

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.22.026

肝细胞生长因子与表皮生长因子联合培养人胆囊上皮细胞的研究*

邓世康,袁 珺,王连敏,王 滔,邹 浩,张小文[△]
(昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科二病区,昆明 650101)

摘要:目的 建立体外联合肝细胞生长因子(HGF)和表皮生长因子(EGF)培养人胆囊上皮细胞(HGBECs)方法。方法 先剥离上皮,采用反复Ⅳ型胶原酶消化配合刮取 HGBECs,制备成单细胞悬液进行接种,细胞分别接种于含或不含 10 ng/mL EGF 以及含 10 ng/mL HGF+10 ng/mL EGF 的培养基进行原代培养。倒置显微镜下观察细胞生长的形态变化,细胞计数、噻唑蓝(MTT)法检测 HGF+EGF 对 HGBECs 增殖的影响。结果 成功培养 HGBECs。添加 HGF+EGF 组较添加 EGF 组 HGBECs 增殖速度快且维持时间长;体外存活时间明显延长(19.3±2.5)d vs. (14.2±2.4)d, $P<0.05$,细胞活力和细胞形态优于只添加 EGF 组。结论 HGF 联合 EGF 可以明显地促进 HGBECs 增殖,延长细胞体外存活时间,较长时间稳定细胞形态。

关键词:胆囊;上皮细胞;肝细胞生长因子;表皮生长因子
中图分类号:R34 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)22-2903-04

Experimental research of combined hepatocyte growth factor with epidermal growth factor cultured human gallbladder epithelial cell*
Deng Shikang, Yuan Jun, Wang Lianmin, Wang Tao, Zou Hao, Zhang Xiaowen[△]
(The Two Ward, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China)

Abstract: Objective To establish the method of combined hepatocyte growth factor(HGF) with epidermal growth factor(EGF) cultured human gallbladder epithelial cells(HGBECs) in vitro. **Methods** The epithelial layer was peeled away from human gallbladder, epithelial layer were digested with collagenase Ⅳ and scraped repeatedly. HGBECs were isolated and seeded in cell culture plates containing medium supplemented with or without 10 ng/mL EGF or with 10 ng/mL HGF and 10 ng/mL EGF respectively. Then the morphologic changes of the cells were observed and taken photos with inverted phase contrast microscope, and counted number of cells, MTT assay detected vigor of cells in different groups. **Results** The number of the HGBECs of the HGF+EGF group was obviously more than the EGF group, the duration of the HGBECs of the HGF+EGF group was obviously longer than the EGF group(19.3±2.5)d vs. (14.2±2.4)d, $P<0.05$. And the HGBECs of the group with HGF+EGF had better cell vigor. **Conclusion** HGF combines with EGF added to medium can obviously promote the proliferation of HGBECs and prolong the duration and stabilize morphology of HGBECs in vitro.

Key words: bile duct; epithelial cells; hepatocyte growth factor; epidermal growth factor

胆囊上皮细胞和胆管上皮细胞一样,是一种高氧耗、高代谢、低缺氧耐受的细胞群体,由于胆囊上皮细胞这些特殊的生物学特征,使其体外培养很困难。通过创新培养方法后成功培养出了人胆囊上皮细胞(human gallbladder epithelial cells, HGBECs),不仅能使其存活时间延长,还能维持其生物学特征。胆囊结石、胆囊息肉和胆囊癌等胆囊疾病的发病都与胆囊上皮细胞密切相关,研究胆囊上皮细胞,可以更为准确了解胆囊疾病乃至胆管疾病的发病机制、诊断和治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人胆囊标本 标本来源于昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科二病区经手术治疗胆囊息肉的患者,并且经院伦理委员会及患者同意。

1.1.2 试剂 (1)完全培养基Ⅰ:DMEM/F12 培养基(Hyclon 公司)中加入 20%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco 公司),1%青/链霉素(双抗)(索莱宝公司)。(2)完全培养基Ⅱ:DMEM/F12 培养基中加入 10 ng/mL 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF, PeproTech 公司),20%FBS,1%双抗。

