

建鲤体内外急性肝损伤模型的建立

曹丽萍, 贾睿, 丁炜东, 杜金梁, 殷国俊*

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081)

摘要:以四氯化碳(CCl_4)为肝毒剂, 建立建鲤体内外急性肝损伤模型。体内, 采用腹腔注射法造模, 按 0.1 mL/10 g 一次性分别注射 0、6.25%、12.5% 和 15% CCl_4 -橄榄油溶液 (v/v), 于造模后 24~144 h 取血, 测定建鲤血清中谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和 丙二醛 (MDA) 水平; 体外, 0、2、4、8、16、32 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CCl_4 分别作用于原代培养建鲤肝细胞 4 h 后, 用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞生存状况, 同时收集细胞培养上清, 测定其 GPT、GOT、LDH、MDA、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 活力。结果显示, 12.5%、15% CCl_4 -橄榄油溶液腹腔注射建鲤 24 h 后即能引起血清中 GOT、GPT 和 MDA 显著升高, 15% CCl_4 溶液造模组 48 h 能显著提高血清中 LDH 水平, 4 个指标均在 CCl_4 作用 96 h 后恢复到接近正常水平; 8~32 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CCl_4 作用体外培养肝细胞 4 h 时, 细胞上清中 GPT、GOT、LDH 和 MDA 含量显著升高, SOD 和 GSH 活力显著下降, 肝细胞存活率显著下降, 分别为空白对照组的 66.29%、54% 和 37%, 且有剂量依赖性。结果表明, 分别采用 15% CCl_4 -橄榄油腹腔注射建鲤 72 h 和 8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CCl_4 作用体外培养肝细胞 4 h 可以构建体内外急性肝损伤模型。

关键词: 四氯化碳; 建鲤; 模型; MTT

中图分类号: S942

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)06-0885-05

Establishment of the acute hepatic injury model induced by CCl_4 in *Cyprinus carpio* var. *jian* *in vivo* and *in vitro*

CAO Li-ping, JIA Rui, DING Wei-dong, DU Jin-liang, YIN Guo-jun

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081)

Abstract: The present study aimed to develop acute liver injury models *in vivo* and *in vitro* using carbon tetrachloride (CCl_4) as hepatotoxicant to lay a foundation for screening and evaluating liver-protective drugs. *In vivo*, Jian carps were injected intraperitoneally with CCl_4 0.1 mL/10 g of body weight once and the blood samples were collected in 4 groups with concentrations (0, 6.25%, 12.5% and 15% CCl_4 in olive oil, v/v) and in different periods (24, 48, 72, 96 and 144 h). Glutamate oxalate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA) of serum were detected. *In vitro*, the hepatocytes were exposed to 6 concentrations of CCl_4 (0, 2, 4, 8, 16 and 32 mmol/L) for 4 h and the activities of GPT, GOT, LDH, MDA, superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in cell culture supernatant and the survival rate of the injured hepatocytes were determined. Results revealed the groups injected with 12.5% and 15% (v/v) of CCl_4 in olive oil at a volume of 0.1 mL/10 g of body weight for 24 h could significantly elevate the serum levels of GOT, GPT and MDA, and the group with 15% of CCl_4 for 48 h produced a significant effect in the case of LDH activities, but all four hepatic function markers were recovered to normal level at 96 h. Hepatocytes treated with CCl_4 at 8, 16 and 32 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ increased levels of GOT, GPT and MDA, suppressed SOD and GSH activities; meanwhile, significantly decreased cell viabilities (66.29%, 54% and 37%, respectively) compared to the control dose-dependently. Overall results proved the optimal damaged conditions of acute liver injury models induced by CCl_4 *in vivo* and *in vitro* were 15% CCl_4 0.1 mL/10 g.b.w for 72 h once intraperitoneally and 8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 4 h.

