

· 论 著 ·

胆固醇对体外分离培养的豚鼠胆囊 Cajal 样间质细胞的影响

许金煌, 范莹

中国医科大学附属盛京医院普外二科, 辽宁 沈阳 110004

摘要: **目的** 研究胆固醇对体外分离培养的豚鼠胆囊 Cajal 样间质细胞(ICLCs)增殖、凋亡的影响。**方法** 体外分离培养豚鼠胆囊 ICLCs,用含不同质量浓度[0 mg/L(空白组)及 12.5、25、50、100 mg/L(实验组)]的胆固醇培养液作用于细胞 24 h 后,CCK-8 法检测细胞的增殖率,流式细胞术检测细胞的凋亡率,Western blot 检测细胞受体酪氨酸激酶(c-kit)蛋白的表达量,实时荧光定量 PCR 检测细胞 c-kit mRNA 的表达水平。**结果** 用含 25、50、100 mg/L 质量浓度胆固醇的培养液培养 ICLCs 后,与空白组相比,实验组 ICLCs 的增殖率明显下降($P < 0.05$);ICLCs 的凋亡率明显增加($P < 0.05$);c-kit 蛋白表达及 c-kit mRNA 表达均明显下降($P < 0.05$)。**结论** 高浓度的胆固醇能够抑制 ICLCs 的增殖并促进 ICLCs 的凋亡,ICLCs 增殖率下降可能是 SCF/c-kit 信号通路受阻所致。

关键词: Cajal 样间质细胞; 胆固醇; 凋亡; 增殖; 受体酪氨酸激酶基因

中图分类号: R 575.6 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)11-1457-05

Influence of cholesterol on interstitial Cajal-like cells of guinea pig gallbladder isolated and cultured in vitro

XU Jin-huang, FAN Ying

Second Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China

Corresponding author: FAN Ying, E-mail: coolingpine78@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cholesterol on proliferation and apoptosis of interstitial Cajal-like cells (ICLCs) isolated from guinea pig gallbladder in vitro. **Methods** ICLCs of guinea pig gallbladder were isolated and cultured in vitro. After the ICLCs were treated with cholesterol medium containing different concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100 mg/L) for 24 h, cell proliferation was detected by cell-counting kit-8 method, cell apoptosis was detected by flow cytometry, c-kit protein expression was detected by Western blot, and c-kit mRNA expression was detected by real time fluorescence quantitative PCR. **Results** After the ICLCs were treated with cholesterol medium containing different concentrations (25, 50, 100 mg/L) for 24 h, the proliferation rate of ICLCs decreased significantly ($P < 0.05$), the apoptotic rate of ICLCs increased significantly ($P < 0.05$), the expression of c-kit protein and c-kit mRNA decreased significantly ($P < 0.05$) in 25, 50, 100 mg/L cholesterol concentration group compared with 0 mg/L. **Conclusions** High concentration of cholesterol can inhibit the proliferation of ICLCs and promote the apoptosis of ICLCs. The decrease of the proliferation rate of ICLCs may be due to the blockage of SCF/c-kit signaling pathway.

Key words: Interstitial Cajal-like cells; Cholesterol; Apoptosis; Proliferation; C-kit gene

Fund program: Natural Foundation Program of Liaoning Province (20180550125)

胆囊胆固醇结石(CG)是外科临床上常见的一种疾病,CG的病因复杂,胆囊动力下降是形成CG的一个重要原因^[1-3]。近年来,随着胆囊Cajal样间质细胞(ICLCs)在胆囊动力调控方面的作用被肯定^[4-10],其与CG形成的关系成为研究的热点。研究发现,在

人类CG的胆囊标本和豚鼠CG模型的胆囊标本中均出现ICLCs数量减少的现象^[11-13],且ICLCs减少的原因可能是胆汁中的胆固醇过饱和引起的^[14]。本研究旨在通过体外分离培养豚鼠胆囊ICLCs,以及在细胞培养液里加入水溶性胆固醇模拟CG患者胆囊