(3)完全培养基Ⅲ:DMEM/F12 培养基中加入 10 ng/mL EGF (PeproTech 公司),10 ng/mL 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF, PeproTech 公司),20%FBS,1%双抗。Ⅳ型胶原酶(索莱宝公司),胰酶(索莱宝公司),DNase I(索莱宝公司),纤维连接蛋白(Pro Specbio 公司),细胞角蛋白 19 抗体(Epitomics 公司),荧光二抗(KPL 公司),噻唑蓝(MTT,索莱宝公司)。

1.2 方法

1.2.1 HGBECs 的分离、纯化与培养 取下患者胆囊,避开息肉部位切取约 2 cm×2 cm 胆囊组织,生理盐水冲洗 3 遍。用预冷的含 1%双抗的 PBS 冲洗 3 遍。将组织转移至盛有预冷 DMEM/F12 培养基的 60 mm 培养皿中,剥取上皮。将上皮转移至 35 mm 培养皿(1 号)中,加入预温的Ⅳ型胶原酶(含 20 μ/mL DNase I)2 mL 将整个上皮组织浸泡,37℃消化 30 min,每 10 min 振荡 1 次。将组织转移至 35 mm 培养皿(2 号)中,用手术刀片反复刮取上皮,用 DMEM/F12 培养基冲洗组织后,再将组织放回 1 号培养皿中继续消化 30 min,如此反复 3 次。将 2 号培养皿中的液体用吸头吹打 10 多次后,200 目不

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260084);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目(2011FB162)。 作者简介:邓世康(1984—),在读博士,主要从事肝胆胰外科基础与临床研究。 △ 通讯作者, Tel:13708407121; E-mail:zhangxiaowenlu@hotmail.com。

锈钢筛网过滤细胞悬液。800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀重悬于 DMEM/F12 培养基中, 再次 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀重悬于含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基中, 接种到 60 mm 的培养皿中, 37 °C 培养 1 h。轻轻吸取培养基, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀分别重悬于 I、II、III 完全培养基中。台盼蓝染色活细胞计数, 调整细胞浓度至 $(1 \sim 3) \times 10^6$ /mL 接种于 12 孔培养板中用纤维连接蛋白包被好的细胞爬片上, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后换液, 以后每 2~3 d 换液 1 次。每天用倒置显微镜观察细胞形态及其生长的基本情况。

1.2.2 培养细胞的免疫荧光化学鉴定 细胞培养 6 d 后, 吸弃培养液; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 4% 多聚甲醛固定 15 min; 含 0.03% Triton 的 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 3% 胎牛血清蛋白封闭 1 h; 含 0.03% Triton 的 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 1:250 稀释的一抗 (兔抗人多克隆抗体), 4 °C 过夜; 含 0.03% Triton 的 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 1:1 000 稀释的荧光二抗 (羊抗兔), 避光孵育 30 min; 避光 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 含 0.5 μg/mL DAPI 的封片液封片。阴性对照组用含 0.03% Triton 的 PBS 代替一抗。

1.2.3 细胞分组、测量存活时间和细胞计数 (1) 细胞分组: 根据添加生长因子的不同, 将细胞分为未添加细胞因子组、添加 EGF 组、添加 EGF+HGF 组。(2) 测量细胞存活时间: 以细胞开始出现空泡当天为存活到最后 1 d, 测量每组 12 孔细胞的存活时间。(3) 细胞计数: 分别于培养第 3~10 天从每组中随机抽取 3 孔, 每孔在 20 倍镜下采集 3 个视野; 计数每个视野中上皮细胞的数目。

