

## · 实验研究 ·

# 美宝胃肠胶囊维持胚胎小白鼠胃组织器官型植块存活及促进细胞增殖

徐荣祥, 王运平, 范然, 王建虹, 林海

**【摘要】** 目的:通过体外检测美宝胃肠胶囊(GIC)对胚胎小白鼠胃组织器官型植块生长的影响以探索 GIC 修复胃肠道粘膜损伤的机理。方法:体外培养胚胎小白鼠胃器官型植块,将植块分为两组:实验组和对照组。结果:实验组的胃器官型植块能很好地维持存活,从其中长出的单个细胞以及细胞克隆生长好、生长时间长。而对照组的胃器官型植块很快变性死亡。二者差异非常显著。结论:GIC 能维持胚胎小白鼠胃器官型植块存活并促进来自植块的细胞和细胞克隆的生长,并且此过程可能与 GIC 激活上皮干细胞有关。

**【关键词】** GIC;胃植块;生长

**【中图分类号】**R573.0954.48;Q253 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1001-0726(2001)04-0209-06

**GIC Could Maintain Survival and Promote Cell Growth of Organ - Type Explants of Stomach of Mouse Embryo** Xu Rong-xiang, Wang Yun-ping, Fan Ran, et al. Central laboratory, MEBO Global Group 100053

**【Abstract】** **Objective:** To research on the reparative mechanism of GIC on the lesion of gastrointestinal tract through testing the effect of GIC on survival and growth of organ - type explants of gastric tissue of mouse embryo. **Method:** Cultured the organ - type explants of gastric tissue of mouse embryo in vitro, all the explants were divided into two groups: test group and control group. **Results:** Explants in test group could survive, single cells and cell clones from explants grew well and long. However, explants, cells and cell clones in control group died off after a short period of time. There was significant difference between two groups. **Conclusion:** MEBO could promote survival and growth of cells of gastric explants of mouse embryo and this process may be related to activation of epithelial stem cells.

**【Key words】** GIC; gastric explant; growth

**【CLC number】**R573.0954.48;Q253 **【Document code】**A **【Article ID】**1001-0726(2001)04-0209-06

本实验的目的在于通过体外检测 GIC 对胚胎小白鼠胃组织器官型植块生长的影响以初步探讨 GIC 治疗粘膜损伤性疾病的机理。

## 一、仪器、设备、材料、试剂及实验动物

超净工作台(北京半导体设备二厂)、CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Forma)、超级恒温水浴及恒温电烤箱(重庆四达)、冰箱(江苏长岭)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、显微成像分析系统(上海科瑞)、微波炉(广东 Galanz)、微型计算机(北京沐泽)、光学显微镜(江苏光学仪器厂)、各种型号注射器、12 孔培养板(丹麦 NUNC)、50ml 离心管、Eppendorf 离心管、微量加样器(1000 $\mu$ l、200 $\mu$ l、20 $\mu$ l、10 $\mu$ l,均为法国 Gilson)、大小滴头、培养皿( $\Phi$ 5cm、 $\Phi$ 6cm)、0.22 $\mu$ m 微孔滤膜、针头滤器、各种眼科手术器械、显微外科器械、有盖三角烧瓶、有盖小试管、针头、GIC(本公司生产)、MEM 培养基(美国 Hyclone)、胎牛血清(杭州三利)、青霉素和链霉素(华北制药)等。

