

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.002

不同粘附剂对大鼠肝实质细胞体外培养的影响 *

谷若曦¹ 杨珂¹ 张华伟¹ 张佳妮¹ 丁成成² 彭甜甜³ 陈伟航³ 程硕¹ 华茜^{2Δ}

(1 北京中医药大学中医学院 北京 100029; 2 北京中医药大学生命科学院 北京 100029;

3 北京中医药大学针灸推拿学院 北京 100029)

摘要 目的:比较鼠尾胶与多聚赖氨酸对大鼠肝实质细胞体外培养的影响。**方法:**分别采用鼠尾胶与多聚赖氨酸包被同一块培养板,然后将从大鼠肝脏中分离出来的肝实质细胞,接种到包被好的培养板中。于接种前(0 h),接种后体外培养 24 h、72 h 显微镜下观察细胞贴壁与形态变化情况。**结果:**接种前(0 h)可见新鲜分离的肝实质细胞呈圆形,明亮,有立体感,轮廓完整,层次清楚;体外培养 24 h 后两种粘附剂包被的同一块培养板中,均可观察到肝实质细胞正常生长,且细胞形态由圆形转变为多角形,并且融合聚集,胞体变平整,贴壁情况区别不大;培养 72 h 后细胞间开始出现连接,大部分肝细胞呈现出双核或多核,并且多聚赖氨酸包被的培养板中可见大量肝细胞呈岛屿状,已完全贴壁于培养板上。**结论:**多聚赖氨酸作为包被材料更有利于肝实质细胞贴壁生长以及保持细胞固有形态。

关键词:肝实质细胞;鼠尾胶;多聚赖氨酸(PLL);体外培养

中图分类号:R-33;Q593.1;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)15-2808-04

Effect of Different Adhesives on the Culture of Rat Hepatocytes *

GU Ruo-xi¹, YANG Ke¹, ZHANG Hua-wei¹, ZHANG Jia-ni¹, DING Cheng-cheng², PENG Tian-tian³,

CHEN Wei-hang³, CHENG Shuo¹, HUA Qian^{2Δ}

(1 School of Chinese Medicine; 2 School of Life Science; 3 School of Acupuncture-Moxibustion Tuina,

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: Comparison of the effects of rat tail's collagen and polylysine on the culture of rat hepatocytes in vitro.

Methods: The same culture plate was coated with rat tail's collagen and polylysine respectively, and then the hepatocytes isolated from rat liver were inoculated into the coated culture plate. The changes of cell adhesion and morphology were observed under microscope before inoculation (0 h) and after inoculation for 24 hours and 72 hours in vitro. **Results:** Before inoculation (0 h), the freshly isolated hepatocytes were round, bright, three-dimensional, complete in outline and clean in layer. After 24 hours of culture in vitro, the normal growth of hepatocytes were observed in the same culture plates coated with two kinds of adhesives, and the morphology of hepatocytes changed from round to polygonal, and the cells fused and gathered, the cell body became flat, and there was little difference in adhesion. After 72 hours of culture, the connection between the cells began to appear. Most of the hepatocytes were binuclear or multinucleated, and a large number of hepatocytes were island-shaped in the polylysine-coated culture plate, which had completely adhered to the culture plate. **Conclusions:** As a coating material, polylysine is more beneficial to the adherent growth of hepatocytes and maintain the inherent morphology of hepatocytes.

Key words: Hepatocytes; Rat tail's collagen; Polylysine; In vitro

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q593.1; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)15-2808-04

前言

肝脏作为人体最重要的器官之一,由肝实质细胞及非实质细胞(肝窦内皮细胞、库普弗细胞、肝星状细胞等)构成,其中肝实质细胞构成肝脏的主要细胞^[1]。肝毒性是药物退出市场的常见原因,因此,迫切需要可靠的体外肝细胞模型,对于确定候选药物肝毒性,减少药物开发时间、费用和实验动物数量起着至关重要的作用^[2]。肝细胞系价格便宜,可以无限繁殖,但它们在

