论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412029

大鼠骨髓间充质干细胞通过膀胱壁注射改善大鼠逼尿肌无力

印苏培,郑 霁,董明明,周占松 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone-derived mesenchymal stem cells,rBMSCs)膀胱壁注射法改善大鼠逼尿肌无力(acontractile detrusor, ACD)的可能性。**方法** 40只SD雌性大鼠分为4组,每组10只:正常大鼠对照组、低温诱导ACD组、生理盐水治疗组、rBMSCs治疗组。常规分离培养rBMSCs至第3代。建立大鼠膀胱壁冻伤模型模拟逼尿肌无力的情况,将rBMSCs或生理盐水注入大鼠膀胱壁肌层,14 d后检测各组大鼠膀胱排尿功能,逼尿肌肌条收缩力,RT-PCR和Western blot检测平滑肌收缩相关蛋白(α-SMA、Calponin和SM-MHC)的表达情况,HE染色了解各组大鼠膀胱壁组织学改变情况。**结果** rBMSCs治疗组膀胱内压、肌条收缩力显著高于低温诱导ACD组和生理盐水治疗组($P<0.01$),恢复超过50%。治疗组α-SMA、Calponin及SM-MHC的表达明显高于低温诱导ACD组和生理盐水治疗组($P<0.01$)。**结论** rBMSCs通过膀胱壁注射能有效改善大鼠逼尿肌无力。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;平滑肌细胞;逼尿肌无力

[中图法分类号] R-332;R329.2;R694.05 [文献标志码] A

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve acontractile detrusor in rat model

Yin Supei, Zheng Ji, Dong Mingming, Zhou Zhansong (Institute of Urinary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the possibility of alleviating acontractile detrusor (ACD) by cytotherapy with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (rBMSCs) injected into the bladder wall. **Methods** Forty Sprague-Dawley female rats were divided into 4 groups: a control group (G1, $n=10$), a low-temperature modeling group (G2, $n=10$), a normal saline treatment group (G3, $n=10$), and a rBMSCs treatment group (G4, $n=10$). The rBMSCs were isolated and cultured as reported before. ACD was induced via cryoinjury of the bladder, and rBMSCs were directly injected into the bladder wall. After 14 d, the bladder micturition function, bladder detrusor strip tension, expressions of smooth muscle contraction-related markers (α-SMA, Calponin and SM-MHC) and histological changes were assessed in each group. **Results** Western blotting and RT-PCR results indicated that compared with the G2 and G3 groups, the mRNA and protein levels of α-SMA, Calponin and SM-MHC were markedly increased in the G4 group ($P<0.01$). Cystometry and muscle strip intension test demonstrated the detrusor contractibility was improved in the G4 group, and the detrusor function was recovered by over 50%. **Conclusion** The injection of rBMSCs into the bladder wall can alleviate ACD in the rat model.

[**Key words**] bone-derived mesenchymal stem cells; smooth muscle cells; acontractile detrusor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270842). Corresponding author: Zhou Zhansong, E-mail: zhouzhansong@sohu.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270842)

[通信作者] 周占松,E-mail:zhouzhansong@sohu.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1356.010.html(2015-03-27)

随着年龄的增长,某些疾病(如脊髓损伤、糖尿病及间质性膀胱炎等)可能会导致膀胱逼尿肌无力(acontractile detrusor, ACD)[1]。逼尿肌无力会引起许多膀胱功能障碍的症状,包括排尿困难、尿潴留、尿急等,从而严重影响患者的身心健康和生活质量,导致患者出现社交活动障碍、性生活问题及心理障碍[2-4]。目前,包括间隙性自行导尿、拟胆碱药物、电刺激治疗在内的传统治疗方法仅能缓解症状,而不能修复受损的膀胱逼尿肌[5-6],是传统治疗方法效果欠佳的重要原因。因此,越来越多的研究者关注利用组织工程学的方法促进膀胱平滑肌的再生,从而提升逼尿肌的收缩能力[7-9]。在目前的研究中,干细胞的作用越来越引起人们的关注,许多研究者试图通过干细胞的多向分化特性来修复膀胱功能障碍。研究发现,肌肉来源干细胞可改善逼尿肌损伤[10]。但是,在临床应用上,肌肉来源干细胞的获取不仅有创,还面临一定的伦理学限制。骨髓间充质干细胞存在于各种类型的组织和器官中,获取相对容易,其具有自我复制、更新和多向分化的能力,并能分化为包括平滑肌细胞在内的多种细胞。从理论上推测,骨髓间充质干细胞的临床应用将有利于改善患者逼尿肌无力。但是,目前仍缺乏骨髓间充质干细胞是否能改善逼尿肌无力的相关研究报道。本研究拟探讨大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone-derived mesenchymal stem cells, rBMSCs)膀胱壁注射法改善大鼠逼尿肌无力的可能性。