ICLCs 面对的高游离胆固醇环境,探讨胆固醇对 ICLCs 增殖、凋亡的影响;通过研究胆固醇对 ICLCs 受体酪氨酸激酶(c-kit)蛋白及 mRNA 表达的影响来探讨胆固醇对胆囊 ICLCs 数量的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 健康雄性豚鼠 5 只,体重为 300 ~ 400 g,由北京金牧阳实验动物养殖中心提供,适应性饲养于中国医科大学附属盛京医院本溪医药研究基地研发中心动物部,普通级饲养。干细胞生长因子(Pepro Tech 公司),M199 培养液(Hyclone),胎牛血清(Gemini 南美胎牛血清),三抗(Gibco 公司),c-kit 单克隆抗体(NOVUS 美国),Triton X-100(中国碧云天生物技术),DAPI(中国碧云天生物技术),山羊血清(中国索莱宝科技),水溶性胆固醇(美国 Sigma 公司),CCK-8 试剂盒(弗元上海生物科技),凋亡试剂盒(弗元上海生物科技),RNA 提取试剂盒(Takara),反转录试剂盒(Takara)。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠胆囊 ICLCs 的分离、培养 豚鼠禁食 12 h,腹腔注射 10% 的水合氯醛麻醉,脱颈处死。将豚鼠腹部剃毛后浸泡在 75% 酒精中 5 min,剖开豚鼠上腹部,充分暴露胆囊。无菌条件下于胆囊颈部切除胆囊,将胆囊置于含 1% 三抗的 PBS 中,在解剖显微镜下,仔细剥离胆囊系膜和血管,剖开胆囊组织,用含 1% 三抗的 PBS 冲洗 3 次,剥去胆囊黏膜层及黏膜下层。用含 1% 三抗的 PBS 冲洗胆囊肌条 3 次,将肌条剪碎成约为 1 mm × 1 mm 的小块后,加入 5 ml II 型胶原酶(质量浓度 1.3 mg/ml),将组织移入 15 ml 离心管,于 37 ℃ 水浴条件下消化 30 min。将消化好的胆囊组织 1 500 r/min,离心 5 min,弃上层清。再用 M199 培养液重悬沉淀,然后用吸管吹打 5 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清。最后用 5 ml 混合培养液(含 M199 培养液、10% FBS、1% 三抗、5 ng/ml SCF)重悬细胞。过 200 目筛网去除大块组织。将过滤后的细胞悬液转移至培养瓶内,放入孵箱培养(温度为 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5%)。细胞于孵箱稳定培养 12 h 后,弃培养液,PBS 洗涤 3 次,加入 5 ml 新的混合培养液,观察并记录所培养细胞的形态和数量。以后每 2 天换液 1 次,并观察培养瓶内培养液,有无浑浊、颜色变淡、漂浮物、絮状物等。

1.2.2 ICLCs 的鉴定 取培养的第三代 ICLCs,制成单细胞悬液后接种于 6 孔板中,待细胞稳定后,弃去培养液,PBS 冲洗 2 min × 3 次。4% 多聚甲醛室温固

定 20 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次;1% 的 Triton X-100 作用于细胞 15 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次;10% 山羊血清室温下封闭 30 min;加入 c-kit 单克隆抗体(1:100)4 ℃ 冰箱过夜,次日取出后 PBS 冲洗 5 min × 3 次;加入 FITC 标记的二抗(1:50)常温下避光作用 1.5 h,PBS 冲洗 5 min × 3 次;DAPI 染核 5 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次,50% 甘油液封。将 6 孔板置于荧光显微镜下观察,选取 3 个不同视野照相并保存图片。

