开阴道壁，暴露膀胱颈，使用特制穿刺针用一对单线将膀胱颈旁组织悬吊在腹直肌鞘。与开放手术相比，Stamey手术创伤小、操作简便，因此这种术式已被广泛应用。但该术式最大缺陷为软组织间悬吊及点状悬吊，缺乏稳定的支持，缝线张力不能保持恒定，悬吊后膀胱颈成角，导致术后腹压增加时缝线张力过高引发对组织的切割及断线，影响远期手术效果。1987年Gittes等[4]对Stamey法长针膀胱颈悬吊术进行改良，提出阴道壁不切开的术式，但仍然是借助软组织间悬吊及点状悬吊，缺乏稳定的支持，缝线张力不能保持恒定。Vesica经皮悬吊术治疗女性压力性尿失禁是一种微创的手术方式[5]，通过骨钉使悬吊线固定耻骨节结上，为缝线提供了固定支点，悬吊线张力恒定，避免了缝线断裂及缝线对组织的切割；采用“Z”形悬吊，将阴道壁及耻骨膀胱韧带悬吊在一起，悬吊面积宽阔而不影响血运，提高了控尿能力；应用膀胱尿道镜监视，保证了手术安全；将悬吊线通过余量器结扎，使悬吊程度相对量化，防止了膀胱颈过度纠正及出口梗阻，便于掌握。由上述可以看出：Vesica经皮悬吊术治疗女性压力性尿失禁汇总了既往许多术式中优点，手术简单创伤小、稳定性好、可靠性强、并发症少。Appell等[6]报道71例患者应用本术式治疗，随访12个月治愈率94%，1例耻骨后脓肿，1例皮肤窦道，4例患者短期尿潴留。本组10例患者，2例短期尿潴留，再次导尿至10 d后正常排尿。1例患者出现耻骨联合及耻骨上区隐痛不适，半月后自行缓解，未见其它并发症。故Vesica经皮膀胱颈悬吊术治疗女性压力性尿失禁，是一种值得推广的微创、安全、操作易掌握、效果满意的手术。

关键词：尿失禁；Vesica经皮；膀胱颈悬吊术
中图法分类号：R694.540.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] Meyer S, Dhenin T, Schmidt N, *et al*. Subjective and Objective effects of intravaginal eletrical myostimulation and biofeedback in patients with genuine stress urinary incontinence[J]. Br J Urol, 1992, 69(6): 584-588.
[2] Pereyra A J. A simplified surgical procedure for the correction of stress incontincnce in women[J]. West J Surg, 1959, 67(4): 223-226.
[3] Stamey T A. Endoscopic suspension of the vesical neck for urinary incontinence[J]. Surfg Gynec Obst, 1973, 136(4): 547-554.
[4] Gittes R F, Loughlin K R. No-incision pubovaginal suspension for stress incontinence[J]. J Urol, 1987, 138(3): 568-570.
[5] 那彦群，李建兴，潘柏年，等. Vesica经皮膀胱颈悬吊治疗女性压力性尿失禁[J]. 中华泌尿外科杂志，1999，20(11)：686-688.
[6] Appell R A, Rackley R R, Dmochowski R R, *et al*. Vesica percutaneous bladder neck stabilization[J]. J Endourol, 1996, 10(3): 221-225.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2004)19-1775-03

技术方法

几种培养方法对ES/GFP小鼠胚胎干细胞系增殖和分化能力作用比较

Comparison of methods for culturing mouse embryonic stem cell line ES/GFP and its effect on cell proliferation and differentiation

曹 娟[1]，徐海伟[1]，唐 军[1]，范晓棠[2]，吴 旋[1]（第三军医大学基础医学部：[1]生理学教研室，[2]神经生物学教研室，重庆市神经科学研究所，重庆 400038）