Key words: carbon tetrachloride; *Cyprinus carpio* var. *jian*; model; MTT

收稿日期: 2012-03-14

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2009DFA32620), 无锡市科技计划(国际科技合作)(CZE00906)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)项目(2011JBF005)共同资助。

作者简介: 曹丽萍, 女, 助理研究员。E-mail: caolp@ffrc.cn

* 通讯作者: 殷国俊, 男, 博士。E-mail: yingj@ffrc.cn

肝脏是鱼体内最大的实质器官,参与消化、代谢、排泄、解毒及免疫等多种生命活动,特别是胃肠吸收的物质,几乎全部进入肝脏,在肝内进行合成、分解、转化、贮存,因此鱼类肝脏最易受多种病原体、毒物及免疫病理所累及^[1-2];同时环境污染,高蛋白、高脂肪或霉变饲料的使用、抗生素和杀虫剂的滥用等因素也导致鱼类肝胆疾病频繁发生^[3]。大量研究证实在多种肝病的肝细胞损伤中,多种酶、自由基以及脂质过氧化反应均发生着较大的变化,氧化应激是它们的共同损伤机制^[4]。因此利用具有生物学活性的肝损伤模型,快速而高通量地筛选护肝药物并探索其作用原理具有重要意义,但是在水产上,鱼类保肝药物筛选模型的研究鲜有报道。

动物模型的建立方法有很多,如用四氯化碳(CCl₄)、异种蛋白、乙醇、二甲基亚硝胺、复合因素致肝纤维化模型等。其中CCl₄是最早、最广泛应用于实验性肝损伤动物模型的选择性肝毒性物质^[5],其成模率高,重复性好,易操作。因此,本研究采用CCl₄为肝毒剂,通过测定血清或细胞培养上清中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)含量以及肝细胞增殖活性,构建建鲤的体内外急性肝损伤模型,为进一步筛选、评价保肝药物奠定基础,同时也为有效防治鱼类肝胆综合症提供了解决的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 L-15培养基、HBSS(Hanks Balanced Saults)溶液、链霉素/青霉素(streptomycin/penicillin)和肝素(heparin)购于美国SIGMA公司;新生小牛血清(FCS)和细胞培养板购自于GIBCO公司;CCl₄(分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司;谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)等测定试剂盒购自于南京建成生物工程研究所科技有限公司。723分光光度计购自上海欣茂仪器有限公司。

1.1.2 实验鱼 建鲤来自中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场,体质健康无伤,6月龄,体重150g左右,饲养于循环水系统中,25℃,每天投喂商品饲料2次。

1.2 方法

1.2.1 CCl₄的配置 CCl₄用L-15培养基(含1% S/P, 0.2% heparin 和 15%FCS)配成 2、4、8、16、32

mmol·L⁻¹的浓度,0.1% DMSO(二甲基亚砷)助溶,0.22 μm 的过滤器过滤,备用。

1.2.2 建鲤肝细胞的分离^[6-7] 随机选取建鲤,MS-222麻醉后,去血。在超净台内,无菌剖取鲤鱼肝脏,取适量肝组织放至培养皿中,用HBSS溶液洗至白色。将肝组织切成1 mm³大小后,用5~10倍肝重体积的0.1%胰酶消化液消化30 min,待肝组织的细胞分散成单个或大量小细胞团时加入FCS终止消化。过100目筛,剩下的组织块可根据所需细胞数量对其进行再消化。将滤液转入离心管中,4℃,1 000 r·min⁻¹离心2 min,倒出上清液,用HBSS溶液清洗沉淀以除去消化液。沉淀悬浮后梯度离心,4℃,60 g 和 30 g 离心5 min。台盼蓝法进行细胞活性检测并计数,只有在活细胞数达到细胞总数的90%以上时,方可用于肝细胞损伤模型的构建和药理研究。L-15培养基(含1% S/P, 0.2% heparin 和 15%FCS)调整细胞浓度为10⁶/mL,接种到96孔板上,每孔100 μL,27℃培养24 h后,备用。

1.2.3 CCl₄致建鲤在体肝损伤模型的建立 健康建鲤,随即分为6组,每组20尾,隔食12 h后,称体重,按0.1 mL/10 g 分别一次性腹腔注射6.25%、12.5%、15%、18.75%和25% CCl₄-橄榄油溶液(v/v)、对照组给等体积橄榄油溶液造模。观察动物存活情况,于造模后24~144 h取血,测定建鲤血清中GPT、GOT、LDH 和 MDA 含量。如动物在实验中死亡,则不进行测定。

