

- Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 3 Kang GH, Lee S, Shim YH, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of hMLH1 promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathol Int* 2002;52:764-768
- 4 程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 陆娟, 朱红音, 顾伟齐. 人胃癌组织 DNA 甲基化酶去甲基化酶与肿瘤相关基因的表达. *中华消化杂志* 2004;24:203-206
- 5 Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 2002;86:564-567
- 6 Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bieche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:4415-4422
- 7 Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y. The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2002;21:4822-4829
- 8 Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh SA, Kim JC. Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:196-202
- 9 Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Takahira T, Yamamoto H, Sakamoto A, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Possible association between tumor-suppressor gene mutations and hMSH2/hMLH1 inactivation in alveolar soft part sarcoma. *Hum Pathol* 2003;34:841-849
- 10 Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* 2001;91:205-212

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大鼠胃壁细胞的分离及纯化

李燕舞, 王建华, 王汝俊

李燕舞, 王建华, 王汝俊, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405
国家自然科学基金项目, No. 30271650
项目负责人: 王汝俊, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学脾胃研究所.
电话: 020-36585555
收稿日期: 2004-03-11 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 建立和完善大鼠胃壁细胞分离和纯化的方法.

方法: 采用 Pronase-EDTA 酶消化法脱颈椎处死大鼠取胃制作翻转胃袋并注入消化酶溶液. 通过三步即消化-分散-纯化来完成大鼠胃壁细胞的游离和收集过程.

结果: 即时分离细胞经 HE 染色鉴别纯度达到 70% 活度经台盼兰排除实验鉴定可达到 90% 以上在 0-4 环境下 22 h 后细胞活度仍可达 70-80% 左右.

结论: 严格控制分离细胞操作的条件可获得较为稳定的实验结果包括细胞的活度和纯度.

李燕舞, 王建华, 王汝俊. 大鼠胃壁细胞的分离及纯化. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1733-1735

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1733.asp>

0 引言

壁细胞是胃底腺干细胞分化的一种终末细胞主要功能是分泌胃酸在一些种属包括人猴子兔猫豚鼠牛等壁细胞还有分泌内因子的作用这对于维生素 B₁₂ 的吸收必不可少但对于大鼠和小鼠壁细胞的功能只有泌酸^[1]. 由于许多消化系疾病均与胃酸分

泌有关故对胃黏膜及壁细胞的研究必不可少. 国外 1970 年代就建立了分离壁细胞的方法^[1]. 近年国内李晓波 *et al*^[2]建立了兔胃壁细胞的分离方法我室聂克 *et al*^[3]根据 Lewin 的方法略加改善建立了大鼠胃壁细胞的分离方法. 由于壁细胞的分离较难操作过程较为复杂因此分离细胞的活率和纯度也存在较大差异我们在此基础上对该法进一步摸索有几点体会.

1 大鼠胃壁细胞的分离方法

1.1 材料 实验动物采用 SD 普通级大鼠雌雄均可 200-250 g 实验前不予禁食. 基础营养液包括: NaH₂PO₄ Na₂HPO₄ NaHCO₃ NaCl KCl HEPES Glucose. A 液: 基础液 + BSA + EDTA B 液: 基础液 + BSA + CaCl₂ + MgCl₂ C 液: B 液 + DTT 消化液: A 液 + pronase. 其中 A 液中 BSA 的含量由 20 g/L 减至 10 g/L 细胞分离的数量和活率未见明显变化. HEPES 配制时应单独溶解为无色溶液, 若颜色变黄时会影响细胞分离结果. DTT 在临用前加入, 所用各种营养液均用 NaOH 调整 pH 值 7.0-7.5 酶的用量应控制在 1 g/L EDTA 用量为 2 mmol/L.

1.2 胃袋 脱颈椎处死动物剖开腹腔结扎贲门和幽门将取出的胃放入冰冷的生理盐水中冲洗表面由胃底剪开一口用玻璃棒将胃翻转后再置冰冷生理盐水中洗涤胃内容物及黏液在胃盲囊与胃体交界处结扎切口由胃窦部进针(4 号)注入消化液至胃袋充满为止. 若胃袋出现充血溃疡胃内容物变稀等异常状况则对胃壁细胞的分离结果有很大影响.

