

牙源性角化囊肿上皮细胞体外培养及其生物学特性

杨绍滨¹ 张静² 薛娇³ 庞宝兴⁴ 袁荣涛^{1,3}

(1 青岛大学口腔医学院, 山东 青岛 266003; 2 青岛市市立医院手术室;
3 青岛市市立医院口腔医学中心; 4 青岛大学附属医院口腔颌面外科)

[摘要] **目的** 探讨体外培养牙源性角化囊肿上皮细胞的方法, 并且比较牙源性角化囊肿和正常口腔黏膜(NOM)上皮细胞增殖能力的差异, 为牙源性角化囊肿的体外实验提供细胞模型。**方法** 采用酶消化法, 在角化细胞无血清培养基上原代培养牙源性角化囊肿和 NOM 上皮细胞。倒置显微镜下观察细胞形态学特征, 免疫荧光染色鉴定细胞表面标记物, 并通过生长曲线、克隆形成率和细胞周期分析比较两种细胞的增殖能力差异。**结果** 体外培养的牙源性角化囊肿上皮细胞表现为典型的上皮细胞铺路石样外观, 体外培养可传至 3~4 代。经过 CK、CK10、CK14、Vimentin 免疫荧光染色鉴定为角化上皮细胞。牙源性角化囊肿上皮细胞在生长速度、克隆形成率和增殖指数等方面均高于 NOM 上皮细胞。**结论** 采用酶消化法在角化细胞无血清培养基上可实现牙源性角化囊肿上皮细胞体外连续培养, 牙源性角化囊肿上皮细胞较 NOM 上皮细胞具有更强的增殖活力。

[关键词] 牙源性囊肿; 上皮细胞; 原代细胞培养; 细胞增殖

[中图分类号] R739.82 **[文献标志码]** A

IN VITRO CULTURE AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EPITHELIAL CELLS IN ODONTOGENIC KERATOCYST
YANG Shaobin, ZHANG Jing, XUE Jiao, PANG Baoxing, YUAN Rongtao (College of Stomatology, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the method for in vitro culture of odontogenic keratocyst (OKC) epithelial cells and the difference in proliferative capacity between OKC and normal oral mucosal (NOM) epithelial cells, and to provide a cell model for in vitro experiment of OKC. **Methods** Enzyme digestion was used for the primary culture of OKC and NOM epithelial cells in serum-free medium for keratinocytes. An inverted microscope was used to observe cell morphology; immunofluorescent staining was used to identify cell surface markers; growth curve, cloning efficiency, and cell cycle analysis were used to compared the difference in proliferative capacity between the two types of epithelial cells. **Results** OKC epithelial cells cultured in vitro had the typical cobblestone appearance of epithelial cells and were passaged to the third or fourth generation in vitro. They were identified as keratinized epithelial cells by immunofluorescence staining of CK, CK10, CK14, and vimentin. OKC epithelial cells had higher growth rate, cloning efficiency, and proliferation index than NOM epithelial cells. **Conclusion** Enzyme digestion can achieve continuous in vitro culture of OKC epithelial cells in serum-free medium for keratinocytes, and OKC epithelial cells have higher proliferative ability than NOM epithelial cells.

[KEY WORDS] Odontogenic cysts; Epithelial cells; Primary cell culture; Cell proliferation

牙源性角化囊肿(OKC)是一种常见的牙源性颌骨病损,1956年由 PHILIPSEN 首次报道,好发于上下颌磨牙区及下颌升支,因其具有较高的生长潜能和明显的复发倾向,近年来倍受关注^[1]。2005年第3版WHO头颈肿瘤分类将其归类为颌骨良性肿瘤,称为牙源性角化囊性瘤(KCOT)^[2],最新第4版(2017)WHO头颈肿瘤分类重新将其归类为牙源性囊肿,恢复使用牙源性角化囊肿这一术语代替牙源性角化囊性瘤^[3]。本实验利用原代培养技术,探索建立 OKC 上皮细胞体外培养体系,为 OKC 体外实验提供细胞模型,并研究其增殖动力学特性,分析增殖活力与侵袭性生长之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

