

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.015

新生小鼠卵巢组织的玻璃化冻存、移植及分离卵泡的体外成熟培养初步研究

罗 阳 杨向群 李佳琛 甘霏霏 田菁燕 宋 丹 彭南妮[△]

(深圳市第五人民医院生殖医学中心 广东 深圳 518000)

摘要 目的:系统地探索新生小鼠卵巢组织的玻璃化冻存建立卵巢库,移植和分离卵泡以及体外成熟培养的实验方法。**方法:**对1日龄小鼠卵巢组织进行冻存,解冻复苏和同种肾包膜下移植,从卵巢移植物种中进行卵泡分离和体外成熟培养。**结果:**①采用平衡液(ES)处理25min,玻璃化液(VS)处理3min方案冻存的卵巢组织具有更高比例的形态完整卵泡,其完整原始卵泡率均值达96.6%,显著性高于实验中其它四组方案($P<0.05$);②在分别移植2周和4周后回收卵巢移植植物,发现二者的卵巢回收率无显著差异($P>0.05$),但移植4周组的卵泡回收数目要明显高于2周组($P<0.05$);③在培养基中添加适量的自体血清(10%,V/V)能显著提高卵子的体外成熟率,培养12h后对照组中生发泡破裂(GVBD)发生率为 $(34.74\pm 4.26)\%$,添加血清后提高至 $(54.60\pm 3.37)\%$,成熟的MII期卵子获得率从 $(43.17\pm 1.31)\%$ 升高至 $(57.75\pm 5.31)\%$,有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**通过该实验较好地建立了卵巢组织的玻璃化冻存、移植和卵泡分离以及体外成熟培养的实验方法。

关键词:卵巢;玻璃化冷冻;卵巢移植;卵母细胞体外成熟培养

中图分类号:Q492.5, Q95-3, Q813.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)13-2457-05

Investigation of the Vitrification and Sequential Transplantation of Newborn Mice Ovaries, and the in vitro Maturation of Isolated Oocytes

LUO Yang, YANG Xiang-qun, LI Jia-chen, GAN Fei-fei, TIAN Jing-yan, SONG Dan, PENG Nan-ni[△]

(Reproductive Medicine Center, the Fifth Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong, 518000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the experimental methods for the vitrification of newborn mice ovaries to established ovarian libraries, sequential transplantation, and the in vitro maturation of isolated oocytes from grafted ovaries. **Methods:** Ovaries from one-day old mice were vitrified, and the warmed ovaries were allografted the kidney capsules of adult female mice, then isolated oocytes from the ovary grafts for in vitro maturing. **Results:** ① The percentages of morphologically normal follicles from the protocol of placing in equilibration solution for 25min, and vitrification solution for 3min were significantly greater than those achieved from other four protocols ($P<0.05$); ② 2 weeks and 4 weeks after grafting, there was no significant difference in recovery ($P>0.05$), but the number of recovered follicles for the four weeks group was significantly higher than that in 2 weeks ($P<0.05$); ③ Supplement autologous serum (10%, V / V) in the in vitro mature medium could significantly improve the rate of of mature oocytes ($P<0.05$), from $(34.74\pm 4.26)\%$ in control group to $(54.60\pm 3.37)\%$ in experimental group exhibited germinal vesicle breakdown (GVBD), while the rate of proceeded to the metaphase II (MII) stage mature oocytes from $(43.17\pm 1.31)\%$ to $(57.75\pm 5.31)\%$. **Conclusion:** The experimental methods in ovarian tissue vitrification, transplantation and the in vitro maturation of isolated oocytes were well established.

