

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.11.05

BHK-21 细胞不同处理方式对裸鼠致瘤性的影响

于义娟, 秦 涛, 闵娟娟, 漆世华, 靖志强, 付 娅, 李晶梅, 廖园园,
舒银辉, 朱 薇, 徐 松, 谢红玲*

(武汉中博生物股份有限公司, 武汉 430070)

[收稿日期] 2017-02-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 11-0028-08 [中图分类号] Q813

[摘 要] 为分析 BHK-21 细胞不同处理方式对裸鼠致瘤性的影响, 分别用甲醛、二乙烯亚胺 (BEI)、 β -丙内酯 (BPL) 进行灭活和在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行冻融处理的 BHK-21 细胞接种裸鼠, 通过病理组织形态学观察判定其是否存在致肿瘤的特性。结果显示, 甲醛、BEI、BPL、冻融 2 次或 3 次分别处理的 BHK-21 细胞接种裸鼠, 对裸鼠致瘤率为零。冻融 1 次的 BHK-21 细胞和 10^7 、 10^5 和 10^3 个 BHK-21 细胞分别接种裸鼠, 致瘤率为 100%。10 个 BHK-21 细胞接种裸鼠, 未见成瘤。试验表明, 裸鼠检测 BHK-21 细胞致瘤性敏感性为 10^3 个细胞; 冻融 2 次、甲醛、BEI、BPL 处理, BHK-21 细胞均丧失致瘤性; 冻融 1 次不能使 BHK-21 细胞丧失致瘤性。

[关键词] BHK-21 细胞; 裸鼠; 致瘤性

Effects of Different Treatments of BHK-21 Cells on Tumorigenicity in Nude Mice

YU Yi-juan, QIN Tao, MIN Juan-juan, QI Shi-hua, JING Zhi-qiang, FU Ya, LI Jing-mei,
LIAO Yuan-yuan, SHU Yin-hui, ZHU Wei, XU Song, XIE Hong-ling*

(Wuhan Chopper Biology Co., Ltd, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: XIE Hong-ling, E-mail: 13419546263@163.com

Abstract: For understanding the tumorigenicity of BHK-21 cells, nude mice were injected by BHK-21 cells which inactivated by formaldehyde, diethylenimine (BEI), β -propiolactone (BPL) as well as BHK-21 cells which freezing-thawing at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, the tumor-bearing characteristics were observed by pathomorphological changes. The results showed that the tumor morbidity of BHK-21 cells were treated by formaldehyde, BEI, BPL and freezing-thawing for two or three times were zero, 10^7 , 10^5 , 10^3 BHK-21 cells can 100% cause the tumors as well as the BHK-21 cells were freezing-thawing only once, no tumors were found when the dose of injection is ten. These results suggested that the sensitivity of tumorigenicity of BHK-21 cells in nude mice was 10^3 cells, the tumorigenicity of BHK-21 cells can be killed with freezing-thawing for twice, formaldehyde, BEI and BPL; but it still have tumorigenicity in nude mice with freezing-thawing only once.

Key words: BHK-21 cells; nude mice; tumorigenicity

作者简介: 于义娟, 硕士, 从事兽用疫苗研发和动物组织病理检测研究。

通讯作者: 谢红玲。E-mail: 13419546263@163.com

BHK-21 细胞为地鼠肾传代细胞系,具有致瘤性,其完整活细胞具有较高的致癌、致瘤性,不能用于活疫苗的制备^[1]。BHK-21 细胞灭活后不具有致瘤性,是世界卫生组织推荐的生产兽用疫苗细胞,现已在规模化生产中应用,主要用于口蹄疫灭活疫苗的生产^[2]。本研究以《中国兽药典》所载的致瘤性检验方法,对灭活剂、冻融处理的 BHK-21 细胞进行检验,从中选择能够使 BHK-21 细胞丧失致瘤性的处理方法,用于兽用生物制品的研发和生产。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 动物 BALB/c-nu/nu 裸鼠,雌性,4~6 周龄,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。
- 1.1.2 饲料 裸鼠料,购自北京华阜康生物科技股

