

LPS 诱导奶牛子宫内膜上皮细胞炎症损伤模型的建立

陈佳佳 (北京农业职业学院, 北京, 102442)

摘要 采用 LPS 诱导子宫内膜上皮细胞炎症模型, 通过研究细胞因子 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达验证模型, 为进一步对子宫内膜炎发病机理的研究和治疗药物疗效的评价奠定基础。经组织块原代培养和胰酶纯化分离得到奶牛子宫内膜上皮细胞, 并通过免疫组化鉴定细胞纯度。采用 0、10、30、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 分别在 3、6、9、12、18 h 刺激纯化后的子宫内膜上皮细胞, 采用 MTT 法筛选出最佳刺激浓度时间为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12 h, 然后以最佳刺激浓度刺激子宫内膜上皮细胞, 在 12 h 后收集细胞, 最后通过荧光定量 RT-PCR 检测 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达差异性。

关键词 奶牛子宫内膜炎; 子宫内膜上皮细胞; 细胞因子

中图分类号 S858.23 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)15-0105-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.15.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment of Inflammatory Injury Model of Endometrial Epithelial Cells Induced by LPS in Cows

CHEN Jia-jia (Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442)

Abstract The model of endometrial epithelial cell inflammation induced by LPS was used to study the expression of IL-1 β , TNF- α mRNA, and lay the foundation for further pathogenesis of meningitis in utero treatment of research and evaluation of drug efficacy. Bovine endometrial epithelial cells (BEEC) were obtained and purified from cow uterus with primary cultured tissue explant and trypsin, and identified by immunohist chemistry. We used 0, 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations of LPS, respectively, after 3, 6, 9, 12 h to stimulate purified endometrial epithelial cells, the results showed that the best stimulation concentration and time screened out by MTT method were 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LPS) and 12 h respectively. BEEC were stimulated with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 12 h, and the cells were collected and fluorescence quantitative RT-PCR was made in order to detect the mRNA expression differences of IL-1 β , TNF- α .

Key words Cow endometritis; Endometrial epithelial cells (BEEC); Cytokines

子宫是胚胎附植和孕育胎儿的场所。子宫壁由内膜、肌层和浆膜层构成。子宫内膜是激素作用的靶组织, 在生殖生理研究中占据重要地位。哺乳动物的子宫内膜由上皮和固有层构成。正常情况下, 子宫内膜上皮细胞和基质细胞受卵巢激素的调节发生周期性变化。奶牛分娩会对奶牛子宫内膜上皮细胞产生机械性损伤^[1], 然而子宫复旧尚未完全, 病原菌的污染会导致奶牛子宫内膜炎。病原微生物可引起子宫内膜上皮细胞发生一系列的病理解剖学变化, 包括核染色质凝聚趋边、核膜断裂、内质网肿胀、线粒体肿胀变形^[2]。在急性卡他性和化脓性子宫内膜炎中, 患牛子宫内膜上皮细胞呈现不同程度的变性、坏死^[3]。王洪海等^[4]报道, 对产后 6~10 d 的健康牛和急性子宫内膜患牛子宫内膜超微结构观察发现子宫内膜炎患牛相当对照组子宫内膜局部严重脱落, 上皮细胞和基质细胞大量破损^[4]。

在奶牛子宫内膜炎致病菌中, 大肠杆菌等革兰氏阴性菌占有很大比例。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 由类脂 A、非特异性核心多糖和 O 抗原 3 部分组成, 其中类脂 A 是“毒力中心”^[5]。当细菌死亡溶解或人工破坏菌细胞后释放, 又称内毒素。脂多糖作为介导革兰氏阴性菌脓毒症的重要启动因子, 通过与其受体及其调节蛋白的结合, 从而诱导机体多种细胞因子、炎性介质的合成和释放, 触发机体一系列生理过程^[6]。笔者采用 MTT 法检测 LPS 对奶牛子宫内膜上皮细胞 (bovine endometrial epithelial cells, BEEC) 细胞的增殖变化, 建立奶牛子宫内膜上皮

细胞炎症损伤模型, 并通过检测 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平验证模型, 旨在为进一步探讨 LPS 诱导 BEEC 细胞炎症损伤机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞来源。奶牛子宫内膜上皮细胞, 原代组织培养第 3~4 代。

