

教学研究

小鼠S180腹水瘤细胞在细胞生物学 实验教学中的应用及注意事项

薛雅蓉* 庄 重

(南京大学生命科学学院, 南京 210093)

摘要 细胞生物学实验教学中,经常需要使用大量相同的细胞样品。通过教学实践,作者发现小鼠S180腹水瘤细胞可作为多个实验的细胞材料。该文阐述了小鼠S180腹水瘤细胞作为细胞生物学实验教学材料的优点和准备方法,可用其进行的细胞实验及具体用法等,旨在为细胞生物学实验教学中的选材提供参考。

关键词 小鼠腹水瘤细胞; 细胞生物学实验; 实验材料

The Application and Precaution of Mouse S180 Ascites Sarcoma Cells in Cell Biology Experiment Class

Xue Yarong*, Zhuang Zhong

(School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract In cell biology experiment class, many experiments need the same cell materials. Based on teaching experience, we have found that mouse S180 ascites sarcoma cells can be used in multiple experiments. In this paper, we fully described the advantages of using mouse S180 ascites sarcoma cells as experiment materials, the methods that are used to prepare the cells, the experiments which the cells can be used in, and the detailed procedures for conducting the experiments. The aim of this paper was to provide some insights for choosing experiment materials in the cell biology experiment class.

Key words mouse S180 ascites sarcoma cells; cell biology experiments; experimental materials

细胞生物学实验教学中,经常需要大量相同的细胞样品用于实验,有时给实验教师及实验辅助人员带来难题。在长期的细胞生物学实验教学中,我们发现,利用小鼠腹腔培养肿瘤细胞是获得大量细胞样品的一种方便途径。该法将一些悬浮生长的恶性肿瘤细

胞接种于小鼠腹腔,数天后,细胞在腹腔中增殖,产生大量后代,形成腹水瘤小鼠,抽取腹水可用于多个细胞实验。通常将小鼠腹水中增殖的肿瘤细胞俗称为腹水瘤细胞。我们经过实践证明,用其替代常规细胞材料可以开展一些细胞生物学实验,并且用于某些实验时比常规材料更具优势。下文详细阐述了小鼠腹腔繁殖瘤细胞的方法、注意事项、优势及应用。

1 小鼠腹腔繁殖瘤细胞的方法、注意事项及优势

建立小鼠移植性瘤模型的常用细胞株为S180鼠肉瘤细胞,原因是其缺乏主要组织相容性复合体

收稿日期: 2013-08-18 接受日期: 2013-11-06

国家自然科学基金(批准号: J1103512)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-83685469, E-mail: xueyr@nju.edu.cn

Received: August 18, 2013 Accepted: November 6, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. J1103512)

*Corresponding author. Tel: +86-25-83685469, E-mail: xueyr@nju.edu.cn

网络出版时间: 2014-01-15 13:50

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0264.html>

(major histocompatibility complex, MHC)分子, 不易被受体鼠排斥。因此, 对受体鼠种没有特别要求^[1]。用于接瘤的细胞株可以直接购买, 也可向其他应用腹水瘤小鼠的实验室索求。这些实验室只需提供1只接瘤5~7 d的荷腹水瘤小鼠即可。接瘤小鼠为6~8周龄健康小白鼠, 雌雄不限。如用购买的肿瘤细胞株接种, 直接用灭菌生理盐水配制成 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的浓度, 每只小鼠腹腔注射0.2 mL。如用荷腹水瘤小鼠腹腔瘤细胞接种, 可参考宋长城等^[2]的方法, 先抽出小鼠腹水, 计数后用生理盐水稀释成 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 然后每只小鼠腹腔注射0.2 mL。