体外长期培养中失去了肝细胞的原始特性,无法有效反映药物在体内的复杂代谢作用^[3]。原代细胞在药物预测准确性上远远高于肝细胞系^[4,5]。将肝原代细胞分离、纯化、并进行相应的体外培养对于肝病相关的研究起着越来越重要的作用。自上世纪细胞培养技术发展以来,肝原代细胞的分离作为一种体外实验越来越受到重视,Berry 等^[6]于 1969 年利用原位灌流消化法分离出大鼠肝实质细胞,后在此基础上 Seglen 等^[7]进行改进。本研究在既往大鼠肝实质细胞分离、培养及鉴定的基础上,通过

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81973667);藏医药区域协同创新中心项目(2018XTCX014)

作者简介:谷若曦(1993-),硕士研究生,主要研究方向:中医药防治肿瘤靶向药不良反应的研究,E-mail: guruoxi@yeah.net

Δ 通讯作者:华茜,博士,教授,主要研究方向:中医药防治肿瘤、脑血管疾病机制研究,E-mail: hqianz@aliyun.com

(收稿日期:2021-03-03 接受日期:2021-03-26)

优化大鼠肝实质细胞体外分离技术,对比不同粘附剂对大鼠肝实质细胞体外培养的影响,拟建立稳定、高效的大鼠肝实质细胞体外分离、培养技术。

1 材料与方法

1.1 材料

5-6 周龄 SPF 级 SD 大鼠购于斯贝福(北京)生物技术有限公司。饲养环境:SPF 级环境。微量注射泵;台式离心机、CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司,光学显微镜、倒置荧光显微镜及影像采集系统购自日本 Olympus 公司。IV 型胶原酶(Collagenase IV)、角蛋白 18(Cytokeratin 18)抗体购自美国 Sigma 公司;William E 培养基、D-Hanks(不含酚红)、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,青霉素-链霉素(双抗),DAPI 染色剂购自碧云天生物公司,6 孔细胞培养板、60 mm 细胞培养皿、鼠尾胶、多聚赖氨酸,200 目细胞筛。

1.2 方法

1.2.1 细胞灌流液配置 灌流液 1:100 mL D-Hanks 溶液(不含酚红)灌流前需提前在水浴锅中 37 °C 预热,用于冲洗肝脏。灌流液 2:100 mL William E 培养基(无谷氨酰胺、HEPES,用于肝脏细胞培养)中加入 0.05 mg IV 型胶原酶,灌流前需要提前在水浴锅中 37 °C 预热,用于消化肝脏内细胞。

1.2.2 大鼠肝实质细胞分离 (1)大鼠经异氟烷麻醉后,用 75 % 酒精喷洒体表消毒,腹部朝上,用医用胶带固定四肢在 75 % 酒精喷洒后的鼠板上,医用碘伏清洁大鼠腹部皮肤表面后,在超净台中剪开大鼠腹腔,并且充分暴露肝门静脉及下腔静脉。(2)50 mL 注射器抽取灌流液 1,外接静脉输液针,将配置好的注射器放置在蠕动泵上,待门静脉插管成功后,启动蠕动泵,同时剪开大鼠下腔静脉,蠕动泵按照 25 mL/min 流速匀速流入灌流液 1,用来冲洗肝脏内血液。(3)等待肝脏完全变色后,取下装有灌流液 1 的注射器,换用装有灌流液 2 的注射器,继续注入含 0.05 % IV 型胶原酶的灌流液 2 溶液 100 mL,消化时间为 10 min,等待肝脏表面出现裂痕,并且肝脏内部质地变软后,暂停微量注射泵,停止灌流液灌注。(4)用无菌手术剪将肝脏全部剥离,放置冰上盛有 William E 完全培养基的无菌培养皿中,用无菌镊子小心撕碎肝包膜,分离肝细胞后并用 200 目筛网过滤,收集细胞悬液。(5)迅速将细胞悬液以 500 r/min,4 °C,离心 3 min,离心结束后,去除上清液,加入 William E 完全培养基重悬,重复 3 次,最终获取肝细胞悬液。

1.2.3 肝实质细胞计数与存活率测定 肝细胞悬液与 0.4 % 台盼蓝溶液各取 100 μ L 混合,静置 1 min,然后取 10 μ L 加入到血小板计数板中,并对计数板内的细胞进行计数。

