DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.019
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003 2009

文章编号:1000-5404(2003)22-2009-03

论著

兔膀胱移行上皮细胞构建组织工程尿道的初步研究

孙道冬[1],宋 波[1],熊恩庆[1],孙丹宁[2],金锡御[1],方 强[1],李为兵[1],王 勤[2],乔着意[2],李 靖[2],蒙明生[2],康元上[2]
([1]第三军医大学附属西南医院全军泌尿专科中心,重庆 400038;[2]中国人民解放军第324医院泌尿外科,重庆 400020)

提 要:目的 探索以膀胱移行上皮细胞为种子细胞构建组织工程尿道的可行性。方法 取兔膀胱移行上皮细胞,体外培养传代后作为种子细胞与自制胶原膜体外联合培养并行裸鼠体内移植,通过对复合物扫描电镜、HE染色及角蛋白免疫组化检测,了解细胞在材料上的生长情况。结果 2 h后移行上皮细胞在胶原膜上贴附生长,复合物移植体内20 d后,移行上皮细胞分化成层,层厚1~5层。结论 该方法获取的膀胱移行上皮细胞是构建组织工程尿道的良好种子细胞,与胶原膜构建的复合物在体内形成了尿道类似物,有望成为替代尿道的组织工程材料。

关键词:组织工程;移行上皮细胞;胶原膜
中图法分类号:R318.16;R322.63;R322.62 文献标识码:A

Preliminary study of urethra construction with rabbit bladder transitional cells by tissue engineering

SUN Dao-dong, SONG Bo, XIONG En-qing, SUN Dan-ning, JIN Xi-yu, FANG Qiang, LI Wei-bing, WANG Qin, QIAO Zuo-yi, LI Jing, MENG Min-sheng, KANG Yuan-shang (Center for Urology, No. 324th Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of using transitional cells as seeding cells to construct urethra by tissue engineering. Methods Transitional cells isolated from bladders of New Zealand rabbit were cultured as seeding cells, which were implanted on the collagen membrane for culture *in vitro*. The cell-scaffold complex was transplanted in nude mice. Scanning electron microscopy, HE staining and immunocytochemical staining of cytokeratin were used to evaluate the growth of cells on the collagen membrane. Results Transitional cells adhered to collagen membranes and grew at 2 h after implantation. On day 20 after transplantation *in vivo*, the transitional cells lined in continuous layers of 1 to 5-cell thickness at some parts of the complex. Conclusion Transitional cells isolated in this way are suitable seeding cells to construct urethra by tissue engineering. The cell-scaffold complex can form an analog of normal urethra after transplantation *in vivo*.

Key words: tissue engineering; transitional cell; collagen membrane

应用皮肤、膀胱粘膜、Teflon等自体、异体组织或人工材料,进行长段尿道缺损的修复与重建,效果难以令人满意[1,2]。构建组织工程尿道,是解决这一难题的新希望。然而,种子细胞的来源,是限制组织工程尿道研究的瓶颈问题。我们从新西兰白兔膀胱中分离培养移行上皮细胞,并将其种植到胶原膜支架上后移植裸鼠体内,通过形态学及免疫组化学观察移行上皮细胞的贴附与生长,为构建组织工程尿道提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胶原膜参照王旭等[3]方法制备。超净工作台(苏州净化设备厂),CO_2孵箱(Hilton,美国),低温真空干燥机(北京军事科学院),透射电镜(JEM-2000EX,日本),扫描电镜(MRAY1000B,美国)。DMEM/F12(1∶1)培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone公司),Ⅰ型胶原酶(SIGMA公司),EGF(第三军医大学全军复合伤研究所史春梦博士惠赠),角蛋白AE1/AE3单克隆抗体(晶美生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔膀胱移行上皮细胞的分离和培养 8~12周新西兰白兔,每次2只,雌雄不限,体质量1~1.5 kg,第三军医大学实验动物中心提供。处死后,全切膀胱,翻转外露粘膜面,加入5 ml,0.5 mg/ml的Ⅰ型胶原酶,37 ℃作用15~30 min,解剖显微镜下用手术刀片轻轻刮取粘膜表面,收集细胞,用含10%FCS、10 ng/ml EGF的DMEM/F12(1∶1)培养基再悬浮后,接种至培养瓶中,37 ℃、5%CO_2孵箱内静置培养。

