文章编号:1000-5404(2007)02-0101-04

论著

肌源性干细胞治疗压力性尿失禁的实验研究

徐惠成[1],王延洲[1],王 丹[1],秦茂林[2],常 青[1],梁志清[1],史常旭[1] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科,[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨肌源性干细胞(muscle-derived stem cells, MDSCs)移植至压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)大鼠近端尿道后体内形态、分布以及尿动力学变化,为压力性尿失禁的干细胞移植治疗提供理论基础。**方法** 采用坐骨神经离断法建立压力性尿失禁模型,改良差速贴壁技术分离MDSCs,pEGFP-N1转染作标记,注射至SUI大鼠近端尿道。尿动力学仪检测MDSCs移植后1、2周的漏尿点压力(leak point pressure, LPP)和最大膀胱容量。显微镜观察MDSCs移植后1、3、7、10、14 d荧光细胞的形态和分布。**结果** MDSCs移植后第7、14天,SUI大鼠的LPP均显著提高,移植后2周LPP显著高于移植后1周。在MDSCs移植后第1、3天,细胞保持小圆形和短梭形,局限于注射部位;第7天,一部分移植的MDSCs开始分化,分布范围扩大;第10天,一部分MDSCs分化为平滑肌细胞,部分死亡;第14天,一部分细胞分化为肌纤维,而其余细胞发生变性、死亡。**结论** MDSCs移植后能存活并分化而整合至尿道括约肌,尿道括约肌功能得到改善,提示MDSCs移植可能是治疗压力性尿失禁的有效方法。

关键词:肌源性干细胞;压力性尿失禁;细胞移植
中图法分类号:R-332;R329.2;R694.54 **文献标识码**:A

Experimental study of muscle derived-stem cells for treatment of stress urinary incontinence

XU Hui-cheng[1], WANG Yan-zhou[1], WANG Dan[1], QIN Mao-lin[2], CHANG Qing[1], LIANG Zhi-qing[1], SHI Chang-xu[1] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, [2]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the differentiation of muscle-derived stem cells (MDSCs) and metergasis of periurethral intrinsic sphincter after MDSCs transplantation into proximal urethra of stress urinary incontinence (SUI) rats. **Methods** Sciatic nerve transection was used to establish rat model of SUI. MDSCs were isolated by improved preplate technique. After transfected with pEGFP-N1 plasmid, MDSCs were injected into proximal urethra of SUI rats. Urodynamic test was used to measure leak point pressure (LPP) and maximal bladder capacity at 1st week and 2nd week after MDSCs transplantation. On day 1, 3, 7, 10, 14 after injection, fluorocytes were observed by fluorescence microscope. **Results** LPP were significantly increased at 1st week and 2nd week after MDSCs injection, while LPP at 2nd week was significantly higher than that at 1st week. On day 1, 3 after injection, the cells were small, round and short-fusiform, and distributed around the injected point; On day 7, some high-fluorescence cells were elongated and occupied larger area, but still localized within muscles surrounding urethra; On day 10, some fluorescent cells were long-fusiform and of strong fluorescence, while others lost normal form and were of weakened fluorescence; On day 14, fluorescent cells decreased with weakened fluorescence. **Conclusion** MDSCs could survive and differentiate after transplanted into proximal urethra of SUI rats and could improve function of sphincter muscle of urethra, suggesting that MDSCs transplantation may be an effective method to treat SUI.

