



河南师范大学

HENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学·止于至善

# 肠上皮细胞培养

秦超彬

2016年08月27日



# 目录



河南师范大学

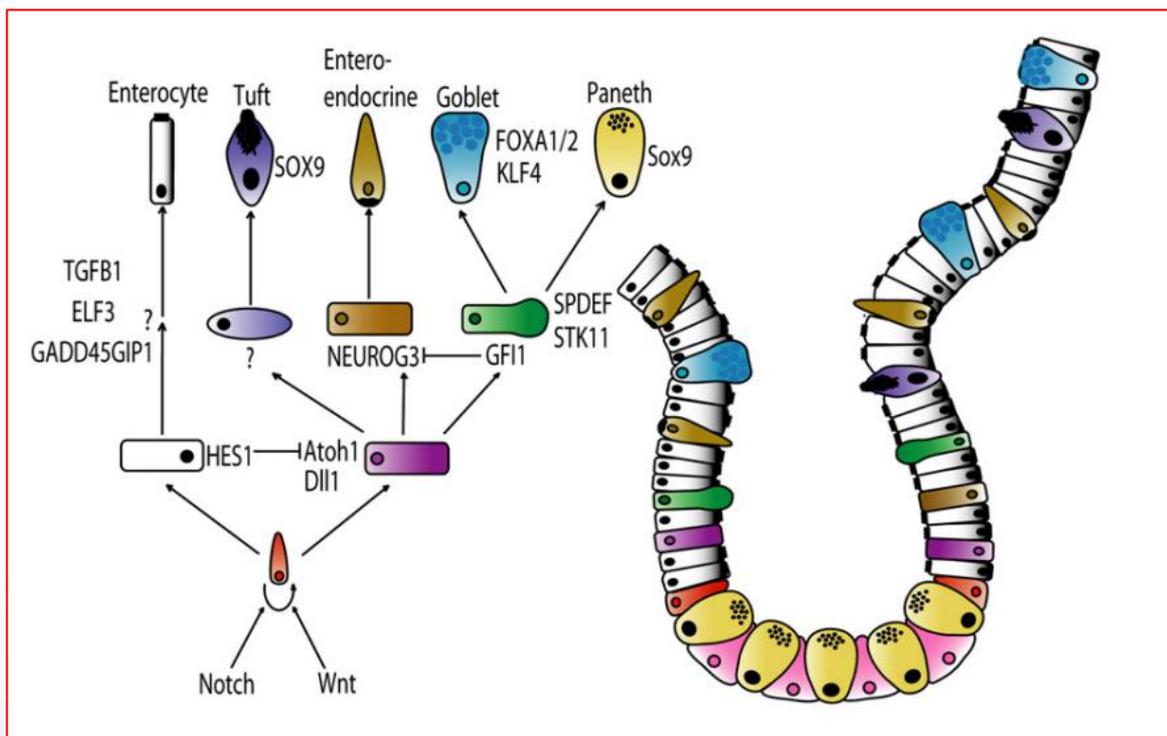
HENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学·止于至善

- 01 肠上皮细胞类型
- 02 肠上皮细胞分离方法
- 03 肠上皮细胞培养条件
- 04 肠上皮细胞鉴定
- 05 肠上皮细胞培养难点



# 1. 肠上皮细胞类型



- ① 肠细胞：营养物质吸收
- ② 杯状细胞：分泌产生粘液
- ③ 潘氏细胞：分泌抗菌肽
- ④ 肠内分泌细胞：分泌胃肠激素
- ⑤ **tuft**细胞：分泌阿片类物质及参与前列腺素合成的酶类

Post mitotic differentiated cells in the intestine are classified into two groups (absorptive and secretory) based on their distinct functions and genetic differentiation programs. One type of absorptive cell (enterocyte) and four types of secretory cells (goblet, Paneth, enteroendocrine and tuft cells) comprise the small intestinal epithelium.

## 2. 肠上皮细胞的分离方法

2.1

组织块培养法

2.2

螯合作用

2.3

酶消化法



## 2.1 组织块培养法



河南师范大学

HENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学·止于至善

### Aquaculture Nutrition



*Aquaculture Nutrition* 2011 17; e241–e252

doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x

### Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide

A. KAWANO<sup>1</sup>, C. HAIDUK<sup>2</sup>, K. SCHIRMER<sup>3</sup>, R. HANNER<sup>4</sup>, L.E.J. LEE<sup>5</sup>, B. DIXON<sup>1</sup> & N.C. BOLS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada; <sup>2</sup> UFZ, Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany; <sup>3</sup> Eawag–Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Dübendorf, Switzerland;

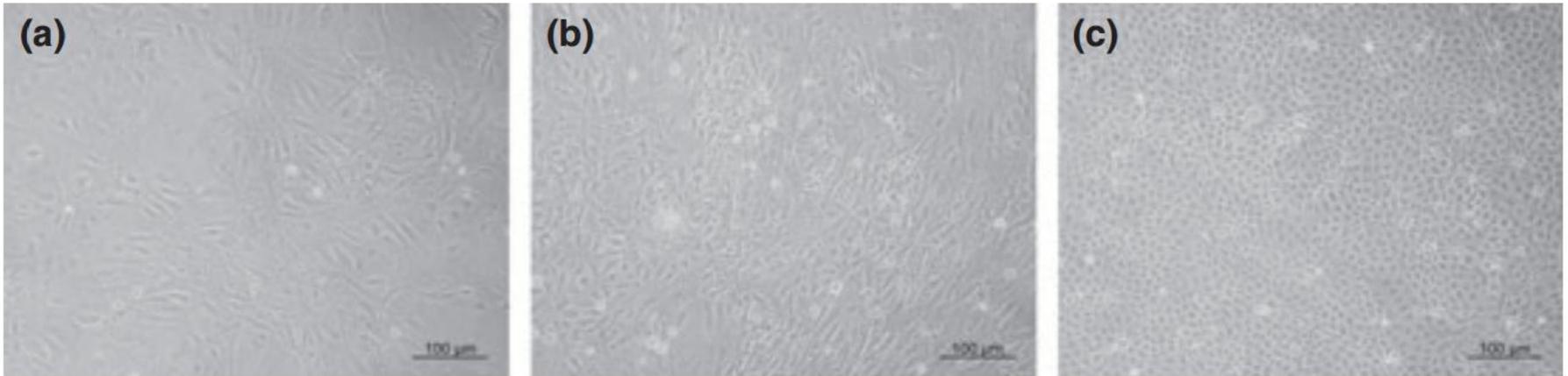
<sup>4</sup> Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada; <sup>5</sup> Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo, Ontario, Canada

实验取材： a small female rainbow trout

## 2.1 组织块培养法

1. 饥饿2天，MS 222麻醉，取肠道，用细胞培养级水冲洗干净。
2. 将肠道放入  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS (DPBS, 加50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin)。纵向剖开，DPBS/gentamicin solution清洗。
3. 从肠道远端剪1mm<sup>3</sup>大小的组织块，放入12.5 cm<sup>2</sup> culture flasks，加培养基 [L15 medium containing **30% FBS** and penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )], 至液面刚好覆盖组织块。
4. 20°C环境中培养，**每2周更换一次培养基**。
5. 8周后，有2个培养瓶出现上皮细胞增殖。用EDTA和 0.1% (w/v) trypsin 将细胞消化下来，在新的培养瓶中**传代培养 (L15 medium with 20% FBS)**。

## 2.1 组织块培养法



Appearance of RTgutGC cultures at different passage numbers. Photomicrographs of passage 6 (a), 12 (b) and above 100 (c) were taken on an inverted phase contrast microscope. Scale bar indicates 100  $\mu\text{m}$ .



## 2.3 酶消化法

### 2.3.1 Dispase +collagenase XI

Journal of Cell Science 101, 219-231 (1992)  
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 1992

219

#### **The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures**

G. S. EVANS<sup>1,\*</sup>, N. FLINT<sup>1</sup>, A. S. SOMERS<sup>1</sup>, B. EYDEN<sup>2</sup> and C. S. POTTEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Cancer Research Campaign Department of Epithelial Biology, Paterson Institute for Cancer Research, Christie Hospital and Holt Radium Institute, Christie Hospital, Withington, Manchester, M20 9BX, UK*

<sup>2</sup>*Department of Pathology, Christie Hospital and Holt Radium Institute, Withington, Manchester M20 9BX, UK*

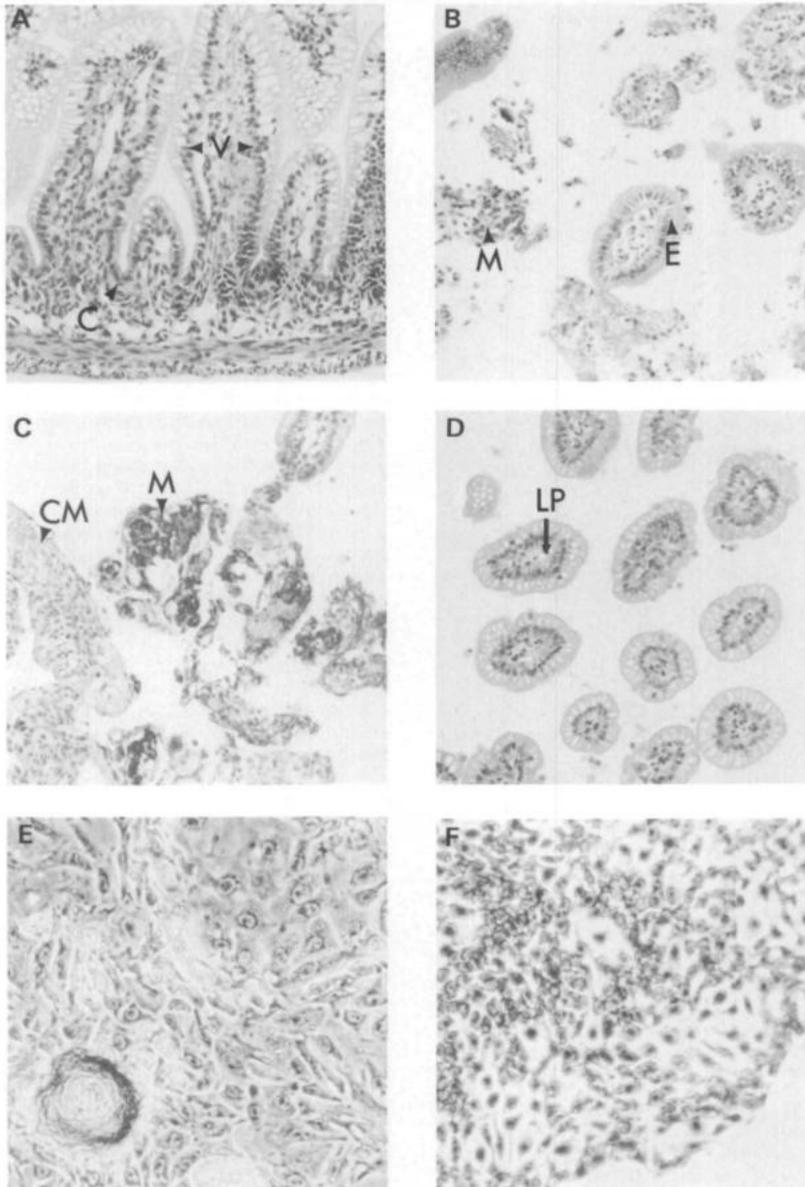
\*Author for correspondence

实验取材:

乳鼠 (six-day-old Wistar rats) 小肠

## 2.3.1 Dispase +collagenase XI

1. six-day-old Wistar rats, 取小肠、纵向剖开, 剪至长度2-3 mm。HBSS, 摇荡洗8次。
2. 转至培养皿中, 剪至 $<1\text{mm}^3$ 。20 ml酶液,  $25^{\circ}\text{C}$ 摇荡消化25 min。  
(0.1 mg/ml dispase and 300 U/ml collagenase in HBSS)
3. 巴氏吸管 (口径 $>2\text{ mm}$ ) 吹打150次, 转移至新的离心管中。
4. 静置1 min, 重力作用下沉降, 小心从液面底部取几毫升。重复两次。
5. 合并上清液, 加10 ml DMEM-S, 200-300 r/min 离心2 min。弃上清, 用20 ml DMEM-S重悬沉淀物。
6. 重复5-6次, 直至上清液澄清, 加适量生长培养基 (10% FBS-DMEM)。



Epithelial cells detached as intact units (villi and small pre-crypt units; Fig. 2A,B) leaving behind large flaps of circular muscle (Fig. 2C).

The epithelium in these organoid units remained as polarised intact layers (Fig. 2D), and attached readily to both plastic and collagen coated dishes within 24-48 hours (Fig. 2E,F).



## 2.3.1 Dispase +collagenase XI

动物营养学报 2011, 23 (7) :1140-1146

Chinese Journal of Animal Nutrition

doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2011.07.011

### 大豆凝集素对鲤鱼肠道上皮细胞结构和功能的影响

冯琳<sup>1,2</sup> 姜俊<sup>1,2</sup> 刘扬<sup>1</sup> 胡凯<sup>1,2</sup> 姜维丹<sup>1,2</sup> 周小秋<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014; 2. 鱼类营养与安全生产四川省高校重点实验室, 雅安 325014)

**摘要:** 本研究旨在考察大豆凝集素(SBA)对原代培养鲤鱼肠道上皮细胞结构和功能的影响, 初步探讨大豆凝集素在鱼类中抗营养的可能作用方式。在24孔培养板中原代培养鲤鱼肠道上皮细胞72 h后, 分别更换为含纯化SBA 0、50、75、100、150、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DMEM培养液, 继续培养72 h后采样测定指标。结果表明, 在SBA的作用下, 鲤鱼肠道上皮细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、谷丙转氨酶(GPT)活力极显著增加( $P < 0.01$ ), 但培养液中谷草转氨酶(GOT)活力变化不显著( $P > 0.05$ )。细胞形态学观察表明, SBA使细胞形态发生了明显变化, 细胞由原有的椭圆形变成长条形或不规则形, 培养液中漂浮的死细胞数量增多。同时, SBA显著或极显著增加鲤鱼肠道上皮细胞中四甲基偶氮唑盐(MTT) OD值、蛋白质含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 显著或极显著增加细胞中GPT和GOT活力及培养液中氨浓度( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 极显著降低细胞中碱性磷酸酶(AKP)和 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP酶活力( $P < 0.01$ )。由此得出, SBA破坏了鲤鱼肠道上皮细胞结构的完整性, 促进了细胞的增殖和凋亡, 抑制了细胞的成熟分化, 加速了细胞的

取材: 体重约为 100 g 的健康建鲤

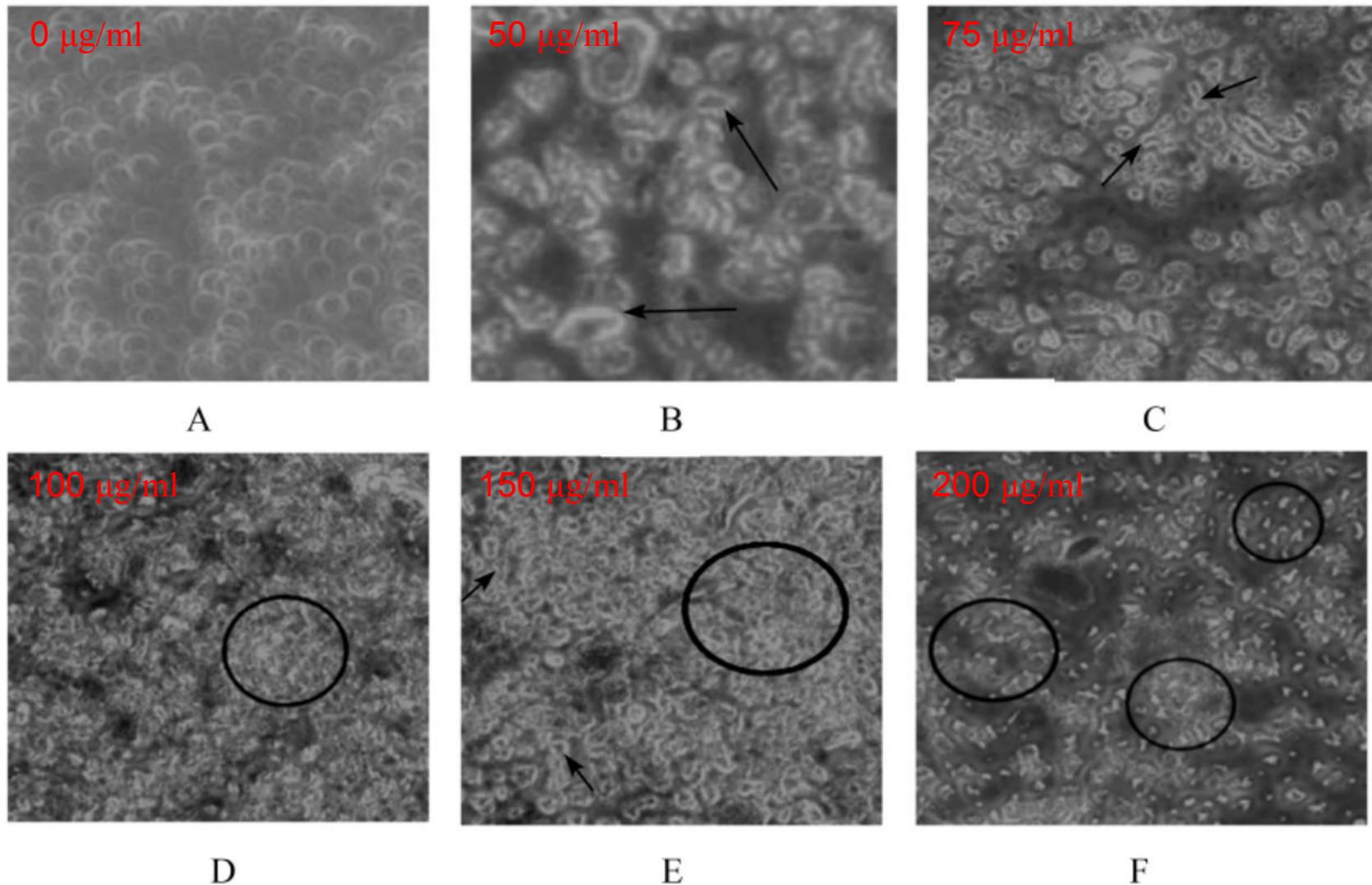


图1 SBA对鲤鱼肠道上皮细胞形态的影响

Fig.1 Influence of SBA on morphology of carp intestinal epithelial cells (200 ×)

## 2.3 酶消化法

### 2.3.2 Collagenase I+Hyaluronidase

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

#### Normal Mouse Intestinal Epithelial Cells as a Model for the *in vitro* Invasion of *Trichinella spiralis* Infective Larvae

Hui Jun Ren, Jing Cui\*, Zhong Quan Wang, Ruo Dan Liu

Department of Parasitology, Medical College, Zhengzhou University, P. R. China

实验取材:

胎鼠小肠隐窝

(intestinal crypts of fetal mouse small intestine)