1 材料与方法

1.1 分离和培养rBMSCs

根据Yang等[11]的方法从成年雌性大鼠的髂骨和股骨中分离骨髓间充质干细胞。骨髓加入骨髓细胞分离液(Gibco, Grand Island, NY, USA)洗脱,骨髓细胞被分离出来,室温下离心20 min,分离出的单细胞悬液再次以1 600 r/min离心5 min,离心后将2 μL悬液加入18 μL DMEM培养液并混匀,滴至计数板,计算单核细胞浓度。将干细胞以10^6/mL接种于培养瓶中,瓶中含10%胎牛血清(FBS, Gibco)、青霉素100 μg/mL、链霉素100 μg/mL及DMEM培养液90%,放入37 ℃、5% CO_2、饱和湿度细胞培养箱中。免疫组化法鉴定间充质干细胞,检测结果:细胞CD29、CD44呈阳性表达,CD34、CD45呈阴性表达,证明本实验培养出的细胞为间充质干细胞。

1.2 实验动物模型制备

健康雌性SD大鼠40只,2月龄,体质量150~200 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,分为4组,每组10只:正常对照组、低温诱导ACD组、生理盐水治疗组、rBMSCs治疗组。逼尿肌无力的大鼠模型根据Somogyi等[12]的方法建立。大鼠用5%水合氯醛腹腔注射麻醉后固定与操作台上,取下腹部正中切口,暴露膀胱及膀胱颈,将10 mm×3 mm被干冰冷冻至-40 ℃的铝棒放置于膀胱壁表面的浆膜层,持续30 s,冻伤膀胱壁约8 mm×3 mm范围。随后,无处理组大鼠直接关腹,生理盐水处理组大鼠用微量注射泵在膀胱壁肌层冻伤区域多点注射生理盐水500 μL后关腹,干细胞处理组大鼠用同样方法在膀胱壁肌层冻伤区域多点注射500 μL 1×10^5/20 μL骨髓间充质干细胞后关腹。

1.3 膀胱测压实验

饲养14 d后,各组大鼠采用Bury等[13]的方法行膀胱测压。各组大鼠采用皮下注射尿烷(1.2 g/kg, Sigma公司)麻醉。经尿道外口将1 mm的硬膜外麻醉导管置入膀胱,导管外口与三通管连接,并分别接在微量灌注泵、尿动力仪,将尿动力仪调零,轻压大鼠腹部,排空膀胱内尿液。用0.9%生理盐水以15 mL/h灌注入膀胱内,根据膀胱充盈过程压力-容积关系检测膀胱压力,记录排尿曲线。

1.4 大鼠逼尿肌肌条收缩检测实验

饲养14 d后,快速断颈处死各组大鼠,分别于膀胱的原冻伤部位取2 mm×6 mm的肌条组织,置于38 ℃ Krebs溶液中,在95% O_2和5% CO_2中平衡30 min后,将肌条一端置于肌槽底端的定挂钩上,另一端悬挂于张力传感骑上(量程为30 g)并与电脑相连,通过RM6240生理信号采集处理系统进行记录,分析肌条收缩的频率和幅度。每个肌条检测20~30 min,取其中5 min的平均值。