Key words: muscle-derived stem cells; stress urinary incontinence; cell transplantation

尿道固有括约肌缺陷(intrinsic sphincter deficiency, ISD)是导致女性压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)的重要原因,目前对ISD导致的SUI尚无长期有效的治疗方法[1]。由于ISD患者的尿道括约肌存在成肌功能障碍,进行肌肉干细胞移植可能是治疗SUI的最佳方法。其中肌源性干细胞(muscle-derived stem cells, MDSCs)具有增殖快、融合慢、多分化

基金项目:国家自然科学基金(30500539),第三军医大学科研基金(2003)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500539) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2003)
作者简介:徐惠成(1970-),男,浙江省兰溪市人,博士,主治医师,讲师,主要从事女性盆底功能障碍和妇科疾病微创诊治方面的研究,发表论文13篇。电话:(023)68765402
收稿日期:2006-05-16;修回日期:2006-10-09

潜能等特性，移植后存活率高的特点，是一种理想的细胞移植物[2]。既往研究表明 MDSCs 注射正常大鼠膀胱壁和尿道后能长期存活并形成肌纤维[3]，但少见 MDSCs 体外培养以及移植至接近人 SUI 病理生理状态模型的研究报道。在本研究中，我们运用改良差速贴壁技术分离 MDSCs，转染 pEGFP-N1 作标记，检测 MDSCs 移植至 SUI 大鼠的近端尿道后体内形态和分布以及尿动力学变化，发现 MDSCs 移植至 SUI 大鼠后可在体内存活分化并改善尿控功能。

1 材料与方法

1.1 主要材料

新生 SD 大鼠和 3～4 周龄雌性 SD 大鼠 56 只，3～4 周龄，体质量(250±50) g，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。pEGFP-N1 质粒由本校组织学与胚胎学教研室秦茂林博士惠赠，bFGF 购自美国 Promega 公司，结蛋白单抗购自美国 Sigma 公司，Lipofectmine™2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司，Ⅰ型胶原酶、Dispase Ⅱ购自德国 Boche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MDSCs 分离纯化 新生 SD 大鼠腹腔注射戊巴比妥麻醉后，取下肢肌肉，去除皮肤和骨骼，将肌肉剪成碎块，加入 D-Hanks 液静置 1 min，弃上清液及漂浮组织。加入 1% 胶原酶，37 ℃孵育 1 h，3 500 r/min，离心 5 min。去上清液，依次加入 2.4 U/ml Dispase Ⅱ，37 ℃孵育 45 min，0.1% 胰蛋白酶，37 ℃孵育 30 min。3 500 r/min，离心直径为 5 min，弃上清液。采用改良差速贴壁技术分离 MDSCs：将细胞悬液置于Ⅰ型胶原包被的培养皿培养 2 h，将未贴壁的细胞悬液转入另一包被有Ⅰ型胶原的培养皿中，每 24 小时重复贴壁 2 次，未贴壁的细胞转入新培养皿中继续贴壁 2 次，每次间隔 36 h，最后贴壁的细胞为 MDSCs。

将 MDSCs 接种于直径为 5 cm 的一次性塑料培养皿中，培养介质为含 10% 胎牛血清 + 10% 马血清 + 2.5 ng/ml bFGF + 1% 青霉素/链霉素的 Ham-F10 培养液，每 3 天更换培养液。细胞融合达 70%～80% 时进行传代，在传代培养第 6～7 天采用消化法对细胞进行纯化。取第 3 代细胞做细胞移植。

1.2.2 结蛋白染色 细胞用 -20 ℃甲醇固定 1 min，加 10% 马血清阻断 1 h，加入结蛋白抗体，室温下过夜，滴加免疫荧光标记的二抗，37℃孵育 30 min，荧光显微镜下观察。

1.2.3 pEGFP-N1 质粒转染 pEGFP-N1 质粒扩增、鉴定和提取参照萨姆布鲁克的《分子克隆学实验指南》进行。pEGFP-N1 质粒转染采用脂质体法，操作步骤参照试剂说明书进行。

1.2.4 SUI 模型建立 将大鼠按体质量随机分成 3 组。C 组：接受假手术未横断坐骨神经，不注射任何物质($n=8$)，M 组：接受双侧坐骨神经横断 + MDSCs 注射($n=24$)，H 组：接受双侧坐骨神经横断 + Ham-F10 培养液注射($n=24$)。采用坐骨神经横断术建立 SUI 模型。在坐骨神经横断术后第 2 周分别取 C、H、M 组大鼠各 4 只，用尿动力学监测仪测定最大膀胱容量和漏尿点压力(leak point pressure，LPP)。尿动力学检测后处死大鼠，取近端尿道做组织学检查。