- 份有限公司。
- 1.1.3 细胞 BHK-21 细胞、人宫颈癌细胞系(HELA)细胞、鸡胚成纤维细胞(CEF),均由武汉中博生物股份有限公司技术中心提供。
- 1.1.4 试剂 2-溴乙胺氢溴酸盐(BEA)、甲醛、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、氢氧化钠(NaOH)均为国产分析纯。取 0.4 mol/L 的 BEA 和 0.4 mol/L 的 NaOH 等体积混合,37 ℃ 孵育 1 h 制成 0.2 mol/L 的二乙烯亚胺(BEI)。DMEM 培养液为 HYCLONE 公司产品。
- 1.1.5 仪器 S8 智能型独立通气笼 IVC(苏州市苏杭科技器材有限公司)、LEICA RM2235 石蜡切片机、JK-6 生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司)、水浴锅、离心机、超净台、冰箱、电磁炉。
- 1.1.6 分组 将裸鼠分为 13 组,每组 10 只,见表 1。

表 1 试验动物分组
Tab 1 Experimental animal grouping

分组 grouping	接种物 inoculation material	细胞密度/0.5 mL cell density/0.5 mL
阳性对照 1 组	HELA 细胞	10^6
阳性对照 2 组	BHK-21 细胞	10^7
阴性对照 1 组	CEF 细胞	10^6
阴性对照 2 组	煮沸 10 min 的 BHK-21 细胞	10^7
梯度 1 组	BHK-21 细胞	10^5
梯度 2 组	BHK-21 细胞	10^3
梯度 3 组	BHK-21 细胞	10
甲醛组	甲醛处理的 BHK-21 细胞	10^7
BEI 组	BEI 处理的 BHK-21 细胞	10^7
BPL 组	BPL 处理的 BHK-21 细胞	10^7
冻融 1 组	-20 ℃ 冻融 1 次的 BHK-21 细胞	10^7
冻融 2 组	-20 ℃ 冻融 2 次的 BHK-21 细胞	10^7
冻融 3 组	-20 ℃ 冻融 3 次的 BHK-21 细胞	10^7

1.2 方法

1.2.1 各组接种物的制备

1.2.1.1 细胞悬液的制备 取悬浮培养的对数生长期的 BHK-21 细胞,1000 r/min 离心 8 min,弃上清,用 DMEM 培养液重悬稀释细胞,使细胞浓度为

$10^7/0.5\text{ mL}$ 、 $10^5/0.5\text{ mL}$ 、 $10^3/0.5\text{ mL}$ 、 $10/0.5\text{ mL}$ 。

1.2.1.2 甲醛灭活组细胞的制备 取 $10^7/0.5\text{ mL}$ 的 BHK-21 细胞,加入甲醛溶液使终浓度为 0.1%,37 ℃ 灭活 72 h。

1.2.1.3 BEI 灭活组细胞的制备 取 $10^7/0.5\text{ mL}$

的 BHK-21 细胞,加入 BEI 溶液使终浓度为 0.005 mol/L,37 ℃ 灭活 48 h,加入硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)溶液使终浓度为 0.005 mol/L。

1.2.1.4 BPL 灭活组细胞的制备 取 $10^7/0.5$ mL 的 BHK-21 细胞,按 1/4000 比例加入 BPL,2~8 ℃ 灭活 24 h,37 ℃ 水解 2 h。

1.2.1.5 冻融组细胞的制备 取 $10^7/0.5$ mL 的 BHK-21 细胞,-20 ℃ 分别冻融 1 次、2 次和 3 次。

1.2.1.6 HELA 细胞和 CEF 细胞悬液制备 分别取静置培养的对数生长期的 HELA 细胞和 CEF 细胞,胰酶溶液消化使细胞分散,离心收集细胞,DMEM 培养液重悬,使细胞浓度为 $10^6/0.5$ mL。

1.2.1.7 阴性对照 2 组细胞的制备 取 $10^7/0.5$ mL 的 BHK-21 细胞,置于沸水中煮 10 min。

1.2.2 裸鼠接种与观察测量

1.2.2.1 裸鼠接种 按表 1 选择接种物。在裸鼠颈背部和背部前 1/3 处,皮下注射,0.5 mL/只。

1.2.2.2 试验观察 观察 14 d,检查有无结节或肿瘤形成。如果有结节或可疑病灶,继续观察至少 1 周,解剖,进行病理组织学检查,检查内脏器官

(心、肝、脾、肺、肾、脑)有无异常病变。对未发生结节的动物,取其中半数,观察 21d,对另外半数动物观察 12 周,对接种部位进行解剖和病理学检查,观察各淋巴结和各器官中有无结节形成,如果可疑,进行病理组织学检查。阳性对照组和阴性对照组观察 21 d^[3-4]。