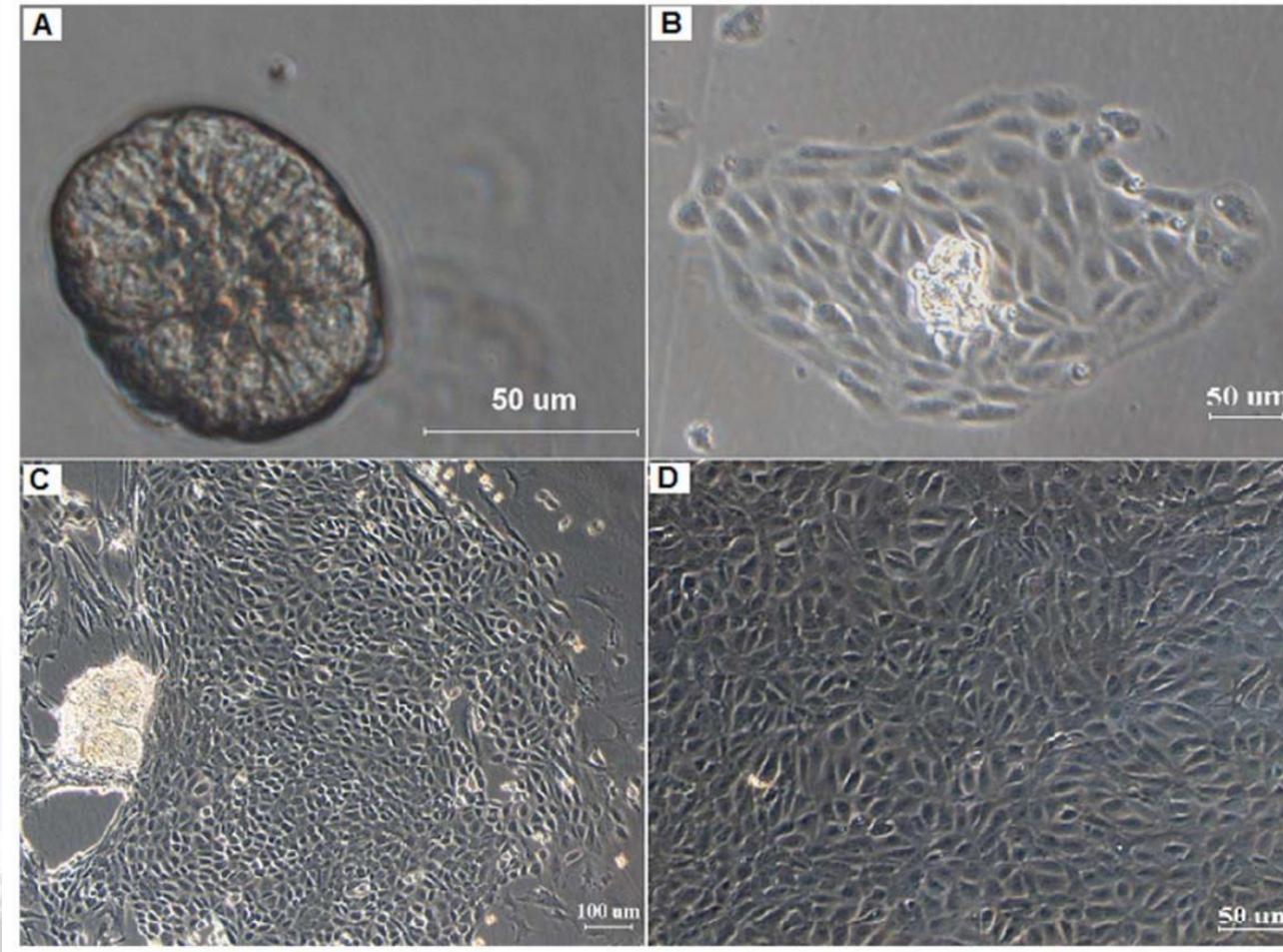
## 2.3.2 Collagenase I+Hyaluronidase

### 分离:

1. 胚胎17-19天，剖腹产取胎鼠，取胎鼠小肠后，纵向切开放入D-Hank's buffer。
2. 用剪刀剪至1mm长度，**collagenase type I (200 U/ml)+Hyaluronidase (100 U/ml)**酶液，37°C消化30 min。
3. 小心去除酶液，4°C **100 g离心5 min**。DMEM+2%FBS+2%山梨醇洗涤沉淀。取上清，室温**250 g离心**，收集purified crypt fraction。
4. DMEM完全培养基重悬沉淀crypts，培养板中孵育90 min后，将未贴壁细胞移至新的培养板，每48小时更换培养基。

### 纯化:

1. 弃培养基，D-Hank's buffer洗两次，0.5% trypsin-0.54 mM EDTA 37°C消化 2 min，加完全培养基终止消化，洗去未贴壁的成纤维细胞。
2. 稀释IECs，种至96孔板（每孔1个细胞），传代3次。
3. 转至培养瓶中扩大培养，传代8-9次后，液氮冻存。



Cultured mouse primary intestinal epithelial. (A) The single crypts obtained with collagenase-hyaluronidase dissociation of mouse small intestine. (B) A few cells gradually migrated out around the crypts after 24 h. (C) The epithelial cells started to grow rapidly after 48 h. (D) Cells continued to grow until confluence was reached after 9 days.

## 2.3 酶消化法

### 2.3.3 EDTA+dispase

GASTROENTEROLOGY 2005;129:1567-1580

#### Isolation and Characterization of a Putative Intestinal Stem Cell Fraction From Mouse Jejunum

CHRISTOPHER M. DEKANEY,<sup>\*,†</sup> JOSE M. RODRIGUEZ,<sup>\*</sup> M. COLLEEN GRAUL,<sup>\*</sup> and SUSAN J. HENNING<sup>\*,§</sup>

<sup>\*</sup>Department of Pediatrics, <sup>†</sup>Michael E. DeBakey Department of Surgery, and <sup>§</sup>Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

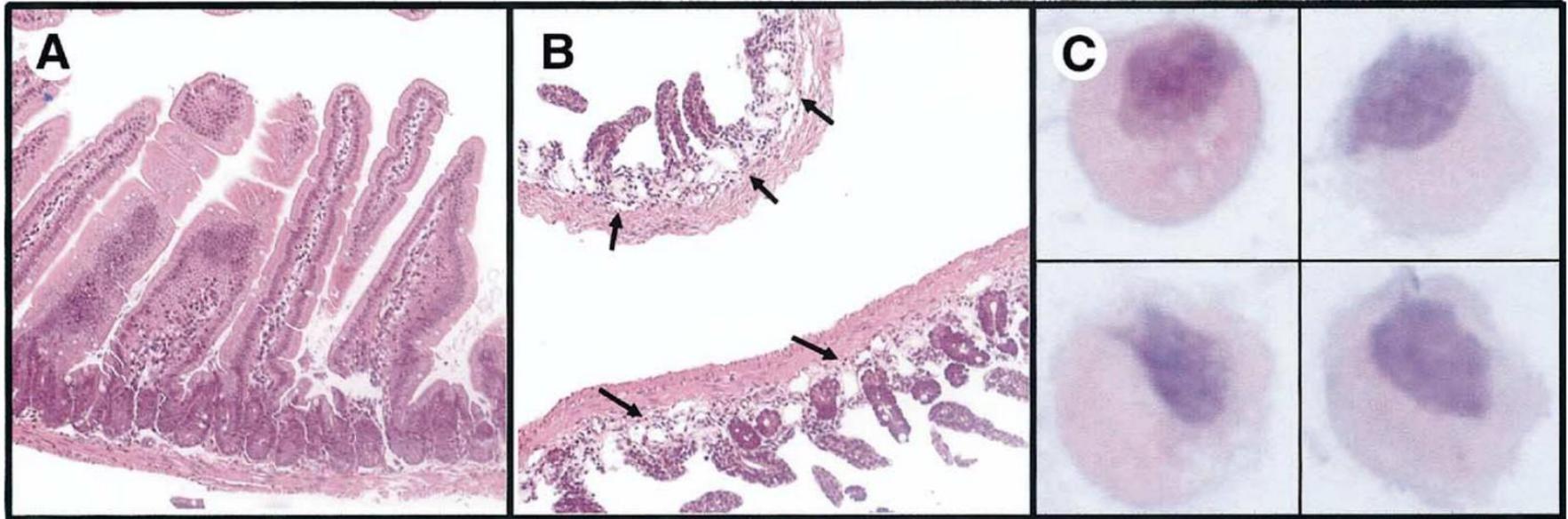
实验取材:

成鼠 (Adult male C57Bl/6J mice) 空肠

### 2.3.3 EDTA+dispase

1. 取空肠，PBS冲洗后，翻转至玻璃棒上。
2. 将玻璃棒浸入含30 mM EDTA的Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free PBS中，搅拌20-25分钟，以产生肠隐窝和绒毛。
3. 500 rpm离心5 min。
4. 弃上清，用酶液（0.3 U/mL dispase in HBSS）重悬，37度消化10 min，以释放单个细胞。
5. 加FBS至终浓度为5%，以终止消化，70 μm滤网过滤。

### 2.3.3 EDTA+dispase



- A. Intact mouse jejunum before exposure to 30 mmol/L EDTA.
  - B. Remaining intestinal tissue after epithelium has been removed by EDTA treatment. Arrows indicate ghosts left by crypt removal.
  - C. Representative micrographs of cytopun CD45-negative SP cells.
- All 3 panels show H&E staining

## 2.3 酶消化法

### 2.3.4 Collagenase (type ?) + trypsin

Journal of Applied Microbiology 

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

**Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua***

C.C. Lazado<sup>1</sup> and C.M.A. Caipang<sup>1,2</sup>

1 Aquaculture Genomics Research Unit, Faculty of Biosciences and Aquaculture, University of Nordland, Bodø, Norway  
2 Disease and Pathogen Transmission Research Group, Institute of Marine Research, Bergen, Norway

实验取材：  
大西洋鳕鱼（Atlantic cod 300–400 g）

## 2.3.4 Collagenase (type ?) + trypsin

1. 饥饿24 h，MS 222麻醉，取肠道，刮除内容物，剪为四部分：前肠、中肠、后肠和直肠（rectum）。
2. 分别用预冷PBS（含P/S）洗2次，不含P/S的PBS洗3次，剪为1-2 mm<sup>2</sup>。
3. 第一轮消化：PBS含500 μL 0.25% 胶原酶震荡消化10 min，100 μm过滤，过滤过程中逐步添加L-15培养基（含P/S，10% FBS）。
4. 第二轮消化：剩余组织块，用0.25%胰酶消化（L-15培养基中，含P/S、FBS），28度震荡30 min。100 μm过滤，收集细胞。
5. 两轮消化所获得的细胞合并。

细胞图：无

## 2.3 酶消化法

### 2.3.5 Trypsin-EDTA

Aquacult Int (2008) 16:591–600  
DOI 10.1007/s10499-008-9170-1

**Investigation of the cytotoxicity of apidaecin on intestinal epithelial cells of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in vitro**

