

技术与方法

放线菌素D诱导非洲绿猴肾细胞(Vero)凋亡模型的建立

钟菲菲¹ 杨慧兰^{2*} 吕芳彪^{1,2} 樊建勇²⁽¹⁾华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006; ⁽²⁾广州军区广州总医院皮肤科, 广州 510010

摘要 用不同剂量(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L)的放线菌素D(actinomycin D, ActD)诱导Vero细胞凋亡不同时间(0, 12, 24, 36, 48, 60 h)。MTT法和流式细胞术的结果显示, 以未处理的细胞作为对照组, 各剂量ActD处理Vero细胞不同时间后, 细胞的活力均下降, 凋亡率均升高, 且呈剂量和时间依赖效应。当ActD浓度为1 mg/L、作用时间为36 h, 细胞的存活率为(0.55±0.01), 凋亡率为(34.83±1.13)%。Gimesa染色、Hoechst33258染色表明, 经ActD(1 mg/L)诱导36 h后Vero细胞形态学发生明显改变, 出现膜小泡和凋亡小体形成等凋亡细胞特征; Real-time PCR结果显示, 诱导组Bax/Bcl-2 mRNA相对含量明显大于正常对照组, 且差异有统计学意义; 分光光度法结果表明, 与正常对照组相比较, 凋亡诱导组caspase-3和caspase-8活性明显升高且差异具有统计学意义, caspase-9活性与对照组相比较, 差异无统计学意义。用1 mg/L ActD诱导Vero细胞36 h时, 细胞存活率和凋亡率都很高, 可作为ActD诱导Vero细胞的最佳剂量。在该剂量及作用时间下, caspase-3和caspase-8活性明显升高, 表明ActD诱导Vero细胞凋亡是通过caspase-8相关的途径。该实验成功建立了ActD诱导非洲绿猴肾细胞凋亡模型, 将有助于进一步探讨目的基因在Vero细胞凋亡作用的分子机制。

关键词 非洲绿猴肾细胞; 细胞凋亡; ActD

Establishment of Apoptosis Model in Vero Cells Induced by Actinomycin D

Zhong Feifei¹, Yang Huilan^{2*}, Lü Fangbiao^{1,2}, Fan Jianyong²⁽¹⁾School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006 China;⁽²⁾Department of Dermatology, Guangzhou Liuhuaqiao Hospital, Guangzhou 510010, China)

Abstract Vero cells were treated with different doses (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L, respectively) of ActD for different times (0, 12, 24, 36, 48, 60 h). MTT assay showed that the viabilities of Vero cells treated with ActD for different period and different concentrations decreased significantly compared with the control cells ($P<0.05$), and flow cytometry assay showed that the apoptosis rates of Vero cells treated with ActD for different period and concentrations all increased significantly compared with the control cells ($P<0.05$), the viabilities and the apoptosis rate showed a dose and time dependent effect. When the concentration of ActD was 1 mg/L, and the reaction time was 36 h, the cell viability was (0.55±0.01) and the apoptosis rate was reach to (34.83±1.13)%. Gimesa staining, Hoechst33258 staining showed that the morphology of the Vero cell apparently changed and the typical

收稿日期: 2013-01-06 接受日期: 2013-03-07

国家自然科学基金(批准号: 30972666、81071401、81171511)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-36653508, E-mail: huilany88@hotmail.com

Received: January 6, 2013 Accepted: March 7, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30972666, 81071401, 81171511)

