

## 树鼩肝细胞体外分离培养体系的复建及主要影响因素分析

张 顶<sup>1,2</sup>, 高 丽<sup>3</sup>, 张远旭<sup>1</sup>, 孙 丽<sup>1,2</sup>, 冯 悦<sup>3</sup>, 何有文<sup>1</sup>, 夏雪山<sup>3</sup>, 张华堂<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室, 免疫生物学实验室和人类疾病灵长类动物模型研究团队, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 昆明理工大学 生物与化学工程学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 树鼩 (*Tupaia Belangeri*) 与人和灵长类亲缘关系较为接近, 是乙型肝炎研究中备受关注的小动物模型, 而其原代肝细胞的分离和培养则是建立 HBV 体外感染模型及应用和基础研究的关键的第一步, 但由于以往的文獻报道均较为简要, 需要较长时间的摸索。本研究通过与机械分离法的直接比较, 验证了两步灌注法在树鼩肝细胞分离中的优越性。进而发现, 在分离后的体外培养过程中, 二甲基亚砒不仅能够促进和维持原代肝细胞的分化, 而且能够显著地抑制纤维状细胞群的出现。同时, 肝细胞生长因子 (HGF) 和表皮生长因子 (EGF) 能够促进肝细胞在体外长期存活。在此优化的条件下, 原代培养可持续 4—5 周, 并且较多的细胞聚集形成类似肝窦结构的形态, 从而为乙型肝炎病毒感染机理研究和药物筛选提供了必备的先决条件, 也为丙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒及单纯疱疹病毒等研究和药物筛选提供了可能。

**关键词:** 树鼩; 肝细胞; 二甲基亚砒; 肝细胞生长因子; 表皮生长因子; 分化  
**中图分类号:** Q959.831 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2009)01-0024-07

## Crucial Factors for *de novo* Establishment of Long-term Primary Culture of Tree Shrew Hepatocytes

ZHANG Ding<sup>1,2</sup>, GAO Li<sup>3</sup>, ZHANG Yuan-xu<sup>1</sup>, SUN Li<sup>1,2</sup>, FENG Yue<sup>3</sup>,  
HE You-wen<sup>1</sup>, XIA Xue-shan<sup>3</sup>, ZHANG Hua-tang<sup>1,\*</sup>

(1. Immunobiology Laboratory and Overseas Team, Key Laboratory of Animal Model and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3. College of Chemistry and Biology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

**Abstract:** Tree shrews (*Tupaia Belangeri*) are phenogenetically close to humans and primates and generally recognized as a prominent small animal model for studies of hepatitis virus type B (HBV). Isolating and culturing tree shrew hepatocytes is the first key step toward the cellular model of HBV infection *in vitro*. Due to the lack of details in previous reports, establishing the model has been a matter of arbitrary experiences. In this study, we validated the superiority of perfusion over mechanic dispersion for hepatocyte separation and isolation. Subsequent cultures showed that dimethyl sulphoxide (DMSO) could suppress the growth of fibroblast-like cells and maintain the hepatocytes in the differentiated status. Furthermore, hepatocyte growth factor (HGF) and epidermal growth factor (EGF) could sustain growth and survival of the hepatocytes in the long-term culture. The combination of DMSO and HGF/EGF could maintain the hepatocytes in a longer and more stable differentiated status with clear trend to form liver sinus-like structures. Following this detailed method as a laboratory routine would permit plentiful starting material for study of HBV infection *in vitro* and drug-screening, as well as studies on hepatitis viruses type C and D, and herpes simplex virus.

**Key words:** Tree shrew; Hepatocytes; Dimethyl sulphoxide; Hepatocyte growth factor; Epidermal growth factor; Differentiation

乙型肝炎病毒 (hepatitis virus type B, HBV) 感染和临床各阶段的乙型肝炎是严重威胁人体健康

的世界性疾病。全球至少有 20 亿人曾感染 HBV, 其中 3.5 亿发展为慢性 HBV 携带者(Bracho et al,

收稿日期: 2008-08-29; 接受日期: 2008-11-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 分课题 (2007CB512807; 云南省科技条件平台建设计划项目 (2006PT07-2))

\*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhanght@post.kiz.ac

第一作者简介: 硕士研究生, E-mail: zhangdingster@hotmail.com

2006)。我国处于乙型肝炎的高发地区, 全国约有 1 亿人长期携带 HBV, 慢性乙肝病人约 2000 万(Jia & Zhuang, 2007), 慢性乙型肝炎已成为我国当前流行最为广泛、危害最为严重的传染病之一。

