

网络出版时间:2013-05-02 10:54
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130502.1054.013.html>

4 种小鼠肠上皮细胞分离培养方法的比较

孙秀梅^a,程帆^b,刘维^a,孙涛^a,薛秀恒^b,李培英^a,王菊花^a

(安徽农业大学 a 动物科技学院, b 茶与食品科技学院,安徽合肥 230036)

[摘要] **【目的】**比较 4 种小鼠肠黏膜上皮细胞(Intestinal epithelial cells,IECs)分离方法的分离效果,建立小鼠 IECs 的有效分离培养方法,获得小鼠 IECs 原代细胞,为后续研究做准备。**【方法】**分别采用组织块培养法、嗜热菌蛋白酶消化法、胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法以及胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ联合消化法共 4 种方法分离小鼠 IECs 并培养,通过细胞免疫组织化学法和细胞免疫荧光法对分离的 IECs 进行细胞特异性鉴定,比较 4 种方法的分离效果。**【结果】**组织块培养法所获 IECs 活力好,增殖能力强,但成纤维细胞污染较严重,细胞纯度低;胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ分离法获得的 IECs 数量少且细胞增殖能力弱;嗜热菌蛋白酶消化法及胶原酶Ⅺ与中性蛋白酶Ⅰ联合消化法所获得的小鼠 IECs 纯度较高,原代培养时增殖能力稍弱于组织块培养法,但传代后增殖能力趋于稳定。通过细胞免疫组织化学法和细胞免疫荧光法对分离的细胞进行鉴定,结果表明,分离的细胞多数为小鼠 IECs。**【结论】**嗜热菌蛋白酶消化法及胶原酶Ⅺ与中性蛋白酶Ⅰ联合消化法均适合肠道上皮细胞的分离和培养。

[关键词] 小鼠;小肠上皮细胞;原代培养;组织块分离培养法;酶学分离培养法

[中图分类号] Q813.1⁺1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2013)05-0025-07

Comparison of four primary culture methods for mouse intestinal epithelial cells

SUN Xiu-mei^a,CHENG Fan^b,LIU Wei^a,SUN Tao^a,
XUE Xiu-heng^b,LI Pei-ying^a,WANG Ju-hua^a

(a College of Animal Technology, b College of Tea&Food Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: **【Objective】** Separation results of four primary culture methods for mouse intestinal epithelial cells were compared to choose and establish utility separation culture method for obtaining mouse IECs and preparing for future research. **【Method】** The four methods, tissue fractional cultivation, thermolysin enzyme digestion, association digestion of collagenase XI and dispase I, and association digestion collagenase I and dispase VI were used to separate and culture mouse IECs. The separation results were compared by the cell immunohistochemistry method and cell immunofluorescence method to identify the cell specificity of the separated IECs. **【Result】** The results showed that the intestinal epithelial cells obtained by tissue culture method had the highest proliferation ability and better viability, but with serious fibroblasts pollution and lower purity. The collagenase I and neutral protease VI method only obtained a few intestinal epithelial cells with lower proliferation. The rmolysin digestion method and the joint digestion method of collagenase XI and neutral protease I obtained intestinal epithelial cells with higher purity and the proliferation ability

[收稿日期] 2012-08-11
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31001019);安徽省自然科学基金项目(11040606M91)
[作者简介] 孙秀梅(1987—),女,黑龙江富裕人,在读硕士,主要从事反刍动物营养转运研究。E-mail: 605923728@qq.com
[通信作者] 王菊花(1975—),女,内蒙古锡盟人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物营养生理研究。
李培英(1953—),女,安徽省泗县人,教授,硕士生导师,主要从事兽医寄生虫与寄生虫病学研究。

was slightly weaker than the tissue culture method. However, the proliferation ability was more stabilized. The results of cell specificity of the separated IECs by the two methods using the cell immunohistochemistry method and cell immunofluorescence method showed that most of the separated cells were IECs. 【Conclusion】 Thermolysin digestion method and Collagenase XI and Dispase I combined digestion method are suitable for isolating and cultivating Intestinal epithelial cells.