OKC 上皮取自 2017 年 8 月青岛大学附属医院口腔颌面外科 3 例 OKC 病人的新鲜手术标本,分别为 13 岁男性、30 岁女性、31 岁男性。所有标本均经病理切片确诊为 OKC。本实验所有病人均签署书面知情同意书并由青岛大学附属医院医学伦理委员会批准通过(2016-04-28-05)。角化细胞无血清培养基(DK-SFM)购买于美国 Gibco 公司;Dispase II 分散酶购买于美国 Sigma 公司;胰蛋白酶(含有 EDTA)购自于美国 Hyclone 公司;Anti-wide spectrum cytokeratin (ab9377)、Anti-Cytokeratin 10 (ab76318)、Anti-Cytokeratin 14 (ab181595)及 Anti-Vimentin (ab92547)单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司;荧

[收稿日期] 2019-04-21; [修订日期] 2019-07-05
[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目(ZR2016HM34)
[通讯作者] 袁荣涛, Email: yuanrongtao@163.com

光(FITC)标记羊抗兔 IgG、DAPI 染液以及 DNA 含量(细胞周期)检测试剂盒购自中国索莱宝公司。

1.2 OKC 上皮细胞的分离、培养与鉴定

无菌条件下取 OKC 病人手术囊壁标本,立即采用含双倍青链霉素(青霉素 100 kU/L,链霉素 0.1 g/L)的 PBS 反复冲洗去污,4℃下浸泡 2 h。加入 1 g/L 的 Dispase II 消化液 4℃消化过夜,将上皮与下方纤维结缔组织剪切分离,并剪碎上皮,加入 0.5 g/L 胰蛋白酶室温消化 5~10 min,分散成单个细胞,用含体积分数 0.10 的胎牛血清终止消化,离心、重悬后,将细胞接种在 DK-SFM 培养基上,置于 37℃、含体积分数 0.05 CO₂ 培养箱中培养。72 h 后首次换液,以后每 2 天换液 1 次。当细胞铺满瓶底 70%~80%时,按 1:2 消化传代。传代后每 2 天换液 1 次,并在倒置显微镜下观察细胞的形态特点及生长状况。

将细胞按 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板内进行细胞爬片(爬片经多聚赖氨酸包被),待细胞爬满玻片后,用 40 g/L 多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min;吸水纸吸干 PBS,滴加山羊血清,室温封闭 30 min;滴加 1:100 稀释的 CK、CK10、CK14 以及 Vimentin 一抗,4℃孵育过夜。滴加 1:100 稀释的荧光(FITC)标记羊抗兔 IgG 二抗,湿盒中 37℃下孵育 1 h, PBST 浸洗 3 次,每次 3 min;滴加 DAPI 染液避光孵育 5 min,对标本进行染核;用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜下观察采集图像。

1.3 细胞增殖活力的检测

1.3.1 生长曲线的绘制 取对数生长期的 OKC 和正常口腔黏膜(NOM)上皮细胞,消化成单细胞悬液,以 1×10^4 个/孔接种于 48 孔板,每日计数 3 孔细胞取平均值,以时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制 2 种细胞的生长曲线并计算群体倍增时间。

1.3.2 克隆形成实验 取对数生长期的 OKC 和 NOM 上皮细胞,消化成单细胞悬液,以 200 个/皿分别接种在直径 6 cm 的培养皿中,置于 37℃、含体积分数 0.05 的 CO₂ 的培养箱中静置培养 2 周。当出现肉眼可见的克隆团时,终止培养,以 40 g/L 的多聚甲醛固定,加适量结晶紫染液染色。低倍镜下计数大于 50 个细胞的克隆数并计算克隆形成率。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.3.3 细胞周期分析 收集第 2 代生长良好的 OKC 和 NOM 细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 个/L。加入含体积分数 0.70 预冷的乙