由于缺乏理想的体内外模型, HBV 感染及乙肝发病机制的研究和抗 HBV 药物的筛选一直受到制约(Yang et al, 2005; Glebe & Urban, 2007)。我国学者首先发现, 树鼩(tree shrew, *Tupaia Belangeri*) 对人 HBV 具有易感性(Su et al, 1987)。经过国内外 20 多年的研究和应用, 与灵长类亲缘关系较接近的树鼩(Nie et al, 2008)及其原代肝细胞已成为乙型肝炎研究中备受关注的体内外模型(Walter et al, 1996; Kock et al, 2001; Glebe et al, 2003)。

分离和培养树鼩原代肝细胞是建立 HBV 体外感染模型、研究感染机制和药物筛选的关键的第一步。我们在预初实验中发现, 由于以往的文献报道均较为简要, 分离细胞的技术细节和细胞培养的具体条件不甚具体和明确(Seglen, 1972, 1973; Gerlach et al, 1993), 复制原代培养体系需要较长时间的摸索, 而且对树鼩原代肝细胞的生长及分化状态有较大影响。因此, 本研究着重探讨了复建树鼩原代肝细胞体外分离培养体系过程中的主要影响因素和优化条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及术前准备

树鼩购自中国科学院昆明动物研究所实验动物中心, 驯养于本实验室动物房, 喂予小鼠颗粒饲料, 添加适量鸡蛋、苹果和牛奶。实验参照研究所实验动物管理相关规定, 选取成年树鼩, 体重 160—200g。经 ELISA 法确认 HBV 表面抗原阴性, 术前盐酸氯胺酮麻醉, 每只肌肉注射 1—2 mg, 胸腹部 75%酒精消毒。

手术用的剪刀、镊子、止血钳、尼龙绳、细胞筛(200 目)、培养皿洗净、烘干后, 放入铁制饭盒中, 120℃, 30min 灭菌, 烘干备用。

### 1.2 主要试剂及灌注液、培养基的配制

II 型胶原酶、Williams' MEDIUM E、HGF 均购自 Invitrogen, EGF、转铁蛋白购自 R&D, CFSE 染料、氢化可的松购自 Sigma, DMSO、地塞米松和胎牛血清分别购自 Amersco、Alexis 和 GIBICO。

第一灌注液: 即 HEPES 缓冲液(含 160.8 mmol/L NaCl、3.15 mmol/L KCl、0.7 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、33

mmol/L HEPES) 加 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素, pH 7.65, 0.2 μm 滤膜过滤除菌。

第二灌注液: 在第一灌注液中加入 0.02% II 型胶原酶、0.017% CaCl<sub>2</sub> 充分溶解后, 0.2 μm 滤膜过滤除菌。

树鼩原代肝细胞贴壁培养基: Williams' Medium E、5%胎牛血清、5 μg/mL 转铁蛋白、5 ng/mL 亚硒酸钠、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素, 0.2 μm 滤膜过滤除菌。

树鼩原代肝细胞维持培养基: Williams' Medium E、5 μg/mL 转铁蛋白、0.1% BSA、18 μg/mL 氢化可的松、40 ng/mL 地塞米松、5 ng/mL 亚硒酸钠、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素, 0.2 μm 滤膜过滤除菌。

### 1.3 两步灌注法分离树鼩肝细胞

经麻醉、消毒后, 固定树鼩于支架上(图 1a), 移至超净工作台中, 打开腹腔(图 1b), 暴露门静脉(图 1c)。用镊子轻轻剥离门静脉周围系膜, 在游离的静脉管处插入导管(图 1d), 用尼龙绳固定(图 1e)。用第一灌注液 200 mL, 15 mL/min, 冲洗血液后, 用第二灌注液 200 mL, 20 mL/min。剪取肝脏, 用镊子拨裂肝包膜, 取消化后的肝细胞 200 目筛网过滤, Williams' Medium E 洗涤 3 次, 经台盼蓝拒染, 相差显微镜下计细胞数及细胞活率。

### 1.4 机械法分离树鼩肝细胞

经麻醉、消毒后, 打开树鼩腹腔, 剪下肝脏组织, 经 37℃ 预热的 HEPES 缓冲液冲洗表面血渍后, 剪成 0.1—0.5 mm<sup>2</sup> 小块, 转移到细胞筛网上, 用 5 mL 注射器活塞顺时针研磨, 使单细胞或细胞团透过筛网。收集滤出液, Williams' Medium E 洗涤 3 次, 经台盼蓝拒染, 相差显微镜下计细胞数及细胞活率。