1.2.2.3 肿瘤组织切片制备和病理形态学观察 断颈处死裸鼠,取出裸鼠皮下肿瘤结节,用中性福尔马林作常规组织固定,制备石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下观察。

1.2.2.4 判定标准 在阳性对照组裸鼠成瘤率为 100%,阴性对照组裸鼠成瘤率为零时,实验成立。实验组裸鼠无肿物生长或者虽有隆突状肿物生长但却是非肿瘤的,接种物无致癌性;若有隆突状肿物生长,经病理形态学观察证实为肿瘤的,接种物有致癌性。

2 结 果

记录各实验组裸鼠精神、饮食、排便、接种部位肿块情况,并对成瘤情况进行统计,见表 2。

表 2 试验各组成瘤数统计

Tab 2 Tumor formation statistics for all groups				
分组 Grouping	细胞 Cell	细胞密度/0.5 mL Cell density/0.5 mL	处理 Treatment	成瘤数/总数 Tumor formation/Total
阳性对照 1 组	HELA	10^6	/	10/10
阳性对照 2 组	BHK-21	10^7	/	10/10
阴性对照 1 组	CEF	10^6	/	0/10
阴性对照 2 组	BHK-21	10^7	煮沸 10 min	0/10
梯度 1 组	BHK-21	10^5	/	10/10
梯度 2 组	BHK-21	10^3	/	10/10
梯度 3 组	BHK-21	10	/	0/10
甲醛组	BHK-21	10^7	37 ℃ 灭活 72 h	0/10
BEI 组	BHK-21	10^7	37 ℃ 灭活 48 h	0/10
BPL 组	BHK-21	10^7	4 ℃ 灭活 24 h	0/10
冻融 1 组	BHK-21	10^7	-20 ℃ 冻融 1 次	10/10
冻融 2 组	BHK-21	10^7	-20 ℃ 冻融 2 次	0/10
冻融 3 组	BHK-21	10^7	-20 ℃ 冻融 3 次	0/10

2.1 阴、阳性对照组 CEF 细胞接种后观察 21 d, 裸鼠均未见肿块, 精神良好, 饮食、排便正常(图 1)。煮沸 10 min 的 BHK-21 细胞接种裸鼠, 均未出现肿块, 且精神、饮食、排便均没出现异常表现。接种后 21 d 剖检 5 只裸鼠, 接种后 12 周剖检 5 只裸鼠, 观察各淋巴结和各器官, 均无结节形成(图 2)。HELA 细胞接种后一周, 裸鼠接种部位有肿块形成, 肿块直径 8 mm 左右, 具有肿瘤的病理形态(图 3)。 10^7 个 BHK-21 细胞接种裸鼠, 接种后一周接种部位有肿块形成, 肿块数量 3 个以上, 且在背部后方皮下也有肿块形成。肿块直径 10~20 mm, 肿块质地较软, 含血量丰富, 具有肿瘤的病理形态。所有裸鼠接种 12~14 d 全部死亡(图 4)。

2.2 冻融组 冻融 1 组裸鼠在接种后第 2 周陆续出现肿块, 肿块 1 到 2 个, 肿块直径 8 mm 左右, 具有肿瘤的病理形态, 部分肿瘤组织表皮出现破溃, 剖检肿块含血量较高, 质地较软(图 5)。冻融 2 组均未出现肿块, 且精神、饮食、排便均没出现异常表现。接种后 21 d 剖检 5 只裸鼠, 接种后 12 周剖检 5 只裸鼠, 观察各淋巴结和各器官, 均无结节形成(图 6)。冻融 3 组裸鼠均未出现肿块, 且精神、饮食、排便均没出现异常表现。接种后 21 d 剖检 5 只裸鼠, 接种后 12 周剖检 5 只裸鼠, 观察各淋巴结和各器官, 均无结节形成(图 7)。

