doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.28.004

# 小鼠海马神经元冰冻切片和脑片培养方法的比较\*

钟磊 谢燕萍 杨娟 2 冯伟伟 3 游 宇4

(1 解放军 421 医院心血管内科 广东 广州 510318;2 湖南医药学院基础医学院生理教研室 湖南 怀化 418000; 3 新乡医学院第一附属医院肿瘤心血管研究中心 河南 新乡 453000;4 陆军总医院附属八一脑科 北京 100700)

摘要目的:通过冰冻切片和脑片培养方式比较获得更适合脑片实验研究的方法。方法:分别运用急性切片和脑片培养方法,结合 全细胞膜片钳技术比较两种脑片处理方法对小鼠海马神经元细胞形态、细胞膜封接难易程度、细胞电生理特性等的差异,获得更 适合细胞研究的脑片获取方法。结果:冰冻切片方法切断部分神经纤维,脑片表层出现肿胀或坏死细胞,2-3 层细胞可用于膜片钳 记录,但不易封接破膜。脑片培养后可使纤维再生,整个脑片细胞形态清晰可见,容易封接破膜,电生理记录波形及基本特性与冰 冻切片一致,但脑片培养方法的细胞突触后电流幅度更大、频率更高。结论:脑片培养可修复受损纤维和细胞膜柔韧性,且不改变 膜特性,但脑片培养重建了一定数量的细胞间信号连接,使细胞反应性增强,脑片培养方法更适合脑片神经元研究。 关键词:冰冻切片;脑片培养;海马神经元

中图分类号:R-33; R338.26 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)28-5416-05

# Comparison of Methods for Frozen Section and Cultivate Slices of Hippocampal Pyramidal Neurons of Mouse\*

ZHONG Lei<sup>1</sup>, XIE Yan-ping<sup>1</sup>, YANG Juan<sup>2</sup>, FENG Wei-wei<sup>3</sup>, YOU Yu<sup>4</sup>

(1 Department of Vasculocardiology, No.421 Hospital of PLA, Guangzhou, Guangdong, 510318, China;

2 Physiology Institute, School of Basic Science, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan, 418000, China;

3 Tumor cardiovascular research institute, first hospital affiliated to Xinxiang Medical School, Xinxiang, Henan, 453000, China;

4 Affiliated Bayi Brain Hospital, General Army Hospital, Beijing, 100700, China)

**ABSTRACT Objective:** To obtain the more suitable method of brain slice experiment through comparing the methods of frozen sections and brain slice culture. **Methods:** Frozen section and brain slice culture were used respectively. The differences in mouse hippocampal neurons cell morphology, difficulty of cell membrane sealing degree, the electrophysiological properties of cells of two kinds of brain slice processing methods were compared using whole cell patch clamp technique to find out which way is more suitable for brain slice research. **Results:** Frozen section cut off part of the nerve fibers, leading to surface slices of cells swelling or necrosis. 2-3 layers of cells could be used for patch clamp recording, but it was not easy to break the sealing. Brain slice culture could make fiber regeneration. The cell morphology was clearly visible, and the membranes were easily ruptured. The electrophysiological recording waveform and the basic characteristics were consistent with those of frozen section, but brain slice culture has more larger on postsynaptic cell current amplitude and higher on frequency. **Conclusion:** Brain slice culture can repair the damaged cell membrane and fiber flexibility, and does not change the membrane properties. However, it can reconstruct a certain number of intercellular signal connection to enhance cell reactivity. Therefore, cultivate slices are more suitable for the study of neurons.

Key words: Frozen section; Cultivate slices; Pyramidal neurons

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338.26 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)28-5416-05

# 前言

通过离体方法研究中枢神经元的技术手段有细胞原代培养、急性单细胞分离、冰冻切片等<sup>[12]</sup>。其中细胞原代培养和急性 单细胞分离可获得单个独立的神经元细胞,而在正常生物体内 部,神经元与周围组织细胞存在信号联系并相互作用,所以不 适于离体方法研究中枢神经系统的功能特性。而冰冻切片方法 通过对脑组织急性处理能有效保留部分神经网络联系,及时记录也可以保留细胞原有的电生理特性,适于离体中枢神经元的研究<sup>[34]</sup>。目前,新型技术脑片培养在逐渐开展,该方法是通过冰冻切片急性分离脑片后,再通过微孔膜插件<sup>(5)</sup>方法培养一段时间后,再进行脑片神经元特性研究,国内外已有研究证实通过微孔膜插件的方法可保留包含在体脑组织中的各种神经元,且能保持完整的细胞间三维空间结构,同时在保证长期神经元存

