

· 基础研究 ·

人股骨头骨微血管内皮细胞的分离培养方法

路玉峰^{1,2}, 俞庆声¹, 郭万首^{1,2}, 程立明¹, 张韞³

(1. 中日友好医院骨关节外科, 北京 100029; 2. 北京协和医学院研究生院, 北京 100730; 3. 中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

【摘要】 目的:探讨培养人股骨头骨微血管内皮细胞分离培养方法。**方法:**2013 年 10 月至 2014 年 1 月 15 例行髋关节置换患者切除的内部无病变的股骨头, 男 2 例, 女 13 例; 年龄 38~92 岁, 平均 71.2 岁。无菌条件下将股骨头内松质骨咬成碎骨粒, 放入培养基。采用酶消化法, 密度梯度离心法分离细胞; 差速贴壁法, 选择性培养基法纯化细胞。倒置显微镜观察细胞特点, 并采用 vWF、CD31 免疫荧光进行细胞鉴定。**结果:**原代培养 24 h 后倒置显微镜下观察细胞数量与患者年龄呈正相关, 年龄越大细胞越少。培养 4~5 d 细胞呈短梭形、多角形或“鹅卵石”状。培养 7~10 d 细胞生长密集, 细胞融合呈漩涡状, 接触抑制明显。vWF、CD31 免疫荧光检测阳性率 100%, 表明细胞为骨微血管内皮细胞。**结论:**人股骨头骨微血管内皮细胞分离培养方法简单、稳定、有效、可重复性好, 可以获得纯度较高的股骨头骨微血管内皮细胞。

【关键词】 股骨头; 微血管; 内皮细胞; 细胞培养技术; 细胞分离

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.10.011

A method for isolated culture of bone microvascular endothelial cells of human femoral head LU Yu-feng, YU Qing-sheng, GUO Wan-shou*, CHENG Li-ming, and ZHANG Yun. *Department of Bone and Joint Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

ABSTRACT Objective: To investigate the method of separation of culture of bone microvascular endothelial cells (BMECs) of human femoral head in vitro. **Methods:** From October 2013 to January 2014, 15 femoral heads without pathologic change from patients resected during hip replacement were selected involving 2 males and 13 females with a mean age of 71.2 years old ranging from 38 to 92. Cancellous bone in femoral head was bited into broken bone grain and transfered into medium in aseptic contidion. Cells were isolated by the methods of enzymic digestion and density gradient centrifugation, purified by differential attachment. The characteristics of cells was observed by inverted microscope. vWF and CD31 immunofluorescence analysis was applied for identification of cells. **Results:** The number of cells was positively correlated with patients' age after 24 hours in primary culture. The older patients had the less cells numbered. After 4 to 5 days' culture, primary cells appeared short spindle, polygon shaped and cobblestone-like morphology. After 7 to 10 days' culture, primary cells proliferated densely, became fusion, arranged in swirl, and contact inhibition appeared significantly. Immunofluorescence staining revealed the cells were 100% positive for vWF and CD31, and it showed that the cultured cells were BMECs. **Conclusion:** It was a simple, steady, effective method with good reproducibility, by which highly purified human BMECs can be obtained.

KEYWORDS Femur head; Microvessels; Endothelial cells; Cell culture techniques; Cell separation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(10): 843-847 www.zggszz.com

骨微血管内皮细胞 (bone microvascular endothelial cells, BMECs) 构成了骨内微血管的内衬, 与骨内其他成分联系密切, 参与了许多骨的病理生理过程, 在骨吸收、新骨的形成、血管再生, 营养物质转运、骨内代谢产物输出及维持骨内微环境平衡方面具有重

要作用。非创伤性股骨头坏死是一种常见的难治性髋关节病变, 其特点是骨细胞及骨髓成分死亡及随后的修复, 继而导致股骨头结构改变, 股骨头塌陷, 引起患者关节疼痛及关节功能障碍, 其病因及发病机制仍不明确, 存在很多争论。研究认为, 股骨头 BMECs 的损伤及功能障碍可能在股骨头坏死发病过程中占有重要地位^[1-2]。因此, 使用股骨头 BMECs 来研究股骨头缺血性坏死的病因、发病机制以及治疗具有十分重要的意义。股骨头 BMECs 分离及体外培养操作复杂、难度较大、成本高、方法不成熟、可重复性差。本实验室前期采用了酶消化法、密度梯度离

