维普资讯 http://www.cqvip.com

Effects of cytokines on function of neonatal B lymphocytes

Chen shi, et al
Department of Immunology, College of Pediatrics

Levels of IL-4 and IL-6 produced by T Lymphocytes(TL) were evaluated in 18 cases of neonatal cord blood. Furthermore, the effects of IL-4, IL-6 and IL-10 on proliferation and IgG production of B lymphocyte(BL) stimulated with Sac were investigatde. The results showde that levets of IL-4 and IL-6 in neonatde were lower than those in adults, and the lowered levels of IL-4 and IL-6 were correlatde with decreased proliferation and Ig production of BL in newborns. Supplement of recombinant IL-4, IL-6 an ' IL-10 can rectify the dysfunction of neonatal BL. Our studies suggest that cytokines insufficiently produced by TL may be an important factor in the lowerde function of neonatal BL.

KEY WORDS Newborns; Cytokines; B lymphosytes; IgG

R329.2 (3)

222-225

小肠粘膜上皮细胞原代培养最适条件的研究

儿科学院外科 伍 烽* 金先庆 吴仕孝 李 镜 王 珊 许嘉陵

提 要 本文定量研究了小肠粘膜上皮细胞原代培养方法的最适条件。Wistar系胎鼠小肠制备成小肠绒毛细胞团悬液，接种于处理后的24孔培养板，采用MTT显色法定量研究影响小肠上皮细胞贴壁生长的各种因素。结果显示培养液质量、培养时间、CO_2浓度、肠绒毛细胞团接种浓度、胎牛血清浓度和加药时间是影响肠上皮细胞贴壁生长的主要因素，并得到了上述因素的最适培养条件。上述研究结果可为体外探讨细胞生长因子和肠营养素对肠上皮细胞结构、功能、生长和分化的影响提供了一种可靠、定量的研究手段。

关键词 小肠；上皮细胞；原代培养；培养条件
中图分类号 R329.2

小肠粘膜上皮细胞是肠道的主要功能细胞。本文在建立大鼠小肠上皮细胞的原代培养方法及其生物学鉴定这一前期工作基础上，采用MTT显色法定量研究影响小肠上皮细胞贴壁生长的各种因素，旨在探讨小肠粘膜上皮细胞原代培养的最适条件。

1 材料和方法

1.1 小肠上皮细胞原代培养[1]

孕龄17－19天Wistar系大鼠(由本校实验动物中心提供)为实验动物，剖宫产术取出胎仔，75%乙醇浸泡消毒10分钟，取出全部胎仔小肠，经机械和胶原酶H(宝灵曼，德国)消化，半沉淀法离心后制成小肠绒毛细胞团悬液，单个绒毛细胞团悬浮于DMEM(GIBCO，美国)培养液中，该培养液同时含胎牛血清(长春生物制品研究所)，10万u/L青霉素和0.1g/L链霉素(华北制药厂)。小肠绒毛细胞团定量接种于用鼠尾胶原处理后的24孔培养板(Linbro，美国)中，4孔为一组，每孔1.5ml，置37°C，二氧化碳孵箱(Shel－Lab，美国)内培养。

1.2 MTT显色法测定肠上皮细胞的生长和增殖[2]

24孔板培养一定时间后，弃培养液，贴壁生长的肠上皮用DMEM液冲洗两次，每孔加入500μl DMEM液和0.5%四甲基偶氮唑盐(Sigma，美国，简称MTT)50μl，再培养4小时，弃液，加入二甲亚砜(MDSO，北京化工厂)200μl，

