

# 内皮祖细胞在膀胱细胞外基质上的生长及分化\*\*

萧安格, 赵凯亮, 杨嗣星, 李永伟, 廖文彪, 孟令超

## Growth and differentiation of endothelial progenitor cells on the bladder extracellular matrix

Xiao An-ge, Zhao Kai-liang, Yang Si-xing, Li Yong-wei, Liao Wen-biao, Meng Ling-chao

### Abstract

**BACKGROUND:** Traditional bladder tissue engineering scaffold materials have no vascular structures, and insufficient vascularization is the problem after implantation *in vivo*.

**OBJECTIVE:** To evaluate the biocompatibility of bladder extracellular matrix with endothelial progenitor cells of rabbits.

**METHODS:** Rabbit's endothelial progenitor cells were isolated and cultured. The endothelial progenitor cells combined with the bladder extracellular matrix were cultured and seeded *in vitro*. The histocompatibility of the complex was evaluated after implantation into the rabbit back.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Endothelial progenitor cells were able to adhere, grow, and proliferate on the bladder extracellular matrix surface, showing a good cell shape. At 1 week after the endothelial progenitor cells combined with the bladder extracellular matrix were implanted in rabbits, the distinctive inflammatory reaction around the material could be seen, with severe adhesion and mass bleeding. The hematoxylin-eosin staining showed many inflammatory cells infiltrating tissues, collagen and loose arrangement of elastic fibers. After 8 weeks, the implanted materials had been degraded to be broken filaments, fused with the surrounding tissue, with crisp texture and easy bleeding; the hematoxylin-eosin staining showed no obvious tissue infiltration of inflammatory cells in response, closely arranged collagen and elastic fibers and neovasculature could be seen in the materials. The results indicate that the endothelial progenitor cells have a good compatibility with the bladder extracellular matrix, and the complex has a good compatibility with body tissues.

Xiao AG, Zhao KL, Yang SX, Li YW, Liao WB, Meng LC. Growth and differentiation of endothelial progenitor cells on the bladder extracellular matrix. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(47): 8797-8800.

[<http://www.crter.cn> <http://en.zglckf.com>]

### 摘要

**背景:** 传统的组织工程膀胱支架材料本身无血管结构, 植入体内后面临血管化不足的问题。

**目的:** 观察内皮祖细胞与膀胱细胞外基质的生物相容性。

**方法:** 分离培养兔内皮祖细胞, 种植于兔膀胱细胞外基质上与其复合培养。将复合生长材料植入兔背部皮下检测其组织相容性。

**结果与结论:** 兔内皮祖细胞能够在膀胱细胞外基质表面正常黏附、生长、增殖, 细胞形态良好。内皮祖细胞-膀胱细胞外基质植入兔体内后 1 周时, 可见材料周围炎症反应明显, 粘连严重, 出血较多; 苏木精-伊红染色可见组织中较多炎性细胞浸润, 胶原及弹性纤维排列松散。植入后 8 周时可见材料已降解成碎细丝状, 与周围组织融合生长在一起, 但质地略脆, 易出血; 苏木精-伊红染色可见组织中已无明显炎症细胞浸润反应, 胶原及弹性纤维排列紧密并且有新生血管长入其中。结果表明内皮祖细胞与膀胱细胞外基质具有良好的相容性, 复合培养物与体内组织具有良好的相容性。

**关键词:** 膀胱细胞外基质; 内皮祖细胞; 生物相容性; 组织工程; 支架

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.47.014

萧安格, 赵凯亮, 杨嗣星, 李永伟, 廖文彪, 孟令超. 内皮祖细胞在膀胱细胞外基质上的生长及分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(47):8797-8800. [<http://www.crter.org> <http://cn.zglckf.com>]

