

黑色素瘤模型的建立与评价

姚香利¹, 苗旭光¹, 魏茜茜¹, 王 暄¹, 刘守信^{1,2}

(1.河北科技大学化学与制药工程学院,河北石家庄 050018;2.河北省药用分子化学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地,河北石家庄 050018)

摘要:为了快速有效地进行在体药物筛选,研究了以小鼠黑色素实体瘤组织中的原代细胞构建黑色素瘤模型的方法。从荷黑色素瘤小鼠的组织中提取原代肿瘤细胞,与体外培养的 B16 细胞通过皮下注射分别植入两组 C57BL/6 小鼠体内,考察两组小鼠肿瘤显现时间和生长速度。结果表明:当接种浓度为 5.0×10^6 个/mL、每只 0.2 mL 时,小鼠黑色素瘤原代细胞和体外培养的 B16 细胞成瘤率分别为 100% 和 80%,且小鼠右前肢肿瘤(大小约 4 mm^3)出现时间分别约在第 3 天和第 8 天。紫杉醇对两种模型的初步评价显示,与体外培养的 B16 细胞模型相比,原代 B16 细胞模型是体内筛选和评价特定化合物抗肿瘤活性的一种可行而有效的方法,成瘤时间较短、成瘤率高,所得实验数据误差也较小。模型的建立为相关药物评价模型的开发研究提供了一条可借鉴的新途径。

关键词:分子药理学;黑色素瘤;原代细胞;C57BL/6 小鼠;B16 细胞;接种浓度

中图分类号:R332;R730.5 **文献标志码:**A

Establishment and evaluation of melanoma model

YAO Xiangli¹, MIAO Xuguang¹, WEI Xixi¹, WANG Xuan¹, LIU Shouxin^{1,2}

(1.School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2.State Key Laboratory Breeding Base-Key Laboratory of Molecular Chemistry for Drug of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: In order to screen drug rapidly and effectively in vivo, the approach of the establishment for mouse melanoma model with primary cell from melanin solid tumor tissue of mouse is studied. The primary cell and the cultured B16 cells in vitro are implanted into two groups of C57BL/6 mice by hypodermic, respectively. The appearing time and the growth rate of tumor in two groups of mouse are investigated. The results show that when the inoculation is 0.2 mL for each one (the cell concentration of 5.0×10^6 /mL), the tumor formation rates of the primary tumor cells of mouse melanoma and in vitro cultured B16 cells are 100% and 80%, respectively, and it takes about 3 and 8 days respectively that the tumor sizes become about 4 mm^3 . The preliminary evaluation of two models are carried out with taxol, showing that the primary B16 cell model is a feasible and effective method for screening and evaluating the antitumor activity of specific compounds in vivo compared with the B16 cell model cultured in vitro, and it has shorter tumor forming time, higher tumor forming rate and less error in the obtained experimental data, which provides a new way for the development and research of related drug evaluation models.

收稿日期:2018-05-07;修回日期:2018-06-05;责任编辑:张士莹

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB723501)

第一作者简介:姚香利(1991—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事抗肿瘤药物活性筛选及评价方面的研究。

通信作者:刘守信教授。E-mail:chlsx@263.net

姚香利,苗旭光,魏茜茜,等.黑色素瘤模型的建立与评价[J].河北科技大学学报,2018,39(4):343-348.

YAO Xiangli, MIAO Xuguang, WEI Xixi, et al. Establishment and evaluation of melanoma model[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2018, 39(4): 343-348.