1.2.5 MDSCs 局部注射 大鼠麻醉后，沿大鼠下腹正中线剪开腹壁，暴露尿道，在尿道近端距膀胱约 0.2 cm 处取时钟 2 点和 10 点进针，M 组每侧注射 MDSCs 悬液 10 μl，每只大鼠注射 MDSCs($1\sim2$)$\times10^5$ 个，H 组每侧注射 Ham-F10 培养液 10 μl，C 组不注射任何物质。

1.2.6 尿动力学测定与组织学检查 于移植后第 7 和 14 天分别取各组 4 只大鼠行尿动力学测定。移植后第 1、3、7、10、14 天处死大鼠，取近端尿道做组织学检查。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 MDSCs 分离培养和纯化

5 次贴壁后得到 MDSCs，细胞为小圆形，形态均一(图 1)。



图 1 5 次贴壁后得到的 MDSCs (LM×150)

2.2 MDSCs 结蛋白染色

取第 3 代细胞行结蛋白免疫荧光检测，荧光显微镜下 MDSCs的细胞质内可见绿色荧光(图 2)。

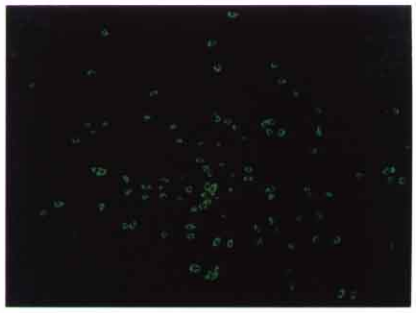


图 2 MDSC 结蛋白染色 (荧光显微镜×100)

2.3 坐骨神经横断后最大膀胱容量和 LPP

坐骨神经横断术后 2 周，C，H 和 M 组的 LPP 和最大膀胱容量见表 1。3 组相比，H、M 组 LPP 显著下降，最大膀胱容量显著增加，H 组和 M 组间最大膀胱容量和 LPP 均无明显差异。

表 1 坐骨神经横断术后尿动力学结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	最大膀胱容量(ml)	漏尿点压力(cmH_2O)
C	4	1.40±0.13	26.23±0.76
H	4	2.74±0.10[a]	15.99±0.67[a]
M	4	2.71±0.12[a]	16.04±1.46[a]

a：$P<0.01$，与 C 组比较

2.4　SUI 大鼠 MDSCs 移植后最大膀胱容量和 LPP

注射后第 1 周和第 2 周 C 组、H 组和 M 组大鼠 LPP 和最大膀胱容量见表 2。H 组和 M 组最大膀胱容量均显著高于 C 组，H 组和 M 组间无明显差异；C 组 LPP 显著高于 H 组和 M 组，M 组的 LPP 显著高于 H 组，M 组注射后第 2 周 LPP 显著高于注射后第 1 周。

