

欧洲鳗鲡 *Anguilla anguilla* 尾鳍细胞系的建立以及不同生长因子对其增殖的影响

庄道华¹ 陈芸¹ 张子平² 王艺磊^{1*}

(¹集美大学水产学院, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 厦门 361021;

²Department of Biological Science, Seton Hall University, 新泽西州 07079, 美国)

摘要 取欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)尾鳍进行体外培养, 最终获得可连续传代的类纤维状的细胞系(欧洲鳗鲡尾鳍细胞系, European eel fin cell line, EEF)。探索不同传代比例对其生长增殖的影响。同时, 以MTT法分析不同生长因子[碱性成纤维生长因子(FGF-basic)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)]对其增殖、形态的影响。结果显示: EEF增殖受上述生长因子调节作用很小, 但是其形态却与FGF-basic的添加与否及其来源有很大关系。EEF细胞系的生长周期较目前所报道的欧洲鳗鲡细胞系快。染色体数目分析得出EEF的特征染色体数目为38条, 这是首次基于体外培养细胞系的欧洲鳗鲡染色体数目分析。EEF的增殖、生长特性使之适宜于进一步开展鳗鲡病毒学、细胞生物学、基因组学、遗传学以及资源保护等方面的研究。

关键词 欧洲鳗鲡; 细胞系; 尾鳍; 生长因子; MTT

Establishment of A Caudal Fin Cell Line from the European Eel *Anguilla anguilla* and the Impact of Different Growth Factors on Its Proliferation

Zhuang Daohua¹, Chen Yun¹, Zhang Ziping², Wang Yilei^{1*}

(¹Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education; Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; ²Department of Biological Science, Seton Hall University, New Jersey 07079, USA)

Abstract The caudal fin of European eel *Anguilla anguilla* has been successfully cultured *in vitro*, and the fibroblast-like cell line could be subcultured serially, which was named as EEF. In this study, the impact of different passage ratios on EEF's growth and proliferation was examined. Meanwhile, MTT assay analysis was employed to evaluate the effect of different growth factors including basic fibroblast growth factor FGF-basic, hepatocyte growth factor HGF, and epidermal growth factor EGF on proliferation and morphology of EEF. The results showed that the impact of different growth factors on the proliferation of EEF is insignificant, whereas there is significant effect of FGF-basic on the morphology of the cell line. Also the growth rate of EEF was faster than current available cell lines derived from European eel. Karyotype analysis of the cell line shows that the EEF cell has 38 chromosomes. It is the first time to report chromosome analysis based on the cell line cultured *in vitro* of European eel. In conclusion, the EEF is a suitable cell line for further research in cell biology, genomics, genetics and resource protection of European eel.

Key words European eel; cell line; caudal fin; growth factor; MTT

收稿日期: 2012-12-31 接受日期: 2013-02-22

集美大学创新团队基金(批准号: 2010A001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0592-6182723, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

Received: December 31, 2012 Accepted: February 22, 2013

This work was supported by the Innovation Team Foundation of Jimei University (Grant No.2010A001)

*Corresponding author. Tel: +86-592-6182723, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-05-09 15:19 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130509.1519.002.html

欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)属硬骨鱼纲, 辐鳍亚纲, 鳗鲡目, 鳗鲡科, 鳗鲡属鱼类。欧洲鳗鲡营养丰富, 国内外市场需求量较高, 出口前景广阔^[1-3]。然而一直以来, 欧洲鳗鲡作为病害多发鱼类, 养殖风险较高^[2,4-6]; 且欧洲鳗鲡种从国外进口, 价格相对昂贵, 加之近年欧盟限制鳗苗出口, 欧洲鳗鲡苗问题顿现窘迫。因此, 关于欧洲鳗鲡种质资源、病害防治等问题都亟需做进一步研究。采用组织离体培养建立细胞系的方法进行病毒学、环境毒理学、细胞生物学、肿瘤学、基因组学、遗传学以及资源保护等方面的研究在其他物种中已广泛使用^[7-8], 因此, 通过建立欧洲鳗鲡的细胞系将可为其病毒分离、基因功能研究、遗传背景分析等方面的研究带来诸多的便利。