1.1.2 仪器。倒置生物显微镜(日本 OLYMPUS, IX71/IX2); 二氧化碳培养箱(日本 SANYO, MCO-18AIC); 酶标仪(美国 BIORAD, 680 型); 核酸浓度测定仪(德国 Eppendorf 公司); 荧光定量 PCR 仪(美国 STRATAGENE, MX3005P)。

1.1.3 试剂。胎牛血清(美国 GIBCO, 批号 8199549); DMEM/F12+GlutaMAX 培养基(美国 GIBCO, 批号 1354752); O55:B5 脂多糖(Sigma 公司, L2880) 牛角蛋白免疫组化试剂盒(上海研卉生物公司); DAB Kit(北京中杉金桥生物公司); M- mLV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、dNTP(Promega 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 奶牛子宫内膜上皮细胞的原代培养及分离纯化。

1.2.1.1 试验动物取样。从屠宰场选取临床正常, 产后复旧完全的荷斯坦奶牛的子宫, 30 min 内结扎分离 2 个子宫角。用无菌生理盐水(添加 400 IU/mL 青霉素, 链霉素)保存, 置于冰盒, 1 h 内送入实验室。

1.2.1.2 奶牛子宫内膜细胞的原代培养: 组织块培养法。在超净工作台上, 用剪刀剪开子宫角中段的侧壁, 暴露子宫腔; 随后将子宫内膜小心从子宫肌层上剥离下来, 注意将肌层组织剥离干净, 并放入平皿中。用添加双抗的 PBS 反复冲

洗组织块,直至冲洗液变清亮为止。用弯头手术剪反复剪切子宫内膜至1 mm 3小块为止,离心弃去上清,加入新的培养液,吸取若干组织块,放入培养瓶中;小块相互距离以0.5 cm为宜。翻转培养瓶,置于CO₂细胞培养箱培养2~3 h后;向培养瓶中注入少量细胞培养液(DMEM/F12GlutaMAX+10% FBS+双抗),慢慢将培养瓶翻转,置细胞培养箱中培养,24 h后补加少量细胞培养液。每天显微镜下观察细胞游出情况,每隔1天换液1次。

1.2.1.3 细胞计数及活力测定。胰酶消化贴壁细胞,制备单细胞悬液,取0.1 mL 10倍稀释。将稀释后的细胞悬液与0.3%台盼蓝溶液以9:1混合均匀,滴在细胞计数板上,在3 min内,低倍镜下用细胞计数器分别记录活细胞(无色透明)和死细胞(蓝色)数量,按照以下公式计算细胞浓度和细胞活力:

细胞浓度=(4个大方格内活细胞总数/4)×10⁴×稀释倍数 (1)

活细胞率=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数)×100% (2)

1.2.1.4 奶牛子宫内膜上皮细胞的分离纯化。当组织培养8~9 d后,子宫内膜细胞呈单层铺开,用枪头小心地将组织块吹下并从培养瓶里弃去,用无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS洗涤细胞2次,向25 mL细胞瓶里加入37℃预热的0.25%的胰蛋白酶溶液0.5 mL,水平晃动细胞培养瓶消化3~5 min,在倒置显微镜下观察到大多数基质细胞变圆脱壁时,用PBS漂洗以除去基质细胞,随后加入1 mL的0.25%的胰酶-EDTA消化2~3 min,用细胞培养液终止反应,轻轻吹打细胞瓶内壁,15 mL离心管收集细胞悬液,1 000 r/min下离心5 min,弃上清,加入细胞培养液,细胞计数和细胞活力计算后,按细胞浓度10⁵个/mL接种于细胞培养瓶中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.2.2 奶牛子宫内膜上皮细胞的鉴定。角蛋白是上皮细胞膜上的特异性蛋白,通过免疫组化法来检测细胞膜上角蛋白的表达,从而判断细胞纯化程度。经分离纯化后,得到纯度较高的上皮细胞,当融合率达到90%以上,用0.25%的胰酶-EDTA消化,传代在6孔板中,孔板中放置高压处理好的盖玻片进行细胞爬片培养。细胞生长汇合后,弃去培养液,PBS洗涤3次。4%的多聚甲醛固定15~30 min;空气干燥5 min,用眼科镊小心取出盖玻片,注意玻片正反面。PBS洗涤2次。0.5%Triton X-100(DPBS配)孵育1次20 min。PBS清洗标本3次各2 min。加入3% H₂O₂浸泡10 min,除去内源性的过氧化氢酶,PBS冲洗3次;加入3% H₂O₂浸泡10 min,除去内源性的过氧化氢酶,PBS冲洗3次;将切片放入0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉中蒸煮3 min,进行抗原修复,PBS冲洗3次;加入1滴山羊血清进行抗原修复,37℃孵育15 min;加入1滴1:100倍稀释的一抗,37℃孵育45 min,PBS冲洗5次;加入1滴生物素标记的羊抗兔IgG(二抗),37℃孵育30 min,PBS冲洗5次;DAB显色(避光,镜下观察至棕色);苏木精复染10 min,冲洗;封片,拍照。

