

## 荧光素酶标记转基因人胚胎干细胞的活体观察

蔡柳洪<sup>1</sup>, 周灿权<sup>2</sup>, 张 滨<sup>1</sup>

(中山大学 1. 附属第三医院不育与性医学科, 广东 广州 510630; 2. 附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】研究荧光素酶作为报告基因在活体定量和定位监测转基因人胚胎干细胞移植的动向的可行性。【方法】酶切 pGL3 base 质粒获得荧光素酶基因, 酶切 LTBR-uGIP 获得载体骨架, 连接荧光素酶基因和载体骨架构建慢病毒载体 pULP, 按照常规方法包装和扩增。ULP 转导 293T 细胞以检测其荧光素酶的表达。人胚胎干细胞 H9 (P40) 以 W3R 细胞为饲养层常规培养, 人胚胎干细胞转导 iDuet101-IDO (吲哚胺 2, 3 双氧化酶, IDO) 或 iDuet101-CTLA4Ig (细胞毒性 T 细胞相关分子 4 免疫球蛋白, CTLA4Ig), 经过筛选后再次转导 ULP, 即 iDuet101-ULP (有荧光素酶表达)、iDuet 101-CTLA4Ig-ULP (有荧光素酶和 CTLA4Ig 表达), iDuet101-IDO-ULP (有荧光素酶和 IDO 表达)。经过 2 次转导的 3 组人胚胎干细胞分别移植于 5 只 BALB/C 小鼠 (实验组, 共 15 只) 和 2 只 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> 小鼠 (对照组, 共 6 只), 在注射后当日、3、5、7、14、21 d 和 28 d 检测荧光素酶信号。【结果】在体外最少 22 000 个两次转导外源基因的人胚胎干细胞可检测到荧光信号。异种移植只需要  $5 \times 10^6$  的细胞即可检测到荧光信号, iDuet 101-CTLA4Ig-ULP 组与 iDuet101-IDO-ULP 组 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> 小鼠在移植后荧光信号逐渐增强, 观察期间逐渐上升到  $3 \times 10^7$  电子和  $1.5 \times 10^7$  电子, iDuet101-ULP 组两只 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> 小鼠在移植后第 7 天因伤口感染退出实验。3 组 BALB/C 小鼠在第 7 天荧光信号消失, 直到移植后两个月信号没有恢复。【结论】构建慢病毒载体共表达抗生素抗性基因和目的基因, 结合 W3R 细胞作为饲养层细胞以筛选细胞保证外源基因的表达。在细胞移植免疫缺陷小鼠后, 荧光素酶基因可用于活体定量和定位监测转基因人胚胎干细胞移植的动向。

**关键词:** 荧光素酶; 报告基因; 人胚胎干细胞; 异种移植; 转基因

中图分类号: R392.4 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)02-0174-05

### Viviperception of Transgenic Human Embryonic Stem Cells Labeled by Luciferase

CAI Liu-hong<sup>1</sup>, ZHOU Can-quan<sup>2</sup>, ZHANG Bin<sup>1</sup>

(1. Department of Infertility and Sexual Medicine, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the feasibility of luciferase as a reporter gene in quantitative and located monitoring the trend of transgenic human embryonic stem cells after xenotransplantation in vivo. 【Methods】 Digested plasmid pGL3-base obtained luciferase gene, and digested lentivirus vector LTBR-uGIP obtained vector backbone. Luciferase gene and vector backbone were connected to construct lentivirus vector pULP packed and amplified using the conventional method. 293T cells were transduced with ULP to detect the expression of luciferase. Human embryonic stem cells H9 (P40) were cultured routinely on W3R cells as the feeder layers. H9 (P40) first transduced iDuet101-IDO gene (indoleamine 2, 3 dioxygenase, IDO) or iDuet101-CTLA4Ig gene (cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 immunoglobulin, CTLA4Ig). After selection, ULP was transduced once again and three groups of human embryonic stem cells were obtained: iDuet101-ULP (with luciferase expression), iDuet 101-CTLA4Ig-ULP (with luciferase and CTLA4Ig expressions), and iDuet101-IDO-ULP (with luciferase and IDO expressions). After double transduction, the three groups of cells were transplanted in 15 BALB/C mice as experimental group and 6 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice as control group, respectively. Luciferase signals were detected on the 0, 3rd, 5th, 7th, 14th, and 21st day after the injection. 【Results】 The minimum number for detecting fluorescence signal of human embryonic stem cells which transduced exogenous gene for two times in vitro was 22 000. Only  $5 \times 10^6$  cells were enough for the detection of fluorescence signal in xenotransplantation in vivo. The signal kept enhancing in RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice after transplantation, and increased to  $3 \times 10^7$  electrons and  $1.5 \times 10^7$  electrons in iDuet 101-CTLA4Ig-ULP group and iDuet101-IDO-ULP group respectively. Two RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice in iDuet101-ULP