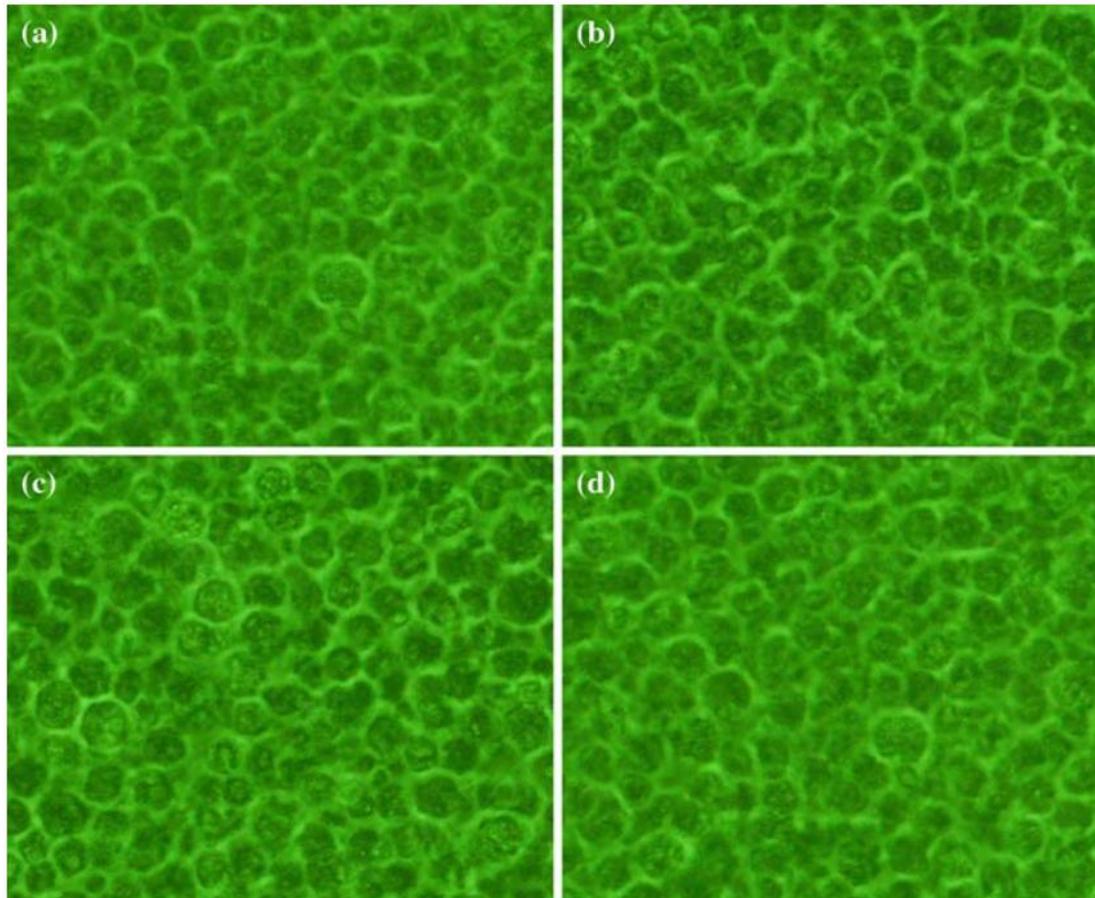
Xuxia Zhou · Yanbo Wang · Yuanjiang Pan · Weifen Li

实验取材:

罗非鱼 (*Tilapia*  $7.38 \pm 0.92$  g)

## 2.3.5 Trypsin-EDTA

1. MS 222麻醉，75%酒精擦拭体表灭菌。
2. 断头，取肠道，Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free PBS（penicillin and streptomycin (200 µg/ml, respectively), gentamicin (400 µg/ml), and Fungizone (250 µg/ml)）洗2次，每次10 min。
3. 5 ml消化液震荡消化20 min，0.05% trypsin-0.02% EDTA溶于Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free PBS。
4. 吸取细胞悬浮液，100 µm尼龙膜过滤到终止液（含10% FBS的PBS）。
5. 剩余的肠道组织，再次消化20 min，并过滤到终止液。
6. 细胞悬浮液离心10 min，用含2% FBS的PBS洗两次，离心（速度、时间?）。
7. 用L-15培养基（含2 mmol/l L-glutamine, 5% FBS, 100 µg/ml penicillin and streptomycin and 200 µg/ml gentamicin）重悬细胞。
8. 28度 CO<sub>2</sub>培养箱培养，24 h后PBS洗2次，去除未贴壁细胞，培养基两天更换1次。



**Effect of apidaecin on primary intestinal epithelial cells morphology (400×).**

Cells were treated with apidaecin; the concentrations were 0.0 µg/ml (a), 10.0 µg/ml (b), 20.0 µg/ml (c), and 30.0 µg/ml (d).

## 2.3 酶消化法

### 2.3.6 胶原酶 I、IV联合消化液

第22卷第1期  
2013年1月

上海海洋大学学报  
JOURNAL OF SHANGHAI OCEAN UNIVERSITY

Vol.22, No.1  
Jan., 2013

文章编号: 1674 - 5566 (2013) 01 - 0033 - 09

#### 草鱼肠道粘膜上皮细胞的分离与原代培养

姚仕彬<sup>1</sup>, 叶元土<sup>1</sup>, 蔡春芳<sup>1</sup>, 姚林杰<sup>1</sup>, 许凡<sup>1</sup>, 刘猛<sup>1</sup>, 萧培珍<sup>2</sup>,  
王丽宏<sup>2</sup>

(1. 苏州大学 医学部, 江苏 苏州 215123; 2. 北京市营养源研究所 系统营养工程技术研究中心, 北京 100069)

#### 实验取材:

试验鱼体重为( 22.0 ± 5.0) g

## 2.3.6 胶原酶 I、IV 联合消化液

1. 使用自制的强化饲料（叶元土，蔡春芳，张宝彤，等. 一种强化鱼类肠道粘膜和肝胰脏细胞生理功能的配合饲料: 中国, 201010585756[P]. 2011-05-25.）强化饲养 2 周。含有肉碱、牛磺酸、谷氨酰胺等。
2. 取试验鱼，用超纯水冲洗体表 2 次，捣碎脑部致死，迅速置 75% 乙醇中浸泡 5 ~ 10 s。超净工作台上解剖，取出肠道中段，去除肠系膜，用注射器( 10 mL) 吸取 D-Hanks 清洗液冲洗肠段内腔 3 ~ 4 次。

## 2.3.6 胶原酶 I、IV 联合消化液

### 3. 3种分离方法:

**机械剪碎消化法:** 将肠段剪成  $1\text{ mm}^3$  大小的组织块, D-Hanks 清洗液反复清洗后备用;

**肠囊翻转消化法:** 将肠段翻转使肠道粘膜面朝外, 再使用 D-Hanks 清洗液清洗肠道粘膜面后, 肠段两端使用无菌棉线扎紧后待用;

**机械刮取消化法:** 将肠段翻转使肠道粘膜面朝外, 用 D-Hanks 清洗液清洗肠道粘膜面后, 放入培养皿中, 用无菌载玻片一端刮取肠道粘膜层, 使用清洗液反复清洗刮取下来的粘膜层, 清除悬浮在液面上层多余的脂肪细胞后待用。

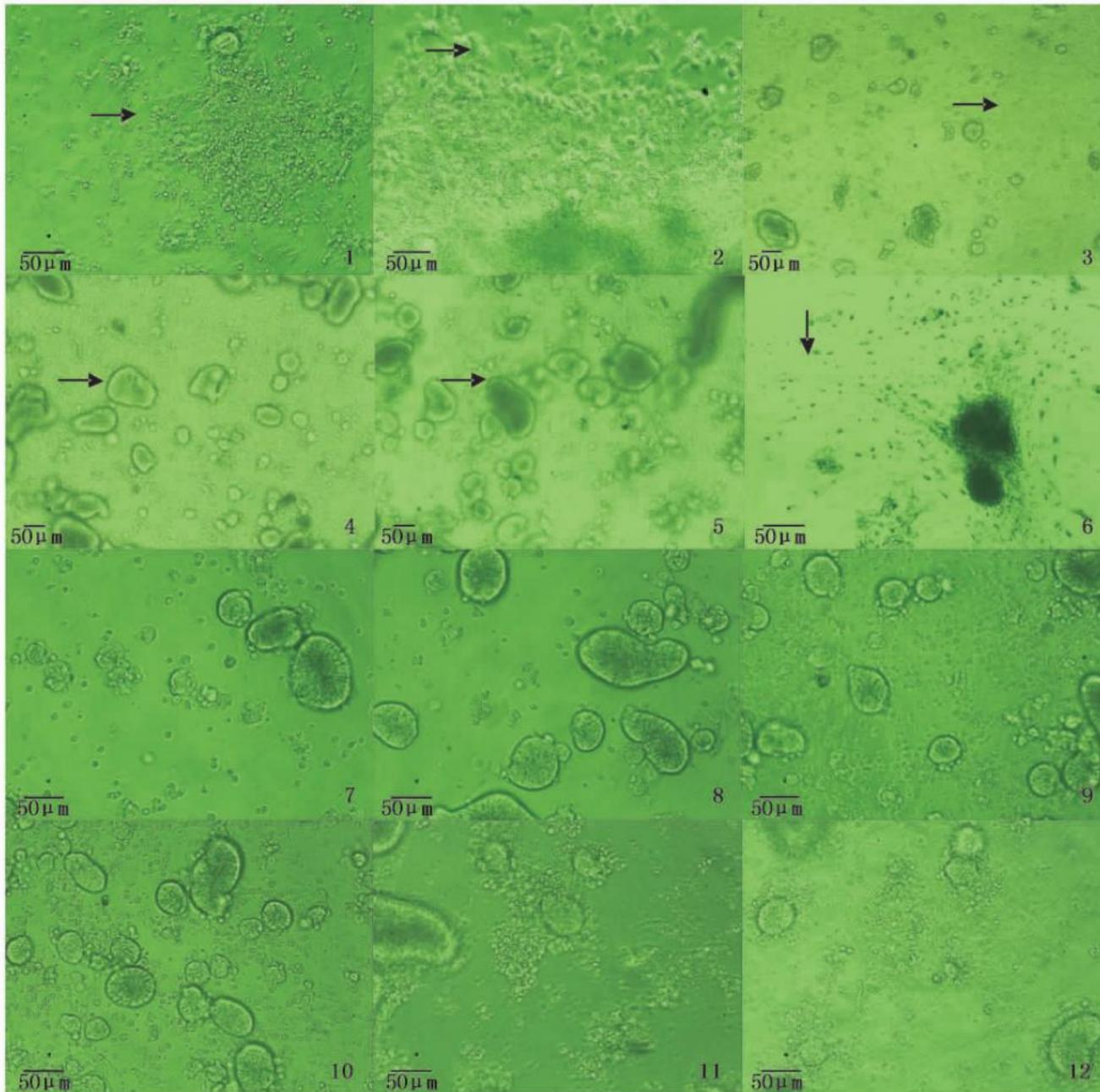
4. 将处理后的粘膜组织转入细胞培养瓶 (50mL) 中, 加入胶原酶 I、IV 联合消化液,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  震荡消化 30 min 后, 按  $V(\text{消化液}) : V(\text{胎牛血清}) = 19 : 1$  的比例立即加入 FBS 终止消化, 玻璃吸管 (10 mL) 反复吹打 5 min 后, 静置 1 min, 吸取上清细胞悬液到细胞培养瓶中备用。