*Corresponding author. Tel: +86-20-36653508, E-mail: huilany88@hotmail.com

网络出版时间: 2013-05-14 15:22 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130514.1522.002.html

characteristic of apoptotic cells, for instance, membrane vesicles and apoptotic body was appeared after treated by ActD (1.0 mg/L) for 36 h. Real-time PCR demenstrated that compared with untreated Vero cells, Bax was increased, Bcl-2 was decreased in Vero cells treated by ActD (1.0 mg/L) for 36 h. Spectrophotometry results showed that compared with the control group, the caspase-3 and caspase-8 activity of apoptosis-induced group was significantly higher and the difference was statistically significant; while the activity of caspase-9 has no statistically significant difference compared with the control group. The optimum condition of ActD for establishment an apoptosis model in Vero cells is 1.0 mg/L for 36 h. At this condition, both the cell viability and the apoptosis rates were high. Caspase-3 and caspase-8 activity was significantly higher when dealed with ActD (1.0 mg/L) for 36 h, indicating that ActD-induced the Vero cell apoptosis is in caspase-8-dependent way. In this study, ActD-induced apoptosis model in Vero cells was successfully established which will help to further evaluate the molecular mechanisms of the role of target gene in apoptosis in Vero cells.

Key words Vero cells; apoptosis; ActD

细胞凋亡(apoptosis)是进化上高度保守的细胞在一定条件下通过启动内部死亡机制,按特定的基因程序自行结束生命的过程,其主要特征是细胞收缩、染色质凝集成块状并形成凋亡小体。细胞凋亡已成为一种维持机体自身稳定所必需的生理性细胞死亡,在机体生命活动中具有积极意义。细胞凋亡与细胞坏死不同,细胞凋亡不是一件被动的过程,而是细胞的自稳平衡机制对内外刺激因素的主动应答过程,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用^[1-2]。

放线菌素D(actinomycin D, ActD)为细胞周期非特异性药物,是多肽类抗肿瘤抗生素,它可选择性地与DNA中的鸟嘌呤结合,抑制以DNA为模板的RNA多聚酶,干扰细胞的转录过程,抑制mRNA的合成。ActD除了能诱导昆虫细胞凋亡外^[3],还可以诱导包括人类在内的其他哺乳动物细胞的凋亡^[4-7]。非洲绿猴肾细胞(Vero)是来源于非洲绿猴肾的贴壁生长的上皮细胞株,生长较为迅速、易培养且对病毒易感,所以其与LLC-MK₂细胞、HeLa细胞等都是研究病毒及病毒基因功能较为常见的细胞模型^[8-10]。此外,它还可以用于疫苗的生产^[11-12]。本研究拟使用ActD建立非洲绿猴肾细胞(Vero)凋亡模型,并确定最适作用浓度和时间,为进一步深入探讨目的基因在体外真核细胞中对凋亡的作用及其可能的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

Vero细胞由本实验室保存; RPMI-1640细胞培养液、胎牛血清为美国HyClone公司生产; MTT粉剂、

DMSO、ActD为美国Sigma公司生产; 凋亡检测试剂盒Guava Nexin[®] Reagent 100 Tests由美国Millipore公司生产; 胰酶、Giemsa、Hoechst33258由广州威佳科技有限公司提供; caspase-3、caspase-8、caspase-9活性检测试剂盒购于BestBio-贝博公司; 逆转录酶M-MLV、TRIzol均为Invitrogen公司产品; GoTaq master mix购自Promega公司; 引物由上海Invitrogen公司合成。

倒置显微镜(日本Olympus公司); 流式细胞仪(美国Millipore公司); CO₂培养箱(NaPCO公司); 450型酶标仪(美国BIO-RAD公司); 实时定量PCR仪(Rotor Gene 2000, Qiagen公司)。

1.2 细胞培养

Vero细胞在含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中贴壁生长,于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,根据细胞生长状况2~3 d传代1次,培养瓶铺满时用2.5 g/L胰蛋白酶消化传代,培养细胞至对数期。