醇溶液 4℃固定过夜。PBS 洗去固定液,向细胞沉淀中加入 100 μL RNase A 液,37℃孵育 30 min,再加入 400 μL 碘化丙锭(PI)染液混匀,4℃避光反应 30 min。流式细胞仪检测 488 nm 波长处细胞周期各时相 DNA 的含量,并用 ModFit 软件进行分析,并计算 DNA 指数(DI)、增殖指数(PI)以及 S 期细胞比率(SPF)。DI=样本细胞 G₀/G₁ 期细胞峰均道值/正常二倍体标准细胞 G₀/G₁ 期细胞峰均道值。PI=(S+G₂/M)/(G₀/G₁+S+G₂/M)×100%。SPF=S/(G₀/G₁+S+G₂/M)×100%。以人淋巴细胞为参照标准,变异系数(CV)约 5%。

1.4 统计学分析

所有实验均重复 3 次,采用 SPSS 22.0 软件包进行数据分析。计量实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组独立样本差异的比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 OKC 上皮细胞形态特点

采用酶消化法获得的 OKC 上皮细胞,加入无血清培养基 24 h 后开始贴壁生长,刚贴壁的细胞折光性较强,呈圆形或卵圆形。随后胞质展开,折光性下降,细胞呈多边形,形成克隆团并逐渐增殖融合成片。约 10 d 左右长满瓶底,细胞密集排列呈铺路石样外观。见图 1。

2.2 OKC 上皮细胞表面标志物鉴定

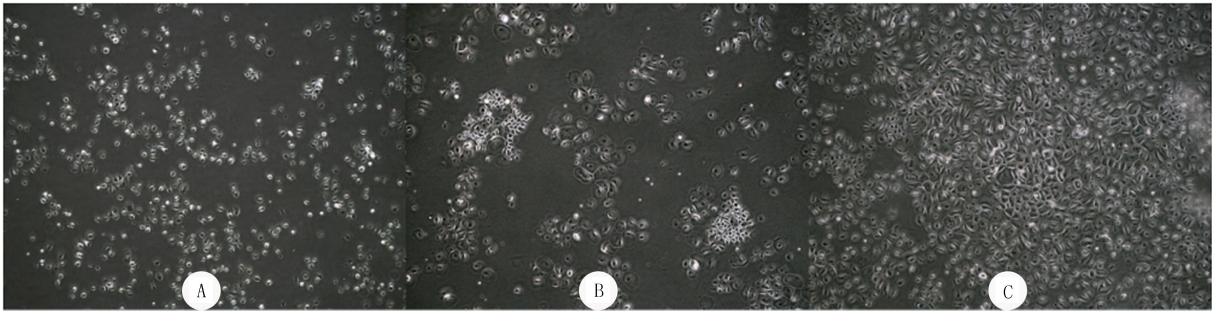
OKC 上皮细胞 CK、CK10、CK14 免疫荧光染色均为阳性,细胞浆呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光,Vimentin 免疫荧光染色阴性,仅细胞核被 DAPI 染成蓝色荧光。见图 2。

2.3 细胞生长曲线

OKC 和 NOM 上皮细胞的生长曲线均呈“S”形。细胞传代接种后,前 3 d 处于潜伏期,细胞生长缓慢;4~10 d 为对数生长期,细胞增殖旺盛;第 10 天以后进入平台期,细胞生长趋于平缓(图 3)。计算细胞的群体倍增时间(DT), $DT = (T - T_0) \lg 2 / (\lg N - \lg N_0)$, *T*、*T*₀ 分别表示培养开始和结束时间,*N*、*N*₀ 分别表示 *T*、*T*₀ 时间点的细胞数量,OKC 上皮细胞群体 DT 为 (39.7 ± 1.3) h, NOM 细胞为 (52.3 ± 0.4) h,差异具有统计学意义(*t* = -15.581, *P* < 0.05)。