1.2.3 MTT筛选LPS作用浓度时间。胰酶-EDTA消化并

收集BEEC,台盼兰染色细胞计数,调整细胞浓度为1×10⁵ cell/mL,加入200 μL/well细胞悬液于96孔细胞培养板,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞80%汇合后,吸取上清,PBS洗2遍后,分别加入0、10、30、50、100 μg/mL的LPS(用不含血清的无色培养基配置),分别在培养3、6、9、12、18 h后每孔加入10 μL MTT(5 mg/mL,PBS溶解,用孔径0.22 mm滤膜过滤),4 h后弃掉培养液,加入100 μL DMSO,振荡混匀,使用酶标仪于490 nm波长处测定各孔的吸光值(OD)。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{LPS组的OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.4 RT-PCR检测LPS对BEEC细胞因子基因水平表达的影响。常规培养细胞,经传代3次以上,当IEC-6细胞融合率在95%以上时,用0.25%的胰酶-EDTA消化后加含15%的血清的DMEM/F12GlutaMAX完全培养液。常规培养1 d后,处理前用无钙镁PBS洗2次。

BEEC细胞分为对照组、模型组且设定3、6、9、12 h 4个时间点。对照组,用DMEM/F12GlutaMAX培养;模型组,先用DMEM/F12GlutaMAX培养2 h后,用DMEM/F12GlutaMAX配制的30 μg/mL的LPS培养3、6、9、12 h。选取3~5代纯化后的BEEC,传代于六孔板中,细胞培养箱中培养,按试验分组的要求处理细胞。细胞处理完成后,弃去培养液,用无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS洗涤2次,加入1 mL预冷的Trizol,充分吹打使裂解完全,室温放置反应5~10 min。提取RNA,加入0.1% DEPC水20~30 μL,用枪头缓慢吹吸或离心,使RNA溶解混匀,-80℃下保存备用。吸取1 μL使用核酸测定仪检测RNA浓度,使用RNA反转录两步法合成cDNA。

根据GenBank数据库公布的牛待测基因序列,使用Primer premier 5.0和Oligo6.0软件在其相对保守区域设计基因的特异性上下游引物,并由上海生工生物工程公司合成。引物序列见表1。引物开盖前应先离心,慢慢打开,以防干粉状引物散失,按照说明书要求加适量灭菌处理过的DEPC水溶解,关闭管盖,充分振荡5~10 min,配成100 μmol/L的贮存液,分装后-20℃下保存。

表1 炎症细胞因子引物序列

Table 1 The primer sequences of inflammatory cytokines

引物名称 Primer name	序列 Sequence	产物大小 Product size//bp
ACTB	正向引物为5'-CAGAAGGACTCGTACGTGGG-3'; 反向引物为5'-TTGGCCTTGGGGTTCAGGG-3'	199
IL-1β	正向引物为5'-CTTCATTGCCAGTTTCTG-3'; 反向引物为5'-CAGGTGTTGGATGCACTCT-3'	141
TNF-α	正向引物为5'-ACGGGCTTACCTCATCTACTC-3'; 反向引物为5'-GCTCTTGATGGCAGACAGG-3'	140