1.3 凋亡指标的测定

1.3.1 MTT法测细胞增值 将处于对数生长期的Vero细胞以 6×10^4 接种至96孔板,细胞贴壁生长后加入终浓度分别为0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/L的ActD, 分别染毒0, 12, 24, 36, 48, 60 h。MTT法检测Vero细胞存活率,确定最佳诱导剂量和诱导时间。在培养结束前4 h加入5 mg/mL的MTT溶液(终浓度为0.5 mg/mL), 37℃培养至结束。吸净旧培养基和MTT, 再加150 μL DMSO重悬细胞,脱色摇床上震荡10 min,充分溶解MTT结晶物,选择570 nm波长在酶标仪上测定D值。每实验组设6个复孔,重复3次。按细胞存活率 $D=(\text{实验组}/\text{对$

照组)×100%进行计算。

1.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡 在细胞长到80%的融合度时, 分别加入含ActD(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L)的10% NBS的RPMI-1640培养液分别作用12, 24, 36, 48, 60 h。弃去培养液, 胰酶消化收集细胞, 用300 μL含10% NBS的RPMI-1640培养液重悬细胞, 各组中取100 μL细胞悬液, 加入Annexin-V-PE/7-AAD室温下避光孵育20 min后, 上流式细胞仪进行分析。

1.3.3 Giemsa染色检测细胞核 弃去待处理的各组细胞(6孔板)中的旧培养液, PBS冲洗2次, 空气干燥; 甲醇固定约15 min, 空气干燥; Giemsa染液(PBS稀释母液10倍)染色约15 min, 流水冲洗, 去除染液; 二甲苯透明约2 min, 空气干燥; 光学显微镜下观察拍照。

1.3.4 Vero细胞凋亡情况的Hoechst33258荧光染色观察 将Vero细胞以 5×10^4 /mL接种于细胞爬片上, 贴壁后用 ActD(1 mg/L)处理36 h, PBS 洗3 次, 加入0.5 mL固定液固定10 min, PBS洗2次, 每次3 min; 加入0.5 mL的Hoechst33258染色液室温下染色5 min, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.5 Vero细胞凋亡诱导后Bax、Bcl-2 mRNA的相对定量 (1)总RNA的提取及cDNA的扩增: Vero细胞在含体积分数10%胎牛血清的 RPMI-1640培养基中贴壁生长, ActD(1 mg/L)处理36 h, 采用TRIzol按照其说明书提取处理组和对照组Vero细胞中的总RNA, 并用DNA/蛋白分析仪(BeckMAN, DU530)测定其浓度及 D_{260}/D_{280} 。取4 μg的RNA用M-MLV逆转录酶反转录成cDNA。反转录的体系和条件按照其说明书操作; (2)标准曲线的制作: 将cDNA倍比稀释1, 10, 100, 1 000倍, 于一薄壁PCR管内加入各浓度的cDNA 2 μL、上下游引物(10 μmol/L)各1 μL、2×GoTaq master mix 12.5 μL, 加无RNase水至25 μL,

吹打均匀后在实时定量PCR仪(Rotor Gene 2000, Qiagen公司)上进行扩增, 扩增条件为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火、延伸60 s, 共进行40个循环, 并于60 °C收集荧光值。扩增结束后做溶解曲线, 即由80 °C升温至95 °C, 每步增加1 °C。平行重复实验3次, 取平均Ct值; (3)目的基因的实时定量PCR扩增: 取各组cDNA 2 μL加入到薄壁PCR管内, 再加入的组分及扩增条件同(2)。平行重复实验3次, 取平均Ct值; (4)目的基因相对定量的分析: 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析Bax、Bcl-2 mRNA在Vero中的相对表达量。

1.3.6 caspase-3、caspase-8、caspase-9活性检测 吸取50 μL含100~200 μg蛋白的细胞, 加入50 μL的2×Reaction buffer, 再加入5 μL底物并于37 °C避光孵育4 h; 用酶标仪在 $\lambda=405$ nm测定其吸光值。通过计算 $D_{\text{诱导剂}}/D_{\text{阴性对照}}$ 的倍数来确定凋亡诱导剂组caspase-3、caspase-8、caspase-9的活化程度。[注意: 以Lysis buffer和Reaction buffer作为空白对照(50 μL Lysis buffer+50 μL 2×Reaction buffer)]