Key words: mouse; mouse intestinal epithelial cells; primary culture; tissue fractional cultivation; enzymology fractional cultivation

肠黏膜上皮细胞(Intestinal epithelial cells, IECs)是消化道中消化、吸收营养物质的主要功能性细胞,体外培养 IECs 已成为深入研究动物肠道功能、病理及细胞分化的重要途径^[1-2]。自 20 世纪 70 年代以来,学者们便开始对鼠的肠上皮细胞进行体外培养和建系研究。1978 年,Quaroni 等^[3]建立了 IEC-6 细胞株,它保持了肠上皮干细胞未分化的特性。IEC-18 也是由 Quaroni 等^[3]最先从大鼠回肠隐窝细胞中分离出并成功建系的细胞系,其保持了增殖的隐窝细胞的许多特性^[4],在正常的培养条件下该细胞存活力高,保持了肠隐窝细胞的显型,并且能够分化成肠上皮细胞^[5]。之后,研究者逐渐建立胎鼠永久小肠上皮细胞系^[6-7]、大鼠 IECs 原代培养方法^[8]、人类结肠和小肠上皮细胞系^[9-10]及山羊 IECs 的单克隆细胞株^[11]。冉新泽等^[12]进一步对大鼠小肠上皮细胞培养体系的影响因素进行了探讨,为开展相关研究提供了重要条件。综观以上研究可知,体外培养 IECs 的关键步骤是选材和分离方法,材料一般是胚胎或新生动物^[13],分离方法目前主要有组织块分离培养法^[11]、螯合剂分离培养法^[14]和酶学分离培养法^[15-16],究竟哪种方法更易分离得到形态完整且易贴壁生长的细胞,有待于进一步研究。本研究分析比较了 4 种小鼠肠上皮细胞原代分离培养方法对肠道上皮细胞贴壁生长的影响,旨在筛选出适宜的分离方法,为今后 IECs 的体外培养提供方法支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 怀孕 16~19 日的 KM 雌鼠,8 周龄,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 DMEM-F12 培养液, Thermo 公司;胎牛血清(FBS)和牛血清白蛋白(BSA),杭州四季青公司;小肠细胞培养基:DMEM-F12 培养基中添加体积分数 2% 的 FBS、0.65 g/L 谷氨酰胺(Gln)、0.01 g/L 表皮生长因子(EGF)、100 U/mL

青霉素、0.1 g/L 链霉素、5 g/L 胰岛素;青霉素(100 U/mL)和链霉素(0.1 g/L),上海生工生物工程有限公司;胶原酶 XI 型 C7657、中性蛋白酶 I 型 D4818、嗜热菌蛋白酶、胰酶工作液和 DPBS 缓冲液,美国 Sigma 公司;分散液:DMEM-F12 中添加体积分数 2.5% FBS 和体积分数 2% 山梨醇,0.2 μm 过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;细胞鉴定试剂:体积分数 4% 多聚甲醛,体积分数 0.5% Triton X-100,体积分数 3% H_2O_2 , 10 g/L BSA, DAPI(0.005 g/L)。小鼠肠上皮细胞抗体:一抗为兔抗鼠细胞角蛋白 18(CK18),康为世纪公司;免疫组化二抗为羊抗兔 IgG 血清,北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 培养皿的准备 取一次性细胞培养皿,加入质量分数 0.2% 明胶铺满整个皿底,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min 后取出,吸弃明胶,用 DPBS 洗 3 次,吸弃 DPBS 后备用。

1.2.2 上皮细胞的前处理 无菌条件下取出 16~19 日龄胎鼠小肠,在显微镜下剔除肠系膜,将小肠移至培养皿中,用 DPBS 反复清洗,直到上清液清亮为止,再用含青霉素(300 U/mL)和链霉素(0.3 g/L)的无血清 DMEM-F12 清洗数次。将肠管剪成肉眼可见的碎片,用无血清的 DMEM-F12 清洗后,1 200 r/min 离心 3 min,弃去上清,取沉淀备用。

1.2.3 组织块培养法 前处理后,继续剪碎样品成小于 1 mm^3 的碎片,转移至离心管中,加无血清 DMEM-F12 清洗,用移液管反复吹打,1 200 r/min 离心 3 min;用 DPBS 反复清洗沉淀组织块,直至上清液澄清;吸去上清液后,取适量沉淀均匀平铺于皿底,加少许 FBS,倒置培养皿,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养,8 h 后加完全培养液,继续培养。