### 1.5 树鼩原代肝细胞的培养

上述方法获得的树鼩肝细胞, 以相同的密度(10<sup>6</sup> 细胞/孔)接种于六孔板中, 首先使用贴壁培养基培养, 4 h 后换维持培养基, 此后每 2 天换液 1 次。

### 1.6 检测细胞增殖状况

羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)染料标记法检测细胞增殖状况。在分离得到的树鼩肝细胞悬液中加入 CFSE, 终浓度为 10 μg/mL, 37℃ 水浴 10 min, 每 2 min 震荡一次, 然后加入 500 μL 胎牛血清, 4℃、5 min 终止反应。5%胎牛血清洗涤

细胞 3 遍后, 接入六孔板中培养, 4 天后, 收集细胞, 流式细胞术检测 CFSE 荧光强度, 其衰减次数可反映细胞增殖变化。

## 2 结果

### 2.1 树鼯肝脏的两步灌注

在进行树鼯肝脏灌注时, 第一步灌注 37°C 预热的缓冲液冲洗肝脏, 当肝脏由原来的深红色变成明亮的土黄色 (图 1f), 表明血液已基本冲洗干净, 停止灌注; 第二步灌注 II 型胶原酶消化肝脏, 当肝组织变软, 且表面由光滑变为颗粒状时, 表明已消化完全 (图 1g)。两步灌注完成以后, 肝脏内组织结构已被消化掉, 变为单个细胞或细胞团状态, 此时剥离肝包膜, 得到肝细胞的悬液 (图 1h, i)。在预初实验中, 我们曾尝试使用 IV 型胶原酶, 但细胞贴壁率低, 而选用 II 型胶原酶后, 细胞可长期存活、贴壁生长 (详见后)。

### 2.2 机械法与两步灌注法获得的肝细胞的存活率比较

一只成年树鼯, 机械分离法得到  $1.4 \times 10^8$  个肝细胞, 活细胞率为 90%; 两步灌注法得到  $1 \times 10^7$  个肝细胞, 活细胞率为 98%。可以看到刚分离的细

胞大小均匀呈球形 (图 2a, c), 其中机械法分离的细胞碎片较多 (图 2a)。机械法分离的细胞始终呈圆球形, 而且随着培养时间的延长, 细胞逐渐脱离板底漂浮起来; 至第 3 天时, >80% 细胞已经漂浮, 无明显的生长迹象 (图 2b)。灌注法分离的细胞 4h 后开始贴壁伸展, 至第 3 天基本铺满板底, 呈不规则多边形, 成群生长 (图 2d)。

### 2.3 DMSO 对原代培养肝细胞分化的影响

用灌注法得到的细胞, 在培养时加入 2% 二甲基亚砜 (DMSO), 可明显改变细胞的状态, 即在没有加入 DMSO 的细胞培养系统中, 细胞在第 3—4 天时, 会出现一些纤维状形态的细胞 (图 3a), 并且随着培养时间的增长, 纤维状细胞在总细胞中占的比例增大; 至第 6 天, 取代肝细胞成为主要的细胞群体 (图 3b), 而在培养基中加入 2% DMSO 后, 基本无纤维状细胞生长 (图 3c, d)。

### 2.4 生长因子对肝细胞增殖能力以及存活时间的影响

我们在最初的试验中发现, 没有加生长因子的细胞在第 5 天时开始漂浮 (图 4 a, b, c)。而在培养基中加入 10ng/mL 的 EGF 和 HGF 后, 肝细胞呈现充分伸展的状态, 在显微镜下能清晰的看到细