1.2.4 CCl₄致建鲤肝原代细胞损伤模型的建立 肝细胞96孔板培养24 h后,吸弃上清,待用细胞换用含浓度为2、4、8、16、32 mmol·L⁻¹ CCl₄的L-15培养基培养,每孔100 μL,每个浓度设4个重复;同时设空白对照组,纯L-15培养基培养,每孔100 μL,27℃培养4 h,收集细胞培养上清,测定其GOT、GPT、LDH、MDA、SOD 和 GSH 活力,同时测定各组细胞的存活率。

1.2.5 MTT 法检测细胞生长活力^[8] 收集上清后,将96孔细胞板移至离心机上350 g 离心10 min,倾去上清,每孔加100 μL 15% FCS-L-15 和 20 μL MTT, 27℃继续孵育4 h。倾去上清,每孔加150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解选择570 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。

细胞存活率按公式^[9]计算:细胞存活率=A₅₇₀(处理组)/A₅₇₀(对照组)×100%。

1.3 指标的测定及数据分析

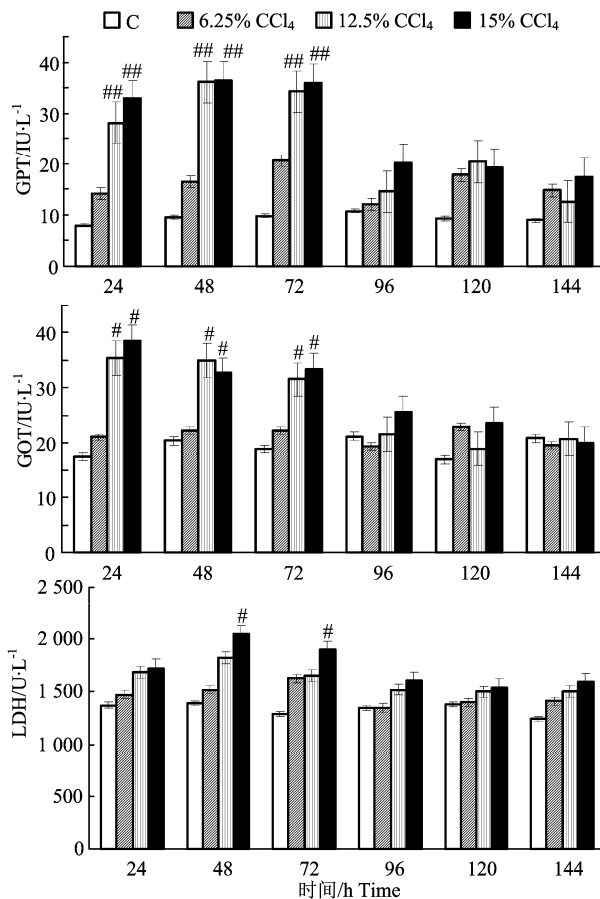
按照试剂盒操作说明测定GOT、GPT、LDH、

MDA、SOD 和 GSH, 试验数据用平均值±标准误表示, 数据分析采用 SPSS15 软件包中的单因素方差分析 (one-way-ANOVA) 处理, 对样本之间进行 *t* 检验。 *P* 值取 0.05 和 0.01。

2 结果与分析

2.1 CCl₄ 致建鲤在体肝损伤模型的建立

CCl₄-橄榄油溶液注射 24 h 后, 18.75% 和 25% CCl₄ 溶液造模组建鲤死亡率分别为 20% 和 50%, 其



Values are expressed as mean ± S.E.M. (*n* = 20). # *P* < 0.05; ## *P* < 0.01, compared with carps treated with control group only

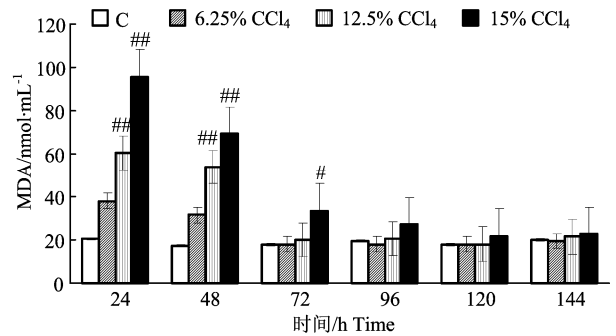
图 1 不同浓度 CCl₄ 在 24~144 h 内对建鲤血清中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和乳酸脱氢酶(LDH)影响