1.1 小鼠腹腔繁殖瘤细胞的具体方法

(1)脱颈处死已腹腔接种S180鼠肉瘤细胞株5~7 d的腹水瘤小鼠, 用酒精棉球消毒腹部。

(2)沿腹中线剪开小鼠腹部皮肤并向两边撕开, 暴露腹膜。

(3)用带针头的一次性注射器抽取1~2 mL腹腔液(乳白或微黄色), 放入无菌离心管中。注意: 抽取腹腔液时, 用左手拇指和食指捏住撕至两侧的小鼠左侧腹部皮肤, 然后用中指从小鼠左侧腹部外部将内脏推向右侧, 使腹腔内留出一定空隙, 以便针头进入腹腔后不被腹腔内的肠、肠系膜等堵塞而影响吸液。

(4)向细胞悬液中加入5 mL灭菌生理盐水, 混匀; 吸取少量样品用血球计数板计数细胞浓度, 剩余细胞悬液记下体积后 $1\ 500\ \text{r/min}$ 离心5 min, 弃上清, 留细胞沉淀。

(5)用一次性注射器吸取适量灭菌生理盐水重悬细胞沉淀, 使细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

(6)每只无瘤小鼠腹腔注射0.2 mL细胞悬液。

1.2 小鼠腹腔繁殖瘤细胞需要注意的事项

全程应无菌操作。凡与细胞接触的容器及试剂均应预先消毒, 抽取腹水和注射前均需用酒精棉球对小鼠腹部进行擦拭消毒, 用一次性注射器吸取细胞及每次注射前后应用酒精灯消毒注射器针头。

操作要快, 从抽取细胞到注射完毕最好控制在30 min内。为了节省时间, 可不计数, 洗涤后直接用原腹腔液3倍体积的生理盐水重悬细胞沉淀, 然后给每只小鼠腹腔注射0.2 mL细胞悬液。

1.3 小鼠腹腔繁殖瘤细胞相比体外培养细胞的优势

从上面方法可以看出, 体内增殖腹水瘤细胞所需实验条件简单, 在普通实验室有高压蒸汽消毒锅、酒精灯、离心机即可; 实验试剂只有生理盐水, 成本

低; 无需进行复杂的无菌操作; 所需时间短, 实际操作时间不超过2 h。

利用体外细胞培养技术也可以获得大量细胞, 并且体外培养便于控制细胞生长环境、便于获得均一细胞群、便于施加实验因素以及便于观察实验结果, 在研究肿瘤细胞生物学特性(如生长速度、黏附能力、迁移能力等)方面、肿瘤发生发展病理方面以及抗肿瘤药物筛选及药物敏感性检测方面、致突变化合物检测方面等与体内试验相比有一定的优势, 可以避免复杂的机体内环境其他因素对实验结果的影响^[3]。但与体内增殖腹水瘤细胞相比, 存在如下弊端: (1)体外培养细胞对实验条件要求较高。需要有细胞培养间、超净工作台、高压蒸汽消毒锅、 CO_2 培养箱、纯水制备设备、培养液等溶液的过滤设备、细胞冻存及解冻设备等。(2)体外培养细胞成本较高。细胞株、培养液、血清等材料及试剂价格昂贵。(3)体外培养细胞对实验准备人员无菌操作技术要求较高, 易因操作不慎导致微生物污染而培养失败。(4)体外培养细胞操作麻烦而费时。最基本的操作包括培养间及超净工作台消毒、洗涤及消毒培养用品、过滤分装培养液、细胞准备及加样等, 需要时间远超过2 h。若一次培养获取的细胞量不够还需传代培养。

显而易见, 利用小鼠腹腔繁殖瘤细胞比体外培养细胞具有方便、省时、实验条件简单、实验成本低等优势。

2 利用腹水瘤细胞开展的细胞实验举例

2.1 利用腹水瘤细胞进行滴片法制备细胞分裂染色体标本实验

制备良好的细胞分裂染色体标本是进行动、植物细胞遗传学研究及临床医学遗传性疾病分析的基础。滴片法是截止目前制备动、植物分散良好的染色体标本片的唯一方法。制备动物和植物细胞两大类材料染色体标本时方法的不同处是, 分裂中的动物细胞只要预先制备好单细胞悬液就可按滴片法制片, 植物细胞则需要先用酶破坏细胞间质及细胞壁, 获得原生质体后再用滴片法制片^[4]。因此, 学习滴片法制备细胞分裂染色体标本片很有意义。