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81301116) 作者简介:钟磊(1982-),医学硕士,主要研究方向:听觉可塑性等 Δ 通讯作者:游宇

<sup>(</sup>收稿日期:2017-04-02 接受日期:2017-04-29)

活的条件下,可保留完善的神经传递回路和受体分布<sup>[68]</sup>。那么 该方法是否改变了细胞某些基本电生理特性呢?不得而知。海 马是大脑研究最多最广泛的区域,所以本实验通过冰冻切片和 脑片培养方法首次对海马脑片进行细胞形态、基本模特性、神 经突触电生理特性来比较两种方法的优劣程度,为神经科学领 域的方法修饰和选取上提供实验和理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 冰冻切片

实验取健康的且体重在 16-22 g 成年 C57 小鼠 17 只(由 南方医科大学动物中心提供),异氟烷麻醉后断头取脑,迅速移 入冰冻脑脊液(ACSF)中使组织变硬,在用徕卡切片机制备成 300 µm 的冠状切片。制备好的脑片转移入 ACSF 液孵育(37 ℃;30 min)后常温观察记录。实验用 ACSF<sup>®</sup>成分(mmol/L): 125 NaCl,3.3 KCl,1.4 MgSO<sub>4</sub>,1.3 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>,1.2Mg-SO<sub>4</sub>,10 glucose,2.4 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.3)。所有化学试剂均购自 Sigma。

#### 1.2 脑片培养

实验用 2~3 周的健康 C57 小鼠 10 只,切片过程(如上)在 细胞间超净台内完成,参照文献<sup>[1]</sup>消毒切好的脑片用吸管迅速 转移至六孔板的膜插件上,去除六孔板中的液体,再加入 1ML 培养液培养,脑片培养 1~2 周观察并进行电生理。培养液成分 为(mmol/L):0.05MEM,0.018EBSS,0.001S-P(双抗),0.005Glucose,0.025 Horse scrum。培养液及所有实验器械需高温灭菌, 动物乙醇消毒。

### 1.3 脑片观察和电生理记录

在红外光差显微镜的低、高倍镜下分别观察小鼠海马区域脑片状态和单个细胞细胞膜凹凸程度、膜表面颗粒等,然后在全细胞膜片钳电流钳模式下,由数模转换器通过玻璃电极注入电流刺激(步阶:50 pA,时程:100 ms,强度从-50 pA 到300 pA),并记录神经元动作电位发放。记录用玻璃微电极由P-97(SUTTER,美国)拉制,且保证电阻为 3~6 MΩ。电极内液<sup>[10-12]</sup>(mmol) 成分为:142K-gluconate,10EGTA,9 HEPE, 3.8Mg-ATP,4.1MgCl<sub>2</sub>, 0.2GTP。

1.3.1 I-V 值 在电压钳模式下,向神经元内注入电流为-100 pA 到+100 pA,步阶为 10pA,刺激时程为 200 ms 的阈下电流 刺激,分别记录两组脑片的锥体神经元阈下电压值,用 clampfit 软件将 100 ms 的平台期对应电流电压值进行分析并绘制 I-V 曲线图。

1.3.2 微小突触后电流(mEPSCs) 在全细胞电压钳模式下, 两组脑片均在灌流液中加入 gabazine(10 μmol/L)和 strychnine (1 μmol/L)分别阻断氨基丁酸能和甘氨酸能反应,再将海马椎体神经元钳制在 -60 mv, 待细胞稳定 10 min 左右记录细胞自发 mEPSCs 反应。

## 1.4 统计分析

SPSS13.0软件进行数据统计分析,用均数±标准差表示计量资料。方法采用两个独立样本t检验,以P<0.05表示有统计学意义。作图软件包括SPSS13.0、origin8.0、cavas、CorelDRAW等。

## 2 结果

## 2.1 脑片和细胞状态比较

在红外光差显微镜的低倍镜下观察发现,由冰冻切片制备 的脑片形态轮廓清晰,切片表面平整,颜色偏淡黄色。高倍镜下 表面一至二层细胞肿胀破裂,或出现明显的细胞核,深层三至 四层细胞轮廓清晰,未见细胞肿胀,用电极封接破膜时,易封接 难破膜,或者难封接。而脑片培养方法获得的脑片低倍镜下边 缘不清晰,且有向外伸展的树突、轴突和结缔组织,切片表面厚 薄不一,颜色偏白。高倍镜下可见脑片从表面至深部均有活细 胞,轮廓清晰,用电极接触时以毫秒级的速度封接破膜。