RT-PCR反应体系如下:1.000 μL cDNA,1.000 μL上游引物,1.000 μL下游引物,12.500 μL Brilliant SYBR Green QPCR master Mix,0.375 μL ROX,9.125 μL DEPC水。

RT-PCR反应条件如下:95℃预变性10 min;95℃变性

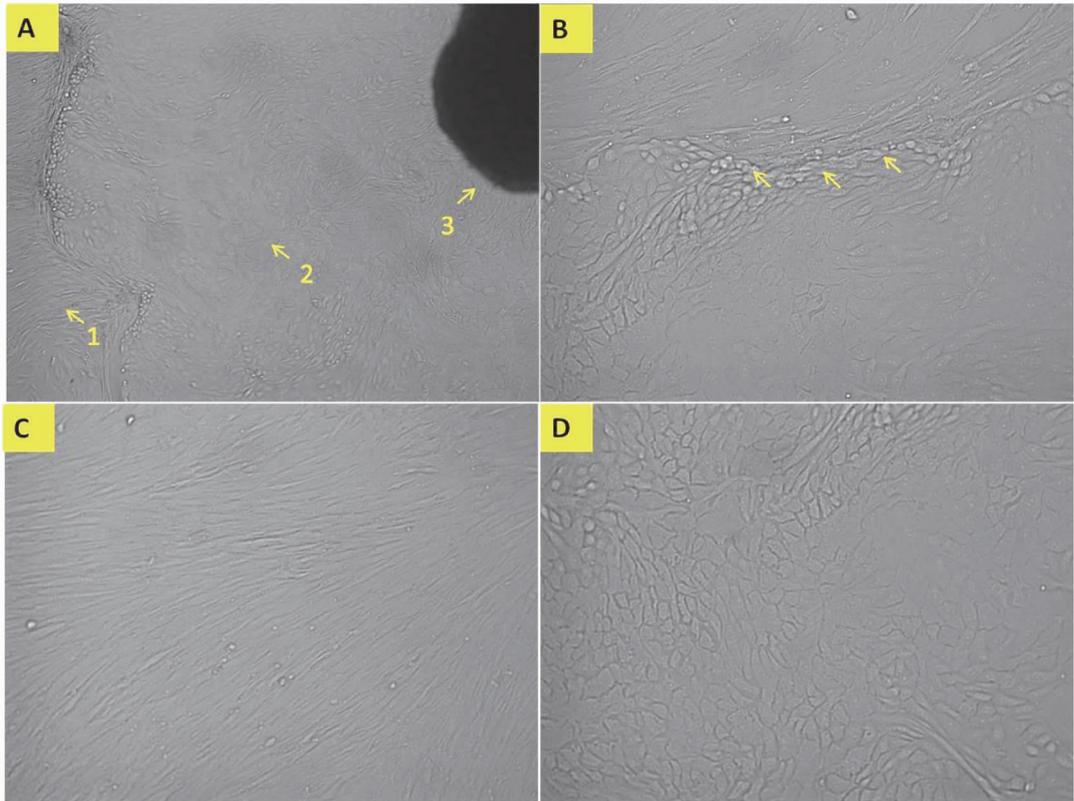
30 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环。溶解曲线条件如下: 95 °C 1 min; 55 °C 30 s; 95 °C 30 s。每个样本至少重复 3 次独立的 Real-time PCR 全过程。

1.2.5 数据统计与分析。使用 SPSS 11.5 统计软件对试验数据进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 组织块法培养的 BEEC 和 BESC 组织培养后一般在第 4 天左右开始出现组织块边缘变圆, 基质细胞呈梭形从组

织块周围溢出, 形成“细胞晕”, 在第 7 天呈铺石状的上皮细胞游出, 如图 1A 所示; 随着培养时间的延长, BESC 分裂增殖, 细胞连接成束, 平行排列; BEEC 呈多边形, 以团块形式生长, 细胞连接紧密, BESC 可抑制 BEEC 延伸生长; 如图 1B 所示, 箭头所指为 2 种细胞生长的交界处; 当细胞晕圈宽度是组织块的半径的 1~2 倍, 适合分离纯化和传代。图 1C 为纯化后的奶牛子宫内膜基质细胞。图 1D 为纯化后的奶牛子宫内膜上皮细胞。