*男，1962—09出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

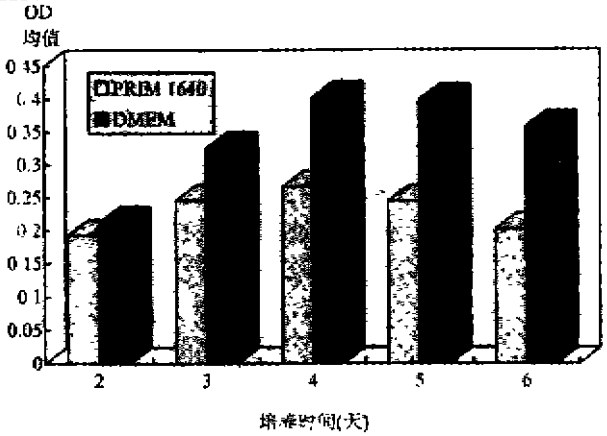


图1 培养液质量对上皮细胞生长的影响

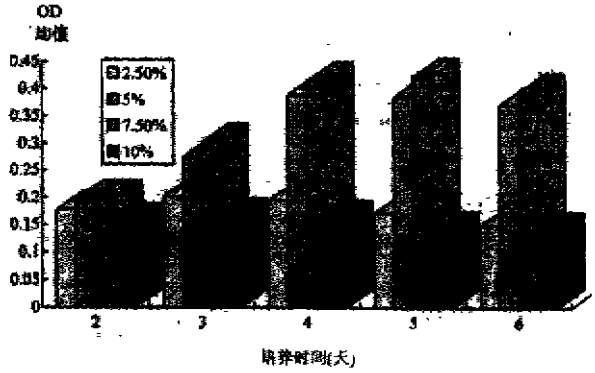


图2 二氧化碳浓度对肠上皮细胞生长的影响

振摇2分钟，吸出并加入到96孔培养板(Falcon，美国)中，在自动酶标仪450型(Bio－Rad，美国)上比色，波长595nm，测出每孔光密度(OD)值。

2 结 果

2.1 培养液质量

维持分离后肠上皮细胞生长的关键是基础培养基的质量。图1显示与RPIM1640比较，DMEM液对贴壁肠上皮细胞生长有较强的促进作用。

2.2 CO_2浓度

实验中采用碳酸盐缓冲培养和改变温箱CO_2浓度以观察pH对肠上皮细胞生长的作用，结果表明5～7.5%CO_2浓度最适合细胞生长(图2)

2.3 小肠绒毛细胞团接种量

小肠绒毛细胞团分别配制成不同浓度的悬液，定量接种，培养72小时后用MTT法测定各孔光密度值。图3显示随接种绒毛细胞团数量增加，所测OD均值升高。但是，当绒毛数量＞1.37×10^4/孔时，OD均值开始下降，表明接种绒毛数量过多反而影响肠上皮细胞的贴壁生长。

2.4 肠上皮细胞培养时间

接种6.25×10^3/孔上肠绒毛细胞因子24孔板内，在37℃、7%CO_2条件下分别培养24、48、72、96、120小时，MTT法测定不同培养时间的OD值。结果显示96小时培养组OD均值最高(图4)，表明此时贴壁生长的肠上皮细胞活细胞数量最多。