收稿日期: 2008-10-07

基金项目: 广州市科技计划项目 (2004Z1-E0101)

作者简介: 蔡柳洪, 博士, E-mail: cailh@mail.sysu.edu.cn

group dropped because of the infection in injection sites on the 7th d after transplantation. No signals could be detected in BALB/C mice on the 7th d after transplantation and signals did not resume until 2 months later. [Conclusions] Constructing lentivirus vector co-expressing antibiotic resistant genes and target genes and using W3R as feeder cells for selecting gene-modified human embryonic stem cells can ensure the expression of exogenous genes. Luciferase gene can be used for quantitative and located monitoring the trend of transgenic human embryonic stem cells in vivo after xenotransplantation.

**Key words:** luciferase; reporter gene; human embryonic stem cell; xenotransplantation; transgene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2):174-178]

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)能在体外培养条件下无限增殖并分化为3个胚层的细胞,因而被认为可能成为细胞/组织/器官移植的重要供体来源。为了监测移植后细胞动向,往往需要以牺牲动物来实现。目前临床和科研方面均发展了各种影像学技术以活体研究细胞的发展动向。与其他影像学技术相比,荧光素酶的特点是在哺乳动物组织和细胞中的背景非常低,几乎不见细胞自身的内源光,国外已经有将其应用于小鼠胚胎干细胞和人胚胎干细胞的研究<sup>[1-2]</sup>,将荧光素酶报告基因引入人胚胎干细胞的研究国内尚未见报道。本文研究了荧光素酶在hESCs异种移植中监测细胞动向的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 人胚胎干细胞培养、鉴定所需主要试剂

P40 H9 hESCs 来自美国 WiCell Research Institute。饲养层细胞 W3R,为美国 Linzhao Cheng 实验室惠赠。培养方法及试剂详见已经发表的文章<sup>[3-4]</sup>。

### 1.2 主要仪器设备和试剂

D-luciferin、Xenogen IVIS(r)50 成像系统均购自美国 Xenogen 公司, Xba I、Nco I、EcoR I、dNTP Mix、NEBuffer 2 和 4、Hind III、DNA Polymerase 1(Klenow)、Kpn I 购自美国 New England Biolabs 公司, QIAquick PCR 产物纯化试剂盒(50)、QIAprep 离心小量抽提试剂盒(250)、HiSpeed 大量抽提试剂盒(25) 购自美国 Qiagen 公司, Poly-D-Lysine 购自美国 BD 公司, One Shot® Stbl3™ 化学感受态 E.coli 购自美国 invitrogen 公司, Amicon Ultra-15 过滤离心管(Ultracel-100 膜) 购自美国 Millipore 公司。

### 1.3 实验中所用载体

pGL3 base 质粒购自美国 Invitrogen 公司,慢病毒载体 iDuet101-CTLA4Ig, iDuet101-IDO, iDuet101、

LTBR-uGIP、CMV  $\Delta$ R8.91、MD.G 为美国 Linzhao Cheng 实验室惠赠。

### 1.4 pULP 慢病毒载体的构建、包装和鉴定

按照根据标准的 DNA 重组技术构建。荧光素酶基因(Luc-B)由酶切 pGL3 base 质粒获得,载体骨架(LTBR-UIP)由酶切 LTBR-uGIP 获得,经过酶切产物热失活、平末端处理、CIP 处理载体,胶纯化后连接 Luc-B 和 LTBR-UIP,所构建慢病毒载体命名为 pULP,包括 UBC 启动子和 IRES(internal ribosome entry site)连接,能同时表达荧光素酶基因和 Puromycin 抗性基因。随后用限制性内切酶 BsrG I 和 Kpn I 酶切 pULP 后电泳,选取有目标片段的克隆进行测序。所有的慢病毒颗粒(ULP)都按常规方式进行包装<sup>[4]</sup>,用 Amicon Ultra-15 过滤离心管浓缩病毒上清液,-80 °C 保存。测定细胞滴度,计算公式是:(实验组细胞计数/无加筛选抗生素的 293T 细胞)×筛选前细胞计数×10<sup>3</sup>(cfu/mL)

