrogenic differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells/CHEN Xiafu, JIN Xuhong, HUANG Denggao, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(5): 508—514

Abstract

Objective: To investigate the effects of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on proliferation and chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) in vitro.

Method: P4 hUCMSCs were randomly divided into control group (group C, no LIPUS), LIPUS L30 group (30mW/cm^2), L50 group (50mW/cm^2), L80 group (80mW/cm^2), Each LIPUS group was divided into 5, 10, 20 min/d subgroups. After 1-5 days continuous LIPUS stimulation, the cell proliferation activity was detected by CCK-8 After continuous stimulation and induction of cartilage for 2 weeks, the concentration of cartilage specific extracellular glycosaminoglycan(GAG) and type II collagen(Col2) were detected by ELISA method, two kinds of cartilage were observed by cell Alicia blue staining and Col2 and DAPI fluorescence staining to assess the level of the distribution of specific proteins.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.05.003

*基金项目：海南省自然科学基金项目（20158297）

1 中南大学湘雅医学院附属海口医院骨科中心，海口，570208；2 中南大学湘雅医学院附属海口医院中心实验室；3 通讯作者

作者简介：陈侠甫，男，硕士研究生，住院医师； 收稿日期：2018-06-12

Result: ①After 5 min/d stimulation for 5 days, the cell colony of L50 group was more denser and the cell proliferation activity was more higher than that of L30 group, L80 group (P<0.05) and control group (PP< 0.05), The proliferation rate decreased more as the stimulation intensity or duration increased in 10 min/d and 20min/d groups, the L8o and 20min/d group is the most (P<0.05). ②When LIPUS stimulation 5min/d and chondrogenic differentiation were used together, the cells in group L30 were more flat and larger, and the area of alcian blue staining and Col2 fluorescence intensity were greater than those in the L50 group, L80 group and the control group. The content of the exocrine GAG and Col2 protein in the experimental group was higher than that in the control group, and the most significant was L30 (P<0.05). There was no significant difference between the experimental group and the control group at 10min/d and 20min/d.

Conclusion: ①The LIPUS stimulation with appropriate parameters promotes cell proliferation. 50mW/cm^2-5min/d is the most significant, but with the increase of stimulation intensity and stimulation time, the cell proliferation ability decreases. ②Under the synergy effect of cell inducible factors, the appropriate parameters (30mW/cm^2, 5min/d) LIPUS stimulation can promote chondrogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells.

Author's address Haikou Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central University, Haikou People's Hospital, Haikou,Hainan,570208

Key word low-intensity pulsed ultrasound; umbilical cord mesenchymal stem cells; tissue engineering; cell proliferation; chondrogenic differentiation

关节软骨损伤的修复是临床研究的难点和热点,组织工程技术提供了新的治疗手段[1]。目前软骨组织工程中存在如何获取足够数量的种子细胞以及优化组织工程软骨性能的问题。Cook SD等[2]在动物实验的研究中证实了低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)具有促进软骨下缺损修复的作用。Yoon JH等[3]进一步研究发现LIPUS通过复合应力刺激使整个人脐带中间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)的产量提高3.3倍,而不需要酶消化或生长因子补充,同时Xu P等[4]的研究结果证实,LIPUS可以促进体外造血干/祖细胞有效增殖和集落形成。以上研究表明,我们可利用LIPUS来获得更多MSC和改善成软骨性能问题以用于临床。目前LIPUS应力刺激如何影响hUCMSCs增殖和成软骨分化,其合适的刺激强度和时间如何,尚缺乏科学统一的研究。本实验研究设备采用文献[5]较常用的工作频率为1.5MHz,脉冲宽度为200μs,重复频率1kHz,拟筛选出促进hUCMSCs增殖、成软骨分化的最适宜的LIPUS刺激强度和时间参数,从而为进一步研究LIPUS刺激下hUCMSCs成软骨分化中的力学信号转导机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