2.3 灭活剂处理组 甲醛组: 1 周内 4 只裸鼠接种部位有肿块形成, 2 周肿块消失, 21 d 剖检, 经病理形态学检查, 无肿瘤组织。另 6 只裸鼠没有出现肿块, 且精神、饮食、排便均没出现异常表现, 21 d 剖检 3 只裸鼠, 12 周剖检 3 只裸鼠, 观察各淋巴结和各器官, 均无结节形成(图 8)。BEI、BPL 组: 裸鼠均未出现肿块, 且精神、饮食、排便均没出现异常表现。BEI、BPL 组接种后 21 d 分别剖检 5 只裸鼠, 接种后 12 周分别剖检 5 只裸鼠, 观察各淋巴结和各器官, 均无结节形成(图 9、图 10)。

2.4 梯度组 梯度 1 组: 接种后一周接种部位有肿块形成, 肿块数量 2 个以上, 且在背部后方皮下也有肿块形成。肿块直径 8~16 mm, 肿块质地较软, 含血量丰富, 具有肿瘤的病理形态, 观察期内没

有死亡(图 11)。梯度 2 组: 接种后一周均未出现肿块, 在接种后 2 周有 8 只裸鼠接种部位有肿块形成, 在接种 3 周有 2 只裸鼠接种部位有肿块形成, 肿块直径在 4 mm 左右, 具有肿瘤的病理形态(图 12)。梯度 3 组: 裸鼠均未出现肿块, 精神、饮食、排便均没出现异常表现。接种后 21 d 剖检 5 只裸鼠, 接种后 12 周剖检 5 只裸鼠, 观察各淋巴结和各器官, 均无结节形成(图 13)。



图 1 阴性对照 1 组裸鼠

Fig 1 Negative control group 1



图 2 阴性对照 2 组裸鼠

Fig 2 Negative control group 2



图 3 阳性对照 1 组裸鼠

Fig 3 Positive control group 1



图 4 阳性对照 2 组裸鼠
Fig 4 Positive control group 2



图 8 甲醛组裸鼠
Fig 8 Formaldehyde treatment group



图 5 冻融 1 组裸鼠
Fig 5 Freezing-thawing group 1



图 9 BEI 组裸鼠
Fig 9 BEI treatment group



图 6 冻融 2 组裸鼠
Fig 6 Freezing-thawing group 2



图 10 BPL 组裸鼠
Fig 10 BPL treatment group

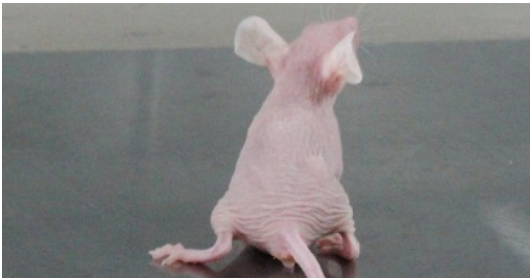


图 7 冻融 3 组裸鼠
Fig 7 Freezing-thawing group 3



图 11 梯度 1 组裸鼠
Fig 11 Gradient group 1



图 12 梯度 2 组裸鼠
Fig 12 Gradient group 2



图 13 梯度 3 组裸鼠
Fig 13 Gradient group 3

2.5 HELA 细胞致瘤裸鼠肿瘤病理学观察 采集裸鼠皮下肿瘤结节,进行组织切片制备和病理形态学观察。细胞排列紊乱,失去正常的排列层次,细胞大小不一(图 14)。有些细胞体积偏大,细胞核与细胞质的比例增大,细胞核形态大小不一,染色质粗糙,出现病理性核分裂象(图 15)。