1.2.4 嗜热菌蛋白酶消化法 向前处理沉淀中加入适量嗜热菌蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min,期间每 5 min 振荡 1 次,1 200 r/min 离心 3 min,弃去上清液,沉淀用适量完全培养液重悬,用孔径为 2.84

mm 的尼龙网过滤;取适量滤液接种于培养皿中,培养 48 h 后换液。

1.2.5 胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法 向前处理沉淀中加入适量胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ,37℃消化 20 min,用移液枪吹吸 150 次,静置 1 min,取上清液,重复此步 2 次;向上清液中加入 10 mL 分散液,混匀,1 200 r/min 离心 3 min,弃去上清液,沉淀用分散液重悬,重复此步 5~6 次,直至上清液澄清且隐窝单位明显为止;最后用完全培养液重悬,接种于培养皿中,培养 48 h 后换液。

1.2.6 胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ联合消化法 操作步骤同 1.2.5。

1.2.7 小鼠肠上皮细胞的纯化与鉴定 用以上分离培养法得到的分散细胞经相差贴壁法纯化后,进行免疫组化和免疫荧光鉴定。细胞免疫组化方法如下,将培养在 4 孔板的细胞用体积分数 4% 多聚甲醛固定 15 min,DPBS 冲洗后,用体积分数 0.5% Triton X-100 DPBS 溶液透化 20 min,DPBS 冲洗后用体积分数 3% H₂O₂ 孵育 5~10 min,DPBS 冲洗;用山羊抗鼠血清室温封闭 10~15 min,吸去封闭液,勿洗;加一抗(兔抗鼠 CK18)工作液,4℃孵育过夜,DPBS 冲洗后加二抗(羊抗兔 IgG 血清)工作液,37℃孵育 30 min,加 S-A/HRP,室温或 37℃孵育 10~15 min,DPBS 冲洗,DAB 显色液显色 30 s 后立即用 DPBS 冲洗,在显微镜下观察。试验同时设阴性对照,以 DPBS 代替一抗。结果判断:以细

胞膜出现棕黄色着色为阳性,按照 Lacoste 等^[17]的分级标准进行分级。细胞免疫荧光步骤参照宋锐等^[18]的方法进行,具体操作简述如下:用体积分数 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBST (含体积分数 0.5% Triton X-100 的 DPBS 溶液)透化 20 min 后,用含 10 g/L BSA 的 PBST 孵育 30 min 以阻断抗体的非特异性结合,滴加一抗(兔抗鼠 CK18,按说明书稀释抗体),4℃冰箱过夜;在避光条件下滴加二抗(羊抗兔 IgG 血清),避光孵育 1 h;DPBS 冲洗后加入 0.001 g/L 的 DAPI 染色 1 min,DPBS 冲洗后在荧光倒置显微镜下观察各种特异性基因的表达情况。

2 结果与分析

2.1 4种分离方法的分离结果

2.1.1 组织块培养法 将组织块剪碎后在显微镜下能观察到肠绒毛结构(图 1A)。用组织块培养法分离小鼠 IECs 时,培养 24 h 左右 90% 的组织块周围有细胞辐射,培养 3~5 d 组织块结构几乎消失,从组织块辐射的细胞汇集成片;从细胞形态来观察,组织块周围有立体感,肠上皮细胞呈圆形且形态饱满,由一层膜状结构包围(图 1B);部分组织块周围几乎全为成纤维细胞(图 1C);培养至第 1 代时,从细胞形态来看,贴壁细胞是成纤维细胞与肠上皮细胞夹杂生长的混合细胞(图 1D)。

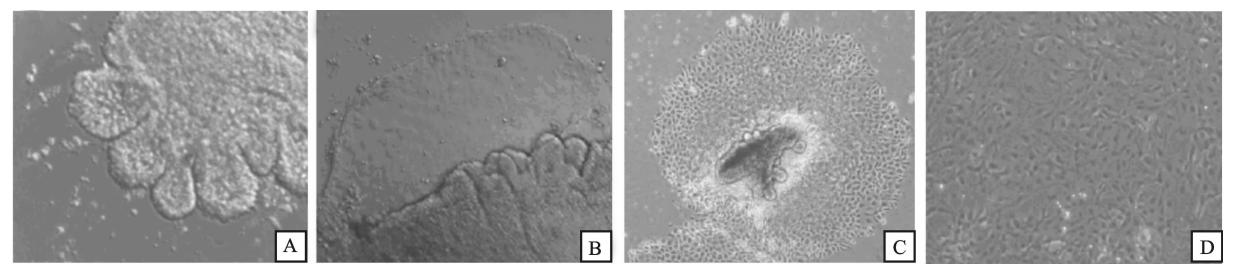


图1 组织块培养法分离小鼠 IECs(×100)