## 0 引言

组织工程学是综合应用工程学和细胞生物学的原理, 将体外培养扩增后的具有特定生物学活性的种子细胞与可降解的生物支架材料复合, 再将其回植体内缺损部位, 种子细胞在支架材料降解吸收的过程中会分泌新的细胞外基质, 从而再生成具有正常结构和功能的组织, 达到真正意义上的生物学修复<sup>[1-6]</sup>。组织工程化膀胱的构建为膀胱缺损的修复带来了新的希望。

组织工程膀胱的血管化一直是人们关注的

焦点。膀胱组织的黏膜下层有密布的毛细血管网, 以供应膀胱组织的营养和氧分。Wallet等<sup>[1]</sup>认为厚度>0.5 mm的移植物如没有血管长入以提供组织成活所需的氧气和营养成分, 移植物将坏死脱落。现行的组织工程化膀胱构建方法是使用种子细胞种植于生物支架上, 可形成膀胱组织的3层结构, 但无论从形成新生膀胱的血供还是质量上均不能满足临床修复膀胱缺损的需要。因此, 如何在构建组织工程化膀胱的同时促进血管的长入, 成为组织工程膀胱深入研究和走向应用的关键性环节。

实验体外培养兔内皮祖细胞作为种子细胞, 膀胱细胞外基质作为支架材料构建组织工

Department of Urinary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Xiao An-ge★, Studying for master's degree, Department of Urinary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
chensi271@yahoo.com.cn

Zhao Kai-liang, Studying for master's degree, Department of Urinary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
wenlu1985@yahoo.cn

Xiao An-ge and Zhao Kai-liang contributed equally to this paper.

Correspondence to: Yang Si-xing, Professor, Doctoral supervisor, Department of Urinary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30872594\*

Received: 2011-04-16  
Accepted: 2011-05-19

武汉大学人民医院泌尿外科, 湖北省武汉市 430060

萧安格★, 男, 1973年生, 台湾人, 汉族, 武汉大学第一临床医学院在读硕士, 主要从事泌尿组织工程学研究。  
chensi271@yahoo.com.cn

并列第一作者: 赵凯亮★, 男, 1983年生, 山西省晋城市人, 汉族, 武汉大学第一临床医学院在读硕士, 主要从事泌尿组织工程学研究。  
wenlu1985@yahoo.cn

通讯作者: 杨嗣星, 教授, 博士生导师, 武汉大学人民医院泌尿外科, 湖北省武汉市 430060  
sxyang2004@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)47-0879-04

收稿日期: 2011-04-16  
修回日期: 2011-05-19  
(20110416012/GW-W)

程化膀胱, 初步探讨以其构建组织工程膀胱的可行性。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察及细胞-材料的体内分化实验。

**时间及地点:** 于2009-10/2010-10在武汉大学人民医院中心实验室完成。

**材料:** SPF级健康成年新西兰兔12只, 体重2.0~2.5 kg, 雌雄不拘, 购自武汉大学医学院动物实验中心, 其中4只用于膀胱细胞外基质制备, 其余8只作为细胞-材料的体内分化实验的实验组。

**主要试剂:**

试剂	来源
内皮细胞生长培养基	EGM-2, 美国 Clonetics 公司
内皮细胞生长培养基补充物	EGM-2MV SingleQuots, 美国 Clonetics 公司
纤维连接蛋白	Fibronectin-Fn, 美国 Sigma 公司
淋巴细胞分离液与 PBS 液	TBD 公司
胰蛋白酶、DNA 酶	美国 GIBCO 公司
FITC-CD34 单克隆抗体、APC-CD133 单克隆抗体	美国 eBioscience 公司
Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白	Dil-Ac-LDL, 美国 Molecular Probe 公司
EDTA	上海化学试剂厂
PerCP/Cy5.5-VEGFR2 单克隆抗体	美国 BioLegend 公司
FITC-UEA-1	美国 Sigma 公司