### 5. 离心



## 2.3.6 胶原酶 I、IV 联合消化液

**摘要:** 以强化培育后草鱼的肠道粘膜为试验材料,采用不同消化法和离心转速梯度分离肠道粘膜细胞团,分别试验不同培养液与不同 CO<sub>2</sub> 浓度组合、胎牛血清浓度及细胞接种浓度时细胞生长效果,并且观察草鱼原代肠道粘膜细胞生长过程,同时采用 3 种细胞形态观察法、MTT 检测法及相关酶活力系统评价细胞培养效果。结果表明:采用机械刮取消化法,分离转速为 400 r/min,在使用 M199 培养液、6% CO<sub>2</sub>、15% 胎牛血清、接种浓度为  $2 \times 10^3$  (个/孔) 条件下可批量复制草鱼原代肠道粘膜上皮细胞;细胞增殖过程符合动物原代肠道粘膜上皮细胞生长分化规律,采用荧光倒置显微镜与 Giemsa 染色法相结合、MTT 检测法、AKP 酶活力及 LDH/MTT OD 值可系统评价细胞培养效果。



## 200×

1. 未强化投饲, 培养24 h 后;
2. 强化投饲, 培养 24 h 后
3. 机械剪碎消化法, 单个细胞
4. 肠囊翻转消化法, 肠道粘膜细胞团
5. 机械刮取消除法, 肠道粘膜细胞团
6. 机械剪碎消化法, 培养 24 h, 加入MTT 2 h 后, 成纤维细胞生长
7. 200 r /min 转速离心;
8. 400 r /min 转速离心;
9. 600 r /min 转速离心;
10. 800 r /min 转速离心;
11. 添加 0% 浓度胎牛血清, 培养 48 h 后;
12. 添加 15% 浓度胎牛血清, 培养 24 h 后。



## 2.3.6 胶原酶 I、IV 联合消化液

第 38 卷 第 1 期

Vol 38 No 1

淡 水 渔 业

Freshwater Fisheries

2008 年 1 月

Jan 2008

### 鲫肠道上皮细胞原代培养方法的研究

宋增福<sup>1,3</sup>, 吴天星<sup>2</sup>, 潘晓东<sup>1</sup>

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029; 2. 浙江大学理学院, 杭州 310029;

3. 上海水产大学生命学院, 上海 200090)

**摘要:** 探讨了健康鲫 (*Carassius auratus*) 幼鱼肠道上皮细胞的原代培养方法。结果显示, 用含有抗生素、胶原蛋白酶 I、EDTA 和胶原蛋白酶 IV 组成的 D-Hank's 液消化无菌分离的鲫肠道可以获得大量细胞团及绒毛隐窝; 用含有抗生素、胎牛血清 (FBS)、表皮生长因子 (EGF)、胰岛素的 DMEM 培养液进行培养, 并根据肠道上皮细胞与成纤维细胞贴壁时间的差异进一步纯化, 连续培养 12 d 后可以得到纯化的肠道上皮细胞。

**关键词:** 鲫 (*Carassius auratus*); 肠道上皮细胞; 原代培养

中图分类号: Q172

文献标识码: A

文章编号: 1000-6907-(2008)01-0067-03

实验取材: 体长 4 ~ 6 cm, 体重 10 ~ 12 g 左右的健康鲫幼鱼



## 分离:

1. 鲫饲养于含抗生素液(青霉素、链霉素、庆大霉素)的水体中,禁食数天。头部敲打致死,放入70%乙醇中消毒1 min。
2. 在无菌室中取出中段肠道,剪除肠系膜,纵行剪开肠壁,用D-Hanks液(其中含青霉素20万IU/L、链霉素200 mg/L和庆大霉素20万U/L)冲洗数次,洗去黏液。
3. 将肠壁剪碎,加入含有胶原蛋白酶 I 0.2 g/L、EDTA 0.02%和胶原蛋白酶 IV 0.2 g/L的D-Hank s液,28℃水浴中振荡消化20 min。
4. 吸管反复吹打直到光镜下出现大量细胞及细胞团,加入DMEM含5%胎牛血清终止消化,1000 r/min离心5 min,弃上清液,加入含抗生素的DMEM制得细胞悬液。

## 纯化:

1. 将细胞悬液接种于 24 孔培养板 , 培养板底壁涂有I型胶原 , 每孔接种浓度为  $1 \times 10^4$  个 /mL , 培养液总体积 1 mL ( 含 FBS 5%、表皮生长因子 0.01 mg/L ( EGF ) 、胰岛素 200 U/L、青霉素 10 万 IU/L、链霉素 100 mg/L 和庆大霉素 10 万 U/L ) 。
2. 置 28 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 。 培养 90 min 后 , 把培养液连同未贴壁的细胞转入新的培养板继续培养 。 每 48 h 更换培养液一次 , 12 d 左右基本铺满底壁 。
3. 传代培养时移去培养液 , 加入少许 D-Hanks 液 , 浸润所有细胞后移去 , 加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液消化 , 吹打分散接种新的培养板培养 。



## 鲫鱼IECs

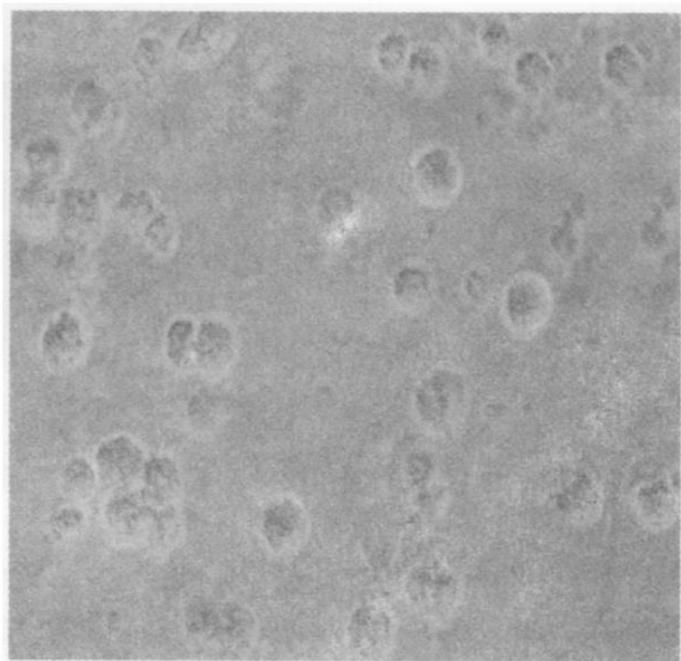


图 1 消化后显现的 IEC 细胞 (相差显微镜 $\times 400$ )  
Fig 1 IECs appeared after the digesting treatment  
(inverted Phase microscope $\times 400$ )

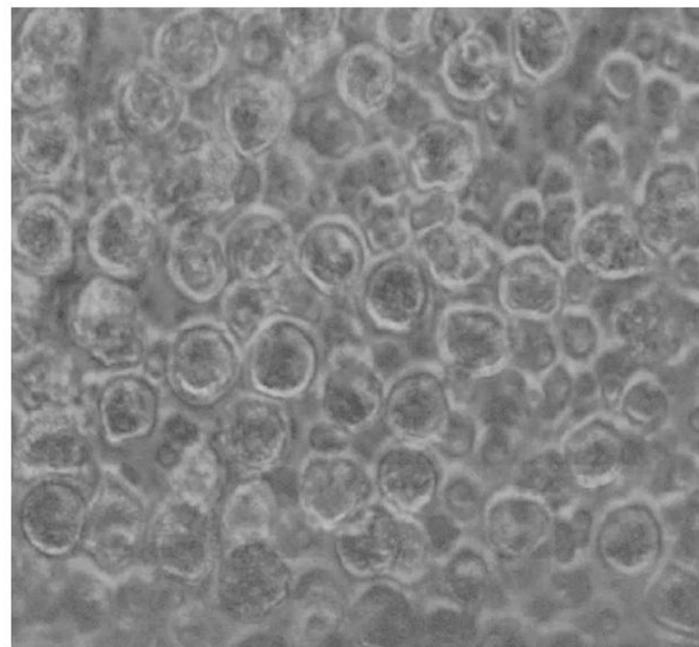


图 2 培养 12 天的 IEC (相差显微镜 $\times 400$ )  
Fig 2 IEC morphology cultured after 12 d  
(inverted Phase microscope $\times 400$ )

## 3. 肠上皮细胞的培养条件

3.1 包被基质

3.2 FBS

3.3 谷氨酰胺

3.4 生长因子和激素



# 3. 肠上皮细胞的培养条件

## 3.1 包被基质

大多采用胶原蛋白（通常为I型）包被，以存进肠上皮细胞的贴壁。

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101948533 A

(43) 申请公布日 2011.01.19

(21) 申请号 201010288301.0

(22) 申请日 2010.09.21

(71) 申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱路199号

(72) 发明人 叶元土 蔡春芳 戴如燕 唐焱

姚仕彬 宋亮

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有

限公司 32103

代理人 陶海锋

(51) Int. Cl.

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

G12N 5/071 (2010.01)

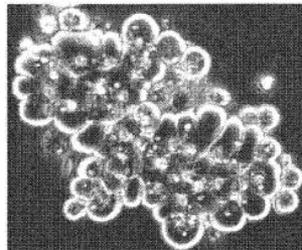
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种鱼皮胶原蛋白的制备方法

(57) 摘要

本发明属于鱼皮胶原蛋白加工领域，具体涉及一种可以作为鱼类细胞培养载体的鱼皮胶原蛋白制备方法，包括原料处理、提取、盐析、纯化透析干燥步骤，其中，所述原料处理中采用无水乙醚于35~40℃回流3~4h，除去鱼皮的脂肪，然后风干，得到除脂后的鱼皮渣；所述提取步骤为：按照固液比为1：50~70，将0.5~0.6M乙酸加入除脂后的鱼皮渣中，浸提60~80h，40目筛卷网过滤得到含鱼皮胶原蛋白的滤液；重复进行一次。本发明在保持所得鱼皮胶原蛋白的生物特性、纯度的基础上，提高得率，并且应用所得鱼皮胶原蛋白作为鱼类细胞培养载体时，细胞亲和性好、贴壁速度快、细胞生长良好、生长密度高，相对于牛皮胶原蛋白或鼠尾胶原蛋白而言取得了显著的进步。



# 3. 肠上皮细胞的培养条件

## 3.2 FBS

鲤鱼: 2% FBS

动物营养学报 2011, 23 (7) :1140-1146  
*Chinese Journal of Animal Nutrition*

doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2011.07.011

### 大豆凝集素对鲤鱼肠道上皮细胞结构和功能的影响

冯琳<sup>1,2</sup> 姜俊<sup>1,2</sup> 刘扬<sup>1</sup> 胡凯<sup>1,2</sup> 姜维丹<sup>1,2</sup> 周小秋<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014; 2. 鱼类营养与安全生产四川省高校重点实验室, 雅安 325014)

