

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.51.019

[http://www.crter.org]

彭 彧, 王玉杰, 李佳, 木拉提·热夏提. 兔膀胱脱细胞基质负载大鼠毛囊干细胞的体外培养[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(51):8901-8906.

兔膀胱脱细胞基质负载大鼠毛囊干细胞的体外培养***

彭 彧^{1,2}, 王玉杰², 李 佳², 木拉提·热夏提² (1长沙市第八医院泌尿外科, 湖南省长沙市 410100; ²新疆医科大学第一附属医院泌尿外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011)

文章亮点:

- 1 毛囊干细胞是新兴的泌尿系组织工程的种子细胞, 目前国内尚没有毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质复合培养的相关报道。
- 2 毛囊干细胞在异种膀胱脱细胞基质上生长良好, 进一步为毛囊干细胞修复膀胱缺损疾病的研究奠定了基础。
- 3 国内首次运用毛囊干细胞为泌尿系组织工程种子细胞, 但膀胱脱细胞基质诱导毛囊干细胞定向分化的机制尚处在初级阶段, 有待进一步深入研究。

关键词:

生物材料; 细胞外基质材料; 干细胞; 膀胱脱细胞基质; 毛囊干细胞; 支架; 培养; 修复; 生物相容性; 国家自然科学基金

主题词:

生物相容性材料; 毛囊; 干细胞; 膀胱

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2009211B22)*; 2012年国家自然科学基金(81160088)*

摘要

背景: 组织工程学的兴起为泌尿系组织或器官的修复和重建开辟了新的途径, 膀胱脱细胞基质是较好的泌尿系组织工程修复的替代材料。

目的: 构建毛囊干细胞与异种膀胱脱细胞基质为支架的细胞支架复合物, 体外培养观察细胞在支架上的生长状态。

方法: 制备新西兰兔膀胱脱细胞基质, 通过扫描电镜和 Masson 染色检测材料脱细胞效果, 采用二次沉淀法将第3代毛囊干细胞静态接种于膀胱脱细胞基质表面, 倒置显微镜下观察细胞生长状态, 并绘制细胞生长曲线, 组织学检测和扫描电镜观察细胞在材料表面的生长状况。

结果与结论: 制备的膀胱脱细胞基质为白色半透明膜状, 扫描电镜下观察为纤维网状结构, 未见细胞残留。Masson 染色提示膀胱脱细胞基质为胶原结构, 无明显细胞残留。细胞材料体外复合培养 48 h 后倒置显微镜下观察膀胱脱细胞基质周围毛囊干细胞生长状态良好, 1 周后扫描电镜下观察毛囊干细胞伸展、黏附于支架表面。结果可见毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质体外培养具有良好的生物相容性。

In vitro culture of rabbit bladder acellular matrix carrying rat hair follicle stem cells

Peng Yu^{1,2}, Wang Yu-jie², Li Jia², Muratrixat² (1Department of Urology, the Eighth Hospital of Changsha City, Changsha 410100, Hunan Province, China; ²Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: The rise of tissue engineering has opened up new ways for tissue repair and reconstruction of the urinary tract, and the bladder acellular matrix is a better alternative material for urinary tissue engineering.

OBJECTIVE: To construct the compound of hair follicle stem cells with heterologous bladder acellular scaffold, and to observe the growth of hair follicle stem cells on the scaffold.

METHODS: Bladder acellular matrix from New Zealand rabbits were prepared and detected using scanning electron microscopy and Masson staining. Passage 3 hair follicle stem cells were statically inoculated into the surface of bladder acellular matrix using secondary sedimentation method. Under inverted microscope, cell growth was observed, and cell growth curves were drawn. Cell growth on the scaffold surface was observed through histological detection and scanning electron microscope observation.

RESULTS AND CONCLUSION: Prepared bladder acellular matrix was a white translucent film with fiber mesh structure, and no residual cells were seen. Masson staining results indicated that the bladder acellular matrix had collagen structure, and no obvious residual cells. After culture for 48 hours, hair follicle stem cells grew well around the bladder acellular matrix under inverted microscope; 1 week later, hair follicle stem cells extended and adhered to the scaffold surface. These findings indicate that hair follicle stem cells have a good biocompatibility with the bladder acellular matrix through *in vitro* culture.