1.2.3 CCK-8 实验检测细胞增殖 培养的胆囊 ICLCs 制成单细胞悬液后,以 5 000 个细胞每孔的密度接种于 96 孔板中,经过同步化处理 24 h 后,分别用含[0 mg/L(空白组)及 12.5、25、50、100 mg/L(实验组)]质量浓度胆固醇的培养液培养 24 h。加入 CCK-8 溶液后孵育 4 h,酶标仪读取 A450 数据。根据公式计算细胞增殖活力(%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100$ (A 空白为具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度)。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 分别用含[0 mg/L(空白组)及 25、50、100 mg/L(实验组)]质量浓度的胆固醇培养液培养 ICLCs,24 h 后收集各组细胞,PBS 清洗细胞两次,收集 5×10^5 个细胞,加入 500 μl 的 Binding Buffer,5 μl 的 Annexin V-FITC 和 5 μl PI 混匀,室温条件下避光 15 min,进行细胞凋亡检测。每组胆固醇浓度重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 ICLCs c-kit 蛋白的表达 分别用含(0、25、50、100 mg/L)质量浓度的胆固醇培养液培养 ICLCs,24 h 后收集各组细胞,提取蛋白。根据 BCA 试剂盒操作检测蛋白浓度,调整不同样品的体积,加水和上样缓冲液稀释,使样品蛋白含量相同。配制 10% 的分离胶,5% 的浓缩胶,上样,恒压 80 V 电泳至溴酚蓝达到胶的底部。切去多余胶,用 0.45 μm 的 PVDF 膜恒压 100 V 进行转膜(β-actin 45 min;c-kit 150 min)。转膜完成后,PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h;TBST 缓冲液漂洗,分别放入含 c-kit 抗体、β-actin 抗体的孵育盒中,摇床上轻度摇晃,4℃ 过夜。取出 PVDF 膜,TBST 漂洗 3 次 × 10 min。将 PVDF 膜放入二抗溶液中,室温放置 2 h,TBST 漂洗 3 次 × 10 min。采用 ECL 化学发光法,按试剂盒说明,将试剂 A 液和 B 液等量混合均匀后,用移液器吸取发光液,滴加于洗好的膜上,放入显影仪器内曝光,获得图像。对 Western 条带进行分析,以 β-actin 作为内参,目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测 ICLCs c-kit 的表

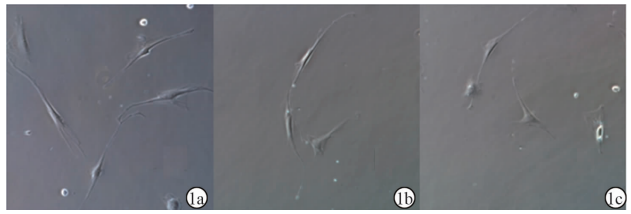
达 分别用含(0、25、50、100 mg/L)质量浓度的胆固醇培养液培养 ICLCs, 24 h 后弃培养液, PBS 清洗 3 次, 各加入 1 ml Trizol 于培养瓶中, 反复吹打至贴壁细胞脱落, 转移至 1.5 ml EP 管中, 根据试剂盒说明书操作提取细胞总的 RNA, 按反转录试剂盒说明反转录合成 cDNA。以其为模板进行 PCR 反应。c-kit 引物上游序列: 5'-CCA ACC AGG CTC TTC TCA ACC ATC-3', 下游引物序列: 5'-CCT TGT TCT CGC TCG TGT GAT CC-3'; β -actin 上游引物序列: 5'-CAA CAC AGT GCT GTC TGG TGG TAC-3'; 下游引物序列: 5'-ATC TGC TGG AAG GTG GAG AGT GAG-3'。反应体系: SYBR 10 μ l, DEPC 水 6.4 μ l, 上游引物 0.8 μ l, 下游引物 0.8 μ l, cDNA 2 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 35 个循环。按公式 $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组目的基因 } Ct - \text{内参 } Ct) - (\text{对照组目的基因 } Ct - \text{内参 } Ct)$ 计算出 $\Delta\Delta Ct$, 经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析计算 c-kit mRNA 相对表达量。设置 3 个平行复孔, 检测结果取平均值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件和 GraphPad Rrism 6.0 软件进行统计分析并做图, 以上实验均重复 3 次, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