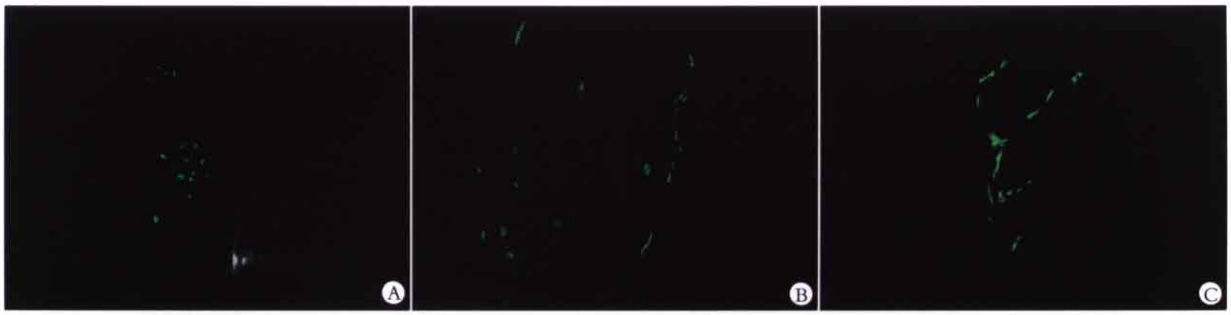
2.5　MDSCs 移植后分布分化

MDSCs 注射后第 1 天和第 3 天，细胞保持小圆形和短梭形，局限于注射部位（图 3A）；移植后第 7 天，部分强荧光细胞呈长梭形，分布范围较前扩大，但局限于尿道周围肌肉内（图 3B）；注射后第 10 天，部分荧光细胞呈长梭形和圆形，一部分失去正常细胞形态，荧光减弱；注射后第 14 天，荧光细胞中部分呈长梭形，部分细胞荧光减弱，未见圆形细胞（图 3C）。C 组和 H 组未见荧光细胞。

表 2　MDSCs 注射后 SUI 大鼠尿动力学结果

组别	第 1 周		第 2 周	
	最大膀胱容量（ml）	漏尿点压力（cmH_2O）	最大膀胱容量（ml）	漏尿点压力（cmH_2O）
C	1.65 ± 0.12	27.31 ± 1.32	1.54 ± 0.11	27.68 ± 1.13
H	2.51 ± 0.09[a]	14.81 ± 0.67[a]	2.65 ± 0.17[a]	13.12 ± 1.16[a]
M	2.51 ± 0.14[a]	21.59 ± 0.88[ab]	2.58 ± 0.18[a]	24.14 ± 0.33[ab]

a：$P<0.01$，与 C 组比较；b：$P<0.01$，与 H 组比较



A：第 3 天；B：第 7 天；C：第 14 天

图 3　移植后的 MDSCs（荧光显微镜 ×100）

3　讨论

SUI 是指在腹压突然增加时出现无法控制的漏尿，导致 SUI 的关键机制主要有两种：尿道固有括约肌缺陷（ISD）和膀胱颈支撑功能障碍，其中 ISD 是导致女性 SUI 的重要原因[4]。女性因分娩创伤和其他尿失禁的诱发因素，可使支配相关肌肉的神经受损或肌肉本身损伤，从而使盆底肌和尿道括约肌的质量和数量发生改变。正常机体局部肌肉组织损伤后会发生组织再生，但尿道括约肌的再生能力有限，在 ISD 患者存在有明显的成肌功能障碍[4]。

SUI 的治疗方法众多，包括手术治疗和非手术治疗，但长期疗效均不理想，且并发症多[5]。特别是对于 ISD 所致的 SUI，由于成肌功能障碍的存在，从本质上改善 ISD 的治疗方法是纠正其成肌功能障碍，即恢复 ISD 所致 SUI 患者成肌细胞作用或功能。目前一些研究报道骨骼肌成肌细胞尿道内注射移植后能在尿道括约肌长期存活并可改善尿控功能[3]。但是成肌细胞移植存在许多问题，包括移植后细胞存活率低下以及增殖能力不强，这些均限制了卫星细胞移植治疗的应用。MDSCs 是肌肉内高度未分化的多潜能干细胞，具有增殖快、融合慢、多分化潜能等特性，移植后存活率高等特点，是一种理想的细胞移植物[2]。

3.1　MDSCs 的分离、培养和鉴定

Qu-Petersen 等[2] 最早采用差速贴壁技术分离肌肉细胞，经过连续 6 步贴壁后得到 MDSCs，其原理是成纤维细胞、内皮细胞的贴壁能力强于卫星细胞，而卫星细胞贴壁能力又强于 MDSCs。