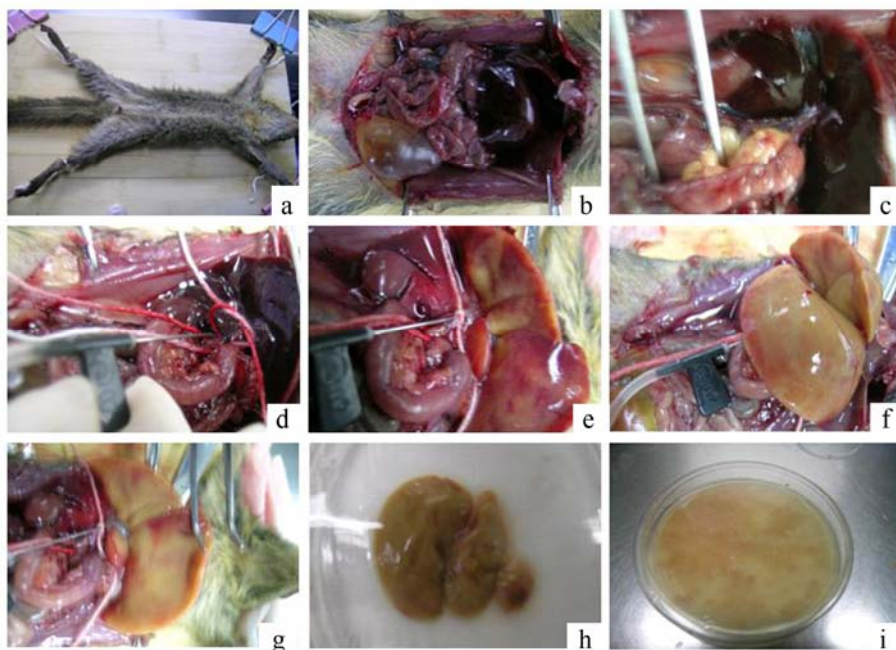


图 1 树鼯肝脏两步灌注法

Fig. 1 Two-step perfusion of the tree shrew's liver

a: 固定树鼯; b: 剖开腹腔; c: 暴露肝门静脉; d: 插入导管; e: 固定导管; f: 第一步灌注; g: 第二步灌注; h: 剪下肝脏; i: 得到肝细胞悬液。

a: Fix the tree shrew; b: Dissect the abdomen; c: Expose the portal vein; d: Insert a tube; e: Fix the tube; f: First-step perfuse; g: Second-step perfuse; h: Cut off the liver; i: Collect hepatocytes suspension.

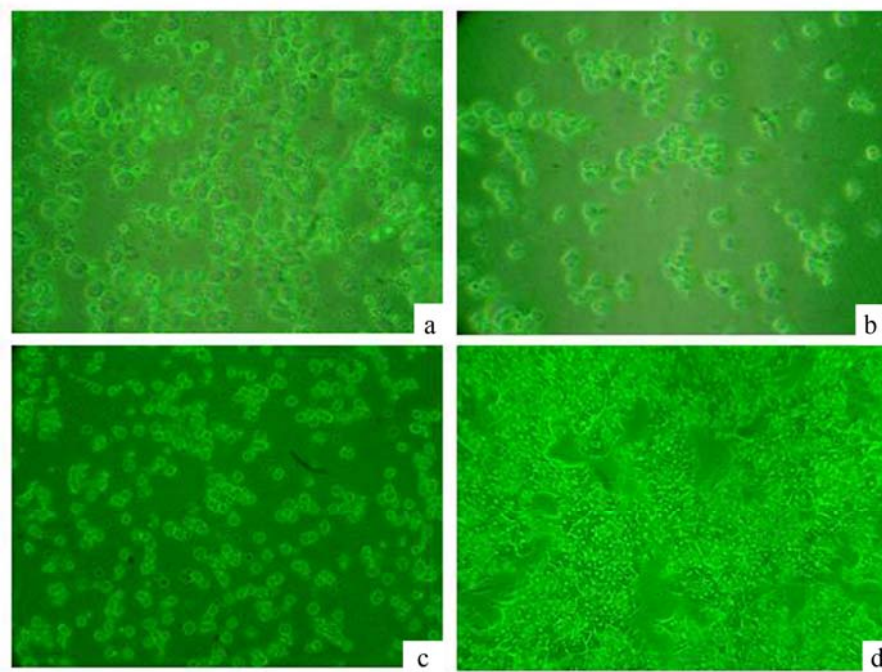


图 2 机械法与灌注法获得的树鼯肝细胞培养形态上的比较

Fig. 2 Comparison of tree shrew hepatocytes from mechanical dispersion and perfusion

a: 机械法分离的肝细胞; b: 机械法分离的、培养 3 天后的肝细胞; c: 灌注法分离的肝细胞; d: 灌注法分离的、培养 3 天后的肝细胞。  
a: Hepatocytes from mechanical dispersion; b: Hepatocytes of mechanical dispersion *in vitro* cultured in the 3rd day; c: Hepatocytes from perfusion; d: Hepatocytes of perfusion *in vitro* cultured in the 3rd day.