脐带干细胞基础培养基和成软骨诱导培养基(广州赛业科技有限公司);0.25%胰蛋白酶、GAG和II型胶原ELISA试剂盒(美国Gibco公司);CCk-8(日本仁川);Col2一抗ab34712和荧光二抗ab150077(美国Abcam公司);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);酶标仪(美国BD公司);细胞培养箱(美国 Thermos公司)。

SonaCell细胞扩增仪提供LIPUS刺激,SonaCell超声设备(加拿大 Intelligent-Nano公司)是基于生物学和临床研究的基础上设置的,其设备参数:脉冲超声频率1.5MHz,脉冲重复频率为1kHz,脉冲循环为20%。超声强度平均强度可调整在0—100mW/cm^2。仪器探头通过耦合剂紧贴培养板底部进行刺激。

细胞培养及形态观察:将P2代脐带间充质干细胞(hUCMSCs,广州赛业生物科技有限公司)在体外进行贴壁培养,加入脐带干细胞基础培养基(DMEM培养基含10%胎牛血清、1%谷氨酰胺以及50U/ml青、链霉素),37℃、5%CO_2条件下进行培养。24h后换液弃去非贴壁细胞,每隔2—3d换液,待细胞融合达80%时,胰酶消化,以1∶2的比例传代培养。在倒置显微镜下观察细胞形态并运用Image-

Pro Plus软件拍照。

1.2 实验分组

研究LIPUS的增殖效应时取第4代细胞以1.5×10^4/ml的密度100μl接种至96孔板中，随机分为4组：对照组（C组）、LIPUS刺激L30组（30mW/cm^2）、L50组（50mW/cm^2）、L80组（80mW/cm^2），每组做4组重复实验。细胞培养24h换液，将细胞培养板通过耦合剂接触SonaCell设备的探头元件并放置于细胞培养箱中进行刺激，5、10或20min/d。研究LIPUS成软骨分化效应时取第4代细胞2×10^4/ml的密度1ml接种至12孔板中，实验分组同上，但LIPUS刺激需待细胞在培养箱中培养融合达80%时更换成软骨诱导液（DMEM培养基含100nmol/l地塞米松、1% ITS、10ng/l TGF-β、50mg/ml抗坏血酸、40mg/ml脯氨酸、100mg/ml丙酮酸钠、10%胎牛血清）后进行。

1.3 LIPUS对hUCMSCs细胞增殖率的影响

CCK-8实验：细胞接种24h后进行LIPUS分组刺激，连续刺激1—5天，并于每次刺激24h后更换培养基，另取空白孔加入培养基作空白组，加入10μl CCk-8溶液于细胞培养箱孵育4h后测450nm波长处OD值，分别计算：细胞增殖率=（实验组OD-空白组OD）/（对照组OD-空白组OD）×100%。做4组重复实验，对数据进行统计学分析。

1.4 LIPUS对hUCMSCs细胞成软骨分化的影响

Elisa实验：在细胞进行LIPUS分组刺激并成软骨诱导培养2周后收集各组细胞培养液，每组4个重复样本，按照预实验结果，样本稀释5倍后按试剂盒说明书进行ELISA实验检测GAG和Col2。终止反应后15min内测450nm处OD值，根据标准品的浓度和OD值绘制标准曲线，计算各组Col2和GAG的浓度。

阿利新蓝染色实验：在细胞进行LIPUS分组刺激并成软骨诱导培养2周后，将各组细胞用磷酸盐缓冲液（PBS）漂洗3次（每次5min），4%多聚甲醛室温下固定30min；PBS漂洗3次，加0.1MHCl溶液浸洗5min，pH值降至1.0；1%阿利新蓝染色30min；PBS漂洗3次，在倒置显微镜下观察，运用Image-ProPlus软件拍照。