由于 MDSCs 数量极少，有报道 1×10^5 个卫星细胞中仅有 1 个 MDSCs 克隆，因此 MDSCs 的分离是关键。目前已进行的研究均采用 6 步贴壁技术从成体动物分离 MDSCs。本研究表明，采用 6 步贴壁法从成体大鼠分离 MDSCs，在贴壁 6 次后得到的细胞数量极少，而直接将贴壁 5 次后的细胞悬液用于培养，混杂有较多的成纤维细胞量。为了增加分离细胞的数量并提高分离细胞的纯度，本研究对既往报道的分离技术进行了改进：①取新生大鼠肌肉标本分离细胞；②减少贴壁次数。本研究表明，将 6 步贴壁减少至 5 步，延长 4、5 两步的贴壁时间，而维持总的贴壁时间基本不变，分离得到的细胞数量相对增加，为小圆形，结蛋白染色阳性，与 6 步贴壁法分离得到 MDSCs 一致，提示分离得到的细胞为 MDSCs。采用 5 步贴壁分离技术有以下优点：①简化了实验步骤；②增加了 MDSCs 的量。

目前 MDSCs 尚无一致的鉴定方法，主要根据细胞分离方法和细胞的形态、细胞标志物鉴定，其中最常用的细胞标记物是结蛋白。本研究分离培养的 MDSCs 胞浆结蛋白强阳性，与 Qu-Petersen 等[2] 报道一致。

3.2　SUI 发病机制和动物模型建立

导致 SUI 的机制主要有膀胱颈支撑功能障碍和 ISD，女性中 ISD 占重要作用。尿道括约肌的再生能力

有限，分娩创伤和其他尿失禁的诱发因素可使神经或肌肉受到损害，导致 ISD，从而造成尿道闭合压产生不够而最终发生 SUI。

根据 SUI 的发病机制，目前采用多种方法建立了 SUI 模型，包括模拟产伤、坐骨神经横断、阴部神经横断、尿道括约肌烧灼等[6,7]，这些方法均不能完全模拟人 SUI 的病理生理。本研究通过坐骨神经横断术建立 SUI 模型，发现在坐骨神经横断后第 2 周，LPP 显著下降，尿道组织学检查示尿道周围肌肉有萎缩。LPP 是反应尿控功能最重要的指标，LPP 下降提示尿道括约肌功能下降。本研究建立的模型同时有尿道括约肌结构和功能缺陷，类似于人由于 ISD 导致的 SUI。

3.3 MDSC 移植治疗 SUI

SUI 的治疗方法众多，但要从根本上解决 ISD，长期疗效不理想。由于 ISD 患者的尿道括约肌存在成肌功能障碍，进行肌肉干细胞移植可能是治疗 SUI 的有效方法[4]。有研究表明，MDSCs 尿道内移植后能在尿道括约肌内长期存活，部分可分化肌纤维。但干细胞的分化和生存受微环境的影响，实验所采用的动物、模型的建立方法以及细胞的注射时机等均影响移植 MDSCs 的存活和分化。目前已进行的研究方法多集中于正常动物或在模型建立的同时进行 MDSCs，且无 MDSCs 移植后细胞分化的具体研究。

本研究在坐骨神经离断后第 2 周移植，移植环境接近人 SUI 的病理生理。尿动力学检测显示 MDSCs 移植后第 7 天和第 14 天，LPP 均得到显著提高，提示尿道括约肌功能得到改善。但 MDSCs 移植不能完全恢复 LPP，说明 MDSCs 移植不能完全恢复 ISD，这与既往报道不同，可能与细胞注射数量及时机有关[6]。在移植后第 1 天和第 3 天，MDSCs 保持原有形态，局限于注射部位，提示移植的 MDSCs 尚未分化和迁移。在移植后第 7 天，细胞形态和分布范围发生改变，提示移植后第 7 天一部分 MDSCs 开始分化。在移植后第 14 天，荧光细胞均呈长梭形，数量减少，提示移植的 MDSCs 除部分分化为肌纤维外，其余死亡。