**实验方法:**

**兔内皮祖细胞的培养及鉴定:** 无菌条件下抽取8只新西兰兔骨髓5 mL, 肝素钠抗凝, 按密度梯度离心法分离单个核细胞, 重悬于含体积分数10%胎牛血清的EGM-2培养基中, 接种于预先铺好纤连蛋白(5 μg/cm<sup>2</sup>)的培养瓶内, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养48 h后首次换液, 以后每二三天换液1次。在倒置显微镜下观察细胞形态变化。通过流式细胞术、免疫荧光证实培养的细胞为内皮祖细胞。

**兔膀胱细胞外基质的制备:** 兔膀胱细胞外基质的制备参照杨嗣星等<sup>[2]</sup>的方法。将制备好的材料冷冻干燥, 封装, 环氧乙烷消毒, 保存备用。苏木精-伊红染色和扫描电镜观察膀胱细胞效果。

**兔膀胱细胞外基质和内皮祖细胞的复合培养:** 将兔膀胱细胞外基质剪成小块置入24孔板内, 以

EBM-2培养基预湿48 h。将已经培养好的第3代内皮祖细胞以1.0×10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>的密度接种到24孔板内, 置培养箱培养。取同期培养的内皮祖细胞作为对照。培养后第2天开始行细胞计数: 每天各取每组的2孔消化离心进行细胞计数, 连续12 d, 绘制细胞生长曲线, 对比两组细胞曲线。

**细胞-材料的体内分化实验:** 将兔膀胱细胞外基质剪成1 cm<sup>2</sup>块置入6孔板内, 以EBM-2培养液预湿48 h。将微环境培养的细胞以10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>的浓度接种到膀胱细胞外基质的一面, 置培养箱培养14 d。设未种植细胞的材料为对照组, 麻醉完全后, 在背部做长约1.0 cm切口, 左边植入培养2块14 d的细胞-支架材料复合物, 右边植入未种植细胞的材料, 作为对照。术后1, 2, 4, 8周处死动物, 每次处死2只, 大体观察植入物的情况及其与周围组织的关系, 切取植入物, 以40 g/L多聚甲醛固定, 制成切片, 行苏木精-伊红染色, 观察植入材料体内降解和血管生成的情况。

**主要观察指标:** ①倒置显微镜观察原代、传代内皮祖细胞形态。②倒置显微镜下观察细胞和材料复合培养状况。③细胞和材料复合培养后生长曲线。④检测细胞-材料复合物植入动物体内后1, 2, 4, 8周的体内降解和血管生成的情况。

## 2 结果

**2.1 兔内皮祖细胞的形态观察与鉴定** 原代培养的兔内皮祖细胞贴壁缓慢, 在粘连蛋白包被的培养皿中培养24 h开始贴壁, 3 d贴壁基本完全, 并有少量细胞开始伸展呈梭形, 但多数呈圆形或椭圆形。随着诱导培养时间延长, 圆形细胞减少, 梭形细胞数量增多, 7 d可出现细胞集落, 以后细胞大量增殖, 14 d细胞长满培养瓶底, 呈铺路石样, 见图1。

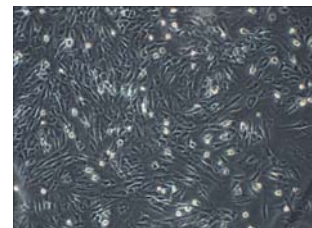


Figure 1 Endothelial progenitor cells cultured for 14 d showed a typical cobblestone-like shape under inverted phase contrast microscope (x100)  
图1 兔内皮祖细胞培养第14天(x100)

细胞培养14 d后, 流式细胞仪分析细胞表面标志表明VEGFR2, CD34和CD133阳性; 免疫荧光检查示80%的贴壁细胞呈Dil-Ac-LDL和FITC-UEA-1双染阳性, 表明实验成功得到兔内皮祖细胞。

