3 讨论

缺血再灌注损伤后肾组织炎细胞的浸润不仅是造成肾组织直接损伤的重要原因，而且可引起肾血管内皮细胞的损伤和免疫原性增强，导致进一步的免疫性损伤，从而在急性缺血性肾衰、移植肾功能延迟恢复、急性排斥的发生中发挥重要作用[1]。

我们以前的体外研究结果表明[2,3]：缺氧、氧化损伤均可导致内皮细胞粘附分子表达的改变；ICAM-1 是介导 PMN 与内皮细胞牢固粘附的主要分子，加用 ICAM-1 抗体可明显抑制氧化损伤后粘附力的增加，反映出细胞间粘附力的增加与粘附分子表达增强的相互依从关系。本研究结果表明，体缺血再灌注损伤同样可导致 ICAM-1 表达的显著增强；并且 ICAM-1 的表达增强与炎细胞的浸润密切相关，是介导再灌注后炎细胞浸润的重要原因。

除通过粘附力的增加介导 PMN 等炎细胞的浸润外，粘附分子的表达还在促进浸润白细胞的激活并抑制 PMN 的凋亡中发挥作用；另一方面，浸润、活化的 PMN 可通过释出的花生四烯酸代谢产物、超氧离子及细胞因子导致进一步的内皮及组织损伤[4]，形成恶性循环。粘附分子拮抗在器官保存中的作用已引起重视，采用 ICAM-1 反义 ODN 可抑制冷保存肺、肾组织 ICAM-1 的表达并减少原发性的移植肺失功并延长移植物的存活期[5]。在器官保存中粘附分子拮抗的作用有两方面：①减少再灌注后局部 PMN 的浸润及继发的组织学损害，防止急性肾衰、移植物功能延迟恢复的发生；②减少移植免疫发生的强度。减少粘附分子的表达可减轻致敏 T 细胞的活化，从而有利于减轻排斥反应、增加免疫耐受发生的可能。

关键词：缺血再灌注；肾脏；ICAM-1
中图法分类号：R692.02 文献标识码：B

参考文献：

[1] Lauriat S, Linas S L. The role of neutrophils in acute renal failure[J]. Semin Nephrol, 1998, 18(5): 498-504.
[2] 刘 宏，金锡御，吴雄飞. 肾脏缺血再灌注后内皮素-1、一氧化氮改变[J]. 重庆医学，2002，31(4)：296-298.
[3] 刘 宏，吴雄飞，金锡御. 缺氧及氧化损伤后 GEC 粘附分子表达与粘附性改变[J]. 第三军医大学学报，2002，24(9)：1043-1045.
[4] Banda M A, Lefer D J, Granger D N. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice[J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 2): H2721-H2725.
[5] Horimoto H, Nakai Y, Nakahara K, *et al*. HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin prolonged rat cardiac allograft survival by blocking intercellular signals[J]. J Heart Lung Transplant, 2002, 21(4): 440-445.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2005)15-1619-02

经验交流

人胆囊上皮细胞优化培养及其炎症模型建立

Optimized culture and inflammatory model establishment of human gallbladder epithelial cells

潘光栋[1]，程南生[1]，熊先泽[1]，刘江文[1]，李胜富[2]，张国福[3]，严律南[1]（四川大学华西医院：[1]普通外1科，[2]移植免疫实验室，[3]核医学科，成都 610041）

本研究结合国内外文献报道，进行胆囊上皮细胞（human gallbladder epithelial cells，HGBEC）的优化培养并建立其炎症模型。

1 材料与方法

1.1 材料

正常胆囊2枚，DMEM 培养基（Gibco），Ⅳ型胶原酶（Sigma），包被液（Ⅳ型胶原酶配成 200 g/L），200 ml/L 小牛血清（成都哈里生物公司），人内皮细胞生长因子（hEGF）（Sigma），CK_{19}抗体（DAKO），人白介素 1β（hIL-1β）（Roche 公司），TNF-α、IL-6 放免测定药盒（北京放射免疫研究所）。

基金项目：留学回国人员科研启动基金资助项目[2001(345)]
Supported by the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas [2001(345)]
作者简介：潘光栋（1966-），男，广西省北海市人，博士研究生，主治医师，主要从事肝胆外科临床、基础方面的研究。电话：(028)88054973，E-mail：pgdhx@126.com
通讯作者：程南生，电话：(028)85422467
收稿日期：2004-02-12；修回日期：2004-12-24