### 1.5 慢病毒载体转导 hESCs

在六孔板进行。hESCs 细胞在 Matrigel 上按照常规传代培养一代,以 MEF 条件培养基培养,待细胞(80~90)%融合时进行转导,加入 8  $\mu$ g/mL polybrene 和浓缩病毒上清液 50  $\mu$ L。6 h 后换液,以后每天换液,3 d 后 1:1 传代至 W3R 上进行筛选。第 1 次转导是 iDuet-101, iDuet101-CTLA4Ig 或 iDuet101-IDO 慢病毒载体转导 H9,用 Hygromycin (10  $\mu$ g/mL)进行筛选,随后用 ULP 第 2 次转导细胞,用 Puromycin (1  $\mu$ g/mL)Puromycin 完成筛选(两次转导后的 hESCs 分别命名为 iDuet101-ULP、iDuet 101-CTLA4Ig-ULP 和 iDuet101-IDO-ULP)。

### 1.6 体外检测荧光素酶的表达和体外荧光素敏感试验

4 种 2 次转导后的 hES 各 1×10<sup>6</sup> 细胞,加入 150  $\mu$ L GLO 细胞裂解液,室温下静置 10 min,离心,取上清 50  $\mu$ L,加入等量的 D-luciferin (15 mg/mL),立即在 Packard Topcount NXT 上检测荧光素酶活性。收获细胞 2.8×10<sup>6</sup> 细胞,按照等倍稀释

的方法将细胞分配到96孔板的每一个孔。每孔总体积100  $\mu\text{L}$ 。加入等量底物 D-Luciferin 15 mg/mL, 在0、5、10、15 min 后用 Xenogen IVIS(r)50 成像系统进行检测。

### 1.6 体内检测荧光素酶

BALB/C 小鼠和 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{C}^{-/-}$  品系(来源于 BALB/C) 小鼠均为美国 Linzhao Cheng 实验室惠赠。转导后的 hESCs 生长在 Matrigel 上, 胰酶消化收获细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$  1 000 r/min ( $r = 12 \text{ cm}$ ) 离心 5 min, 去上清将细胞重悬于 HBSS, 将细胞吸入注射器并置于冰上备用。乙醚麻醉小鼠后消毒小鼠右下肢外侧, 每只动物注射  $5 \times 10^6$  细胞, 各 2 只 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{C}^{-/-}$  小鼠和 5 只 BALB/C 小鼠。在注射后当天、3、5、7 d 检测荧光素酶信号, 此后每周检查 1 次。麻醉小鼠, 检测前 15 min 在小鼠左下肢注射 D-Luciferin 15 mg/mL 共 0.5 mL, 在 Xenogen IVIS(r) 50 成像系统进行检测。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒载体构建

本研究中使用的载体骨架经过 Cheng 实验室改进能同时表达两个转基因, 即荧光素酶由 UBC 启动子控制表达, IRES 连接下游的 Puromycin, 这样有利于进行细胞转导后的筛选。荧光素酶与载体连接后用 BsrG1 和 KpnI 酶切, 目的片段为 11 624 bp 和 9 414 bp, 或 1 052 bp 和 9 996 bp 两个片段。随后进一步用 Hind III 酶切, 目的片段应该是 556 bp, 584 bp, 1 213 bp, 1 726 bp, 1 939 bp 和 5 030 bp 共 6 个片段, 酶切结果显示有目的片段, 测序则进一步证实 DNA 序列的正确。

### 2.2 慢病毒颗粒 ULP 转导 hESCs

我们利用慢病毒载体对 H9 进行两次转导, 第 1 次转导 CTLA4Ig 或 IDO 基因, 筛选后第 2 次转导荧光素酶基因, 后者作为报告基因用于追踪转基因后的 hESCs 在宿主体内的动向。

### 2.3 体外荧光素酶基因的表达

我们在进行滴度检测的时候用 ULIP 转导 293T 细胞, 以 Puromycin 进行筛选, 病毒滴度为  $1 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$ 。随后, H9 hESCs 进行两次转导并完成筛选,  $5 \times 10^6$  细胞裂解液检测荧光素酶活性的结果(图 1)。