彭彧★, 男, 1986年生, 湖南省宁乡县人, 汉族, 2013年新疆医科大学毕业, 硕士, 主要从事泌尿系统组织工程方面的研究。
267305117@qq.com

通讯作者: 木拉提·热夏提, 副主任医师, 新疆医科大学第一附属医院泌尿外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2013)51-08901-06

修回日期:2013-09-21
(201303037/M·W)

Peng Yu★, Master, Department of Urology, the Eighth Hospital of Changsha City, Changsha 410100, Hunan Province, China
267305117@qq.com

Corresponding author: Muratrixat, Associate chief physician, Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2013-05-21

Subject headings: biocompatible materials; hair follicle; stem cells; urinary bladder

Funding: the National Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2009211B22*; the National Natural Science Foundation of China in 2012, No. 81160088*

Peng Y, Wang YJ, Li J, Muratrixat. In vitro culture of rabbit bladder acellular matrix carrying rat hair follicle stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(51):8901-8906.

0 引言 Introduction

各种先天性畸形、炎症、肿瘤及创伤等均可导致膀胱组织结构或功能丧失,给无数患者带来极大的痛苦,严重者可导致肾功能减退甚至肾衰竭。传统方法使用自体非泌尿系组织或合成聚合材料来修复或代替缺损的膀胱,但这些组织很难完全替代原组织器官功能,并可能会产生一系列并发症^[1-2],且自体非泌尿系组织数量有限,限制了它的应用。膀胱脱细胞基质作为一种天然的细胞外基质生物材料,仅保留胶原蛋白、蛋白多糖、糖蛋白等低抗原物质,因此,选择异种膀胱脱细胞基质作为支架材料构建组织工程膀胱成为目前研究的热点。本实验选用具有向尿路上皮细胞及平滑肌细胞定向分化的大鼠毛囊干细胞作为种子细胞^[3-4],体外构建细胞-支架复合物,为毛囊干细胞和异种膀胱脱细胞基质复合物修复膀胱缺损提供实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 体外构建细胞-支架复合物,观察性实验。

时间及地点: 实验于2011年8月至2012年10月在新疆医科大学第一附属医院临床研究院完成。

材料:

实验动物: 清洁级SD大鼠5只,雌雄不限,体质量200 g左右,由新疆医科大学动物中心提供。新西兰兔2只,雌雄不限,3-5月龄,体质量2.5 kg左右,由新疆医科大学动物中心提供。

兔膀胱脱细胞基质负载大鼠毛囊干细胞体外培养实验所用主要试剂:

试剂	来源
IV型胶原	Sigma 公司
K-SFM 培养基	Gibco 公司
优级胎牛血清	四季青公司
Dispase II	Roche 公司
胰蛋白酶和乙二胺四乙酸消化液	Solarbio 公司
Masson 染色试剂盒	南京建成公司

实验方法:

兔膀胱脱细胞基质的制备及鉴定: 空气栓塞法处死新西兰大白兔,仰卧位固定,取下腹部正中切口,备皮,切取兔膀胱,去除膀胱周围脂肪及筋膜组织,用含10%青链霉素的D-Hank's缓冲液漂洗3次,4℃条件下保存于

D-Hank's缓冲液中。纵行切开膀胱壁,黏膜面朝上,刀片小心刮去黏膜层。利用显微器械仔细分离出黏膜下层组织,注意尽量剔除浆肌层组织,同时保持黏膜下层的完整性,取出分离好的黏膜下层组织,修剪成1 cm×1 cm大小,无菌PBS漂洗3遍,在100 mL PBS(含0.1%叠氮钠)混合液中室温条件下以250 r/min的速度浸泡搅拌过夜。无菌PBS漂洗,置于100 mL 0.5 mmol/L EDTA+0.4%胰蛋白酶溶液中37℃条件下以250 r/min的速度浸泡搅拌5.0-6.0 h。无菌PBS漂洗,在100 mL 1 mol/L NaCl(含DNase- I 4 000 kU)溶液中37℃条件下以250 r/min的速度浸泡搅拌6-8 h,使细胞彻底溶解,细胞组分完全释放。在100 mL含4%脱氧胆酸钠和0.1%叠氮钠的混合溶液中室温条件下以250 r/min的速度浸泡搅拌6-8 h,使细胞膜脂质双层和细胞内的膜脂质溶解。将制备好的膀胱脱细胞基质修剪成1 cm×1 cm大小,用含5%青链霉素的无菌PBS漂洗3遍后,平铺于24孔板中,置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥6 h。将冻干的膀胱脱细胞基质进行钴60辐射灭菌,辐射剂量为25 kGy,4℃条件下低温保存。