1.4 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示, 采用 SPSS 13.0软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)和 t 检验; 率间的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT法检测细胞增殖

MTT法测Act D对Vero细胞存活力的影响, 按细胞存活率 $D=(\text{实验组}/\text{对照组}) \times 100\%$ 计算。ActD对Vero细胞存活率的影响的见表1。由表1可见, 与对照组(0 mg/L)相比, 各剂量ActD(0.25~4 mg/L)诱

表1 ActD诱导后Vero细胞的存活率($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The survival rate of vero cells after induced apoptosis by ActD($n=6, \bar{x} \pm s$)

剂量(mg/L) Dosage(mg/L)	存活率 Survival rate				
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
0	1.00±0.03	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.11
0.25	0.92±0.04*	0.70±0.01*	0.63±0.07*	0.47±0.01*	0.36±0.01*
0.5	0.89±0.07*	0.64±0.11*	0.60±0.01*	0.40±0.02*	0.34±0.05*
1	0.88±0.14*	0.63±0.08*	0.55±0.01*	0.37±0.06*	0.28±0.08*
2	0.85±0.08*	0.62±0.14*	0.49±0.02*	0.35±0.04*	0.25±0.03*
4	0.80±0.04*	0.58±0.04*	0.40±0.07*	0.29±0.09*	0.17±0.02*

* $P < 0.05$.

导Vero细胞凋亡不同时间(0~60 h)后, Vero细胞的活力均下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。且随着ActD浓度的增加、作用时间的增长, Vero细胞的存活率逐渐下降, 呈现出剂量和时间依赖效应。在1 mg/L的ActD诱导凋亡36 h后, Vero细胞的存活率为(0.55 ± 0.01)。

2.2 流式细胞术确定Vero细胞的凋亡率情况

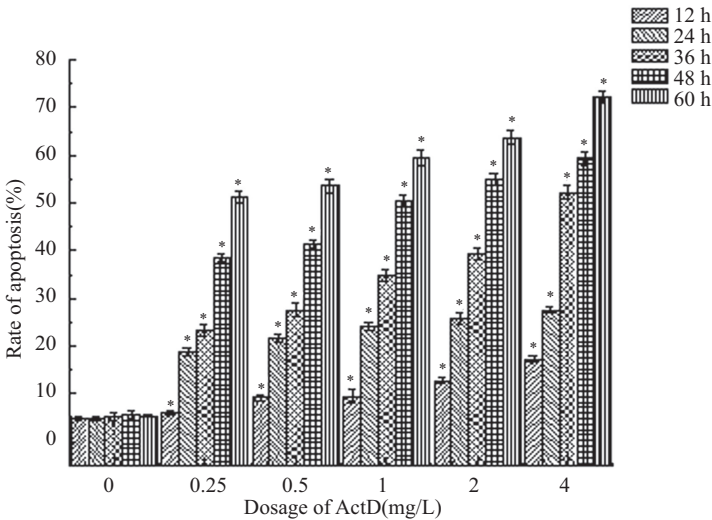
当细胞在发生凋亡的早期时, 在细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)会迁移至细胞膜外测; 而坏死细胞PS也暴露于细胞膜外测, 对7-AAD高染。磷脂结合蛋白V(Annexin V)是钙依赖性的磷脂结合蛋白, 它与PS具有高度的结合力。如将Annexin V标记上PE等荧光素, 即可使用Annexin V/7-AAD双染法可检测细胞早期的凋亡情况。Annexin V/7-AAD双染流式细胞术的结果为: 凋亡细胞Annexin V高染、

7-AAD低染, 表现为绿色荧光; 坏死细胞Annexin V、7-AAD均高染, 表现为绿色和红色荧光; 正常活细胞Annexin V、7-AAD均低染。ActD对Vero细胞凋亡率的影响见图1。

