DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.049
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1109-03

论著

人胆囊上皮细胞的分离、培养及鉴定

陈东风[1],刘为纹[1],房殿春[1],刘 苹[2],易 萍[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

提 要:目的 探索人胆囊上皮细胞的较佳分离方法和合适的生长条件,为研究胆囊的生理功能和相关疾病打下基础。方法 采用Ⅳ型胶原酶及钝性擦刮法分离细胞,Ⅳ型胶原包被培养皿,DMEM/HamF12培养基联合培养。结果 每个胆囊可分离得到(5~10)×10^7个胆囊上皮细胞,接种1周内生长旺盛,第3、4天达到峰值,呈现扁平多角形成片贴壁状态。结论 Ⅳ型胶原酶消化法可成功分离人胆囊上皮细胞,DMEM/HamF12培养基可提供较为满意的生长条件。

关键词:胆囊上皮细胞;Ⅳ型胶原酶;Ⅳ型胶原
中图法分类号:R322.48;R329.2 文献标识码:A

Isolation, culture and identification of human gallbladder epithelial cells

CHEN Dong-feng, LIU Wei-wen, FANG Dian-chun, LIU Ping, YI Ping (Department of Gastroenterology, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the suitable method for separation and growth conditions of human gallbladder epithelial cells (HGBEC) for establishing the basis of research work in physiological function of gallbladder and its related diseases. Methods HGBEC were isolated with collagenase type Ⅳ and cultured in DMEM/Ham F12 medium. The cultural dishes were firstly coated with collagen type Ⅳ and bovine calf serum. Morphological changes of the cells were observed and the growth curve of the cells was made. Results A total of (5—10)×10^7 cells were obtained from a single human gallbladder. These cells grew vigorously within one week and reached the maximum at the 3rd and the 4th day. The cells were flat and multangular in shape, and attached to the dishes. Conclusion Collagenase type Ⅳ digestion can successfully separate the HGBEC, and DMEM/Ham F12 can provide satisfactory growth condition for HGBEC.

Key words: gallbladder epithelial cells; collagenases; Collagen

胆囊是人体的重要器官,其主要功能是贮存、浓缩和排泄胆汁,胆囊上皮细胞与胆囊功能有着十分密切的联系。胆囊好发疾病如胆囊炎、胆石症,胆囊癌等,都是以胆囊上皮细胞为病变的靶位,胆囊上皮成为损伤因素攻击的中心。可以认为,胆囊上皮细胞是胆囊生理功能及病理状态的中心环节。而要研究胆囊上皮细胞的粘液分泌能力,离子转运功能,对炎症介质的反应和病理状态改变等,首先需进行胆囊上皮细胞的分离及培养。我们经过反复摸索,成功地分离培养了人胆囊上皮细胞(Human gallbladder epithelial cells, HGBEC),为进一步研究胆囊的生理功能和相关疾病奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 胆囊标本来自因胆囊息肉行切除的患者,选用离息肉1 cm以外的胆囊组织,经病理学检查证明无明显炎症者。

1.1.2 D-Hanks,Hanks及PBS液 配制方法文献[1]。

1.1.3 DMEM/HamF12培养基(Sigma) 按说明分别配制,加入青霉素、链霉素(100 U/ml,100 μg/ml),过滤除菌,冻存备用,用时1∶1混合。

1.1.4 Ⅳ型胶原酶(Sigma) 以超纯水配制0.25%溶液,过滤除菌后—20 ℃保存。

1.1.5 包被液 Ⅳ型胶原(Sigma)配成0.2 g/ml,4 ℃保存。

1.1.6 小牛血清(Hyclon)加入培养基至终浓度10%。

1.1.7 CK19抗体(北京中山生物试剂公司)。

1.2 方法

1.2.1 包被培养板 先用小牛血清包被,37℃烘干后,再用配制好的包被液进行包被,37 ℃烘干后备用。

1.2.2 在手术室无菌条件下取出胆囊,取肉眼观察下无明显炎症,距息肉1 cm以上,同时行冰冻切片证明无炎细胞浸润的胆囊组织。剪开胆囊翻出粘膜,弃胆汁,Hanks缓冲洗,无菌纱布蘸干,修剪胆囊,仅留胆囊粘膜层,并将其剪成1 cm×1 cm小块,置于消化液中,37 ℃消化,并采用钝性擦刮法,每5 min收集1次消化液,共4次。消化液置于离心管,800 r/min,5 min×2弃上清,加入完全培养基,台盼蓝染色活细胞数大于95%,调整细胞浓度至(5~10)×10^4/ml,接种于12孔板,置37 ℃,5%CO_2培养箱培养。

