DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.028
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
256 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0256-03

采用组织工程技术建造人工膀胱组织的实验研究

侯卫平[1],叶本兰[2],王常勇[3],郭希民[3],赵 强[3] (第三军医大学:[1]新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037;[3]基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]军事医学科学院基础医学研究所,北京 100039)

提 要:目的 通过将扩增的膀胱种子细胞与一定形状聚合材料复合后植入裸鼠体内进行培育,尝试采用组织工程技术建造人造膀胱组织的可行性。方法 从幼兔取膀胱,机械分离与酶消化获取上皮细胞和平滑肌细胞,在体外培养并扩增细胞,之后将上皮细胞和平滑肌细胞分别接种到聚合材料的内外表面,将其植入到裸鼠体内进行培育。对植入术后4、8周的标本取材,进行大体、组织学观察及免疫组化检测。结果 培育的细胞材料复合体的内壁可形成数层移行上皮细胞层,外壁由数层平滑肌细胞层构成。随着聚合材料的降解,移行上皮细胞与平滑肌细胞不断增殖并达汇合。结论 采用组织工程技术可再造出类似于正常膀胱壁的人造膀胱组织。

关键词:组织工程;膀胱;细胞培养;聚合物
中图法分类号:R318.16;R322.62 文献标识码:A

Reconstruction of bladder tissue using tissue-engineering technique

HOU Wei-ping[1], YE Ben-lan[2], WANG Chang-yong[3], GUO Xi-min[2], ZHAO Qiang[2] ([1] Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2] Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3] Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of reconstruction of artificial bladder tissue using the expanded bladder cells seeded onto both sides of a synthetic PLGA polymer and cultured in the nude mice by tissue-engineering technique. Methods The urothelial cells and smooth muscle cells were obtained from young rabbits by mechanical isolation and enzyme digestion method. *In vitro* cultured and expanded smooth muscle cells and urothelial cells were seeded onto the outer and inner surfaces of each polymer. Then, the constructs were implanted into the subcutaneous pockets of athymic mice. At 4 and 8 weeks after implantation, the specimens were harvested and examined macroscopically, histologically, and immunohistochemically. Results The polymer was covered with urothelial cells inside and smooth muscle cells outside. As polymer degradation was in progress, the urothelial cells and the smooth muscle cells kept proliferation and converged. Conclusion Artificial bladder tissue reconstructed by tissue-engineering technique has the similar properties to those of the normal bladder wall. This study has laid solid foundation for further studies of tissue-engineering bladder.

Key words: tissue-engineering; bladder; polymer; cell culture

近年来,随着组织工程研究的兴起和发展,科研人员尝试应用组织工程的技术方法进行膀胱的外科重建术。组织工程学是一门跨学科的新领域,它是应用工程学和生命科学的基本原理试图建造能够用于重建、维持或提高缺损组织功能的生物性人体组织[1]。目前已有皮肤、血管、心脏瓣膜等研究成功的报道。国外研究人员在移行上皮种子细胞培养扩增取得成功之后,其膀胱组织工程研究获得了突破性进展[2,3]。而国内膀胱组织工程研究刚刚起步,我们采用组织工程的技术,首次尝试将培养扩增的膀胱移行上皮细胞及平滑肌细胞与国内研制的可降解聚合材料构建并经体内培育,观测其可否培育成在解剖组织学上接近于正常膀胱壁的人造组织。从而为组织工程化膀胱的进一步实验研究奠定坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

1.1.1 实验材料:①PLGA三维多孔泡沫材料由中国科学院化学所研制并提供,其孔径250~350 μm,孔隙率为90%,^{60}Co消毒后备用。根据接种细胞需要,支架材料被塑成椭圆形囊状。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170256)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170256)
作者简介:侯卫平(1973-),男,山西省五寨县人,硕士研究生,医师,主要从事肾脏生理及膀胱组织工程方面的实验研究。电话:(023)68774621
收稿日期:2003-03-21;修回日期:2003-05-30

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

②角阮细胞培养基、DMEM 培养基及新生牛血清(Gibco, USA)、胰酶与Ⅰ型胶原酶(Pharmacia, USA)、抗上皮细胞角蛋白单抗与抗平滑肌 α-肌动蛋白单抗(Doke, USA)。③新西兰幼兔, 由军事医学科学院实验动物中心提供。雌性裸鼠, 购于中国生物制品检定所。