Key words: Ovary; Vitrification; Ovary transplantation; Oocytes in vitro maturation

Chinese Library Classification: Q492.5, Q95-3, Q813.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)13-2457-05

前言

目前,癌症的诊治水平不断提高,增加了大量癌症患者的存活机率,但相关的治疗会严重损害女性的生殖能力^[1];同时,现代社会有越来越多的女性选择推迟自己的生育年龄,但女性的生殖能力随着年龄的增加呈下降趋势^[2]。因此,女性的生殖能

力保存问题将会是一个具有重要意义的研究领域和挑战。通过对冷冻保存的卵巢组织进行自体移植或是从中分离卵泡进行体外成熟均可以达到保存生殖能力的目的,且保存卵巢组织对于青春前期女性以及需要立即进行化疗的女性而言是唯一的选项^[3]。本研究以新生小鼠卵巢组织为研究材料,参照目前对人类卵子冷冻的方法,系统性地从卵巢组织的玻璃化冻存建立卵巢库,卵巢组织同种异位移植,以及移植卵巢的卵泡分离和体外成熟培养的实验研究,拟建立一系列的实验方案,为以后进行人类胎儿期卵巢组织保存以及分离卵泡和体外培养成熟提供重要的借鉴意义。

作者简介:罗阳(1987-),男,硕士,主要研究方向:生殖发育和人类辅助生殖技术应用,电话:0755-82287911, E-mail:ly.ni@163.com

△通讯作者:彭南妮, E-mail: nnpeng@126.com

(收稿日期:2013-11-23 接受日期:2013-12-21)

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明白小鼠购自广东省医学实验动物中心,以出生 1 日龄小鼠取卵巢进行玻璃化冷冻实验;以 10-12 周龄雄性昆明白小鼠作为卵巢移植的受体小鼠。

1.2 主要试剂与仪器

DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)和卵母细胞体外成熟培养基由美国 SAGE 公司提供;璃化冷冻、解冻试剂由加拿大 JIEYING Laboratory 提供;玻璃化冷冻载体由日本 KLTATATO 公司提供;CO₂ 培养箱由美国 Thermo 公司提供;体视显微镜(SM2645)、倒置显微镜(TE300)由日本 Nikon 公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 卵巢收集 选择成年的 8-10 周龄昆明白雌鼠和 10~12 周龄昆明白雄鼠进行自然合笼交配。在母鼠产仔的第 1 天处死新生小鼠,置于操作皿中,以 DPBS 湿润,解剖显微镜下分离出卵巢,并将卵巢周围的包膜等其它组织去除干净,分离出的卵巢转移到含 DPBS 的培养皿中待用。

1.3.2 卵巢组织玻璃化冷冻与解冻复苏 采用用于临床上人类胚胎冷冻的玻璃化冷冻试剂,将卵巢组织随机平均分配为六组进行冷冻实验,每组实验中包含有 40 个卵巢组织,具体处理如下:

第一组:玻璃化平衡液(ES)中处理 15min,转入冷冻液(VS)中处理 3min;

第二组:玻璃化平衡液(ES)中处理 20min,转入冷冻液(VS)中处理 3min;

第三组 玻璃化平衡液(ES)中处理 25min,转入冷冻液(VS)中处理 3min;

第四组:玻璃化平衡液(ES)中处理 15min,转入冷冻液(VS)中处理 5min;

第五组:玻璃化平衡液(ES)中处理 20min,转入冷冻液(VS)中处理 5min;

处理完毕后,将卵巢组织迅速转移至玻璃化冷冻载杆上,置液氮罐中冷冻保存。卵巢组织冷冻保存至少一个月之后,进行解冻复苏。将含有冷冻卵巢的载杆从液氮中迅速取出,置于解冻液中 2min,用拉制好的巴斯管将组织从载杆上吹吸下来,转至稀释液中 5min,然后分别转至漂洗液 1,2 中各 5min。解冻后的卵巢组织于 DPBS 中,置于 CO₂ 培养箱,6% CO₂,37℃ 条件下复苏培养 1h 后实验待用。

1.3.3 卵巢移植 以 10-12 周龄雄性昆明白小鼠作为移植受体,腹腔注射 0.1%戊巴比妥进行麻醉,常规消毒后在肋脊角处右边分别切开皮肤及肌肉,充分暴露右侧肾脏,用眼科镊轻轻提起肾被膜,用另钟表镊在肾脏上端把肾被膜刺开一个小口,将 2 枚新鲜或冻融后的新生鼠卵巢由小口处推送入肾被膜下,将肾脏送回腹腔原位后,分别滴加 1 滴链霉素和青霉素后,依次缝合小鼠肌肉和皮肤切口。

