论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0968-04

膀胱出口梗阻体外细胞生物力学模型的建立的研究

丁砺蠡,熊恩庆,龚 宇,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 建立一种全新的膀胱出口梗阻(BOO)体外细胞水平的生物力学模型,为BOO的研究提供一个更为稳定科学的实验平台。**方法** 应用负压发生装置对贴壁生长在BioFlex培养皿内的正常膀胱平滑肌细胞施加不同程度的周期性张力,使其硅胶底部分别发生10%、20%、30%的形变,利用免疫细胞化学检测收缩表型标志物α-actin,RT-PCR检测增殖指标PCNA的mRNA表达以及Western blot检测增殖细胞核抗原(PCNA)、cdk2 kinase蛋白表达,观察它们的动态变化,利用MTT法观察细胞增殖性的变化。**结果** 随着形变量的增大,免疫细胞化学发现α-actin先代偿增加后失代偿降低;RT-PCR和Western blotting发现PCNA的mRNA表达量逐渐增加,PCNA、cdk2 kinase的蛋白表达量逐渐增加,30%形变组显著高于正常对照组($P<0.01$);MTT实验发现与正常对照组比,细胞的增殖活性显著增加($P<0.01$)。**结论** ①对培养逼尿肌细胞施加周期性张力负荷作用的方法建立了一种全新的体外细胞水平的BOO模型;②随周期性张力增加,逼尿肌细胞由"收缩型"逐渐转化为"分泌型"。

关键词: 逼尿肌;梗阻;模型;张力;重塑

中图法分类号: R-332; R322.62; R694.2 **文献标识码**: A

Establishment and research of a biomechanical model of bladder outflow obstruction at single cell level *in vitro*

DING Li-li, XIONG En-qing, GONG Yu, SONG Bo (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a brand new model of bladder outflow obstruction (BOO) at single cell level *in vitro* to offer a more stable and scientific experimental base. **Methods** Recurrent mechanical stretch generated by vacuum facility was applied to cells attached to flexible membrane of special culture plate, which led to 10%, 20% and 30% elongation of them. Immunocytochemistry was used to analyze the expression of α-actin (sign of contractile phenotype) and RT-PCR was performed to detect the dynamic changes of mRNA expression of PCNA and Western blotting to protein expression of PCNA and cdk2 kinase. MTT assay was used to observe the changes of proliferation of cells. **Results** In the case of gradual elongation, the expression of α-actin rose at first and fell afterwards; the mRNA expression of PCNA and protein expression of PCNA and cdk2 kinase rose gradually. Changes in 30% elongation group were greater than the control ($P<0.01$). MTT assay also revealed the significant rising of proliferation ($P<0.01$). **Conclusion** A model of BOO at single cell level *in vitro* was established by means of performing recurrent mechanical stretch upon cultured smooth muscle cells. Smooth muscle cells were remodeled from "contractile phenotype" to "secretory phenotype" by the increasing stretch.

Key words: destructor; obstruction; model; stretch; remodeling

建立模型是实验研究的基础之一,在膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)的研究中,传统也是目前最常用的模型是通过手术缩窄尿道,形成机械性梗阻得到。实践中,操作较为繁琐,而且由于无法排除体内和操作过程的多因素干扰,尤其是不能真正模拟BOO的进行性发展过程,在此基础上的实验结果也难以让人信服。针对这种情况,我们考虑完全排除体内干扰因素,建立细胞水平的模型[1]。本实验前期研究表明BOO膀胱功能改变的结构基础(微观基础)是膀胱平滑肌细胞表型的改变[2],即由正常的"收缩型"转化为"分泌型"。所以我们拟在体外建立对平滑肌细胞施加周期性张力[3],使其表型发生转化而得到BOO细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300350)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30300350)

作者简介:丁砺蠡(1978-),男,安徽省怀宁县人,硕士研究生,医师,主要从事膀胱逼尿肌结构与膀胱功能的关系方面的研究。电话:(023)65398476,E-mail: ding@mail.tmmu.com.cn

通讯作者:熊恩庆,电话:(023)68754332

收稿日期:2005-01-04;修回日期:2005-03-15

胞的生物力学模型。此模型不但能模拟梗阻的进行性发展，还能通过对表型和一些细胞增殖基因的监测[4]很好地观察和干预，操作简便。

1　材料与方法

1.1　大鼠平滑肌细胞的分离和培养、鉴定

Wistar 大鼠（清洁级，2～3 月龄，体质量 150～250 g，第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供）膀胱，解剖显微镜下剔除内外膜，剪成 1 mm^3 的小块，0.2% 胶原酶消化制成细胞悬液，以 10^5/ml 的浓度接种培养瓶，37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养。细胞长至 80% 汇合即可胰酶消化，1∶3 或 1∶4 传代。实验应用 2～5 代细胞。采用 SABC 免疫染色对细胞进行染色鉴定。