实验动物:昆明种胚胎鼠。

## 二、实验方法:

1. 取一只孕 16 日龄的昆明种雌性小白鼠, 颈椎脱臼法处死, 先置于 75% 乙醇中浸洗一遍 (2 分钟), 再置于 75% 乙醇中消毒 5 分钟;
2. 用眼科剪以及止血钳先剪开雌鼠的腹部皮肤, 钝性分离至两侧, 充分暴露腹壁肌肉, 然后小心剪开腹壁全层, 切勿伤及内脏及小鼠胚胎;
3. 剪开子宫, 从宫腔中取出胚胎鼠, 置入无菌平皿中;
4. 用双抗—冷 PBS 将胚胎鼠体表洗涤两次, 每次 1 分钟;
5. 用显微外科剪刀将胚胎鼠的腹壁剪开, 再用显微外科镊子夹起鼠胃, 自贲门及幽门部切断, 得到全胃, 切掉并弃去近贲门的 1/3, 然后沿胃大弯处纵行切开鼠胃, 充分暴露胃粘膜;
6. 用双抗—冷 PBS 将胚胎鼠胃连续洗涤两次, 每次 1 分钟;
7. 将鼠胃置于含双抗的 MEM 培养液中浸洗 2 次, 每次 1 分钟;
8. 将鼠胃剪成极小的器官型植块, 面积约 1mm × 1mm;
9. 将植块置于 12 孔培养板的培养孔中央, 每孔 5 块, 间隔约 2mm, 布局合理, 粘膜面向上, 轻轻按压每块植块, 使其紧贴培养板的表面;
10. 沿培养孔的边缘, 缓慢加入约 0.5ml 的完全 MEM 培养液, 勿使培养液与植块接触;
11. 将培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中预孵育 1 小时;
12. 每孔加完全 MEM 培养液 2ml, 轻拿轻放, 切勿使植块飘起, 实验组加 GIC;
13. 实验组和对照组同步等量换液, 每次去掉原液的 1/2 左右, 再加入相同量的新鲜 MEM 培养液;
14. 用倒置显微镜观察植块生长情况, 用显微成像记录分析系统记录所观察的结果, 并用计算机保存图像。

### 三、实验结果

细胞全程培养 111 天以内的报告 培养过程中未出现污染, 实验组和对照组的胃组织植块刚开始培养时, 能固定在培养孔中央, 但随着培养时间的延长, 植块先后慢慢脱离培养孔底部, 游离飘浮于培养液中, 但仍然贴近培养孔底部, 并且大多集中于培养孔中央, 植块的大小和形状几乎没有变化。这是培养前 7 天的情况。

实验组植块和对照组植块在培养的前 7 天, 组织块是完整的, 但从培养的第 8 天开始, 组织块就开始逐渐松解, 并最终成为肉眼不易察觉的组织块, 同时在实验组和对照组的视野中出现了单个细胞以及细胞克隆, 在体外培养的第 18 天, 对照组中的单个细胞以及细胞克隆逐渐变黑、皱缩、死亡、硬结, 而此时实验组的细胞生长继续呈现良好的生长态势, 单个细胞很多, 在视野中到处可见, 细胞类型大多为圆形或椭圆形, 细胞核清晰, 细胞是典型的活细胞, 以培养孔中央数量最多, 越靠近培养孔边缘细胞越少, 边缘几乎没有, 同时细胞克隆数也逐渐增多, 每个克隆所含有的细胞个数也越来越多。这种明显的差别在其它器官型植块的培养中也曾经反复出现过, 主要与营养物质供应有关。颜色变深往往是组织细胞变性坏死的前兆, 说明单纯的 MEM 培养基无法提供给组织块合适而充足的营养, 恰恰相反, GIC 以其丰富的营养从一开始便能使组织处于一个与体内环境相差不大的生长环境中, 充分保证了组织和细胞的活性。