1.3.4 组织学观察和评价 将对照组和经过冷冻处理的实验组的 1 日龄小鼠卵巢置于中性缓冲福尔马林溶液中固定过夜后进行石蜡包埋和切片,HE 染色后于高倍镜下进行评价和计

数分析。卵泡分析参照 Tilly 等人运用的标准,即由单层扁平的小颗粒细胞包绕着初级卵母细胞时称之为原始卵泡^[7];由单层立方柱状颗粒细胞包绕初级卵母细胞时为初级卵泡;不多于四层立方状颗粒细胞包绕卵母细胞的卵泡为次级卵泡;

1.3.5 卵母细胞体外分离及其成熟培养 移植术后 2 周、4 周分别处死受体小鼠,每次每组处死 3 只,观察卵巢移植体的生长发育状况,然后将取出的卵巢移植体转至体外操作培养液中进行卵泡分离处理。卵泡分离采用机械分离法,即于解剖镜下,以 1 mL 注射针进行机械分离,分离出的未成熟卵子转至体外成熟培养基中进行成熟培养。血清添加物采自实验中 1 日龄小鼠,500×g 高速离心 20 min 后分离收集血清,-20℃ 保存待用。

1.3.6 数据分析处理 用 SPSS13.0 软件对实验数据进行分析。卵泡形态完整率数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),用 Bonferroni 法进行两两比较;卵泡分离回收数目采用独立样本 T 检验分析;卵巢移植体回收率、GVBD 获得率和 MII 获得率均用卡方检验分析。P<0.05 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 不同玻璃化冷冻方案对卵巢组织中卵泡的影响

将分别采用五种方案冻存的卵巢解冻复苏后石蜡切片并 HE 染色分析,发现第三组的切片中组织形态完好无皱缩,细胞形态良好。我们对处于卵泡发育早期阶段的原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡进行计数和统计分析其分别对应的形态完整卵泡率,发现五组实验之间存在显著性差异。

其中五种玻璃化冷冻方案对卵巢组织中的原始卵泡保存都具有较好的效果(图 1),形态完整率均值分别达到 87.87±2.12%,90.10±1.90%,96.60±1.30%,89.60±1.60%,88.90±2.07%,而第三组显著性高于其它四组(P<0.05),显示其在作为卵泡储备的原始卵泡的保存上具有优越性;但在初级卵泡与次级卵泡上,第三组形态完整率仅相对于第四、五组有显著性差异(P<0.05)。

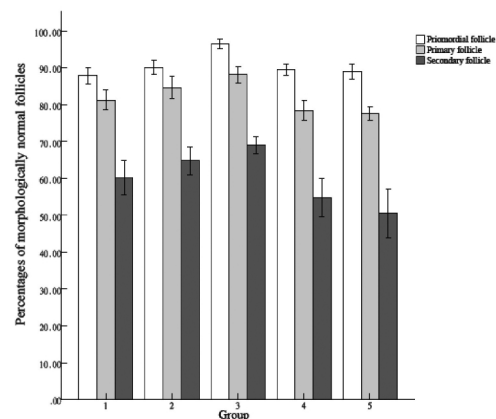


图 1 不同玻璃化冷冻方案下的早期卵泡形态完整率

Fig. 1 Percentages of morphologically normal follicles of early stages in different vitrification methods

Note: *P<0.05 Group3 compared with control group 1, 2, 4, 5; #P<0.05 Group3 compared with control group 4, 5; ▲P<0.05 Group3 compared with control group 4, 5.