Keywords: molecular pharmacology; melanoma; primary cell; C57BL/6 mice; B16 cell; inoculation density

恶性黑色素瘤是起源于神经嵴的黑色素细胞恶性肿瘤^[1]。统计结果表明,在美国,恶性黑色素瘤的年发病人数为 88 000 人左右,且每小时就有一名恶性黑色素瘤患者失去生命^[2]。恶性黑色素瘤的发病率逐年增高^[3],全球各地区均呈持续增长趋势^[4]。外科手术治疗中,I 期、II 期黑色素瘤患者 5 年生存率正从 80% 下降到 55%^[5-7]。因此,针对治疗恶性黑色素瘤药物的研发已经成为本领域研究的重点之一。人类利用小鼠模型进行癌症研究已有 110 多年的历史^[8]。药物的研发效率常常依赖于动物肿瘤模型的优劣。孟星君等^[9]和王淑瑞等^[10]在小鼠黑色素瘤模型的建立中均采用将体外培养的小鼠黑色素瘤细胞 B16 接种于小鼠皮下的方法。

本文通过对比小鼠黑色素瘤组织中提取的原代肿瘤细胞和体外培养 B16 细胞两种方法所建立的小鼠黑色素瘤动物模型的差异,优选建立更高效的黑色素瘤模型方法,从而为研究黑色素瘤治疗药物的体内实验提供便利途径。以 C57BL/6 小鼠为实验动物,选取不同浓度的小鼠黑色素瘤 B16 细胞,在小鼠皮下建立肿瘤模型,优选出最佳的细胞接种浓度;同时,以最佳接种浓度接种从组织中提取的原代肿瘤细胞和体外培养的 B16 细胞,于两组小鼠右前肢腋窝皮下接种后,观察各组小鼠肿瘤显现时间、肿瘤生长速度,以优选出建立小鼠黑色素瘤动物模型的最佳方法。在此基础上,用临床使用的抗肿瘤药物紫杉醇对所建立的模型进行了初步评价。

1 主要仪器与材料

CO₂ 培养箱(3131),美国 Thermo 公司提供;低速离心机(5418),德国 Eppendorf 公司制造。

C57BL/6 小鼠,雄性,6~7 周龄,17~20 g,SPF 级,由河北省实验动物中心(河北医科大学)提供。

B16 小鼠黑色素瘤细胞株,由中国科学院上海细胞生物研究所提供;胎牛血清,购自 Bovogen Biologicals Pty Ltd;胰蛋白酶,购自 Gibco 公司;紫杉醇,购于广州爱纯医药科技和西安康诺化工有限公司;细胞完全培养基:将 45 mL RPMI-1640(Gibco)+5 mL 胎牛血清+500 μL(双抗青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 mg/L)充分混匀,用于培养细胞,将细胞置于 37 °C、5%(体积分数,下同)CO₂ 的培养箱中培养。

2 实验方法

2.1 小鼠黑色素瘤 B16 细胞模型的建立

取对数生长期 B16 细胞,用 PBS 洗涤 2 次,用胰蛋白酶进行消化,胎牛血清终止,轻轻吹打混匀,收集细胞悬浮液。将上述悬浮液置于离心机内,以 1 000 r/min 转速离心 5 min,弃去上清液。加入 1 mL 基础培养基,轻轻吹打成单细胞悬浮液,以台盼蓝染色,活细胞数在 95% 以上。用细胞计数板计数,用 PBS 调整细胞浓度,细胞浓度约为 5.0×10^5 , 5.0×10^6 , 5.0×10^7 个/mL。取 C57BL/6 小鼠 30 只,随机平均分为 3 组,即低浓度组(5.0×10^5 个/mL)、中浓度组(5.0×10^6 个/mL)和高浓度组(5.0×10^7 个/mL),每只接种 0.2 mL。用 75% 的酒精擦拭小鼠右前肢腋窝处进行消毒,取已经调整好浓度的小鼠黑色素瘤 B16 细胞,接种于相对应的各组小鼠右前肢腋窝皮下,每日触摸小鼠右前肢,观察是否有肿瘤块出现,并隔天记录肿瘤的生长情况。