下面为实验组和对照组的对比图, 从中可以看到差别是何等之明显。

图1 培养第24天。图1A为对照组，图1B为实验组。对照组中的胃组织细胞或细胞克隆已经死亡，实验组中显示的是细胞克隆。

图1A

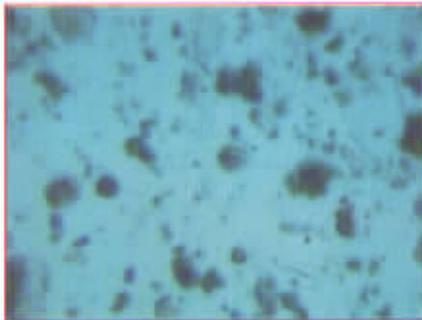


图1B

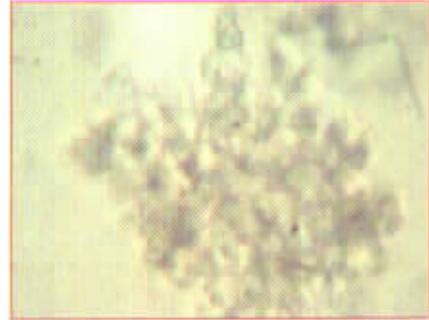


图2 培养第30天。图2A为对照组，图2B为实验组。对照组中残留的是胃组织细胞碎片，实验组中是一个细胞克隆。

图2A

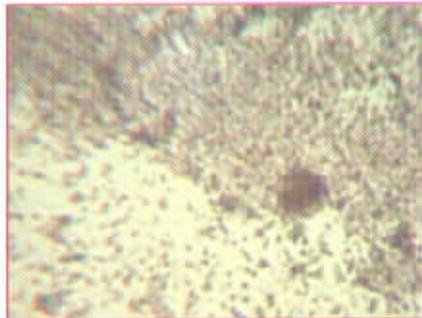


图2B



图3 培养第38天，图3A为对照组，图3B为实验组。对照组中残留的是胃组织细胞碎片，实验组中是一个细胞克隆，克隆中的细胞生长良好。

图3A



图3B

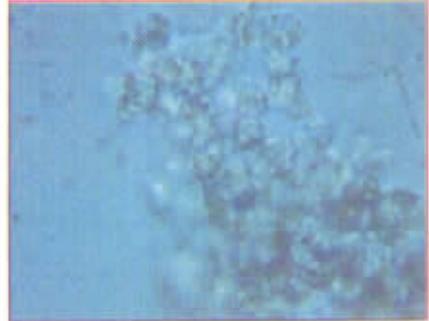


图4 培养第42天，图4A为对照组，图4B为实验组。对照组中残留的是胃组织细胞碎片以及细胞克隆碎片，实验组中是细胞克隆。

图4A

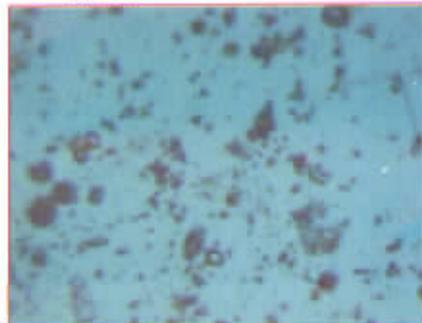


图4B

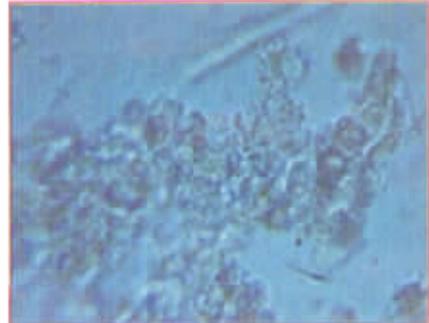


图5 培养第50天,图5A为对照组,图5B为实验组。对照组中为已经死亡的胃组织细胞,实验组中是弥漫生长的胃组织细胞。

图5A

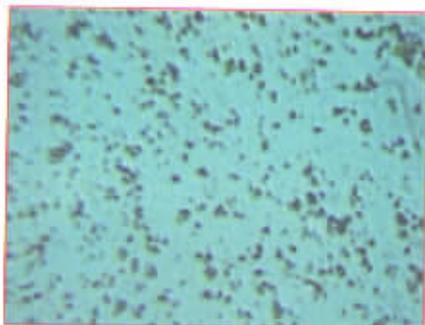


图5B



图6 培养第70天,图6A为对照组,图6B为实验组。对照组为位于培养孔中央的已经死亡的胃组织细胞和细胞克隆,实验组中是弥漫生长的胃组织细胞。