1.3 消化 消化液注入胃袋应小心操作若出现漏液则影响细胞的活率. 胃袋放入A液内37℃水浴振荡(100次/min)并通入950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂. 此时胃袋内层即浆膜面处于消化液(pronase-EDTA)的作用外层即黏膜面处于A液(EDTA+BSA)中. 既保证消化酶的分离作用又避免了直接作用对胃黏膜细胞的损伤. 消化时间为90 min. 整个消化过程分为3步. 每步30 min. 更换新鲜A液后重复进行. 每次换液须预先37℃温浴并通气. 以保证细胞分离过程始终处于一个较为恒定的环境.

1.4 分散 是指胃黏膜细胞由胃袋组织游离下来的过程. 此过程主要由2步组成: 一是磁力搅拌二是低速离心. 搅拌的目的是将消化过程中胃黏膜层松散的细胞从组织上游离下来. 离心的目的则是集中收集细胞. 搅拌时胃袋处于B液中. B液较A液多了Ca²⁺和Mg²⁺离子. 使分离下来的细胞所处的环境更加接近生理条件. 搅拌时间以50 min为宜. 且每10 min更换一次B液. 更换前B液同样需要预先温浴和通气. 搅拌的速度要缓慢轻柔. 以胃袋刚好可以在B液中自由旋转为宜. 每次搅拌后. 混有细胞及组织残渣的B液要经200目尼龙滤膜过滤. 然后离心. 离心速度控制900-1 000 r/min. 离心5 min. 细胞可沉于管底. 用C液混悬后收集. 因C液中含有分散细胞的DTT. 且离心速度低. 细胞易于吹打. 分散团块较少. 每次收集的细胞混悬液要放入0-4℃环境保存. 此温度对细胞形态损伤较小.

1.5 细胞活率 即时分离的细胞特别是应用消化酶最大的一个缺点就是对细胞的损伤. 通过翻转胃袋及消化酶用量和细胞保护剂BSA用量的控制. 分离细胞的活率大有提高. 可以达到90%以上(台盼蓝染色实验). 但随着时间的延长. 细胞的死亡率迅速增加. 室温操作大约2 h后. 细胞活率降为50%以下. 这很不利于对细胞形态及功能的进一步检测. 为了对细胞活率的改善. 有报道对分离胃壁细胞进行原代培养^[4]. 在整个过程中. 壁细胞每日的死亡率为5-10%. 但因本室条件限制. 分离过程无法保证无菌操作. 细胞培养难以实现. 设想将分离细胞混悬于F12/DMEM培养基(加胰岛素. 转铁蛋白. 抗生素. 葡萄糖. 牛血清白蛋白). 在37℃恒温开放环境中. 并通入50 mL/L CO₂. 过夜观察细胞活率的变化. 发现分离2 h后. 细胞活率可保持80%左右. 但14 h后. 只有个别细胞存活. 考虑是因为37℃及培养基适宜细菌繁殖. 对细胞的影响很大. 而0-4℃环境对细胞损伤小. 且不利于细菌生长. 故将细胞混悬液放入0-4℃冰箱. 结果发现2 h后. 活率大于80%. 22 h后. 活率为70%. 44 h后. 活率为40-50%. 细胞死亡速度明显减慢. 后又观察将分离细胞混悬于C营养液中. 0-4℃保存. 细胞的活率22 h后. 仍可达到70-80%. 这对于进行即时分离细胞的进一步功能检测. 无疑是非常有利的.