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81273972)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81273972)

通讯作者: 郭万首 E-mail: guowanshou@263.net

Corresponding author: GUO Wan-shou E-mail: guowanshou@263.net

心法成功分离并培养出人股骨头 BMECs。本研究在前期实验基础上对部分技术细节加以改进并进行简化,建立了一种简易、稳定的人的股骨头 BMECs 的分离、培养方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取自 2013 年 10 月至 2014 年 1 月,在中日友好医院骨关节科住院行髋关节置换患者的股骨头。取材标准:股骨颈骨折,股骨粗隆间骨折,原发性髋关节骨关节炎,先天性髋关节发育不良继发髋关节骨关节炎,创伤性骨关节炎需行髋关节置换患者。排除标准:股骨头缺血性坏死,强直性脊柱炎、类风湿性关节炎等炎症性关节病变累及髋关节,血友病髋关节病变,髋关节结核,化脓性感染,髋关节周围肿瘤等患者。

共 15 例患者符合上述取材标准,其中男 2 例,女 13 例;平均年龄 71.2(38~92)岁。其中股骨颈骨折 7 例,股骨粗隆间骨折 3 例,原发性髋关节骨关节炎 2 例,先天性髋关节发育不良继发髋关节骨关节炎 3 例。所有患者对实验知情同意,并签署了知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 明胶(Sigma-Aldrich), I 型胶原酶(北京索莱宝科技有限公司),胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25% trypsin+0.53 mM EDTA,北京索莱宝科技有限公司),胎牛血清(四季青,浙江天杭生物科技有限公司),M199 内皮细胞培养基(Hyclone),低糖 DMEM 培养基(Hyclone),PBS(Gibco),HBSS(Gibco),青、链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司),人源性血管内皮细胞生长因子(北京义翘神州生物技术有限公司),肝素钠(南京新百药业有限公司),TritonX-100(北京索莱宝科技有限公司),Hoechst33342(Sigma-Aldrich),I 抗:抗体同型对照 Rabbit IgG(H+L)(北京博奥森生物技术有限公司);Anti-CD31(PECAM-1)(北京博奥森生物技术有限公司);Anti-vWF(北京博奥森生物技术有限公司);II 抗:Goat Anti-rabbit IgG / FITC,(北京博奥森生物技术有限公司)。超净台(北京世安科林净化技术有限公司),倒置相差显微镜(Olympus IX71),CO₂ 孵箱(GalaxyR,Eppendorf),离心机(Sigma-Aldrich,3K30)等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离 取髋关节置换时切除的符合取材标准的人股骨头,手术室无菌条件下去除标本的软组织及软骨部分,将股骨头内松质骨用咬骨钳咬成碎骨粒(图 1),放入装有 30 ml 肝素化、无血清的低糖 DMEM 培养基的 50 ml 离心管,带至实验室。将

标本反复震荡 3~5 min,去除培养基及上层油脂,加入 37 °C 预热的适量 HBSS 液,再次震荡,重复 2~3 次,至冲洗液澄清,将油脂及骨松质颗粒网孔内的杂质震荡下来。然后去除骨粒内冲洗液,尽量去除干净。向股骨头骨组织加入含 1.5%~2% I 型胶原酶的 DMEM 培养基,液体水平略高于骨粒平面。37 °C 水浴消化 30 min~1 h,倒掉培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶 0.53 mM EDTA 的消化液,胰蛋白酶终浓度为 0.1%。37 °C 水浴消化 5~10 min。用 70 μM 的细胞筛过滤掉油脂及细小骨粒,收集消化液,并再次加入 DMEM 培养基反复震荡,使用细胞筛收集细胞液。重复 2~3 次。将滤过的细胞悬液 20 °C 2 000 r/min 离心 10 min。离心结束后可见管底有少量细胞。将离心后的细胞先用 DMEM 培养基悬于不含明胶的培养皿内,1 h 后收集培养基,再次离心,最后将细胞接种在 10 ml 完全性内皮细胞培养基(成分为:M199 培养基,含 100 μg/ml 链霉素,100 U/ml 青霉素,10 ng/ml 血管内皮细胞生长因子,40 U/ml 肝素,20% 胎牛血清),含有 2% 的明胶直径 10 cm 培养皿内。37 °C 5% CO₂ 环境培养。