### 2.4 体外荧光素酶检测敏感性结果

收获  $2.8 \times 10^6$  细胞, 取细胞裂解液等倍稀释后检测, 经过 7 次等倍稀释, 仍能用 Xenogen IVIS (r)50 成像系统检测到荧光信号, 即体外能检测到荧光信号的最低的细胞数相当于 21 875 个(图 2 箭头所指)。

### 2.5 体内荧光素酶基因的表达

每组各 2 只 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{C}^{-/-}$  小鼠和 5 只 BALB/C 小鼠, 均注射  $5 \times 10^6$  个经过两次转导的人胚胎干细胞。注射当日均可见荧光信号(图 3A)。在 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{C}^{-/-}$  小鼠, 荧光信号持续存在, 检测显示荧光信号逐渐增强(图 3B)。在实验第 7 天检测荧光素酶信号后, iDuet101-ULP 组的 2 只 RAG<sup>-/-</sup>  $\gamma\text{C}^{-/-}$  小鼠因为在注射细胞部位出现溃疡而退出实验。3 组 BALB/C 小鼠, 均在实验第 7 天检测荧光信号消失, 此后观察两个月亦未重新出现。在移植后 28 天, 畸胎瘤尚未能在体表触诊触及。

## 3 讨论

由于 hESCs 保持未分化状态和具有向三个胚层细胞分化的潜力, 在研究基因功能方面有其他细胞所无法比拟的优势, 而转基因是基因治疗研究、胚胎发育生物学和基因调控研究、药物毒理学研究等的重要途径。

在本文中, 人胚胎干细胞经过两次慢病毒转导后仍然保持其无限增殖和多能分化的特性(资料没有提供), 说明利用慢病毒载体转基因是安全的。慢病毒载体(lentivirus-based vector, LV)能将外源基因整合入分裂期及静止期细胞的基因组内<sup>[5]</sup>, 是目前研究 hESCs 转基因最主要的方法。本研究使用的载体均已经经过改造<sup>[6]</sup>, 慢病毒载体 pULP 通过 UBC 启动子和 IRES 的连接, 能同时表达荧光素酶基因和筛选基因, iDuet 载体为双启动子结构, 目的基因表达由 EF1 $\alpha$  控制, 筛选抗生素是 Hygromycin, 由 PGK 控制表达。以能表达 3 种筛选基因的 W3R 细胞为饲养层, 可以不断进行筛选以保证外源基因的表达。

监测转基因后移植细胞动向是 hESCs 安全应用的前提条件之一, 实现活体观察是必然趋势。在细胞影像学发明以前, 为了观察目的蛋白的功能和细胞的动向, 需要在不同的时间点杀死动物进行观察。现在临床和科研方面均广泛使用各种非侵入性的活体影像学技术, 比如电子发射断层扫

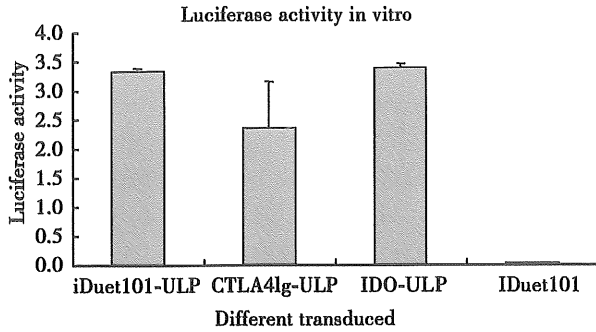


图 1 两次转导后的 H9 细胞裂解液荧光素酶活性

Fig.1 Luciferase activity of double transduced H9 cell lysate ( $5 \times 10^6$  cells)

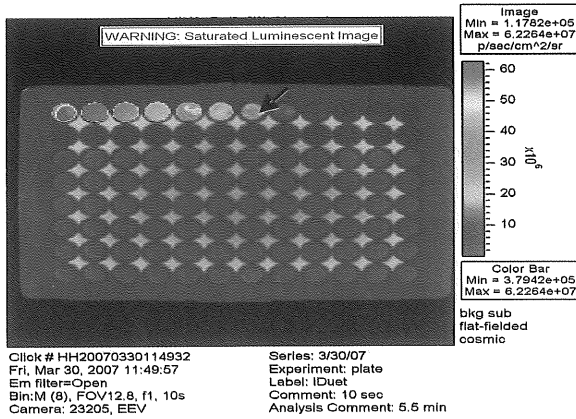


图 2 体外荧光素酶检测敏感性结果

Fig.2 Detection results of sensitivity of luciferase in vitro

描和核磁共振等。为了能无侵入性、长期、准确地观察细胞的动向,稳定转导报告基因到宿主基因组是常用的方法<sup>[7-8]</sup>,比较常用的是荧光蛋白比如 GFP,或者与特定基因位点结合的荧光染料,或者是基因的蛋白产物能将外源底物转化为荧光物质。