**2.2 兔膀胱细胞外基质的结构特点** 光镜下, 膀胱细胞外基质由许多排列规则而紧密连接成网状的胶原纤维组成, 苏木精-伊红染色呈红色, 内部未见细胞。扫描电镜示基质材料呈网状排列, 表面无细胞残片, 见图2, 3。

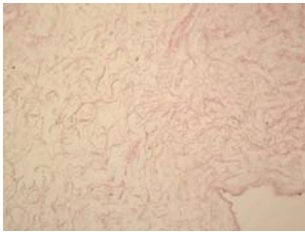


Figure 2 Hematoxylin-eosin staining for rabbit bladder extracellular matrix (x200)  
图2 兔膀胱细胞外基质苏木精-伊红染色(x200)

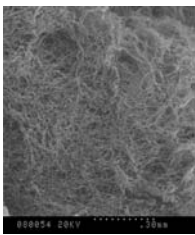


Figure 3 Scanning electron microscope results of rabbit bladder extracellular matrix (x100)  
图3 兔膀胱细胞外基质电镜扫描结果(x100)

**2.3 兔膀胱细胞外基质与内皮祖细胞的复合培养** 可见内皮祖细胞在膀胱细胞外基质材料表面良好的贴附、繁殖, 实验组与对照组的细胞有相似的生长曲线, 说明内皮祖细胞在膀胱细胞外基质表面生长良好, 相容性较好, 见图4。

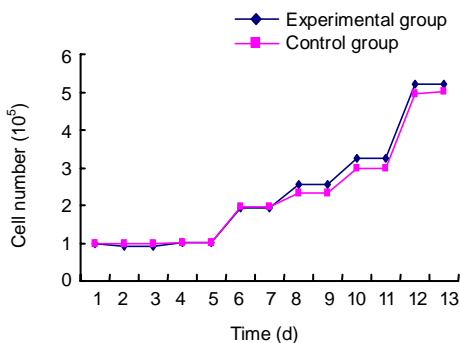


Figure 4 Growth curve of endothelial progenitor cells co-cultured with the bladder acellular matrix  
图4 兔内皮祖细胞与膀胱细胞外基质共培养的生长曲线

**2.4 细胞-材料的体内分化实验** 兔膀胱细胞外基质复合材料植入兔背部皮下后所有实验动物均正常存活, 活动和进食正常, 伤口一期愈合, 未见切口感染、化脓、积液、植入物排出等现象。

组织学观察: 植入后1周植入材料周围有大量炎性细胞浸润, 材料完整, 未见明显降解; 2周材料周围炎性细胞数量明显减少; 4周炎性反应已基本消退, 材料部分降解; 8周材料已降解成碎细丝状, 并见新生血管长入其中, 见图5。

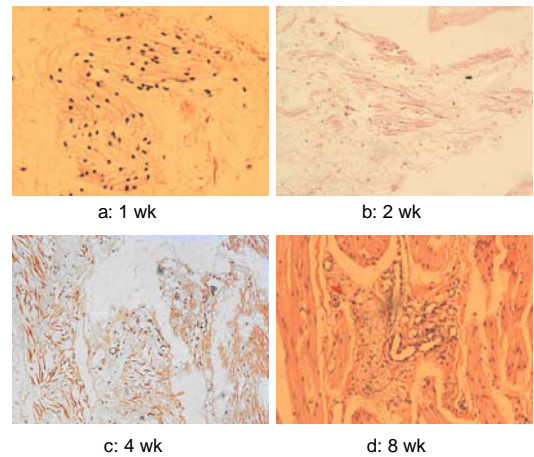


Figure 5 Histological observation of cells-material removed at different time points after implantation (Hematoxylin-eosin staining, x200)

图5 细胞-材料体内植入后不同时间点取出组织学观察(苏木精-伊红染色, x200)