## 2.2 冰冻切片和培养脑片细胞动作电位电生理特性比较

通过给予一定的电流刺激,两组记录所得的动作电位波形 一致,通过对最大电流刺激强度 300pA 下细胞的电生理特性 参数如:动作电位发放数(action potential count, AP count)、第 一发放延时(first spike latency, FSL)、峰值时间差(interspike interval at peak value, ISIp)、峰值电压(peak amplititude)进行数据 统计分析,发现均无统计学差异(如图 1)。说明脑片培养的方 法并未改变细胞的基本电生理特性。

### 2.3 冰冻切片和脑片培养对海马锥体神经元 I-V 曲线影响

实验进一步研究两组脑片神经元 I-V 曲线反应。将神经元 在电压钳模式下注入 -100 pA 到 +100 pA,步阶间隔 10pA,刺 激时程为 200 ms 的步阶电流。分别记录冰冻切片(n=17)和脑 片培养海马锥体神经元(n=19)电流反应(如图 2,A),并绘制 I-V 曲线(如图 2,B)。从图 B 展示的 IV 曲线看出,当均值在 V=0 mV 时,两组电流分别为 699.83± 13.02pA 和 700.10± 10.45pA,无统计学差异(p=0.98),(如图 2C)。当 I=0pA 时,两 组神经元细胞反转电位值分别为 61± 10mV 和 57± 7mV,两 者间无统计学差异(p=0.78),如图 2D。两组细胞最大电流反应 分别为 1581.03± 23.58pA 和 1643.19± 19.49pA,两者间无统计 学差异(p=0.13)。说明脑片培养的方法并不影响细胞 I-V 曲线 形状和基本膜参数。

### 2.4 冰冻切片和脑片培养对海马神经元 mEPSCs 的差异比较

为探讨冰冻切片以及脑片培养对海马神经元突触连接的 影响差异,实验以全细胞电压钳模式的方法记录方式,分别对 冰冻切片组和脑片培养组椎体神经元微小突触后电流(mEP-SCs)反应进行记录,实验分别记录细胞18和17个,每个细胞 记录时长为 10 min(如图 3A)。图 3B 对两组间的电流幅度进行 统计比较,发现冰冻切片组(29.75±6.78 pA)比脑片培养组 (33.58± 4.13 pA)电流幅度略低,具有统计学意义(P<0.05),说 明脑片培养提高了突触后细胞通道的反应性来提高电流幅度。 通过对突触后电流的半峰宽(half peak width;半峰宽 = AP 下降 支半峰时间-AP上升支半峰时间)进行统计学研究发现,冰冻 切片组(2.0± 0.8 ms)和脑片培养组(1.9± 1.0 ms)半峰宽差异 不明显,且无统计学差异(P>0.05)。说明脑片培养并未影响细 胞突触后介导通道的开放时间,(如图 3C)。在对 mEPSCs 反应 频率分析时发现,冰冻切片组频率(31.82± 8.56 ms)明显低于 脑片培养组(40.83±7.16 ms), 且均具有显著统计学差异(P<0. 05)(如图 3D)。说明脑片培养的方式促使了突触前囊泡量子释 放,且该量子为非动作电位依赖的囊泡量子,突触前量子释放



Fig.1 The recording of action potential of hippocampal pyramidal neurons in frozen section and cultivate slices Note: A: The action potential waveform produced by injecting current for pyramidal cells and the current injection propofol. Fro: group of frozen section, n=26; Cul: group of cultivate slices, n=28. B, C, D, E: the AP count, the mean first spike latency, the interspike interval at peak value and peak amplitude from the group of frozen section and cultivate slices. Error bars are ± SE. \*\*, p<0.01, \*, p<0.05. Independent-sample T Test.