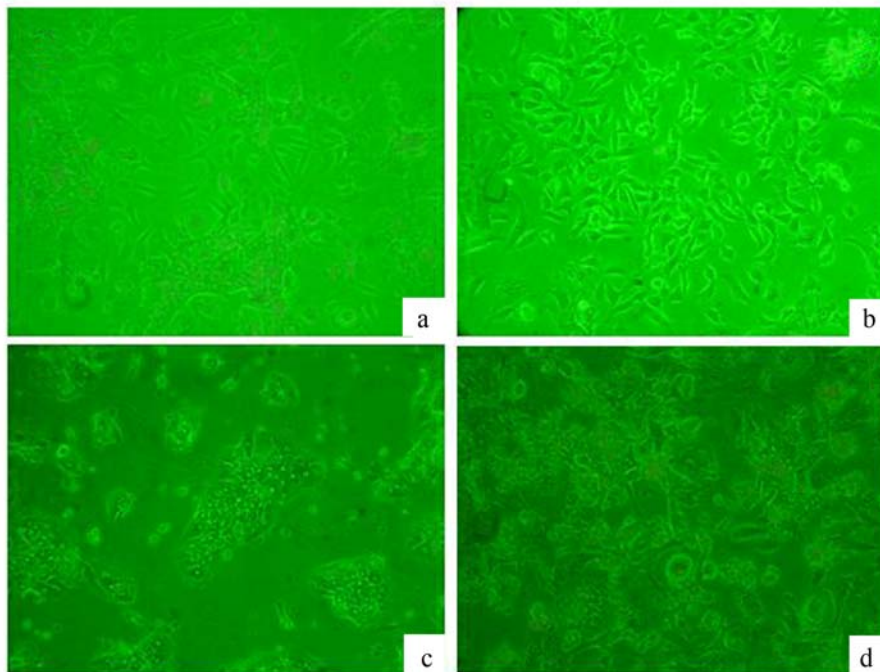


图 3 DMSO 对树鼯肝脏原代细胞的影响

Fig. 3 The effect of DMSO on the primary tree shrew hepatocytes

a: 培养第 4 天的树鼯肝脏原代细胞 (无 DMSO); b: 培养第 6 天的树鼯肝脏原代细胞 (无 DMSO); c: 培养第 4 天的树鼯肝脏原代细胞 (加入 2% DMSO); d: 培养第 6 天的树鼯肝脏原代细胞 (加入 2% DMSO)。箭头示纤维状细胞。  
a: Primary hepatocytes in the 4th day without DMSO; b: Primary hepatocytes in the 6th day without DMSO; c: Primary hepatocytes in the 4th day with DMSO; d: Primary hepatocytes in the 6th day with DMSO. The arrow indicates the fibrocyte-like cell.



胞核和细胞质，细胞界限明显，部分细胞呈双核或多核状态（图 4d, e, f），至少能够存活 9 天以上。因此，在后续的实验，我们常规加入 HGF 和 EGF（详后）。

### 2.5 条件优化后肝细胞体外长期培养形态观察

根据上述单独加入 DMSO 或生长因子（EGF 和 HGF）的作用，我们进一步探讨了联合使用 DMSO 和 HGF、EGF 的效果。结果发现，肝细胞能在体外存活 4—5 周。在培养的前 4 天，细胞持

续伸展变成不规则的多边形，单个细胞及细胞群体面积不断增大（图 5a, b, c）；至第 4 天，肝细胞铺满板底，细胞之间紧密接触，可以看到一些类似肝窦形状的细胞群形态（图 5d）。在这种形态出现之后，肝细胞及细胞群的形态基本维持不变，至 5 周后，细胞开始萎缩，并且部分漂浮至培养上清中（图 5e—l）。