2.5 胎牛血清浓度

24孔培养板中接种小肠绒毛细胞团6.25×10^3/孔后，分别加入不同浓度的胎牛血

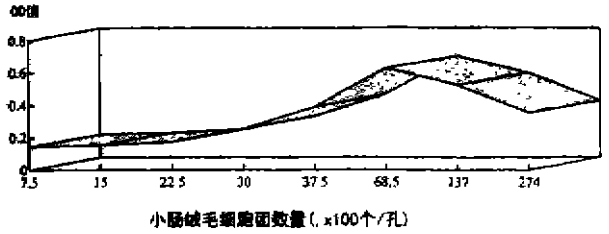


图3 小肠绒毛细胞团接种量对肠上皮细胞生长的影响

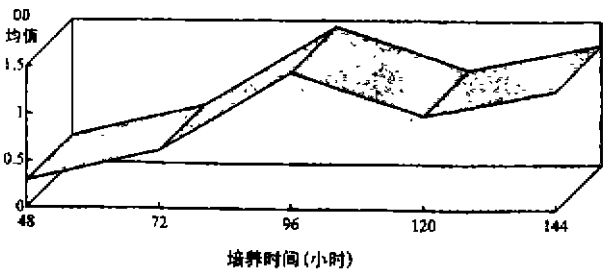


图4 肠上皮细胞培养时间上皮细胞生长的影响

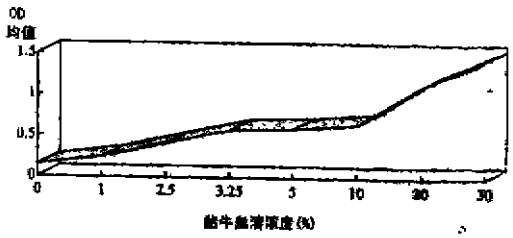


图5 胎牛血清浓度对肠上皮细胞生长的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

清，96小时后MTT法测定各孔光密度值。结果显示随胎牛血清浓度的增加，光密度均值愈大(图5)。胎牛血清浓度对肠上皮细胞的增殖有明显的促进作用。

2.6 加药时间

24孔板内定量接种小肠绒毛细胞团悬液(5.25×10^5/孔)后，分别于0、12、24、48小时加入能促进上皮细胞贴壁生长的细胞生长因子—表皮生长因子(北京邦定公司)500u，培养96小时用MTT法测定各孔光密度值。结果显示48小时加药组OD均值最高，表明此时加药对贴壁的肠上皮细胞生长最满意。

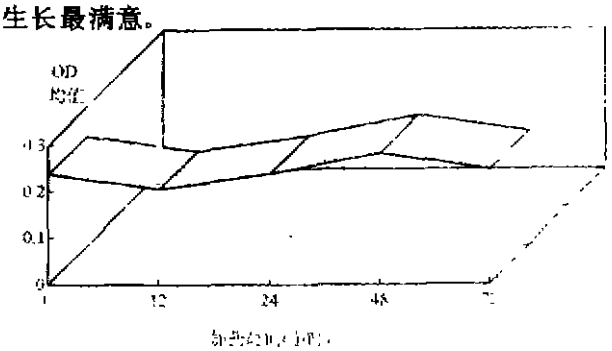


图6 加药时间对肠上皮细胞生长的影响

3 讨论

肠道是一个由多种细胞构成，多功能的复杂器官。其中，肠粘膜上皮细胞是肠道的重要功能细胞。它参与了肠道的食物消化、吸收功能，内、外分泌功能，免疫屏障功能和外科应激反应。近年来研究发现肠粘膜屏障功能下降和由此所致的肠源性细菌、内毒素移位与外科重症病人的败血症、高代谢状态、继发性组织细胞损害、多器官功能衰竭等并发症密切有关[3]。因此，建立小肠粘膜上皮细胞原代培养方法，从体外直接研究小肠上皮细胞的生物学特征、细胞增殖和分化的调控因互，以及病理状态下肠上皮细胞营养和代谢的变化等方面均具有重要的临床意义。

由于具有贴壁生长能力差，对营养和外界培养条件要求高，培养过程中易被其他间质细胞污染等特点，使小肠粘膜上皮细胞原代培养非常困难。近年来，国外研究肠上皮细胞的生物学特征、细胞增殖和分化的调控因素多采用小肠上皮细胞株(常以IEC－6为主)或肠道肿瘤细胞株[4]。肠上细胞株是经过数周体外培养，从混合细胞中挑选，最后形成单细胞克隆的，因而在反映体内肠上皮细胞的基本结构、代谢、功能和分化特征方面均存在一定的差异。如采用肿瘤细胞株，更难体现正常上皮细胞的代谢和分化特点。与此相反、原代培养的肠上皮细胞这种差异甚小，它能客观、真实地模似体内肠上细胞的生物学特征，使研究结果更准确、可靠。同时，本实验首次采用MTT显色法对小肠上皮细胞原代培养的影响因素和最适条件进行了研究，其结果可能有助于建立稳定的、容易重复的小肠上皮细胞原代培养方法。

体外测定活细胞数量和细胞增殖的方法不少，如普通的细胞计数，用特殊染料使细胞着色后计数，以及采用^3H－TdR或^{125}I－UdR的同位素掺入法等。但是，这些方法均有不足之外。MTT显色法于1983年由Mosmann首先提出[5]。由于具有省时、操作简便、重复性好、无放射性污染等优点，且能客观地反映细胞存活和增殖情况，因而在肿瘤学和免疫学领域中得到了广泛的应用[6-10]。该方法利用活细胞内线体脱氢酶能将MTT转化为兰紫色衍生物甲 (Formazane)的原理来检测活细胞数目。同时，产物甲 颜色深浅(常用OD值表示，可在自动酶标仪上连续读数)与活细胞数成正比。故本实验应用此原理建立了测定肠上皮细胞活细胞数目的方法以探讨小肠上皮细胞原代培养的最适条件。上述研究结果可以为体外定量研究细胞生长因子、激素和肠营养素对小肠上皮细胞结构、功能、生长和分化的影响提供一种可靠的研究手段。