1.1.2　实验设备　　细胞培养设备: CO_2 孵箱(HerausBB5060 型), 倒置显微镜(OLympus), Cytodex-3 微载体(Pharmacia, USA), 旋转生物反应器(Synthecon, USA)。

1.2　方法

1.2.1　膀胱移行上皮种子细胞的原代培养与扩增　　从幼兔获取膀胱, 显微分离膀胱上皮细胞层及平滑肌细胞层, 将分离的上皮细胞层及平滑肌细胞层剪成约 1 mm× 1 mm× 1 mm 大小的组织小块。上皮组织小块采用 0.125% 胰酶和 0.01% EDTA 混合液消化, 平滑肌细胞组织小块置入新鲜配制 0.2% Ⅰ型胶原酶的消化液中, 显微镜下观察消化的游离细胞情况并适时终止消化, 分别收集细胞悬液并离心, 用添加有 50 μg/ml 的牛垂体提取物和 5 ng/ml 的表皮细胞生长因子的角阮细胞培养基培养移行上皮细胞。用含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基培养平滑肌细胞。每代细胞培养生长至 80% ~90% 汇合时即可传代培养。

1.2.2　膀胱平滑肌细胞的微载体培养　　第 2 代平滑肌细胞达到 90% 汇合时, 胰酶消化并收集细胞, 进一步采用微载体在旋转生物反应器内进行平滑肌细胞的扩增培养[4]。即将 0.5 g 预处理的 Cytodex-3 微载体与收集的平滑肌细胞加入到盛有 DMEM 培养基的旋转生物反应器(RCCS)内, RCCS 容器初始旋转速度为 10 r/min, 12 h 后以 30 r/min 持续搅拌, 整个装置置于 37 ℃COS2 孵箱内进行培养。

1.2.3　膀胱种子细胞鉴定、收集并与聚合材料的复合　　取生长稳定期的种子细胞接种到无菌盖玻片上制作细胞爬片, 之后进行免疫组化染色, 抗角蛋白单克隆抗体鉴定移行上皮细胞, 抗平滑肌 α-肌动蛋白单克隆抗体鉴定平滑肌细胞。

首先用酶消化法收集在微载体上培养扩增的平滑肌细胞, 并将其浓缩为 2.0× 10^7/ml 的细胞悬液, 之后在超净台内将细胞悬液接种到囊状聚合材料的外表面。24 h 后消化收集移形上皮细胞, 将其浓缩为 1.0× 10^7/ml 的细胞悬液, 之后接种到聚合材料的内表面。将细胞材料复合体置于培养皿内, 在 37 ℃的孵箱内进行培育, 待细胞贴壁后补加培养基。

1.2.4　细胞-聚合材料复合体的体内培育　　以 4~6 周龄的雌性裸鼠为植入对象, 实验分为两组, 即实验组(Ⅰ组)和对照组(Ⅱ组)。Ⅰ组(n= 12)为接种细胞的细胞材料复合体, Ⅱ组为未接种细胞的单纯聚合材料。具体步骤为: 将裸鼠麻醉后剪开其背部皮肤并分离出皮下袋。根据随机分组的原则, 分别将实验组和对照组植入到裸鼠的背部皮下, 每只裸鼠植入一个聚合材料。之后缝合皮肤, 继续饲养。

1.2.5　复合体体内培育产物的检测　　植入术后 4、8 周, 分别处死裸鼠, 打开背部皮肤, 首先进行大体观察, 之后将培育的复合体与裸鼠的皮肤和周围组织分离, 取出标本立即投入 10% 甲醛固定液固定, 之后行石蜡包埋、切片, 进行 HE 染色及马森氏染色。同时应用免疫组化染色(S-P 法), 一抗分别为抗平滑肌 α-肌动蛋白单克隆抗体与抗角蛋白单克隆抗体(以1∶50稀释)。

2　结果

2.1　大体观察

术后裸鼠背部伤口愈合良好, 饮食活动正常。术后 4 周时见Ⅰ组复合体内外表面已有组织形成, 而中间聚合材料层已降解变薄, 8 周时, 肉眼已分不清内外壁再生组织与材料之间的界线。与Ⅰ组相比, Ⅱ组移植物的内外表面在 4、8 周时均无组织形成, 4 周时聚合支架材料已出现明显的降解, 至第 8 周, 聚合材料大部分被吸收, 移植区仅见少量残留的聚合物碎片。