### 2.6 原代肝细胞的增殖

如上所述，在起始密度为  $1 \times 10^6$  细胞/孔的树

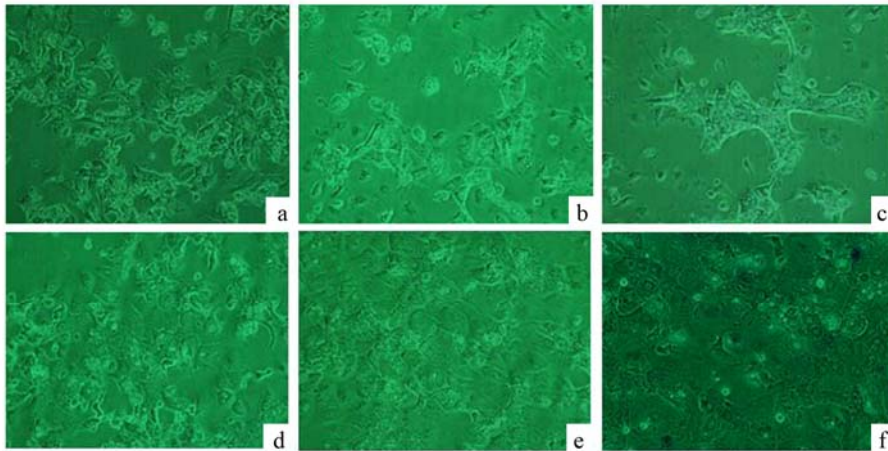


图 4 EGF、HGF 对树鼯肝脏原代细胞的影响

Fig. 4 The effect of EGF, HGF on the primary tree shrew hepatocytes

a, b, c: 培养第 3 天、第 5 天、第 9 天的树鼯肝脏原代细胞（未加 EGF、HGF）；d, e, f: 培养第 3 天、第 5 天、第 9 天的树鼯肝脏原代细胞（加 EGF、HGF）。

a, b, c: The primary hepatocytes cultured in the 3rd, 5th, 9th day respectively without EGF and HGF; d, e, f: The primary hepatocytes cultured in the 3rd, 5th, 9th day respectively with EGF and HGF.

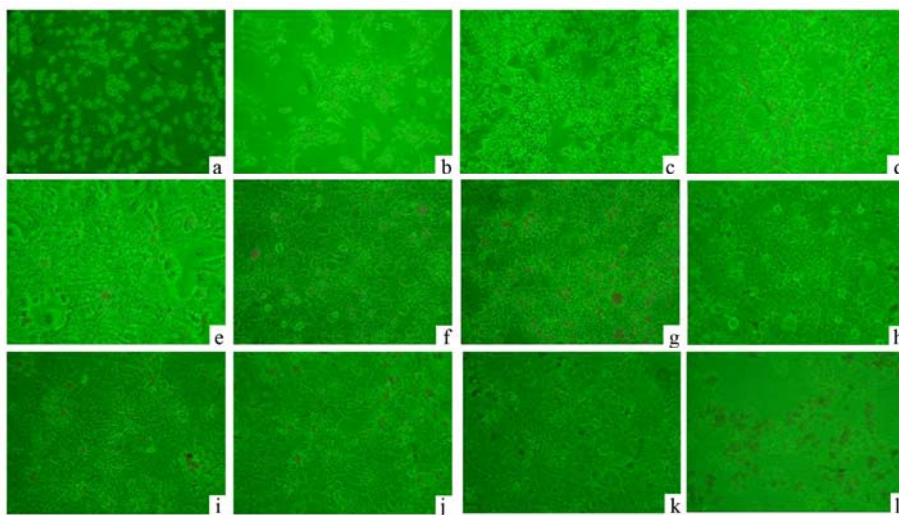


图 5 条件优化后树鼯肝细胞体外长期培养形态

Fig. 5 A long time culture of primary tree shrew hepatocytes in the optimized condition

a—l: 分别是 4 h, 1、3、7、11、13、17、20、24、27、34 和 38 天的树鼯肝细胞。

a - l: The primary hepatocytes in the 4th hours, 1st day, 3rd day, 7th day, 11th day, 13th day, 17th day, 20th day, 24th day, 27th day, 34th day, 38th day, respectively.

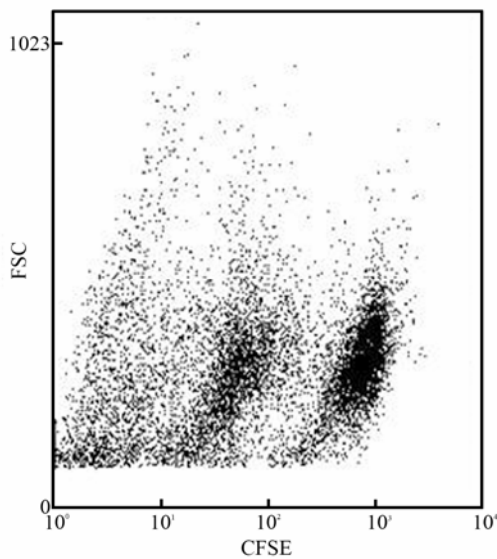


图 6 体外培养树鼩肝细胞的增殖

Fig. 6 The proliferation of cultured primary tree shrew hepatocytes

鼩原代肝细胞培养中, 前 4 天细胞群体形态有较大变化, 4 天后细胞形态基本维持不变。通过 CFSE 染料标记细胞, 检测细胞在前 4 天内增殖状况, 结果发现 4 天内肝细胞会发生明显增殖 (图 6)。