2.2 原代肿瘤细胞小鼠黑色素瘤模型的建立

首先剥离小鼠皮下的肿瘤块,选择光滑的肿瘤组织,用 PBS 洗涤。将处理后的肿瘤组织放到培养皿中,加入少量 PBS,去除结缔组织和血管组织。用眼科剪将组织剪碎,用胰蛋白酶进行消化,以 1 000 r/min 转速离心 5 min,弃去上清液,分别加入到放有完全培养基的培养瓶中,于培养箱内孵育过夜,贴壁细胞为较纯的原代细胞。将细胞用 PBS 洗涤 2 次,用胰蛋白酶进行消化,胎牛血清终止,轻轻吹打混匀,收集细胞悬浮液^[11]。将此悬浮液置于离心机内,以 1 000 r/min 转速离心 5 min,弃去上清液。加入 1 mL 基础培养基,轻轻吹打成单细胞悬浮液,以台盼蓝染色,活细胞数在 95% 以上,采用细胞计数板计数,用 PBS 调整细胞浓度为最佳接种浓度,即 5.0×10^6 个/mL。

2.3 原代肿瘤细胞与体外培养 B16 细胞小鼠黑色素瘤模型平行接种实验

取 C57BL/6 小鼠 20 只,随机平均分为 2 组。用 75% 的酒精擦拭小鼠右前肢腋窝处进行消毒。第 1 组接种

小鼠黑色素瘤 B16 细胞,浓度为 5.0×10^6 /mL,每只接种 0.2 mL;第 2 组接种小鼠黑色素瘤原代细胞,浓度为 5.0×10^6 个/mL,每只 0.2 mL。每日触摸小鼠右前肢,观察是否有肿瘤块出现,并记录每天肿瘤的生长情况。

2.4 紫杉醇对两种小鼠黑色素瘤模型的评价

体外培养细胞组和原代肿瘤细胞组建模方法同“2.1”和“2.2”,每组 10 只 C57BL/6 小鼠,每组接种小鼠黑色素瘤细胞后,观察小鼠右前肢腋窝皮下。发现小鼠右前肢有肿瘤(大小约 4 mm^3)出现时,视为肿瘤显现时间。次日,以临床使用的紫杉醇为抗肿瘤药物,采用腹腔注射方法给药,剂量为 $10 \text{ mg/kg}^{[12]}$,周期为 21 天。重复 3 次实验,考察两组小鼠肿瘤的变化情况。

2.5 观察指标

观察并记录小鼠的精神状态、饮食、毛色,以及肿瘤外观的形态情况。接种后每日触摸小鼠右前肢腋下,考察肿瘤显现时间、肿瘤生长速度。将出现约 4 mm^3 的肿瘤块时间视为肿瘤显现时间,每日用游标卡尺记录肿瘤的最长径 $L(\text{mm})$ 、垂直方向最大横径 $W(\text{mm})$ 、肿瘤体积 $V(\text{mm}^3)$,计算公式为 $V=LW^2/2^{[13]}$ 。

2.6 统计学处理

数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用 t 检验进行统计分析,其中差异 $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

3 结果与讨论

黑色素瘤的致死率非常高,细胞也易于转移。为了筛选出合理的治疗药物,建立快速、有效的黑色素瘤动物模型已成为相关研究的重点之一。裸鼠免疫功能缺陷、存活率低,对操作环境的要求比较严格,且价格相对较为昂贵^[14]。而小鼠相对来说在这些方面具有较为明显的优势。所以,在药物初步筛选期间,选择小鼠黑色素瘤作为实验模型的技术上和经济上是可行的。原代细胞取自新鲜剥离的肿瘤组织,其生物学特性尚未发生较明显的变化,仍保留原二倍体遗传性,基因保留量在 90% 以上,因而更适用于药物敏感性试验,所得数据更具有说服力^[15-17]。

参照已报道的文献^[18-22],本实验采用胰蛋白酶消化法处理肿瘤标本,剔除基质纤维、间质蛋白等组织间质,充分分散组织细胞,以保证在短时间内生长成片,获得较高产量、较高纯度的原代细胞。