### 3 讨论

在膀胱组织工程研究中支架材料的选择尤为重要, 它是构建组织工程化膀胱组织最基本的构架, 是研究的基础和关键。理想的组织工程支架材料必须具有良好的生物相容性, 而且适合种子细胞在支架上黏附、生长<sup>[7]</sup>。目前常用的膀胱组织工程生物支架材料主要包括3大类: 天然细胞外基质(胶原、网状纤维等); 细胞外基质衍生物(膀胱细胞基质、膀胱黏膜下层等); 各种合成聚合物(聚乳酸、聚羟基乙酸等)<sup>[8]</sup>。

膀胱细胞外基质是一种特殊的天然生物支架材料, 它是通过理化方法去除生物体原型组织中的实质细胞, 消除其抗原性, 同时又保留相对完整的细胞外支架结构, 通过对膀胱细胞外基质的组成及机械性能的研究, 发现其强度、拉力和弹力特征与正常的膀胱组织无明显区别, 而且膀胱细胞外基质来源广泛, 制作成本低廉, 有利于手术缝合, 是较为理想的组织工程膀胱支架材料<sup>[9]</sup>。很多研究已证明其在膀胱组织工程中的应用的可行性<sup>[10-11]</sup>, 但单纯采用细胞外基质进行组织替代存在血管



化不足导致挛缩的现象<sup>[12]</sup>, 显示了单纯的细胞外基质诱导组织再生能力不足的问题。因此增加组织工程膀胱的体内血管化是解决这一问题的关键所在。

内皮祖细胞是一种来源于骨髓的内皮前体细胞, 在正常情况下, 有少量循环于外周血中, 具有向血管内皮细胞分化从而促进血管新生的作用。许多研究结果已证实其在心肌缺血以及肢体局部缺血后的侧支循环建立过程中发挥了重要的作用, 有可能作为组织工程研究的种子细胞促进血管化过程<sup>[13-15]</sup>。

本实验采用内皮祖细胞和支架材料共培养及异位移植实验, 在体外、体内对内皮祖细胞和膀胱细胞外基质的生物相容性进行评价。体外复合培养实验结果显示, 内皮祖细胞与膀胱细胞外基质复合培养后, 随着时间延长, 可见内皮祖细胞在材料表面良好的贴附、繁殖, 其正常的生长增殖未受到材料的影响。将材料剪成小块置入24孔板内, 接种细胞到24孔板内, 测得的细胞生长曲线与对照组细胞的生长曲线相似。并且本实验发现, 种植在含有小块材料的24孔板内的细胞增殖速度往往优于单独细胞生长组, 这也许恰好印证了膀胱细胞外基质确实含有一些利于细胞生长的细胞因子, 可以促进细胞的增殖生长。

动物体内植入实验是组织工程化生物衍生材料研究中另一个重要环节。它能够考察生物材料在动物体内的组织反应和与受体组织的愈合过程, 为进一步的临床应用提供实验依据。

本实验材料皮下植入实验结果表明膀胱细胞外基质在动物体内植入后4周时, 大体观察可见材料周围炎症反应明显, 粘连严重, 出血较多; 组织切片苏木精-伊红染色观察可见组织中较多炎性细胞浸润, 胶原及弹性纤维排列松散; 组织切片免疫组化染色可见薄层、不连续的单层上皮生长。到实验观察的中后期炎性细胞浸润逐渐减少而巨噬细胞逐渐增多, 与之相应的是材料在实验动物体内逐渐降解, 到第8周时可见材料已降解成碎细丝状, 与周围组织融合生长在一起, 但质地略脆, 易出血; 组织切片苏木精-伊红染色观察可见组织中已无明显炎症细胞浸润反应, 胶原及弹性纤维排列紧密并且有新生血管长入其中。结果表明膀胱细胞外基质对机体无毒, 并且在体内与周围组织有良好的生物相容性, 有一定的生物活性, 符合组织工程支架材料使用安全性的要求, 可用于组织工程膀胱的构建。