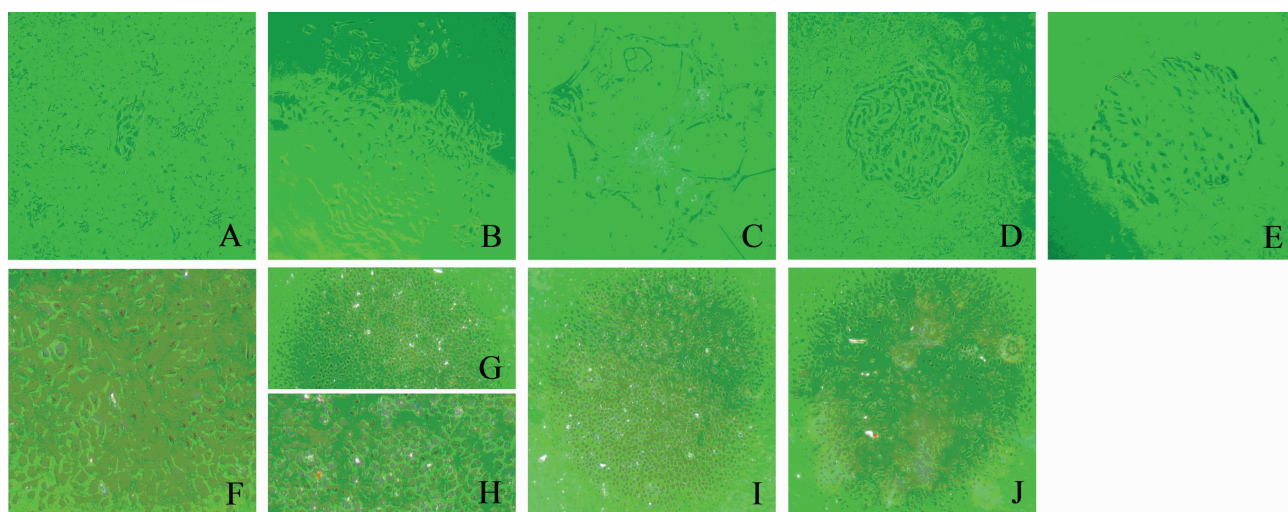
1.2.4 MTT 法测定细胞活力 将细胞以每孔 1×10^4 个细胞接种于纤维连接蛋白包被的 96 孔培养板中, 分别用 I、II、III 完全培养基培养。分别于培养第 3~10 天后加入 MTT 溶液

20 μL, 37 °C 培养箱中维持 4 h, 小心吸弃孔内培养基, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min 后, 酶标仪在波长 570 nm 处测定 OD 值。每组设 3 复孔, 重复 3 次, 以不加细胞只加培养基的孔为空白对照孔。以时间为横轴, 吸光度值均值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.3 统计学处理 所有实验数据用 SPSS17.0 统计软件包进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态和生长特性 原代培养的胆囊上皮细胞接种 1 d 可见细胞贴壁, 3 组细胞在 3 d 时形态相似, 即成大小不等的“细胞岛”(图 1A)。未添加细胞因子组细胞形态呈锥形, 生长缓慢, 6 d 左右细胞间连接松散(图 1B), 至 9 d 左右细胞出现拉丝现象, 细胞质内出现大小不等的空泡, 细胞变大逐渐死亡(图 1C), 平均存活时间为 (10.3 ± 2.2) d。添加 EGF 组细胞形态在 6 d 时形成多边形或者锥形并形成较大的“细胞岛”(图 1D), 生长较未添加细胞因子组快, 细胞数量增多, 9 d 左右“细胞岛”逐渐扩大(图 1E), 细胞间连接也比未添加细胞因子组紧密, 12 d 左右细胞间连接开始松散, 细胞形态接近多边形(图 1F), 平均存活时间为 (14.2 ± 2.4) d。与未添加细胞因子组相比, 存活时间明显延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。EGF+HGF 组细胞形态在 6 d 左右近似多边形, 细胞排列紧密, 呈典型的“铺路石”状生长(图 1G、H), 细胞增殖快, 立体感强, 细胞密度加大, 此时细胞生长状态最佳, 9 d 时细胞继续生长(图 1I), 18 d 左右细胞形态开始由多边形变成梭形, 细胞间隙加大(图 1J), 21 d 左右细胞出现空泡并逐渐死亡, 平均存活时间为 (19.3 ± 2.5) d。与添加 EGF 组比较, 存活时间显著延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), EGF 联合 HGF 培养更能长时间维持胆囊上皮细胞的形态。