鲫鱼: 5% FBS

第 38 卷 第 1 期  
Vol 38 No 1

淡水渔业  
Freshwater Fisheries

2008 年 1 月  
Jan 2008

### 鲫肠道上皮细胞原代培养方法的研究

宋增福<sup>1,3</sup>, 吴天星<sup>2</sup>, 潘晓东<sup>1</sup>

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029 2 浙江大学理学院, 杭州 310029

3. 上海水产大学生命学院, 上海 200090)



## 3.2 FBS



河南师范大学

HENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学·止于至善

第7卷第5期  
1997年5月

中国现代医学杂志  
China Journal of Modern Medicine

Vol. 7 No. 5  
May 1997

### 大鼠小肠上皮细胞培养体系的建立及其影响因素的探讨

冉新泽 粟永萍 程天民 林远 刘晓宏

**【摘要】**：作者引进并建立了大鼠小肠上皮细胞(IEC-6)的培养传代和活性检测的实验方法;且对几种影响因素进行了探讨。实验发现,IEC-6在一定密度范围内与 $^3\text{H-TdR}$ 参入量呈正相关变化;培养72h以内,参入量随时间延长而增加; $^3\text{H-TdR}$  55.5KBq/孔内,计数值与剂量间呈线性关系;胎牛血清浓度以10%为宜,但不加胰岛素组显著降低,pH值以7.26最好。IEC-6在4~26Gy照射范围内,剂量效应是非常显著的负相关( $r=-0.970$ )。此法操作简便,传代稳定,指标客观,重复性好,为开展相关研究提供了重要的条件。

**【作者单位】**：重庆第三军医大学预防医学系 重庆第三军医大学预防医学系 重庆第三军医大学预防医学系 重庆第三军医大学预防医学系 重庆第三军医大学预防医学系

**【关键词】**：肠上皮细胞 培养方法  $^3\text{H-TdR}$ 参入 大鼠

**【基金】**：国家自然科学基金项目 NO.39100119

**【分类号】**：R329

### 大鼠肠上皮细胞株(IEC-6)培养：

37°C, 10% CO<sub>2</sub>; DMEM (100 mM HEPES, 100 U/ml青霉素, 100 μg/ml链霉素, 3.7 g 碳酸氢钠, 200 mmol/L L-谷氨酰胺, 4500 mg/L 葡萄糖)

### 最佳条件：

- (1) 密度 $10 \times 10^4$  cells/孔 (96孔板)
- (2) 培养时间：72 h
- (3) PH值：7.26
- (4) 10% FBS, 加胰岛素(浓度?)



## 3.2 FBS



河南师范大学

HENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学·止于至善

第22卷第1期  
2013年1月

上海海洋大学学报  
JOURNAL OF SHANGHAI OCEAN UNIVERSITY

Vol.22, No.1  
Jan., 2013

文章编号: 1674 - 5566 (2013) 01 - 0033 - 09

### 草鱼肠道粘膜上皮细胞的分离与原代培养

姚仕彬<sup>1</sup>, 叶元土<sup>1</sup>, 蔡春芳<sup>1</sup>, 姚林杰<sup>1</sup>, 许凡<sup>1</sup>, 刘猛<sup>1</sup>, 萧培珍<sup>2</sup>,  
王丽宏<sup>2</sup>

(1. 苏州大学 医学部, 江苏 苏州 215123; 2. 北京市营养源研究所 系统营养工程技术研究中心, 北京 100069)

草鱼:

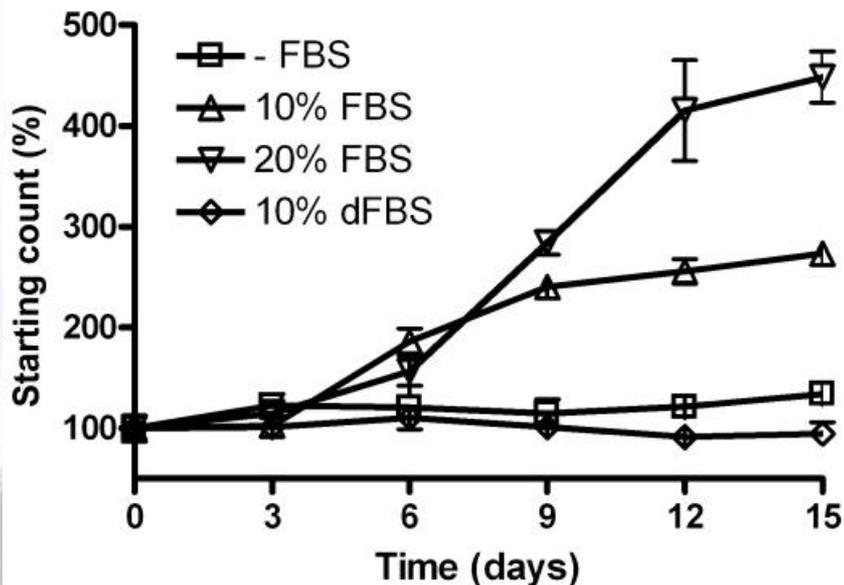
15% FBS

**表4 胎牛血清浓度对草鱼 IECs 生长的影响**  
**Tab.4 Effects of different concentrations of serum on proliferation of IECs in primary culture**

胎牛血清浓度 / %	样本数 / 孔	MTT OD 值
0	12	0.283 ± 0.073 <sup>a</sup>
5	12	0.469 ± 0.087 <sup>b</sup>
10	12	0.509 ± 0.161 <sup>b</sup>
15	12	0.631 ± 0.121 <sup>c</sup>
20	12	0.677 ± 0.119 <sup>c</sup>

# 3. 肠上皮细胞的培养条件

虹鳟：20% FBS



## Aquaculture Nutrition

*Aquaculture Nutrition* 2011 17; e241–e252

doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x

Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide

A. KAWANO<sup>1</sup>, C. HAIDUK<sup>2</sup>, K. SCHIRMER<sup>3</sup>, R. HANNER<sup>4</sup>, L.E.J. LEE<sup>5</sup>, B. DIXON<sup>1</sup> & N.C. BOLS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada; <sup>2</sup> UFZ, Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany; <sup>3</sup> Eawag–Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology, Dübendorf, Switzerland; <sup>4</sup> Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada; <sup>5</sup> Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo, Ontario, Canada

**Figure 2** Growth curves for RTgutGC grown in different L15 media compositions. Cultures were initiated at approximately  $5.0 \times 10^4$  cells well<sup>-1</sup> in 12-well tissue culture plates at room temperature. The next day, cell number was determined with a Coulter counter for three wells (starting count) and cells were grown in L15 alone, 10% fetal bovine serum (FBS), 20% FBS or 10% dFBS. Subsequent cell counts were made every 3 days over a 15-days period and expressed as a percentage of the starting count.



## 3.2 FBS

动物医学进展, 2007, 28(4): 53-57  
Progress in Veterinary Medicine

文献综述

### 哺乳动物肠上皮细胞的原代培养\*

刘芳宁, 张彦明\*

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨陵 712100)

**摘要:** 肠上皮细胞是由多功能干细胞分化成的一个高度组织化系统。从离体的肠组织中分离的肠隐窝单位或肠上皮细胞可在数小时内保持高度活力, 但要长期(达到 10 d)原代培养肠上皮细胞仍然很困难。文章对肠上皮细胞的分离、鉴定、原代培养所需维持培养基和生长培养基的设计及培养条件等方面进行了综述。

**关键词:** 原代培养; 哺乳动物; 小肠; 结肠; 上皮组织

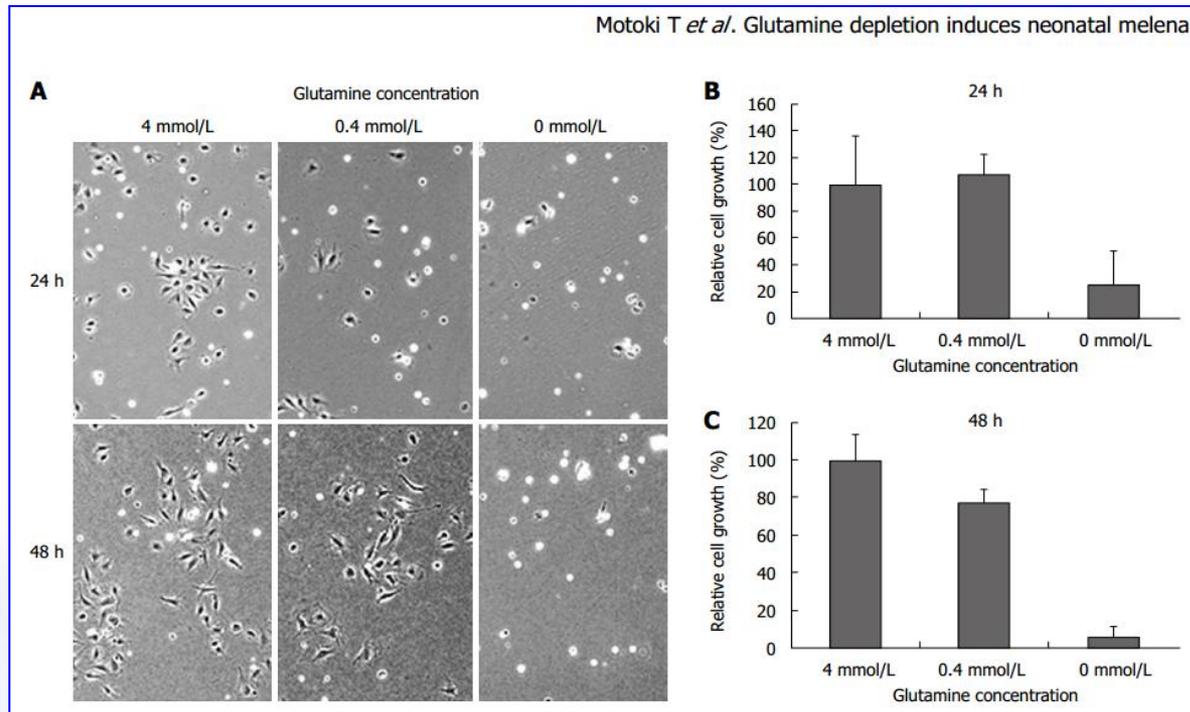
## 哺乳动物: 建议2.5% - 5% FBS

胎牛血清可以促进上皮细胞的生长, 在培养基中添加胎牛血清可以保护细胞免受残留的细胞毒素和渗透压改变带来的刺激。一般认为胎牛血清中含有 1 ng/mL ~ 100 ng/mL 的生长因子。但如果胎牛血清浓度较高 (10% ~ 15%), 则对上皮细胞具有一定的细胞毒性。Fukamachi H (1992) 发现用无血清

培养基培养起来的胎鼠肠细胞, 如果再用含血清培养基在培养, 细胞的增殖明显会被抑制。在肠细胞的原代培中, 胎牛血清的添加量一般是 2.5% ~ 5%。目前选择的培养基主要是用于维持肠细胞的短期生存, 其中 DMEM 是最基础的培养基。

# 3. 肠上皮细胞的培养条件

## 3.3 谷氨酰胺



**Figure 4 Glutamine depletion suppresses cell proliferation of cultured intestinal epithelial cells.** A: IEC6 rat intestinal epithelial cells were treated with media containing different amounts of glutamine (0, 0.4 and 4 mmol/L); Cell morphology and cell number were observed at the indicated time points (B: 24 h, C: 48 h).