1.2　外加周期性张力下平滑肌细胞的培养和分组

将细胞用 1×10^5 ～ 1×10^6/ml 接种到 Bioflex（Elastin）培养皿（35-BF-3001E，Flexcell 公司）底部的弹性膜上贴壁后外加周期性张力培养。张力用小型生物撞击机（第三军医大学大坪医院野战外科研究所）发生，调至周期性负压吸引状态，通过负压吸引对培养皿弹性底部的变形作用，将与皿底紧密贴附的细胞进行周期性的牵拉。

贴附于底部弹性膜的细胞分为正常对照组（N，12 例）、BOO_1 组（10% 最大拉伸，12 例）、BOO_2 组（20% 最大拉伸，12 例）、BOO_3 组（30% 最大拉伸，12 例）。压力与形变量的关系为 $Y(\%)=0.3518P^{1.8065}$（P 为培养皿底部张力膜所受压力，Y 为实际发生的形变量）。采用频率为 5～10 Hz 的正弦压力波形给细胞施压，时间为 6 h。操作结束后，放入 37 ℃孵箱培养。

1.3　免疫细胞化学和激光共聚焦显微镜观察

95% 乙醇固定，丙酮透化后，分别对各组细胞进行 SABC 免疫细胞化学染色。激光共聚焦显微镜（德国 Leica，第三军医大学西南医院中心实验室）下使用 555 nm 波长观察细胞形态的变化。

1.4　MTT 法测定细胞的增生活性

将接受张力培养后 6 h 的细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化下来，10% FBS 配制成密度为 1×10^4/ml 细胞悬液，接种到 96 孔板中，37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 96 h。从 96 孔板各孔中轻轻吸取并弃去 100 μl 培养上清液，然后加入 15 μl 的 MTT 溶液（0.5%），置 37 ℃培养箱中孵育 5 h 后，弃去上清，再加入 100 μl 二甲基亚砜（DMSO），充分混匀，静置后在酶联仪上选择检测波长 490 nm 比色测定吸光度[D(490)值]。

1.5　RT-PCR

张力负荷 48 h 后提取各组细胞总 RNA，紫外分光光度计测定 $D_{260}/D_{280}\approx2.0$，两步法 RT-PCR（Promega 公司试剂盒）扩增增殖细胞核抗原（PCNA）的 mRNA。反应条件：逆转录 20 μl 体系，48 ℃下 45 min。取反应产物的 1/5 构成 100 μl 的 PCR 反应体系。94 ℃变性 2 min，再以 94 ℃变性 45 s，54 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 1 min 的顺序进行 25 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min，冷却至 4 ℃。取 9 μl 反应产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 30 min～1 h，使用 Quantity One 分析软件进行图像分析，测定各条带的灰度值。

1.6　Western blot 检测

72 h 后用 0.5× SDS 裂解贴壁细胞，提取各组细胞总蛋白。绘制蛋白标准曲线，分别测定各组蛋白浓度，20 μl 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，3～4 h 后溴芬兰至底部时，切胶转膜 12 h，顺序加入 PCNA、cdk2 kinase 蛋白一、二抗（美国 Santa Cruze 公司）进行免疫反应，将 NC 膜与 ECL 共同孵育 1 min，保鲜膜覆盖，X 胶片照相保存。图像使用 Quantity One 分析软件，分析各条带的灰度值。