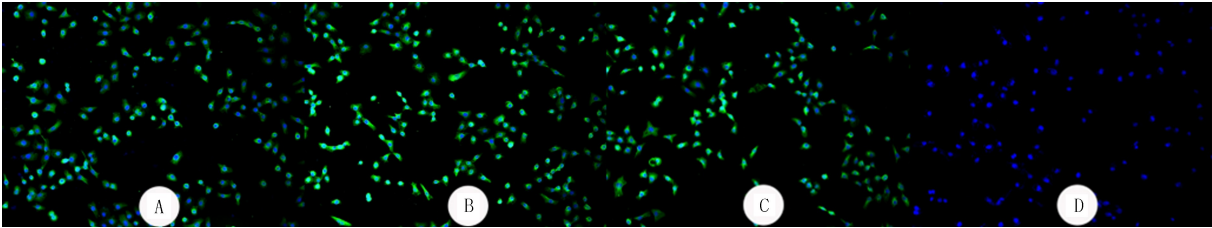
2.4 克隆形成率

将 OKC、NOM 上皮细胞分别以 200 个/皿密度接种至直径 6 cm 的培养皿中,培养 2 周后结晶紫



A:24 h 后细胞贴壁,呈圆形或卵圆形;B:5 d 后形成克隆团;C:10 d 后细胞长满瓶底,密集排列呈铺路石样。倒置相差显微镜,40 倍

图 1 OKC 原代上皮细胞



A:CK(+);B:CK10(+);C:CK14(+);D:Vimentin(-)。免疫荧光染色,200 倍

图 2 OKC 上皮细胞免疫荧光染色

染色可见克隆团形成(图 4)。OKC 上皮细胞克隆形成率为 $(19.5\pm1.5)\%$,NOM 上皮细胞克隆形成率为 $(9.2\pm1.0)\%$,差异具有统计学意义($t=9.803$, $P<0.05$)。

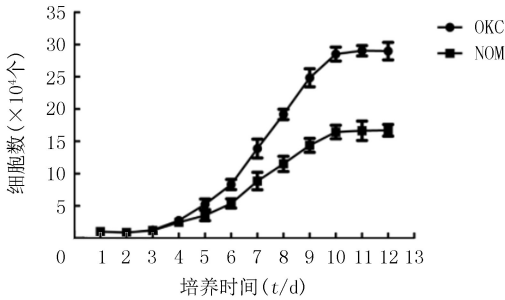


图 3 OKC、NOM 上皮细胞生长曲线

2.5 细胞周期分析

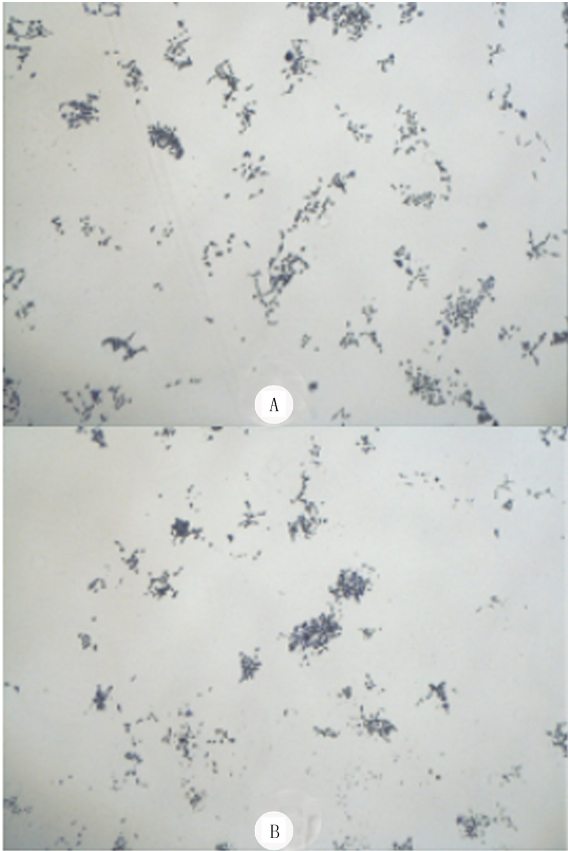
两种细胞流式仪检测结果显示,OKC、NOM 上皮细胞的 DI 值分别为 0.99 ± 0.03 、 1.03 ± 0.02 ,差异无统计学意义($t=-1.976$, $P>0.05$);PI 值分别为 $(41.53\pm1.56)\%$ 、 $(26.03\pm5.12)\%$,SPF 值分别为 $(28.17\pm1.42)\%$ 、 $(17.80\pm2.62)\%$,差异有统计学意义($t=5.013$ 、 6.032 , $P<0.05$)。