1.2.2 细胞的原代培养 细胞在 5%CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h 后,细胞贴壁,给予细胞换液,换液时轻轻摇晃培养皿,以便在更换培养基的同时清除没有贴壁的细胞和杂质。如没有贴壁的细胞和杂质较多时,可再使用 37 °C 预热的 HBSS 液洗 1~2 遍。36~48 h 后进行第 2 次换液。以后每 3~5 d 根据培养基的颜色改变换液 1 次。

1.2.3 细胞的纯化和传代培养 细胞培养 7~10 d,细胞单层密集生长超过培养皿底面积的 80% 给予传代,以 0.25% 胰蛋白酶/0.53% EDTA 消化 3~5 min,待大部分细胞变圆后,立即加入低糖 DMEM 培养基终止消化,并用移液器轻轻吹打使细胞脱壁。收集细胞悬液,20 °C 2 000 r/min 离心 10 min。去上清,轻轻拍打管底,使细胞游离,加入内皮细胞培养基,移液管吹打使细胞分布均匀,按 1:2 比例接种于直径 10 cm,2% 明胶包被的细胞培养皿内。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 形态学观察 采用倒置显微镜观察原代和传代细胞的形态和生长情况。

1.3.2 免疫组织化学染色 VIII 因子相关抗原(vWF)表达:取 2~3 代培养细胞,消化接种于直径 6 cm、2% 明胶包被有盖玻片的培养皿内,待细胞爬满玻片后取出,PBS 洗 5 min×3 次,室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 5 min×3 次,0.05% 的 TritonX-100 4 °C 孵育 10 min 后,吸去 Triton 液,再次 PBS 洗 5 min×3 次,加入 10% 胎牛血清室温封闭

60 min, 兔抗人 vWF 多克隆抗体(1:200)4 ℃孵育过夜, PBS 5 min×3 次, 加异硫氰酸荧光素标记的 II 抗和 Hoechst33342。II 抗为山羊抗兔 IgG, 室温孵育 90 min。最后将细胞爬片用抗荧光衰减封片剂固定在黏附载玻片上。同源同型抗体作为阴性对照。CD31 表达: I 抗为兔抗人 CD31(PECAM-1)抗体; II 抗为异硫氰酸荧光素标记的山羊抗兔 IgG。同源同型抗体作为阴性对照。操作同 vWF。

2 结果

2.1 细胞的形态学观察 原代培养 2~3 d 可见细胞基本呈梭形或多角形, 散在分布, 原代培养过程中偶尔可见集落生长情况。BMECs 的细胞数量与患者年龄直接相关, 年轻患者(<50 岁)的 BMECs 分离 24 h 后倒置显微镜下观察, 可见细胞分布较为均匀, 低倍放大倍数(10 目镜×10 物镜), 每个视野有 60~100 个细胞(图 1a)。而随着患者年龄增长, 每视野中 BMEC 的细胞数量逐渐减少, 85 岁以上患者每视野仅可见 1~2 个细胞, 偶可见细胞集落多达 10 余个(表 1)。培养 4~5 d 后细胞呈短梭形、多角形、“鹅卵石”或“铺路石”状(图 1b), 生长速度加快。培养 7~10 d, 单层生长的细胞可铺满大部分培养皿底, 部分细胞呈密集生长状态, 融合的细胞群呈漩涡状, 发生明显的生长接触抑制, 此时可进行传代。通过更换原代培养细胞的培养液, 已经可以去掉取材过程中产生的大部杂质, 残留的杂质也可通过传代过程清除掉。与原代细胞相比, 传代培养细胞的形态差异明显减小, 多呈长梭形、多角形或分枝状(图 1c)。