1.2.4 肝实质细胞体外培养 同一块 6 孔细胞培养板分别用鼠尾胶及多聚赖氨酸包被,培养箱内静置 24 小时,使两种包被剂与培养板充分接触,接种前用移液枪吸取包被剂,确保包被剂在培养板中无液体残留后,开始接种肝细胞悬液。经鼠尾胶、多聚赖氨酸分别包被细胞培养板后,将细胞悬液按照 2×10^5 个 / mL 浓度接种于细胞培养板中,每孔加入 2 mL 细胞悬液,并培养于 37 °C,50 ML/CO₂ 细胞培养箱中。

1.2.5 不同包被剂对细胞贴壁及形态的影响 肝实质细胞接种后,在细胞培养箱内以 37 °C,50 ML/CO₂ 浓度继续培养,分

别观察接种前(0 h),以及培养 24 h、72 h 后的肝实质细胞的贴壁以及细胞形态情况,比较不同包被剂对大鼠肝实质细胞体外培养的影响。

1.2.6 肝实质细胞鉴定 细胞贴壁生长后,运用免疫荧光技术对肝实质细胞进行鉴定。细胞免疫荧光:(1)移液枪吸出细胞培养板中完全培养基液体,接着用 PBS 清洗细胞培养板 3 次,确保 PBS 完全覆盖细胞培养板后,浸洗细胞 3 min,再用 4 % 多聚甲醛固定细胞 10 min,然后用 PBS 溶液浸洗 3 次,每次时间 3 min。(2)运用 0.5 % 浓度的 Trion X-100 室温通透 10 min, PBS 浸洗次数 3 次,每次时间 3 min。(3)吸干细胞培养板中的 PBS,滴加正常的山羊血清,室温下封闭 1 h。(4)吸干封闭液后,向细胞培养板中滴加足量的兔抗大鼠 CK 18 一抗(1:100 倍稀释)并放入湿盒,4 °C 冰箱内孵育过夜。(5)吸干细胞培养板中的兔抗大鼠 CK18 一抗,接着用 PBST 浸洗细胞 3 次,每次 3 min,然后吸净细胞培养板中液体,再滴加荧光二抗羊抗兔 IgG (1:100 倍稀释),在室温下孵育 1 h。(6)吸净二抗, PBST 浸洗 3 次,每次时间 3 min。接着向细胞培养板中加入 DAPI,并且避光孵育 5 min,然后用 PBST 浸洗 3 次,每次时间 3 min,移液枪去除多余的 DAPI,最后荧光显微镜下观察细胞形态并采集图像。

2 结果

2.1 细胞分离结果与存活率

每只成年大鼠可成功分离 $2 \sim 3 \times 10^8$ 个肝细胞,细胞透亮,饱满,台盼蓝拒染实验结果显示平均存活率 90 % 以上。

2.2 不同包被剂对肝实质细胞形态学特征的影响

将肝实质细胞分别接种于同一块鼠尾胶及多聚赖氨酸包被的培养板中,接种时可见新鲜分离的肝实质细胞呈椭圆形,明亮,有立体感。见图 1。继续培养 24 h 后,两种粘附剂包被的培养板中均可保证肝实质细胞正常生长,且细胞由椭圆形转变为多角形,融合聚集生长,胞体变平整,贴壁情况区别不大;培养 72 h 后大部分肝实质细胞呈双核或多核形态,细胞间开始出现紧密连接,并且相对于鼠尾胶包被的培养板,多聚赖氨酸包被的培养板中可见大量肝细胞呈岛桥状联系,并且已完全粘附于培养板上。表明由多聚赖氨酸作为包被材料更有利于肝实质细胞贴壁生长以及保持细胞固有形态。见图 2。

2.3 肝实质细胞免疫荧光鉴定

细胞角蛋白 18(CK18)属于细胞骨架中间丝蛋白家族中的 I 型细胞角蛋白。CK18 与它共表达的 II 型互补蛋白结合在一起,通过调节细胞过程来发挥其功能,例如有丝分裂^[8],细胞凋亡^[9]和增殖^[10]。CK18 是表达在正常肝实质细胞表面的特异性抗原,可以用来鉴定肝实质细胞^[11]。本实验在细胞培养 5 d 后进行抗 CK18 免疫荧光细胞化学染色,荧光显微镜下观察显示,细胞核发出蓝色荧光(DAPI),肝实质细胞表面发绿色荧光(CK18),表明肝实质细胞中 CK18 表达阳性。见图 3。