1.7　统计学方法

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS 11.5 软件行配对 t 检验。

2　结果

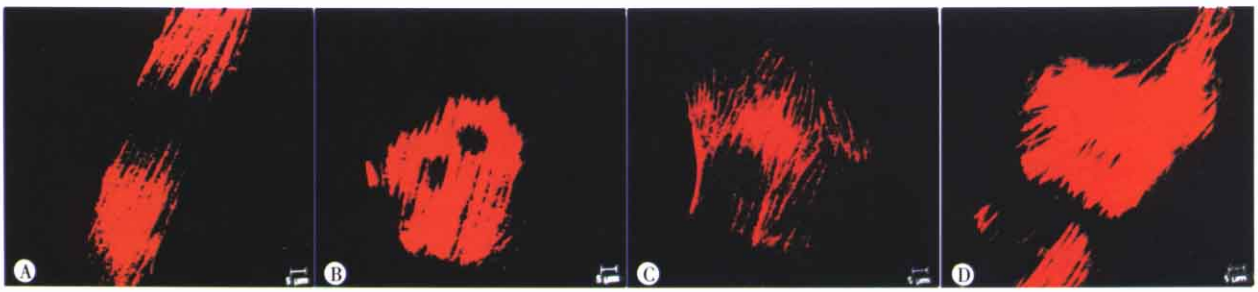
2.1　大鼠平滑肌的分离和培养、鉴定

原代细胞刚刚贴壁时呈梭形、棒形、长圆形，亦有伸出伪足状的细胞。很快随着细胞的增殖，成长梭形放射状的生长，6～7 d 后，细胞铺盖大部分培养瓶底，成束细胞平行排列，部分区域细胞生长紧密，高低起伏，呈现平滑肌细胞特征性的“峰”-“谷”样生长。

免疫荧光鉴定：经 α-actin 单抗、SABC 法荧光 Cy3 免疫细胞染色证明所得为膀胱平滑肌细胞。

2.2　周期性张力负荷对细胞形态的影响

正常对照组细胞内的 α-actin 沿细胞轴向均匀分布，纤维间基本平行排列。BOO_1 组细胞内 α-actin 表达量显著增加，并更趋向于轴向有序排列，显示在弱张力负荷下平滑肌细胞的代偿。BOO_2 组细胞内 α-actin 表达量显著增加，纤维增粗，并开始出现交叉。BOO_3 组细胞内 α-actin 表达量下降，同时出现排列紊乱，纤维断裂，连续性中断等异常改变。可见，随着细胞不断被拉伸，细胞开始表现为代偿性肌化，随后出现肌丝紊乱、断裂、α-actin 表达降低等一系列失代偿表现，见图 1。



A: Normal control; B: BOO_1 group; C: BOO_2 group; D: BOO_3 group

图 1　平滑肌细胞 α-actin 的免疫荧光（SABC × 1 000）

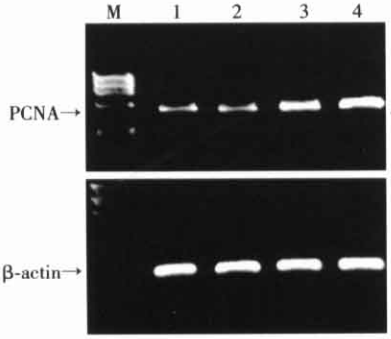
Fig 1　Immunofluorescent assay of α-actin in smooth muscle cells（SABC × 1 000）

2.3 周期性张力负荷对细胞增生活性的影响

MTT法测得 BOO_1 组、BOO_2 组、BOO_3 组的 $D(490)$ 值分别为(0.28±0.027)、(0.500±0.006)、(0.505±0.012),与正常对照组(0.207±0.004)比较差别均显著($P<0.05$)。

2.4 周期性张力负荷对反映细胞增殖的PCNA的mRNA水平的影响

从图2可见,随着拉伸程度的增加,PCNA的mRNA表达逐渐增强。与正常对照组相比,BOO_2 组有显著性差别($P<0.05$),BOO_3 组有非常显著差别($P<0.01$),提示外加张力负荷与反映细胞增殖程度的基因PCNA的mRNA表达正相关。



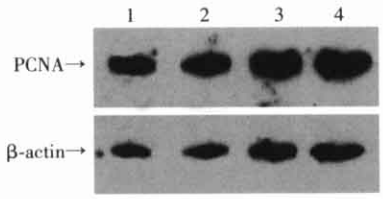
M: Marker; 1: Normal control; 2: BOO_1 group; 3: BOO_2 group; 4: BOO_3 group

图2 张力负荷对PCNA的mRNA水平的影响

Fig 2 Effects of stretch on mRNA levels of PCNA

2.5 周期性张力负荷对细胞增殖有关基因PCNA和cdk2 kinase蛋白表达的影响

由图3 Western blot检测可见,随着拉伸程度的增加,PCNA和cdk2 kinase表达逐渐增强。与正常对照组相比,BOO_2 组有显著性差别($P<0.05$),BOO_3 组有非常显著差别($P<0.01$),提示外加张力负荷与细胞增殖有关基因PCNA和cdk2 kinase蛋白表达正相关。