大鼠毛囊干细胞的培养及鉴定: 取大鼠乳鼠触须部皮肤,体式显微镜下显微镊钝性分离单个毛囊组织,将分离的毛囊组织置于Dispase II(0.25 g/L)中,37℃摇床消化2 h, PBS冲洗3遍,置于胰蛋白酶(2.5 g/L)和乙二胺四乙酸(0.2 g/L)1:1消化液中37℃摇床消化1 h,后过200目钢网收集滤液离心(1 500 r/min)10 min,弃去上清,加入含体积分数为10%胎牛血清的无血清角质细胞培养液重悬细胞,加入IV型胶原包被的培养瓶中,培养箱中静置30 min后,弃去未贴壁的细胞。体积分数为5% CO₂、37℃孵箱中培养,两三天换液1次。待细胞达70%-80%汇合时胰蛋白酶和乙二胺四乙酸混合液消化传代。毛囊干细胞的鉴定采用形态学观察及结合相关表面标志物法进行。

毛囊干细胞与膀胱脱细胞支架体外复合培养实验: 取已制备好的兔膀胱无细胞基质,无菌D-Hank's缓冲液漂洗3次,加入K-SFM培养基预湿24 h。吸去K-SFM培养基,保持支架材料处于展开平铺状态,重新加入含体积分数为10%胎牛血清的K-SFM培养基浸润预湿2 h备用。取第3代毛囊干细胞,用含体积分数为10%胎牛血清的K-SFM完全培养基,在37℃、体积分数为5%CO₂条件下培养,待细胞长满皿底80%左右时,加入0.125% trypsin-0.01%EDTA消化细胞,计数后,用含体积分数为10%胎牛血清的K-SFM培养基调整细胞悬液的浓度至1×10⁹ L⁻¹。加入24孔板内预湿好的支架材料上,从支架中心缓慢滴入,每孔加入0.5 mL。空白孔内加入同样

细胞悬液作为对照。37℃、体积分数为5%CO₂培养箱内静置培养30 min后取出,重新加入0.5 mL细胞悬液,继续于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱内静置培养。静置培养30 min后,分别加入含体积分数为10%胎牛血清的K-SFM完全培养基1 mL,置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱内培养。细胞-支架复合物体外复合培养第2天开始行细胞计数:每天随机抽取每组的4孔,0.125%trypsin-0.01%EDTA消化离心后进行细胞计数,连续10 d,绘制细胞生长曲线,将两组曲线进行对比。

主要观察指标:扫描电镜及Masson染色观察膀胱脱细胞基质脱细胞效果,倒置相差显微镜下观察毛囊干细胞形态,流式细胞仪检测CD34、β1整合素(CD29)表达对细胞进行鉴定,倒置相差显微镜、扫描电镜及组织学检测观察细胞-支架复合物形态,绘制细胞-支架复合物细胞生长曲线。

2 结果 Results

2.1 膀胱脱细胞基质的结构特点 见图1, 2。

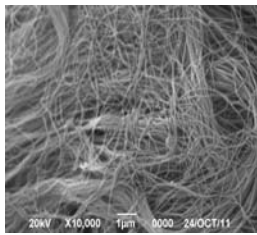


图1 扫描电镜示膀胱脱细胞基质表面为纤维网状结构,未见细胞残留(×10 000)

Figure 1 Scanning electron microscopy demonstrated the bladder acellular matrix had fiber mesh structure, but no residual cells (×10 000)



图2 Masson染色显示膀胱脱细胞基质为疏松的蓝色胶原纤维结构,未见细胞残留(×200)

Figure 2 Masson staining showed the bladder acellular matrix presented with loose blue collagen fiber structure, and had no residual cells (×200)

制备的膀胱脱细胞基质呈白色半透明膜状,厚度约0.5 mm,具有一定弹性及韧性,冻干保存的膀胱脱细胞基

质复水后,在液体中能展开呈片状,脱离液体基质后皱缩成团。扫描电镜下观察,膀胱脱细胞基质支架为由胶原蛋白形成的网状纤维结构,可见不规则空隙,支架表面未见细胞残留。Masson染色提示膀胱脱细胞基质仅能见匀质状态的蓝染的薄层胶原纤维,未见残留细胞。