3 讨论

目前研究者在解决有关细胞贴壁实验研究中,常采用鼠尾胶、多聚赖氨酸等基质来解决细胞贴壁的问题^[12]。最近,有研究者进行了 PC12 悬浮细胞在胶原蛋白与多聚赖氨酸包被的培养材料中,细胞贴壁、分化、生长情况的比较,发现胶原蛋白是

PC12 细胞贴壁生长以及分化的最佳改良基质^[13]。也有研究者对比了鼠尾胶原与基底膜基质对大鼠原代肝细胞的影响,发现鼠尾胶原通过激活细胞外信号 ERK1/2,抑制了大鼠原代肝细胞的凋亡^[14]。鼠尾胶作为包被基质之一,主要成分为 I 型胶原蛋白^[15],但多需自行配置,提纯方法较为复杂,且容易污染,保存时间较短^[16]。

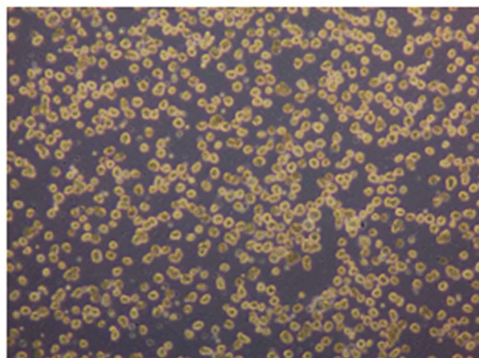


图 1 新鲜分离出的肝实质细胞(10X)
Fig.1 Freshly isolated hepatocytes(10X)

多聚赖氨酸是一种带正电的聚合物,可以通过静电作用与阴离子聚合物相互作用,促进细胞黏附、增生、分化,具有改善培养器皿表面的电荷状态以加速细胞贴壁的能力^[17-19]。因此,多聚赖氨酸目前已被广泛应用,辅助多种细胞贴壁生长^[20-25]。王俊婷等^[26]人发现用多聚赖氨酸包被的细胞培养板培养悬浮细胞更容易促使其贴壁。何玲等^[27]研究表明,无多聚赖氨酸包被可影响细胞的存活率及活性,多聚赖氨酸预包被能提高大脑皮层星形胶质细胞贴壁和生长状态。黄绍辉^[28]研究发现颌下腺细胞在包被有多聚赖氨酸的培养皿中表面生长分化良好,呈单层生长,表明多聚赖氨酸在体外培养过程中,可以促进细胞黏附与生长。

有研究表明,利用细胞外基质对材料表面进行预处理,不仅可以促进细胞的粘附,而且可以促进细胞的生长、迁移和分化,延长细胞的寿命^[29]。研究者在进行人原代肝细胞在鼠尾胶原与基质胶上培养的实验中发现,在基质胶上培养的肝细胞显示出与鼠尾胶原完全不同的形态,在基质胶上培养的细胞,迁移并形成大的细胞聚集体,而在鼠尾胶原上培养的细胞分散开,并形成扁平的多边形形状,两者产生差异的主要原因为,分离出

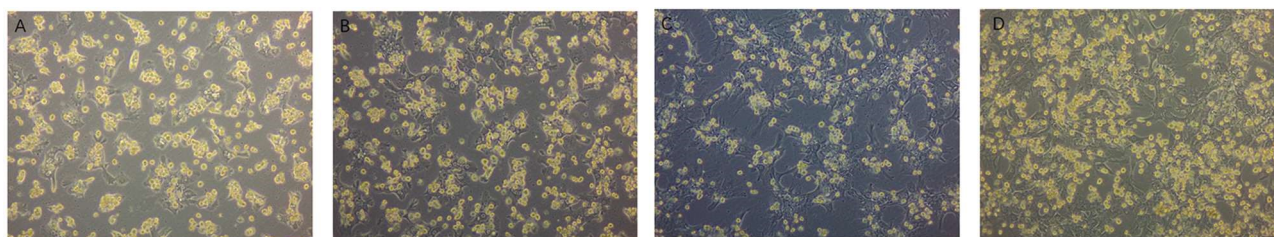


图 2 肝实质细胞在两种基质中的细胞形态

Fig.2 Morphology of hepatocytes in two kinds of matrix

注: A:培养 24 h 后鼠尾胶包被的肝实质细胞形态(10×)

Note: A: Morphology of hepatocytes coated with rat tail's collagen after 24 hours of culture(10×)