Kou等^[9]报道从感染了鳗鱼凹凸病(Beko disease)的日本鳗鲡(*A. japonica*)的肝脏中分离的细胞系(EP-1)中发现鳗鱼凹凸病原虫(*Pleistophora anguillarum*)。DeWitte-Orr等^[10]报道, 从美洲鳗鲡(*A. schrank*)外周血白血球培养的过程中获得一可连续培养的细胞系PBLE。然而, 现阶段关于欧洲鳗鲡细胞系体外培养及其相关的研究却相对滞后: 2008年, 郑在予^[11]报道了欧洲鳗鲡胸鳍以及肝脏细胞系的建立; 2010年, 毛凝^[12]报道在前者基础之上进一步简要分析欧洲鳗鲡胸鳍细胞系的培养条件等特性, 但所报道细胞系生长增殖周期较长, 达到6天以上, 给许多相关实验带来了许多的不便。因此, 进一步深入研究并建立一个增殖迅速、更加适宜分子和细胞遗传学实验的欧洲鳗鲡细胞系成为首要解决的难题。

1 材料与方法

1.1 实验动物

欧洲鳗鲡购自厦门集美区农贸市场, 选取0.5~1 kg活力良好的个体。

1.2 试剂

L-15 Leibovitz Media、DMEM/F12 1:1培养液和DMEM低糖培养液购自Hyclone公司; 重组人表皮生长因子(human EGF)、重组人肝细胞生长因子(human HGF)、重组人碱性成纤维生长因子(human FGF-basic)和重组鼠碱性成纤维生长因子(murine FGF-basic)购自Perprotech公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原代培养 将欧洲鳗鲡洗净去除体表黏液, 浸泡至含1‰商品化次氯酸消毒液的桶中1 h, 最后

滴入3-4滴丁香酚(约为水体积的0.1%左右)以进行麻醉。取出约0.5 cm²大小的尾鳍组织块, 以酒精棉球反复擦拭。移入超净工作台, PBS清洗, 剪碎至约1 mm³的组织块, 胰酶消化后铺入25 cm²细胞培养瓶。倒置干贴24 h后加入完全培养液(含16.7%胎牛血清FBS、0.5% β-巯基乙醇、50 μg/mL N-乙酰葡萄糖胺、50 μg/mL羧甲基纤维素钠、10 μg/L murine FGF-basic、5 μg/L human EGF、1 μg/L human HGF、100 IU/mL青霉素以及100 μg/mL赤霉素)启动原代培养, 每周换液一次, 27 °C恒温培养。

1.3.2 传代培养 待贴壁细胞扩散增殖趋势不明显时(50%~60%总细胞覆盖率)以胰酶消化法启动传代培养。采用经典细胞消化步骤: 移除原先培养瓶中的旧培养液, PBS-A/D-Hanks清洗1次, 胰酶消化至大多数细胞变圆解除贴壁, 加入含血清培养液终止消化, 吹打, 以合适比例接种至新培养瓶。

1.3.3 不同传代比例增殖曲线的影响及群体倍增时间分析 从上述步骤所建立的欧洲鳗鲡尾鳍细胞系(命名为EEF)中选取形态良好、增殖旺盛的细胞, 消化传代, 分别以1:2、1:3、1:5、1:10进行传代至25 cm²细胞培养瓶, 采用经典五点交叉取样法进行倒置显微拍摄, 每组取5点观测细胞数总和作图分析。