腹水瘤细胞增殖迅速, 有大量处于分裂期的细胞, 是制备染色体标本的好材料。其为单细胞悬液, 可直接用滴片法制备染色体标本。实验时只需将腹

水瘤细胞从小鼠腹腔抽出后按照该类材料制备染色体标本的一般方法直接进行相关操作, 如离心沉淀、低渗、预固定、固定、滴片及染色等^[4], 就可获得良好的染色体标本片(图1A)。每个同学0.5 mL的腹水瘤细胞悬液[内含腹水瘤细胞 $[(5\sim 10)\times 10^7]$, 一个30人的班只要有2只荷腹水瘤小鼠就足够学生进行常规实验及不同条件(如是否低渗处理及处理时间长短、用湿片或干片滴片等)对制片效果影响的探究性实验, 比常规用于滴片法制备细胞分裂染色体标本的材料有明显的优势。那么, 什么是常规用于滴片法制备细胞分裂染色体标本的材料? 用其进行这类实验存在什么弊端呢?

常规制备人类或大动物染色体标本片的材料为培养的血细胞^[5-7]。用其进行该类实验教学, 一般需要在实验前3天给每个同学培养至少1瓶血细胞(25 mL培养瓶, 装培养液5~6 mL, 接种抗凝血0.3 mL, 内含可分裂的淋巴细胞约 $[(0.5\sim 1)\times 10^6]$, 每班30个同学就需要准备至少30瓶细胞, 如要进行实验条件的对比, 还需成倍增加细胞量。条件、成本、操作的麻烦及费时如前所述。腹水瘤细胞准备与之相比需要条件简单, 操作省时而且成本低。

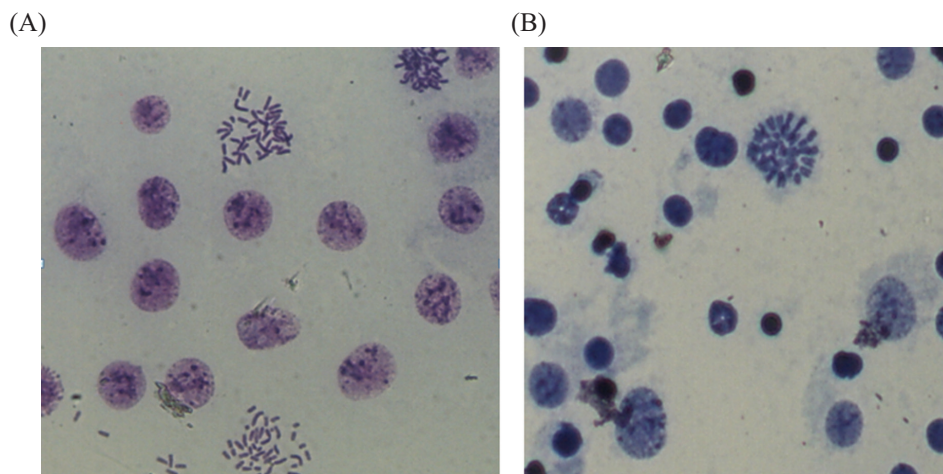
常规制备小动物如小鼠染色体标本的材料为骨髓细胞^[5]。优点是不必花费时间培养而可直接取材制片。但用其进行本实验教学, 至少每两个同学需要一只小鼠, 与用腹水瘤细胞相比实验成本大为增加。还有, 骨髓细胞组成复杂、分裂相少(图1B), 不便观察细胞分裂各期核及染色体特征。

2.2 利用腹水瘤细胞进行细胞增殖及细胞活力检测实验

细胞增殖和细胞活力(cell viability)是细胞研究者经常需要检测的项目, 用于研究某些细胞本身的增殖特性、生长因子和毒性物质对细胞增殖和活力的影响等^[8]。因此, 将该类实验列入细胞生物学实验课教学内容很有实践意义。