注: A. 100×; 1. BESC; 2. BEEC; 3. 组织块; B. 200×; C. BESC (200×); D. BEEC (200×)

Note: A. 100×; 1. BESC; 2. BEEC; 3. Tissue block; ; B. 200×; C. BESC (200×); D. BEEC (200×)

图 1 BEEC 和 BESC 细胞形态比较

Fig. 1 The cell morphology comparison between BEEC and BESC

2.2 免疫组化鉴定 BEEC 纯化分离后的奶牛子宫内膜上皮细胞经免疫组化法检测角蛋白的表达, 如图 2 所示, 上皮细胞的细胞质呈红棕色, 角蛋白表达呈阳性, 初步估算上皮细胞纯度达 95%。

2.3 MTT 筛选 LPS 作用浓度和刺激时间 如图 3 所示, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 作用 12 h 后, BEEC 活力显著下降 ($P < 0.05$); 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 作用 12、18 h 后, BEEC 活力极显著下降 ($P < 0.01$); 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 作用 9 h 后, 细胞活力显著下降 ($P < 0.05$), 作用 12、18 h 可以极显著抑制 BEEC 活力 ($P < 0.01$)。

筛选结果表明, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 作用 12 h 后 BEEC 活力显著下降 ($P < 0.05$), 并且随着时间的延长, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及其以上的浓度刺激细胞导致细胞活力极显著下降 ($P < 0.01$), 故当 LPS 浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 BEEC 12 h 时细胞活力形成明显拐点, 3 次重复试验结果一致, 选定该条件作为最佳作用时间浓度。

2.4 RT-PCR 检测 LPS 对奶牛子宫内膜上皮细胞因子 IL-1 β mRNA 表达的影响 由图 4 可知, 与对照组相比, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 作用子宫内膜上皮细胞 3、6、9、12 h IL-1 β 的表达量均极显著上升 ($P < 0.01$)。

2.5 RT-PCR 检测 LPS 对奶牛子宫内膜上皮细胞因子 TNF- α mRNA 表达的影响 由图 5 可知, 与对照组相比, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 作用子宫内膜上皮细胞 3、6、9、12 h TNF- α 的表达量极显著上升 ($P < 0.01$)。

3 讨论

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的组成成分, 是引起炎症反应的关键介质之一。奶牛子宫内膜是机体抵抗侵入物的第一道防线, 子宫内膜上皮细胞在阻止子宫免受感染中扮演重要的角色。因此, 奶牛子宫内膜上皮细胞被广泛用于奶牛子宫生殖生理或病理以及分子基因和蛋白水平发生发展机制的研究。为了保证细胞性状的稳

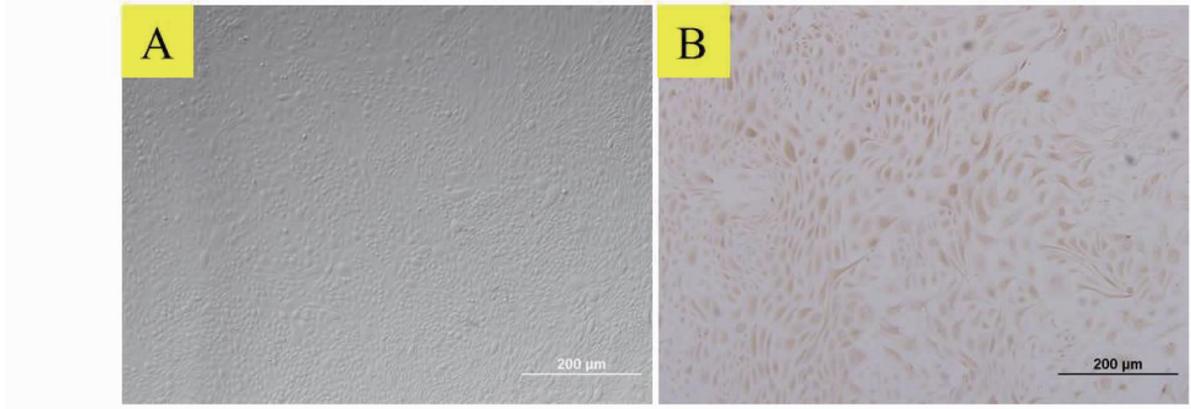
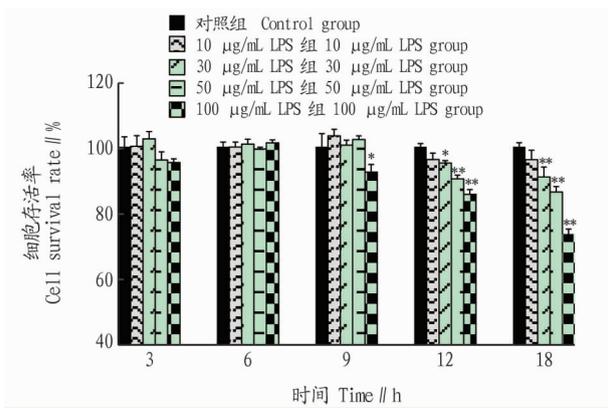