Col2细胞免疫荧光实验：在细胞进行LIPUS分组刺激并成软骨诱导培养4周后，将各组细胞用PBST漂洗3次（每次5min），4%多聚甲醛室温下固定15min；PBS漂洗3次，0.5%Triton×-100透膜处理30min；PBS漂洗3次，0.5%牛血清白蛋白(BSA)室温湿盒封闭30min；加入Col2一抗（1∶100）4℃过夜；PBS漂洗3次，滴加二抗（1∶500）37℃室温避光孵育1h；PBS漂洗3次，滴加1ml DAPI染色液37℃静置30min；PBS漂洗3次，在荧光倒置相差显微镜下观察，运用Image-ProPlus软件拍照。

1.5 统计学分析

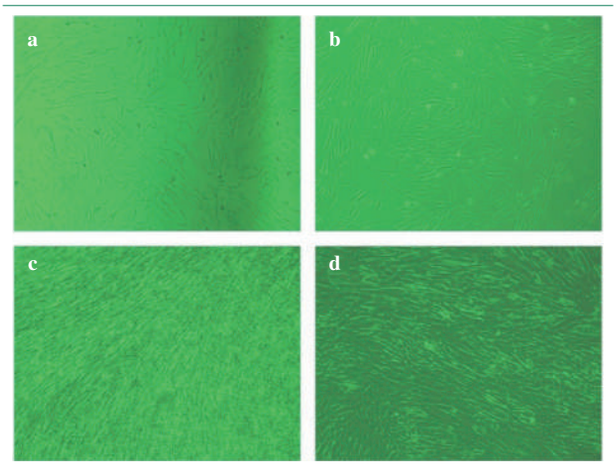
应用SPSS22.0统计学软件对实验数据进行分析，实验结果用均数±标准差表示。多组比较采用单因素ANOVA检验方法，以对照组为参照两两比较采用Dunnett法，组间两两比较采用LSD法。$P<0.05$表示差异显著。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

P2代hUCMSCs培养4h后贴壁细胞数量明显增多，外观类似成纤维样细胞，呈长梭形均匀分布(图1A)，生长迅速，2—3d即出现集落，逐渐融合成漩涡状；培养4—5d时细胞融合达80%以上，传代培养后细胞形态无明显改变(图1B)。在给予LPUS应力刺激30mW/cm^2、5min/d时，hUCMSCs培养10天时细胞形态无明显改变（图1C），而LIPUS刺激合并成软骨诱导的细胞在培养7d时出现扁平宽大的软骨样细胞形态改变(图1D)。

图1 显微镜下观察hUCMSCs细胞形态 （×100）



a 1d，b 3d，c L30刺激组10d，d L30复合诱导组7d

2.2 LIPUS刺激对hUCMSCs细胞增殖的影响

2.2.1 各组细胞形态改变的比较：LIPUS刺激并培养5d时，显微镜观察5min/d各实验组细胞生长状态良好，L50组细胞较对照组更为活跃，细胞集落更密集，10、20min/d组随着脉冲强度增大和刺激时间延长，细胞集落较少（图2）。

2.2.2 各组细胞增殖率的比较：LIPUS作用于hUCMSCs细胞的强度-效应曲线如图3所示。结果表明，LIPUS连续刺激1—5d，在第5d当刺激时间为5min/d时L50组的细胞增殖率高于对照组和余实验组（$P<0.05$），刺激10min/d、20min/d时各实验组细胞随着刺激强度的增大而增殖受到抑制，以L80组抑制增殖效果最显著（$P<0.05$）。

2.3 LIPUS刺激对hUCMSCs细胞成软骨分化的影响

2.3.1 各组细胞形态改变的比较：LIPUS刺激并成软骨诱导培养2周时，显微镜观察5min/d各实验组细胞生长状态良好，L30组细胞较对照组更为扁平宽大，10、20min/d组随着脉冲强度增大和刺激时间延长，细胞贴壁状态变差（图4）。

2.3.2 各组软骨特异性蛋白GAG和Col2胞外表达水平的比较：Elisa检测各组糖胺多糖、II型胶原表达，与对照组比较，各实验组在刺激5min/d时糖胺多糖、II型胶原均升高，以L30组最为显著（$P<0.05$）；刺激10min/d、20min/d时，各实验组与对照组组间无显著性差异。各实验组组内两两比较，刺激5min/d时较10min/d、20min/d时糖胺多糖、II型胶原均升高，以L30组最为显著（$P<0.05$），见图5。