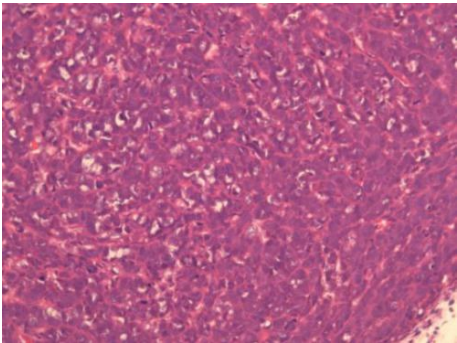
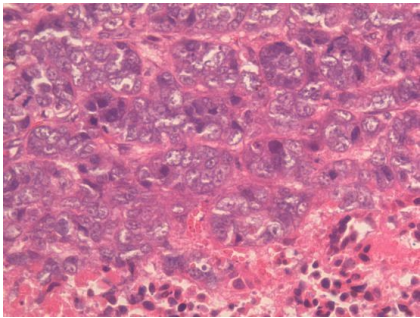


图 14 HELA 细胞致瘤 HE 200×
Fig 14 Tumor caused by Hela cells HE 200×



→:病理性核分裂相
→:Pathological mitotic phase

图 15 HELA 细胞致瘤 HE 400×
Fig 15 Tumor caused by Hela cells HE 400×

2.6 BHK-21 细胞致瘤裸鼠肿瘤病理学观察 采集各肿块,制备石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下观察,结果见图 16、图 17。

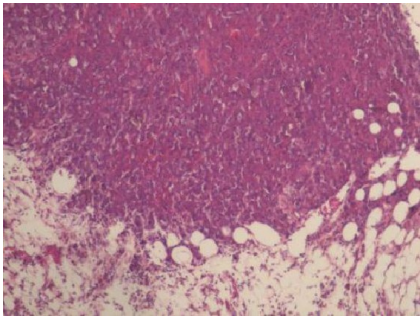
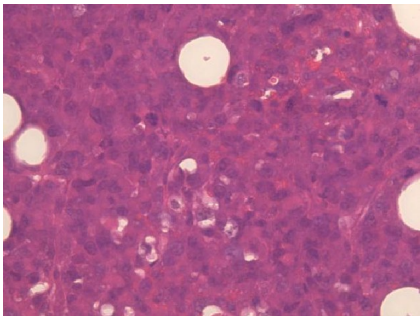


图 16 BHK-21 细胞致瘤 HE 200×
Fig 16 Tumor caused by BHK-21 cells HE 200×



→:病理性核分裂相
→:Pathological mitotic phase

图 17 BHK-21 细胞致瘤 HE 400×
Fig 17 Tumor caused by BHK-21 cells HE 400×

结果显示,肿块大部分区域为坏死的肿瘤组织,肿瘤细胞如横纹肌母细胞样弥漫分布,可见病理性核分裂象。

3 讨论

本试验中使用的甲醛、BPL、BEI 属于化学灭活剂。化学灭活的优点是效果确实、方法简便。甲醛灭活的作用机制是破坏微生物的核酸及蛋白质。甲醛灭活时首先与含氨基的核苷酸碱基(如 A、G、U)结合而使核酸变性。使用较高浓度的甲醛和较长时间的作用时间,甲醛可与蛋白质的胺基结合,形成羟甲基衍生物或二羟甲基衍生物,后者再与酰胺发生交联反应。微生物的蛋白质发生变性,阻止其核酸逸出^[5-6]。甲醛灭活存在较多的缺陷,包括刺激性大、致癌危险、破坏免疫原性、灭活时间长、灭活效果受多种因素影响等^[7]。BPL 灭活的作用机制是作用于微生物的 DNA 或 RNA,通过与核酸的嘌呤碱基(主要是 G)反应破坏核酸的结构,但不直接作用于蛋白质,因此能保持良好的免疫原性。大剂量 BPL 是一种潜在致癌物,但是 BPL 极易水解,在 37 ℃ 水浴水解 2 h 后消失,其水解为无毒性的人体脂肪代谢产物 β -羟基丙酸。BPL 灭活的另一优势是灭活所需时间短,能显著缩短疫苗生产周期^[5]。BEI 灭活的作用机制是烷化微生物 DNA 分子中的鸟嘌呤或腺嘌呤,引起单链断裂、双螺旋链交联及干扰酶系统和核蛋白作用,破坏核酸代谢、合成,导致微生物核酸芯破坏。BEI 破坏微生物核酸,不作用于蛋白质,能较好的保持抗原的免疫原性^[5]。本试验中使用冻融处理 BHK-21 细胞。冻融是一种破碎细胞的方法,作用机理是突然冷冻时细胞内形成冰晶,细胞内外溶剂浓度突然改变致使细胞破碎^[8]。