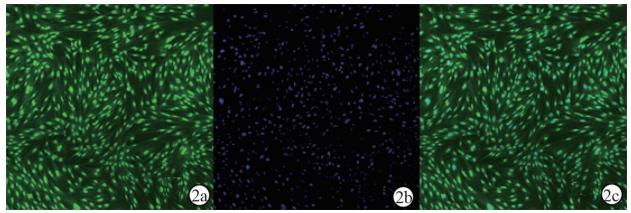
2.1 细胞培养结果 细胞培养 1 周后, 显微镜下观察可见(图 1): 细胞呈梭形、三角形、圆形、椭圆形, 细胞核较大, 细胞质较少, 有 2~3 个突起, 突起间可相互连接。随着培养时间的增加, 细胞突起细长化且彼此间相互连接形成网络, 形成典型的 ICLCs 形态特征。培养的细胞经传代 3 次, 进行免疫荧光染色[即 c-kit 单克隆抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗处理]后呈 c-kit 阳性, 表现为 FITC 绿色荧光, 细胞核 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色, 表现为蓝色荧光(图 2、图 3)。ICLCs 特异性表达 c-kit 抗体, 胆囊组织中除 ICLCs 及少量的肥大细胞外, 其余细胞皆为 c-kit 抗体阴性。因此实验所培养的细胞除少量 c-kit 阳性的圆形肥大细胞外, 其余皆为 ICLCs, ICLCs

大多数为梭形。
2.2 胆固醇对 ICLCs 增殖的影响 根据细胞增殖活力作胆固醇对 ICLCs 增殖影响的曲线, 结果显示, 实验组所设 4 个质量浓度的胆固醇中的后三者(25、50、100 mg/L) 均能降低 ICLCs 的增殖率, 与空白组



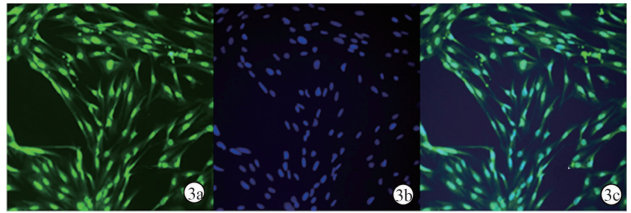
注: 1a: 细胞呈梭形、圆形、椭圆形, 突起间有连接; 1b: 细胞呈梭形, 细胞间有连接; 1c: 细胞呈三角形。

图 1 ICLCs 培养 1 周后倒置显微镜图 ($\times 400$)



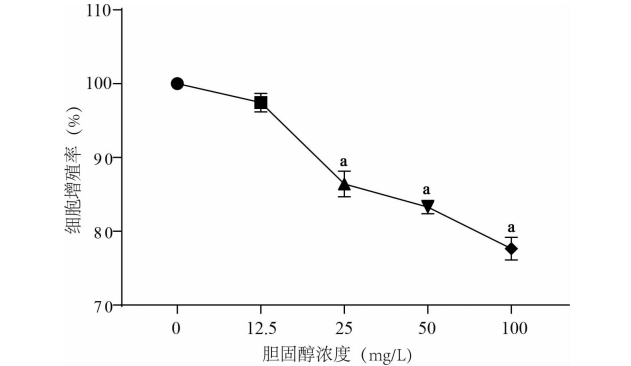
注: 2a: c-kit 荧光抗体染色; 2b: DAPI 染色; 2c: Merge。

图 2 第三代 ICLCs 免疫荧光染色图 ($\times 200$)。



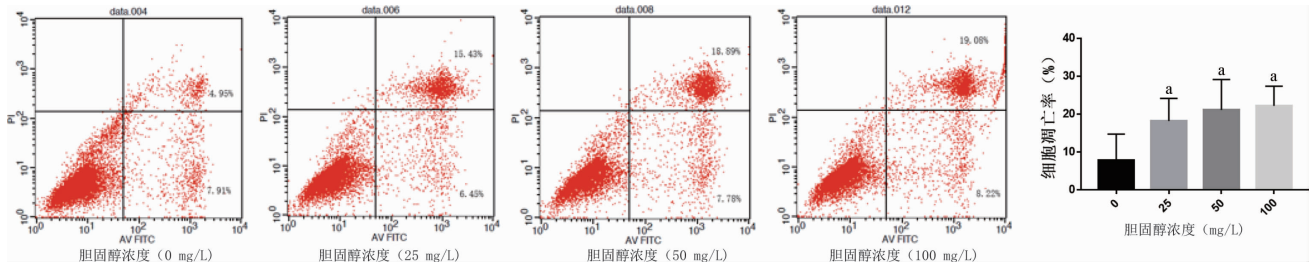
注: 3a: c-kit 荧光抗体染色; 3b: DAPI 染色; 3c: Merge。