1.3.4 不同生长因子对其增殖与形态影响 从EEF细胞系中选取形态良好、增殖旺盛的细胞, 消化, 以含16.7% FBS的培养液(不含任何生长因子)终止消化, 而后以1:2传代比例接种至96孔板, 三组生长因子(鼠FGF-basic、人HGF、人EGF)分别设置4个浓度梯度(100, 50, 5, 1 μg/L), 每个浓度3个重复, 共计3×4×3=36个实验孔, 另以3孔不含任何生长因子仅含FBS的培养液作为对照组。5% CO₂、27 °C恒温、恒湿培养, 48 h待细胞贴壁完全后, 以含对应浓度生长因子的培养液换液, 继续培养24 h后加入MTT(终浓度0.5 mg/mL)终止培养, 4 h后弃培养液, 每孔加入150 μL DMSO, 微震荡10 min, 490 nm处检测光密度, 并以SPSS软件进行统计学分析。另取增殖旺盛的EEF第15代细胞分别采用含有10 μg/L的鼠、人重组FGF-basic进行培养(1:2传代, 细胞终浓度约10⁵/mL), 于72 h拍照以显示不同种类FGF-basic对EEF形态的影响。

1.3.5 EEF染色体数目分析 参照孙爱^[13]的方法, 取分裂旺盛的第15代EEF细胞, 接种至75 cm²细胞培养瓶。48 h后换液, 加入终浓度为20 μg/mL的秋水

仙碱, 继续培养24 h后收集细胞; 加入4 mL 3‰ KCl 低渗30 min; 加入1 mL新鲜配置预冷的卡诺氏固定液预固定10 min, 2 000 r/min离心10 min; 取细胞沉淀加入0.5 mL卡诺氏固定液, 以移液枪重悬沉淀; 再加入1 mL固定液; 30 cm高度-20 °C预处理玻片滴片; 65 °C干燥, Giemsa染液染色10 min, 双蒸水冲洗, 干燥, 中性树脂封片, 1 000×油镜观察。

2 结果

2.1 EEF原代培养

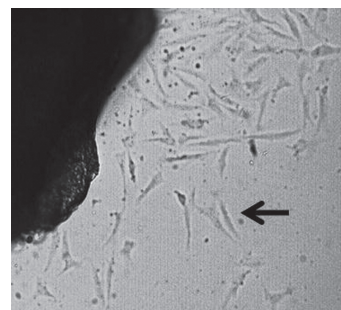
原代培养的组织块于第5天开始有零星细胞迁移出来(图1), 培养至第27天时大量细胞迁出, 靠近组织块的部位有多层细胞层叠(图2)。随后消化传代至新培养瓶, 启动传代培养。

2.2 EEF传代培养

传代培养的EEF细胞单独存在时呈现“Y”和“T”形纤维状(图3A), 一旦有接触抑制, 即开始趋于扩张形成树突状(图3B)。当细胞增殖至亚汇合状态时密集细胞开始呈现出流线形生长趋势(图3C和3D); 至完全汇合后细胞总体呈明显流线形(图3E-3H)。不同代数细胞之间能保持形态稳定(图3A-3H)。

2.3 不同传代比例对EEF增殖曲线的影响及群体倍增时间分析

如图4所示, 1:2和1:3为EEF最适传代比例。EEF细胞有独特的分裂增殖特性: 于48 h细胞完全贴壁后



左上角为组织块, 箭头所示为组织块迁出细胞。

The shadow on the top left corner shows the tissue block. The arrow indicates cells migrated from the tissue block.

图1 EEF原代培养第5天(50×)

Fig.1 EEF primary culture on 5th day(50×)