3.1 小鼠荷瘤后状态考察

随着 B16 细胞接种数的不同,C57BL/6 小鼠的肿瘤生长速度也不同。接种数越多,肿瘤显现时间越早,肿瘤生长越快,小鼠的基本状况越差。高浓度组接种后,约在第 5 天小鼠出现肿瘤块,其精神状态良好,毛色洁白,食物摄入量正常。第 6~12 天,肿瘤增长迅速,小鼠右前肢肿瘤周边脱毛严重,肿瘤周边可见血管,小鼠精神萎靡,食物摄入量减少。第 13~20 天,部分小鼠肿瘤块有渗血或出血现象。随着时间的延长,小鼠精神恍惚,几乎不进食水。中浓度组接种后,小鼠约在第 8 天出现肿瘤块,第 9~12 天,小鼠精神状态尚可,食物摄入量正常,肿瘤生长速度缓慢。第 13~20 天,小鼠精神状态不如之前,食物摄入量减少,毛色不洁,肿瘤增长速度加快。相对于高、中浓度组,低浓度组肿瘤生长缓慢,小鼠基本情况较好,出现精神不佳、毛色不洁、饮食量减少等情况的时间段推后。原代肿瘤细胞接种小鼠皮下后,约在第 3 天出现肿瘤块;第 4~7 天小鼠精神状态尚可,食物摄入量正常,肿瘤生长速度缓慢;第 8~20 天,小鼠精神状态萎靡,食物摄入量减少,肿瘤块增长速度明显。

3.2 B16 细胞接种浓度对肿瘤形成和生长的影响

接种肿瘤细胞浓度的变化,不仅影响着实体瘤显现的时间,同时也影响着成瘤率。选择低、中、高 3 个浓度组对小鼠肿瘤生长情况进一步考察,其组别间差异 $P < 0.01$ 。不同浓度 B16 细胞接种小鼠皮下实验结果见表 1。

表 1 不同浓度 B16 细胞接种小鼠皮下实验结果

Tab.1 Subcutaneous experiment of mice inoculated with B16 cells with different concentrations

组别	接种肿瘤细胞数/个	肿瘤显现时间/d	成瘤率/%
低浓度组	1.0×10^5	10.6 ± 0.5	70
中浓度组	1.0×10^6	8.0 ± 0.7	80
高浓度组	1.0×10^7	5.2 ± 0.8	100

表1数据表明,接种数目越多,肿瘤显现时间越早,成瘤率越高。图1是不同接种浓度条件下,实体瘤体积随时间的变化曲线。图1数据显示:低浓度组肿瘤出现时间最晚,肿瘤生长速度较为缓慢;中剂量组肿瘤生长速度较平稳;高剂量组肿瘤出现时间最早,肿瘤生长速度快。其中,相对于低浓度组,中浓度组肿瘤出现的时间较早,成瘤率能达到80%。同时,中浓度组肿瘤增长的速度较为平稳,更便于考察被测化合物对实体肿瘤增长的影响。对于高浓度组,小鼠肿瘤增长的速度过快,在第18天时肿瘤体积约为4000 mm³,考虑到动物理论学而放弃,停止实验。所以,确定中浓度组的接种细胞数为最佳接种浓度。

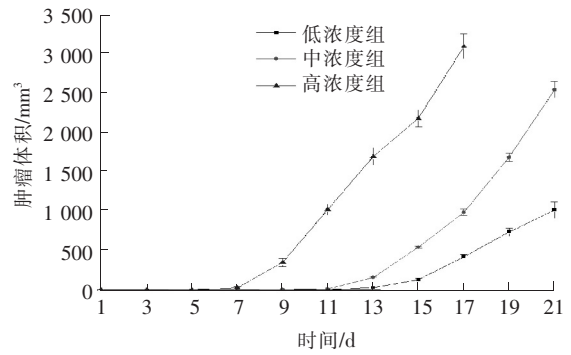


图1 不同浓度 B16 细胞接种后肿瘤的生长曲线
Fig.1 Tumor growth curve after inoculation of B16 cells with different concentrations