参考文献

1.伍 烽.等.中国临床营养杂志 1996;4(s):84
2.伍 烽.等.中国肠内与肠外营养杂志 1997;5:103
3.Demling R.ed al.Curr Prob Surg 1993:30:356
4.Sanderson IR.et al.J Nutr 1994;124:S131
5.Mosmann t.J Immuno Methods 1983;65:55
6.Virag L.et al.J Immuno Methods 1995;185:199
7.Yokoyama I.et al.Transpl Int 1995;8:251
8.Doyle LA.et al.Br J Cancer 1995;72:535
9.Schuurman B,et al.J Surg Oncol 1995;60:18
10.Buszello H.Anticancer Res 1995;15:735

(收稿时间 1997－11－19)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Optimal conditions of primary culture for small intestinal epithelial cells

Wu Feng, et al
Department of Pediatric Surgery, College of Pediatrics

On the basis of preceding work in establishing a reproducible method for small intestinal epithelial cells of fetal rat in primary culture,we investigaged the optimal culture conditions of small intestinal epithelial cell.The epithelial organoids of small intestine were obtained from Wistar fetal rats,and were successfully cultured on collage-coated plates in DEME medium.MTT colorimetric assay was developed to allow a reproducible and quantitative measurement of proliferation of small intestinal epithelial cells in primary culture,so as to get the optimal culture data at different conditions.Results showed that cultural medium quality,incubative time,CO_2u concentration,the amounts of incubated epithelial organoids,fetal calf serum level and the time of administrated drug were major influential factors in the process of epithelial growth in primary culture.The optimal culture data of these factors were also obtained.It is concluded that many factors can influence the growth of small intestinal epithelium in the process of primary culture.The optimal culture conditions would be useful to investigate the effects of extracellular matrix constituents,hormones,growth factors,and specific nutrients on the epithelial structure,function,proliferation,and differentiation in the small intestine.

KEY WORDS Small intestine; Epithelial cell; Primary culture; Optimal culture condition

225-229 (4)

WST-1法用于抗恶性肿瘤药物筛选的实验研究

R979.1
R965.1

基础医学院病理生理教研室 蓝 轲* 范维珂
医学检验系分析化学教研室 黄 昕

提 要 WST-1是一种新型的四唑盐。它生成水溶性的有色物质，比色时不需额外的溶解步骤。在本研究中，我们将WST-1用于胃癌细胞株SGC-7901的抗癌药物筛选试验。我们的研究表明：①最适细胞接种数0.5×10^4-1×10^4/孔。②.WST-1显色法的最佳波长450nm。③.WST-1显色法重复性良好，组内变异系数为3.5%～8.7%。④WST-1法比MTT法敏感。⑤.WST-1法比MTT法简便。⑥.WST-1法用于抗癌药物筛选结果与MTT法具有良好的符合性。结果表明.WST-1法具有快速、简便的特点，是体外瘤株筛选抗癌新药和临床肿瘤药敏试验的可靠方法。

关键词 WST-1法; MTT法; 抗癌药物敏感试验; SGC-7901细胞株 药物筛选
中图分类号 R979.1

近年来，恶性肿瘤的发病率在世界范围内呈不断上升的趋势。随着医学科学的进展，恶性肿瘤的治疗方法也在不断涌现。但就目前来看，手术、放疗和化疗仍然是治疗恶性肿瘤的主要手段。合理使用化疗药物往往是肿瘤治疗成功的关键。由于肿瘤存在耐药的问题，如何选择对肿瘤敏感的抗癌药物对化疗至关重要。迄今为止，用于抗癌药物筛选的肿瘤药敏试验已形成体内外十余种方法。体内试验由于耗时长，价格昂贵，已逐步被体外实验取代。目前国内外常用的方法有Salmon

*男，1971-12生，研究生