注: B:培养 24 h 后多聚赖氨酸包被的肝实质细胞形态(10×)

Note: B: Morphology of hepatocytes coated with polylysine after 24 hours of culture(10×)

注: C:培养 72 h 后鼠尾胶包被的肝实质细胞形态(10×)

Note: C: Morphology of hepatocytes coated with rat tail's collagen after 72 hours of culture(10×)

注: D:培养 72 h 后多聚赖氨酸包被的肝实质细胞形态(10×)

Note: D: Morphology of hepatocytes coated with polylysine after 72 hours of culture(10×)

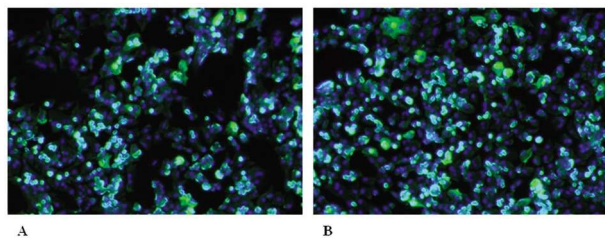


图 3 培养 5 d 后的大鼠肝实质细胞 CK18 免疫荧光检测结果

Fig.3 Immunofluorescence detection of CK18 in rat hepatocytes cultured for 5 days

(A)鼠尾胶包被;(B)多聚赖氨酸包被

(A)Rat tail's collagen coated; (B)Polylysine coated

的人原代肝细胞具有合成、结合以及分泌胆汁酸的能力,与鼠尾胶原相比,在基质胶上培养,人原代肝细胞可以合成更多的胆汁酸^[30]。本实验比较了两种包被剂对肝实质细胞形态的影

响。结果显示,多聚赖氨酸包被的细胞培养板中大鼠肝实质细胞更易于贴壁生长,以及形成架桥结构形态,而鼠尾胶包被的培养板中细胞架桥结构相对较少,不易保持细胞固有形态。表明多聚赖氨酸作为包被剂更适合肝实质细胞的生长。探究其原因,包括以下两点:(1)肝实质细胞表达的角蛋白 18 属于 I 型角蛋白^[31]与鼠尾胶 I 型胶原蛋白同属蛋白质结构,鼠尾胶在肝实质细胞贴壁时对肝实质细胞表达的角蛋白 18 产生了竞争性拮抗作用,进而影响到肝实质细胞正常贴壁生长。(2)带有负电荷的细胞膜与带有正电荷的多聚赖氨酸会发生非特异性的静电相互作用,促使肝实质细胞牢固的附着在多聚赖氨酸包被的细胞培养板上。

本实验同时在分离大鼠肝细胞的步骤中进行了细致的改进,在整个实验中要获得形态完整,数量充足的肝实质细胞应注意以下几点:(1)门静脉插管之前,需要将注射器内的气泡

完全排空,防止气泡进入肝脏后,导致肝脏中血液无法清洗充分。(2)由于肝门静脉相对于下腔静脉较细,不易插管成功,因此灌流液除从肝门静脉流入,下腔静脉流出外,还可以从下腔静脉流入,肝门静脉流出。(3)由于原代细胞不易贴壁,首次换液时间应控制在肝实质细胞贴壁 48 h 以后进行,以确保所有肝实质细胞均已贴壁。(4)由于普通培养基无法提供肝细胞生长所必需的培养条件,本实验使用肝脏细胞培养的专用培养基 William E(无谷氨酰胺、HEPES)培养基,相对于普通培养基,此培养基可以提供肝脏细胞生长所需的营养成分,保证肝实质细胞的稳定生长。(5)整个实验需在无菌环境下操作,以确保提取出来的细胞不被外界环境污染。

综上所述,本实验优化了大鼠肝实质细胞体外分离技术,可以经济、高效地指导大鼠肝实质细胞的稳定提取,并且对比了两种粘附剂对大鼠肝实质细胞体外培养的影响,发现相对于鼠尾胶,多聚赖氨酸提高了大鼠肝实质细胞体外培养的效率,可以为后续药物筛选以及安全性提供生物医学研究支持。

参考文献(References)