由图1可见, 统计学分析显示, 与对照组(0 mg/L)相比, 各剂量ActD诱导Vero细胞凋亡不同时间后, Vero细胞的凋亡率均升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。且随着ActD浓度的增加, 作用时间的增长, Vero细胞的凋亡率逐渐增大, 呈现出剂量和时间依赖效应。在1 mg/L的ActD诱导凋亡36 h后, Vero细胞的凋亡率为(34.83 ± 1.13)%。

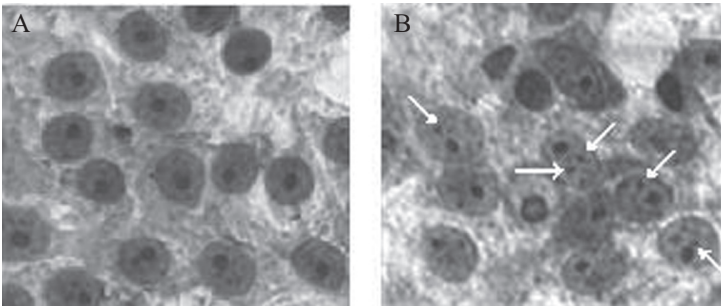
2.3 Giemsa染色观察细胞核

经ActD(1 mg/L)诱导凋亡的Vero细胞凋亡36 h后, 细胞膜发生了皱缩(但胞膜完整); 染色质凝聚在细胞中央; 细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒等明显



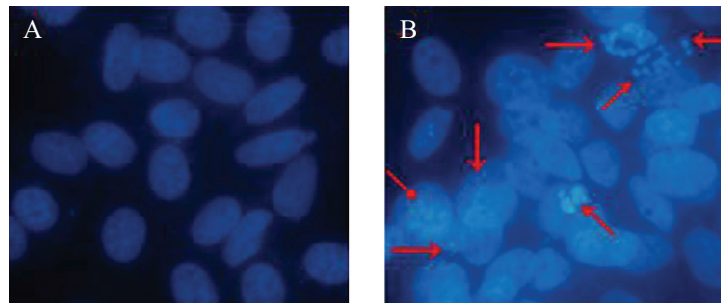
* $P<0.05$.

图1 ActD诱导后Vero细胞的凋亡率
Fig.1 The apoptosis rate of Vero cells after induction by ActD



A: 未诱导的正常Vero 细胞; B: ActD诱导的Vero 细胞(1 mg/L, 36 h)。红色箭头为碎裂的细胞核。
A: control Vero cells; B: Vero cells induced by ActD(1 mg/L, 36 h). Red arrowhead showed fragmentation of the nucleus.

图2 Gimesa染色分析细胞凋亡(400×)
Fig.2 Gimesa stain of cell nucleus(400×)



A: 未诱导正常的Vero细胞; B: ActD诱导Vero 细胞(1 mg/L, 36 h)。红色箭头为凋亡的细胞。
A: control Vero cells; B: Vero cells induced by ActD(1 mg/L, 36 h). Red arrowhead showed the apoptosis cells.

图3 Hoechst 33258荧光染色分析细胞凋亡(400×)

Fig.3 Cells were stained with Hoechst 33258 and observed by fluorescence microscopy(400×)

的凋亡现象(图2B)。而未诱导的正常Vero细胞, 细胞核被染成蓝紫色, 细胞质淡染(图2A)。光学显微镜下统计细胞凋亡的个数, B组中平均每个视野下细胞凋亡数与非凋亡的比例约为1:2, 与流式细胞术的结果基本一致; A组中很少有细胞凋亡现象。