反映细胞增殖最直接的方法为简单计数法。该法简单, 用于快速分裂的细胞如细菌也是可行的。缺点是敏感度低, 不能反映细胞分裂前DNA复制的变化, 一般不用于真核细胞增殖检测。³H-TdR(氚标记的胸腺嘧啶核苷)掺入法很敏感, 能够显示DNA的复制情况, 缺点是存在同位素污染及危害问题, 限制了其应用^[8-9]。通过检测细胞代谢活性反映细胞增殖是目前比较常用的方法, 具体有MTT(二甲基噻唑二苯基四唑溴盐)法、XTT法、MTS法、cck-8(cell counting kit-8)法、WST-1法及WST-8法等^[9]。这些方法操作简单, 使用安全, 通过控制实验条件也能达到很高的检测灵敏度, 广泛应用于生物学和医学研究的多个领域。因此, 建议在高校细胞生物学实验教学(日常实验课或开放实验)中增加这类实验内容, 诸如“MTT法比色检测的细胞活力与细胞数量的关系实验”、“抗癌药物羟基喜树碱对腹水瘤细胞活力的影响实验”等。

MTT法在这类方法中最为经典, 在医学基础与应用研究尤其是抗癌药物筛选及临床肿瘤药敏实验^[10-11]方面应用也最为广泛, 被我国药典^[12]收录,



A: 滴片法制备的小鼠S180腹水瘤细胞有丝分裂染色体标本图; B: 正常小鼠骨髓细胞有丝分裂染色体标本图。

A: mitotic chromosomes of mouse S180 ascites sarcoma cells prepared by dropping-method; B: mitotic chromosomes of normal mouse bone marrow cells.

图1 滴片法制备的小鼠细胞有丝分裂染色体

Fig.1 Mitotic chromosomes of mouse cells by dropping-method

用于一些药物的促细胞增殖活性和细胞毒性检测。实验成本较低, 适合于成本预算限制严格的学校开展。但由于该法所需时长超过日常一次实验课的2~3小时, 可在时间限制不严的细胞生物学开放实验课中开展。XTT法、MTS法、cck-8法、WST-1法及WST-8法等是近十年发展起来的类似MTT法的细胞增殖与活力检测方法, 产生的甲臜均为可溶性产物, 无需溶解即可直接比色。其中的cck-8法因为检测试剂水溶性更强、更易于保存且检测灵敏度更高而应用最多^[9]。而且, 作为学生实验其最大的优势是实验用时较短^[13], 可在正常实验课时段开展。

通过这类实验, 学生可以从中了解到: (1)通过检测细胞线粒体酶活可以反映细胞增殖及活力。(2)MTT法及cck-8法比色值与细胞浓度关系密切。在一定的细胞浓度范围内, 比色值与细胞浓度呈线性关系; 细胞浓度过大及过小, 都会导致线性关系不佳。(3)有多种因素影响比色结果。这些因素包括稀释细胞用液、MTT法细胞裂解前是否离心培养板并弃除部分培养液、裂解液种类及作用条件、比色孔中是否因操作导致气泡产生等。需要注意的是, 不同小鼠腹腔繁殖的腹水瘤细胞活性可能不同, 实验时同一个学生应该用相同小鼠来源的腹水瘤细胞进行检测; 另外, 腹水瘤细胞中往往混入了少量的小鼠血细胞, 其中的白细胞也具有代谢该类物质的活性, 用血球计数板计数并计算细胞浓度时要将其计算在内, 否则会导致检测本底提高而影响实验结果。

“细胞活力”一词往往有两层含义, 一层含义是细胞的代谢活性, 另一层含义是总细胞中活细胞的比率^[8]。细胞代谢活性用MTT法、cck-8法及其他类似方法检测即可, 总细胞中活细胞比率检测最常用和最简单的方法为染料排斥试验(dye exclusion test)^[8,14,16]。检测原理是: 活细胞完整质膜对某些染料分子如台盼蓝(trypan blue)和碘化丙锭(propidium iodide, PI)具有不可逾越的屏障作用, 将这类染料排斥在细胞外; 死细胞受损质膜却允许这类染料进入细胞。台盼蓝染料排除法是最常用的细胞活力检测方法^[8], 结果可通过普通光学显微镜检查。实验时用煮沸、冷冻、紫外线照射等物理因素及抗癌药物、去污剂等化学因素处理腹水瘤细胞, 然后用台盼蓝染料对处理细胞和对照细胞进行染色, 观察死细胞和活细胞的着色效果、统计活细胞比率。PI为荧光染料, 用于流式细胞仪及荧光显微镜分析细胞存活率。