3.3 B16 原代细胞与体外培养细胞接种成瘤率的比较

在优选出接种浓度的基础上,进一步对 B16 原代细胞与体外培养细胞接种成瘤率进行了考察。选取 1.0×10⁶ 个细胞为接种浓度,同时接种于小鼠腋窝皮下,肿瘤显现时间及成瘤率见表2(P<0.01)。

表2 小鼠黑色素瘤原代细胞和体外培养 B16 细胞接种小鼠皮下实验对比
Tab.2 Comparison of subcutaneous experiment in mice inoculated with tumor tissue grinding fluid and in vitro cultured B16 cells

项目	接种肿瘤细胞数/个	肿瘤显现时间/d	成瘤率/%
体外培养	1.0×10 ⁶	8.1±0.7	80
原代细胞	1.0×10 ⁶	3.2±0.4	100

表2数据显示:在给定的接种浓度下,体外培养的 B16 细胞在约第8天出现肿瘤块,成瘤率可达80%。而接种原代细胞后,约在第3天发现肿瘤块,成瘤率可达100%。可见,原代细胞接种成瘤效果优于体外细胞接种。

3.4 最佳接种浓度条件下肿瘤的生长

在最佳接种浓度下,将体外培养的 B16 细胞和小鼠黑色素瘤原代细胞接种于小鼠皮下,考察实体瘤在两组小鼠体内的生长情况,数据如图2所示。由图2实体瘤增长曲线可知,与接种体外培养 B16 细胞相比,接种原代细胞的小鼠黑色素实体瘤的生长速度较快,成瘤率较高,但两组的肿瘤生长速度均较为平稳。

3.5 建模方法评价

为了更进一步考察两种模型在药物筛选中应用的可行性以及特点,研究中选择目前临床上使用的抗肿瘤药物紫杉醇测试了所建模型。接种体外培养 B16 细胞和原代 B16 细胞于小鼠皮下,按常规选取成瘤后的小鼠,将其随机分为两组,平行各选10只,编号从1到10,腹腔注射紫杉醇。在给药期间,小鼠均没有死亡现象。给药21天后,观察各组小鼠的肿瘤体积大小。考虑到小鼠个体差异性,实验重复3次,结果基本相似,实验数据如图3所示。

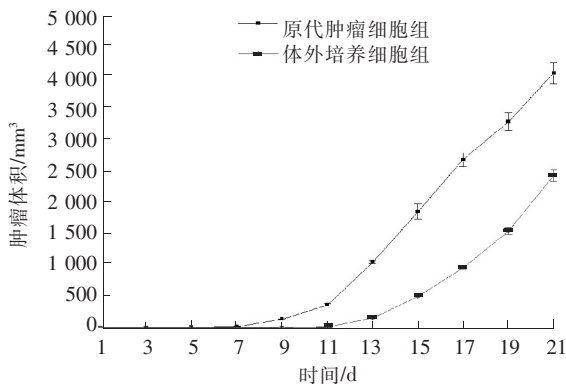


图2 最佳接种浓度两组小鼠肿瘤生长曲线
Fig.2 Tumor growth curve of two groups of mice with optimized inoculation concentration

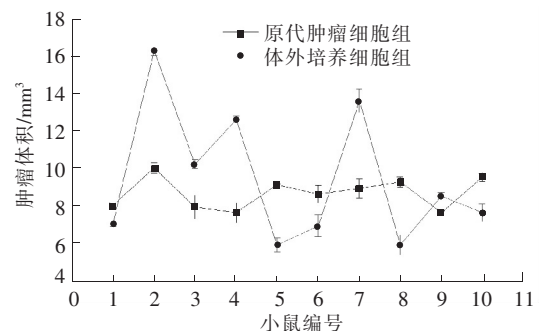


图3 小鼠腹腔注射紫杉醇21天后肿瘤体积大小
Fig.3 Tumor size after intraperitoneal injection of paclitaxel in mice for 21 days