1.2 方法

先用小牛血清包被培养基37 ℃烘干，再用200 g/L Ⅳ型胶原酶包被，37 ℃烘干后备用。无菌条件下剪开胆囊底部，以缓冲液及生理盐水反复冲洗胆囊粘膜，无菌纱布蘸干，刮擦胆囊粘膜层，收集细胞悬液，经 100 目筛网过滤后1 200 r/min 离心 10 min，再用 DMEM 培养液离心洗涤细胞沉淀 2 次。用 DMEM 生长培养基培养悬液洗涤后的细胞，按(5～10)×10^5/ml 的细胞浓度接种于塑料培养皿内，37 ℃培养 2 h 以去除其中的非上皮细胞；同时以加有 10 mg/L hEGF 的 DMEM 培养基接种相同皿数的细胞，作为对照，共 48 孔。用台盼蓝染色活细胞数大于 95%，置 37 ℃、50 ml/L CO_2、饱和湿度二氧化碳培养箱内培养，24 h 后全量换液，以后每 2.5 天换液 1 次；每 24 小时行细胞计数，用 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.1 g/L EDTA 消化 3 孔细胞计数，取均值绘制细胞生长曲线。培养第 3 天取出细胞固定于载玻片上，按常规方法以上皮细胞标记角蛋白 CK_{19}的兔抗人 IgG 为一抗，HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行免疫组化染色，DAB 显色、苏木精复染，进行细胞鉴定，同时观察细胞着色及细胞的纯度。另取一胆囊，以上述方法进行胆囊上皮细胞的分离、培养，接种于含 10 mg/L hEGF 的 DMEM 培养基，细胞数

5×10^5/ml，共16孔，分为试验组8孔，对照组8孔。于培养第7天，向试验组加入hIL-1β至终浓度5 mg/L，每孔培养液均为2 ml，轻轻摇匀；2 h后，分别取各组每培养孔上清液0.8 ml，以放射免疫分析法测定IL-6、TNF-α浓度，倒置显微镜观察各组细胞贴壁及形态特征。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 人胆囊上皮细胞分离

采用Ⅳ型胶原酶消化法效率高，每个胆囊可以分离得到(5～10)$\times10^7$ 个胆囊上皮细胞，能满足培养的需要。我们对陈东风等[1]之方法进行了改良，操作更简单、快捷，同样可以满足要求。

2.2 人胆囊上皮细胞培养

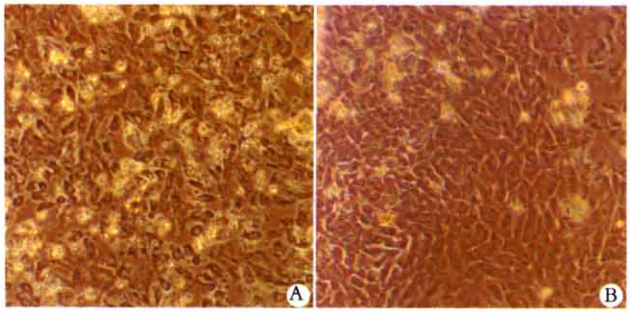
2.2.1 hEGF对人胆囊上皮细胞生长影响　人胆囊上皮细胞体外培养1周内生长较为活跃，第5～6天细胞数达最高值，平均细胞数2.6×10^7 个/孔，维持2 d后开始下降，但1周内细胞数仍可维持较高水平，平均存活时间8.3 d，原代培养最长可达16 d。添加内皮细胞生长因子后，细胞数及细胞存活时间均明显增加，第6～7天达最高值，平均细胞数4.6×10^7 个/孔，进入平台期，可维持10～12 d，平均存活时间18.6 d，细胞最长可存活25 d。比较添加hEGF组和未添加hEGF组HGBEC细胞数及生存时间($P<0.05$)，有统计学意义。

2.2.2 形态和生长变化　人胆囊上皮细胞在不同的培养基中生长情况有明显不同。在添加hEGF组，在接种6 h后开始贴壁，24 h后大部分贴壁并伸展，悬浮和死亡的细胞及碎片经全量换液去除；大多数细胞呈典型的扁平多角状，部分增生活跃的细胞呈柱状，且细胞核偏向一侧呈极性。培养第6～7天细胞生长活跃，增殖快，可见腺管样结构，而部分增殖活跃的细胞呈柱状。培养第6～7天以后逐渐进入平台期。培养第20天后出现拉丝、拉网现象，胞浆内出现空泡，片状生长的边缘细胞逐渐脱落。而未添加EGF组，接种1 d后出现典型核分裂象，第2天出现贴壁，贴壁生长持续5～6 d，至第10天细胞显著减少，13～14 d大部分细胞死亡。