2.2　组织学观察

植入术后 4 周, Ⅰ组植入物经 HE 染色, 可见聚合材料上内侧已增生多层上皮细胞层, 外层细胞为多层的梭状细胞层, 见图 1。植入后 8 周, Ⅰ组经马森氏染色, 可见材料外壁细胞层胞浆染为红色, 胞核为黑色, 表面包饶的成纤维细胞为蓝色。在材料内部, 红染的平滑肌细胞与上皮细胞已汇合, 混杂少数蓝染成纤维细胞, 见图 2。Ⅱ组苏木精-伊红染色, 植入物外壁见少量炎细胞浸润, 内壁无细胞生长。马森染色见少数蓝染的成纤维细胞浸润, 无红染细胞。



图 1　复合体经体内培育 4 周后, 材料外壁的平滑肌细胞层(HE× 33)

Fig 1　Smooth muscle cells covered the outside of polymer at 4 weeks after culture (HE× 33)

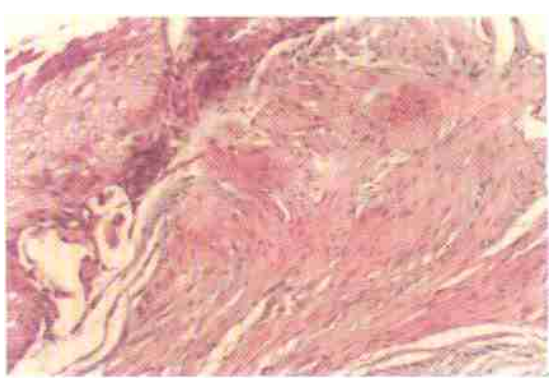


图 2　复合体经体内培育 8 周后, 移行上皮与平滑肌组织相汇合(马森染色×33)

Fig 2　Urothelial cells converged with the smooth muscle cells at 8 weeks after culture (Masson Stain× 33)

2.3　免疫组化观察

在术后 4 周时, Ⅰ组复合体的内壁细胞层抗角蛋白单克隆

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

(AE1/AE3)免疫组化染色阳性,外壁细胞层抗平滑肌 α-肌动蛋白免疫组化染色阳性,至第 8 周,可见两种细胞在材料内部已达汇合。Ⅱ组移植物在术后各时间点均未见两种抗体免疫组化染色阳性的细胞。

3 讨论

组织工程学最基本的思路是在体外分离、培养细胞,将一定数量的细胞接种到具有一定空间结构的支架上,通过细胞之间的相互粘附、生长繁殖、分泌细胞外基质,从而形成具有一定结构和功能的组织或器官[5]。组织工程研究是未来医学由替换向重建发展的重要手段之一。膀胱组织工程研究在国外已开展了近 10 年,并取得很大的进展,他们已成功地再造了组织工程化的人造组织并修复重建了动物缺损的膀胱、输尿管,使其维持了正常的生理功能[2,3]。

没有适当的支架材料,移植细胞就会流失死亡,目前国外应用于膀胱组织工程研究的主要支架材料为聚酯类材料,如聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)以及两者的共聚物(PLGA)[6]。近年来,国内聚合物支架材料研究进展较快,已经能够研制出生物相容性较好的聚酯类材料。本研究所选用国产的聚乙交酯丙交酯(PLGA)泡沫材料,该材料具有较好的生物相容性和生物降解性,孔隙率较高,孔径大小适合细胞长入,孔度均匀,体内完全降解时间在 2 个月左右。

本研究将培养扩增后的膀胱移形上皮细胞与平滑肌细胞分别接种到预制为囊状的聚合材料内外表面,在动物体内进行培育,实验结果表明,细胞支架复合物的内外壁可分别增殖形成移行上皮细胞层与平滑肌细胞层。随着培育时间的延长,支架材料逐渐降解,两种细胞层最终在材料内部汇合,最后成功地再造出类似膀胱壁样组织。再造人工膀胱组织的形成与材料的形状、细胞接种浓度、支架材料降解速度以及复合体体内、外培育环境密切相关。本实验初步摸索了人造膀胱组织构建与培育的基本条件。结果展示了以国产 PLGA 材料为支架,可进行人造膀胱组织的初步构建与培育,从而为膀胱组织工程的进一步研究奠定了坚实的基础。

参考文献:

[1] Atala A. Autologous cell transplantation for urologic reconstruction[J]. J Urol, 1998, 159(1): 2—3.