1: Normal control; 2: BOO_1 group; 3: BOO_2 group; 4: BOO_3 group

图3 张力负荷对PCNA和cdk2 kinase蛋白表达的影响

Fig 3 Effects of stretch on expressions of PCNA and cdk2 kinase

3 讨论

膀胱出口梗阻是指膀胱颈和近端尿道处各种原因导致的尿液流出道阻力升高,会导致膀胱逼尿肌结构改变,继而产生膀胱功能改变和一系列严重的并发症。目前常用的BOO传统模型大多是通过手术缩窄动物尿道,造成膀胱出口梗阻。结扎法操作简单,梗阻形成确切、可靠,但梗阻程度难以确定,过重则模型存活率低,过轻则无法形成有效梗阻,而且其最大的缺陷在于,一旦结扎形成尿道狭窄后,梗阻即刻形成。因此该方法模拟的BOO准确地说其实是一种"急性梗阻",而非人类BOO导致的慢性进行性梗阻。

鉴于传统方法无法克服的缺陷,我们从体外细胞角度建立了一种全新BOO模型。体外全膀胱的生物力学分析证明,数学建模的方法同样适合于膀胱这一空腔脏器的研究[5]。根据BOO时膀胱功能损伤的实质,是逼尿肌细胞承受尿流受阻导致的周期性、超过生理负荷的张力刺激作用,我们最近提出对培养的逼尿肌细胞施加周期性张力超负荷牵拉作用,能够较为精确地在细胞水平模拟BOO,这与高血压对血管平滑肌细胞的损伤具有相似的致病机制,它能排除在体水平无法避免的多因素干扰,有望为深入研究梗阻后膀胱功能障碍的分子机制提供有说服力的模型[6]。

这种BOO体外细胞生物力学模型很大程度上克服了传统方法的不足。首先,重复性好。由于实验参数可进行量化,不同批次实验实得到的细胞处于完全相同的干预状态可降低人为因素对实验条件的影响[7](如制作动物模型时尿道结扎的缩窄程度难以统一等)。其次,可控性好,外界的参数值可以根据实验需要随时调节,细胞的变化也可以随时动态观测,提供一个很好的"人-细胞"对话界面。再次,易于观测,传统结扎法较难得到作用到膀胱细胞上的确切张力,而此法张力参数值可以得到。最后,有更为广泛的使用前景,不受物种及细胞类型的研究,这些由于实际困难和伦理道德难于进行的科研行为,应用此模型可以轻松解决。

此前我们的研究证实,BOO膀胱功能改变的结构基础是平滑肌细胞表型由正常的"收缩型"转化为"分泌型"。本实验采取不同的外加周期性张力负荷对细胞逐次拉伸,通过观察收缩表型标志物α-actin和细胞增殖指标PCNA、cdk2 kinase动态了解其表型特征的变化。正常的膀胱逼尿肌细胞在周期性张力负荷下开始逐渐改变表型,在一定时间内,较小的张力作用下细胞能够代偿外加张力的作用,表型保持稳定;而当张力逐渐增大到一定程度,细胞失去代偿能力,收缩表型标志物α-actin下降而PCNA、cdk2 kinase表达增加,证明BOO后逼尿肌细胞处于由"收缩型"转化为"分泌型"表型的动态变化,这可能就是膀胱功能由代偿发展至失代偿过程的结构基础。

参考文献:

[1] Persson K, Dean Mckinney T, Steers W D, *et al*. Activation of the tran-

scription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in bladder smooth muscle exposed to outlet obstruction and mechanical stretching[J]. J Urol, 2001, 165(2): 633 - 639.

[2] Gong Y, Song B, Jin X Y. Phenotype transformation is the structural basis of functional changes of detrusor smooth muscle cell subjected to cyclic overload mechanical stretch[J]. Int J Urol, 2002, 10(9 Suppl): A88.

[3] Tubaro A, Carter S, Hind A, *et al*. A prospective study of the safety and efficacy of suprapubic transvesical prostatectomy in patients with benign prostatic hyperplasia[J]. J Urol, 2001, 166(1): 172 - 176.

[4] Tomita N, Horiuchi M, Tomita S, *et al*. An oligonucleotide decoy for transcription factor E2F inhibits mesangial cell proliferation *in vitro*[J]. Am J Physiol, 1998, 275(2 Pt 2): F287 - F284.

[5] Johansson R, Pandita R K, Poljakovic M, *et al*. Activity and expression of nitric oxide synthase in the hypertrophied rat bladder and the effect of nitric oxide on bladder smooth muscle growth[J]. J Urol, 2002, 168(6): 2689 - 2694.