由图3可知,紫杉醇能够抑制黑色素瘤的增大,但似乎药物对两组小鼠体内肿瘤抑制的效果存在一定的差异,主要表现为各小鼠实体瘤体积相差较大。其中,原代肿瘤细胞组的各小鼠肿瘤体积相对差异不大,数据平行性较好。相反,体外培养细胞组的各小鼠肿瘤体积大小的波动性较大。药物筛选是一项系统而严谨的研究工作,数据的真实性和稳定性对判定化合物的药用价值十分重要。相对于体外培养细胞模型,原代B16细胞模型在筛选和评价特定化合物的抗肿瘤活性方面,数据误差较小,便于得出相对准确的评价。

4 结 论

1)选用体外培养的B16细胞,在低、中、高3个不同浓度下接种于C57BL/6小鼠皮下,优选出中浓度为优势肿瘤模型的接种浓度。

2)在中浓度基础上,将体外培养的B16细胞和原代肿瘤细胞分别同时接种于小鼠皮下,数据显示,原代细胞的小鼠黑色素实体瘤生长速度较快,成瘤率较高,但两组的肿瘤生长速度均较为平稳。

3)选择紫杉醇药物来评价所建模型的效果,结果显示,两种模型均可应用于药物的筛选,在疗程内未发现有小鼠死亡的现象。但在观察实体瘤的变化时发现,原代细胞肿瘤模型组的小鼠肿瘤体积在施药后21天时,彼此差异相对较小;而在施药计量、施药时间等所有条件相同的情况下,体外培养细胞模型组小鼠的肿瘤体积彼此相差较大。

4)原代B16细胞模型是体内筛选和评价特定化合物抗肿瘤活性的一种可行而有效的方法,成瘤时间较短、成瘤率高,所得实验数据误差也较小,为相关药物评价模型的开发研究提供了一条可借鉴的新途径。

5)本实验只做了小鼠黑色素瘤模型,今后尚需对其他肿瘤模型的建立开展更进一步的研究。

参考文献/References:

- [1] 祖丽胡玛尔·莫沙,康晓静.恶性黑色素瘤的免疫治疗研究进展[J]. 国际皮肤性病杂志, 2017,43(2): 117-120.
- [2] GREENLEE R T, HILLI-HARMON M B, MURRAY T, et al. Cancer statistics, 2001[J]. CA Cancer J Clin, 2001,51(1): 15-36.
- [3] 韩新峰.国际抗肿瘤药物市场趋势及制剂技术进展[J]. 河北工业科技, 2010, 27(3): 207-209.
HAN Xinfeng. Analysis of international anticancer drug market trends and preparation technology progress[J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2010, 27(3): 207-209.
- [4] GARBEA C, EIGENTLERA T K, KEILHOLZ U, et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: Current status and future prospects[J]. Oncologist, 2011, 16(1): 5-24.
- [5] CROWSON A N, MAGRO C M, MIHM M C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node[J]. Mod Pathol, 2006,19(sup2): 71-87.
- [6] BARNHILL R L, KATZEN J, SPATZPAT A, et al. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma[J]. J Cutan Pathol, 2005,32(4): 268-273.
- [7] FRANCKEN A B, SHAW H M, THOMPSON J F, et al. The prognostic importance of tumormitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up[J]. Ann Surg Oncol, 2004,11(4): 426-433.
- [8] 王硕,苏杭,袁经权,等.实验小鼠在癌症研究中的应用及其进展[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(9): 63-67.
WANG Shuo, SU Hang, YUAN Jingquan, et al. Application and recent advances of laboratory mouse in cancer research[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2011, 21(9):63-67.
- [9] 孟星君,李孝东,刘俊,等. C57BL/6J小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 139-144.
MENG Xingjun, LI Xiaodong, LIU Jun, et al. Establishment of a C57BL/6J mouse model of metastatic melanoma in the lung[J]. Chinese Journal of Experimental Animals, 2018, 26(2): 139-144.
- [10] 王淑瑞,齐浩,刘建强,等. B16黑色素瘤移植模型的建立[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2006,9(1): 18-20.
WANG Shurui, QI Hao, LIU Jianqiang, et al. Modeling of B16 melanoma cell in mice[J]. Journal of Xi'an University of Arts and Sciences (Natural Science Edition), 2006,9(1): 18-20.
- [11] 刘小珍,郑智国,凌志强. 肿瘤细胞原代培养与保存[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(4): 276-283.
LIU Xiaozhen, ZHENG Zhiguo, LING Zhiqiang. Primary culture and preservation of tumor cells[J]. Chinese Cancer, 2015, 24(4): 276-283.
- [12] 熊玮. 聚多巴胺表面修饰的紫杉醇纳米颗粒抗恶性黑色素瘤的作用研究[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
XIONG Wei. Study on the Effect of the Polydopamine Surface Modified PTX-loaded Nanoparticles for Malignant Melanoma[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016.
- [13] 张胜本,黄显凯,饶本强. SW-480裸鼠移植瘤模型的建立及其生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2002, 22(2): 109-111.