提 要：目的 观察采用不同的饲养层和培养基对永久表达绿色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞系ES/GFP的增殖、分化和绿色荧光蛋白表达的影响。方法 分别采用小鼠胚胎成纤维细胞和人胚胎成纤维细胞为饲养层，采用含重组人白血病抑制因子的DMEM/FCS培养基和Buffalo条件培养基培养ES/GFP细胞系。N_2无血清培养基诱导ES/GFP小鼠胚胎干细胞为神经前体细胞，Nestin免疫组化染色。结果 小鼠胚胎成纤维细胞和人胚胎成纤维细胞为饲养层，常规LIF培养液和Buffalo条件培养基均能较好维持ES/GFP细胞的高增殖能力和全能分化能力，对绿色荧光蛋白的表达和胚体形成、神经前体细胞的分化无明显差异。结论 人胚胎成纤维细胞可替代小鼠胚胎成纤维细胞作为ES/GFP饲养层，减少饲养层制备的工作量和污染的机会。Buffalo条件培养基可完全替代LIF培养基，降低细胞培养的成本。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39900169、30070727、30100087)，全军医学科研“十五”计划青年基金资助项目(01Q099)，重庆市应用基础基金资助项目(2001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39900169, 30070727, 30100087), the “Tenth Five-year Plan” for Sci & Tech Research of PLA (01Q099), and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2001)

作者简介：曹 娟(1976-)，女，重庆市江津人，助理实验师，主要从事胚胎干细胞的培养和诱导方面的研究。电话：(023)68752890
通信作者：徐海伟，电话：(023)68752254，E-mail：haiweixu2001@yahoo.com.cn

收稿日期：2003-04-23；修回日期：2004-02-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是从着床前胚胎(孕3~5 d)的内细胞群(inner cell mass, ICM)分离得到的,能在体外培养的一种高度未分化的细胞。近年来对ES细胞向神经细胞、造血细胞、心肌细胞等定向诱导分化的研究[1],为难治性血液系统疾病和神经变性疾病等提供了组织、器官移植的原材料。同时ES细胞在药物的开发利用、遗传性疾病的防治以及基因的筛选和功能研究等方面展示了广阔的应用前景。ES细胞的体外培养是进行上述各项研究的前提与基础。由于多向分化潜能是ES细胞的主要特性之一,体外培养条件的轻微变化就可能导致分化机制的启动。因此ES细胞体外培养条件非常严格,在维持细胞分裂增殖的同时必须抑制其分化倾向,才能保持ES细胞的分化全能性。常用的方法是用小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)作饲养层进行体外培养,在培养基中加入白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)抑制ES细胞的分化[2~4]。但MEF饲养层制备比较繁琐,可使用代数少,加大了ES培养的工作量,同时也增加了污染的机会。常规含LIF的ES培养基虽然能够较好维持ES细胞的未分化状态,但LIF很昂贵,在ES培养中使用量较大,增加了ES培养的成本。本实验尝试用人胚胎成纤维细胞(human embryonic fibroblast, HEF)替代小鼠胚胎成纤维细胞作为ES培养的饲养层,用大鼠Buffalo条件培养基[5]替代传统的LIF培养基,观察对永久表达绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的小鼠ES细胞系ES/GFP增殖、分化和绿色荧光表达的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

永久表达绿色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞系ES/GFP细胞、Buffalo大鼠肝癌细胞株,购自北大生命科学院。人胚胎成纤维细胞株,中山医科大学附属第一医院生殖医学中心李晓红博士惠赠。DMEM(高糖)、谷氨酰胺2 mmol/L、N_2 supplement(GIBCO提供),优质胎牛血清(Hyclone提供),β巯基乙醇、丝裂霉素、纤维连接蛋白、多聚鸟氨酸(Sigma提供),重组人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, hLIF)(Chemicon提供),Nestin抗体(Pharmergen),二抗和三抗(Zymed提供)。

1.2 方法

1.2.1 BRL(buffalo rat liver)条件培养基的制备 把大鼠肝癌细胞种植于T25细胞培养瓶中,用不含hLIF的ES细胞培养液培养3 d后(中间不更换培养液),将培养液离心(2 000 r/min, 20 min),过滤。按3∶7比例加入3份不含hLIF的ES细胞培养液,并补加适量胎牛血清、谷氨酰胺,制成BRL条件培养基。

1.2.2 MEF饲养层的制备 取13.5 d昆明小鼠胚胎去除头、四肢和内脏,PBS冲洗,将组织块剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小的碎块,再用PBS洗两次,0.25%胰蛋白酶消化,加等量饲养层细胞培养液中和,室温下静置10 min,取上层细胞悬液离心。接种于T25培养瓶内培养,加入饲养层细胞培养液,每天换液1次,2~3 d传代1次,3~5代的MEF可用作饲养层。使用前用丝裂霉素10 mg/L处理60 min使饲养层细胞失去增殖能力。