图 3 第三代 ICLCs 免疫荧光染色图 ($\times 400$)



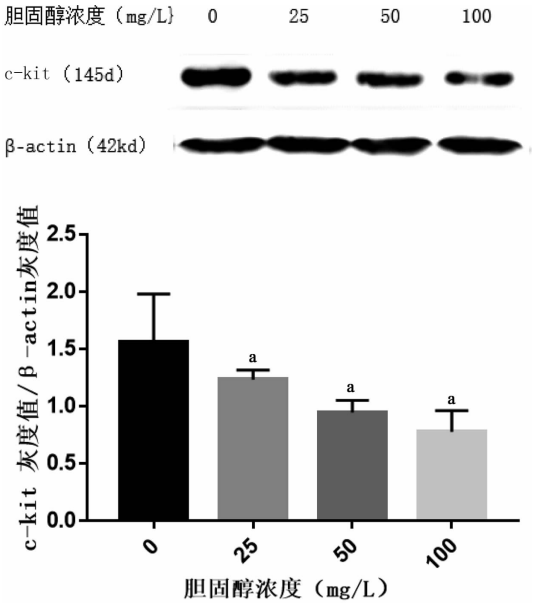
注: 与 0 mg/L 对比, ^a $P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度胆固醇对 ICLCs 增殖影响曲线



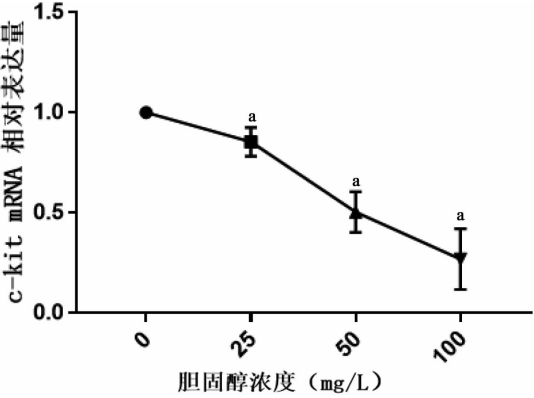
注: 与 0 mg/L 相比, ^a $P < 0.05$ 。

图 5 不同浓度胆固醇对 ICLCs 凋亡率的影响



注:与 0 mg/L 对比,^a $P < 0.05$ 。

图 6 各组 ICLC c-kit 蛋白表达及蛋白相对表达量



注:与 0 mg/L 对比,^a $P < 0.05$ 。

图 7 不同浓度胆固醇对 ICLCs c-kit mRNA 表达

(0 mg/L)相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

2.3 胆固醇对 ICLCs 凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示,实验组 25、50、100 mg/L 质量浓度的胆固醇均能增加 ICLCs 的凋亡率,与空白组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

2.4 胆固醇对 ICLCs c-kit 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与空白组相比,实验组 25、50、100 mg/L 质量浓度的胆固醇 ICLCs c-kit 蛋白表达均下降($P < 0.05$)。见图 6。

2.5 胆固醇对 ICLCs c-kit mRNA 表达的影响 与空白组相比,实验组 25、50、100 mg/L 质量浓度的胆固醇 ICLCs c-kit mRNA 表达量均下降($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

胆囊形成 CG 是多因素共同作用的结果,CG 形

成的基本过程为各中因素影响胆固醇与胆汁酸的浓度比例发生改变,胆汁中的游离胆固醇浓度达到过饱和状态,胆汁析出胆固醇结晶,胆囊动力下降引起的胆囊收缩力下降、胆囊排空受限、排空延迟使胆固醇结晶淤积在胆囊内,在胆囊分泌的黏液作用下,胆固醇结晶进一步增大,聚集成石。