2.3.3 各组软骨特异性蛋白GAG及Col2的定性分布及比较：成软骨诱导培养2周时，各组细胞阿利新蓝染色显示，细胞内均可见蓝色异染颗粒，其中L30复合诱导组蓝染颗粒较多（图6）；4周时 Col2细胞免疫荧光检测和DAPI染色结果显示，各分组细胞核周围和细胞之间均可见绿色荧光物质分布，显微镜下见L30组细胞荧光强度较L50、L80和诱导对照组更强。

3 讨论

经过二十多年的发展，软骨组织工程学以骨髓间充质干细胞（bone marrow-derived mesenchymal stem cells，BMSCs）和关节软骨细胞为种子细胞的

图2 低强度脉冲超声（LIPUS）刺激5d倒置显微镜下观察5min/d时DAPI染色细胞 （×100）

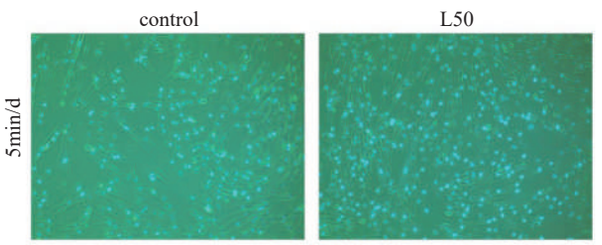
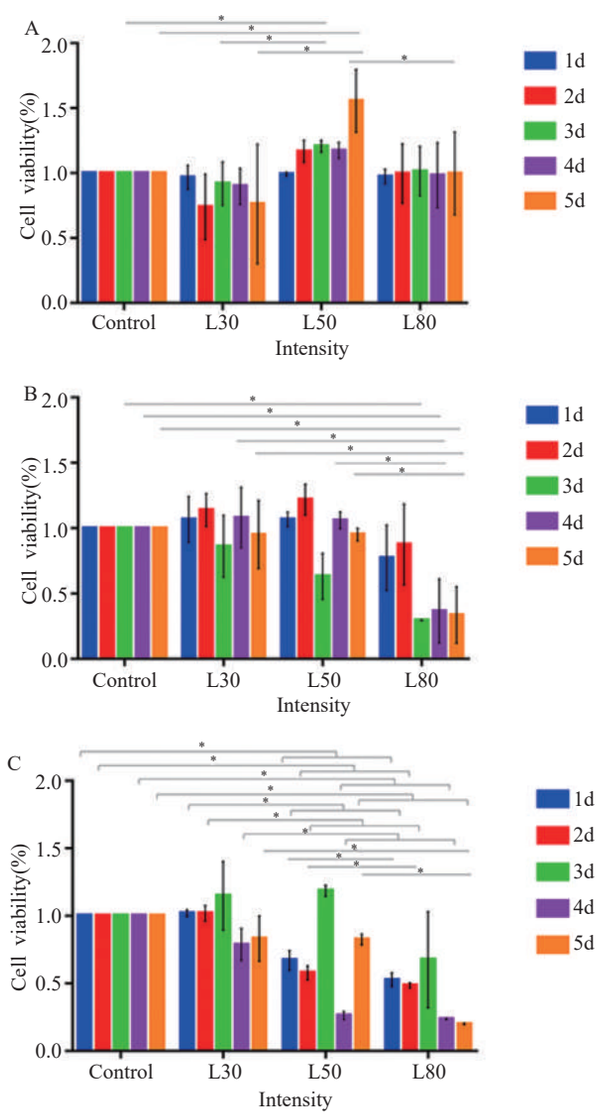
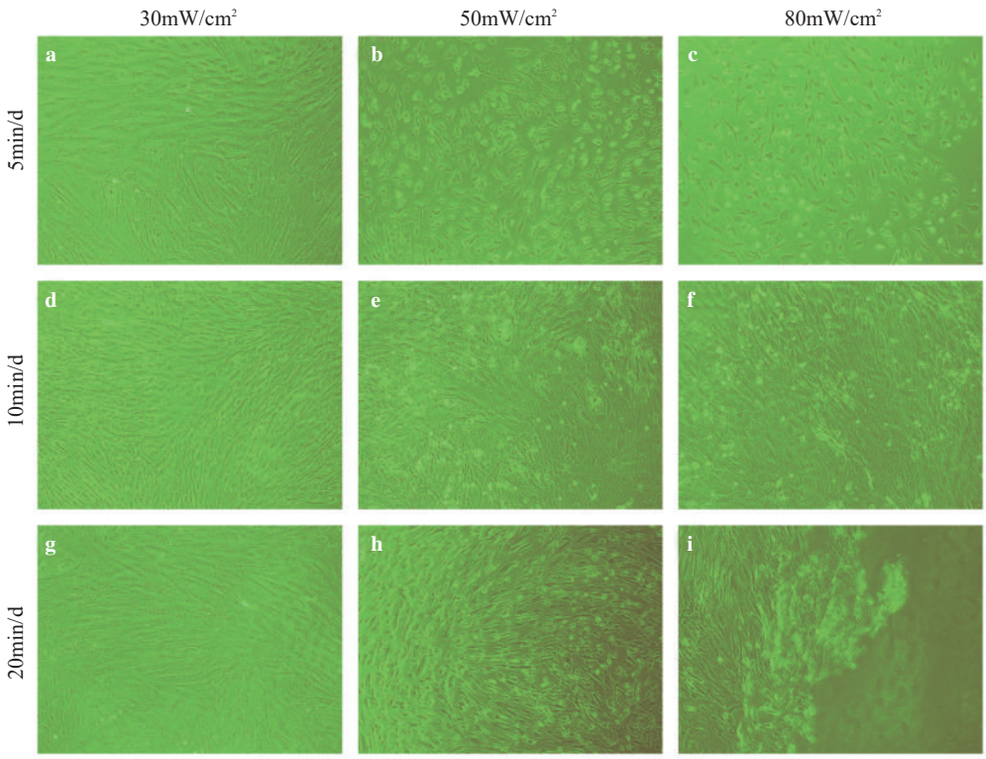