Fig.2 The I-V curves of hippocampal pyramidal neurons from frozen section and cultivate slices

Note: A: Example of membrane current waveforms recorded from group of frozen section and cultivate slices during propofol application. B: The current-voltage functions (I-V curves) derived from the steady-state responses in A. Open circles and open squares represent responses of frozen section (n=17) and cultivate slices (n=19). Error bars are ± SE. C: Comparison the current of group of frozen section and cultivate slices when V=0mV. D: Comparison the reversal potential (Vrev) of group of frozen section and cultivate slices when I=0mV. E: Comparison the max current of group of frozen section and cultivate slices during 50 to 100mV stimulus. Error bars are ± SE. \*\*, p<0.01. Independent-sample T Test.</li>

增加进而使神经细胞兴奋性传递加快。以上结果显示,脑片培养组的椎体神经元具有更高的细胞反应性,且发放频率显著增加,说明冰冻切片急性损伤了神经纤维连接,而脑片培养的方式修复了一定数量的纤维连接,重建了一定数量的细胞间信号连接,从而使细胞反应性增加。

## 3 讨论

随着脑片培养技术的不断改进,国内外现已广泛运用微孔 膜插件方法培养新生鼠脑片,该方法既能使培养基中的营养物 质满足脑片细胞需要,又能事使脑片向空气中摄取足够的氧气 <sup>[13]4]</sup>。前期研究已经证实脑片培养技术既能保持组织固有结构 不变,保证细胞的三维空间结构不会改变、维持层与层间纤维 连接,保留了完整的突触回路、递质释放、受体分布、突触连接 和其他生理功能,更加接近体内的真实表现,同时又有利于实 验条件的控制和实验结果的观察<sup>[15,16]</sup>。本实验以海马脑片为研 究对象,通过全细胞膜片钳记录方结合海马椎体神经元的解剖 学特点,探索及验证脑片培养的方式获得的神经元状态与冰冻 切片方式获得的神经元状态异同点。

脑组织培养技术已经渗透到神经科学研究各个领域,然而 对于本实验的脑片培养技术并未得到普及,前期学者通过体视 学原理定量定时观察培养脑片中细胞细胞层、各层细胞密度、 细胞大小的变化过程,得出离体脑片培养的细胞发育模式与在 体细胞发育模式一致的结论<sup>[17,18]</sup>。为本实验的脑片培养技术给 予有力的佐证,加之本实验采用微孔膜插件方法进行培养,与 冰冻切片获得的脑片细胞比较,进一步保证脑片培养过程中细 胞营养吸取和提供更佳的生存发育环境。通过红外显微镜观 察,脑片培养的方式获得的脑片保留了完整的细胞种类和三维 空间结构,海马区域神经细胞规律分布、细胞胞体形态清晰,与 前期脑片培养结果一致。冰冻切片组的脑片细胞表层受损,二





Fig.3 The recording of miniexcitatory postsynaptic currents of hippocampal neurons from group of frozen section and cultivate slices Note: A: left: The recordings of mEPSCs of hippocampal neurons from group of frozen section and cultivate slices. right: Averaged traces from mEPSCs of two individual cells, normalized to their peaks. B, C, D: Comparison the current, half peak width and frequency of mEPSCs in two groups. Fro: n=18; Cul: n=17. Error bars are ± SE. \*\*, p<0.01;\*, p<0.05. Independent-sample T Test.

至三层可见细胞形态完整,说明脑片培养方法除了能保证与 在体相同的胞体结构与分布外,还能更好的筛除和修复受损 细胞。

А

B

Current (pA)

动作电位的形成与细胞膜表面离子通道特性有密切关系, 当细胞受到一定刺激便能细胞膜上的各类离子通道产生相应 数量的开放和关闭,继而产生内外膜电流,改变细胞膜电位[19]。 实验对冰冻切片和脑片培养组分别给予相同强度和时程的电 流刺激并记录动作电位,经过统计研究发现无论是动作电位数 量,还是动作电位各个基本参数,均没有显著的统计学差异。说 明体外脑片培养的方式与在体冰冻切片获得的神经元具有相 同的膜细胞特性,脑片培养保存了正常的膜蛋白功能。

细胞膜基本特性除了动作电位这个衡量指标外,细胞反转 电位决定细胞处于静息状态的电位模式,实验进一步研究两种 脑片获得方式对细胞的 I-V 曲线变化的影响,通过统计发现无 论是反转电位还是最大电流,均无显著统计学差异。并且当给 予 50mV 以上的兴奋性刺激时,I-V 曲线平台亦未改变,这进一 步说明脑片培养方式并未改变神经元膜参数,保留了与在体神 经元相同且完整的膜蛋白种类和数量。