[2] Yoo J J, Satar N, Atala A. Ureteral replacement using biodegradable polymer scaffolds seeded with urothelia and smooth muscle cells[J]. J Urol, 1995, 53(Suppl): A375.

[3] Oberpenning F, Meng J, Yoo J J. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(2): 149—155.

[4] 侯卫平,郭希民,叶本兰,等. 平滑肌细胞在旋转生物反应器内的微载体培养与快速扩增[J]. 基础医学与临床, 2002, 22(4): 378—382.

[5] Cima L G, Vacanti J P, Vacanti C, *et al*. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates[J]. J Biomech Eng, 1991, 113(2): 143—151.

[6] Bergsma J E, Rozema F R, Jong W H, *et al*. Biocompatibility and degradation mechanism of predegrade and nondegraded poly(lactide) implant: An animal study[J]. Mater Med, 1995, 16(4): 715—724.

(编辑 薛国文)

(上接 255 页)

疗效分析:①年龄与疗效的关系:1~20 岁 34 例中残及良好 26 例;21~40 岁 65 例,中残及良好 29 例,40 岁以上 25 例,中残及良好 12。1~20 岁组与其它两组比较,$P<0.05$。②治疗开始时间与疗效的关系:伤后<1 周治疗 42 例,中残及良好 28 例,1 至 2 周治疗,58 例,中残及良好 29 例,>2 周治疗 33 例,中残及良好 10 例。第 1 组分别与其它两组比较,二者之间有显著意义,$P<0.05$。③疗程与疗效的关系:治疗 1 个疗程 38 例,中残及良好 16 例,2 个疗程 65 例,中残及良好 38 例,3 个疗程以上 21 例,中残及良好 13 例。1 疗程分别与 2、3 疗程比较,$P<0.05$,2、3 疗程之间差异不显著。④病情严重程度:GCS3~5 分:36 例,中残及良好 11 例,GCS 6~8 分:88 例,中残及良好 56 例,$P<0.05$。⑤手术与否:手术 93 例,中残及良好 53 例,未手术 31,中残及良好 14 例,$P<0.05$。

3 讨论

本组研究结果显示患者年龄轻组治疗效果好于年龄大组,与其它方法的疗效相一致,因为年轻人器官功能较好,机体抵抗力及再生能力较高。治疗早疗效更高,与高压氧治疗的机理有关,高压氧仅对受到缺血、缺氧损害存在功能障碍但仍未死亡的"半暗区"神经组织有治疗作用,对受到严重损害,已经死亡的神经组织则无效[1,2],因此伤后早期治疗,挽救缺血、缺氧神经组织对改善预后十分关键。但伤后 3 d 内治疗易诱发活动性出血,因此应在 3 d 后行高压氧治疗。治疗时间长者好于治疗时间短者,但大于 2 个疗程则治疗效果增加不明显。行手术治疗组好于未行手术治疗组,可能与手术清除颅内血肿,减轻颅内压,从而一定程度上阻断缺血、缺氧及脑水肿之恶性循环有关。综合上述,我们认为,高压氧是一种治疗重型颅脑外伤非常有效的治疗手段,在影响高压氧治疗效果的因素中,早期治疗是最能改善治疗效的因素。因此应在保证呼吸道通畅及生命体征平稳的条件下,尽早行高压氧治疗。

关键词:重型颅脑外伤;高压氧
中图法分类号:R651.150.596 文献标识码:B

参考文献:

[1] Bayir H, Clark R S, Kochanek P M. Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma[J]. Crit Care Med, 2003, 31(1 Suppl): S112—117.

[2] Ratzenhofer-Komenda B, Offner A, Quehenberger F, *et al*. Hemodynamic and oxygenation profiles in the early period after hyperbaric oxygen therapy: an observational study of intensive-care patients[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2003, 47(5): 554—558.

(编辑 陈聪连)

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