

底细胞的1%~10%,此即为表皮干细胞。

在表皮干细胞的培养过程中,表皮干细胞纯度以及活性的维持是实验需要解决的主要问题。我们采用了如下方法:(1)Ⅳ型胶原快速黏附。干细胞的主要特点之一是通过表达整合素实现对基底膜各种成分的黏附<sup>[6,7]</sup>。整合素由1个 $\alpha$ 亚基、1个 $\beta$ 亚基组成, $\alpha$ 亚基与 $\beta$ 亚基的差异形成了多种整合素亚型,其中由 $\beta_1$ 亚基组成的整合素在表皮干细胞与基底膜的黏附中起重要作用。根据这个特点,我们利用表皮干细胞对Ⅳ型胶原的快速黏附性对其进行分离。(2)采用成纤维细胞条件培养液。培养液的选择、培养液中钙离子的浓度、外源性EGF的含量是关键因素。钙离子的浓度和外源性EGF的含量过低会抑制细胞的生长,过高则会加速细胞的分化。本研究中,我们利用成纤维细胞分泌的多种细胞外基质,大大提高了表皮干细胞的贴壁生长率,同时抑制了成纤维细胞的生长和表皮干细胞的分化,有利于表皮干细胞的培养及其特性的维持。(3)联合消化法。原代表皮细胞的获取有组织块培养法和消化法2种。前一种方法简单易行,但需较长培养时间,并且每次消化传代都夹杂有较多的成纤维细胞。因此,本研究采用胰蛋白酶和EDTA按比例混合消化,有利于维持细胞的活性。对培养细胞的免疫组化鉴定表明,分离培养的表皮干细胞纯度较高、活性较好。同时,我们

发现真皮中也有少量的阳性细胞分布,提示真皮中可能也存在有表皮干细胞。

本研究为表皮干细胞的体外分离培养提供了一些实验依据,如何维持其在体外的快速增殖以满足临床的需要,是今后的研究中需要解决的问题。

#### [参考文献]

- [1] 孙晓庆,付小兵,盛志勇. 表皮干细胞[J]. 中华创伤杂志, 2000,16(10):635-638.
  - [2] Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation[J]. *EMBO J*, 2002,21(15):3919-3926.
  - [3] Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells[J]. *J Pathol*, 2002,197(4):479-491.
  - [4] Slack JM. Stem cell in epithelial tissues[J]. *Science*, 2000,287(5457):1431-1433.
  - [5] Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, et al. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions[J]. *Exp Dermatol*, 1999,8(1):80-88.
  - [6] Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cell in culture[J]. *Exp Cell Res*, 1998,224(1):184-195.
  - [7] Akiyama M, Smith LT, Shimizu H. Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles[J]. *J Invest Dermatol*, 2000,114(2):321-327.
- [收稿日期] 2003-12-24 [修回日期] 2004-04-29  
[本文编辑] 尹茶

#### · 研究简报 ·

### 术中B超联合术后纤维胆道镜治疗肝内胆管结石初步观察

#### Combination of intraoperative ultrasonographic scanning and postoperative flexible choledochoscopy in treatment of hepatolithiasis

尤天庚,王宏顺,杨家和,陈小云,陈志荣,夏雷,沈达明,龚彪,吴孟超  
(第二军医大学东方肝胆外科医院胆道二科,上海 200438)

[关键词] 肝内胆管结石;超声内镜;纤维胆道镜

[中图分类号] R 657.420.5

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)08-0817-01

肝内胆管结石因彻底取石手术难度大、残石率高以及再手术率高而成为胆道外科难题之一。术中B超(IOUS)技术操作简便,可降低残石率。胆道镜技术的发展,开辟了治疗肝内胆管结石的较理想的方法。我院从2000年8月至2002年9月对26例肝内胆管结石患者进行了IOUS引导、监测取石,术后3个月常规胆道镜取石、清洗胆管,取得了较满意的效果。

#### 1 资料和方法

1.1 一般资料 本组26例,男12例,女14例,年龄26~56岁,中位年龄44岁。右肝内胆管结石12例,左右肝内胆管结石14例。3例既往有胆道手术史。均为多发性结石,结石直

径0.5~2.5 cm。所有病例术前均经B超、核磁共振胆管成像术(MRCP)或逆行胰胆管造影(ERCP)检查诊断为肝内胆管结石。IOUS、T管造影、胆道镜清洗胆道后,B超随访14~36个月,平均随访28个月。

1.2 手术方法 常规开腹探查。切开胆总管探查取石后,用B超在肝脏膈面和脏面全面扫描,显示肝内胆管结石的部位和数量分布,以及肝内胆管扩张和可能的狭窄部位。根据B  
(下转第821页)