2 大鼠胃壁细胞的纯化方法

由于分离出的胃黏膜细胞包括主细胞. 壁细胞. 黏液细胞及少数内分泌细胞. 而胃壁细胞只占总体细胞的20-30%. 为得到较高纯度的壁细胞用于实验研究. 是一个必须解决的问题. 李晓波曾用淘洗及离心的方法可获得较高纯度的兔胃壁细胞^[2]. 但由于仪器设备及兔. 鼠所分离胃黏膜细胞数量多少的差异. 淘洗方法难以实施. Percoll作为一种细胞分离液. 具有对细胞损伤小的特点. 且易于从细胞表面洗脱. 可用于对大鼠胃壁细胞的纯化分离. 我室采用400 g/L. 600 g/L Percoll非连续密度梯度离心法. 可得到较稳定的70%左右纯度的壁细胞.

2.1 Percoll的配制 用生理盐水或0.25 mol/L蔗糖配制. 可保证细胞处于等渗环境. 我室采用生理盐水配制. 首先. 将Percoll原液与1.5 mol/L的NaCl 9:1混合(体积比)作为纯Percoll储存液. 密度为1.130-1.15 g/L. 用时再根据需要用0.15 mol/L NaCl配制不同百分比浓度的Percoll.

2.2 富集壁细胞 我室以往采取恒流泵制作40-60%连续密度梯度. 递质离心富集壁细胞. 经操作发现. 非连续密度梯度离心. 细胞更容易分层收集. 在离心管中依次铺入600 g/L (1.080 g/L). 400 g/L (1.056 g/L) Percoll分离液各2 mL. 再轻轻铺入细胞混悬液1 mL. 细胞浓度在(1-2 × 10⁶ /L). 离心速度2 000 r/min. 15 min. 细胞在不同界面出现. 分层分别收集. 40%及60%界面处. 细胞台盼蓝染色. 鉴定活率. HE染色. 鉴定纯度. 结果发现. 40%层界面处. 细胞数量较少. 细胞碎片较多. 活率低. 而60%层界面处. 富集细胞数量较多. 细胞活率. 可达到90-95%. 细胞涂片. 经HE染色后. 壁细胞比例. 可达到70%左右. 且结果稳定. 陈蕾 *et al*^[4]报道. 大鼠壁细胞分离并培养后. 纯度可达到80%. 可能与其采用幼年大鼠(体重100g左右)及经过培养有关.

3 讨论

细胞分离的方法通常有两种: 机械分离法和酶分离法. 与其他组织相比较. 比如肝或胰腺. 胃黏膜因细胞排列紧密. 而不易分离. 单纯应用机械法分离胃黏膜细胞. 效果并不理想. 应用胶原酶. 可对狗. 豚鼠. 兔的胃黏膜细胞进行成功的分离. 由于不同种属的动物及不同类型的蛋白水解酶. 对细胞分离效果影响迥异. 胶原酶对大鼠胃黏膜细胞的分离. 并不理想. 而Pronase(链酶蛋白酶)对分离大鼠胃黏膜细胞. 很有效. 这种酶具有广泛的消化作用. 与EDTA联合使用. 作用更加突出. 但对细胞的生物结构. 有一定影响.

大鼠胃壁细胞的分离. 采用pronase-EDTA酶消化法. 根据Lewin *et al*制作. 翻转胃袋. 并注入消化液. 进行细胞分离. 分离过程. 主要分为三步: 消化-分散-纯化. 具体来说. 是指(1)pronase-EDTA消化液. 注入翻转胃袋. 并将胃袋放入营养液中. 37℃水浴振荡. 消化过程; (2)磁力搅

拌分散细胞并低速离心收集细胞过程; (3)percoll 非连续密度梯度离心富集壁细胞过程。即时分离纯化后壁细胞纯度为70% 活率90% 在0-4℃环境下保存22 h后活率仍可达到70-80%。

细胞分离过程往往较为烦琐需细致操作而结果也常因人因地有很大差异我室针对大鼠胃壁细胞的分离方法进行摸索在本实验室条件下已取得较为稳定的结果。壁细胞的纯化是影响细胞功能检测的关键步骤。目前国外报道应用JE-6B淘洗系统可对狗或兔的胃黏膜细胞进行纯化获得70%纯度的壁细胞再进一步用percoll 梯度离心的方法可纯化至95-100%^[5]。Chew *et al*^[6]用Nycodens 梯度离心联合淘洗可获得95%纯度的兔壁细胞。Schepp *et al*^[7]报道应用淘洗和percoll 梯度离心的方法纯化大鼠壁细胞纯度可达到97%以上。本室在已有的实验条件下可获得大鼠壁细胞纯度70%尚需进一步提高。