图3 不同强度的低强度脉冲超声（LIPUS）作用于细胞的强度–效应曲线



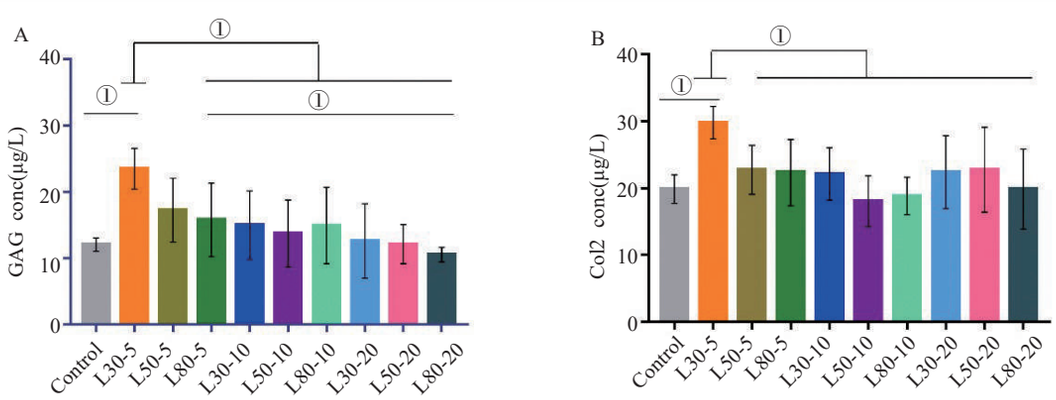
（A）5min/d，(B)10min/d，(C)20min/d。LIPUS作用于细胞1—5d后，CCK-8法检测细胞增殖率，*$P<0.05$