荧光素酶作为报告基因有其他方法所不能比拟的优点,但国内尚未见将荧光素酶基因应用于人胚胎干细胞的研究。荧光素酶最早于 1995 年用于在体追踪细菌病原菌<sup>[9]</sup>,能够在有氧和能量的条件下将底物氧化从而产生可见光而无须外源光的激发,其光的波长范围比较广,大部分超过了 600 nm,包含了红光,从而有利于光从组织中透射并被检测。与其他影像学技术相比,荧光素酶的最大好处是在哺乳动物组织和细胞中的背景非常低,几乎不见细胞自身的内源光。它是非放射性的,而且与其他酶类报告基因相比比较少与酶相关的免疫问题。国外有作者用荧光素酶基因作为报告基因活体观察 hESC 分化<sup>[2]</sup>,也有利用荧光素酶研究小鼠胚胎干细胞的移植<sup>[1]</sup>。

利用荧光素酶作为报告基因可以达到活体定量

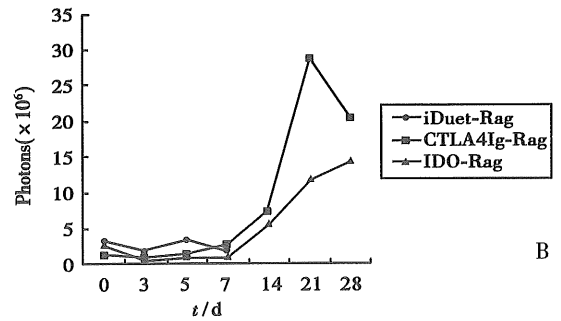
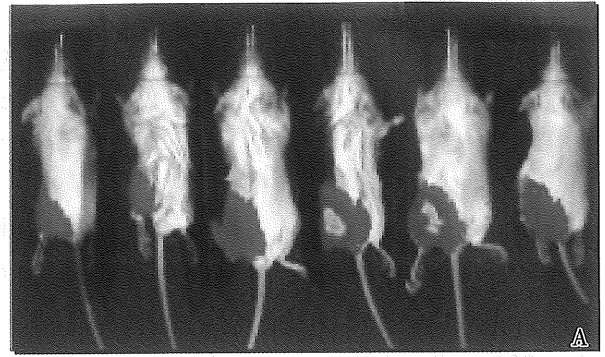


图 3 体内荧光素酶基因的表达

Fig.3 Expression of luciferase gene in vivo

A: Fluorescence signals of some mice after cell injection; B: Changes of fluorescence signal intensity of  $Rag^{-/-} \gamma C^{-/-}$  mice in the three groups during the observation period (iDuet-Rag, CTLA4Ig-Rag, and IDO-Rag refer to iDuet101-ULP, iDuet 101-CTLA4Ig-ULP, or iDuet101- IDO-ULP Transplanted onto  $Rag^{-/-} \gamma C^{-/-}$  mice, respectively)

和定位监测转基因人胚胎干细胞移植的动向的目的。hESCs 移植免疫缺陷小鼠是目前研究 hESCs 多能分化特性的主要方法,但尚未有 hESCs 移植免疫完全小鼠获得畸胎瘤的报道,本研究中在 BALB/C 小鼠,荧光信号在 7 d 内迅速消失,与文献报道相符合<sup>[10]</sup>。但在  $RAG^{-/-} \gamma C^{-/-}$  小鼠, iDuet 101-CTLA4Ig-ULP 和 iDuet101-IDO-ULP 组在观察期间自移植日开始荧光信号逐渐增强逐渐上升到  $3 \times 10^7$  电子和  $1.5 \times 10^7$  电子(iDuet101-ULIP 组两只小鼠因感染退出实验),表明定量检测移植后细胞成为可能。