表 1 原代 BMECs 培养 24 h 倒置显微镜下细胞分布情况

Tab.1 Distribution of cells observed by inverted microscope after 24 h in primary BMECs culture

年龄	性别(例)		细胞密度(10 目镜×10 物镜)
	男	女	
<50 岁	0	3	60~100/视野
50~85 岁	1	5	25~40/视野
>85 岁	0	3	1~10/视野

2.2 免疫组织化学染色鉴定结果

2.2.1 血管性血友病因子(von Willbrand Factor, vWF) 鉴定 荧光染料 Hoechst33342 结合染色体, 在显微镜下呈现蓝色荧光, 对细胞核进行了定位(图 1d)。表达 vWF 的细胞经过标记异硫氰酸荧光素(FITC)的抗体染色后, 在荧光显微镜下观察其细胞浆阳性呈黄绿色荧光(图 1e)。而 FITC 标记的同型抗体作为一抗染色, 细胞浆没有激发出荧光(图 1f)。从临床样品分离出的细胞均能表达 vWF, 表明这些

细胞具有血管内皮细胞的特征, 阳性率 100%。

2.2.2 CD31 鉴定 参照 Hoechst33342 细胞核染色图片(图 1g), FITC 标记的 CD31 抗体染色细胞在荧光显微镜下均呈黄绿色(图 1h), CD31 的同型抗体作为一抗染色, 结果呈阴性(图 1i)。CD31 的免疫荧光染色结果证明, 培养细胞为血管组织来源, 且具有内皮细胞特征, 阳性率 100%。

3 讨论

微血管内皮细胞遍布全身各种组织器官, 具有调节细胞膜物质转运及摄取; 调节凝血及纤溶; 合成和分泌血管活性物质; 参与炎症, 免疫反应以及血管生成; 具有肿瘤细胞黏附及促进成骨等作用。微血管内皮细胞具有器官特异性, 根据细胞的连续性及其基底膜的特点可分为 3 种^[3]: ①连续性内皮细胞, 主要分布在肺、脑、皮肤、皮下组织和黏膜组织; ②带有窗孔的内皮细胞, 主要分布于肠黏膜, 内、外分泌腺体等; ③不连续内皮细胞, 主要位于骨髓、肝和脾内。股骨头微循环血管主要表现为血窦, 内皮细胞有窗孔, 无隔膜, 间隙较大, 内皮基底膜不完整或缺如, 呈断续状, 有利于成熟的红细胞穿过。

有关非创伤性股骨头坏死的体外细胞学研究, 多数文献使用骨髓基质干细胞^[4-6], 部分研究使用了成骨细胞^[7]、破骨细胞^[8], 也有不少文献使用脐静脉内皮细胞^[9]及内皮前体细胞^[10]。目前除了本中心^[11]尚未发现有国内外使用股骨头源的骨微血管内皮细胞来研究股骨头缺血性坏死。

本试验共分离了 15 例患者的股骨头微血管内皮细胞, 失败了 3 例, 失败的原因可能是在分离过程中 I 型胶原酶的浓度偏低。笔者的经验是 I 型胶原酶的浓度在 0.15%~0.2% 范围内是安全的, 消化时间在 30 min~1 h 之间。I 型胶原酶将内皮细胞从骨小梁壁上消化下来后, 使用 0.1% 的胰蛋白酶可以将相互连接的内皮细胞消化成单个内皮细胞。收集细胞消化液时, 不要仅仅收集离心管内的液体, 需要再用培养基冲洗 1 遍, 收集第 2 次冲洗液, 第 3 次冲洗液细胞量已经很少。冲洗 2 次后, 即可以将标本弃去。离心后在处理离心液时, 应先将上面漂浮的脂肪去除, 否则在去除培养基时, 管底容易残留较多脂肪, 以致接种细胞时细胞培养基内有较多脂肪组织。此外, 内皮细胞培养基内要有适当浓度的肝素, 因为肝素能明显增强 VEGF 对内皮细胞增殖的促进作用^[12]。