3 讨 论

OKC 虽为颌骨良性病变,但其生物学行为具有侵袭性,传统的刮治术术后复发率较高^[4-5]。通过免疫组化技术检测增殖细胞核抗原(PCNA)和 Ki67 等增殖相关指标在 OKC 和其他牙源性颌骨囊肿中的表达差异,发现 OKC 上皮的增殖细胞数显著高于含牙囊肿和根端囊肿^[6]。由于缺少合适的细胞模

型,目前关于 OKC 的体外研究很少。潘爽等^[7]对 OKC 上皮细胞进行了短期原代培养,但未进一步研究其生物学特性。

本实验借鉴 NOM 上皮细胞培养方法,对 OKC 上皮细胞进行体外连续培养并研究其增殖动力学特



A:OKC 上皮细胞;B:NOM 上皮细胞。结晶紫染色

图 4 OKC、NOM 上皮细胞克隆团

性^[8-9]。原代培养的第一步是取材,标本去污是防止细胞污染很重要的一个步骤,直接影响实验的成败^[10]。口腔是一个有菌的环境,定植于口腔中的细菌以 G^- 菌和兼性厌氧菌为主,主要包括链球菌属、葡萄球菌属、罗氏菌属以及奈瑟菌属等^[11]。传统的细胞培养多使用青链霉素混合液,青霉素对 G^+ 菌、 G^- 球菌以及多数厌氧菌有效,而链霉素对 G^- 杆菌有效,对厌氧菌无效,两种抗生素联用可增加其广谱性,杀灭口腔常见细菌。本实验采用青链霉素混合液处理 OKC 组织标本,原代培养过程中未发生污染。有效的分离上皮和上皮下方结缔组织可防止成纤维细胞污染,是 OKC 上皮细胞原代培养的另一关键步骤。研究发现,Dispase II 分散酶是一种中性蛋白酶,它可以选择性分解 IV 型胶原纤维和纤粘连蛋白,作用于半桥粒,而不破坏上皮之间的连接,从而完整分离上皮,最大程度地保留有增殖能力的基底细胞,避免成纤维细胞的污染^[12]。本实验发现 Dispase II 冷消化法可获得高纯度和高增殖活性的 OKC 上皮细胞。临床上继发感染的 OKC 纤维囊壁增厚,炎细胞浸润明显,上皮发生不规则增生,出现上皮钉突、角化丧失,上皮与下方结缔组织囊壁连接变紧密,难以将上皮和纤维结缔组织分离。实验取材时应选取炎症反应较轻的薄层囊壁组织,于显微镜下剪切分离,方可获得单一上皮。而对于无法完整分离的标本,可暂时将上皮细胞和成纤维细胞共同培养,因成纤维细胞在无血清培养基中不易贴壁生长,可通过换液将其去除。此外,与 NOM 上皮细胞一样,OKC 上皮细胞初次传代也存在消化困难、贴壁率低的问题,胰蛋白酶对上皮细胞的损伤是细胞不贴壁的重要原因。为此本研究采用低浓度(0.5 g/L)的胰蛋白酶以及 0.2 g/L 的 EDTA 混合液消化上皮,适当延长消化时间,降低了对细胞的损伤,有效地获得了足够数量的增殖能力较强的上皮细胞。本实验采用角化细胞无血清培养基,作为一种选择性培养基可避免成纤维细胞贴壁生长,有利于上皮细胞增殖。通过上述方法,本研究在体外成功培养出 OKC 原代上皮细胞。与口腔黏膜上皮细胞体外培养的研究结果相似,OKC 上皮细胞体外培养可传至 3~4 代,第 2~3 代细胞增殖旺盛,从第 4 代开始,出现个别体积较大的“巨细胞”,细胞形态变得不规则,出现伪足,胞浆内出现黑色颗粒和空泡,细胞衰老,增殖减缓^[13]。细胞生长周期约为 50 d。