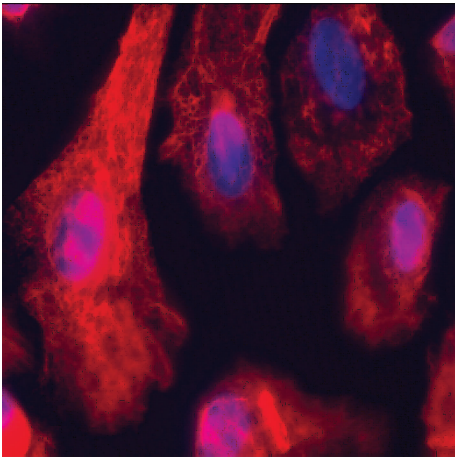
A: 未添加细胞因子组细胞培养 3 d 生长情况 ($\times 200$); B: 未添加细胞因子组细胞培养 6 d 生长情况 ($\times 200$); C: 未添加细胞因子组细胞培养 9 d 生长情况 ($\times 400$); D: 添加 EGF 组细胞培养 6 d 生长情况 ($\times 200$); E: 添加 EGF 组细胞培养 9 d 生长情况 ($\times 200$); F: 添加 EGF 组细胞培养 12 d 生长情况 ($\times 200$); G: 添加 HGF+EGF 组细胞培养 6 d 生长情况 ($\times 40$); H (G 图的放大): 添加 HGF+EGF 组细胞培养 6 d 生长情况 ($\times 200$); I: 添加 HGF+EGF 组细胞培养 9 d 生长情况 ($\times 40$); J: 添加 HGF+EGF 组细胞培养 18 d 生长情况 ($\times 40$)。

图 1 各组细胞不同培养时间的生长情况

2.2 细胞鉴定 细胞角蛋白 19 (cytokeratin-19, CK-19) 是胆管上皮细胞的特异性标志物, 肝细胞和成纤维细胞均不表达, 可用于鉴定胆管上皮细胞。荧光染色后可见细胞呈多边形, 细胞间紧密连接, 细胞核呈椭圆形位于细胞质中央(图 2)。

2.3 细胞计数结果 统计结果显示, 培养 3 d 和 4 d 时, 细胞计数 3 组间两两比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 5~10 d, 添加 HGF+EGF 组细胞数量明显多于添加 EGF 组, 添加 EGF 组明显多于未添加细胞因子组, 差异均有统计学意

义($P<0.05$,表 1)。未添加细胞因子组细胞在培养第 5~8 天生长活跃,第 9 天后生长减慢;添加 EGF 组细胞第 5~8 天增殖快,第 9 天后进入平台期,衰减趋势低于未添加细胞因子组;添加 HGF+EGF 组细胞至第 10 天增殖仍然迅速,生长旺盛,与未添加细胞因子组和添加 EGF 组比较具有较好的生长优势,见图 3。



细胞质 CK-19 染色阳性,呈红色;细胞核为 DAPI 染色,呈深蓝色。

图 2 人胆囊上皮细胞 CK-19 鉴定(×630)

2.4 MTT 检测结果 结果显示,培养 3 d 和 4 d 时,3 组间两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。培养 5 d 时,与未添加

细胞因子组比较,添加 EGF 组细胞活力没有明显增强,差异无统计学意义($P>0.05$);与添加 EGF 组细胞比较,添加 HGF+EGF 组细胞活力明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。培养 6~10 d,添加 HGF+EGF 组细胞活力显著高于其他两组,其活力在培养 8 d 时下降,但幅度缓慢,添加 EGF 组细胞活力优于未添加细胞因子组,差异均有统计学意义(表 2)。未添加细胞因子组细胞在培养第 4~6 天活力上升,第 9 天后迅速衰减;添加 EGF 组细胞第 4~7 天增殖快,之后进入平台期,第 9 天后逐渐减低,衰减趋势低于未添加细胞因子组;添加 HGF+EGF 组细胞在第 9 天活力最强,之后逐渐衰减,与未添加细胞因子组和添加 EGF 组比较,能较长时间维持细胞活力(图 4)。

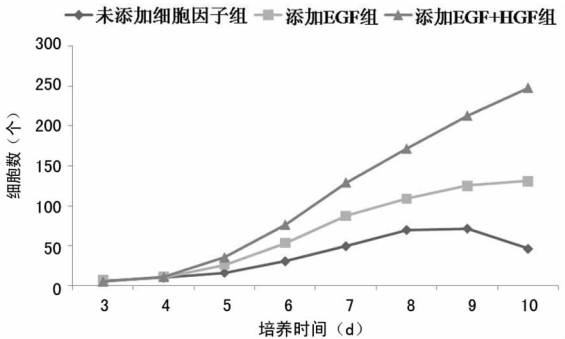


图 3 3 组细胞培养生长情况

表 1 各组人胆囊上皮细胞计数比较($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	培养时间							
	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
未添加细胞因子组	5.6±2.1	9.7±3.2	16.0±3.0	30.3±1.5#	49.3±3.1	69.7±4.9	71.3±8.1	46.0±4.4#
添加 EGF 组	6.3±3.1	10.7±4.5	26.0±3.7*	53.3±4.7#	87.3±3.1*	108.7±5.5*	125.0±11.0*	131.0±17.1#
添加 EGF+HGF 组	5.0±1.2	11.0±4.6	35.3±2.1*▲	76.3±4.0#	129.3±12.0◆	171.7±12.1◆	213.0±10.1◆	248.0±4.6#