1.2.2 兔膀胱移行上皮细胞在胶原膜上种植 将2~4代对数生长期细胞,经0.25%胰蛋白酶消化后,小牛血清终止。离心收集细胞,培养基再悬浮,以1×10^5/cm^2接种到胶原膜上,37 ℃、5%CO_2孵箱内静置培养。24 h后将细胞胶原膜复合物包绕

作者简介:孙道冬(1973-),男,四川省成都市人,硕士,医师,主要从事组织工程尿道、尿道重建与修复方面的研究,现在中国人民解放军第324医院泌尿外科。电话:(023)68762063
通信作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2002-08-25;修回日期:2003-09-10

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

硬膜外导管卷呈圆管状,种植细胞面向内,可吸收缝线固定,留待体内移植,见图1。

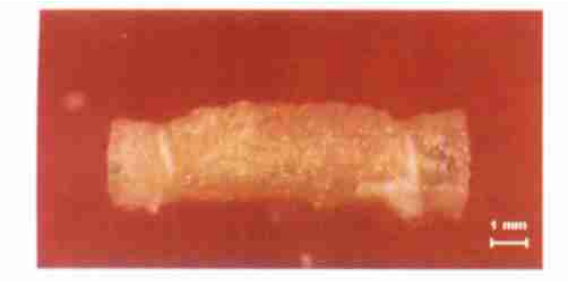


图1 待移植的组织工程尿道前体

Fig 1 The well grown tissue engineering urethra for transplantation *in vivo*

1.2.3 兔膀胱移行上皮细胞-胶原膜复合物体内移植 将20只4~6周,体质量15~20 g雄性裸小鼠(第三军医大学实验动物中心提供)随机分为4个实验组,分别为5、10、15、20 d组,设立自身对照实验。复合物和空支架分别随机埋藏在两侧背部靠头侧皮下,于移植5、10、15、20 d后,处死动物,取标本行病理学各项检查。饲养期间,严格按照无菌条件饲养,自由摄食水。

1.2.4 病理学观察 细胞种植到胶原膜上分别于2、12、24 h后以倒置显微镜和扫描电镜观察。体内移植后的兔膀胱移行上皮细胞—胶原膜复合物标本常规10%福尔马林固定、石蜡包埋、切片后,行HE染色、角蛋白AE1/AE3免疫组化染色及阳性细胞计数(200倍普通光镜下,每张切片取5个视野)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0软件,行单向方差分析。

2 结果

2.1 体外培养的兔膀胱移行上皮细胞

倒置显微镜下,兔膀胱移行上皮细胞形态呈多角型,典型的"铺路石样",核较大,细胞间连接紧密,呈贴壁生长,原代培养10~14 d后细胞生长融合,见图2。

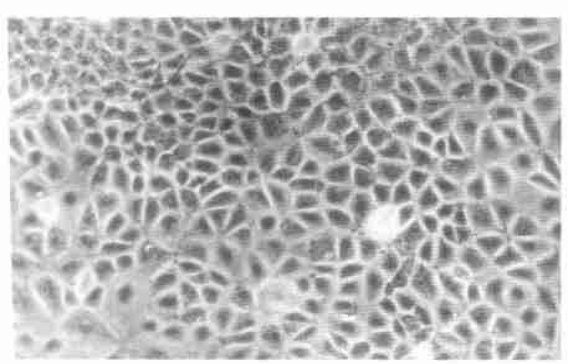


图2 体外培养的兔膀胱移行上皮细胞生长融合 (倒置显微镜×200)

Fig 2 Rabbit transitional cells growing *in vitro* (Invert microscope×200)

2.2 在胶原膜上的兔膀胱移行上皮细胞

倒置显微镜下,接种2 h后,有少数细胞开始贴附于胶原膜上,形态呈类圆形,12 h后贴附细胞数量增加,部分细胞伸展呈三角形或卵石形,24 h后贴附细胞明显伸展,数量明显增加,扫描电镜观察见细胞伸出伪足,见图3。