1.2.3 HEF饲养层的制备 冻存的HEF细胞一支快速复苏后加入8倍体积的DMEM培养液,离心弃上清,加入含7.5% FCS的DMEM培养基中,培养方法同上,12~30代的MEF均可用作ES细胞的饲养层。使用前用丝裂霉素10 mg/L处理160 min。

1.2.4 ES/GFP细胞的培养及分组 将储存于液氮中的ES/GFP细胞株取出快速复苏后加入ES细胞培养基,离心(1 000 r/min, 10 min)。接种到已制备好的饲养层上,每天换液1次,1~2 d传代1次。ES/GFP细胞培养的分组情况:包括用HEF和MEF做饲养层两组,每组中又包括ES细胞培养基和BRL条件培养基两组。

1.2.5 细菌培养皿培养胚体及胚体的贴壁 将培养的ES/GFP细胞用胰酶/EDTA消化,吹打成单细胞悬液后以1.5×10^5/个培养皿的细胞密度加入细菌培养皿(直径7 cm),培养于含10% FCS, 100 μmol/L β-巯基乙醇的DMEM培养基中,37 ℃,5% CO_2培养。将第4天的胚体转入经纤维连接蛋白预处理的6孔板中,在DMEM-10% FCS中培养24 h以使其贴壁。然后换成含N-2 supplement、纤维连接蛋白(5 μg/ml)的DMEM/F12培养液,每2天换液1次。

1.2.6 免疫组化 用4%多聚甲醛固定细胞10 min, 0.2% Triton X-100处理10 min, 5%正常羊血清封闭10 min, 用0.3% H_2O_2封闭内源性过氧化物酶10 min,加入nestin一抗(1∶100)室温1 h, 4 ℃过夜,用PBS漂洗后,其余步骤按ABC方法常规操作。

2 结果

2.1 MEF和HEF作为饲养层培养ES/GFP比较

MEF细胞为短纤维样,1~2代杂细胞多,5代以后生长缓慢,丝裂霉素处理时间短,处理过的细胞可存活2~3周。HEF细胞形态为纤维样、细长、排列规则,7~30代生长旺盛,丝裂霉素处理时间长,处理过的细胞可存活3~4周。ES细胞在MEF的饲养层上培养呈集落突起状生长,集落呈发亮的卵圆形或椭圆形,集落边缘清晰、光滑,细胞体积小排列紧密,细胞之间界限不清,生长旺盛,荧光显微镜下可见ES细胞克隆发出绿色荧光,而周围的饲养层细胞不发光。ES细胞在HEF饲养层上培养呈集落突起状生长,集落呈发亮的梭形,克隆边缘清晰、光滑,细胞体积小排列紧密,细胞之间界限不清,生长旺盛,荧光显微镜下可见ES细胞克隆发出绿色荧光。

2.2 含LIF的ES培养液和BRL条件培养基对ES/GFP的增殖和分化的作用

含LIF的ES培养液和BRL条件培养基中ES/GFP都能快速增殖,细胞克隆形态典型,边缘整齐,呈未分化状态,克隆均

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能发出绿色荧光。同样大小视野中 ES/GFP 克隆数无明显差异。在 ES 培养液和 BRL 条件培养基中培养的 ES/GFP 克隆接种到细菌培养皿后均能形成发绿色荧光的胚体, 同样体积的培养液中胚体数无明显差异。

2.3　不同培养方法培养的 ES/GFP 分化为 NPCs 能力比较

不同培养方法培养 ES/GFP 形成的胚体贴壁后, 胚体边缘部位的细胞为单层上皮样形态, 中心部位为多层细胞。更换成无血清 N_2 选择性培养基后培养 24 h, 多层细胞覆盖的部位大多变为单层, 单层细胞死亡不明显, 贴壁细胞形态无变化。72 h 后观察, 存活的细胞形态多数为细长形, 无上皮样形态的细胞存在, 荧光显微镜下可见发绿色荧光的有多个突起的细胞。取第 5 天的细胞作 Nestin 免疫组化染色, 86%的细胞为阳性细胞, 阳性细胞形态以细长形居多, 有少数呈三角形和不规则形, 细长和三角形细胞着色最深, 多角形片状细胞染色较浅, 对照完全不着色。不同的饲养层和培养基对最终得到的 NPCs 数目无明显差异。