关于股骨头 BMECs 的纯化, 本实验在酶消化之前将含有培养基的股骨头松质骨用力震荡 10~15 min, 并反复更换培养基, 直至震荡后液体澄清, 以去除血液内杂质细胞。原代培养过程中细胞内可

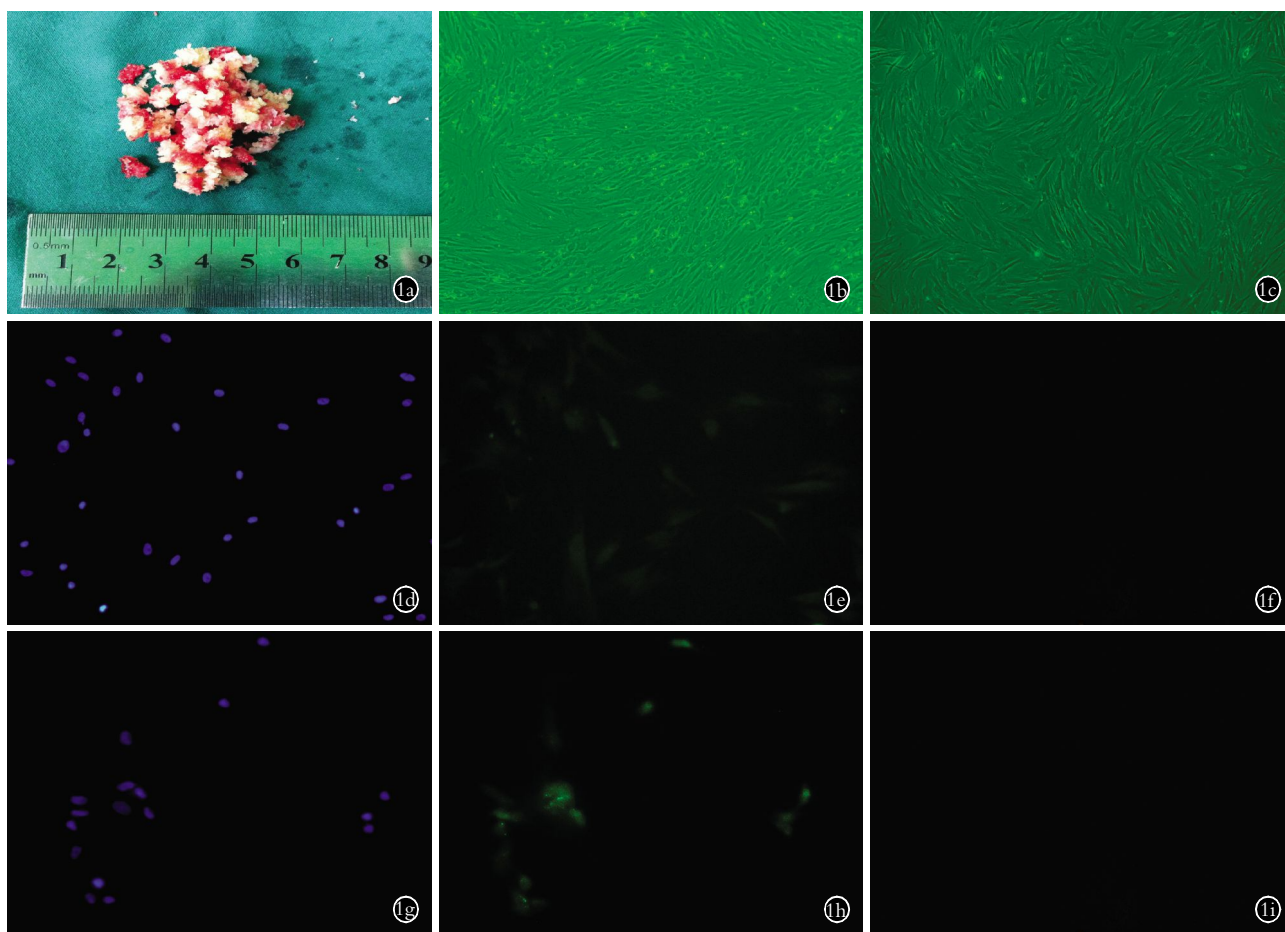


图 1 患者,女,62 岁,因右侧股骨颈骨折行人工股骨头置换术后留取股骨头 **1a**. 无菌条件下,将其内部松质骨咬成小骨粒 **1b**. BMECs 原代培养 4~5 d,已呈现部分融合生长,倒置相差显微镜下观察,可见细胞呈“铺路石”或“鹅卵石”状($\times 100$) **1c**. BMECs 传代培养至第 3 代,细胞多呈长梭形、多角形或分枝状生长($\times 100$) **1d**. 免疫荧光 Hoechst33342 染色显示细胞核(Hoechst $\times 200$) **1e**. BMECs vWF 免疫荧光染色呈阳性(vWF-FITC $\times 200$) **1f**. 免疫荧光同型抗体作为一抗染色呈阴性(Isotype-FITC $\times 200$) **1g**. 免疫荧光 Hoechst33342 染色显示细胞核(Hoechst $\times 200$) **1h**. BMECs CD31 免疫荧光染色呈阳性(CD31-FITC $\times 200$) **1i**. 免疫荧光同型抗体作为一抗染色呈阴性(Isotype-FITC $\times 200$)

Fig.1 Cancellous bone in the femoral head from a 62-year-old woman with fracture of the right femoral neck after hemiarthroplasty of the hip **1a**. Cancellous bone in the femoral head was bitten into broken bone grain under sterile condition **1b**. BMECs grew at a partly fusion and showed cobblestone or slabstone morphology after 7 days in primary culture (magnification $\times 100$) **1c**. BMECs on the 3rd passage demonstrated spindle, polygon and dendritic-shaped appearance (magnification $\times 100$) **1d**. The