1.5 膀胱壁组织HE染色实验

用4%的多聚甲醛对各组膀胱壁组织固定,膀胱壁组织固定好后依次进行脱水处理,石蜡液体中浸泡2 h,冷却后将蜡块切成片状蜡带(蜡带的厚度为3~5 μm)。将组织切片置于60 ℃的烤箱中烘烤2 h,脱蜡后用PBS冲洗3遍(5 min/次);将组织切片放入苏木精中3 min,洗脱后在显微镜下观察,再置于伊红中4 min,洗脱后自然晾干;在切片上滴入约50 μL的中性树脂,将封好片的组织切片自然晾干,并用显微镜观

察组织的形态及病理特征。

1.6 Western blot 检测平滑肌收缩相关蛋白 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 的表达

治疗2周后，收集正常对照组、低温诱导 ACD 组、生理盐水治疗组、rBMSCs 治疗组各组膀胱平滑肌细胞总蛋白，用 BCA 法测定蛋白浓度。样品经电泳、转膜、封闭后，一抗4 ℃过夜孵育，洗膜后用二抗在室温下杂交1 h，洗膜3次6 min/次，ECL 化学发光检测。

1.7 RT-PCR 检测平滑肌收缩相关蛋白 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 在 mRNA 水平的表达

将各组大鼠处死后，取膀胱逼尿肌加液氮研磨至粉末，按 TRIzol 法提取总 RNA，并测定浓度。按照日本 TaKaRa 公司 one Step 试剂盒说明书配置反应溶液并设定 RT-PCR 扩增程序。α-SMA 上游引物 5′-GGAGATGGCGTGACTCACAA-3′，下游引物 5′-CGCTCAGCAGTAGTCACGAA-3′，引物片段大小 123 bp；calponin 上游引物 5′-GCCCAGAAATACGACCACCA-3′，下游引物 5′-CCGGCTGGAGCTTGTTGATA-3′，引物片段大小 145 bp；SM-MHC 上游引物 5′-TAGCAGATCTGGGACCACCA-3′，下游引物 5′-CGCCCTTCTCCTCCTTGATG-3′，引物片段大小 110 bp。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较应用 t 检验。

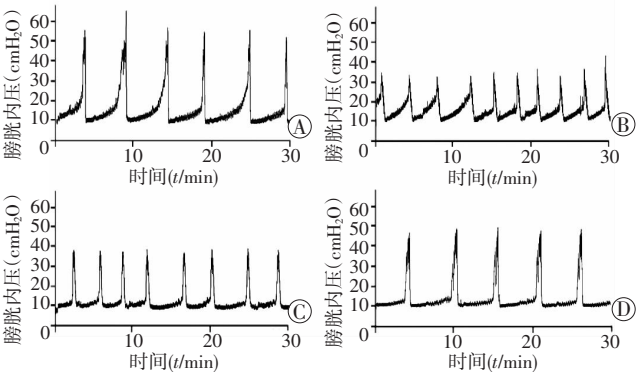
2 结果

2.1 膀胱内压力检测

低温诱导 ACD 组，排尿时膀胱内压是(36.33 ± 2.06)cmH_2O，显著低于正常对照组的(55.00 ± 2.19)cmH_2O。生理盐水或者 rBMSCs 治疗2周后，生理盐水治疗组膀胱内压情况较不采取任何治疗措施的低温诱导 ACD 组无明显好转，为(35.33 ± 2.80)cmH_2O，而 rBMSCs 治疗组膀胱内压较组2及组3明显增加，膀胱内压部分恢复(图1)。