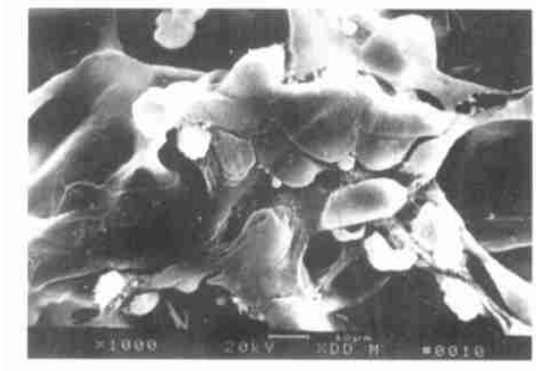


图3 扫描电镜下,移行上皮细胞在胶原膜上贴附生长 (SEM×500)

Fig 3 Transitional cells seeded onto collagen polymers (SEM×500)

2.3 移植物病理观察

随时间推移,标本与周围组织粘连增加,分离困难。切片HE染色后,光镜下可见胶原膜纤维周围细胞成分逐渐增多;支架逐渐降解部分被间质细胞充填替代;材料周围及其内部有明显的血管长入。AE1/AE3是针对多种角蛋白反应的单克隆抗体,而角蛋白是存在于上皮细胞胞浆中特有的结构蛋白。角蛋白AE1/AE3免疫组化染色后,从0~20 d标本,阳性细胞逐渐增多,0.5,10,15,20 d阳性细胞计数分别为19.0±4.2,25.4±3.9,35.4±3.7,47.6±3.1,60.4±3.4,5、10 d与0 d相比 $P<0.05$,15、20 d与0 d相比 $P<0.05$,均有统计学意义第20天标本,移行上皮细胞在局部成层生长,层厚1~5层,见图4。

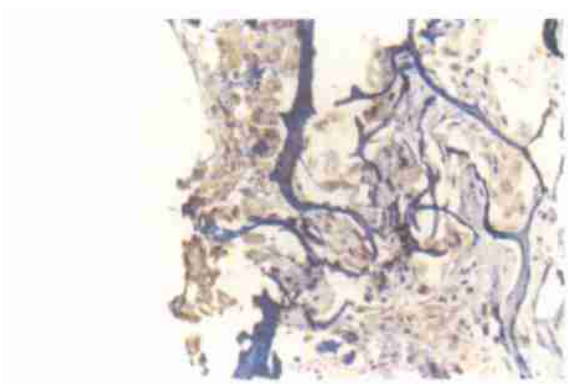


图4 组织工程尿道移植入体内后,移行上皮细胞成层全长,角蛋白 AE_1/AB_3 免疫组化呈阳性着色 (S-P×200)

Fig 4 After implantation of tissue engineering urethra, transitional cells grow in multilayer and cytokeratins show positive staining for AE_1/AE_3 (S-P×200)

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

3　讨论

组织工程种子细胞要求获取方法简便、快速大量扩增和细胞功能强的特性。膀胱移行上皮细胞体外繁殖力低下, 需要培养的微环境复杂, 原代培养较困难[4]。经我们获取的移行上皮细胞, 可稳定传至 7～9 代, 形态典型, 活力好, 纯度高, 数量基本满足组织工程实验研究所需。而且, 移植体内后仍然维持了移行上皮细胞特有的结构和功能特点。

1992 年, Atala 等[5] 将兔移行上皮细胞种植到 PGA (聚羟基乙酸)支架, 观察到了细胞在支架上贴附生长。我们以胶原膜作为细胞生长的支架, 同时将细胞支架复合物移植裸鼠体内, 以观察离体培养后的移行上皮细胞在人工支架上, 能否维持其固有生物学特性和功能, 以及细胞胶原膜复合物能否向预定组织结构分化和演变。经 HE 染色和角蛋白免疫组化染色, 我们观察到体外培养后的移行上皮细胞移植体内后, 在胶原膜的支撑作用下, 细胞仍然有角蛋白的表达, 并且能够分化成层, 维持了移行上皮细胞的功能特点。移行上皮细胞-胶原膜复合物在体内形成了尿道类似物, 有望成为替代尿道的组织工程材料。