医学基础及应用研究中这类方法应用最多的细胞材料是体外培养的肿瘤细胞和动物淋巴细胞。腹水瘤细胞作为材料的优势如前所述。

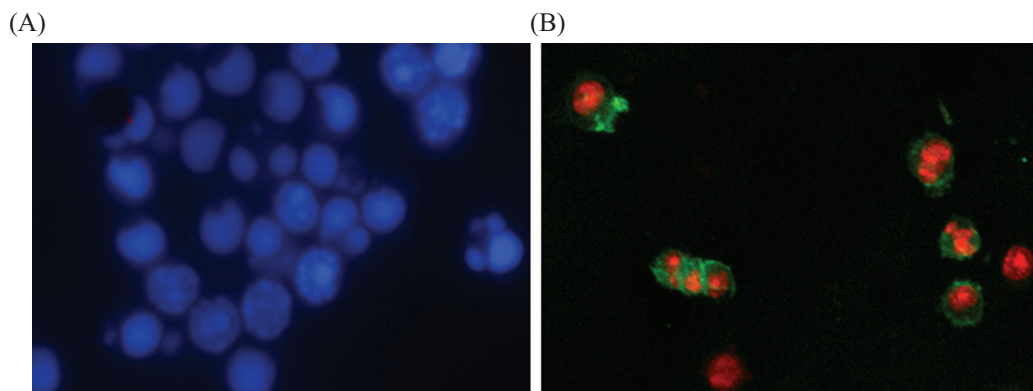
2.3 利用腹水瘤细胞进行细胞凋亡诱导及检测实验

细胞凋亡是一种细胞死亡的重要形式, 对于生命机体意义重大, 参与机体的正常发育分化及一些重要疾病的病理过程。因为其重要, 2002年的诺贝尔生理学或医学奖就授予了细胞程序性死亡遗传规律的发现者悉尼·布雷内(Sydney Brenner)、约翰·苏尔斯顿(John Sulston)和罗伯特·霍维茨(Robert Horvitz)。还由于这种细胞死亡方式在体内不引起炎症^[4], 对机体产生的有害影响较小, 在应用领域, 筛选开发诱导凋亡型抗肿瘤药物是抗肿瘤药物研发的一个重要方向。因此, 在细胞生物学实验教学中开设细胞凋亡检测有关实验的意义不言自明。

在细胞生物学实验教材中, 细胞凋亡诱导及检测所列材料一般为体外培养的肿瘤细胞^[15-17]。如前所述, 很难在教学实践中通过细胞体外培养提供大量所需的细胞材料。我们通过实践发现, 用腹水瘤细胞替代培养的肿瘤细胞, 凋亡诱导效果可靠, 能够达到应有的教学目的。并且, 只要在实验前一定时间将具有诱导凋亡活性的抗癌药物直接注射入荷腹水瘤小鼠的腹腔就可诱导腹水瘤细胞凋亡, 操作简单。诱导腹水瘤细胞凋亡的具体做法是: 参照颜玉蓉等^[18]和刘敏等^[19]用羟基喜树碱诱导肿瘤细胞凋亡的用量, 将人医临床用羟基喜树碱注射液, 用生理盐水稀释成1 mg/mL, 按每只小鼠0.6~1.2 mL注射于小鼠腹腔, 使其浓度在腹腔液中约为40~80 $\mu\text{g/mL}$ (腹水体积按15 mL计), 作用24~48 h诱导腹水瘤细胞凋亡。然后, 抽取腹腔液后可进行如下凋亡相关检测。