### 3 讨论

#### 3.1 树鼩肝细胞体外分离方法的比较

肝细胞的分离方法通常分为两种: 机械分离法和 Seglen 两步灌注法。机械分离法用于小型动物及肝脏组织块中肝细胞的分离(Mitry et al, 2003); Seglen 两步灌注法常用于活体动物肝细胞的原位分离(Seglen, 1972; Seglen, 1973; Gerlach et al, 1993)。我们比较两种方法分离得到的树鼩肝细胞, 选择其中细胞存活率高和生长性能好的 Seglen 两步灌注法用于树鼩原代肝细胞的分离。

通过对比机械分离法和两步灌注法得到的肝细胞, 我们发现两步灌注法分离的肝细胞总量相对较低,  $1 \times 10^7$  个肝细胞, 而机械分离可达  $1.4 \times 10^8$  个肝细胞。虽然两种方法获得的细胞的存活率仅略有差别 (灌注法活细胞率为 98%, 而机械法活细胞率为 90%), 但是机械法分离得到的肝细胞始终呈圆球形, 且贴壁不牢, 每次换液都有部分细胞飘浮, 到第 3 天, 只剩少数细胞附着在板底。因此, 我们认为, 机械分离法对细胞有致命伤害, 导致细胞不能正常贴壁生长。虽然灌注法对手术技巧要求较

高, 获得细胞的总量有待进一步提高, 但分离得到的细胞可以长期存活培养。

#### 3.2 树鼩肝细胞的分化

肝细胞在体外的生长分化状态是影响病毒感染率的极其重要的因素之一。而对 HBV 具有易感性的细胞大多处于相似于体内的高度分化状态 (Glebe & Urban, 2007)。正常情况下, 肝细胞在体内处于静止状态, 但从体内环境中分离出来时, 会启动肝细胞的去分化(Fraslin et al, 1992)。在体外培养条件中加入 DMSO 能够促进并维持肝细胞分化的特定状态(Glebe & Urban, 2007)。我们在树鼩原代肝细胞中加入 2% DMSO 后, 单个细胞形态变为不规则的多边形, 部分细胞呈多核状态, 且细胞逐渐聚拢, 成簇状生长。

灌注法分离得到的肝细胞并不是单一的肝实质细胞, 其中混杂了肝组织内的多种细胞。在我们早期的实验中, 观察到一群纤维状细胞的生长, 且因其生长速度较肝细胞快, 很快成为培养板内主要的细胞群。在尝试胰酶消化传代实验时, 仅有纤维状细胞能够继续生长, 肝细胞却不能再次贴壁生长。在培养液中加入 DMSO 后, 能够明显抑制纤维状细胞的生长, 使肝细胞的生长占优势。这也验证了 DMSO 在原代细胞培养中, 有促进并维持细胞分化状态的功能。

#### 3.3 肝细胞生长因子和表皮生长因子对树鼩肝细胞的影响

肝细胞生长因子(HGF)和表皮生长因子(EGF)能够促进肝细胞的生长(Muakkassah-Kelly et al, 1987; Fraslin et al, 1992; Tomita et al, 1995; Runge et al, 1999)。我们在培养体系中加入 HGF 和 EGF 后, 发现树鼩原代肝细胞能够更充分伸展, 细胞质所占面积明显增大, 单个细胞呈现不规则的多边形, 细胞核与细胞质清晰可见, 细胞在体外存活时间更长。这充分验证了肝细胞生长因子和表皮生长因子能够在体外促进树鼩原代肝细胞的生长。

因此, 我们在树鼩原代肝细胞的培养体系中, 联合使用 DMSO 和 HGF、EGF 后, 培养的细胞能够充分生长分化, 细胞之间紧密连接, 呈现出肝窦组织状的形态。这种类似肝细胞体内分化状态的细胞能够在体外存活近 5 周。

我们发现, 以  $1 \times 10^6$  细胞/孔为起始密度培养的树鼩原代肝细胞, 在前 4 天内细胞数目不断增长, 在培养板内所占面积逐渐增大, 至培养的第 4 天,

细胞已铺满板底, 细胞之间紧密接触。因此我们认为, 培养的树鼩原代肝细胞至少在前4天内增殖, 到第4天时, 细胞之间的紧密接触抑制了生长, 呈现出稳定的状态。另一方面, 除细胞密度造成的接触抑制作用外, 与我们在培养体系中引入的DMSO促进和维持肝细胞分化的作用, 可能有直接关系。细胞增殖检测实验的结果表明, 培养的树鼩原代肝细胞在前4天内能够增殖, 可能与体内外的分离转移启动了细胞增殖程序有关。