cell nucleus were positive in staining with Hoechst33342 (Hoechst $\times 200$) **1e**. The immunohistochemical staining was positive by von Willebrand factor (vWF) in BMECs (vWF-FITC $\times 200$) **1f**. The immunohistochemical staining was negative by homotypic antibody as primary antibody (Isotype-FITC $\times 200$) **1g**. The cell nucleus was positive in staining by Hoechst33342. (Hoechst $\times 200$) **1h**. The immunohistochemical staining was positive by CD31 antibody in BMECs (CD31-FITC $\times 200$) **1i**. The immunohistochemical staining was negative by homotypic antibody as primary antibody (Isotype-FITC $\times 200$)

能混有少量成纤维细胞。本实验采用差速贴壁法去除成纤维细胞的污染。成纤维细胞具有很强的贴壁能力,5% CO₂, 37 °C 培养条件下 1 h 贴壁^[13]。将离心后的细胞先悬浮于不含明胶的培养皿内,1 h 后收集培养基,再次离心,再将细胞接种于含有 2% 的明胶的培养皿内,之后通过完全性内皮细胞培养基换液及酶消化传代,进一步去除了杂质细胞。该方法能有效地去除成纤维细胞的污染,得到纯度高的股骨头骨 BMECs。

BMECs 与其他组织的微血管内皮细胞形态学上相似,呈典型的“铺路石”或“鹅卵石”状。但

BMECs 的鉴定更重要的是其具有特异性细胞因子。VIII 因子相关抗原是血管内皮细胞一个可靠的标记物。VIII 因子复合物包括两部分,vWF (99%)以及与之连接的 VIII 因子(1%),vWF 具有两方面的功能:①促进血小板黏附内皮下基质;②连接 VIII 因子与凝血块。VIII 因子相关抗原即是指 vWF。vWF 主要在内皮细胞内合成,是体外培养的内皮细胞可靠的特异性标记物^[3]。CD31 又称为血小板-内皮细胞黏附分子,是一种内皮细胞连接分子,通常位于血管内皮细胞间的紧密连接处,常作为血管内皮细胞标志物之一。原代培养的细胞呈“铺路石”外观及 vWF、