图6A

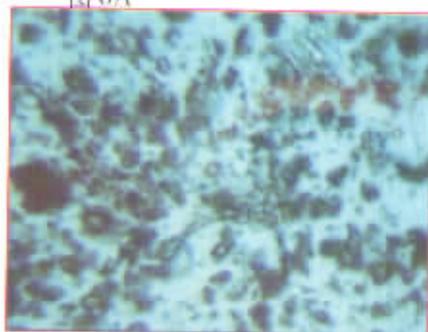


图6B

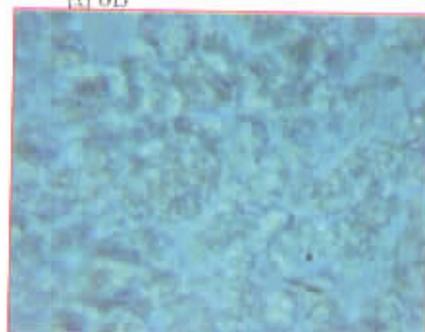


图7 培养第85天,图7A为对照组,图7B为实验组。对照组中为已经死亡的胃组织细胞,实验组中是弥漫生长的胃组织细胞。

图7A

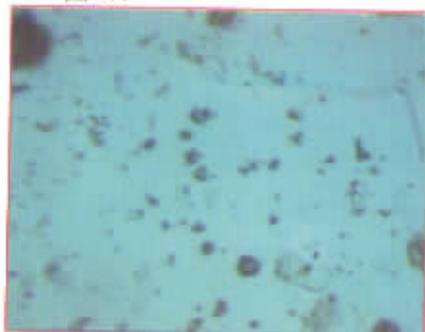


图7B

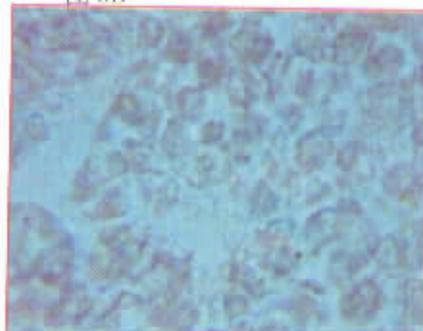


图8 培养第90天,图8A为对照组,图8B为实验组。对照组为培养孔中央已经死亡的胃组织细胞和细胞克隆,实验组中是弥漫生长的胃组织细胞以及细胞克隆。

图8A

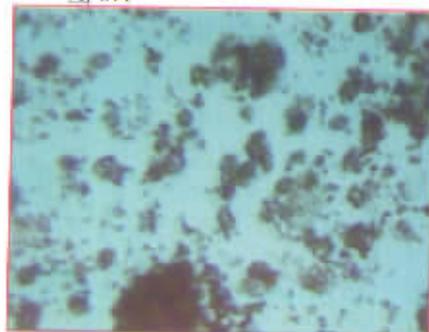
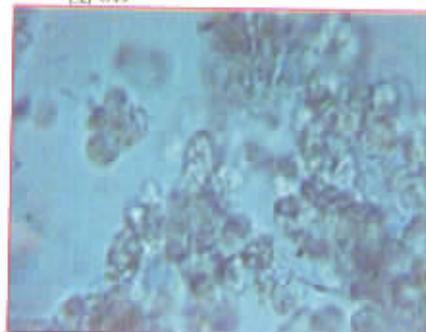


图8B



#### 四、讨 论

体外器官型植块培养 对于检测控制疾病和健康过程的多种因子有特别的实验价值 因为在此培养环境中,原来在体内胃肠道环境中的各种各样的刺激物、体液因子、植物神经等影响因素皆可一一避免。但由于植块中上皮细胞之间的联系、上皮细胞与间充质之间的联系以及结缔组织支持框架没有发生任何改变 因此 此时观察激素、药物、血源性因子以及神经递质等因素对粘膜代谢和分泌的直接影响 非常直观明了 并且能够允许实验者直接来自活体动物的胃粘膜组织进行培养,以观察粘膜的生理再生、分泌和上皮代谢等重要生理指标。我们采用体外培养法就是为了能够更直观地观察到 GIC 对细胞生长的直接影响,从细胞水平探讨 GIC 作用的机理。