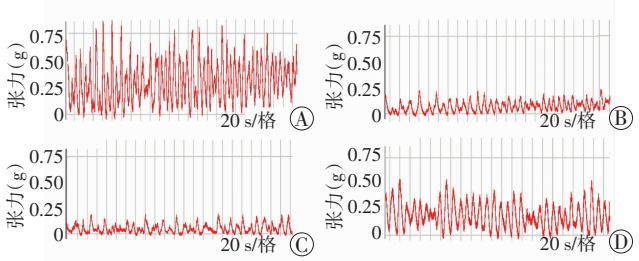
2.2 逼尿肌肌条收缩变化检测

在对各组大鼠逼尿肌收缩能力的比较中，低温损伤诱导的逼尿肌无力大鼠模型的逼尿肌的收缩频率和平均张力为0.06 Hz 和0.125 g(图2B)，明显低于正常大鼠0.1 Hz 和0.5 g(图2A)，频率降低了40%，平均张力降低了75%。rBMSCs 治疗组逼尿肌收缩频率及幅度明显大于低温诱导 ACD 组及生理盐水治疗组。生理盐水治疗前后无明显差异($P > 0.05$)，收缩频率和平均张力均为0.06 Hz 和0.125 g(图2C)，而 rBMSCs 治疗组收缩频率为0.075 Hz 和0.26 g(图2D)，两项指标明显改善，与正常对照组比较恢复超过50%。



A：正常对照组；B：低温诱导 ACD 组；C：生理盐水治疗组；D：rBMSCs 治疗组

图1 治疗2周前后各组大鼠膀胱内压力检测结果



A：正常对照组；B：低温诱导 ACD 组；C：生理盐水治疗组；D：rBMSCs 治疗组

图2 治疗2周前后各组大鼠膀胱逼尿肌肌条检测频率及振幅比较

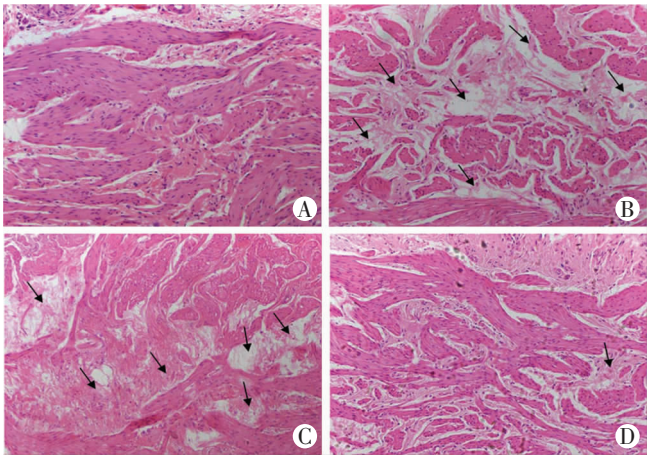
2.3 HE 染色观察组织学变化

显微镜下观察各组大鼠膀胱冰冻切片的 HE 染色发现，正常对照组平滑肌完整，排列整齐(图3A)；低温损伤不仅能破坏逼尿肌，导致肌肉结构破坏，排列紊乱，胶原化，而且能促进平滑肌细胞的凋亡(图3B)；在膀胱肌肉层内注射骨髓间充质干细胞能一定程度上修复逼尿肌损伤，促进平滑肌再生(图3D)；而生理盐水注射组与损伤组比较无明显改变(图3C)。

2.4 平滑肌收缩相关分子在蛋白水平和 mRNA 水平表达的差异

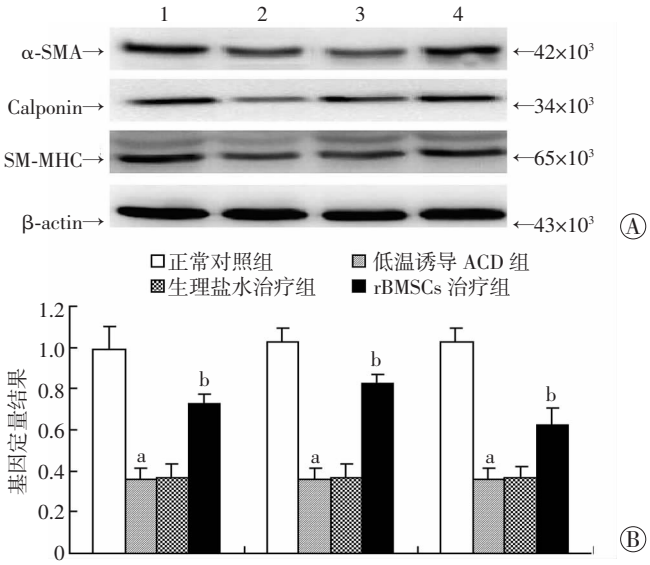
在低温损伤诱导的逼尿肌无力大鼠模型中，平滑肌收缩相关蛋白 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 的表达明显低于正常对照组，注射骨髓间充质干细胞后，平滑肌收缩相关蛋白的表达明显升高，而生理盐水注射组无明显变化(图4A)。通过 RT-PCR 检测平滑肌收缩