2.4 Hoechst33258 荧光染色观察Vero细胞凋亡

Hoechst33258是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低。细胞发生凋亡时, 染色质会固缩。所以Hoechst33258染色后, 在荧光显微镜下观察, 正常细胞的细胞核呈正常的蓝色, 而凋亡细胞的细胞核会呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 颜色有些发白。1 mg/L ActD诱导Vero细胞凋亡36 h后, 在凋亡诱导组中可以很明显的看到凋亡小体和致密浓染的颗粒块状荧光(图3B); 正常对照组中荧光较淡, 无凋亡小体和致密的浓染现象(图3A)。

2.5 Bax、Bcl-2 mRNA相对定量分析

应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析Bax、Bcl-2 mRNA在Vero细胞中的相对表达量, 结果见表2。在ActD(1 mg/L)处理36 h, Bax的相对表达量上调, Bcl-2的相对表达量下调, Bax与Bcl-2的比值为1.44, 与正常对照Vero细胞相比较差异具有统计学意义。

2.6 caspase-3、caspase-8、caspase-9活性检测结果

从图4可以看出, 随着蛋白浓度的升高, cas-

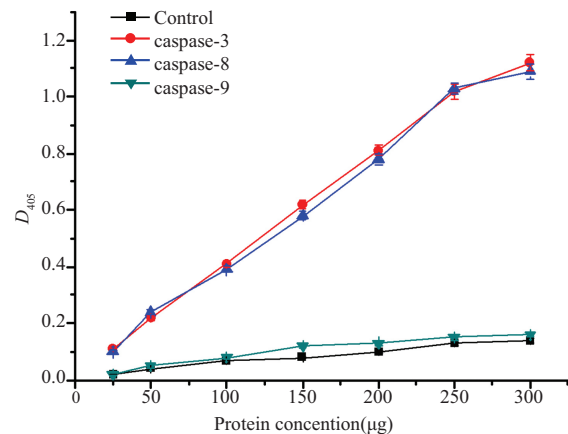


图4 Caspase 活性检测

Fig.4 The detection of caspase activity

pase-3和caspase-8的活性明显升高, 与正常对照组相比较, 差异具有统计学意义; caspase-9的活性与正常对照组差异较少, 无统计学意义。

3 讨论

细胞凋亡是指在一定生理和病理情况下机体为维持内环境稳定, 通过基因调控而使细胞主动有序的消亡过程, 是多细胞生物的一种生理性细胞死亡。细胞凋亡在维持组织、器官的正常生理功能和形态方面起着非常重要的作用, 它可由细胞内部因素和外部刺激所诱导。病毒感染宿主细胞后, 一方面宿主细胞可利用细胞凋亡清除病毒感染的细胞, 加速感染细胞的死亡, 继而能限制病毒的复制和传播, 可能是机体防御病毒侵入的机制之一; 另一方面病毒基因的表达启动相应信号传导途径抑制或延迟被感染细胞发生凋亡。近年来, 对于细胞凋亡的研

表2 Bax、Bcl-2相对表达量

Table 2 The relative expression of Bax and Bcl-2

组别	对照组	凋亡诱导组
Group	Vero	Apoptosis induction group
Bax	1	1.12
Bcl-2	1	0.78
Bax/Bcl-2	1	1.44

究已成为医学界的关注热点。Vero细胞作为最常见的真核细胞, 具易培养、易感染、易转染等特点, 广泛用于外源基因的表达、病毒培养及疫苗的制备。ActD作为常见的凋亡诱导剂, 其作用范围广、诱导效率高等特点, 被广泛用于细胞凋亡的诱导。

目前, 在基础研究中对各种细胞诱导凋亡的浓度和条件国内外尚无统一标准, 但对细胞凋亡模型的建立, 一般采用凋亡率为30%左右作为模型创建良好的标志之一, 因为30%左右的细胞凋亡率既不至于导致细胞死亡率过高, 也保证了药物对凋亡细胞药理作用的发挥^[13]。