图4　LIPUS刺激14d时显微镜下观察细胞形态



hUCMSCs分别在LIPUS刺激强度为30mW/cm²、50mW/cm²、80mW/cm²，刺激时间为5min/d、10min/d、20min/d作用后培养14d时的细胞形态。

图5　各组软骨特异性蛋白GAG和Col2胞外表达水平的比较

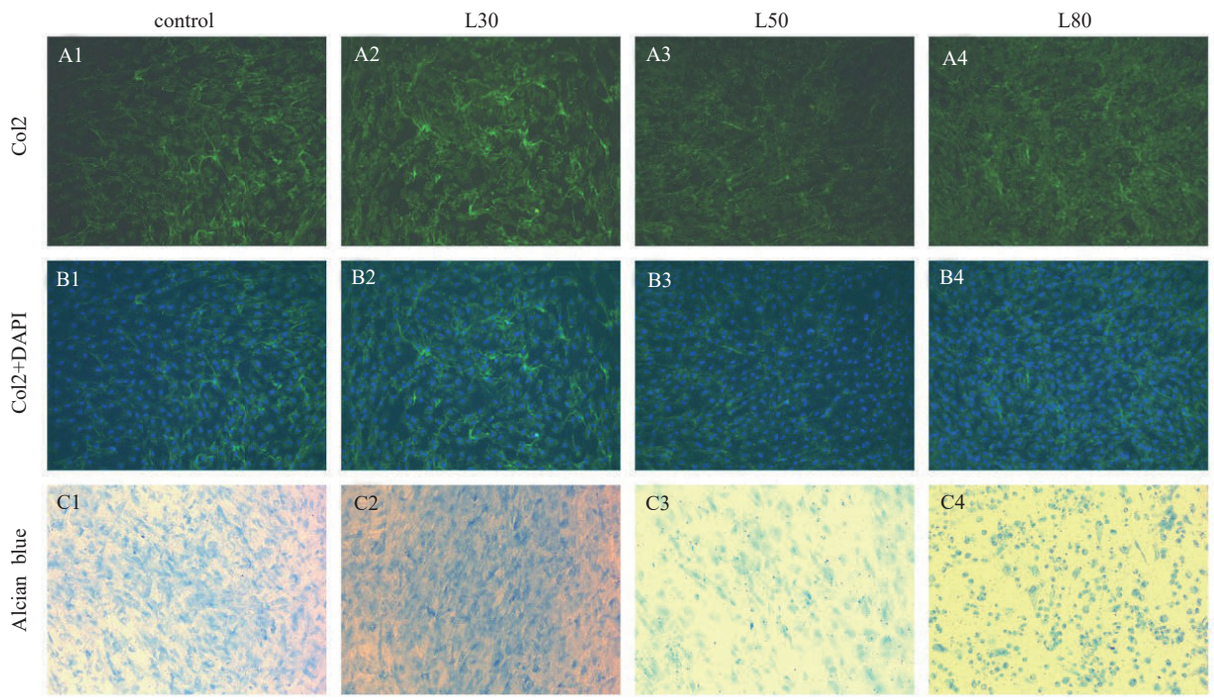


A、B分别为hUCMSCs（P4）给予不同强度和时间的脉冲超声刺激14d后GAG和Col2 Elisa检测结果。L30、50、80分别代表不同刺激强度30、50、80mW/cm²），5、10、20代表不同刺激时间5、10、20min。①$P<0.05$

研究已渐趋成熟，目前均有成功运用其修复关节软骨缺损的临床报道[6—9]。本实验选择hUCMSCs作为研究对象，其来源广泛，取材方便，具有多向分化潜能，比BMSCs具有更强的增殖能力[3]、较低的HLA-ABC和HLA-DR表达[10—11]，更好的粘附性[11]和成软骨分化特性[12]，是理想的软骨组织工程种子细胞。