1.2.3 每24 h行细胞计数,制作生长曲线,2~3 d换液1次,倒置显微镜观察细胞形态及贴壁情况。

1.2.4 将培养的细胞固定于载玻片上,采用人胆囊上皮细胞特异性标记CK19单抗,按常规方法[1]进行免疫组化染色,鉴定

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970039)
作者简介:陈东风(1964—),男,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝脏损伤与修复,胆囊炎、胆石症发病机制及消化介入研究,发表论文45篇,现在附属大坪医院野战外科研究所消化内科工作,重庆,400042。电话:(023)68757362
收稿日期:2001-06-09;修回日期:2001-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

是否为人胆囊上皮细胞。

2 结果

2.1 人胆囊上皮细胞的分离

本研究采用Ⅳ型胶原酶消化法效率高，对细胞损伤小，每个人胆囊可以分离得到(5～10)×10^7个胆囊上皮细胞，能满足培养的需要。

2.2 人胆囊上皮细胞的培养

2.2.1 人胆囊上皮细胞的生长曲线见图1 人胆囊上皮细胞体外培养1周内生长较为活跃，第3天细胞数达到最高值，维持2 d后开始下降，但1周内细胞数仍可维持较高水平，原代培养最长可达16 d。

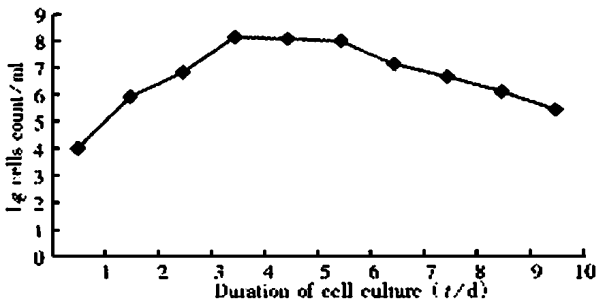


图1 人胆囊上皮细胞的生长曲线

Fig 1 Growth curve of HGBEC

2.2.2 形态和生长变化 人胆囊上皮细胞原代体外培养最初呈圆形或卵圆形，形态自然，1 d后出现典型分裂相，胞质内可见二倍体核型；进入第2天细胞分裂旺盛，相互聚积有贴壁倾向；第3天细胞明显贴壁，呈扁平多角形，胞质中央可见圆形细胞核，细胞间连接成片，此状态可持续到第7天，见图2。此后细胞分裂减慢，活细胞开始解离，至10 d细胞显著减少，14 d大部分细胞死亡，最长可存活16 d。形态观察表明，原代培养的人胆囊上皮细胞在1周内生长、分裂能力很强，此后逐渐减退。培养期1周内的HGBEC是进行相关研究的最佳时期。

2.2.3 培养细胞采用CK19免疫组化染色为棕黄色阳性反应，证明所分离培养细胞为HGBEC，见图3。

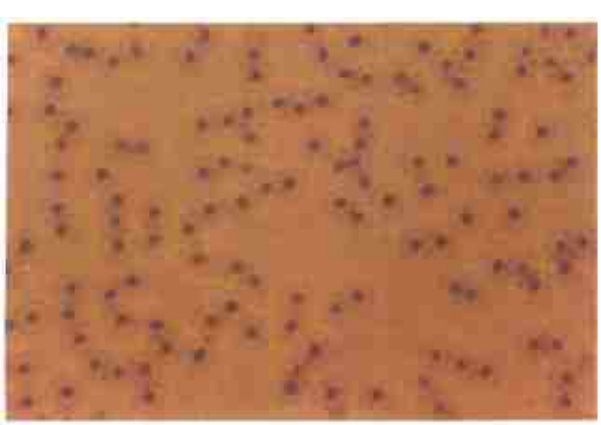


图2 培养的**HGBEC** (×400)

Fig 2 Cultured HGBEC (×400)



图3 培养的**HGBEC CK19**免疫组化染色阳性 (S-P×200)