[作者简介] 尤天庚(1959-),男(汉族),博士,主治医师。

- cells; candidate MSC-like cells from umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1):105-110.
- [5] 郭希民,王常勇,王永红,等.人骨髓间充质干细胞分离培养及向软骨细胞定向分化的实验研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2003, 38(1):63-66.  
Guo XM, Wang CY, Wan YH, et al. Experimental study of the isolation, culture and in chondrogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell[J]. *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi(Chin J Stomatol)*, 2003, 38(1):63-66.
- [6] Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow[J]. *Blood*, 2001, 98(8):2396-2402.
- [7] 呼莹,马丽,马冠杰,等.成人和胎儿骨髓间充质干细胞的比较研究[J]. *中华血液学杂志*, 2002, 23(12):645-648.  
Hu Y, Ma L, Ma GJ, et al. Comparative study of human fetal and adult bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Zhonghua Xueyexue Zazhi(Chin J Hematol)*, 2002, 23(12):645-648.
- [8] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893):41-49.
- [9] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. *Blood*, 2001, 98(9):2615-2625.
- [10] Hu Y, Liao L, Wang Q, et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas[J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 141(5):342-349.
- [11] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1):67-73.
- [12] 李胜富,卢晓风,孙明茵,等.体外培养版纳微型猪近交系骨髓基质干细胞的生物学特性[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16(5):354-358.  
Li SF, Lu XF, Sun MH, et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells *in vitro* derived from bone marrow of banna minipig inbred line[J]. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi(Chin J Rep Reconstr Surg)*, 2002, 16(5):354-358.
- [收稿日期] 2003-11-24 [修回日期] 2004-04-29  
[本文编辑] 尹茶

(上接第817页)

超定位,引导取石器械到达结石部位准确取石。左肝胆管结石伴胆管扩张者行左半肝切除或左外叶切除。右肝Ⅲ级胆道以上结石或伴局部胆管狭窄不能器械取石者,在B超引导下局部切除肝组织。本组26例均行胆总管切开取石,7例外加左肝叶(或部分)切除,3例外加右肝叶部分切除。其中5例(包括3例胆道手术史者)行肝门部胆管成形+胆肠 Roux-en-Y 吻合术。所有患者均放置18号以上T管。术后1个月行T管造影,计算残石率。术后3个月常规行纤维胆道镜胆道取石清洗,拔出T管,经窦道置入纤维胆道镜,探查结石分布和胆汁附壁情况。生理盐水冲洗各分支胆管,清除附壁胆汁。对嵌顿结石,行液电碎石,网篮取石,再次计算残石率,术后重新置入T管。1周后无异常情况再行T管造影,无结石后拔除T管。

## 2 结果

(1)26例IOUS检查有21例与术前影像学结果(B超、MRCP和ERCP)一致,符合率80.7%。与术前诊断不符的5例中,3例术中发现尾状叶胆管结石,1例右前叶支结石,1例左内叶结石。(2)术后T管造影示4例残余结石,数量1~2枚,直径0.3~0.8cm,均分布于右叶Ⅱ级胆管以上区域。(3)术后3个月胆道镜检查:残余结石5例,占19.2%(5/26),较T管造影增加1例,为尾叶胆管结石。有11例见胆泥膜附着胆管壁,占42.3%(11/26),7例取出胆泥膜后见膜内微小结石,直径<1mm。胆道镜发现胆管壁粗糙、破损16例,占61.4%(16/26)。术后平均随访28个月,发现2例残余结石,残石率7.7%。1例为有胆道手术史者,术后29个月B超发现右叶胆管结石,0.8cm;另1例术后32个月B超见右前叶胆管结石,0.5cm。因单发结石<1cm,且无症状暂未治疗。

## 3 讨论

3.1 术中B超对肝胆管结石的治疗价值 肝内胆管结石术

后残留结石是传统外科的难题之一,文献报道<sup>[1]</sup>残石率一般在30.36%。本组术后残石5例,占19.2%。有报道<sup>[1]</sup>术中胆道镜取石后,残石率17.4%,与本组结果接近。准确定位并彻底清除结石,是手术成功的关键之一。IOUS可显示2mm小结石,准确率98.7%<sup>[2]</sup>。IOUS被认为比术中胆道造影更准确、方便。IOUS一方面提高了结石分辨率,另一方面在B超引导下,通过适当手法配合,动态观察取石器械与结石部位的关系,可以达到Ⅲ级以上胆管,常常是普通胆道镜无法达到的位置。肝门部胆管结石与尾状叶胆管结石影重重叠,术前常不能发现,术中忽略了结石。本组3例术前未诊断尾状叶结石,而由IOUS发现,占术前漏诊的3/5。我们建议,取净肝门部结石后再次B超探查尾叶是否有结石存在。肝叶切除患者,IOUS可以确定肝叶切除的界线,避免大血管损伤。

3.2 术后胆道镜对肝胆管结石的治疗价值 胆道镜具有直观并可配合器械操作的优点<sup>[3]</sup>。术后胆道的再次清理是本研究的一个重要环节。T管造影无残留结石患者中,1例术后胆道镜发现小结石,占1/5。胆管结石是由胆汁代谢异常、细菌感染和胆道损伤等多种因素造成。实践中观察到,16例患者胆道镜发现胆管损伤,占61.4%。7例发现胆管壁胆泥膜附着,占26.9%。术后胆道镜再次清洗胆道,进一步清除胆泥膜和细菌附着,帮助胆道黏膜修复。本组术后平均随访28个月,2例发现结石,残石率为7.7%,低于文献报道水平。

## 【参考文献】

- [1] 黄志强.我国肝内胆管结石外科治疗的现状:全国4197例手术病例的分析[J]. *中华外科杂志*, 1988, 26(9):513-522.
- [2] 胡宗泽,张清泉,贾淑娴,等.术中B型超声检查在胆石手术中的应用[J]. *中华物理医学杂志*, 1990, 12(3):138-141.
- [3] 鲍恩武,马庆久,鲁建国,等.经胆道镜激光碎石治疗肝内胆管难取性结石[J]. *中国内镜杂志*, 2003, 9(3):28-29.

[收稿日期] 2003-11-26 [修回日期] 2004-03-04  
[本文编辑] 曹静