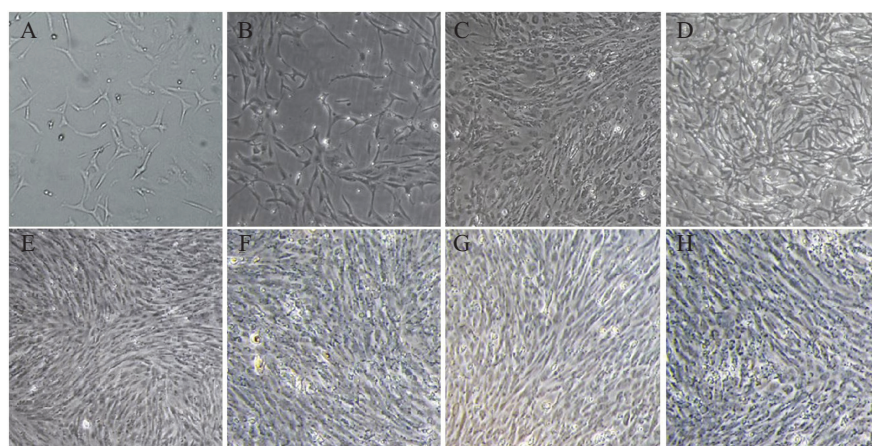


右侧为组织块, 左边为多层迁出细胞。

The shadow of right side shows the tissue blocks of caudal fin. The left shows multi-layer cells migrated from the tissue block.

图2 EEF原代培养第27天(50×)

Fig.2 EEF primary culture on 27th day(50×)



A: EEF P2: 细胞间无接触抑制, 呈现“Y”和“T”形纤维状; B: EEF P10: 部分细胞因接触抑制而呈现树突状; C: EEF P10; D: EEF P11: 亚汇合状态, 细胞有呈现流线形的趋势; E: EEF P9; F: EEF P16; G: EEF P20; H: EEF P21: 汇合状态, 密集细胞呈现流线形。A-H对应实际宽度为1 000 μm × 1 000 μm(50×)。

A: EEF P2: cells were without contact inhibition, presented the “Y” and “T”-shaped fibrous; B: EEF P10: some of cells showed dendritic shape in case of contact inhibition; C: EEF P10; D: EEF P11: cells in sub-confluent state, showed the trend of the streamlined shape; E: EEF P9; F: EEF P16; G: EEF P20; H: EEF P21: dense cells in confluent state, exhibited streamlined shape. Figures from A to H correspond to the actual size of 1 000 μm × 1 000 μm(50×).

图3 不同代数EEF形态

Fig.3 Morphologies of different passages of EEF cells

进行换液, 72 h即达到平台期, 超过72 h以后EEF细胞进入较缓慢增殖期, 并且能相对很长时间维持在这一时期。由此可判断, 48~72 h为其对数期, 在此期间细胞数目增殖一倍以上, 对数期群体倍增时间为16~18 h左右。不同传代比例对EEF增殖曲线影响很大, 如上表所示, 进入平台期以后较高传代比例的细胞数目明显高于较低传代比例组。在1:10传代比例下, 细胞超过96 h以后有明显进入衰退期的趋势。

2.4 不同生长因子对EEF细胞增殖与形态影响

通过MTT法测试三种生长因子(图5A-5C)对EEF细胞增殖的影响, 结果显示除了较高浓度的鼠

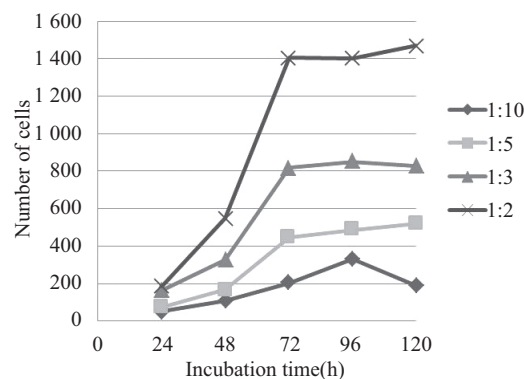
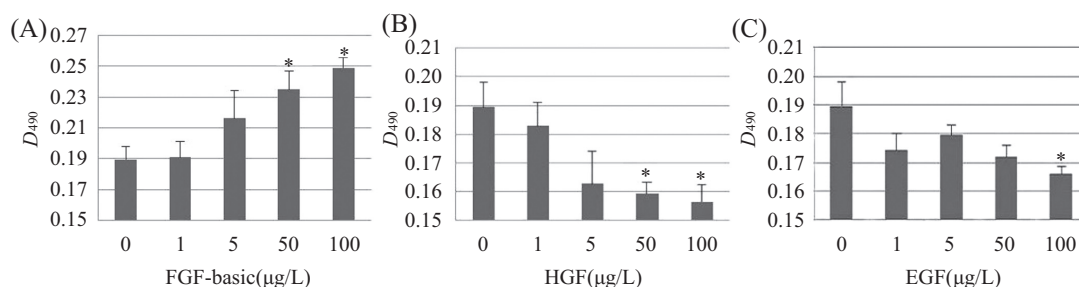