Figure 1 Effects of CCl₄ at different concentrations for 24-144 h on serum glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamate oxalate transaminase (GOT) and lactate dehydrogenase (LDH) of Jian carps

它浓度的造模组和对照组无死亡现象。6.25%、12.5% 和 15% CCl₄ 造模组及对对照组的建鲤血清中 GPT、GOT、LDH 和 MDA 含量测定结果见图 1 和 图 2。

2.1.1 不同浓度 CCl₄ 注射建鲤后 24~144 h 对建鲤血清 GPT、GOT 和 LDH 的影响 图 1-A、1-B 和 1-C 表明, 与对照组相比, 12.5% 和 15% CCl₄ 溶液造模

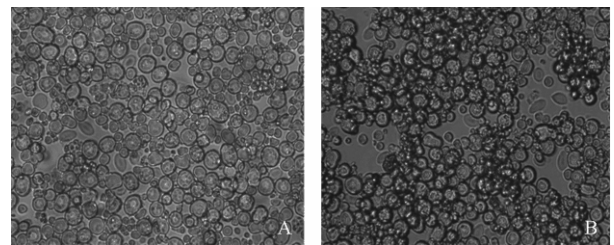
24 h 均能引起血清中 GPT 和 GOT 显著升高 (*P* < 0.01 或 *P* < 0.05); 仅 15% CCl₄ 溶液造模 48 h 引起血清中 LDH 显著升高 (*P* < 0.05), 其它浓度均无显著效果; CCl₄ 诱导的 GPT、GOT 和 LDH 水平升高均维持到造模后 72 h, 随后迅速恢复, 第 96 小时后, 恢复到接近正常水平。



Values are expressed as mean ± S.E.M. (*n* = 20). # *P* < 0.05; ## *P* < 0.01, compared with carps treated with control group only

图 2 不同浓度 CCl₄ 在 24~144 h 内对建鲤血清中丙二醛 (MDA) 的影响

Figure 2 Effects of CCl₄ at different concentration for 24-144 h on serum malondialdehyde (MDA) of Jian carps



A. 正常对照组 Normal control; B. 8 mmol·L⁻¹ CCl₄ 损伤 4 h 组 CCl₄ at 8 mmol·L⁻¹ injured for 4 h

图 3 离体肝细胞的形态观察 (×400)

Figure 3 Morphological observation of *Carassius auratus gibel* hepatocyte *in vitro* (×400)

2.1.2 不同浓度 CCl₄ 注射建鲤后 24~144 h 对建鲤血清 MDA 的影响 图 2 表明, 与对照组相比, 12.5% 和 15% CCl₄ 溶液造模 24 h 均能引起血清中 MDA 极显著升高 (*P* < 0.01); 其中 12.5% CCl₄ 溶液造模组中 MDA 水平在造模第 48 小时恢复, 而 15% CCl₄ 溶液造模组中 MDA 水平维持到第 72 小时, 第 96 小时后 MDA 值恢复到接近正常水平。

2.2 CCl₄ 致建鲤体外肝细胞损伤模型的建立

2.2.1 不同浓度 CCl₄ 对鲤鱼肝原代细胞培养上清液中生化指标的影响 如表 1 所示, 8~32 mmol·L⁻¹ CCl₄ 作用 4 h 后, 原代培养建鲤肝细胞上清液的 GOT、GPT、LDH 和 MDA 含量升高, SOD 和 GSH

水平下降,与对照组相比,差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且这种差异随着 CCl_4 作用浓度的上升而加剧。

2.2.2 不同浓度 CCl_4 对建鲤肝原代细胞存活率的影响 MTT 活性检测结果表明(表 2),空白对照组肝细胞形态大部分正常,细胞核清晰可见(图 3-A);各

浓度的 CCl_4 作用于肝细胞时均有不同程度的损伤,损伤程度呈现出剂量依赖性。8~32 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CCl_4 作用体外培养肝细胞 4 h 时,肝细胞存活率显著下降,分别为空白对照组的 66.29%(图 3-B)、54%和 37%,与对照组相比,差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 CCl_4 对建鲤肝原代细胞培养上清液中生化指标的影响