CD31 免疫荧光检测阳性率 100%均证明了本实验培养的细胞是股骨头 BMECs。

本实验方法简单、经济、稳定,可重复性好,能获得纯度较高的股骨头 BMECs,对研究股骨头缺血性坏死的发病机制乃至坏死区域的重建,提供了重要的细胞基础。

参考文献

- [1] Starklint H, Lausten GS, Arnoldi CC. Microvascular obstruction in avascular necrosis. Immunohistochemistry of 14 femoral heads[J]. Acta Orthop Scand, 1995, 66(1):9-12.
- [2] Kang P, Shen B, Yang J, et al. Circulating platelet-derived microparticles and endothelium-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. Thromb Res, 2008, 123(2):367-373.
- [3] Angelis ED, Moss SH, Pouton CW. Endothelial cell biology and culture methods for drug transport studies[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996, 18:193-218.
- [4] Yin TC, Wang CJ, Yang KD, et al. Shockwaves enhance the osteogenic gene expression in marrow stromal cells from hips with osteonecrosis[J]. Chang Gung Med J, 2011, 34(4):367-374.
- [5] Xie XH, Wang XL, He YX, et al. Promotion of bone repair by implantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(5):1562-1571.
- [6] Wang Y, Li J, Liu M, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in steroid-induced adipogenic differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells of rabbit using small interference RNA[J]. Chin Med J Engl, 2014, 127(1):130-136.
- [7] 童培建, 许良, 胡柏松, 等. 右归饮对激素股骨头坏死大鼠体外诱导培养成骨细胞作用的研究[J]. 中国骨伤, 2010, 23(1):23-27.
Tong PJ, Xu L, Hu BS, et al. In vitro induction studies of *Yougui* drink on culture of steroid induced necrosis of femoral head rat osteoblast[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(1):23-27. Chinese with abstract in English.
- [8] 童培建, 肖鲁伟, 季卫锋, 等. 脂质代谢及破骨细胞活性在激素性股骨头坏死塌陷发生过程中的作用研究[J]. 中国骨伤, 2009, 22(2):110-113.
Tong PJ, Xiao LW, Ji WF, et al. Research on the role of metabolism of fatty substance and osteoclast activity during the development of steroid-induced necrosis of femoral head[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(2):110-113. Chinese with abstract in English.
- [9] Chang CH, Liao TC, Hsu YM, et al. A poly(propylene fumarate)-calcium phosphate based angiogenic injectable bone cement for femoral head osteonecrosis[J]. Biomaterials, 2010, 31(14):4048-4055.
- [10] Chen C, Yang S, Feng Y, et al. Impairment of two types of circulating endothelial progenitor cells in patients with glucocorticoid-induced avascular osteonecrosis of the femoral head[J]. Joint Bone Spine, 2013, 80(1):70-76.
- [11] 王佰亮, 李子荣, 娄晋宁, 等. 淫羊藿苷对糖皮质激素诱导的骨微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国微循环, 2009, 13(6):461-464.
Wang BL, Li ZR, Lou JN, et al. Protection of human bone microvascular endothelial cells from glucocorticosteroid induced cell injury by icariin in vitro[J]. Zhongguo Wei Xun Huan, 2009, 13(6):461-464. Chinese.
- [12] Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, et al. Heparin- II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism[J]. Circ Res, 2006, 99(8):853-860.
- [13] Haisch CE, Lodge PA, Huber SA, et al. The vascular endothelial cell is central to xenogenic immune reactivity[J]. Surgery, 1990, 108(2):306-311.

(收稿日期:2014-06-18 本文编辑:李宜)

·读者·作者·编者·

《中国骨伤》杂志正式启用稿件远程处理系统通知

《中国骨伤》杂志已于 2010 年 1 月正式启用稿件远程处理系统。通过网站 <http://www.zggszz.com> 可实现不限时在线投稿、审稿、编辑、退修、查询等工作。我刊不再接受纸质版和电子信箱的投稿。

欢迎广大的作者、读者和编者登录本刊网站,进入稿件处理系统进行网上投稿、审稿和稿件查询等工作。

咨询电话:010-84020925。

《中国骨伤》杂志社