图4 EEF不同传代比例增殖曲线

Fig.4 Proliferation curves of EEF at different passages of proportion

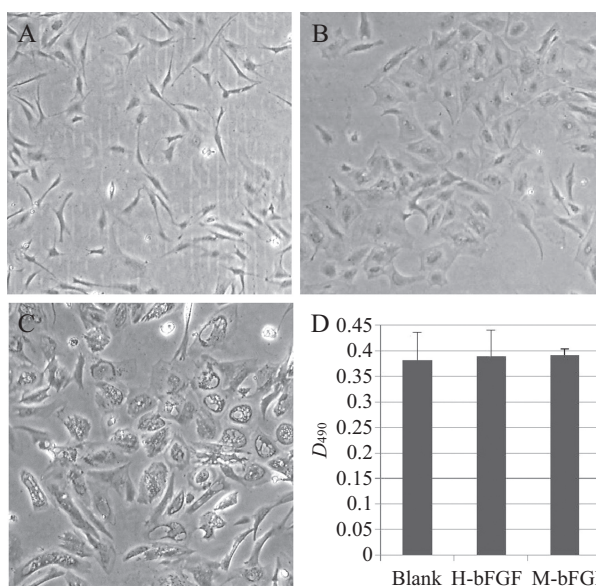


A: 鼠FGF-basic; B: 人HGF; C: 人EGF; * $P < 0.05$ 。

A: murine FGF-basic; B: human HGF; C: human EGF; * $P < 0.05$ 。

图5 不同生长因子对EEF增殖的影响

Fig.5 Effect of different growth factors on the proliferation of EEF



A: EEF P15采用10 µg/L鼠FGF-basic(50×); B: EEF P15采用10 µg/L人FGF-basic(50×); C: EEF P15未添加任何FGF-basic(50×); D: 采用MTT法检测10 µg/L不同来源的FGF-basic对EEF增殖的影响, 其中, 横轴H-bFGF为人FGF-basic, M-bFGF为鼠FGF-basic。插图A-C对应实际宽度为1 000 µm × 1 000 µm(50×)。

A: EEF P15, 10 µg/L murine FGF-basic(50×); B: EEF P15, 10 µg/L human FGF-basic(50×); C: EEF P15, without any kind of FGF-basic(50×); D: Effect of different kinds of FGF-basic on the proliferation of EEF, analyzed by MTT. H-bFGF and M-bFGF represent human FGF-basic and murine FGF-basic, respectively. Figures from A to C correspond to the actual size of 1 000 µm × 1 000 µm(50×)。

图6 固定浓度下不同来源FGF-basic对EEF形态与增值的影响

Fig.6 Different kinds of FGF-basic on the morphology and proliferation of EEF under fixed concentrations

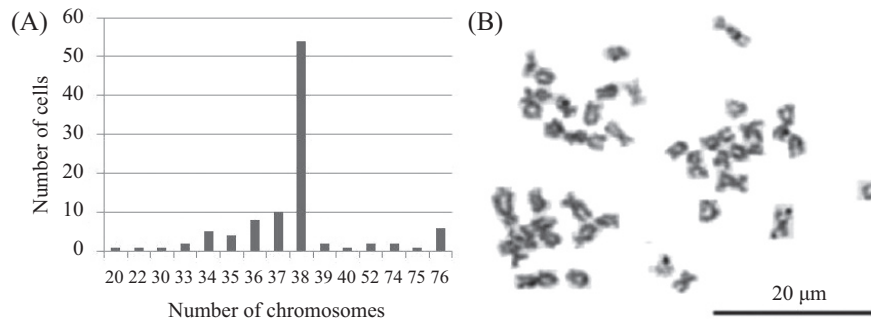


图7 EEF P15染色体数目分析

Fig.7 Analysis of karyotype for EEF P15

FGF-basic(50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$)对EEF增殖有显著促进作用($P<0.05$)外, 另外两种生长因子HGF和EGF均对EEF增殖无明显促进作用, 而高浓度的HGF(50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$)以及EGF(100 $\mu\text{g/L}$)甚至对EEF增殖有显著抑制作用($P<0.05$)。