综上所述, 上述方法分离培养的树鼩原代肝细

胞能够更稳定、更长久的保持类似于体内的分化状态, 为我们研究HBV体外感染提供了很好的材料。此外, 已有研究表明, 树鼩能够感染丙型肝炎病毒, 丁型肝炎病毒和单纯疱疹病毒(Li et al, 1995; Guha et al, 2005), 而且树鼩作为肝损伤和肝癌模型也有报道(Yan et al, 1996; Park et al, 2000; Yang et al, 2005)。因此, 分离培养树鼩原代肝细胞及其分化状态的研究对嗜肝病毒科的体外感染模型和肝癌分子机制上的研究具有重大意义。

### 参考文献:

- Bracho MA, Gosalbes MJ, Gonzalez F, Moya A, Gonzalez-Candelas F. 2006. Molecular epidemiology and evolution in an outbreak of fulminant hepatitis B virus [J]. *J Clin Microbiol*, **44**(4): 1288-1294.
- Fraslin JM, Touquette L, Douaie M, Menezo Y, Guillemot JC, Mallard J. 1992. Isolation and long-term maintenance of differentiated adult chicken hepatocytes in primary culture [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, **28A**(9-10): 615-620.
- Gerlach JC, Brombacher J, Courtney JM, Neuhaus P. 1993. Nonenzymatic versus enzymatic hepatocyte isolation from pig livers for larger scale investigations of liver cell perfusion systems [J]. *Int J Artif Organ*, **16**(9): 677-681.
- Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH. 2003. Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus [J]. *J Virol*, **77**(17): 9511-9521.
- Glebe D, Urban S. 2007. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry [J]. *World J Gastroenterol*, **13**(1): 22-38.
- Guha C, Lee SW, Chowdhury NR, Chowdhury JR. 2005. Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C [J]. *Lab Anim (NY)*, **34**(2): 39-47.
- Jia JD, Zhuang H. 2007. A winning war against hepatitis B virus infection in China [J]. *Chin Med J (Engl)*, **120**(24): 2157-2158.
- Kock J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsacker F. 2001. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus [J]. *J Virol*, **75**(11): 5084-5089.
- Li Q, Ding M, Wang H. 1995. The infection of hepatitis D virus in adult tupaia [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **75**(10): 611-613, 639-640.
- Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, Terry C, Mieli-Vergani G, Girlanda R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, Dhawan A. 2003. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function [J]. *Cell Transplant*, **12**(1): 69-74.
- Muakkassah-Kelly SF, Bieri F, Waechter F, Bentley P, Staubli W. 1987. Long-term maintenance of hepatocytes in primary culture in the presence of DMSO: further characterization and effect of nafenopin, a peroxisome proliferator [J]. *Exp Cell Res*, **171**(1): 37-51.
- Nie W, Fu B, O'Brien PC, Wang J, Su W, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang F. 2008. Flying lemurs—the 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia-Dermoptera sister clade [J]. *BMC Biol*, **6**: 18.
- Park US, Su JJ, Ban KC, Qin L, Lee EH, Lee YI. 2000. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1 [J]. *Gene*, **251**(1): 73-80.
- Runge DM, Runge D, Dorko K, Pizarov LA, Leckel K, Kostrubsky VE, Thomas D, Strom SC, Michalopoulos GK. 1999. Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes [J]. *J Hepatol*, **30**(2): 265-274.
- Seglen PO. 1972. Preparation of rat liver cells. I. Effect of  $Ca^{2+}$  on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver [J]. *Exp Cell Res*, **74**(2): 450-454.
- Seglen PO. 1973. Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion [J]. *Exp Cell Res*, **76**(1): 25-30.
- Su JJ, Yan QR, Gan YQ, Zhou DN, Huang DR, Huang GH. 1987. Study on the HBV infection of adult Tupaia [J]. *Zhonghua Binglixue Zazhi*, **16**(1): 103-105.
- Tomita Y, Yuasa C, Ni R, Ishimura K, Ichihara A. 1995. Long-term maintenance of functional rat hepatocytes in primary culture by additions of pyruvate and various hormones [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1243**(3): 329-335.
- Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatology*, **24**(1): 1-5.
- Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Gan YC, Yang C, Huang GH. 1996. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, **122**(5): 283-288.
- Yang EB, Cao J, Su JJ, Chow P. 2005. The tree shrews: useful animal models for the viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, **52**(6): 613-616.