Table 1 Effects of CCl_4 at different concentrations on glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamate oxalate transaminase (GOT), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in cell culture supernatants of Jian carps

组别 Group	浓度 /mmol·L ⁻¹ Concentration	GOT /IU·L ⁻¹	GPT /IU·L ⁻¹	LDH /U·L ⁻¹	MDA /nmol·L ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	GSH /U·mL ⁻¹
Control	0	2.00±1.92	3.00±0.12	328.95±93.25	4.14±1.04	9.89±3.33	128.58±17.62
CCl_4	2	3.00±1.06	5.00±0.11	355.26±125.98	4.29±1.25	7.59±1.26	110.23±15.70
	4	5.00±1.76*	8.00±0.15*	625.00±123.96*	5.14±2.04	8.56±0.79	117.86±6.89
	8	9.00±0.79**	11.00±0.19*	657.89±48.13*	9.57±2.35**	6.88±1.08*	85.56±6.05*
	16	8.00±0.03**	21.00±1.52**	690.79±87.66*	9.14±1.98**	6.92±0.33*	91.07±8.18*
	32	8.00±0.11**	27.00±0.18**	914.47±112.94**	9.20±2.10**	4.52±1.54**	53.27±9.24**

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下同。

Note: Values are expressed as mean ± S.E.M. ($n = 4$). Compared to control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. The same below.

表 2 不同浓度 CCl_4 对建鲤肝原代细胞存活率的影响

Table 2 Effects of CCl_4 at different concentrations on cell viability in primary hepatocytes of Jian carps

空白对照组 Control	CCl_4 损伤组/mmol·L ⁻¹ Group injured by CCl_4				
	2	4	8	16	32
100.00±0.00	80.36±2.28	67.00±2.56	66.29±3.99*	54.00±1.98*	37.00±2.35**

3 讨论

CCl_4 可通过细胞色素 P450 作用分解为三氯甲烷自由基 ($\text{CCl}_3\cdot$)^[10], $\text{CCl}_3\cdot$ 既能选择性的损伤小叶中央区的肝细胞,又能迅速与 O_2 结合转化为过氧化三氯甲烷自由基 ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$)^[11], 这些自由基通过攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化,损伤肝细胞; CCl_4 同时能抑制内源性抗氧化酶(如 SOD)活性,致使大量自由基无法清除,加重脂质过氧化^[12], MDA 是脂质过氧化的主要降解产物^[13],可严重损伤肝细胞的结构,导致肝细胞坏死,进一步加重肝细胞的损伤,并阻断膜蛋白的合成,使胞浆内的可溶性酶渗出,导致血清中的 GOT、GPT 和 LDH 含量上升^[14-15]。因此,本研究选择 GOT、GPT、LDH、MDA 和 SOD 等相关生化指标作为肝(细胞)损伤的指标,进行体内外急性肝损伤模型的研究。

构建急性肝损伤模型来筛选保肝药物,造模剂量的选择是关键,既要肝损伤指标明显,又要求存活率高。剂量过小,损伤轻,指标变化不明显,不

利于分析保肝药药效;剂量过大,容易引起肝功能衰竭,导致死亡率增加,造成药品和动物的浪费且不利于统计分析^[16]。本研究在实际造模过程中发现依据鱼体重决定的注射剂量一次性给予太多会导致溶液泄漏,使得剂量不精准,同时大量的 CCl_4 油溶液将对建鲤腹腔内脏器造成损伤而导致急性肝坏死,增加死亡率;另外,在前期预实验中还发现,采用胸腔注射法造模极易导致鱼体死亡,而腹腔注射法可以有效降低由于操作失误导致的死亡率。本实验通过测定血清中 GOT、GPT、LDH、和 MDA 等生化指标,确定了 0.1mL/10 g 一次性腹腔注射 15% CCl_4 -橄榄油溶液为最佳 CCl_4 损伤剂量;在观察时间点的选择上,可以考虑注射后 72 h 左右的时间点,此时,血清中酶的变化最为明显。该体内急性肝损伤模型具有以下特点:一次性给药,剂量精准,操作简单;肝损伤指标明确;周期短,建鲤全部存活,可为保肝药物的筛选与疗效评估提供实验数据。