同一批次细胞经过不同的FGF-basic处理, 形态呈现出明显差异。使用鼠FGF-basic组细胞呈现明显与原代及较早批次细胞相类似的长纤维状(图6A); 未使用FGF-basic组则呈现出较明显的卵圆状, 单个细胞面积明显较鼠FGF-basic组大(图6B), 且细胞空泡明显; 使用人FGF-basic组细胞形态亦有改变, 无论纤维化程度抑或细胞大小均介于鼠FGF-basic组和无FGF-basic组之间(图6C)。MTT分析显示, 不同来源的FGF-basic(人和鼠)在相同浓度下(10 $\mu\text{g/L}$), 均对EEF增殖无显著影响($P>0.05$, 图6D)。

2.5 EEF染色体数目分析

100个视野下染色体数目分析统计, 细胞染色体数目分布在20~76之间, 其中54%的分裂相细胞具有38条染色体(图7A)。其中, 18条为亚中着丝粒或中着丝粒染色体, 20条为端着丝粒染色体(图7B)。

3 讨论

鱼类组织离体培养时培养环境较体内环境有较大差异。但是能适应这种差异的细胞会逐步迁出原有组织块并沿支持物底部贴壁、增殖, 经历多次传代以后细胞形态、增殖周期渐渐稳定^[13]。不同的鱼类个体因为种间或是个体差异或不同组织差异, 得以迁出并扩大化培养的细胞在形态、生理及其增殖方面都有独特之处^[13-15]。目前, EEF已传代至20代, 体外培养时间超过300天。所培养细胞增殖形状良好, 传代第三天即能达到平台期; 形态均一, 散在细胞呈现典型类纤维状, 汇合期细胞总体呈现流线形。

EGF和HGF对EEF的影响较一致, 均仅在高浓度下起显著抑制作用。HGF、EGF均与促进血管生成、内皮形成有关, 而HGF甚至有抗细胞纤维化的作用^[16-19]。而EEF作为类纤维状细胞, 增殖不受EGF和HGF促进可能与其本身特性有关。

FGF-basic作为哺乳动物生长因子, 最初从牛脑中分离, 以其对成纤维细胞生长的促进作用而得名, 对于细胞系增殖、形态维持有较大影响, 在鱼类细胞培养中多有使用^[20-22]。不同来源的FGF-basic蛋白具有一定的结构保守性, 但在细胞膜受体定位、胞内信号转导途径上的差异导致其在生物学功能上的不同^[23]。本实验中所采用的重组鼠FGF-basic为一个16.2 kDa的蛋白, 具有145个氨基酸残基, 而所采用的重组人FGF-basic为17.2 kDa, 154个氨基酸残基。鼠FGF-basic在较低浓度下(1~10 ng/mL)对于EEF的增殖无明显作用, 这可能与不同的生长因子或是EEF细胞独特的分裂习性有关。但是有趣的是, 来源不同的FGF-basic(鼠和人)能极大地改变EEF的细胞形态, 在未添加FGF-basic的对照组中, 细胞呈现卵圆形, 而添加了无论是鼠或是人FGF-basic的实验组细胞均呈现不同程度纤维状。因此可以得出: 尽管低浓度FGF-basic不能明显促进EEF细胞增殖, 但对EEF细胞形态有较大影响。