图2 角蛋白鉴定BEEC细胞

Fig. 2 The verification of BEEC by using keratin

定性,避免细胞因多次传代而老化,故选用体外原代培养3~4代纯度较高的奶牛子宫内膜上皮细胞(bovine endometrial epithelial cells, BEEC)用于体外研究的细胞模型。通过LPS对细胞进行不同浓度和时间的刺激,探讨LPS对BEEC细胞增殖能力、形态学损伤的影响,以此作为建立并评价BEEC细胞体外炎性损伤模型,进一步用于后续实验研究。

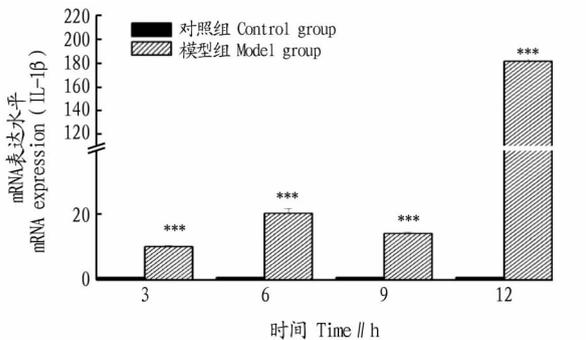


注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

Note: * indicated $P < 0.05$, ** indicated $P < 0.01$

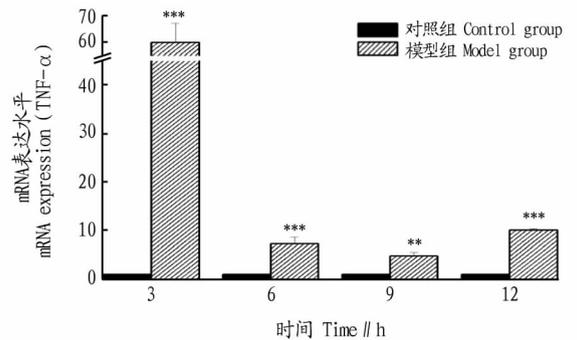
图3 不同时间和LPS浓度下细胞活力的变化

Fig. 3 The cell viability changes at different time and LPS concentrations



注: *** 表示 $P < 0.001$

Note: *** indicated $P < 0.001$

图4 IL-1 β mRNA表达水平的变化Fig. 4 The changes of IL-1 β mRNA expression level

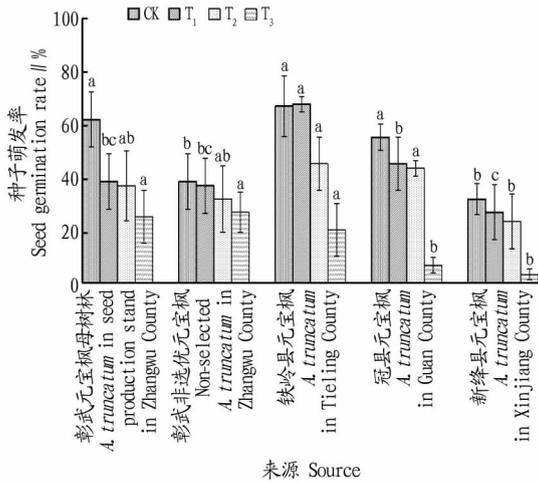
注: ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$