2.3.1 凋亡细胞形态及核变化的染色观察 将腹水瘤细胞悬液经1 500 r/min离心5 min后弃大部分上清, 留约与细胞沉淀体积相同的上清重悬细胞沉淀后制备涂片标本, 晾干后用瑞氏染液或吉姆萨染液染色后进行观察^[4]。也可用Hoechst 33258等染核的荧光染料对细胞悬液进行染色后制备细胞装片于荧光显微镜下观察核的变化(图2A)。

2.3.2 凋亡细胞的FITC-AnnexinV/PI双染色实验 用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的磷脂酰丝氨酸特异结合物AnnexinV(即FITC-AnnexinV)对凋亡细胞进行染色可显示凋亡细胞膜的磷脂酰丝氨酸, 使凋亡细胞膜显示绿色; 再用不能透过正常细胞膜的碘化



A: 腹腔注射1.2 mL羟基喜树碱溶液(1 mg/mL)处理小鼠S180细胞48 h后, 体外用Hoechst 33258染色的细胞荧光显微镜照片, 显示凝集的染色质及凋亡小体; B: 用FITC-AnnexinV/PI染色的细胞激光共聚焦显微镜照片, 显示凋亡晚期细胞(表面绿色、内部红色)。

A: the fluorescence microscopic observation of staining the cells with Hoechst 33258 stain, showing chromatin agglutination and apoptosis body after injecting 1.2 mL hydroxycamptothecine solution (1 mg/mL) into mouse abdominal cavity for 48 h to induce S180 ascites sarcoma cells apoptosis; B: the confocal laser scanning microscopic picture of staining them with FITC-AnnexinV/PI, showing later stage apoptosis cells (surface green, inside red).

图2 凋亡腹水瘤细胞的荧光染色

Fig.2 Fluorescence microscopic observation of mouse S180 ascites sarcoma cells apoptosis

丙锭(PI)染色凋亡细胞, 还可显示凋亡晚期细胞膜通透性增大的变化^[8]。结果是, 未发生凋亡变化的细胞不显示荧光, 凋亡早期细胞只有膜显示绿色, 凋亡晚期细胞膜显示绿色, 核显示红色(图2B)。

2.3.3 凋亡细胞DNA的提取及梯状条带电泳 凋亡细胞DNA在琼脂糖凝胶电泳时产生梯状分布的DNA条带, 可作为鉴别是否发生细胞凋亡的一个重要生化指标^[14]。用诱导凋亡的腹水瘤细胞能够进行各种探索性试验: DNA断裂时机的检测、凋亡细胞DNA提取条件的优化实验等。检测DNA断裂时机时, 可用注射羟基喜树碱不同时间的腹水瘤材料进行实验; 凋亡细胞DNA提取优化可从细胞数量、裂解液组成、裂解时间、DNA沉淀时间、沉淀离心时间等方面进行优化。特别需要注意的是, 凋亡细胞产生的DNA片段远小于哺乳动物细胞基因组DNA, 如参考提取基因组DNA的方法提取凋亡细胞DNA, 可能会导致小片段DNA丢失, 电泳时不易出现梯状条带。需要延长DNA沉淀和离心时间, 并用浓度较高的琼脂糖凝胶进行电泳才会得到较好的实验结果。