本试验用裸鼠检测细胞致瘤性,裸鼠胸腺先天性缺陷,T 淋巴细胞缺损,适于免疫生物学、免疫病理学、移植免疫等研究,是生物制品传代细胞致癌试验的最好动物模型^[9]。裸鼠皮下接种肿瘤细胞,可导致其产生肿瘤或组织癌变,且保持原发瘤的组织学形态、免疫学特点及其特有的染色体组型^[10]。

细胞染色体遗传特征决定致瘤性质并具有种属特异性,不同核型细胞致瘤性不同^[11-12]。对

BHK-21 细胞系 KA 株、M 株、YA 株的染色体组型与遗传变异率分析,研究发现 BHK-21 细胞皮下接种裸鼠均产生进行性生长的恶性肿瘤,且不论核型如何始终具有强的致癌性^[12]。染色体数目变异越大,染色体众数越多、范围越宽,染色体条数越多,致瘤性越强。可能是因为“优胜劣汰”作用导致染色体数目变异较小细胞在裸鼠体内增殖处于劣势或被淘汰,相反染色体数目变异较大细胞在裸鼠体内增殖处于优势而明显增多^[13-14]。李六金等学者研究 BHK-21 细胞致瘤性,结果显示 10^8 BHK-21 细胞和 10^7 BHK-21 细胞不论是低代次还是高代次的肿块形成率和致瘤率均为 100%,且代次之间差异不显著。正常 BHK-21 细胞经快速裂解后仍具有致瘤性^[1]。

本试验用裸鼠检测 BHK-21 细胞致瘤性,结果显示, 10^3 个 BHK-21 细胞接种裸鼠引发肿瘤; 10 个 BHK-21 接种裸鼠观察期内未见肿瘤。本试验结果表明,BHK-21 细胞的数量及密度对裸鼠的致瘤性有明显影响,裸鼠检测 BHK-21 细胞致瘤性敏感性为 10^3 个细胞。

本试验对 BHK-21 细胞进行 -20 ℃ 冻融 1 次处理后,进行裸鼠致瘤性试验观察。结果显示皮下接种裸鼠引发肿瘤,且重复性稳定,这和李六金等学者的正常 BHK-21 细胞经快速裂解后仍具有致瘤性的结论相符。

本试验对 BHK-21 细胞分别进行甲醛 37 ℃ 灭活 72 h、BEI 37 ℃ 灭活 48 h、BPL 4 ℃ 灭活 24 h、-20 ℃ 冻融 2 次或 3 次处理后,进行裸鼠致瘤性试验观察。结果显示,甲醛、BEI、BPL、-20 ℃ 冻融 2 次或 3 次后,皮下接种裸鼠均不引发肿瘤。结果表明,兽用灭活疫苗若以 BHK-21 细胞作为病毒增殖载体收获的抗原液,经 2 次冻融处理或 0.1% 甲醛或 0.005 mol/L 的 BEI 或 1/4000 的 BPL 进行灭活,均能使 BHK-21 细胞丧失致瘤性。

综上所述,BHK-21 细胞经灭活和冻融处理可丧失对裸鼠的致瘤性,其结果可以作为判定 BHK-21 细胞是否适用于兽用灭活疫苗抗原生产的参考依据。

参考文献:

- [1] 李六金,李 泰,施新猷,等. 五种动物传代细胞系对裸鼠的致癌性[J]. 第四军医大学学报,2000,26(1):738-739.
- Li L J, Li T, Shi X Y. Evaluation of neoplastigenesis of 5 types of passage animal cell lines in nude mice[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2000, 26(1): 738-739.
- [2] 田 波,尚勇良,武发菊,等. BHK21 细胞的悬浮驯化及其悬浮培养参数研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(31):10855-10857.
- Tian B, Shang Y L, Wu F J. Study on BHK21 cell suspension adaptation and culture parameters in suspension condition [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2014, 42(31): 10855-10857.
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二 O 一 O 年版 [S]. 2011;附录 36-37.
- Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010) [S]. 2011; appendix 36-37.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二 O 一五年版 [S]. 2016.
- Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015) [S]. 2016
- [5] 程水生,崔保安,陈光华. 兽医实验动物学[M]. 中国农业出版社,2012;129-130.
- Cheng S S, Cui B A, Chen G H. Veterinary laboratory animal science[M]. Chinese Agricultural Publishing House,2012;129-130.
- [6] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1989;298-304.
- Shi X Y. Medical laboratory animal science[M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Publishing House, 1989: 298-304.
- [7] 姜 平. 兽医生物制品学[M]. 第 2 版. 中国农业出版社,2006.
- Jiang P. Veterinary Biologicology[M]. Second edition. Chinese agricultural publishing house, 2006.
- [8] 姚 理,王文翔,陈 涛,等. 花生四烯酸的功能及提取纯化 [C]//第二十一届学术年会暨中国食用油产业发展论坛论文集选集, 2012: 263-267.
- Yao L, Wang W X, Chen T, *et al.* The functions and extraction and purification of arachidonic acid [C]// Selected papers from the 21st academic annual conference and industry development BBS of Chinese cooking oil, 2012: 263-267.
- [9] 徐守振,尹燕博,王 新. 动物疫苗中常用抗原灭活剂的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(9):162-167.
- Xu S Z, Yin Y B, Wang X. The research progress of commonly used antigen inactivating agents in animal vaccine[J]. Journal of Chinese Animal and Veterinary Sciences, 2010, 37(9): 162-167.
- [10] 卫龙兴,王福泉. 动物疫苗中灭活剂与佐剂的种类及其应用 [J]. 现代农业科技,2009,19:321-322.
- Wei L X, Wang F Q. The types of inactivating agent and adjuvant and its application in animal vaccine[J]. Journal of Modern Agricultural Science and Technology, 2009, 19: 321-322.
- [11] 张德礼,季 梁,李六金,等. 病毒疫苗制备用 8 株不同核型 VERO 细胞系在裸鼠体内致癌/致瘤性的系统实验研究 [J]. 遗传学报,2004,31(7):647-660.
- Zhang D L, Ji L, Li L J, *et al.* Systematically experimental investigation on carcinogenesis or tumorigenicity of VERO cell lines of different karyotypes in nude mice in vivo used for viral vaccine manufacture[J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(7): 647- 660.
- [12] 张德礼,李六金,夏耕田,等. 动物细胞系的染色体组型与遗传变异率分析[J]. 遗传学报,2001,28(4):327-344.
- Zhang D L, Li L J, Xia G T, *et al.* Analysis of karyotype and genetic variation rate of animal cell lines[J]. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(4): 327-344.
- [13] 张德礼,黄高升,李六金,等. 恶性横纹肌样瘤 MRT 的起源研究-高变异率细胞系致裸鼠产生 MRT 的实验研究[C]//2000 年中国博士后学术大会论文集:医药学与生物学分册,2000: 573-582.
- Zhang D L, Huang G S, Li L J, *et al.* Study on the origin of the malignant striated muscle tumor (MRT) - the experimental research on the MRT Caused by high mutation rate cell lines in nude mice [C]// Proceedings of Chinese post-doctoral academic conference in 2000: the archies of medicine and biology, 2000: 573-582.
- [14] 张德礼,黄高升,李六金,等. 恶性横纹肌样瘤(MRT)的起源研究-高变异率,HELA 细胞致裸鼠产生 MRT 的实验研究[J]. 遗传学报,2000,27(12):1057-1071.
- Zhang D L, Huang G S, Li L J, *et al.* Study on the origin of the malignant striated muscle tumor (MRT) - the experimental research on the MRT caused by high mutation rate cell lines in nude mice. [J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(12): 1057-1071.

(编辑:李文平)