相关蛋白在 mRNA 水平的表达情况，发现与蛋白水平的表达一致（图 4B）。



A：正常对照组，膀胱壁肌肉层规则，肌束平整成条索状；B：低温诱导 ACD 组，膀胱壁肌肉层紊乱，肌束部分断裂破坏，箭头示肌肉间水肿和瘢痕化；C：生理盐水治疗组，肌束部分断裂破坏，箭头示肌肉间水肿和瘢痕化；D：rBMSCs 治疗组，膀胱壁肌肉层轻度紊乱，箭头示轻微水肿，肌肉层得到较好修复

图 3　HE 染色观察各组大鼠膀胱平滑肌细胞变化　（×200）



1：正常对照组；2：低温诱导 ACD 组；3：生理盐水治疗组；4：rBMSCs 治疗组　A：Western blot 检测结果；B：RT-PCR 检测各组 α-SMA、Calponin、SM-MHC 在 mRNA 水平的表达　a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与生理盐水治疗组比较

图 4　Western blot 和 RT-PCR 检测各组大鼠 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 在蛋白水平和 mRNA 水平的表达变化

3　讨论

逼尿肌无力是临床常见的尿道膀胱功能障碍之一，发病原因较多，治疗效果欠佳。目前关于逼尿肌无力的发病机制还不明确，主要有神经源性和肌源性两种理论[12]。本研究专注于解决肌源性逼尿肌无力的治疗，因此我们参照 Somogyi 等[12]的方法建立了低温损伤诱导的逼尿肌无力大鼠模型，发现模型大鼠逼尿肌收缩能力下降（图 2B），与该文献中检测结果类似，提示本研究中逼尿肌无力动物模型建立成功。

干细胞组织工程是目前最有价值的研究领域之一，通过细胞治疗来恢复受损的组织、器官已经逐渐成为可能。人脐带间充质干细胞[14]、子宫内膜干细胞[15]和尿源性干细胞[15-16]能被用于组织工程膀胱的制作和膀胱损伤的修复。因此，干细胞治疗将有可能替代目前的传统治疗，用于改善逼尿肌无力。Lee 等[10]研究发现，将人肌肉来源的干细胞注射入大鼠膀胱壁后，能显著改善冻伤所致的逼尿肌肌条收缩力的下降。但是，在临床应用上，肌肉来源干细胞的获取不仅有创，还面临一定的伦理学限制。骨髓间充质干细胞具有分化为多种膀胱细胞的能力，且获取相对容易[17]。目前，国内外尚无骨髓间充质干细胞是否能改善逼尿肌无力的相关研究报道。本研究探讨大鼠骨髓间充质干细胞膀胱壁注射法是否能改善大鼠逼尿肌无力。本研究发现，在低温损伤诱导的逼尿肌无力大鼠模型的膀胱壁内注入大鼠骨髓间充质干细胞后，排尿时膀胱内压和逼尿肌肌条收缩振幅、频率明显增加，膀胱的排尿功能和逼尿肌的收缩能力得到明显改善，提示大鼠骨髓间充质干细胞通过膀胱壁注射可明显改善冻伤所致的大鼠逼尿肌无力。这与 Lee 等[10]的研究结果类似。同时，本研究包含了在体的膀胱测压实验结果，因此得出的结论较 Lee 等[10]的更为可靠。

本研究还发现，大鼠骨髓间充质干细胞通过膀胱壁注射可明显提升冻伤膀胱壁内平滑肌收缩相关蛋白（α-SMA、Calponin and SM-MHC）的表达，提示骨髓间充质干细胞分化为平滑肌细胞可能是骨髓间充质干细胞膀胱壁注射改善冻伤所致逼尿肌无力的机制之一[17]。我们的研究目前仅仅局限于动物研究，对于是否适用于患者治疗仍然需要进行认真的评价和进一步研究。越来越多的研究表明，将骨髓间充质干细胞注入受损的膀胱壁后，能够分化为膀胱修复的支架和细胞[14, 18]。通过相应的生物学支架和相关因子，能促进