2.3.4 凋亡细胞流式细胞仪分选 FITC-AnnexinV和DAPI同时对凋亡细胞进行染色后可通过流式细胞仪分选凋亡细胞, 并计算凋亡率。

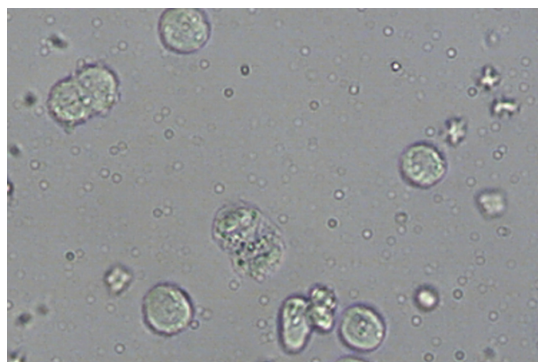
2.4 利用腹水瘤细胞进行细胞冻存及解冻复苏实验

细胞研究及应用实践中, 为了保种和长期保存细胞的活性, 常须将细胞进行冷冻保存, 并在需要时重新复苏和培养。

用腹水瘤细胞作为细胞冻存及解冻复苏实验的材料由于取材方便而量大, 可进行多种对比及探究性实验。我们让学生进行的对比实验有: 加与不加冷冻保护剂及加不同种类冷冻保护剂、不同冷冻保护剂与细胞在冻存前后于室温条件下接触的时间长短等对按常规操作解冻后的细胞活力的影响。通过实验, 实现两个教学目的: 让学生了解细胞冻存时必须加冷冻保护剂; 不同冷冻保护剂使用条件不同, 应注意冻存前后的操作。

2.5 利用腹水瘤细胞进行细胞融合实验

细胞融合技术在细胞工程领域发挥着重要作用, 除了用于研制生产单克隆抗体外, 还用于培育植物新



图中大的圆形细胞为用50%分子量1 kDa的聚乙二醇(PEG)作用90秒的小鼠S180腹水瘤细胞。

The large circular cells in the picture are mouse S180 ascites sarcoma cells treated with 50% 1 kDa PEG for 90 s.

图3 腹水瘤细胞融合图

Fig.3 Cell fusion of mouse S180 ascites sarcoma cells

品种, 诱导不同种间、属间甚至不同科间原生质体的融合。细胞生物学实验教材及教学实践中, 多数用鸡红细胞作为细胞融合的实验材料^[15-16,20]。其缺点是, 红细胞为扁平状, 相互接触面小, 使得按常规融合方法得到的融合率往往很小。

腹水瘤细胞为球形, 细胞相互接触面大, 融合相对容易, 融合率高(图3)。可能存在的问题是, 很难区分融合和正在分裂的两个细胞, 因此, 也可用瘤细胞和鸡红细胞融合, 如李素文在《细胞生物学实验指导》一书^[11]中就用体外培养的HeLa细胞和鸡红细胞进行细胞融合实验。

综上所述, 小鼠腹水瘤细胞不但准备容易、成本低, 还具有活性高、分裂快、易被诱导凋亡及融合、纯度也较高等优势, 可广泛用于多个细胞生物学实验且效果良好。由于容易获得大量细胞材料, 使教师有可能开展各种探索及研究性实验教学, 在完成基本教学目标的基础上, 开展创新教学, 培养学生的创新意识和创新实验能力。

参考文献 (References)