- [1] Ölander M, Wiñiewski JR, Artursson P. Cell-type-resolved proteomic analysis of the human liver[J]. *Liver Int*, 2020, 40(7): 1770-1780
- [2] Ruoff M, Vosough M, Königsrainer A, et al. Towards improved hepatocyte cultures: Progress and limitations [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 138: 111188
- [3] Gómez-lechón MJ, Tolosa L, Conde I, et al. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10(11): 1553-1568
- [4] Lu J, Einhorn S, Venkatarangan L, et al. Morphological and Functional Characterization and Assessment of iPSC-Derived Hepatocytes for In Vitro Toxicity Testing[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 147(1): 39-54
- [5] Kang SJ, Lee HM, Park YI, et al. Chemically induced hepatotoxicity in human stem cell-induced hepatocytes compared with primary hepatocytes and HepG2[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(5): 403-417
- [6] Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study [J]. *J Cell Biol*, 1969, 43(3): 506-520
- [7] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13: 29-83
- [8] Ku NO, Michie S, Resurreccion EZ, et al. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4373-4378
- [9] Caulin C, Ware CF, Magin TM, et al. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(1): 17-22
- [10] Wang X, Lao Y, Xu N, et al. Oblongifolin C inhibits metastasis by up-regulating keratin 18 and tubulins[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10293
- [11] Strauss HM, Keller S. Pharmacological interference with protein-protein interactions mediated by coiled-coil motifs [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, (186): 461-482
- [12] 李建瑛,许永华,张东辉,等. 两种不同基质对体外培养成骨细胞促贴壁生长的影响[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(05): 19-21
- [13] Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, et al. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 958
- [14] Serna-Márquez N, Rodríguez-Hernández A, Ayala-Reyes M, et al. Fibrillar Collagen Type I Participates in the Survival and Aggregation of Primary Hepatocytes Cultured on Soft Hydrogels [J]. *Biomimetics (Basel)*, 2020, 5(2): 30
- [15] Bou-gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, et al. Extra-cellular matrix in vascular networks[J]. *Cell Prolif*, 2004, 37(3): 207-220
- [16] Bledi Y, Domb AJ, Linial M. Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000, 5(3): 282-289
- [17] Liu B, Ma J, Gao E, et al. Development of an artificial neuronal network with post-mitotic rat fetal hippocampal cells by polyethyleneimine[J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23(8): 1221-1228
- [18] Cai L, Lu J, Sheen V, et al. Optimal poly(L-lysine) grafting density in hydrogels for promoting neural progenitor cell functions [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(5): 1663-1674
- [19] Prokopovic VZ, Vikulina As, Sustr D, et al. Binding Mechanism of the Model Charged Dye Carboxyfluorescein to Hyaluronan/Polylysine Multilayers[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(44): 38908-38918
- [20] Lerardi V, Niccolini A, Alderighi M, et al. AFM characterization of rabbit spermatozoa[J]. *Microsc Res Tech*, 2008, 71(7): 529-535
- [21] Li M, Liu L, Xi N, et al. Imaging and measuring the rituximab-induced changes of mechanical properties in B-lymphoma cells using atomic force microscopy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(2): 689-694
- [22] Li M, Liu L, Xi N, et al. Atomic force microscopy imaging of live mammalian cells[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(9): 811-817
- [23] Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy [J]. *J Cell Biol*, 1975, 66(1): 198-200
- [24] Vacquier VD. The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge [J]. *Dev Biol*, 1975, 43(1): 62-74
- [25] Fantner GE, Barbero RJ, Gray DS, et al. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy[J]. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5(4): 280-285
- [26] 王俊婷,落继先. 多聚赖氨酸在悬浮细胞转染中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30(1): 89-92
- [27] 何玲,刘露,陈国俊. 多聚左旋赖氨酸对大脑皮层星形胶质细胞体外培养的影响[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(13): 4-7+23
- [28] 黄绍辉,张恩礁,周青,等. 多聚赖氨酸对胎鼠颌下腺细胞培养的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2006, (05): 510-511
- [29] Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, et al. Use of extracellular matrix components for cell culture[J]. *Anal Biochem*, 1987, 166(1): 1-13
- [30] Mörk LM, Strom SC, Mode A, et al. Addition of Dexamethasone Alters the Bile Acid Composition by Inducing CYP8B1 in Primary Cultures of Human Hepatocytes[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2016, 6(2): 87-93
- [31] Toivola DM, Baribault H, Magin T, et al. Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(6): G1343-G1354