## 3. 肠上皮细胞的培养条件

### 3.4 生长因子和激素

**EGF :**

1 ng/mL ~ 50 ng/mL , 通常为 10 ng/mL或20 ng/mL

**Insulin :**

1  $\mu$ g/mL ~ 10  $\mu$ g/mL

## 4. 肠上皮细胞的鉴定

4.1 酶活检测

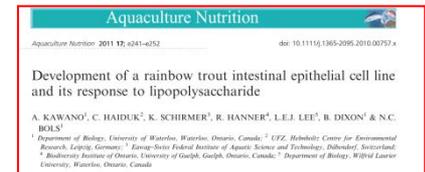
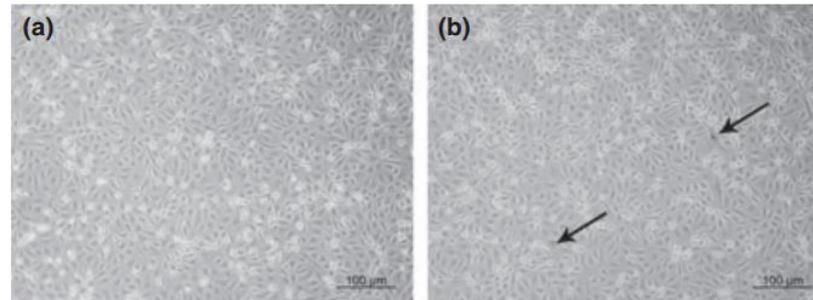
4.2 电镜观察刷状缘

4.3 组织特异性marker

# 4. 肠上皮细胞的鉴定

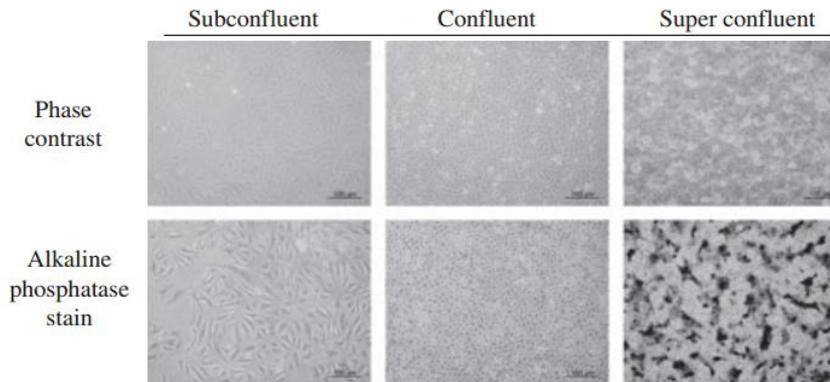
## 4.1 酶活检测

虹鳟



$\beta$ -半乳糖苷酶

**Figure 3** Examination of RTgutGC cultures for  $\beta$ -galactosidase activity. A histochemical stain for  $\beta$ -galactosidase activity was applied overnight to cultures of RTgutGC. Photomicrographs are shown for fixed (a) and stained (b) cells. Cells showing blue staining were found in a small percentage of RTgutGC cultures, with some indicated by *arrows*. *Scale bar* indicates 100  $\mu\text{m}$ .

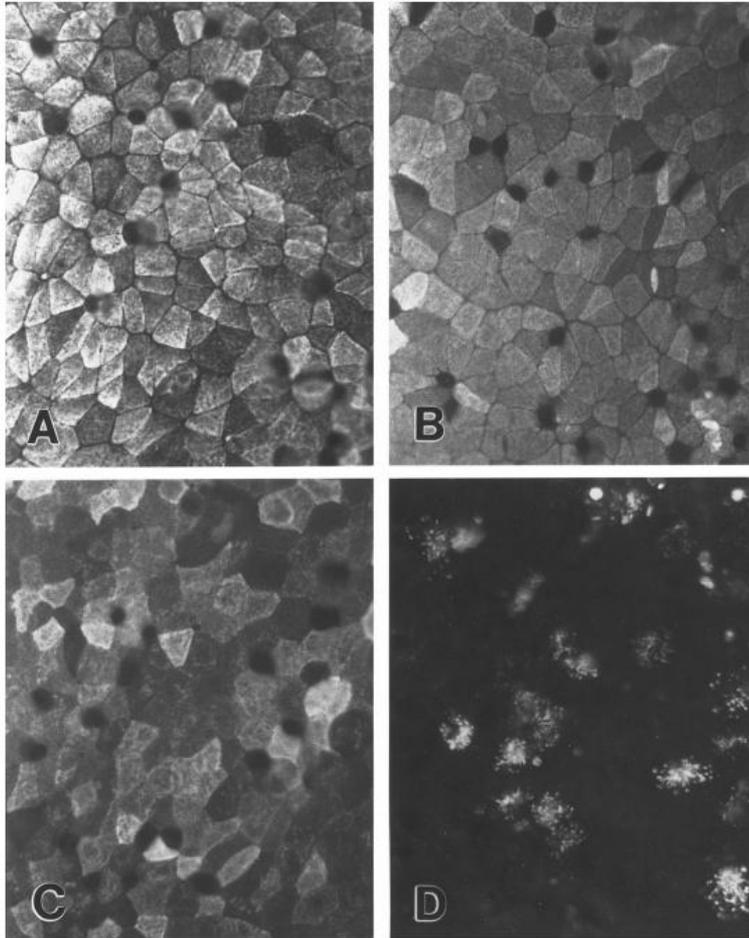


碱性磷酸酶

**Figure 4** Examination of RTgutGC cultures for alkaline phosphatase activity at varying cell densities. A histochemical stain for AP activity was applied for 2.5 h to cultures for RTgutGC. The top row shows RTgutGC seeded at varying densities prior to detecting AP activity. The bottom row shows RTgutGC seeded at varying densities after AP staining. *Scale bar* indicates 100  $\mu\text{m}$ .

# 4. 肠上皮细胞的鉴定

## 4.1 酶活检测



胎儿IECs

Indirect immunodetection of intestinal cell markers in PCDE 6 days after plating.

A, sucrase-isomaltase (蔗糖酶-异麦芽糖酶)

B, aminopeptidase N (氨肽酶N)

C, lactase-phlorizin hydrolase (乳糖酶-根皮苷水解酶)

D, MIM-1/39 antigen (crypt-cell marker)

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH **245**, 34-42 (1998)  
ARTICLE NO. EX984221

Primary Cultures of Fully Differentiated and Pure Human  
Intestinal Epithelial Cells

Nathalie Perreault and Jean-François Beaulieu<sup>1</sup>

Centre de Recherche en Biologie du Développement des Épithéliums et Thématique de Physiopathologie Digestive du Centre  
de Recherche Clinique du CUSE, Département of Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4



# 4. 肠上皮细胞的鉴定

## 4.2 电镜观察刷状缘

### 鲫肠道上皮细胞原代培养方法的研究

宋增福<sup>1,3</sup>, 吴天星<sup>2</sup>, 潘晓东<sup>1</sup>

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029 2 浙江大学理学院, 杭州 310029  
3. 上海水产大学生命学院, 上海 200090)

**摘要:** 探讨了健康鲫 (*Carassius auratus*) 幼鱼肠道上皮细胞的原代培养方法。结果显示, 用含有抗生素、胶原蛋白酶I、EDTA和胶原蛋白酶IV组成的D-Hank's液消化无菌分离的鲫肠道可以获得大量细胞团及绒毛隐窝; 用含有抗生素、胎牛血清(FBS)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素的DMEM培养液进行培养, 并根据肠道上皮细胞与成纤维细胞贴壁时间的差异进一步纯化, 连续培养12d后可以得到纯化的肠道上皮细胞。

**关键词:** 鲫 (*Carassius auratus*); 肠道上皮细胞; 原代培养

中图分类号: Q172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6907-(2008)01-0067-03

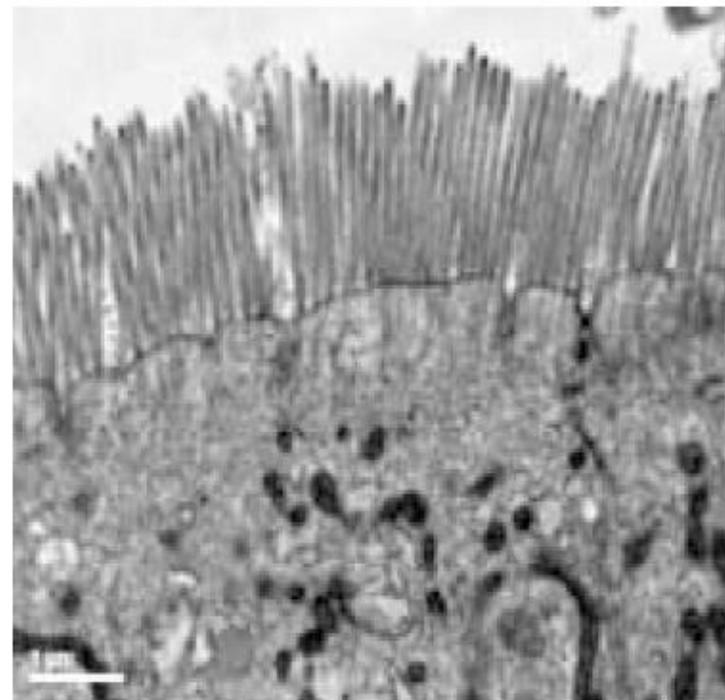
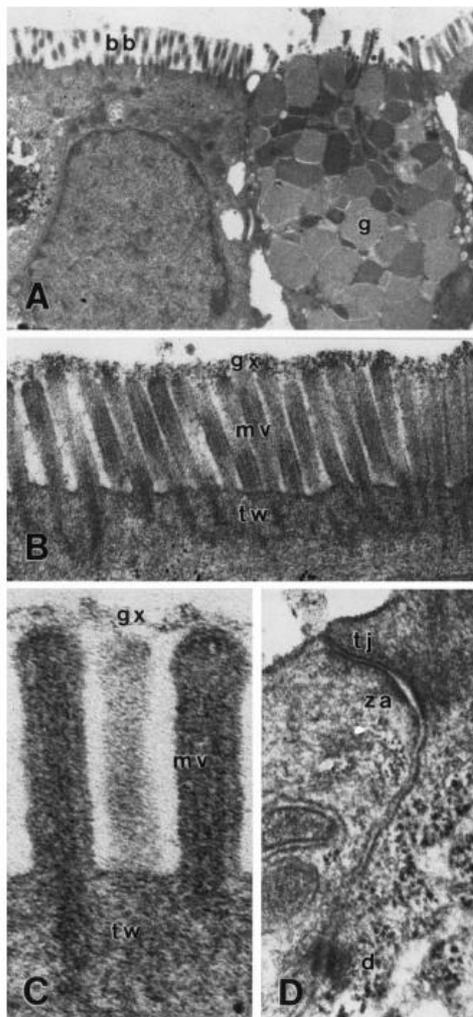