- ZHANG Shengben, HUANG Xiankai, RAO Benqiang. Establishment of model of transplanted tumor of human highly differentiated colonic carcinoma cell line SW-480 in nude mice[J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2002, 22(2): 109-111.
- [14] 陈陵际. 运用人癌裸小鼠移植瘤模型进行抗癌新药评价[J]. *上海实验动物科学*, 2001, 21(4): 247-250.
- CHEN Lingji. The criteria of new anticancer agents evaluation in human tumor nude mice model[J]. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 2001, 21(4): 247-250.
- [15] GIBSON D, AMBROSIO R E, SAMUEL M, et al. A method for isolating large Numbers of viable disaggregated cells from various human tissues for cell culture establishment[J]. *Vitro Cell Dev Biol*, 1986, 22(9): 529-534.
- [16] LEE M Y, CHOU C Y, TANG M J, et al. Epithelial mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor over expression, and snail up-regulation[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(15): 4743-4750.
- [17] RIDKY T W, CHOW J M, WONG D J, et al. Invasive three-dimensional organ otypic neoplasia from multiple normal human epithelia [J]. *Nat Med*, 2010, 16(12): 1450-1455.
- [18] 王义宝, 刘云会, 刘丽波, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养及其生物学行为初步探讨[J]. *神经解剖学杂志*, 2006, 22(2): 224-228.
- WANG Yibao, LIU Yunhui, LIU Libo, et al. Primary culture of brain microvascular endothelial cell and its biological behavior study[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2006, 22(2): 224-228.
- [19] 刘恺鸣, 迟路湘, 鲁向辉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(20): 2011-2013.
- [20] 梁朝峰, 郭英, 石德金, 等. 大鼠脑皮质微血管内皮细胞的分离和培养[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(5): 1038-1040.
- [21] 王志强, 梁锐, 陈明清, 等. 血清胰蛋白酶消化法和组织块法原代培养人包皮成纤维细胞的比较[J]. *生命科学研究*, 2012, 16(3): 242-247.
- WANG Zhiqiang, LIANG Rui, CHEN Mingqing, et al. Comparing trypsin digestion and tissue piece method in primary culture of human foreskin fibroblasts[J]. *Life Science Research*, 2012, 16(3): 242-247.
- [22] 田林郁, 李胜富, 周东. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离、培养及不同纯化方法的比较[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 41(5): 869-872.
- TIAN Linyu, LI Shengfu, ZHOU Dong. Separation culture and purification of rat brain micro-endothelial cell[J]. *Journal of Sichuan University(Medical Science Edition)*, 2010, 41(5): 869-872.