Fig 3 Positive staining of CK19 in HGBEC (S-P×200)

3 讨论

人胆囊上皮细胞(HGBEC)与胆汁直接接触，它有分泌和吸收功能，在胆汁浓缩、结石形成中有着重要意义，同时也是许多病原体如细菌、寄生虫等作用的部位。胆囊上皮细胞的分离培养是研究胆囊疾病的基础[2]。与其它上皮细胞一样，胆囊粘膜上皮细胞分化程度高，生长条件要求苛刻，体外培养困难。1991年美国学者Oda[3]在世界上首次成功地建立了胆囊上皮细胞体外培养方法，而国内一直没有成功的报道。我们经过反复摸索，在国内成功地建立了人胆囊上皮细胞(HGBEC)的分离培养方法，结果令人满意。

将人胆囊上皮细胞从胆囊粘膜分离下来较为困难，既往文献常用胰酶-EDTA消化液分离法[4]，与我们选用的Ⅳ型胶原酶消化加钝性擦刮法相比，前者分离时间长，细胞解离不充分且损伤大，所得细胞极少，培养时细胞活性差，而我们的方法所得细胞数量多，形态自然，分离效果好。

判断细胞体外培养是否成功的重要标志是培养的细胞能否贴壁并排列成单层。培养于未包被塑料瓶中的HGBEC，始终处于悬浮状态，贴壁性很差，细胞分裂缓慢。我们将塑料瓶预先用Ⅳ型胶原和10%小牛血清联合包被后，培养的HGBEC第2天开始贴壁，第3天便可充分贴壁，细胞生长旺盛，呈六角形形态，平铺成单层，相互接触，甚至可形成腺管样结构。提示体外培养较困难的细胞，可采用预先包被培养器皿的办法。

HGBEC对培养液要求较高，我们发现它在1640培养液生长缓慢，细胞死亡快，即使增加接种量也不能明显延长存活时间。可能由于1640培养液不含无机盐和次黄嘌呤等HGBEC生长所需物质。我们将HGBEC置于营养丰富的DMED、HAM F12培养基中，细胞生长旺盛，贴壁快，迅速形成单层，培养效果满意，完全能满足研究的需要。为进一步研究胆囊上皮细胞分泌、吸收、

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

离子转运、调控等功能及变化的意义奠定了基础。

参考文献：

[1] 蔡文琴，王伯行，主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 496－497.
[2] Moser A J, Giurgiu D I, Morgenstern K E, *et al*. Calmodulin regulation of gallbladder ion transport becomes dysfunctional during gallstone formation in prairie dogs[J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(7): 1 422－1 430.
[3] Oda D, Lee S P, Hayashi A. Long-term culture and partial characterization of dog gallbladder epithelial cells[J]. Lab Invest, 1991, 64(5): 682－691.
[4] Purdum P P, Ulissi A, Hylemon P B, *et al*. Culture human gallbladder epithelia[J]. Lab Invest, 1993, 68(3): 345－353.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2001)09-1111-01

个案与短篇

穿透性角膜移植联合白内障摘除人工晶体植入术的临床探讨

Clinical exploration on tri-combination of penetrating keratoplasty, cataract extraction and artificial lens implantation

曹建琴，周丽钧，董凌峰 （无锡市第二人民医院眼科，无锡 214002）

随着眼科显微手术的发展，穿透性角膜移植术联合白内障摘除人工晶体植入术（三联术）日益成熟。我院自 1997 年以来，对 11 例患者行三联术，现将临床结果报告如下。

1 资料与方法

临床资料：本组共 11 例，其中男性 5 例，女性 6 例，儿童 2 例，年龄最小 4 岁，最大 68 岁，平均 55 岁，患者时间 6 个月至 605 个月，平均 122 个月。粘连性角膜白斑 6 例，陈旧性色素膜炎，角膜溃疡穿孔 2 例，青光眼术后角膜变性葡萄肿 1 例，角膜外伤并发白内障 2 例，视力光感 4 例，眼前手动 5 例，数指 2 例。

供眼材料来自外伤后去世的自愿捐献者，去世后 10 min 内摘除眼球，放在 0℃湿房保存，保存时间不超过 24 h，供体年龄 20～30 岁，术前用二性霉素液、林可霉素液、庆大霉素液浸泡 5 min，屈光度数参照健眼及患眼发病前视力及屈光状态估算，法国 BVI 公司 AB-SCAN，SPK-2 公式计算人工晶体植入度数。