图 3 IECs细胞微绒毛(透射电镜×2000)  
Fig 3 The microvillus of the IECs  
(transmission electron microscopy×2000)



# 4. 肠上皮细胞的鉴定

## 4.2 电镜观察刷状缘



### 胎儿IECs

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 245, 34–42 (1998)  
ARTICLE NO. EX984221

Primary Cultures of Fully Differentiated and Pure Human Intestinal Epithelial Cells

Nathalie Perreault and Jean-François Beaulieu<sup>1</sup>

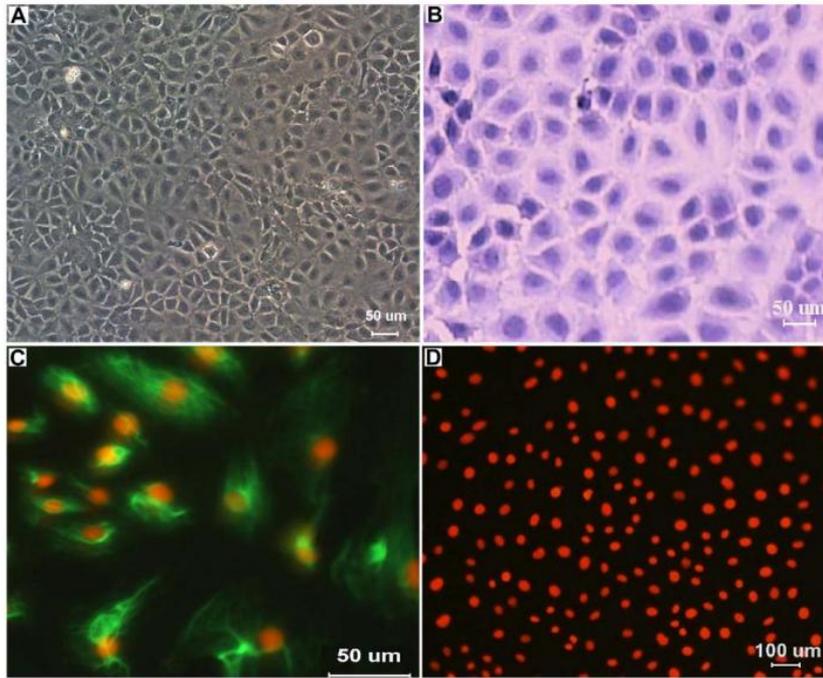
Centre de Recherche en Biologie du Développement des Épithéliums et Thématique de Physiopathologie Digestive du Centre de Recherche Clinique du CUSSE, Département of Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

Electron microscopy analysis of the ultrastructural characteristics of primary cultures of differentiated enterocytes (PCDE) 6 days after plating.

PCDE cultures are mainly composed of [absorptive and goblet cells](#) (A) displaying ultrastructural characteristics typical of their *in vivo* counterpart, the villus epithelium. Note in particular the presence of mucus granules (g) in goblet cells and [the presence of a well-organized brush border \(bb\) at the luminal domain of absorptive cells](#). At higher magnification, the fine structural organization of the brush border (B, C) including microvilli (mv), terminal web (tw), and glycocalyx (gx) as well as junctional complexes (D) including the tight junction (tj), zonula adherens (za), and desmosome (d) appear normal.

# 4. 肠上皮细胞的鉴定

## 4.3 组织特异性marker



OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Normal Mouse Intestinal Epithelial Cells as a Model for the *in vitro* Invasion of *Trichinella spiralis* Infective Larvae

Hui Jun Ren, Jing Cui\*, Zhong Quan Wang, Ruo Dan Liu

Department of Parasitology, Medical College, Zhengzhou University, P. R. China

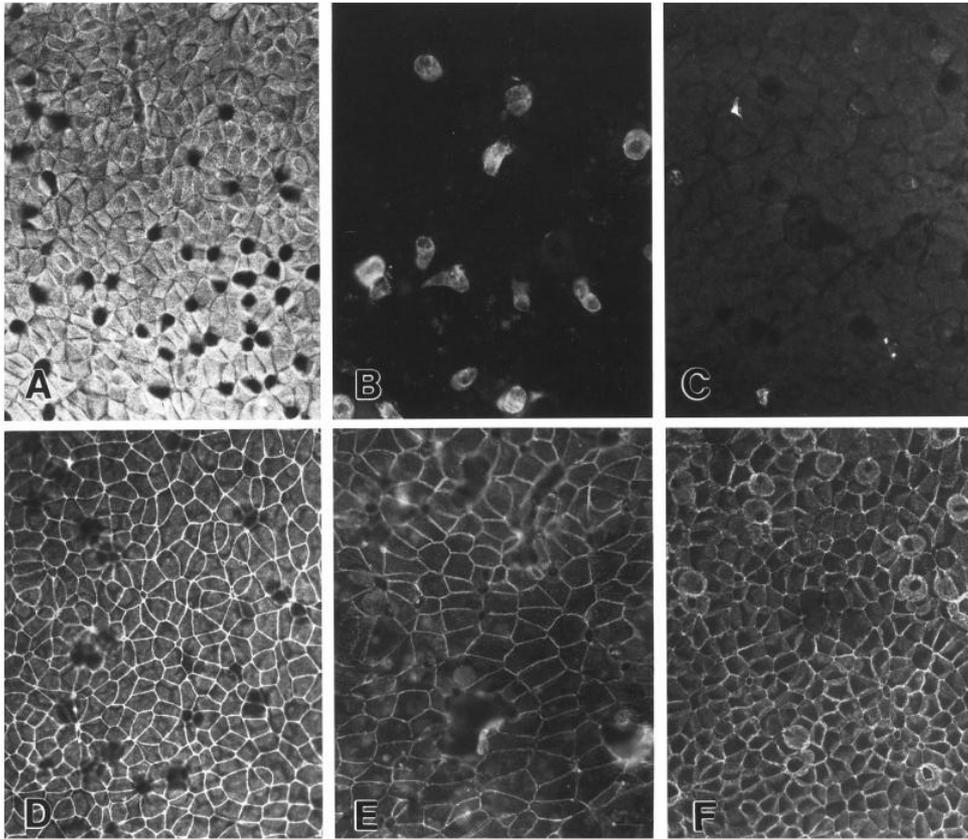
October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e27010

免疫荧光检测  
小鼠IECs角蛋白18

Morphological characteristic and Immunofluorescence staining of fetal mouse IECs. (A) The IECs formed a tightly packed monolayer with **typical cobblestone morphology** (passage 8). (B) HE staining of IECs. (C) Immunofluorescence staining of IEC cytokeratins, **cytokeratin 18** was clearly detected in the cytoplasm of IECs with a green color. (D) No green fluorescence in the cytoplasm of IECs was found and only the nucleus was stained red with propidium iodide (PI) in the negative controls.

# 4. 肠上皮细胞的鉴定

## 4.3 组织特异性marker



Indirect immunofluorescence of tissue-specific cell markers in PCDE 6 days after plating.

- A. keratin 18 (角蛋白18, 柱状上皮细胞)
- B. intestinal mucins (肠粘蛋白, 杯状上皮细胞)
- C. vimentin (波形蛋白, 间充质细胞)
- D. ZO-1 (紧密连接)
- E. desmosomal components (桥粒连接)
- F. E-cadherin (粘附连接)

上皮细胞之间相邻细胞侧膜的顶部存在三种连接复合结构, 即紧密连接、黏附连接和桥粒连接。

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 265, 34-42 (1999)  
ARTICLE NO. ENR0423

Primary Cultures of Fully Differentiated and Pure Human Intestinal Epithelial Cells

Nathalie Perreault and Jean-François Beaulieu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Biologie du Développement des Epithéliums et Tissulaires de Physiopathologie Digestive du Centre de Recherche Clinique du C.S.C. Département de Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5M4



# 5. 肠上皮细胞培养难点

5.1 凋亡易，增殖难

5.2 贴壁能力弱

5.3 易污染

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102382795 A

(43) 申请公布日 2012.03.21

(21) 申请号 201110348822.5

(22) 申请日 2011.11.08

(71) 申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路  
211 号

(72) 发明人 周小秋 姜俊 冯琳 刘扬 胡凯  
姜维丹

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 4 页

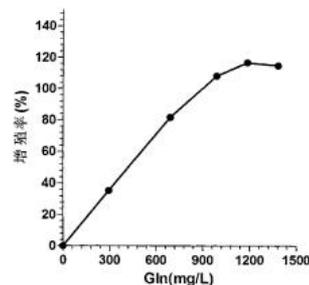
(54) 发明名称

一种维持鱼类肠细胞增殖分化的原代培养方法

法

(57) 摘要

本发明公开了维持鱼类肠细胞增殖分化的原代培养方法,包括以下步骤:1)、按常规方法将鱼体表消毒,无菌取出整个内脏,去除肠道表面的系膜组织,洗净肠道内容物;2)、将肠道剪切成2~3mm的组织小块;3)、用混合液消化分离肠细胞,得到鱼肠细胞和细胞团;4)、用离心方法分离纯化得到鱼肠细胞团;5)、将分离纯化的鱼肠细胞团计数接种于胶原蛋白涂抹的培养板中进行培养;6)、接种的鱼肠细胞团在24~26℃条件下原代培养,细胞贴壁生长,增殖分化。本发明根据鱼类肠道组织结构特点,摸索了最佳的鱼肠细胞分离酶的种类、使用浓度和肠细胞团的纯化方法。采用商品胶原蛋白涂抹方便涂抹细胞培养器皿,摸索了最佳的鱼肠细胞接种和密闭培养条件。





河南师范大学

HENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学·止于至善

Thanks !