Cajal 间质细胞是 1893 年西班牙神经解剖学家在胃肠道观察到的一类与肠内自主神经末梢活动相关的特殊间质细胞,经过历代学者的研究,将之命名为 Cajal 间质细胞(ICCs)^[15]。ICCs 是胃肠道慢波的起搏细胞,参与肠道慢波的起搏和传播,且与肠道信号的传导和调节有关^[16]。近年来,许多学者在胃肠外的组织也发现这类细胞,并将之称为 Cajal 样间质细胞(ICLCs)^[17-18]。现已证实,胆囊上也存在 ICLCs,胆囊 ICLCs 有胆囊平滑肌动力起搏、介导慢波电位传播及调节神经递质的作用,其数量的减少可引起胆囊收缩力的减退,导致胆囊动力受损^[19-22]。有学者认为,胆汁中的一些成分可能会引起胆囊动力的损伤,而胆囊结石患者胆汁中的胆固醇浓度明显高于无胆囊结石的胆汁,那么胆囊收缩功能的损伤就可能是由于胆囊壁吸收胆汁中过饱和的胆固醇引起,而这也可能是导致胆囊 ICLCs 减少的原因^[23-24]。

c-kit 基因是一种原癌基因,编码Ⅲ型酪氨酸蛋白激酶膜受体,胆囊 ICLCs 特异性表达 c-kit,目前细胞 c-kit 免疫阳性仍是鉴别 ICLCs 最常用的方法。干细胞生长因子(SCF)是 c-kit 受体的天然配体,c-kit 及 SCF 组成的 SCF/c-kit 信号通路在 ICLCs 的发育、分化及表型维持中起重要作用^[25]。当 c-kit 或 SCF 表达下降时,SCF/c-Kit 信号通路受损可引起 ICLCs 数量、形态及功能异常^[26-30]。

本研究通过体外分离、培养以及传代的方法来获取豚鼠胆囊 ICLCs,由于胆囊 ICLCs 特异性表达 c-kit 蛋白,所以我们通过免疫荧光染色法来鉴定 ICLCs,结果显示,细胞表现为 c-kit 阳性,FITC 绿色荧光,证实所培养的细胞为胆囊 ICLCs。通过在 ICLCs 的培养液中加入不同质量浓度的胆固醇模拟胆囊结石患者胆囊 ICLCs 面对的胆汁中高胆固醇环境。CCK-8 增殖实验结果显示,与空白组相比,实验组的 4 个质量浓度的胆固醇培养液(12.5、25、50、100 mg/L)中的后三者均可降低 ICLCs 的增殖率。细胞凋亡检测结果显示,与对照组相比,25、50、100 mg/L 质量浓度胆固醇组 ICLCs 的凋亡率明显增加。以上两种实验证明高浓度的胆固醇培养液能够抑制 ICLCs 的增殖、促进 ICLC 的凋亡。Western Blot 结果和 PCR 结果显示,与对照组相比,25、50、100 mg/L 质量浓度胆固醇

组 ICLCs c-kit 蛋白和 c-kit mRNA 的相对表达量均下降,提示 ICLCs 增殖率下降可能是由于 SCF/c-kit 信号通路受阻影响 ICLCs 的生长发育。

综上所述,在胆囊形成结石的过程中,高浓度的胆固醇环境通过抑制 SCF/c-kit 信号通路影响胆囊 ICLCs 的生长发育,并促使其凋亡增加,进而引起胆囊 ICLCs 总数的减少,导致胆囊的自发节律收缩功能下降,从而在胆囊结石形成过程中发挥作用。