目前尚无有关 MDSCs 移植后尿控功能的变化与移植细胞的数量间关系的研究。本研究中移植 MDSCs 的数量参照文献[8]进行。本课题将进一步定量研究移植 MDSCs 与功能变化。

本研究表明，MDSCs 尿道内移植后随时间延长分布范围扩大，但膀胱壁内未见明显荧光细胞，最大膀胱容量无改变，提示 MDSCs 移植后迁移有限。随时间延长，移植 MDSCs 是否能发生远处迁移尚有待深入研究。

目前 MDSCs 移植改善尿控功能的机制尚不完全明确，可能与以下因素有关：①MDSCs 整合到宿主纤维，增加收缩强度；②再生有神经支配的肌纤维；③填充效应[8,9]。文献[7]报道，MDSCs 移植后可在尿道括约肌内分化形成新肌纤维，但这些肌纤维排列紊乱，并不能融合到宿主肌纤维，因此推测移植的 MDSCs 主要发挥填充效应。本研究中，MDSCs 移植后第 1 周和第 2 周，LPP 均显著升高，但移植后第 2 周显著高于第 1 周，结合 MDSCs 移植后的分化，我们推测，在尿道注射后第 7 天，移植的 MDSCs 尚未分化，LPP 提高可能主要通过移植细胞的填充效应，在第 14 天，除已分化细胞外，其余细胞已变性，LPP 提高可能主要通过尿道括约肌功能改善。MDSCs 移植后分化形成的肌细胞是否具有与宿主尿道括约肌细胞同样的功能在下一部分课题中进一步研究。有报道，MDSCs 移植后大部分分化为成纤维细胞，如此移植的细胞将仅通过填充效应发挥作用，而 TGF-β1 在 MDSCs 分化为成纤维细胞中起重要作用。在延续课题中，我们将在 MDSCs 上转染反义 TGF-β1 以抑制 MDSCs 向成纤维细胞分化，增强其向肌纤维细胞分化，从而达到进一步提高尿道括约肌功能的目的。

有研究表明，从新生动物分离的成肌细胞处于年老环境后再生能力下降。MDSCs 移植至老年患者的尿道是否具有足够的再生能力有待深入研究。

参考文献：

[1] Kevorkian R. Physiology of incontinence[J]. Clin Geriatr Med, 2004, 20(4): 409-425, v.

[2] Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, *et al*. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration[J]. J Cell Biol, 2002, 157(5): 851-864.

[3] Peyromaure M, Sebe P, Praud C, *et al*. Fate of implanted syngenic muscle precursor cells in striated urethral sphincter of female rats: perspectives for treatment of urinary incontinence[J]. Urol, 2004, 64(5): 1037-1041.

[4] Strasser H, Berjukow S, Marksteiner R, *et al*. Stem cell therapy for urinary stress incontinence[J]. Exp Gerontol, 2004, 39(9): 1259-1265.

[5] Chartier-Kastler E. SUI: Current Management and Unmet Needs[J]. Eur Urol Suppl, 2005, 4(1): 11-17.

[6] Lee J Y, Cannon T W, Pruchnic R, *et al*. The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2003, 14(1): 31-37.

[7] Chermansky C J, Tarin T, Kwon D D, *et al*. Intraurethral muscle-derived cell injections increase leak point pressure in a rat model of intrinsic sphincter deficiency[J]. Urology, 2004, 63(4): 780-785.

[8] Kwon D, Minnery B, Kim Y, *et al*. Neurologic recovery and improved detrusor contractility using muscle-derived cells in rat model of unilateral pelvic nerve transaction[J]. Urology, 2005, 65(6): 1249-1253.

[9] Irintchev A, Zweyer M, Cooper R N, *et al*. Contractile properties, structure and fiber phenotype of intact and regenerating slow-twitch muscles of mice treated with cyclosporin A[J]. Cell Tissue Res, 2002, 308(1): 143-156.

（编辑 栾 嘉）