以上结果均表明膀胱细胞外基质作为支架材料, 内皮祖细胞作为加强组织工程膀胱血管化的种子细胞的可行性和实用性。膀胱细胞外基质复合内皮祖细胞构建的组织工程化膀胱有可能成为膀胱扩大和替代的理想材料, 但它是否能够完全用于膀胱扩大和替代的临床中, 还有待进一步的证实。

#### 4 参考文献

- [1] Walles T, Herden T, Haverich A, et al. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials*. 2003; 24(7):1233-1239.
- [2] Yang SX, Song C, Liu Y, et al. *Zhonghua Miniao Waiké Zazhi*. 2003; 24(8):555-557. 杨嗣星, 宋超, 刘勇, 等. 尿道细胞外基质的研制[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2003, 24(8):555-557.
- [3] Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering*. 1993; 60:920.
- [4] Williams DJ, Sebastine IM. *Tissue engineering and regenerative medicine: manufacturing challenges*. *IEEE Proc Nanobiotechnol*. 2005; 152(6):207-210.
- [5] Yang ZM. *Zhonghua Shiyán Waiké Zazhi*. 2002; 19(2):103-104. 杨志明. 组织工程学与实验外科[J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(2):103-104.
- [6] Cao YL, Cui L, Liu W. *Zhonghua Shiyán Waiké Zazhi*. 2003; 20(6):485-486. 曹谊林, 崔磊, 刘伟. 中国组织工程研究回顾与发展[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(6):485-486.
- [7] Kim BS, Atala A, Yoo JJ. A collagen matrix dedved from bladder can be used to engineer smooth muscle tissue. *World J Urol*. 200; 26(4):307-314.
- [8] Yang SX, Shen FJ, Wang LL. *Zhonghua Miniao Waiké Zazhi*. 2006; 27(12):861-863. 杨嗣星, 申复进, 王玲珑. 组织工程化尿道研究现状与前景[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2006, 27(12):861-863.
- [9] Dahm SE, PiechoLa HJ, Dahiya R, et al. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. *Br J Urol*. 1998; 82(3):411-419.
- [10] Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for bladder repair. *Urology*. 1999; 54(3):407-410.
- [11] Obara T, Matsuura S, Narita S, et al. Bladder acellular matrix grafting regenerates urinary bladder in the spinal cord injury rat. *Urology*. 2006; 68(40):892-897.
- [12] Brown A, Farhat W, Merguerianc PA, et al. 22 week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model. *Biomaterials*. 2002; 23(10):2179-2190.
- [13] Alobaid N, Alnaeb ME, Sales KM, et al. Endothelial progenitor cells and their potential clinical applications in peripheral arterial disease. *Endothelium*. 2005; 12(5-6):243-250.
- [14] Quraishi A, Losordo DW. Ischemic tissue repair by autologous bone marrow-derived stem cells: scientific basis and preclinical data. *Handb Exp Pharmacol*. 2007; (180):167-179.
- [15] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, et al. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases. *Cell Transplant*. 2007; 16(3):273-284.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 国家自然科学基金项目(30872594)。

**作者贡献:** 萧安格进行实验设计, 实验实施为萧安格、赵凯亮, 实验评估为杨嗣星, 资料收集为李永伟, 萧安格成文, 杨嗣星审核并对文章负责。萧安格与赵凯亮对实验的贡献相同, 故并列为第一作者。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织有直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验中对动物处置符合动物伦理学要求。

**本文创新性:** 以“膀胱细胞外基质, 内皮祖细胞, 生物相容性”为关键词检索万方数据库 2002-05/2010-10 文章, 很多研究已证明膀胱细胞外基质在膀胱组织工程中应用的可行性, 但单纯采用细胞外基质进行组织替代存在血管化不足导致挛缩的现象。

实验利用内皮祖细胞作为种子细胞种植在膀胱细胞外基质上来构建组织工程化膀胱, 拟解决组织工程化膀胱的血管化不足问题。