Yeomans 于 1976 年报道了一种胃组织的体外培养方法<sup>[1]</sup>,他用的是 18 天龄大白鼠的胚胎胃,快速取胃,刀切均分为三段,近端 1/3 弃去,中间 1/3 为胃底部,远端 1/3 为胃窦部,胃窦部及胃底部全层切成极小的碎片( $< 2\text{mm}$ )。这些植块粘膜面向上,贴在塑料培养板的底部,水平摇床  $37^{\circ}\text{C}$  培养 3 天,设定摇速,平均约每分钟使培养液冲洗植块 2 次,这是第一种方法。另一种方法是将粘膜放在金属网格上,然后把粘膜连同网格一起置于多孔培养板中央的孔,其它孔中置入无菌生理盐水浸泡过的无菌纱布以便保持湿度,盖好,置入一个密闭容器中,通 95% 的氧气和 5% 的  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。由于上述体外培养方法目前还没有适宜的培养基,实验者维持体外培养的胃粘膜组织存活时间普遍较短,一般很难超过 48 小时,培养基中如果不加血清,时间更短,6~12 小时会退化坏死,尽管他们很注意选用好的培养基(9 份 DMEM-HEPES 加 1 份 NCTC-135,另加 10% 胎牛血清),但由于植块存活时间短,给实验者提供的检测时间有限,检测项目不能设计的太多,太多了做不完,时简比较仓促,观察结果只能观察那些即刻的实验结果,而不能观察较长时间(或延迟的)才出现的实验结果。由于上述方法不能为长时间培养提供稳定的培养条件,用这种方法进行体外培养人胃肠道的粘膜,形态完整性和功能稳定性仅能维持 6~12 个小时,家兔胃粘膜活性组织最多可有 24 小时的稳定生理功能,之后就会出现不可逆渐进性退化直至死亡。

含有 GIC 的培养基直接打破了现有培养条件的限制,可以长期培养离体胃粘膜组织,便于在光镜下直接观察 GIC 对胃粘膜生长的中长期影响,给粘膜体外培养带来了一次根本性改变,这在传统培养基和传统方法下是不可能实现的。由于使用了含有 GIC 培养基,作者实现了本实验的目的,本实验的主要目的就是观察 GIC 对粘膜生长的影响,此结果也充分体现了 GIC 对胃粘膜组织的细胞保护作用。

为什么胃粘膜能够在这种环境中长期生长呢?可能有两个原因:一是 GIC 本身就是具有丰富而全面营养的细胞培养基和良好的细胞保护剂;另一个是胃粘膜组织中有粘膜干细胞,GIC 激活了干细胞,促进了干细胞增殖。

对于第一个原因的解释:

GIC 有效成分中含有的亚油酸是细胞必需的脂肪酸,是构成细胞生物膜不可缺少的组分,是皮肤、粘膜及深层组织损伤后进行修复的重要材料。另外 GIC 有效成分中还含有蛋氨酸、半胱氨酸、精氨酸、亮氨酸等多种氨基酸以及多种脂类物质、维生素、微量元素,为胃粘膜细胞生长提供了丰富的营养。有效成分具有抗病原微生物作用,对多种细菌、病毒、真菌、原生物都有较强的抑制作用,同时具有抗炎作用。GIC 中的有效成分还可以促进细胞的能量代谢、蛋白质