选用 OKC 上皮细胞作为研究 OKC 的细胞模型,应首先确定是否为上皮来源。角蛋白是上皮细

胞的标志性蛋白,用于鉴别上皮和非上皮来源的细胞,且其表达具有组织特异性、部位特异性和分化特异性^[14]。研究结果表明角化囊肿的角蛋白表达谱有别于含牙囊肿和根端囊肿,某些特异性表达的角蛋白亚群可以作为 OKC 上皮细胞鉴定的表面标志物^[15-16]。CK10 特异性表达于 OKC 复鳞上皮角质细胞表面,是角化上皮的标志。CK14 只表达在复层上皮基底细胞,是复层上皮和增殖细胞的标志。本实验所培养的细胞 CK、CK10、CK14 表达均为阳性,证实为 OKC 上皮角质形成细胞。波形丝蛋白是间叶组织来源细胞的表面标志蛋白,本实验中 Vimentin 表达阴性,证明无成纤维细胞污染。

为进一步研究 OKC 上皮细胞的增殖活性,本实验选取 NOM 上皮细胞作为对照,从生长曲线、克隆形成率和细胞周期分布等方面分析比较 OKC 和 NOM 上皮细胞增殖能力的差异。生长曲线是观察细胞生长规律的基本方法,细胞生长速度在生长曲线上表现为对数生长期的曲线斜率,对数生长期上细胞数量增加 1 倍所用的时间为细胞倍增时间^[17]。从生长曲线上看,OKC 上皮细胞的生长速度快于 NOM 上皮细胞,说明 OKC 上皮细胞增殖能力比正常细胞更强。克隆形成率可对单个细胞的增殖潜力作定量分析,反映细胞的增殖能力和对环境的适应性,克隆形成率高表明生存能力强^[17]。癌细胞的克隆形成率在 95% 以上,而 OKC 上皮细胞的克隆形成率明显低于癌细胞,但是仍然高于正常细胞,说明 OKC 上皮细胞在体外具备一定的生存能力,但不具备癌细胞的恶性增殖能力。细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程,分为分裂间期与分裂期两个阶段。间期又分为三期,即 DNA 合成前期(G_1 期)、DNA 合成期(S 期)以及 DNA 合成后期(G_2 期),分裂期为 M 期。DNA 含量随细胞周期各时相而变化,细胞周期分析是观察细胞增殖状态和周期分布最常用的方法^[18]。 G_0/G_1 期细胞 DNA 含量为 2C,即为二倍体,DI 值为 1.0; G_2/M 期细胞 DNA 含量为 4C,即为四倍体,DI 值为 2.0;S 期细胞 DNA 含量 2C~4C,为异倍体,DI 值大于 2。正常细胞为二倍体,恶性肿瘤细胞多为异倍体。本实验结果显示,OKC 上皮细胞 DI 值为 0.99 ± 0.03 ,在正常二倍体范围,而 PI 和 SPF 均高于 NOM 上皮细胞,表明 OKC 上皮细胞较正常细胞具有更高的分裂增殖活性。细胞周期分析结果表明,OKC 上皮细胞为二倍体细胞,并未转化为恶性肿瘤细胞,但其细胞增殖活动较正常细胞更为

旺盛,这也从细胞水平解释了角化囊肿侵袭性生长的生物学行为。

综上所述,体外培养的 OKC 上皮角质形成细胞体现了 OKC 上皮典型的病理特点,具有较高的增殖活性。为了使 OKC 上皮角质形成细胞更具疾病模型的代表性,炎症因子、渗透压等内环境因素以及药物干预等体外因素对细胞增殖活性的影响仍有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] PAZDERA J, KOLAR Z, ZBORIL V, et al. Odontogenic kera-tocysts/keratocystic odontogenic tumours: Biological characteristics, clinical manifestation and treatment[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2014,158(2):170-174.

[2] MADRAS J, LAPOINTE H. Keratocystic odontogenic tumour: Reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour[J]. J Can Dent Assoc, 2008,74(2):165.

[3] SPEIGHT P M, TAKATA T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: Odontogenic and maxillofacial bone tumours[J]. Virchows Arch, 2018,472(3):331-339.

[4] JOHNSON N R, BATSTONE M D, SAVAGE N W. Management and recurrence of keratocystic odontogenic tumor: A systematic review[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013,116(4):271-276.

[5] 李铁军. 牙源性角化囊肿的生长与行为[J]. 中华口腔医学杂志, 2000,35(4):306-308.