目前，组织工程构建的工程软骨存在许多不足。Ando W等[13]研究发现和正常软骨相比，工程软骨浅层缺少胶原纤维结构，表面刚度和保水能力都较低。多数研究[1,14—15]表明，生理情况下多种机械应

图6 各组软骨特异性蛋白GAG及Col2的定性分布及比较



阿尔新蓝染色结果(×200)C2图中被阿尔新蓝染色面积较大。细胞免疫荧光染色结果(×100)LIPUS刺激复合诱导组和单纯诱导组中均有绿色荧光(Ⅱ型胶原蛋白)和蓝色荧光(细胞核),A2中绿色荧光强度更强

A2、A3、A4分别代表LIPUS刺激复合诱导组强度30mW/cm^2、50 mW/cm^{2}和80mW/cm^2,A1为诱导对照组,在细胞培养14d给予阿尔新蓝细胞染色;在细胞培养28d时细胞免疫荧光检测Col2a1,DAPI染色细胞核。

力刺激包括间歇性压力、流体静压力、剪切力、张力及微重力,在人体软骨组织的再生和重建起着非常重要的作用,间充质干细胞在应力刺激下募集、增殖及向成软骨细胞分化,是新软骨形成的细胞学基础。LIPUS作为高频小振幅脉冲压力波传递机械应力,整合了压应力和流体剪切力同时具有空化效应的特点成为研究者们运用于干细胞等领域研究的热点。

LIPUS影响hUCMSCs成软骨分化效率的可能机制如下:①机械效应:LIPUS是一种通过物理机械刺激产生作用的纵向机械波,通过机械感受器,如牵张激活通道和整合素,进一步激活软骨细胞的JNK和ERK信号转导通路,从而提高II型胶原和糖胺多糖的表达[16]。②热学效应:LIPUS在传播的媒介内产生交替变化的机械压缩波,增加分子振动和相互碰撞的机会,从而使细胞生存的微环境温度稍增高(<1℃),有些酶(如胶原酶)对温度的变化非常敏感,故LIPUS可通过增强酶的活性促进细胞代谢,并抑制细胞凋亡,增加间充质干细胞活性,促进软骨细胞的分化[17]。③空化效应:LIPUS可产生稳态的空化作用,其形成的空化泡通过微声流作用产生剪切力使细胞产生剪力变形,可能通过直接影响细胞骨架改变成软骨相关基因表达。Alves等[18]用培养基灌注的方式模拟体内滑液对流体关节产生的剪切应力,说明流体剪切应力有利于人间充质干细胞向软骨分化。Lu等[19]进一步研究发现流体剪切应力速率可以调控间充质干细胞向成骨或软骨细胞的分化。

通过研究,我们发现hUCMSCs在体外增殖能力强,多代扩增后仍具有较强的增殖活性。进一步研究LIPUS刺激对hUCMSCs增殖活性的影响时,我们发现适宜参数的LIPUS刺激促进细胞增殖,以(50mW/cm^2、5min/d)最显著,但随着刺激强度增大和刺激时间的延长,细胞的增殖能力下降,提示LIPUS刺激具有促进和抑制细胞增殖的双重作用。不过,关于LIPUS刺激是否对细胞有增殖效应存在争

议，Yoon JH等[3]的研究认为LIPUS可以促进脐带干细胞增殖并提高人脐带中MSCs的产量，但未对促进细胞增殖的刺激强度参数进行具体的实验筛选，相反，Tien YC等[20]研究则认为LIPUS无促软骨细胞增殖效应。我们考虑上述结果的差异和实验采用的不同LIPUS仪器参数以及细胞种类、接种细胞量和细胞培养方式等有关。