2.2 不同移植时间对卵巢移植物的影响

2.2.1 不同移植时间对卵巢发育的影响

在卵巢移植后 2 周和 4 周时分别回收移植植物,观察发现移植植物在受体鼠肾包膜下生长良好。移植 2 周组中的卵巢移植植物较移植时有明显增大,表面有少许的血管生成(图 2A),而 4 周

组则较 2 周组有显著增大,移植植物表面有清晰可见的血管生成(图 2B),且可见有突出于卵巢表面的大卵泡,显示正在发生排卵过程,在将移植植物分离后于 DPBS 中漂洗可得到排出的游离卵泡,故从发育形态学上可以认为移植 4 周的发育情况优于 2 周。

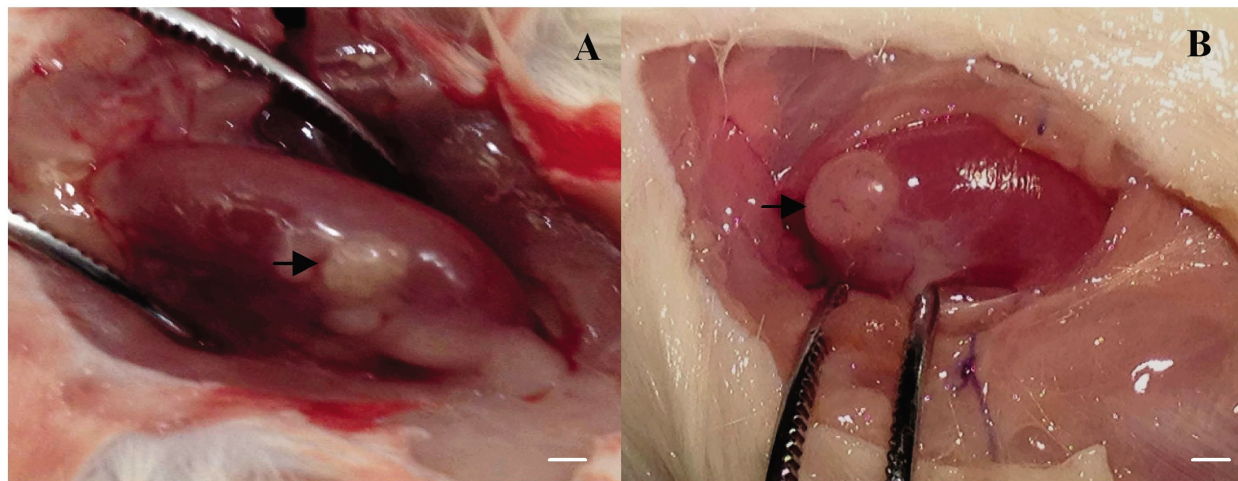


图 2 不同移植时间的卵巢移植植物 A:移植 2 周后的卵巢移植植物;B:移植 4 周后的卵巢移植植物;箭头所指为移植植物。Scale bars, 1000 μ m

Fig. 2 The ovarian grafts after different transplantation days A:The ovarian graft after two weeks transplantation ;B: The ovarian graft after four weeks transplantation.;Arrows indicate the grafts.Scale bars, 1000 μ m

2.2.2 不同移植时间对卵巢移植植物回收和卵泡分离回收数目的影响

在卵巢移植后 2 周和 4 周时分别回收移植植物,移植 2 周组中移植卵巢数为 48 枚,回收 30 枚,卵巢回收率为 62.5%;移植 4 周组中移植卵巢数为 56 枚,回收 34 枚,卵巢回收率为 60.7% (表 1),两组移植时间的卵巢回收率无显著性差异($P>0.05$),对回收的卵巢通过钟表镊和 1ml 注射针进行机械分离卵泡,移植 2 周回收数目为 55.67 ± 9.02 个,移植 4 周后回收数目

87.33 ± 7.57 个(表 1),两者之间有显著性差异($P<0.05$)。卵巢移植植物的回收效率以及卵泡分离回收数关系到进行体外成熟培养的卵子数目,因此我们初步探讨了移植 2 周和 4 周时的影响,结果表明移植 4 周较 2 周的回收率无显著差异,说明经历了移植的前两周,卵巢已生长发育,不会发生回收障碍;但在卵子回收数目上则显著高于 2 周组,说明其有更多的发育生长的卵泡。因此,移植 4 周更有利于良好的实验结果。