A. 小鼠肠绒毛;B. 组织块辐射的细胞;C. 组织块周围的成纤维细胞;D. 组织块培养法第 1 代 IECs

Fig.1 The mouse IECs isolated by tissue cultivation(×100)

A. Villus of small intestine in mouse; B. Cells grow around tissues;C. Large amounts of fibroblasts around tissues; D. Cultured the first generation IECs by tissue fractional cultivation

2.1.2 嗜热菌蛋白酶消化法 嗜热菌蛋白酶消化法分离小鼠 IECs 结果如图 2 所示。用嗜热菌蛋白酶消化小鼠肠组织,能获得肠隐窝单位和散细胞,其均能很好地贴壁(图 2A);隐窝单位在 24 h 内即能辐射出细胞,从形态上看,这些细胞均为 IECs,而贴壁的单个细胞是 IECs 和成纤维细胞的混合细胞;

培养 4 d 隐窝单位基本消失,原来的隐窝周围辐射出大量细胞(图 2B)。分离细胞培养至第 1 代时,从形态看,IECs 占绝大部分,仅有少量成纤维细胞污染(图 2C)。经过简单纯化后,用嗜热菌蛋白酶消化获得的小鼠 IECs 能稳定传代。

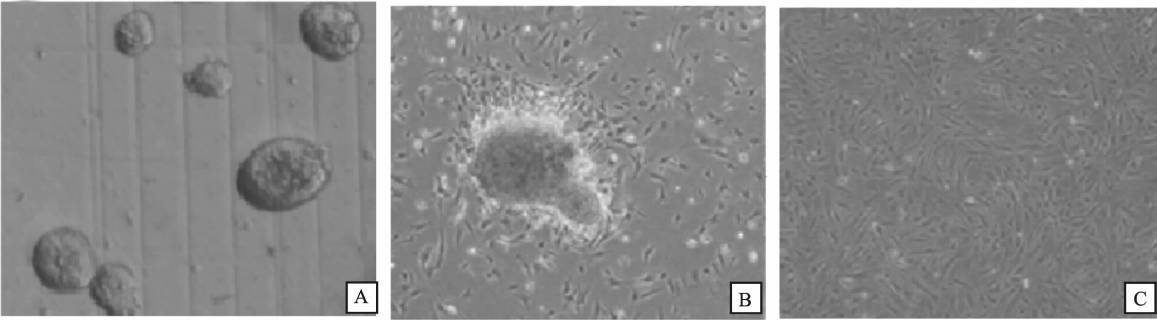


图 2 嗜热菌蛋白酶消化法分离小鼠 IECs (×100)

A. 分离的肠隐窝单位;B. 分离的肠隐窝单位辐射的细胞;C. 第 1 代 IECs

Fig. 2 The mouse IECs isolated by thermolysin enzyme digestion(×100)

A. The dissociated villus crypts; B. Cells grow around the dissociated villus crypts;C. The first generation IECs

2.1.3 胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法 用胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化小鼠小肠组织,能获得大量小肠隐窝单位(图 3A)。将隐窝单位以适当密度加培养液进行培养,隐窝单位能很好地贴壁,24 h 内隐窝单位即能辐射出细胞;48 h 后,从隐

窝单位辐射出的细胞能汇集成片,隐窝单位逐渐消失,从形态上看,这些辐射出的细胞多为 IECs (图 3B)。分离培养至第 1 代时,IECs 形态明显,为多角形,有立体感(图 3C)。用胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法获得的小鼠 IECs 能稳定传至第 6 代。

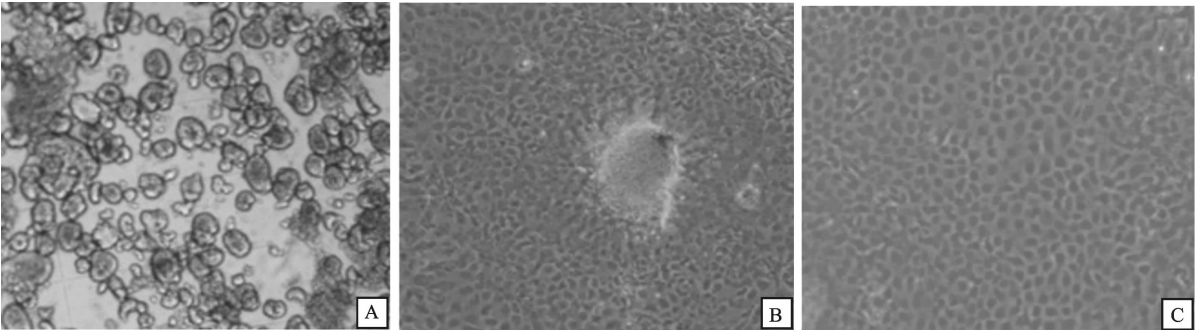


图 3 胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法分离小鼠 IECs(×100)