染色体数目分析显示, EEF细胞系染色体呈现非整倍性, 54%观测到的分裂相细胞具有38条染色体, 所占比率相对较低。呈现整倍性的分裂相细胞中, 18条为中着丝粒或亚中着丝粒染色体, 20条为端着丝粒染色体。这与其他文献关于正常欧洲鳗鲡的体细胞染色体数目报道相一致^[1]。这也是首次基于欧洲鳗鲡体外培养的细胞系的染色体分析。一般认为, 可连续培养的细胞系其染色体倍性为非整倍性, 而有限传代细胞系可以毕其一生保持整倍性。导致这种现象的原因至今尚未清晰, 但通常认为细胞系核型非整倍性

是其转变为可连续传代细胞系的关键诱因^[20]。

由于EEF独特的生长特性, 因此能较长时间处于平台期, 不换液情况下能维持一个月而不至于大批细胞凋亡、解体, 使用时直接传代即可用于实验, 较好的解决了前人建立的欧洲鳗鲡胸鳍细胞所遇到的一些问题。目前, 本课题组正在开展EEF的一些后续研究, 如转染表达外源绿色荧光蛋白基因GFP、核型分析等, 其成果将为开展欧洲鳗鲡遗传和病害等的研究奠定基础。

参考文献 (References)