体外培养的种子细胞移植体内后, 维持了成层生长的能力。从自体组织分离、培养、扩增种子细胞是目前最安全、最实际的方法。然而, 体外培养的体细胞, 易衰老而丧失功能。针对这一问题, 有研究者通过对种子细胞转入端粒酶[6] 来延长细胞寿命, 增加细胞传代次数而细胞特有功能不丧失。而更多研究者发现通过适宜生长因子的刺激, 可以促进细胞在较短时间内迅速达到组织工程所要求的细胞数量[7]。我们运用 EGF, 获得较满意结果, 体外培养 7～10 d 后, 细胞量就能从 10^5 扩增至 10^6, 同时其特定功能不丧失。所以, 随着细胞培养技术的进一步提高, 通过患者少量活检组织分离培养出充足的种子细胞将不再复杂。

移植后的胶原膜支架, 支持了移行上皮细胞的生长。应用胶原膜作为组织工程器官支架, 已有先例, Weinberg 等[8] 应用胶原制作支架, 体外构建血管模型获得成功。王旭等[3] 将异体表皮细胞和成纤维细胞分别种植在胶原膜两侧移植于烧伤创面, 获得满意效果。本部分研究经形态学及免疫组化检测, 随时间推移, 移行上皮细胞沿胶原膜纤维呈成团聚集生长的趋势。移行上皮细胞能够在胶原膜上增殖, 是缘于胶原膜的结构特点, 其 0～200 μm 的纤维间距, 明显利于细胞进行氧气和其他营养物质的交换。Park 等[9] 认为氧分子的存在对细胞在支架上的贴附和生长起到了很大作用。

本组实验研究表明, 移行上皮细胞能够在胶原膜上贴附、分化及增殖, 以膀胱移行上皮细胞作为种子细胞构建组织工程尿道是可行的。

参考文献:

[1] Atala A. Engineering tissue and organs[J]. Curr Opin Urol, 1999, 9(6): 517—526.

[2] Desgrandchamps F. Biomaterials in functional reconstruction[J]. Curr Opin Uro, 2000, 10(3): 201—206.

[3] 王　旭, 王甲汉, 吴　军. 复合皮的制作与临床应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 1997, 11(2): 100—102.

[4] Atala A. Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineering[J]. Urol clin North Am, 1999, 26(1): 157—165.

[5] Atala A, Vacanti J P, Peters C A, *et al*. Formation of urothelial structures *in vivo* from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds *in vitro*[J]. J Urol, 1992, 148(2Pt2): 658—662.

[6] Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, *et al*. Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shorting and replicative senescence in human osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(8): 1453—1464.

[7] 杨志明. 组织工程基础与临床[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2000. 93—101.

[8] Weinberg C B, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and culture vascular cells[J]. Science, 1986, 231(4736): 397—400.

[9] Park K D, Kwon I K, Kim Y H. Tissue engineering of urinary organs[J]. Yonsei Med J, 2000, 41(6): 780—788.

（编辑　郭建秀）

（上接 2008 页）

后护理: 术后 24 h 禁食水、卧床休息 8 h。术后 24 h 进食温凉流质饮食, 忌酸甜。术后 2 d 可食稀饭、面条等膳食。息肉切除后残端因灼伤后形成溃疡, 应严密观察进食后的腹部体征及患者主诉。⑤术后随访及出院指导: 严密观察生命体征及病情变化, 观察大便性质, 术后 1 周内避免重体力活动。术后 1 个月、半年胃肠镜复查, 术后 1 个月内忌食辛辣、刺激食物, 忌饮酒、浓茶、咖啡, 适当休息, 发现异常随时就诊。

关键词: 氩离子凝固术; 消化道息肉治疗; 护理

中图法分类号: R573　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 冯　莉, 吴云林, 孙　波, 等. 氩离子凝固术对猪胃黏膜的凝固作用[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 18(3): 164—166.

[2] Grade A J, Shah I A, Medlin S M. The efficacy and safety of argon plasma coagulation therapy in Barrett's esophagus[J]. Gastrointestinal Endosc, 1999, 50(1): 18—22.

[3] Johanns W, Luis W, Janssen J. Argon Plasma Coagulation(APC) in gastroenterology experimental and clinical experiences[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1997, 9(6): 581—587.

（编辑　刘洪娥）

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