表 1 不同移植时间下的卵巢回收率和卵泡分离回收数

Table 1 The ovary recovery rate and follicles recovery after different transplantation days

Group	Number of grafted ovaries	Number of retrieved ovaries	Ovary recovery rate	Number of retrieved follicles
Two-weeks	48	30	62.5	55.67 ± 9.02
Four-weeks	56	34	60.7 [#]	$87.33\pm 7.57^*$

Note :[#] $P>0.05$ compared with two-weeks group; $^*P<0.05$ compared with two-weeks group

2.3 血清对卵子体外成熟培养的影响

将移植 4 周组实验中分离获得的未成熟 GV 期卵子进行体外成熟培养,卵子随机平均分为对照组(仅体外成熟培养基)和实验组(体外成熟培养基中添加 10%小鼠自体血清)。培养中发现经过 12 h 的体外成熟培养后,实验组中有较多达到成熟阶段的卵母细胞(图 3)。

表 2 卵母细胞体外成熟培养中发生 GVBD 和 MII 的百分率

Table 2 Percentage of oocytes that attaining GVBD and MII

Group	GVBD(%)	MI(%)
Control	34.95(137/392)	43.07(59/137)
Supplement serum	54.68*(228/417)	58.33*(133/228)

* $P<0.05$ VS control group.

统计分析发现对照组中发生 GVBD 的比率为 $(34.74\pm 4.26)\%$, 添加了血清后为 $(54.60\pm 3.37)\%$, 具有显著性差异($P<0.05$);对照组 MII 获得率为 $(43.17\pm 1.31)\%$, 添加了血清后为 $(57.75\pm 5.31)\%$, 有显著性差异($P<0.05$)(表 2)。因此,可以认为添加血清后有利于卵母细胞的体外成熟。

3 讨论

通过玻璃化冷冻保存卵巢组织后进行移植,以及体外分离卵泡成熟培养将会是一条保存女性生殖能力的重要途径^[8-10]。已有大量的实验研究关注于该途径中的卵巢组织玻璃化冷冻方案或是卵巢移植等少数几个或单因素^[11-13]。本研究分为三个相互联系的实验步骤,分别是(1)卵巢玻璃化冷冻,在进行相关

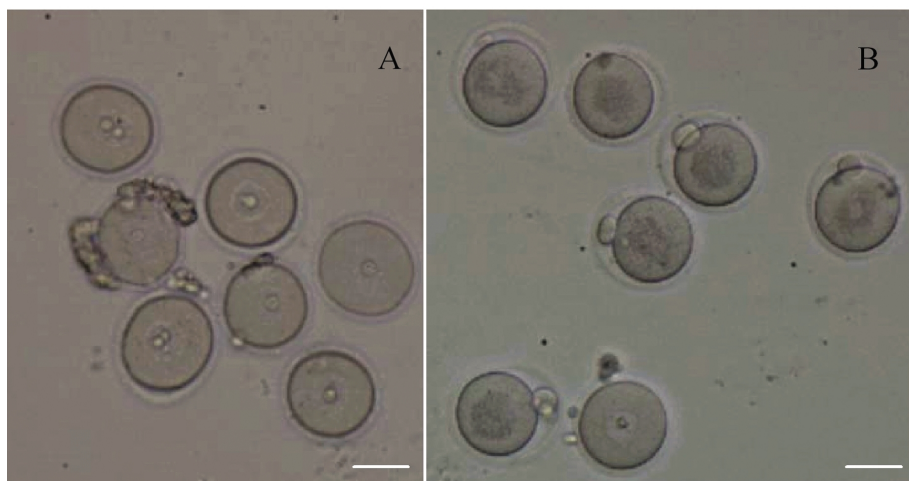


图3 卵母细胞的体外成熟培养:A:体外成熟培养的GV期卵母细胞;B:经体外成熟培养12h后的MII期卵母细胞。Scale bars, 50μ m

Fig. 3 In vitro maturation culture of oocytes. A: The GV-stage oocytes in vitro maturation culture; B: The MII-stage oocytes after in vitro maturation culture for 12h. Scale bars, 50μ m