- 1 娄甜甜, 齐兴柱, 尹绍武, 黄 海, 廖经球, 陈国华, 等. 鳗鲡种质资源的研究进展. 水产科学(Lou Tiantian, Qi Xingzhu, Yin Shaowu, Huang Hai, Liao Jingqiu, Chen Guohua, *et al.* Recent research on germplasm resources in eels(*Genus anguilla*). Fisheries Science) 2007; 26(6): 366-9.
- 2 樊海平. 我国鳗鲡养殖业的现状与发展对策(上). 科学养鱼(Fan Haiping. The current status of eel aquaculture and countermeasures in development I. Scientific Fish Farming) 2006; (2): 1-2.
- 3 樊海平. 我国鳗鲡养殖业的现状与发展对策(下). 科学养鱼(Fan Haiping. The current status of eel aquaculture and countermeasures in development II. Scientific Fish Farming) 2006; (3): 1-2.
- 4 陈 强, 龚 晖, 杨金先. 欧洲鳗迟钝爱德华氏菌的分离鉴定. 中国人兽共患病学报(Chen Qiang, Gong hui, Yang Jinxian. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* in *Anguilla anguilla*. Chinese Journal of Zoonoses) 2011; 27(1): 7-10.
- 5 张宝忠. 国内欧洲鳗鲡养殖中存在的主要问题. 水产科技情报(Zhang Baozhong. Problems in culture of European eel in China. Fisheries Science & Technology Information) 1996; 23(3): 112-4.
- 6 田 丁, 许斌福, 林能峰, 龚 晖, 林天龙. 创伤弧菌外膜蛋白免疫刺激复合物对欧洲鳗鲡的免疫保护性分析. 水生生物学报(Tian Ding, Xu Binfu, Lin Nengfeng, Gong Hui, Lin Tianlong. Outer membrane proteins of *Vibrio vulnificus* induced protective immunity to the european eels. Acta Hydrobiologica Sinica) 2010; 34(2): 431-5.
- 7 艾庆辉, 李庆飞, 麦康森. 鱼类细胞培养技术研究进展. 渔业科学进展(Ai Qinghui, Li Qingfei, Mai Kangsen. Advances in research on fish cell culture techniques. Progress in Fishery Sciences) 2012; 33(3): 122-8.
- 8 Molloy SD, Thomas E, Hoyt K, Bouchard DA. Enhanced detection of infectious salmon anaemia virus using a low-speed centrifugation technique in three fish cell lines. J Fish Dis 2012; 35(1): 1-10.
- 9 Kou GH, Wang CH, Hung HW, Jang YS, Chou CM, Lo CF. A cell line (EP-1 cell line) derived from "Beko disease" affected Japanese eel elver (*Anguilla japonica*) persistently infected with *Pleistophora anguillarum*. Aquaculture 1995; 132(1): 161-73.
- 10 Dewitte-Orr SJ, Lepic K, Bryson SP, Walsh SK, Lee LE, Bols NC. Development of a continuous cell line, PBLE, from an American eel peripheral blood leukocyte preparation. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2006; 42(8): 263-72.
- 11 郑在予. 欧洲鳗鲡组织细胞体外培养初步研究. 中国农学通报(Zheng Zaiyu. Primary studys on European eel tissue cell *in vitro* culture. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2008; 24: 66-9.
- 12 毛 凝. 欧洲鳗鲡胸鳍细胞优化培养条件及促长因子研究. 福建农林大学(Mao Ning. The study of the potimal culture conditions and growth promoting factors of the pectoral fin cells of *Anguilla anguilla*. Fujian Agriculture And Forestry University), 2010.
- 13 孙 爱. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)三种组织细胞系的建立、鉴定及其应用的初步研究. 中国海洋大学(Sun Ai. Establishment of three novel cell lines from large yellow croaker, *Pseudosciaena Crocea*, and their preliminary applications studies. Ocean University of China), 2010.
- 14 Li Z, Bhat N, Manali D, Wang D, Hong N, Yi M, *et al.* Medaka cleavage embryos are capable of generating ES-like cell cultures. Int J Biol Sci 2011; 7(4): 418-25.
- 15 王贤丽. 几种重要海水养殖鱼类细胞系的建立、诱导分化及其应用研究. 中国海洋大学(Wang Xianli. Establishment of cell lines, inducement and application from several important marine fishes. Ocean University of China), 2009.
- 16 李克刚. 表皮生长因子在肿瘤诊疗中的研究进展. 国外医药(抗生素分册)(Li Kegang. Progress of epidermal growth factor in tumor therapy. World Notes on Antibiotics) 2011; 32(6): 259-61.
- 17 鲍 勇, 王邦宁, 胡泽平, 程 源, 陈大年, 刘 敏, 等. 肝细胞生长因子对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡的影响. 安徽医科大学学报(Bao Yong, Wang Bangning, Hu Zeping, Chen Yuan, Chen Danian, Liu Min, *et al.* Effects of hepatocyte growth factor therapy on apoptosis in spontaneous hypertensive rats. Acta Universitatis Medicinalis Anhui) 2012; 47(8): 915-8.
- 18 陈 杏, 张庆林, 熊锡山, 王汉斌. 肝细胞生长因子抗肾纤维化研究进展. 生物技术通讯(Chen Xing, Zhang Qinglin, Xiong Xishan, Wang Hanbin. Advances of hepatocyte growth factor as an anti-fibrotic regulator in renal disease. Letters in Biotechnology) 2011; 22(3): 449-52.
- 19 罗明志, 王淑瑞, 齐 浩. 肝细胞原代培养研究综述. 陕西师范大学学报(自然科学版)(Luo Mingzhi, Wang Shurui, Qi Hao. A review about hepatocyte for primary culture. Journal of Shaanxi Normal University, Natural Science Edition) 2004; 32: 72-6.
- 20 Zheng Y, Wang N, Xie MS, Sha ZX, Chen SL. Establishment and characterization of a new fish cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Fish Physiol Biochem 2012; 38(6): 1-9.
- 21 Chen SL, Ren GC, Sha ZX, Shi CY. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. Dis Aquat Organ 2004; 60(3): 241-6.
- 22 卫秀洋, 王万明, 陈庆泉. 碱性成纤维细胞生长因子在组织修复的研究进展. 中国矫形外科杂志(Wei Xiuyang, Wang Wanming, Chen Qingquan. Research progresses of basic fibroblast growth factor on tissue repair. Orthopedic Journal of China) 2011; 19(13): 1108-10.
- 23 孙策策, 田卫东. 碱性成纤维细胞生长因子研究进展. 现代生物医学进展(Sun Qince, Tian Weidong. The research advances of basic fibroblast growth factor. Progress in Modern Biomedicine) 2009; 9(15): 2947-9.