方法：本组 11 例，术前滴美多丽眼液散瞳均无效，常规 2％利多卡因 5 ml＋0.75％布比卡因 5 ml 混合液后经行球周麻醉，间歇压迫眼球约 15 min，在显微镜下进行，常规逢置 FLIERINGA 巩膜环，常规作植床，另 1 组人员取供体角膜植片，术中发现前房消失 4 例，瞳孔不能见及，5 例虹膜有不同程度后粘连，受体剥离角膜前部板层，占角膜厚度 1/2，后常规行白内障摘除，植入后房人工晶体后，然后去掉全层穿适残余角膜基质层（1/2 角膜厚度），本覆盖角膜移植片，取尼龙线（10-0）于 12：00，6：00，3：00，9：00 方位间段缝合 4 针后每象限间断缝合 3～4 针，共 16～20 针。BSS 液注入前房，使前房形成，2 例因后囊破裂。玻璃体脱出，充分剪除脱出之玻璃体后，行前房人工晶体植入，术后 20％甘露醇＋地塞米松 5 mg/d 和林可霉素 1.8 万 U＋5％葡萄糖 500 ml 静脉滴注 1 d，连续滴注 3 d。

2 结果

经观察 10～36 个月，平均 20 个月，植片透明 7 例，2 例半透明，排斥反应 2 例，致角膜全混，植片半透明和全混均为排斥反应引起，其中 1 例 7 岁女孩排斥反应及继发性青光眼拒绝手术而失明，1 例失明 50 年已为弱视视力未恢复。余手术后视力不同程度提高，最低 0.02，最高 0.2，排斥发生时间 6～12 个月。

3 讨论

随着白内障摘除技术的提高及新器械的出现，使联合手术颇为安全，本组 1 例系独眼，1 例青光眼术后并发性白内障，角膜变性行三联术后迅速复明，视力达 0.1，故独眼亦非该术式的禁忌症，在做白内障囊外摘除时，强调将晶体皮质除净，因为皮质残留会增加色素膜炎，人工晶体植入均从中央受植孔插入，术中需注意前房型人工晶体支架不能与角膜内贴，或使用缝合后房型人工晶体。后房型人工晶体的光学镜面必须居中，术后视力恢复取决于多的因素，如术前眼部本身条件屈光状态与人工晶体屈光度的匹配，角膜移植缝合本身引起的角膜散光等的问题。本组视力不良与排斥反应有关和病程长有弱视存在。排斥反应 2 例均为前房型人工晶体，所以如行白内障囊外摘除，后囊膜破裂时，还是用悬吊人工人晶体取代较好。

Arentsen 等[1]曾对分期和联合手术比较，认为两者效果相同，但我们认为联合手术如分期次，既延迟了复明的时间，增加了手术次数，又可能造成角膜植片细胞的严重损失，甚至引起角膜植片的永久性浑浊，不利于复明。本手术的缺点，为术前不能详细了解术眼屈光度，只能以另眼作参数，其次眼后段的病变不能直接观察到，只能依靠电生理的检查手段，推测术后视力的恢复，前房型人工晶体对角膜移植患者慎用，因可能引起角膜内皮的损伤，这可能因前房型人工晶体放在房角增加了与角膜植片接触的机会；手术操作时植片内皮细胞损伤及术后引起色素膜炎有关[2]，尤其小孩术后不能配合检查者，三联手术应慎用。

关键词：穿透性角膜移植；白内障；人工晶体植入
中图法分类号：R779.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] Arentsen J J, Laibson P R. Penetrating keratoplasty and cataract extraction: combined vs nonsimultaneous surgery[J]. Arch Ophthalmol, 1978, 96(1): 75－76.
[2] 郑一仁，盛敏杰. 穿透性角膜移植与白内障摘除及人工晶体植入联合手术的临床观察[J]. 中华眼科杂志，1990, 26(3): 135.

（编辑 潘式文）

作者简介：曹建琴（1955－），女，江苏省无锡市人，主治医师，主要从事角膜移植方面的研究。电话：(0510)2727501-3029

收稿日期：2001-05-30；修回日期：2001-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net