预实验之后,设计了五种玻璃化冷冻方案,第一、二、三种方案以冷冻过程中的平衡处理时间为变量,而第四、五种方案是在第一、二方案基础上将冷冻过程中的玻璃化液处理时间从3 min 增加至5 min。实验结果表明第三种冷冻方案整体上要优于其它四种,尤其是对原始卵泡的保存上效果良好。原始卵泡是卵巢中的储备池,其在各发育阶段中数量均是最多的,是卵巢冷冻保存及后续培养研究的重要因素^[14],因此,可以认为第三种即ES处理25min,VS处理3min冷冻方案是实验体系中的最佳冷冻保存方案。

将采用第三种玻璃化冷冻方案冻存的卵巢组织解冻复苏后进行(2)卵巢移植,由于对卵巢移植发育影响最大的因素是移植时间,所以本研究将实验分组为移植2周组和移植4周组,实验中发现移植4周组的卵巢生长发育以及分离回收卵泡数为最佳。移植中移植存活的关键是能否成功地重新建立血管生长系统^[15-16],而移植初期可能主要是进行血管系统的重建,之后才是移植物的生长发育,所以我们认为适当的延长移植时间对卵巢移植物的生长发育是有利的。将移植4周组中的卵巢体外分离的卵泡进行(3)卵泡成熟培养,卵子的体外成熟是一个复杂的研究难题,有着众多的影响因素,本研究将研究的切入点放在添加小鼠的自体血清能否改进卵子体外成熟上,分为对照组和实验组(添加10%自体血清),结果表明实验组中的未成熟卵子GVBD发生率及MII获得率显著高于对照组,说明成熟培养基中添加血清后对卵子的体外成熟培养具有明显的改善作用。

卵巢组织冻存可以保存大量的原始和初级卵泡,且在保存儿童的生殖能力上是唯一可行的方法;卵巢组织移植后能够一定程度恢复绝经妇女的内分泌,提高生活质量^[14];从组织中能够方便地分离获取大量卵泡,结合卵子体外成熟培养技术,能够为辅助生殖提供更多的卵子来源。因此,组织的玻璃化冻存、移植及分离卵泡体外成熟技术在辅助生殖中必将具有广阔的应用前景^[17-20]。

参考文献(References)

- [1] Von WM, Donnez J, Hovatta O, et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy—a technique in its infancy but already successful in fertility preservation[J]. Eur J Cancer, 2009,45:1547-1553
- [2] Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences [J]. Endocrine reviews, 2009,30 (5): 465-469
- [3] Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2009, 360(9): 902-911
- [4] Candy CJ, Wood M J, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries[J]. Human Reproduction, 2000, 15(6): 1300-1304
- [5] Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy [J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(3): 318-321
- [6] Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, et al. The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005, 17:333-338
- [7] Johnson J, Canning J, Kaneko T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary[J]. Nature, 2004, 428(6979): 145-150
- [8] Hovatta O, Wright C, Krausz T, et al. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation[J]. Hum Reprod, 1999, 14:2519-2524
- [9] Abir R, Roizman P, Fisch B, et al. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagengels for 24 hours [J]. Hum Reprod, 1999, 14:1299-1301
- [10] Aubard Y. Ovarian tissue xenografting [J]. Eur J Obstet Gynecol, Reprod Biol, 2003, 108 (1): 14-18
- [11] Keros V, Xella S, Hultenby K, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue

- [J]. Human reproduction, 2009, 24(7): 1670-1683
- [12] Zhang JM, Liu XL, Yang YX, et al. Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2010, 45(4): 694-698
- [13] Shen W, Li L, Bai Z, et al. In vitro development of mouse fetal germ cells into mature oocytes[J]. Reproduction, 2007, 134(2): 223-231
- [14] Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation[J]. Biology of Reproduction, 2001, 64(1): 171-178
- [15] Yang HY, Cox SL, Jenkin G, et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts[J]. Reproduction, 2006, 131:851-859
- [16] Israely T, Dafni H, Granot D, et al. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts[J]. Biology of Reproduction, 2003, 68:2055-2064
- [17] Soderstrom -Anttila V, Makinen S, Tuuri T, et al. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients[J]. Hum Reprod, 2005, 20(6): 1534-1540
- [18] Chain RC, Lim JH, Tan SL. State of the art in in vitro oocyte maturation[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004, 16(3): 211-219
- [19] Jeruss J S, Woodruff T K. Preservation of fertility in patients with cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2009, 360(9): 902-911
- [20] Song Y, Sharp R, Lu F, et al. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction[J]. Cryobiology, 2010, 60(3): S60-S65

(上接第 2456 页)

- [4] Shamloo M, Rytter A, Wieloch T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning[J]. Neuroscience, 1999, 93 (1): 81-88
- [5] Van Winkle JA, Chen B, Lei IF, et al. Concurrent middle cerebral artery occlusion and intra-arterial drug infusion via ipsilateral common carotid artery catheter in the rat[J]. Neurosci Methods, 2013, 213 (1): 63-69
- [6] 杜可军. 人 Irg 真核表达载体的构建和初步分析 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14 (4): 179-184
- Du Ke-jun. Construction of human Irg eukaryotic expression vector and primary assay [J]. Chin J Conserv Dent, 2004, 14 (4): 179-184
- [7] Koizumi J Y M, Nakazawa T. Experimental studies of ischemic brain edema, A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recondition can be introduced in the ischemic area [J]. Jpn J Stroke, 1986, 8(12): 1-8
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91
- [9] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. Circulation, 1986, 74 (5): 1124-1136
- [10] Zhang F, Wu Y, Jia J, et al. Pre-ischemic treadmill training induces tolerance to brain ischemia: involvement of glutamate and ERK1/2. Molecules, 2010, 15 (8): 5246-5257
- [11] De Zeeuw S, Lameris T W, Duncker D J, et al. Cardioprotection in pigs by exogenous norepinephrine but not by cerebral ischemia-induced release of endogenous norepinephrine [J]. Stroke, 2001, 32 (3): 767-774
- [12] Li J, Liu W, Ding S, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats [J]. Brain Res, 2008, 1210: 223-229
- [13] Li L, Zuo Z. Isoflurane preconditioning improves short-term and long-term neurological outcome after focal brain ischemia in adult rats [J]. Neuroscience, 2009, 164 (2): 497-506
- [14] Chen M, Chen Q, Cheng X W, et al. Zn²⁺ mediates ischemia-induced impairment of the ubiquitin-proteasome system in the rat hippocampus [J]. J Neurochem, 2009, 111 (5): 1094-1103
- [15] Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, et al. Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOS-knockout mice [J]. Curr Neurovasc Res, 2010, 7 (1): 23-31
- [16] Du K, Chai Y, Hou L, et al. Over-expression and siRNA of a novel environmental lipopolysaccharide-responding gene on the cell cycle of the human hepatoma-derived cell line HepG2 [J]. Toxicology, 2008, 243 (3): 303-310
- [17] 宋庆贺, 于欣平, 陈苏民. 人 Lrp 蛋白在细胞中的定位及 LPS 对其表达的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22 (7): 542-546
- Song Qing-he, Yu Xin-ping, Chen Su-min. Intracellular location of human Lrp and effects of LPS on Lrp expression in human cell lines [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2006, 22 (7): 542-546
- [18] 秦明哲, 李树志, 侯立朝. TNF- α 对人 Irg 基因表达的调控 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30 (1): 11-13
- Qin Ming-zhe, Li Shu-zhi, Hou Li-zhao. Effects of TNF- α on Irg expression in human cell lines [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2009, 30 (1): 11-13