本实验中阿利新蓝染色和Col2免疫荧光染色证实hUCMSCs在体外成软骨诱导作用下能够向软骨细胞方向分化，并且从图1c和d我们发现单纯的力学刺激尚不能有效的诱导间充质干细胞向软骨样细胞分化，这与虞冀哲等[21]的研究结论一致。在进一步研究LIPUS刺激对hUCMSCs成软骨分化的影响时，我们在显微镜下观察时发现在实验14天后，各实验组在5min/d时细胞状态优于10、20min/d各组，并且L30组细胞较对照组更为扁平宽大，在10、20min/d中各实验组随着刺激强度或刺激时间增加，细胞贴壁状态变差（见图3）。行细胞阿利新蓝染色和Col2细胞免疫荧光时发现LIPUS刺激5min/d时L30组较对照组蓝染更深，Col2细胞免疫荧光强度也更大。通过ELISA实验进一步验证，结果为LIPUS刺激5min/d时，L30组软骨细胞特异性细胞外基质GAG和Col2的浓度较单纯诱导组大且有显著差异，随着LIPUS刺激强度和刺激时间增加，两种物质的含量降低（图4a/b）。本实验结果说明LIPUS刺激能促进软骨特异性胞外基质的分泌，这与Tien YC等[20]的研究结论一致。本次实验LIPUS刺激对细胞增殖和成软骨分化的最佳刺激时间一致，但最佳刺激强度不一致，提示我们在研究LIPUS刺激在组织工程中的应用时应综合考虑两者的差异，选取最佳刺激参数。

本研究初步发现，LIPUS刺激5min/d时50mW/cm^{2}有利于hUCMSCs增殖，随着刺激强度和每天刺激时间增加，细胞增殖率降低。在生物活性因子存在时LIPUS可以促进hUCMSCs成软骨分化，在不影响细胞增殖的前提下5min/d、30mW/cm^{2}是最佳刺激条件。当然，应力刺激下人脐带间充质干细胞成软骨分化中的力学信号转导机制需要进一步研究。

参考文献

[1] Choi JR, Yong KW, Choi JY. Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering[J]. J Cell Physiol,2018,233(3):1913—1928 .

[2] Cook SD, Salkeld SL, Popich-Patron LS, et al. Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound[J].Clin Orthop Relat Res,2001,(391Suppl):S231—243.

[3] Yoon JH,Roh EY,Shin S,et al. Introducing pulsed low-intensity ultrasound to culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J].Biotechnol Lett,2009,31(3):329—335.

[4] Xu P, Gul-Uludag H, Ang WT, et al. Low-intensity pulsed ultrasound-mediated stimulation of hematopoietic stem/progenitor cell viability, proliferation and differentiation in vitro[J]. Biotechnol Lett, 2012,34(10): 1965—1973.

[5] Aliabouzar M, Zhang LG, Sarkar K. Lipid Coated Microbubbles and Low Intensity Pulsed Ultrasound Enhance Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in 3D Printed Scaffolds[J]. Sci Rep, 2016, 6: 37728.

[6] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation[J]. N Engl J Med,1994,331(14): 889—895.

[7] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am,1994,76(4): 579—592.

[8] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(3): 199—206.

[9] Zellner J, Pattappa G, Koch M, et al. Autologous mesenchymal stem cells or meniscal cells: what is the best cell source for regenerative meniscus treatment in an early osteoarthritis situation[J]. Stem Cell Res Ther,2017, 8(1): 225.

[10] 吕璐璐,宋永平,魏旭东,等.人脐带和骨髓源间充质干细胞生物学特征的对比研究[J].中国实验血液学杂志,2008,(1):140—146.

[11] Fong CY, Subramanian A, Gauthaman K, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment[J]. Stem Cell Rev,2012, 8(1): 195—209.

[12] Wang L, Tran I, Seshareddy K, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15 (8): 2259—2266.

[13] Ando W, Fujie H, Moriguchi Y, et al. Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells[J]. Eur Cell Mater, 2012, 24: 292—307.

[14] 易飞舟, 赵萤, 赵寅华, 等. 流体静压力调控下Rac1信号通路在大鼠BMSCs成软骨响应中的作用[J]. 牙体牙髓牙周病学

（下转第520页）