前期实验通过形态学和检测细胞膜参数来比较脑片培养 和冰冻切片两种脑片获得方式对单个神经元细胞基本模特性 的异同,得出两种脑片获得方式并无差异。除了单个神经元本 身的特性外,也需要考虑神经元之间的突触回路、递质传递水 平的差异从,后续实验用能更微观精密地反应神经传导效应的 微小突触后电流 mEPSCs 来检测神经元间连接关系,且 mEP-SCs中的幅度、半峰宽和发放频率三个基本参数能有效精准的 反应和检测突触前囊泡释放速度、数量和突触后受体通道接受

信号的敏感性强弱四。统计学研究得出并冰冻切片组幅度低于 比脑片培养组,而冰冻切片组的半峰宽和脑片培养组半峰宽并 无差异,冰冻切片组的反应频率要低于脑片培养组。充分说明 脑片培养的方式仍旧保留了神经元之间的神经突触连接,突触 环路上密集分布相应递质受体并且同时保持递质传递的完整 性。脑片培养组神经元的基本连接完整的情况下,脑片培养方 式通过突触后受体通道数量增加来提高电流幅度,并且一定程 度上促使突触前非动作电位依赖的囊泡量子释放量增多从而 提高突触后神经细胞兴奋性传递和接收。这有利的说明脑片培 养的手段能有效的保证神经元保留与在体神经元相同的细胞 形态和膜细胞特性,经过一段时间的体外培养,不但保存了完 整的突触回路、受体分布、递质释放,且在一定程度上修复了急 性分离切片方式带来的细胞损伤和部分神经连接断裂损坏。从 长远的神经毒理学研究来看,体外脑片培养能更方便的改变神 经元生存外在条件,为中枢神经元药物毒理学研究、神经发育 研究、神经损伤及修复等提供更加有利控制、可靠、理想的环境 和条件。

### 参考文献(References)

- [1] Victorov IV, LyjinAA, Aleksandrova OP. A modified roller method fororganotypic brain cultures: free floating slices of postnatal rat hippocampus[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2001, 7(1): 30-37
- [2] Gahwiler BH, Capogan M, Debanne D, et al. Organotypic slice culture: a technique has come of age [J]. Trends Neurosci, 1997, 20 (10): 471-477
- [3] 王勇,朱小南,陈汝筑,等.新生大鼠海马脑片培养方法[J]. 中国药理 学与毒理学杂志, 2005, 19(1): 70-74 Wang Yong, Zhu Xiao-nan, Chen Ru-zhu, et al. A method for

organotypic hippocampal slice culture of postnatal rat [J]. Chin J Phamia Toxicol, 2005, 19(1): 70-74

- [4] Toyoshima D, Mandai K, Maruo T, et al. Afadin regulates puncta adherentia junction formation and presynaptic differentiation in hippocampal neurons[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89763
- [5] Larkman PM, Kelly JS. The use of brain slices and dissociated neurones to explore the multiplicity of actions of 5-HT in the central nervous system[J]. J Neurosci Methods, 1995, 59(1): 31-39
- [6] Keel M, Birchler M, Wanner GA, et al. Predictive role of IL-6 for multi-organ dysfunction syndrome (MODS) in severely injured patients in the early intensive care phase [J]. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1998, 115: 1086-1087
- [7] Funahashi M, Mitoh Y, Akaike T, et al. Variety of morphological and electrophysiological properties of area postrema neurons in adult rat brain slices[J]. Neurosci Res, 2006, 54(1): 43-48
- [8] Uchida K, Momiyama T, Okano H, et al. Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin[J]. Neurosci Res, 2005, 52(3): 276-286
- [9] Holopainen IE, J?rvel? J, Lopez-Picon FR, et al. Mechanisms of kainate-induced region-specific neuronal death in immature organotypic hippocampal slice cultures [J]. Neurochem Int, 2004, 45 (1): 1-10
- [10] Torkkeli PH, Sekizawa S, French AS. Inactivation of voltageactivated Na(+) currents contributes to different adaptation properties of paired mechanosensory neurons [J]. J Neurophysiol, 2001, 85(4): 1595-1602
- [11] Franks NP, Lieb WR. Inhibitory synapses. Anaesthetics set their sites on ion channels[J]. Nature,1997, 389(6649): 334-335
- [12] Yoshimura M, Nishi S. Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents[J]. Neuroscience, 1993, 53(2): 519-526