本研究通过MTT法确立Vero细胞在各个不同终浓度ActD作用不同时间下细胞的存活率; 采用Annexin V/7-AAD双染法流式细胞术检测了不同浓度ActD作用Vero细胞不同时间后细胞的的凋亡率情况。Giemsa染色显示, 正常细胞核被染成蓝紫色, 呈圆形, 细胞质淡染, 而诱导凋亡的细胞细胞表面皱缩、染色质凝聚在细胞中央、细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒等凋亡现象。Hoechst33258荧光染色显示, 1mg/L ActD诱导Vero细胞凋亡36 h后, 在凋亡诱导组中可以很明显的看到凋亡小体和致密浓染的颗粒块状荧光, 正常对照组中荧光较淡, 无凋亡小体和致密的浓染现象。本研究用ActD诱导Vero细胞凋亡模型中, 通过MTT法测得1 mg/L ActD作用Vero细胞后, 细胞存活率为(0.55±0.01)。通过流式细胞术得在该条件下细胞凋亡率为(34.83±1.13)%, 建立了ActD诱导Vero细胞凋亡的模型, 综合考虑细胞存活率和凋亡率两方面因素, 确定其最优条件为: ActD终浓度1 mg/L, 诱导时间为36 h。在此条件下, caspase-3、caspase-8较对照组升高, 且差异有统计学意义, caspase-9活性基本不变。综上所述, 本实验首次建立了不同浓度ActD诱导Vero细胞凋亡的模型, 为进一步探讨凋亡相关的目的基因在Vero细胞中表达及其作用机制的研究提供实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805): 770-6.
- 2 Soriano ME, Scorrano L. Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell* 2011; 145(1): 15-27.
- 3 Regalla K, Sudhir C. Inhibition of microRNA-14 contributes to actinomycin-D-induced apoptosis in the Sf9 insect cell line. *Cell Biol Int* 2010; 34(8): 851-7.
- 4 Abdelhaleem M. The actinomycin D-induced apoptosis in BCR-ABL-positive K562 cells is associated with cytoplasmic translocation and cleavage of RNA helicase A. *Anticancer Res* 2003; 23(1): 485-90.
- 5 Ana K, Mallary CG, Suzanne SB. Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. *J Innate Immun* 2010; 2: 248-59.
- 6 Frascini A, Bottone MG, Scovassi AI, Denegri M, Risueño MC, Testillano PS, *et.al*. Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis. *Histol Histopathol* 2005; 20(1): 107-17.
- 7 Jin C, Wu S, Lu X, Liu Q, Qi M, Lu S, *et al*. Induction of the bystander effect in Chinese hamster V79 cells by actinomycin D. *Toxicol Lett* 2011; 202(3): 178-85.
- 8 Tzeng WP, Xu J, Frey TK. Characterization of cell lines stably transfected with rubella virus replicons. *Virology* 2012; 429(1): 29-36.
- 9 Linero FN, Thomas MG, Boccaccio GL, Scolaro LA. Junin virus infection impairs stress-granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2 alpha phosphorylation. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 12): 2889-99.
- 10 Seubsasana S, Pientong C, Ekalaksananan T, Thongchai S, Aromdee C. A potential andrographolide analogue against the replication of herpes simplex virus type 1 in Vero cells. *Med Chem* 2011; 7(3): 237-44.
- 11 Zhou F, Zhou J, Ma L, Song S, Zhang X, Li W, *et al*. High-yield production of a stable Vero cell-based vaccine candidate against the highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421(4): 850-4.
- 12 Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimajima M, *et al*. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J Virol* 2012; 86(3): 1405-10.
- 13 海广范, 詹合琴, 李生莹, 许 华. nmhaFGF和haFGF对放线菌素D诱导的人视网膜色素上皮细胞凋亡的保护作用. *眼科新进展*(Hai Guangfan, Zhan Heqin, Li Shengying, Xu Hua. Protective effects of nmhaFGF and haFGF on apoptosis of hRPE cells induced by actinomycin D. *Recent Advances in Ophthalmology*) 2009; 9(6): 409-12.