Note: ** indicated $P < 0.01$, *** indicated $P < 0.001$

图5 TNF- α mRNA表达水平的变化Fig. 5 The changes of TNF- α mRNA expression level

MTT法作为检测细胞增殖的经典方法,灵敏度高,特异性强,结果稳定、可靠,且操作快速、简便^[7-9]。该研究中采用不含血清的无色培养基配置LPS,从而既避免了血清对LPS的干扰,也避免了一般培养液中酚红成分对吸光度的干扰。查阅相关文献后,经过预试验筛选后,选取0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度和0~24 h作用时间的范围内继续筛选模型条件。结果表明,在6 h内,LPS作用剂量100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内,对奶牛子宫内膜上皮细胞的增殖不会产生明显的抑制作用,9 h时100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS对BEEC活力显著下降($P < 0.05$),12 h时30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS可以显著抑制BEEC活力($P < 0.05$),30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上浓度的LPS刺激时间达12 h以上可以极显著抑制细胞活力($P < 0.01$),结合LPS在体内所能达到最高浓度的考虑,故选取30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12 h作为LPS诱导BEEC炎性损伤模型条件。这与之前报道的小鼠子宫内膜细胞体外炎症模型所用的LPS浓度为100 ng/mL 差异较大,可见该炎症模型中细胞不同,LPS作用浓度和时间差距较大^[10]。在一定程度上验证了张桂林等关于10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS对奶牛子宫内膜上皮细胞有不同程度的抑制作用且LPS作用呈浓度和时间依赖性的报道^[11]。倒置显微镜下观察BEEC形态学变化,30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS作用BEEC 12 h,细胞一定程度的

(下转第118页)



注:不同字母表示同一处理不同产地种子萌发率差异显著($P < 0.05$)
 Note: Different letters indicated that the germination rate of seeds from different origins in the same treatment is significantly different ($P < 0.05$)

图1 不同处理下种子萌发率

Fig. 1 Seed germination rate under different treatments

时比较抗旱。

彰武县位于辽宁省西北部,科尔沁沙地南部,属亚湿润干旱区,气候主要特点干旱多风,特别是北部沙区(阿尔乡

(上接第108页)

损伤,镜下观察细胞形态发现,与对照组相比模型组细胞形态学变化明显,细胞隆起,部分细胞皱缩脱落。

LPS 经脂多糖结合蛋白(LBP)/CD14 的识别与调控后,形成 LPS-LBP 复合物,与细胞表面的 CD14/TLRs 受体结合,通过细胞信号传导将信号到细胞核,激活 NF- κ B,进而调控炎症网络分子的基因转录与表达。NF- κ B 活化后可以诱导 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的基因转录,使其产生和分泌增多,其正反馈效应可进一步激活 NF- κ B,进而调控 IL-6、IL-8 的产生和释放^[12]。NF- κ B 活化的同时,使 I κ B α 、P105 等抑制基因的转录上调。IL-1 β 可激活巨噬细胞、T 细胞、B 细胞和信号级联反应,诱导环氧化酶-2(COX-2)和发热反应,介导炎症反应,造成组织损伤^[13]。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)因最初发现其能使肿瘤组织细胞发生出血性坏死而得名,包括 TNF- α 和 TNF- β 两类。TNF- α 主要是由活化的单核-巨噬细胞、上皮细胞等多种细胞产生,可激活巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等功能,导致 IL-1、IL-6 等炎性介质的分泌,促进组织炎症反应的进程^[14]。利用 30 μ g/mL LPS 刺激后 RT-PCR 检测 IL-1 β mRNA 表达水平显著上升, TNF- α mRNA 表达水平显著下降,说明 LPS 能启动细胞内信号传导系统,引起 IL-1 β 、TNF- α 等炎症相关细胞因子的合成释放,从而导致奶牛子宫内膜细胞的损伤。因此, LPS 浓度 30 μ g/mL,刺激时间 12 h 作为奶牛子宫内膜上

镇、章古台镇、四合城镇和大德乡)春季风大且多,生存环境比较恶劣^[11-12]。从试验结果看,彰武元宝枫母树林种子颗粒饱满,种子重量较大,发芽时间整齐,发芽时比较抗旱这些优良的特性,就是这些生长良好的百年以上树木为适应当地恶劣环境进化而来的。彰武元宝枫母树林种子是优秀的元宝枫种源。