本研究显示,荧光素酶作为报告基因在转基因后的 hESCs 活体研究需要细胞数比较少而且能早期观察到细胞的存活状况。体外检测显示,活性最低只需要 22 000 细胞。利用荧光素酶作为报告基因,只要  $5 \times 10^6$  细胞即可持续地在小鼠体内检测到荧光信号,并能进行量化以估计体内存活细胞的数量,而传统的畸胎瘤形成试验一般需要  $10^7$  的细胞,且需要 6 ~ 8 周才能在体表扪及瘤体<sup>[11]</sup>。

因此,构建慢病毒载体共表达抗生素抗性基因和目的基因,结合 W3R 细胞作为饲养层细胞以筛选细胞保证外源基因的表达。在细胞移植免疫缺陷小鼠,荧光素酶基因可用于活体定量和定位监测转基因人胚胎干细胞移植的动向。

致谢:本研究得到了美国 JOHNS HOPKINS UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL 的 Linzhao Cheng 实验室的大力帮助,尤其是 Linzhao Cheng 博士、Zhaohui Ye 博士给予理论上的指导,并无私赠送了 W3R 细胞和多种慢病毒载体。

#### 参考文献:

- [1] Wu JC, Spin JM, Cao F, et al. Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation [J]. *Physiol Genomics*, 2006, 25(1):29-38.
- [2] Li Z, Suzuki Y, Huang M, et al. Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4):864-873.
- [3] Cai L, Ye Z, Zhou BY, et al. Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions [J]. *Cell Res*, 2007, 17(1):62-72.

- [4] Dravid G, Hammond H, Cheng L. Culture of human embryonic stem cells on human and mouse feeder cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 331:91-104.
- [5] 史艳侠,韩文杰,彭柔君,等.使用 FLAG 标签肽及慢病毒载体共同筛选小鼠 *foxp3* 基因 RNA 干扰的有效靶点 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007, 28(6):641-644.
- [6] Zhou BY, Ye Z, Chen G, et al. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3):779-789.
- [7] Tsien RY. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:509-544.
- [8] Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells [J]. *Science*, 1998, 281(5374):269-272.
- [9] Contag CH, Contag PR, Mullins JI, et al. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 18(4):593-603.
- [10] Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Govaert JA, et al. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35):12991-12996.
- [11] 麦庆云,周灿权,李涛,等.玻璃化冷冻法保存人类胚胎干细胞 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3):357-360.

(编辑 张恩健)

(上接第 173 页 from page 173)

在  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以下。在最大限度发挥其屏蔽紫外线功效的同时,也要重视其安全性,让氧化锌纳米材料真正起到保护皮肤和人类健康的作用。这一结论,一方面对生产企业在功效成分的选择和添加有警示作用;另外也为卫生疾控监督提供了理论依据,具有重要的卫生学意义。

致谢:感谢南京大学现代分析中心电镜室马翔老师在生物样品的观察上给予的帮助!感谢南京市医学重点科技发展项目(ZKX06030)的资助!

#### 参考文献:

- [1] 姚超,吴凤芹,林西平,等.纳米技术与纳米材料(VI)-纳米氧化锌在防晒化妆品中的应用 [J]. *日用化学工业*, 2003, 33(6):393-397.
- [2] Schulz J, Hohenberg H, Pflucker F, et al. Distribution of sunscreens on skin [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(Suppl 1):S157-S163.
- [3] Rastogi SC. UV filters in sunscreen products—a survey

[J]. *Contact Dermatitis*, 2002, 46(6):348-351.

- [4] Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth [J]. *Environ Pollut*, 2007, 150(2):243-250.
- [5] Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , and  $\text{ZnO}$  water suspensions [J]. *Water research*, 2006, 40(19):3527-3532.
- [6] 祖庸,王训,吴金龙,等.新型无机抗菌剂-超微细氧化锌 [J]. *化工时刊*, 1999, 13(1):7-9.
- [7] 杨辉,杨丹凤,张华山,等.4种典型纳米材料对小鼠胚胎成纤维细胞毒性的初步研究 [J]. *生态毒理学学报*, 2007, 2(4):427-434.
- [8] Cheryl D, Helgason, Cindy L. *Methods in molecular biology™: basic cell culture protocols* [M]. 3rd edition, Humana Press, Volume 290:2903-2911.
- [9] 冯健,刘永坚,田丽霞,等.草鱼实验性镉中毒的肝、肾病理学研究 [J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2003, 42(2):226-230.

(编辑 孙慧兰)