2.2.3 鉴定　培养细胞采用CK_{19}免疫组化染色为特异性阳性反应，证明所分离培养细胞为HGBEC。细胞多角形，无极性，而部分细胞呈长梭形，有极性。

2.3 炎症状态的胆囊上皮细胞形态变化

对照组和试验组胆囊上皮细胞形态比较显示明显不同，试验组细胞肿胀，胞膜不清，胞浆混浊。对照组细胞边界清晰，形态规则。见图1。



A：对照组；B：试验组

图1 HGBEC培养第7天形态变化 (×100)

2.4 对照组与试验组HGBEC，IL-6测定值

对照组与试验组IL-6分别为(50.00±0.00)与(350.31±37.05)，有显著性差异($P<0.01$)，说明HGBEC培养液加入hIL-1β能促成炎症反应形成，IL-6值明显升高。

2.5 对照组与试验组TNF-α测定值

对照组及试验组TNF-α测定值均在TNF-α测定药盒敏感值低限(0.3 mg/L)以下，未作统计学处理。

3 讨论

人胆囊上皮细胞(HGBEC)有分泌粘液和吸收功能，主要在胆汁浓缩、排泄、贮存方面起作用，对结石的形成也有很大影响，也是胆囊多发病如炎症、肿瘤、结石、寄生虫病的靶部位。胆囊上皮细胞的分离培养已成为研究胆囊疾病的基础。1991年美国学者Oda等[2]在世界上首次成功地建立了狗胆囊上皮细胞体外培养方法，以后陆续有鼠、猪、牛等动物胆囊上皮细胞分离培养的报道。国内学者[1]也建立了人胆囊上皮细胞的分离培养方法；但其存活时间短，进行相关研究的最佳时间是培养1周内，明显限制了相关研究的进一步进行。

我们根据文献[3]所报道，内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor，EGF)可以促进胆管上皮细胞的增生，在培养基中添加EGF与未添加组作比较，发现可以明显增加细胞数和延长细胞存活时间。这对于较长期地观察活细胞的形态结构和生物学特征，进行细胞学、遗传学、免疫学、肿瘤学等多种研究工作，无疑具有重要意义。EGF对胆管上皮细胞和胆囊上皮细胞的生长均有促进作用，可能与它们的生物学特性有一定的共性有关。

建立胆囊上皮细胞的体外炎症模型是研究胆囊上皮细胞炎症的前提。细胞的体外炎症模型制作常以促炎因子为手段，促炎因子种类很多，包括TNF-α、IL-1β、LPS(细菌脂多糖)等，但最主要的、作用最强的、也是实验研究使用最多的是TNF-α、IL-1β。其作用机制比较清楚，关键环节是核因子κB(NF-κB)的激活，进入细胞核内诱导基因表达，结果使炎症介质合成增加[4]。本实验以hIL-1β作为促炎介质，成功制作了胆囊上皮细胞的体外炎症模型，表现为细胞肿胀，胞浆混浊，细胞上清液炎症介质IL-6值与对照组比较明显升高($P<0.001$)。TNF-α也是强有力的炎症介质，本实验测定TNF-α值均在敏感值低限以下，其原因为内皮细胞不直接产生TNF-α，而只能由IL-2β诱导产生[4]。实验的成功为以后的研究奠定了基础。

关键词：人胆囊上皮细胞；培养；炎症模型
中图法分类号：R322.48　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 陈东风，刘为纹，房殿春，等. 人胆囊上皮细胞的分离、培养与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1109－1111.
[2] Oda D，Lee S P，Hayashi A. Long term culture and Partial charactarization of dog gallbladder epithelial cells[J]. Lab Invest，1991，64(5)：682－892.
[3] Joplin R. Effect of EGF on bile duct epithelial cells[J]. Investigation，1992，90(7)：1284－1289.
[4] 金惠铭，卢　建，殷莲华. 细胞分子病理生理学[M]. 郑州：郑州大学出版社，2002. 70－430.

(编辑　薛国文)