参考文献

- [1] 王性炎. 中国元宝枫[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2013.
- [2] 庞晓莉,司辉清,王海燕. 元宝枫叶主要生化成分的季节变化[J]. 食品工业科技,2010,31(8):147-148,159.
- [3] 吴卫中,李璐,许捷. 元宝枫化学成分的研究概况[J]. 中国药事,2008,22(7):603-609.
- [4] 王性炎,王妹清. 神经酸新资源——元宝枫油[J]. 中国油脂,2005,30(9):62-64.
- [5] 魏伊楚,樊金拴,李娟娟,等. 不同产地元宝枫种仁油脂含量及脂肪酸成分研究[J]. 中国粮油学报,2018,33(12):69-73.
- [6] 魏明,廖成华. 绵阳元宝枫种仁油脂成分分析研究[J]. 食品工业科技,2011,32(2):127-128.
- [7] 乔谦,司芬芬,叶美静,等. 元宝枫种子含油率与脂肪酸组多样性分析研究[J]. 中国粮油学报,2018,33(4):56-63.
- [8] 任满田,金彦丽. 元宝枫育苗技术[J]. 山西林业,1999(1):16-17.
- [9] 田野,张松山,桑景拴. 中原地区五角枫的培育技术[J]. 中国园艺文摘,2010(6):104-105.
- [10] 高澜. 元宝枫播种育苗技术[J]. 山西林业,2018(2):28-29.
- [11] 梁强,周德,韩璐,等. 辽宁省彰武县北部不同利用模式风沙土的养分特征[J]. 安徽农业科学,2007,35(8):2330-2331.
- [12] 张建国,孙宝利,舒海燕. 辽宁省彰武县 1953-2010 年气候变化特征分析[J]. 干旱区资源与环境,2012,26(8):148-152.

皮细胞体外炎症损伤模型建立条件。

参考文献

- [1] 何剑斌,丛霞,刘明春,等. 奶牛产后子宫组织超微结构变化的研究[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(4):409-415.
- [2] 李德军,郭定宗,裴小英. NO 与子宫内膜炎奶牛子宫形态结构变化的关系[J]. 中国兽医学报,2010,30(5):681-684.
- [3] 刘绪川,王宇一,张国伟,等. 奶牛子宫内膜炎临床病理学诊断方法的研究[J]. 中国农业科学,1993,26(3):7-13.
- [4] 王洪海,王国卿,张乃生,等. 子宫内膜炎奶牛子宫内膜的超微结构观察[J]. 中国兽医学报,2011,41(1):75-78.
- [5] 唐虹,刘群,孙国德. 内毒素及内毒素血症治疗研究进展[J]. 医学综述,2005,11(2):109-111.
- [6] 孙杰,徐建国. 内毒素在体内信号转导的研究进展[J]. 临床麻醉学杂志,2003,19(6):381-383.
- [7] 陆艳. MTT 法测定肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[J]. 医药导报,2010,29(8):1002-1005.
- [8] 耿梅,马韬,叶正宝,等. 体外药物敏感性试验指导下腹腔化疗的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(6):460-463.
- [9] 姜浩,曹建国,杨林,等. 琼脂培养 MTT 法测定肺癌和卵巢癌药物敏感性的临床评价[J]. 湖南医学,2001(6):414-416.
- [10] 杨倩,史万玉,赵驻军,等. 小鼠子宫内膜炎细胞炎症模型的建立[J]. 河北农业大学学报,2011,34(6):87-90.
- [11] 张桂林,高好敏,崔晓妮,等. 脂多糖对奶牛子宫内皮炎上皮细胞毒性作用研究[J]. 中国奶牛,2011(6):1-3.
- [12] 韩涛,邓勇,樊海宁. 脓毒症与细胞因子研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(7):116-119.
- [13] LAVEDA R, MARTINEZ J, MUNOZ C, et al. Different profile of cytokine synthesis according to the severity of acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(34):5309-5313.
- [14] SAUNDERS B M, BRISCOE H, BRITTON W J. T cell-derived tumour necrosis factor is essential, but not sufficient, for protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137(2):279-287.