- 1 周万青, 李芳秋. 一种自发抗肿瘤小鼠模型的建立及其抗肿瘤机制的研究进展. 医学研究生学报(Zhou Wanqing, Li Fangqiu. Discovery of a tumor resistance mouse and investigation of its mechanism. Journal of Medical Postgraduates) 2008; 21(9): 998-1001.
- 2 宋长城, 张百红, 胡兵, 李新民. 龙力胶囊对S180荷瘤小鼠化疗的增效减毒作用. 现代肿瘤医学(Song Changcheng, Zhang Baihong, Hu Bing, Li Xinmin. Synergism and attenuation effects of Longli capsule on S180 sarcoma xenografted mice with chemotherapy. Modern Oncology) 2010; 18(12): 2326-9.
- 3 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社(Xue Qingshan. Principles and techniques of *in vitro* culture. Beijing: Science Press) 2001, 10-9; 342-3.
- 4 薛雅蓉, 张晶, 华子春. 实用细胞生物学实验. 北京: 科学出版社(Xue Yaron, Zhang Jing, Hua Zichui. Cell biology experiment. Beijing: Science Press) 2012, 131-4.
- 5 乔守怡. 遗传学分析实验教程. 北京: 高等教育出版社(Qiao Shouyi. Genetics analysis experiment course. Beijing: Higher Education Press) 2008, 74-80.
- 6 潘英树, 李梅, 张嘉保, 赵玉民, 胡成华. 草原红牛染色体核型与C带分析. 黄牛杂志(Pan Yingshu, Li Mei, Zhang Jiabao, Zhao Yumin, Hu Chenghua. Study on the karyotype and C-band of red steppe. Journal of Cattle Science) 2005; 31(3): 6-8.
- 7 陈伟平, 赵淑娟, 庞有志, 杨又兵, 白俊艳. 伏牛白山羊染色体核型分析. 黑龙江畜牧兽医(Chen Weiping, Zhao Shujuan, Pang Youzhi, Yang Youbing, Bai Junyan. Analysis of chromosome karyotype in Funiu white goat. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine) 2008; 5: 13-5.
- 8 Luttmann W, Bratke K, Kupper M, Myrtek D, 编著, 沈倍奋, 译. 实验者系列: 免疫学. 北京: 科学出版社(Shen Beifeng, translated. The experimenter series: Immunology. Beijing: Science Press) 2007, 185-6.
- 9 石淙, 万腊根. 细胞增殖的检测方法. 实验与检验医学(Shi Cong, Wan Lagen. The detection methods of cell proliferation. Experimental and Laboratory Medicine) 2012; 30(2): 153-5.
- 10 韩梅, 李金凤, 谭祺, 孙媛媛, 王永炎. MTT方法在药物筛选研究中的应用限制. 中国药理学(Han Mei, Li Jinfen, Tan Qi, Sun Yuanyuan, Wang Yongyan. Limitation of the use of MTT assay for screening in drug discovery. Journal of Chinese Pharmaceutical Science) 2010; 19(3): 195-200.
- 11 陆艳. MTT法测定肿瘤细胞对化疗药物的敏感性. 医药导报(Lu Yan. Evaluation of sensitivity of tumor cell to chemotherapeutic drugs using MTT assay. Herald of Medicine) 2010; 29(8): 1002-5.
- 12 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2010年版, 三部. 北京: 中国医药科技出版社(National pharmacopoeia committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2010 edition, Part 3. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press) 2012, 72-4.
- 13 梁伟, 高青梅, 张文君, 秦伟, 陆惠娜, 黄斌斌, 等. 2种cck-8法试剂最佳实验条件比较. 中国输血杂志(Liang Wei, Gao Qingmei, Zhang Wenjun, Qinqin Wei, Lu Huina, Huang Binbin, et al. The experimental conditions comparison of two kinds of cck-8. Chinese Journal of blood transfusion) 2012; 25(1): 41-2.
- 14 王金发. 细胞生物学. 北京: 科学出版社(Wang Jinfa. Cell biology. Beijing: Science Press) 2007, 604.
- 15 王金发, 何炎明. 细胞生物学实验教程. 北京: 科学出版社(Wang Jinfa, He Yanming. Cell biology experiment course. Beijing: Science Press) 2004, 150-2.
- 16 安利国. 细胞生物学实验教程. 北京: 科学出版社(An Ligu. Cell biology experiment course. Beijing: Science Press) 2005, 88-9.
- 17 李素文. 细胞生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社和施普林格出版社(Li Suwen. Cell biology experiment guidance. Beijing: Higher Education Press, Springer Press) 2001, 149-50.
- 18 颜玉蓉, 付玉荣, 王伟佳, 邱宗荫. 羟基喜树碱诱导肝癌细胞凋亡前后线粒体疏水蛋白质组的定量分析. 中国生物化学与分子生物学报(Yan Yurong, Fu Yurong, Wang Weijia, Qiu Zongyin. Quantitative analysis of hepatoma cells. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology) 2008; 24(4): 373-82.
- 19 刘敏, 王朝晖, 李玲. 癌细胞原代培养对化疗药物敏感性的探讨. 中国微生态学杂志(Liu Min, Wang Zhaohui, Li Ling. Chemosensitivity to primary cultured cancer cells. Chinese Journal of Microecology) 2008; 20(3): 241-5.
- 20 李玟. 细胞融合实验方法的改进. 汕头大学医学院学报(Li Wen. Improvement of experimental method of cell fusion. Journal of Shantou University Medical College) 2005; 18(3): 183-4.