及核酸合成和生物膜的转运等功能。GIC 中的缓释剂成分使其缓慢释放至培养基,防止浓度过高或过低,使细胞持续得到恒定的营养<sup>[3~7]</sup>。

GIC 有效成分中的抗氧化作用对长期培养的细胞的存活极为重要。抗氧化表现为抗自由基、稳定细胞膜。自由基是广泛存在于各种化学反应中的活泼基团,倘若其产生过量,从而引发所谓的自由基链式反应,则将导致细胞膜多不饱和脂肪酸的脂质过氧化,所产生的大量脂质过氧化物会损伤细胞膜及细胞内的大分子蛋白质与核酸,对细胞造成损伤。GIC 有效成分中含有大量的维生素 E。维生素 E 的抗自由基功能是由于其自身结构具有还原性,进而捕捉自由基从而阻断自由基链式反应,起到对细胞的保护作用,而其自身则经过维生素 C 和含硫氨基酸的再生而还原或转变为醌类化合物。大量维生素 E 的存在可使细胞处于流动性高、通透性严密的状态。这除了可保护膜上大量的多不饱和脂肪酸不被氧化外,还与其可以保护膜蛋白的活性结构有关。

对于第二个原因的解释:

胃粘膜组织中有粘膜上皮干细胞, GIC 启动了干细胞。胃粘膜的上皮组织来源于上皮干细胞(epithelial stem cell),用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶脱氧核苷放射自显影研究显示,胃粘膜的上皮干细胞位于胃小凹底部至胃底腺颈部的细胞群中<sup>[2]</sup>。组织学显示胃小凹底部的表面粘液细胞与胃上皮其它部位的同种细胞相比,体积稍小,粘原颗粒较少,分化程度较低,具有旺盛的增殖能力。那些丧失分裂能力的子细胞向小凹上部与粘膜表面不断移动,最终这些细胞变为成熟的富含粘原颗粒的表面粘液细胞。细胞到达粘膜表面后不久即脱落。新生的细胞从小凹底部开始向上迁移至脱落需要 3~4 天的时间。这些胃粘膜的干细胞最容易在体外增殖,干细胞属于未分化细胞,尽管脱离了体内生长的微环境,但仍然具有较强的增殖能力。

至于生长的细胞的性质,我们认为就是胃粘膜细胞,主要原因有两个:一是因为粘膜上皮干细胞在体外有较强的增殖功能,在体外可有一定程度的生长繁殖,这已经为许多研究结果所证实,胃壁其它细胞均不具备这种能力,本实验所用的胃组织标本中,除粘膜细胞外,数量最多的应该是胃壁的平滑肌细胞,平滑肌细胞在体外只能进行有限的增殖,本实验完全可以排除平滑肌细胞生长的可能性,因为培养自始至终未曾发现形态呈条形或梭形、排列呈束状的平滑肌细胞生长。再次,目前还没有发现平滑肌干细胞,这也被认为是平滑肌在体外不易长期生长的原因之一。其它细胞如粘膜下层疏松结缔组织中的动脉、静脉、淋巴管、神经纤维和粘膜下神经丛等组织的细胞能如此生长的可能性很小,第二个原因是优势生长的问题,当某种细胞特别容易生长的时候,其它细胞的生长就会受到一定程度的抑制或者完全被抑制,本实验中其它细胞的生长完全可以被胃粘膜细胞旺盛的生长所抑制。

#### 参考文献

- [1] Donaldson R M JR, Kapadia C R. Organ Culture of gastric mucosa: advantages and limitations. Academic Press Inc, Methods in cell biology, 1980; Volume 21B, 349.
- [2] 邹仲之, 陈东, 尹昕. 消化管. 在“组织学”。成令忠主编。北京:人民卫生出版社, 1981:1082.
- [3] 郭燕世, 王玲, 王志均. 油酸钠对消炎痛引起小鼠胃粘膜损伤的保护作用. 北京医科大学学报, 1987, 3(9):161.
- [4] 杨素娟, 郭燕世. 油酸对消炎痛引起的胃粘膜损伤大鼠

胃粘液分泌的影响. 生理学报, 1985, 37(6):532.

- [5] 孙庆伟, 滕献昌, 侯奕, 等. 江西医药, 1994, 29(1):1.
- [6] Kiprono PC, Kaberia F, Keriko JM, et al. The in vitro anti-fungal and anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). Z Naturforsch [C], 2000; 55(5):485.
- [7] MacDonald H B. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. Journal of the American College of Nutrition, 2000, 19(20):111s.

(收稿日期 2001-10-20)