参考文献

- [1] 于岚,何小东,武峤,等. 胆囊结石相关危险因素的探讨[J]. 中华肝胆外科杂志,2011,17(9):711-713.
- [2] Venneman NG, van Erpecum KJ. Pathogenesis of gallstones[J]. Gastroenterol Clin N Am, 2010, 39(2):171-183.
- [3] Wang HH, Portincasa P, Liu M, et al. Effect of gallbladder hypomotility on cholesterol crystallization and growth in CCK-deficient mice[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(2):138-146.
- [4] Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, et al. C-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract[J]. Cell Tissue Res, 1995, 280(1):97-111.
- [5] Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal; intestinal pacemaker cells? [J]. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1982, 71:1-130.
- [6] Mazzia C, Porcher C, Julé Y, et al. Ultrastructural study of relationships between c-kit immunoreactive interstitial cells and other cellular elements in the human colon[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 113(5):401-411.
- [7] Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum[J]. Cell Tissue Res, 2003, 311(3):299-313.
- [8] Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of Cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine[J]. Cell Tissue Res, 1999, 295(2):247-256.
- [9] Ward SM, Beckett EA, Wang X, et al. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons[J]. J Neurosci, 2000, 20(4):1393-1403.
- [10] Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function[J]. J Physiol (Lond), 2006, 576(Pt 3):721-726.
- [11] 范莹,吴硕东,付倍蓓,等. 高胆固醇饮食豚鼠胆囊组织中 c-kit 和 scf mRNA 及蛋白的表达变化研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 19(10):1063-1068.
- [12] Pasternak A, Gil K, Matyja A, et al. Loss of gallbladder interstitial Cajal-like cells in patients with cholelithiasis[J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(1):e17-e24.
- [13] Pasternak A, Matyja A, Gil K, et al. Interstitial Cajal-like cells and bile lithogenicity in the pathogenesis of gall-stone disease[J]. Pol Przegl Chir, 2013, 85(6):311-316.
- [14] Pasternak A, Szura M, Matyja M, et al. Does bile protect or damage interstitial Cajal-like cells in the human gallbladder? [J]. Folia

Med Cracov, 2013, 53(4):47-59.

- [15] Thuneberg L. One hundred years of interstitial cells of Cajal[J]. Microsc Res Tech, 1999, 47(4):223-238.
- [16] Iino S, Horiguchi K. Interstitial cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract[J]. Acta Histochem Cytochem, 2006, 39(6):145-153.
- [17] Kostin S, Popescu LM. A distinct type of cell in myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLCs) [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(2):295-308.
- [18] Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS. TELOCYTES-a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of Cajal (ICC), via interstitial Cajal-like cells (ICLC) to TELOCYTES [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(4):729-740.
- [19] 张红军,于彬,梅峰,等. 豚鼠 Oddi 括约肌内 Cajal 样细胞及 NOS 表达阳性神经元的分布[J]. 消化外科, 2006, 5(3):201-205.
- [20] 黄悦,陈飞,于彬,等. 豚鼠壶腹 Cajal 样细胞的分布及 Oddi 括约肌肌电活动观察[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(9):1069-1073.
- [21] 徐龙,余保平,陈灵丹,等. Cajal 细胞调节豚鼠胆囊动力的实验研究[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(7):721-724.
- [22] 孙晓敏,余保平,徐龙,等. 小鼠胆囊酪氨酸激酶受体的表达及其意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2007, 13(7):475-479.
- [23] Hu WM, Luo HS, Ding XW, et al. Expression of C-kit messenger ribonucleic acid and C-kit protein in the gallbladders in guinea pigs of high cholesterol diet[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(8):1651-1655.
- [24] Swell L, Bell CC Jr, Gregory DH, et al. The cholesterol saturation index of human bile[J]. Am J Dig Dis, 1974, 19(3):261-265.
- [25] Isozaki K, Hirota S, Nakama A, et al. Disturbed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-kit-expressing cells in Ws/Ws mutant rats [J]. Gastroenterology, 1995, 109(2):456-464.
- [26] Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, et al. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype[J]. Gastroenterology, 1999, 117(1):140-148.
- [27] Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, et al. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(2):G313-G320.
- [28] Nakahara M, Isozaki K, Vanderwinden JM, et al. Dose-dependent and time-limited proliferation of cultured murine interstitial cells of Cajal in response to stem cell factor[J]. Life Sci, 2002, 70(20):2367-2376.
- [29] Bashamboo A, Taylor AH, Samuel K, et al. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway [J]. J Cell Sci, 2006, 119(15):3039-3046.
- [30] Li JM, Goodyer CG, Fellows F, et al. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(5/6):961-972.

收稿日期:2019-04-01 修回日期:2019-05-04 编辑:王国品