3　讨论

ES 细胞培养主要采用饲养层培养, 它是一种常规稳定的 ES 细胞培养方式。小鼠原代胚胎成纤维细胞是从 13～15 d 胎龄的小鼠中分离得到, 一般在分离后传 2 代以去除杂细胞。作为在 ES 细胞建系、扩增培养中最为常用的饲养层, 小鼠原代胚胎成纤维细胞提取较为简单, 但作为饲养层使用时间短, 一般传了 5 代以后, MEF 的增殖能力大为下降, 已不宜作为饲养层, 且丝裂霉素处理后存活时间短, 故需经常制备, 但 HEF 的使用消除了异种蛋白污染的可能。而人胚胎成纤维细胞可长期培养, 制备 1 次可以长期使用(我们已经使用了 2 年, HEF 仍然保持良好的增殖能力), 丝裂霉素处理后存活时间长, 有利于长期体外培养[6,7], 但 HEF 的使用存在伦理学的问题, 采用建系的 HEF 可解决这一问题。

全能性是 ES 细胞最主要的特征, 要保持 ES 细胞的全能性就必须在维持细胞分裂增殖的同时抑制其分化倾向。目前最长使用的是含 LIF 的培养液, 而购买 LIF 比较昂贵, 不利于 ES 细胞的大量扩增。BRL 条件培养基中含有较高浓度的 LIF, 完全可以替代常规的 LIF 的培养液, 能保持 ES 细胞的未分化状态和无限增殖能力。大鼠肝癌细胞存活容易, 生长迅速, 无限增殖, 可源源不断地提供 BRL 条件培养基。

永久表达绿色荧光蛋白的 ES 细胞系在研究 ES 细胞的分化、细胞移植中具有广阔的应用前景[8]。由于经 ES 细胞诱导而来的神经前体细胞脑内移植后存在迁移, 如将神经前体细胞注射到正常成年小鼠的侧脑室, NPCs 一般先迁移到室下区, 然后沿着特定的路径迁移到嗅球[9]。如何追踪移植的 NPCs 并观察其分化状态成为细胞移植中最常见的问题。采用基因转染将 GFP 整合入 ES 细胞系的染色体使其永久表达绿色荧光, 而后将其诱导为发绿色荧光的 NPCs 进行移植, 利用绿色荧光标记及神经元和胶质细胞特异性细胞标记(如β-tubulin 和 GFAP)的免疫双荧光染色可以较为方便地追踪和分析抑制细胞的迁移和分化。

关键词: 胚胎干细胞; 神经前体细胞; 细胞分化; 白血病抑制因子; 小鼠

中图法分类号: R329.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Thomson J A, Itskovitz Eldor J, Shapiro S S, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145－1147.

[2] 吴　旋, 黎海蒂, 李树浓, 等. 小鼠胚胎干细胞体外分化为神经前体细胞的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(11): 1260－1263.

[3] 唐仕波, 邱观婷, 黄　冰. 胚胎干细胞向神经细胞诱导分化的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(12): 936－938.

[4] 都同功, 黄　冰, 钟女奇, 等. 不同条件下培养小鼠胚胎干细胞[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(2): 190－192.

[5] 葛　坚, 郭　彦, 王智崇, 等. 体外诱导胚胎干细胞定向分化为神经细胞的初步研究[J]. 解剖学报, 2001, 32(4): 302－304.

[6] 徐海伟, 吴　旋, 黎海蒂, 等. 纤维连接蛋白在小鼠胚胎干细胞诱导为神经前体细胞中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(3): 197－200.

[7] 吴　旋, 徐海伟, 黎海蒂, 等. AANAT 基因工程化 ES 细胞减少 APP 高表达 PC12 细胞 Aβ 的分泌[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(3): 209－211.

[8] Rolletschek A, Chang H, Guan K, *et al*. Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors[J]. Mech Dev, 2001, 105: 93－104.

[9] Englund U, Bjorklund A, Wictorin K. Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 134(1－2): 123－141.

（编辑　张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net