[6] COSARCA A S, MOCAN S L, PACURAR M, et al. The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors[J]. Rom J Morphol Embryol, 2016,57(2):407-412.

[7] 潘爽,李铁军. 牙源性角化囊性瘤上皮细胞的体外培养及鉴定

(上接第 344 页)

[18] SCHUKNECHT H F. Positional vertigo: Clinical and experimental observations[J]. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol, 1962,66:319-332.

[19] SEMONT A, FREYSS G, VITTE E. Curing the BPPV with a liberatory maneuver[J]. Adv Otorhinolaryngol, 1988,42:290-293.

[20] LI J C, EPLEY J. The 360-degree maneuver for treatment of benign positional vertigo[J]. Otol Neurotol, 2006,27(1):71-77.

[21] 单希征,孙勃,龙顺波,等. 三维滚轮耳石复位系统及其临床应用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008,43(10):786-788.

[22] 孙勃,马丽涛,李娜,等. 前庭功能诊治系统 SRM-IV 在良性阵发性位置性眩晕中的应用[J]. 中华耳科学杂志, 2010,8(1):

[J]. 北京大学学报(医学版), 2009,41(1):28-31.

[8] 胡秀莲,王兴,林野,等. 人口腔黏膜角化上皮细胞的体外培养及生物学特性研究[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2004,2(3):173-176.

[9] 王翔,高文信,王莉,等. 口腔黏膜上皮细胞体外培养的影响因素分析及改进方法[J]. 华西口腔医学杂志, 2007,14(1):79-82.

[10] REID C B, CLOOS J, SNOW G B, et al. A simple and reliable technique for culturing of human oral keratinocytes and fibroblasts[J]. Acta Otolaryngol,1997,117(4):628-633.

[11] DICKINSON B C, MOFFATT C E, HAGERTY D, et al. Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers[J]. Mol Oral Microbiol, 2011,26(3):210-220.

[12] SUN H Y, ZHOU G M, WANG Q, et al. In vitro culture system for keratinocytes obtained from oral lichen planus lesions[J]. Clin Oral Investig, 2014,18(4):1195-1203.

[13] ZHOU Z T, ZHOU H W, SHANG Q X, et al. In-vitro cultivation of nomal human and Reralinocytes[J]. Chinese Medical Journal, 2001,114(7):731-734.

[14] CHU P G, WEISS L M. Keratin expression in human tissues and neoplasms[J]. Histopathology, 2002,40(5):403-439.

[15] STOLL C, STOLLENWERK C, RIEDIGER D, et al. Cyto-keratin expression patterns for distinction of odontogenic keratocysts from dentigerous and radicular cysts[J]. J Oral Pathol Med, 2005,34(9):558-564.

[16] TSUJI K, WATO M, HAYASHI T, et al. The expression of cytokeratin in keratocystic odontogenic tumor, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, radicular cyst and dermoid cyst[J]. Med Mol Morphol, 2014,47(3):156-161.

[17] 周曾同,黄吉燕. 人口腔异常增生上皮、正常上皮及鳞癌细胞生物学特性比较[J]. 临床口腔医学杂志, 2003,19(11):692-695.

[18] FILBY A, DAY W, PUREWAL S, et al. The analysis of cell cycle, proliferation, and asymmetric cell division by imaging flow cytometry[J]. Methods Mol Biol, 2016,1389:71-95.

(本文编辑 耿波 厉建强)

83-85.

[23] 张永斌,孙勃,彭新,等. 老年特发性良性阵发性位置性眩晕的复位治疗及其疗效的研究[J]. 中华耳科学杂志, 2015,13(2):282-287.

[24] 鞠骏 李进让 邹世桢,等. 高龄良性阵发性位置性眩晕患者的临床特点及短期疗效分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017,31(24):1872-1874.

[25] 刘西玲,张欣,鱼红,等. SRM-IV 型前庭功能诊疗系统对良性阵发性位置性眩晕的疗效观察[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017,9(10):71-74.

[26] 张淑南,杨荣礼,高修银,等. BPPV 诊疗系统治疗良性阵发性位置性眩晕疗效的 Meta 分析[J]. 空军医学杂志, 2019,35(1):83-86.

(本文编辑 耿波 厉建强)