*: $P<0.05$,与未添加细胞因子组比较;▲: $P<0.05$,与添加 EGF 组比较;#: $P<0.001$,3 组间两两比较;◆: $P<0.001$,与未添加细胞因子组和添加 EGF 组分别比较。

表 2 MTT 检测各组人胆囊上皮细胞活力($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	培养时间							
	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
未添加细胞因子组	0.254±0.093	0.297±0.084	0.423±0.075	0.513±0.113	0.522±0.054	0.504±0.087	0.453±0.087	0.285±0.121
添加 EGF 组	0.247±0.132	0.287±0.077	0.442±0.088	0.574±0.045*	0.633±0.057*	0.626±0.056*	0.586±0.097*	0.493±0.110*#
添加 EGF+HGF 组	0.256±0.110	0.307±0.067	0.538±0.079▲	0.726±0.077▲#	0.744±0.048▲#	0.716±0.046▲#	0.697±0.076▲#	0.643±0.098▲#

*: $P<0.05$,与未添加细胞因子组比较;▲: $P<0.05$,与添加 EGF 组比较;#: $P<0.001$,与未添加细胞因子组比较。

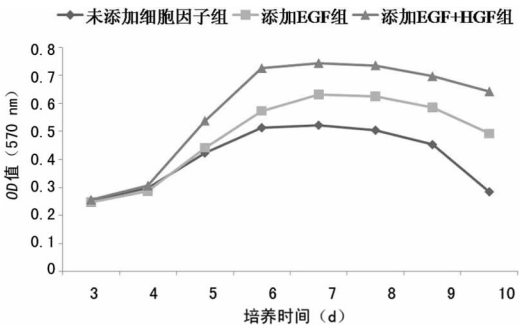


图 4 3 组细胞 MTT 检测情况

3 讨 论

本实验在 Joplin 等^[1-4]研究的基础上改良了胆囊上皮细胞的培养方法,成功培养胆囊上皮细胞,并能稳定维持 19 d 左右。在培养方法上有较多创新,如本实验首次采用首先剥离上皮的方法,可以最大限度减少其他细胞,尤其是纤维细胞的污染,得到的细胞纯度较高;由于胆管上皮细胞仅占肝细胞总数的 3%~5%,采用反复酶消化和刮取上皮组织,这样可以收集到较多上皮细胞;加入 EGF 和 HGF,同时把胎牛血清浓度提高到 20%,以满足胆囊上皮细胞特殊的生物学特性。本实验方法的建立能够有效地为肝胆疾病的研究提供技术支撑。

CK 属于中间纤维蛋白家族,是细胞骨架的构成部分,CK-19 只在胆管肿瘤细胞、胆管上皮细胞及其祖细胞中表达,在肝细胞、肝干细胞及肝肿瘤细胞中不表达,因此 CK-19 是目前公认的胆管上皮细胞的特征性标记物^[5]。

EGF 是细胞培养中常用的添加剂,国内外文献报道^[6-8]在肝内外胆管上皮细胞培养中绝大多数都使用了 EGF,因其能够促进肝细胞和胆管上皮细胞的增殖^[9-10]。