胃壁细胞分离及纯化方法的建立为泌酸相关疾病提

供了体外细胞研究模型为细胞表面受体的研究提供了基础也使研究细胞内信息传递及药物调节成为可能将推动我国胃酸相关疾病的研究。

4 参考文献

- 1 Chew CS. Parietal cell culture: new models and directions. *Annu Rev Physiol* 1994;56:445-461
- 2 李晓波, 钱家鸣, 陈元方. 壁细胞的淘洗分离与应用. 胃肠病学和肝病杂志 1996;5:254-256
- 3 聂克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞的分离方法. 世界华人消化杂志 1999;7:994-995
- 4 陈蕾, 黄威权, 孙绪德, 吕宝真, 蒲若蕾. 大鼠胃壁细胞的分离及培养. 第四军医大学学报 2002;23:769-771
- 5 Delvalle J, Tsunoda Y, Williams JA, Yamada T. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by secretagogue stimulation of canine gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992;262:G420-G426
- 6 Chew CS, Brown MR. Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol trisphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1986;888:116-125
- 7 Schepp W, Dehne K, Herrmuth H, Pfeffer K, Prinz C. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. *Am J Physiol* 1998;275:G1094-1105

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DQA1 的免疫遗传学特征

黄永坤, 戚勤, 郝萍, 李海林, 文革生, 周丽芳

黄永坤, 戚勤, 李海林, 文革生, 周丽芳, 昆明医学院第一附属医院儿科 云南昆明市 650032
郝萍, 昆明医学院第一附属医院临床医学实验中心 云南昆明市 650032
项目负责人: 黄永坤, 650032, 云南省昆明市西昌路 295 号, 昆明医学院第一附属医院. hykkmycn@hotmail.com
电话: 0871-6415908
收稿日期: 2004-04-06 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 了解昆明汉族儿童中幽门螺杆菌(*H pylori*)感染率及其 HLA-DQA1 免疫遗传学特征。

方法: 用胶体金标免疫渗滤法检测 153 名 6-14 岁的学生血 *H pylori*-IgG 抗体。并用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 技术对以血清学试验及 ^{13}C 尿素呼气试验确诊的 34 例 *H pylori* 感染儿童及 37 例无 *H pylori* 感染儿童进行 HLA-DQA1 基因分型。

结果: 昆明儿童 *H pylori* 感染率为 34.5% 其 HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于无 *H pylori* 感染儿童 (29.41% vs 9.46% $P=0.002$ $P_c=0.028$ OR=3.988 95% CI: 1.562-10.180); 而 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于无 *H pylori* 感染儿童 (19.12% vs 33.78%

$P=0.049$ OR=0.463 95% CI: 0.214-1.003) 但经等位基因多项比较校正差异消失 ($P_c=0.686$)。

结论: 昆明汉族儿童 *H pylori* 感染率较高。他们在 HLA-DQA1 位点上与无 *H pylori* 感染儿童存在免疫遗传学差异 HLA-DQA1*0103 基因可能是 *H pylori* 感染的易感基因; 而 DQA1*0302 基因则是否具有免疫抵抗作用需要进一步研究。

黄永坤, 戚勤, 郝萍, 李海林, 文革生, 周丽芳. 幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DQA1 的免疫遗传学特征. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1735-1737

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1735.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori* *H pylori*) 与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤及胃癌密切相关^[1]。世界上至少有半数以上的人口有幽门螺杆菌感染但其中仅很少的一部分表现出明显的临床疾病状态其原因仍不清楚^[2]。许多研究认为这除了与 *H pylori* 菌株的毒力高低环境因素有关外还与宿主的免疫遗传因素有关^[3]。我们用聚合酶链