- [13] Hang P, Sun C, Guo J, et al. BDNF-mediates Down-regulation of MicroRNA-195 Inhibits Ischemic Cardiac Apoptosis in Rats [J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(8): 979-989
- [14] Peng ZW, Wang SQ, Chen GJ, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischemic damage in mice by improving anti-oxidant and anti-inflammation activities and inhibiting apoptosis pathway [J]. Neurochem Res, 2015, 40(4): 661-673
- [15] Lee J C, Tae H J, Cho G S, et al. Ischemic preconditioning protects neurons from damage and maintains the immunoreactivity of kynurenic acid in the gerbil hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(6): 1537-1544
- [16] Colino-Oliveira M, Rombo DM, Dias RB, et al. BDNF-induced presynaptic facilitation of GABAergic transmission in the hippocampus of young adults is dependent of TrkB and adenosine A2A receptors[J]. Purinergic Signal, 2016, 12(2): 283-294
- [17] Chen W C, Lai Y S, Lin S H, et al. Anti-depressant effects of Gastrodia elata Blume and its compounds gastrodin and 4-hydroxybenzyl alcohol, via the monoaminergic system and neuronal cytoskeletal remodeling[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 18(2): 190-199
- [18] Murata A, Kanbayashi T, Shimizu T, et al. Risk factors for drug nonadherence in antidepressant-treated patients and implications of pharmacist adherence instructions for adherence improvement [J]. Patient Prefer Adherence, 2012, 6: 863-869
- [19] Hansen N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 Receptors Mediate Informational Saliency that Promotes Persistent Hippocampal Long-Term Plasticity [J]. Cerebral Cortex, 2014, 24(4): 845-858
- [20] Wei C, Liu Y, Yang M, et al. Dopamine Inhibits High-Frequency Stimulation-Induced Long-Term Potentiation of Intrinsic Excitability in CA1 Hippocampal Pyramidal Neurons[J]. Neurosignals, 2013, 21: 150-159

#### (上接第 5415 页)

Li Ke, Tian Xue-mei, Wang Mei-zhi. Experimental study on the effects of Resveratrol on cell cycle of HepG2 cell[J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2009, 27(3): 317-320

- [30] 黄晓丹,张秀华,浦福兴,等.白藜芦醇对人肝癌细胞 SMMC-7721 增 殖影响的研究[J].医学研究生学报, 2011, 24(10): 26-29 Huang Xiao-dan, Zhang Xiu-hua, Pu Fu-xing, et al. Effects of resveratrol on the proliferation of hepatoma SMMC-7721 cells[J].J Med Postgra, 2011, 24(10): 26-29
- [31] 于良,孙中杰,吴胜利,等.白藜芦醇对小鼠移植性肝癌组织中细胞 周期蛋白的影响[J].第四军医大学学报, 2002, 23(23): 2172-2174 Yu Liang, Sun Zhong-jie, Wu Sheng-li, et al. Effect fo resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer [J].J Fourth Mil Med Univ, 2002, 23(23): 2172-2174
- [32] Zhang H, Yang R. Resveratrol inhibits VEGF gene expression and proliferation of hepaocarcinoma cells [J]. Hepatogastroenterology, 2014, 61(130): 410-412
- [33] 李璐,王璐,陈光亮,等.白藜芦醇抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖及 机制研究[J].生物学杂志, 2016, 33(5): 67-70

Li Lu, Wang Lu, Chen Guang-liang, et al. The inhibitory effect of resveratrol in hepaocellular carcinoma Smmc-7721 cells [J]. Journal of Biology, 2016, 33(5): 67-70

- [34] Wu ML, Li H, Wu DC, et al. CYP1A1 and CYP1B1 expressions in medulloblastoma cells are AhR-independent and have no direct link with resveratrol-induced differentiation and apoptosis [J].Neurosci Lett, 2005, 384(1-2): 33-37
- [35] 艾旭,朱倩,马旭等.白藜芦醇联合放疗对肝癌 Bel-7402 细胞体外 凋亡的影响[J].现代中西医结合杂志, 2014, 23(30): 3321-3324 Ai Xu, Zhu Qian, Ma Xu, et al. Influence of Resveratrol combined with radiotherapy on apoptosis of liver cancer cells Bel-7404 [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2014, 23(30): 3321-3324
- [36] 汪维佳,虞娉.白藜芦醇增强顺铂对肝癌细胞 Bel-7402 的生长抑制 作用[J].实用肿瘤杂志, 2009, 24(2): 157-159
  Wang Wei-jia, Yu Ping. Synergistic action of resveratrol and cisplatin on proliferation of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells[J]. Journal of Practical Oncology, 2009, 24(2): 157-159