HGF 是成熟肝细胞 DNA 合成最强的刺激因子和肝损伤后再生的激发因子,是肝非实质细胞的一种有效促分裂剂^[11]。HGF 广泛分布于肝脏各种细胞,肿瘤细胞等多种细胞中。HGF 具有许多生物学功能,但对肝细胞的作用最为显著,表现在 HGF 可以抑制肝细胞凋亡,促进肝细胞再生,恢复肝细胞功能。HGF 可通过抑制转化生长因子的表达从而抑制了肝^[12]、肾^[13]、肺^[14]等器官的纤维化过程。目前知道 HGF 能促进胆管上皮细胞增殖,但 HGF 与胆囊、胆管关系的研究并不多见。有学者联合应用 HGF 和 EGF 成功地分别将胚胎干细胞^[15]和骨髓间充质干细胞^[16]诱导向胆管上皮样细胞分化,HGF 联合 EGF 能诱导干细胞向胆管上皮样细胞分化,说明在胆管上皮细胞的发生、生长、存活乃至结构和功能上,HGF 和 EGF 发挥着协同促进的作用。因此,笔者联合应用 HGF 和 EGF 培养人胆囊上皮细胞,发现联合组细胞存活时间 $(19.3 \pm 2.5)\text{d}$ 比只用 EGF 培养的细胞存活时间 $(14.2 \pm 2.4)\text{d}$ 长 5 d 左右,细胞活力强,能较长时间维持细胞间的紧密连接和典型的“铺路石”状态,尽管 HGF+EGF 组细胞活力在 8 d 时下降,但幅度比 EGF 组和无细胞因子组缓慢,而且 HGF+EGF 组细胞在 8 d 以后仍然持续增殖,说明 HGF 对胆囊上皮细胞的存活和生长具有促进作用。笔者通过创新和改良了人胆囊上皮细胞的培养方法,显著促进其增殖,延长其体外存活时间和形态特征。这种新方法的建立将为未来肝胆细胞的研究提供坚实基础。

参考文献:

- [1] Joplin R, Kachilele S. Human intrahepatic biliary epithelial cell lineages: studies in vitro[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 481: 193-206.
- [2] Hashimoto W, Sudo R, Fukasawa K, et al. Ductular network formation by rat biliary epithelial cells in the dynamical culture with collagen gel and dimethylsulfoxide stimulation[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(2): 494-506.
- [3] Nagaya M, Katsuta H, Kaneto H, et al. Adult mouse intrahepatic biliary epithelial cells induced in vitro to become insulin-producing cells[J]. *J Endocrinol*, 2009, 201(1): 37-47.
- [4] Ishida Y, Smith S, Wallace L, et al. Ductular morphogenesis and functional polarization of normal human biliary epithelial cells in three-dimensional culture[J]. *J Hepatology*, 2001, 35(1): 2-9.
- [5] Ochiai K, Yamamoto S, Ando H. Isolation and culture of biliary epithelial cells from bile duct remnants of patients with biliary atresia[J]. *Pediatr Surg Int*, 2004, 20(9): 685-688.
- [6] 柴成伟, 郑帅玉, 魏明发, 等. 表皮生长因子对小鼠肝外胆管上皮细胞原代培养的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(20): 3057-3060.
- [7] Komori A, Nakamura M, Fujiwara S, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cell as a possible modulator of hepatic regeneration: Potential role of biliary epithelial cell for hepatic remodeling in vivo[J]. *Hepatol Res*, 2007, 37(3): 438-443.
- [8] Katayanagi K, Kono N, Nakanuma Y. Isolation, culture and characterization of biliary epithelial cells from different anatomical levels of the intrahepatic and extrahepatic biliary tree from a mouse[J]. *Liver*, 1998, 18(2): 90-98.
- [9] Efimova EA, Glanemann M, Liu L, et al. Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Eur Surg Res*, 2004, 36(5): 300-307.
- [10] Joplin R, Hishida T, Tsubouchi H, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor[J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(4): 1284-1289.
- [11] 吕璟. 肝再生相关细胞因子的探究[J]. *解剖科学进展*, 2005, 11(2): 174-179.
- [12] Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, et al. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(5): 1500-1512.
- [13] Schievenbusch S, Strack I, Scheffler M, et al. Combined paracrine and endocrine AAV9 mediated expression of hepatocyte growth factor for the treatment of renal fibrosis[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(7): 1302-1309.
- [14] Long X, Xiong SD, Xiong WN, et al. Effect of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA with electroporation on bleomycin-induced lung fibrosis in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(16): 1432-1427.
- [15] Hu AB, He XS, Cai JY, et al. Biliary epithelial cell differentiation from embryonic stem cells in vitro[J]. *J Clin Rehabil Tis Engin Res*, 2008, 12(9): 5783-5787.
- [16] Zhang C, Yang YL, Lin MJ, et al. In vitro induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into bile duct epithelial-like cells[J]. *Chin J Tis Engin Res*, 2013, 17(1): 17-22.

(收稿日期: 2013-12-08 修回日期: 2014-03-20)