A. 分离的肠隐窝单位;B. 分离的肠隐窝单位辐射的 IECs;C. 第 1 代 IECs

Fig. 3 The mouse IECs isolated by association digestion of collagenase XI and disperse I(×100)

A. The dissociated villus crypts;B. IECs grow around the dissociated villus crypts; C. The first generation IECs

2.1.4 胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ联合消化法 用胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ联合消化小鼠肠组织,可获得数量较少的散在细胞,无小肠隐窝单位。此法分离的细胞数量少,原代培养 72 h 仍不能汇集成片

(图 4A);传至第 1 代后细胞贴壁能力差,且从细胞形态看,贴壁细胞为 IECs 和成纤维细胞的混合细胞(图 4B)。

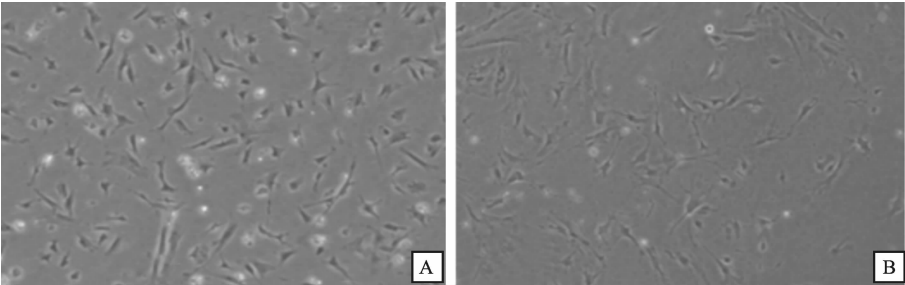


图 4 胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ联合消化法分离小鼠 IECs(×100)

A. 培养 72 h 的原代 IECs;B. 第 1 代 IECs

Fig. 4 The mouse IECs isolated by association digestion Collagenase I and disperse VI(×100)

A. The dissociated IECs;B. The first generation IECs

2.2 IECs 的鉴定

2.2.1 小鼠 IECs 免疫组化结果 对嗜热菌蛋白酶消化法及胶原酶Ⅺ与中性蛋白酶Ⅰ联合消化法获得的小鼠 IECs 进行免疫组化检测,结果表明,阳性细胞的细胞膜染为黄棕色(图 5A);而未用一抗孵育的对照结果呈阴性(图 5B)。因此,初步鉴定分离出的细胞为小肠 IECs 细胞。

2.2.2 小鼠 IECs 免疫荧光鉴定 在荧光倒置显微镜下观察,小鼠 IECs 状态正常(图 6A)。分离的细胞膜表达 CK18 特异性抗原(图 6B),进一步鉴定为 IECs。分离的细胞核经过 DAPI 染色后(图 6C),计算 10 个视野中阳性细胞率可达(88.7±16.4)%。未用一抗孵育的阴性对照细胞未被染色。因此,本试验分离的细胞多数为小鼠 IECs 细胞。

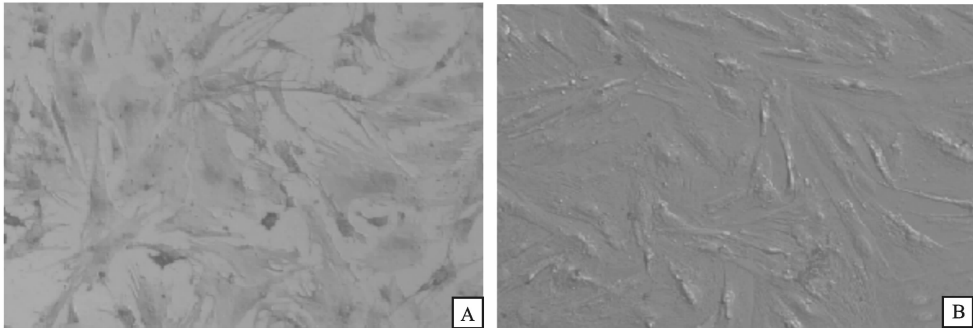


图 5 小鼠 IECs 免疫组化结果(×400)
A. 细胞膜染色阳性;B. 阴性对照
Fig. 5 The result of IECs immunohistochemistry(×400)
A. Positive result of cell membrane staining;B. Negative control