[6] 龚 宇，宋 波，熊恩庆，等. 大鼠BOO对膀胱逼尿肌生物力学特性的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(22)：2002 - 2004.

[7] Sotoudeh M, Li Y S, Yajima N, *et al*. Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch[J]. Am J Physiol Heart·Circ Physiol, 2002, 282(5): H1709 - H1716.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)10-0971-01

个案与短篇

试管婴儿患先天性室间隔缺损外科治疗1例

A case report of surgical treatment for test tube baby suffering from congenital ventricular septal defect

易广兵，陈 林，王 咏，文仁国 （第三军医大学新桥医院心血管外科，重庆 400037）

试管婴儿是目前较为成熟的助孕技术，它已为众多不孕夫妇带来了福音，但试管婴儿的生长发育状况仍引人关注。试管婴儿患先天性心脏病鲜有报道，现报告1例试管婴儿患先天性室间隔缺损的外科治疗。

1 临床资料

患儿系试管婴儿，父亲30岁，母亲26岁，父亲身体健康，母亲患输卵管不通，均无家族遗传病史，无放射线、毒物接触史。精细胞由父亲提供，卵细胞由母亲提供，用经腹腔镜取卵，体外受精后行胚胎移植，由母亲受孕，孕41周，剖宫产。其母怀孕第6周时曾"感冒"1次，口服感冒药后痊愈。

患儿女性，9个月，体质量8 kg，因"出生时发现心脏杂音"入院。查体：发育良好，无发绀，心前区稍降起，心界向左下扩大，心率120次/min，律齐，P2增强，胸骨左缘二、四肋间闻及Ⅳ/6级收缩期杂音。超声心动图提示为：先天性心脏病：①右房、左室增大；②膜周部室间隔缺损，直径0.6 cm，左向右分流；③卵圆孔未闭。胸X线片提示：双肺血增多，心影重度增大。诊断：先天性心脏病，室间隔缺损，卵圆孔未闭。经积极术前准备，在全麻体外循环下心脏跳动中行室间隔缺损修补，卵圆孔缝闭术。手术顺利，术后恢复好，痊愈出院。

2 讨论

自然受孕小儿先天性心脏病的发生与诸多因素有关，常见的有遗传因素，母亲妊娠期间的病毒感染史、药物、毒物、放射线接触史等。而试管婴儿先天性心脏病的发生除了与上述因素有关外，取卵、体外受精、胚胎移植等环节的人为干预，也可能导致先天性心脏病发病率增高。目前对试管婴儿的生长发育状况有一定的研究，不同的试管婴儿技术对婴儿的生长发育影响也不尽相同。例如，标准法试管婴儿、冻融胚胎试管婴儿、赠卵试管婴儿的先天畸形发生率和自然受孕小儿相似[1]，胞浆内单精子注射试管婴儿的先天畸形发生率较自然受孕小儿高[2]。

本例系标准法试管婴儿，据目前研究结果，其先天畸形的发生率和自然受孕小儿相似，但仍不能排除是试管婴儿技术对其造成不利影响。另外，其妊娠早第6周时曾有感冒及口服"感冒药"病史，此生活史也可能造成其先天畸形的发生。总之，随着试管婴儿技术的广泛开展，试管婴儿的先天畸形，先天是先天性心脏病的研究尚有加强，它对揭示先天性心脏病的发病原因及优生优育均有重要意义。

本例试管婴儿的生长发育状况与自然受孕先天性心脏病患儿相似，二者手术治疗无差别。

关键词：试管婴儿；先天性室间隔缺损；外科

中图法分类号：R725.411 文献标识码：B

参考文献：

[1] Wennerholm U B, Albertsson-Wikland K, Bergh C, *et al*. Postnatal growth and health in children born after cryopreservation of embryos[J]. Lancet, 1998, 351(9103): 1085 - 1090.

[2] Sutcliffe-Tuttila V, Sajaniemi N, Tuimala V, *et al*. Health and development of children born after oocyte donation compared with that of those born after *in vitro* fertilization, and parents' attitudes regarding secrecy[J]. Hum Reprod, 1998, 13(7): 2009 - 2015.

[3] Wennerholm U B, Bergh C, Hamberger L, *et al*. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI[J]. Hum Reprod, 2000, 15(4): 944 - 948.

（编辑 张天春）

作者简介：易广兵（1976 - ），男，湖北省谷城县人，医师，主要从事先天性心脏病外科治疗方面的研究。电话：(023)68774007

收稿日期：2005-03-14；修回日期：2005-04-30