骨髓间充质干细胞的归巢和生长[13]。但骨髓间充质干细胞分化为膀胱逼尿肌细胞的具体机制仍需后续深入研究。

参考文献：

[1] McInerney P D, Robinson L Q, Weston P M, *et al*. Assessment of the poorly contractile or acontractile bladder in the older male in the absence of neuropathy[J]. Br J Urol, 1990, 65(2): 161 – 163.

[2] Sakakibara R, Hamano S, Uchiyama T, *et al*. Do BPH patients have neurogenic detrusor dysfunction? A uro-neurological assessment[J]. Urol Int, 2005,74(1): 44 – 50.

[3] Kim S Y, Kwon H C, Hyun J K. Detrusor overactivity in patients with cauda equina syndrome[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(16): E955 – E961.

[4] Twiss C, Rodriguez L V. Female stress urinary incontinence--where are we? [J]. J Urol, 2008, 179(5): 1664 – 1665.

[5] Leippold T, Reitz A, Schurch B. Botulinum toxin as a new therapy option for voiding disorders: current state of the art [J]. Eur Urol, 2003, 44(2): 165 – 174.

[6] Riedl C R, Stephen R L, Daha L K, *et al*. Electromotive administration of intravesical bethanechol and the clinical impact on acontractile detrusor management: introduction of a new test[J]. J Urol, 2000, 164(6): 2108 – 2111.

[7] Stenzl A, Ninkovic M. Restoring voluntary urinary voiding using a latissimus dorsi muscle free flap for bladder reconstruction[J]. Microsurgery, 2001, 21(6): 235 – 240.

[8] van-Koeveringe G, Rademakers K, Stenzl A. Latissimus dorsi detrusor myoplasty to restore voiding in patients with an acontractile bladder - fact or fiction? [J]. Curr Urol Rep, 2013, 14(5): 426 – 434.

[9] Talab S S, Kajbafzadeh A M, Elmi A, *et al*. Bladder reconstruction using scaffold-less autologous smooth muscle cell sheet engineering: early histological outcomes for autoaugmentation cystoplasty[J]. BJU Int, 2014, 114(6): 937 – 945.

[10] Lee J Y, Piao S, Kim I G, *et al*. Effect of human muscle-derived stem cells on cryoinjured mouse bladder contractility [J]. Urology, 2012, 80(1): 224. e7 – 224. e11.

[11] Yang J D, Cheng-Huang, Wang J C, *et al*. The isolation and cultivation of bone marrow stem cells and evaluation of differences for neural-like cells differentiation under the induction with neurotrophic factors [J]. Cytotechnology, 2014, 66(6): 1007 – 1019.

[12] Somogyi G T, Yokoyama T, Szell E A, *et al*. Effect of cryoinjury on the contractile parameters of bladder strips: a model of impaired detrusor contractility[J]. Brain Res Bull, 2002, 59(1): 23 – 28.

[13] Bury M I, Fuller N J, Meisner J W, *et al*. The promotion of functional urinary bladder regeneration using anti-inflammatory nanofibers[J]. Biomaterials, 2014, 35(34): 9311 – 9321.

[14] Yuan H, Zhuang Y, Xiong J, *et al*. Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80959.

[15] Shoae-Hassani A, Sharif S, Seifalian A M, *et al*. Endometrial stem cell differentiation into smooth muscle cell: a novel approach for bladder tissue engineering in women[J]. BJU Int, 2013, 112(6): 854 – 863.

[16] Qin D, Long T, Deng J, *et al*. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(3): 69.

[17] Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, *et al*. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(5): 1769 – 1779.

[18] Roelofs L A, Kortmann B B, Oosterwijk E, *et al*. Tissue engineering of diseased bladder using a collagen scaffold in a bladder exstrophy model[J]. BJU Int, 2014, 114(3): 447 – 457.

（收稿：2014-12-03；修回：2015-01-16）

（编辑　龙　亮）