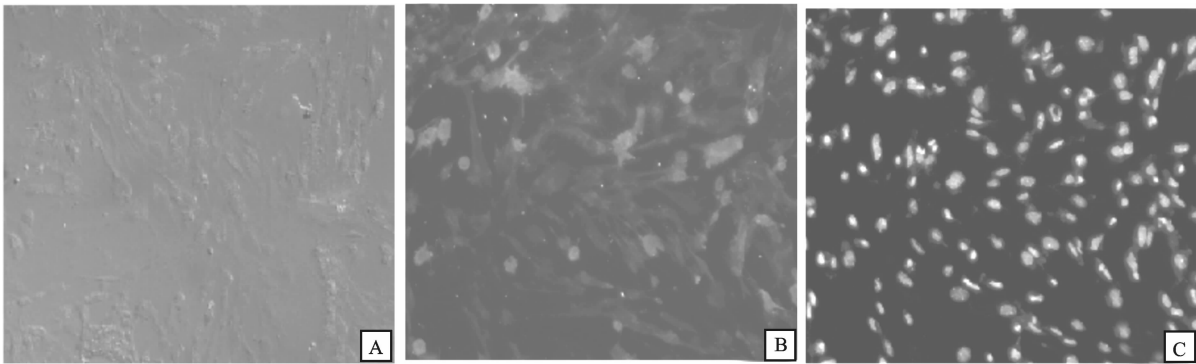


图 6 小鼠 IECs 免疫荧光染色结果(×400)
A. 荧光倒置显微镜下 IECs;B. IECs 细胞 CK18 特异性抗原的检测;C. IECs 细胞核 DAPI 染色定位
Fig. 6 The result of IECs immunofluorescence(×400)
A. IECs observed by inverted fluorescence microscope; B. The testing of CK18 of IECs membrane;C. The IECs nucleus stained by DAPI

2.3 4 种分离方法分离效果的比较

综合比较本试验中 4 种方法的 IECs 分离培养效果可知,组织块培养法获得的细胞活性好,但成纤维细胞污染较严重,今后可以从如何提高细胞纯度进行深入研究;嗜热菌蛋白酶消化法及胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法均能获得完整隐窝单位,经过培养和简单纯化后,通过细胞免疫化学分析均得到纯度较高的 IECs,但这 2 种分离方法所得细胞连续传代后增殖能力均减弱;胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅵ联合消化法获得的 IECs 数量少,且细胞活力

差。综上可知,嗜热菌蛋白酶消化法及胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法分离效果较好,能够获得纯度较高、活力较强的小鼠肠上皮细胞株。

3 讨 论

本试验小肠组织取自 16~19 日龄胎鼠,因为此时胎鼠的小肠黏膜组织幼稚、结构疏松,易于消化,且肠道内无内容物,可避免污染^[11]。本试验采用组织块培养法和 3 种酶解法分离肠道上皮细胞,其中组织块培养法是几种分离方法中最简单的方

法,在分离细胞过程中未经过任何酶的处理,获得的 IECs 原代细胞活力好、增殖能力较强,但成纤维细胞污染较严重,纯化过程较为复杂。一些研究者虽已用组织块培养法获得生长状况良好的小鼠^[19]和山羊^[11] IECs,但均存在同样的缺点。目前对于肠上皮细胞的分离培养,国内外学者多采用酶消化分离法。Perrault 等^[20]使用嗜热菌蛋白酶分离人小肠上皮细胞,结果表明,这种方法分离的 IECs 能稳定传代至 26 代,可用于人小肠上皮细胞系的建立,并认为嗜热菌蛋白酶用于分离肠上皮细胞具有分离产量高、分离的细胞活力强等特点。张道杰等^[10]用嗜热菌蛋白酶消化分离 4~6 个月引产胎儿的小肠 IECs,消化 2 h 能分离出绒毛隐窝单位获得人 IECs,因此认为嗜热菌蛋白酶消化法能分离较多的健全绒毛隐窝单位,获得纯度较高的 IECs。本研究用嗜热菌蛋白酶消化小鼠肠组织,得到了大量的肠隐窝单位以及少量散在细胞,这些散在细胞从形态上可判定为 IECs 和成纤维细胞的混合物,经过简单纯化后能获得大量 IECs。此法获得的 IECs 原代产量高、纯度好、活力强,连续传代后相邻细胞之间的界限模糊,细胞体积变大,出现凋亡现象,增殖能力明显减弱,说明 IECs 有一定寿命,这与 Perrault 等^[20]和张道杰等^[10]报道结果一致。

胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法最初由 Evans 等^[8]用于分离哺乳期大鼠小肠上皮细胞,能获得完整的绒毛和隐窝单位,且上皮细胞仍保持极性。后来,国内外很多学者相继采用此方法分离获得肠完整绒毛和隐窝单位,从而获得了较纯的山羊^[21-22]、大鼠^[12]和小鼠^[23-25] IECs。本试验用胶原酶Ⅺ和中性蛋白酶Ⅰ消化小鼠肠组织,37℃消化 20 min 即可获得大量肠隐窝单位,经过贴壁生长后,由于都是从肠隐窝单位辐射出的细胞,因此 IEC 纯度最高,几乎没有成纤维细胞污染,且所获得的 IECs 与嗜热菌蛋白酶消化法一样,连续传代后细胞增殖能力减弱,证明此细胞并未发生癌变。

胶原酶是一种从细菌中提取的酶,胶原酶Ⅰ消化肠组织时的主要作用是使细胞间质的脯氨酸多肽水解,从而使细胞离散,而对上皮细胞影响不大。Evans 等^[8]用胶原酶Ⅰ在 37℃下消化大鼠肠组织 2 h,获得的 IECs 中有大量间质细胞污染。戴定威等^[15]用胶原酶Ⅰ和中性酶Ⅰ/胶原酶Ⅺ 2 种消化法分离大鼠 IECs,结果发现,中性酶Ⅰ/胶原酶Ⅺ联合应用分离效果比较好,而胶原酶Ⅰ虽然消化良好,但消化时间长,提高酶浓度或是延长消化时间虽然能

获得更多细胞,但同时也增加了细胞损伤的机会,并易混入肠组织其他杂细胞,导致 IEC 纯度降低,而使用中性酶Ⅰ和胶原酶Ⅺ联合可缩短消化时间,取得更佳的分离效果。本试验采用胶原酶Ⅰ和中性蛋白酶Ⅰ联合消化法消化肠组织,获得的 IEC 细胞数量少、增殖能力差,这与 Evans 等^[8]和戴定威等^[15]的研究结果一致。

[参考文献]

- [1] Keding M, Haffen K, Simon-Assmann P. Intestinal tissue and cell cultures [J]. *Differentiation*, 1987, 36(1): 71-85.
- [2] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 256.
Xue Q S. Principles and techniques of *in vitro* culture [M]. Beijing: Science Press, 2001: 256. (in Chinese)
- [3] Quaroni A, Isselbacher K J, Ruoslahti E. Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(11): 5548-5552.
- [4] Quaroni A, Isselbacher K J. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a] pyrene and 7, 14-dimethylbenz [a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1981, 67(6): 1353-1362.
- [5] Quaroni A. Development of fetal rat intestine in organ and monolayer culture [J]. *Cell Biol*, 1985, 100(5): 1611-1622.
- [6] Tepperman B L, Soper B D, Cang Q. Effect of protein kinase C activation on intracellular Ca^{2+} signaling and integrity of intestinal epithelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 518(1): 1-9.
- [7] 叶章群, 刘冠琳, 陈志强, 等. 小鼠肠干细胞群的构建 [J]. *华中科技大学学报: 医学*, 2006, 35(6): 828-830.
Ye Z Q, Liu G L, Chen Z Q, et al. Construction of murine intestinal stem cell population [J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology: Health Science*, 2006, 35(6): 828-830. (in Chinese)
- [8] Evans G S, Flint N, Somes A S, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures [J]. *J Cell Sci*, 1992, 101(1): 219-231.
- [9] Danes B S. Long-term-cultured colon epithelial cell lines from individuals with and without colon cancer genotypes [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1985, 75(2): 261-267.
- [10] 张道杰, 蒋建新, 陈永华, 等. 用嗜热菌蛋白酶进行人肠上皮细胞分离培养 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(11): 1016-1018.
Zhang D J, Jiang J X, Chen Y H, et al. Isolation and primary culture of rabbit intestinal epithelial cell *in vitro* [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2004, 26(11): 1016-1018. (in Chinese)
- [11] 匡伟, 王海霞, 邵桃玉, 等. 新生山羊小肠上皮细胞株的建立和鉴定 [J]. *中国畜牧杂志*, 2007, 43(19): 11-14.
Kang W, Wang H X, Shao T Y, et al. Establishing and identification of neonate goat intestinal epithelial cells [J]. *Chinese*