自从 Berry 及 Friend^[17]首次成功地利用含有胶原蛋白酶的生理溶液灌流肝脏,获得大量单个肝实

质细胞以来, 利用具有活力的肝细胞在试管内研究肝细胞的代谢及分泌功能已受到极大重视, 并正在迅速发展^[18]。本研究采用体外培养的原代建鲤肝细胞来构建体外肝损伤模型, 通过测定培养上清中 GOT、GPT、LDH、MDA、SOD 和 GSH 含量, 以及肝细胞存活率, 确定了 CCl₄ 诱导的肝细胞损伤模型以 8 mmol·L⁻¹ 作用 4 h 为宜。该体外急性肝损伤模型最大限度的克服了个体差异, 具有很强的特异性; 另外本模型的可控性强, 易于重复, 用药少, 耗时短, 便于大量保肝药物的初筛。但由于细胞经过分离和培养, 其膜表面结构、酶活性等与活体细胞可能存在差异, 因此有一定的局限性, 须和体内模型结合起来, 互相补充。

参考文献:

- [1] Arnold H, Pluta H J, Braunbeck T. Sublethal effects of prolonged exposure to disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cytological alterations in the liver by a potent acetylcholine esterase inhibitor [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1996, 34 (1): 43-55.
- [2] Moutou K, Braunbeck T, Houlihan D. Quantitative analysis of alterations in liver ultrastructure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after administration of the aquaculture antibacterials oxolinic acid and flumequine[J]. *Diseases of aquatic organisms*, 1997, 29: 21-34.
- [3] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (7): 1137-1144.
- [4] 王小莺, 胡国良, 张彩英, 等. 保肝护脾液对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中兽医学杂志*, 2006(2): 10-11.
- [5] Koneri R, Balaraman R, Firodous K M V. Hepatoprotective effects of *Momordica Cymbalaria* Fenzl. against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats [J]. *Pharmacology online*, 2008, 1: 365-374.
- [6] 李效宇, 刘永定, 宋立荣. 鲢、鲤和鲫肝细胞原代培养[J]. *水生生物学报*, 2001, 25(4): 420-421.
- [7] 贾睿, 曹丽萍, 丁炜东, 等. 鲫鱼肝细胞分离与原代培养方法的优化[J]. *华北农学报*, 2011, 26(12): 1-8.
- [8] 郑永唐, 贲昆仑. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J]. *免疫学杂志*, 1992, 8(4): 266-269.
- [9] Brain S D, Williams T J, Tippins J R, et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator[J]. *Nature*, 1985, 313: 54-56.
- [10] Recknagel R O, Glende J R E, Dolak J, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1989, 43 (1): 139-154.
- [11] Mitra S, Venkataranganna M, Sundaram R, et al. Effect of HD-03, a herbal formulation, on the antioxidant defence system in rats [J]. *Phytotherapy Research*, 1998, 12 (2): 114-117.
- [12] Zhou J F, Cai D, Zhu Y G, et al. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic cholecystitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 501-507.
- [13] Ohta Y, Sasaki E, Nishida K, et al. Contribution of the antilipid peroxidative action of Dai-saiko-to extract to its preventive effect on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats [J]. *Phytotherapy Research*, 1998, 12: 5-8.
- [14] Berry M N, Halls H J, Grivell M B. Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspensions [J]. *Life Sciences*, 1992, 51(1):1-16.
- [15] Romero F J, Bosch-Morell F, Romero M J, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106 (Suppl 5): 1229-1234.
- [16] 刘霞, 王泰龄, 赵静波, 等. D-半乳糖胺致大鼠急性肝损伤模型制作的改进[J]. *中日友好医院学报*, 1996, 10(4): 305-308.
- [17] Berry M N, Friend D S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells [J]. *J Cell Biol*, 1969, 43: 506-520.
- [18] McGowan J A, Strain A J, Bucher N R. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP [J]. *Cellular Physiology*, 1981, 108(3): 353-363.