- Journal of Animal Science,2007,43(19):11-14. (in Chinese)
- [12] 冉新泽,栗永萍,程天民,等. 大鼠小肠上皮细胞培养体系的建立及其影响因素的探讨 [J]. 中国现代医学杂志,1997,7(5):8-11.
Ran X Z,Su Y P,Cheng T M,et al. To establish the primary culture of rat intestinal epithelial cells line *in vitro* and investigate the influence factors [J]. China Journal of Modren Medicine,1997,7(5):8-11. (in Chinese)
- [13] 王远孝,王 恬. 肠上皮细胞体外培养技术的研究进展 [J]. 饲料研究,2008(14):24-26.
Wang Y X,Wang T. Development of primary culture of rat intestinal epithelial cells *in vitro* [J]. Feed Research, 2008 (14):24-26. (in Chinese)
- [14] Golaz J L,Vonlaufen N,Hemphill A,et al. Establishment and characterization of a primary canine duodenal epithelial cell culture [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*,2007,43(6):176-185.
- [15] 戴定威,吴圣相,李 敏,等. 新生大鼠小肠上皮细胞分离培养研究 [J]. 细胞生物学志,1997,19(1):31-35.
Dai D W,Wu S X,Li M,et al. Establishment of a method for isolation and primary culture of rat colonic epithelial cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology,1997,19(1):31-35. (in Chinese)
- [16] 王 莉,段相林. 大鼠小肠上皮细胞的体外原代培养 [J]. 军事医学科学院院刊,2004,28(1):61-63.
Wang L,Duan X L. *In vitro* primary culture of rat intestinal epithelial cells [J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences,2004,28(1):61-63. (in Chinese)
- [17] Lacoste J,Aprikian A G,Chevalier S. Focal adhesion kinase is required for bombesin-induced prostate cancer cell motility [J]. Mol Cell Endocrinol,2005,235(1/2):51-61.
- [18] 宋 锐,曹鸿国,陶 勇,等. 一种简便的小鼠精原干细胞分离培养方法 [J]. 中国细胞生物学学报,2010,32(2):289-290.
Song R,Cao H G,Tao Y,et al. A simple and convenient isolation method of mouse spermatogonial stem cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology,2010,32(2):289-290. (in Chinese)
- [19] 韩庆广,徐晓燕,赵国琦,等. 小鼠小肠上皮细胞的分离培养研究 [J]. 动物生态学杂志,2009,30(1):48-51.
Han Q G,Xu X Y,Zhao G Q,et al. Studies oil isolation and primary culture of mouse intestine epithelium [J]. Journal of Animal Ecology,2009,30(1):48-51. (in Chinese)
- [20] Perrault N,Beaulieu J F. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures [J]. Experimental Cell Research,1996,224(2):354-364.
- [21] 王海霞,匡 伟,赵国琦. 几种酶分离山羊小肠上皮细胞方法的比较 [J]. 家畜生态学报,2007,28(6):9-14.
Wang H X,Kuang W,Zhao G Q. Establishment of goat intestinal epithelial cell line and nitrogen metabolism of IEC [J]. Journal of Animal Ecology,2007,28(6):9-14. (in Chinese)
- [22] Lindemann G,Grohs M,Stange E F,et al. Limited heat-shock protein 72 induction in Caco-2 cells by L-glutamine [J]. Department of Internal Medicine; I. Division of Gastroenterology,2001,64:81-86.
- [23] 纪华英,陈其奎,曾 晖. 小鼠小肠上皮细胞的体外原代培养 [J]. 医学综述,2010,16(9):1417-1419.
Ji H Y,Chen Q K,Zeng H. *In vitro* primary culture of mouse intestinal epithelial cells [J]. Medical Reviews,2010,16(9):1417-1419. (in Chinese)
- [24] Hautf S M,Sweetser D A,Rotwein P S,et al. A transgenic mouse model that is useful for analyzing cellular and geographic differentiation of the intestine during fetal development [J]. J Biol Chem,1989,264(14):8419-8429.
- [25] Slorach E M,Campbell F C,Dorin J R. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration [J]. J Cell Sci, 1999,114(18):3029-3038.