2.2 毛囊干细胞的培养与鉴定 细胞接种于培养瓶中,37℃、体积分数为5%CO₂条件下培养48 h后倒置显微镜下可见贴壁细胞呈小多角形,周围混有部分成纤维细胞。在传代过程中利用毛囊干细胞对于IV型胶原具有快速黏附性的特点,逐渐筛选出纯度较高的毛囊干细胞,第3代毛囊干细胞培养第7天即可铺满培养瓶底,见图3。第3代毛囊干细胞培养第5天PE标记的CD34呈较高表达,FITC标记的β1整合素(CD29)成高表达,见图4。

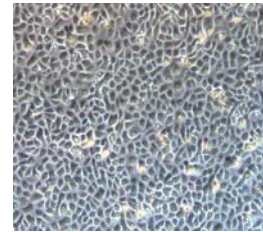


图3 第3代毛囊干细胞培养第7天,细胞集落呈典型的“铺路石状”(×50)

Figure 3 Passage 3 hair follicle stem cells cultured for 7 d showed a typical “aura” shape under the microscope (×50)

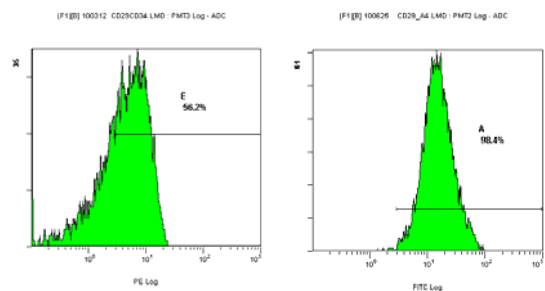
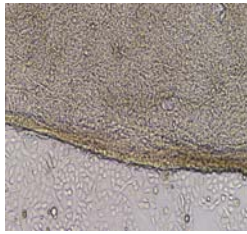


图4 第3代毛囊干细胞PE标记的CD34呈较高表达,FITC标记的β1整合素(CD29)呈高表达

Figure 4 PE-labeled CD34 and FITC-labeled β1 integrin (CD29) of passage 3 hair follicle stem cells showed high expression

2.3 毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质体外复合培养 倒置相差显微镜下观察,第2次种植毛囊干细胞2 h后可见大量细胞黏附于支架及支架周围培养皿底,细胞呈圆形或椭圆形;体外复合培养48 h后倒置相差显微镜下可见黏附

于材料表面的细胞呈梭形生长, 排列方向一致, 材料周围细胞生长状态良好, 呈典型的“铺路石状”生长, 见图5。

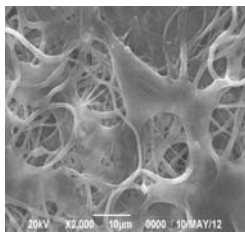


注: 体外复合培养 48 h 后倒置相差显微镜下观察, 可见黏附于材料表面的细胞呈梭形生长, 排列方向一致, 材料周围细胞生长状态良好, 呈典型的“铺路石状”生长。

图 5 毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质体外复合培养 48 h 形态(倒置相差显微镜, $\times 50$)

Figure 5 Morphology of co-cultured hair follicle stem cells with bladder acellular matrix at 48 h observed under inverted phase contrast microscope ($\times 50$)

细胞-支架复合物体外复合培养48 h, 扫描电镜下观察可见细胞形态饱满, 呈单层细胞结构, 平铺于膀胱脱细胞基质表面, 细胞分泌的基质使其与支架纤维紧紧黏附在一起, 细胞与细胞之间也相互粘连接触, 见图6。

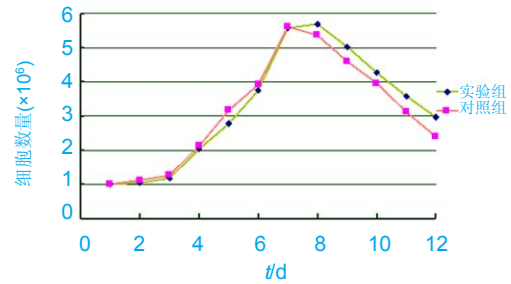


注: 细胞-支架复合物体外复合培养 48 h, 扫描电镜下观察可见细胞形态饱满, 呈单层细胞结构, 平铺于膀胱脱细胞基质表面, 细胞分泌的基质使其与支架纤维紧紧黏附在一起, 细胞与细胞之间也相互粘连接触。

图 6 毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质体外复合培养 48 h 扫描电镜下观察($\times 1\ 000$)

Figure 6 Morphology of co-cultured hair follicle stem cells with bladder acellular matrix at 48 h observed under scanning electron microscope ($\times 1\ 000$)

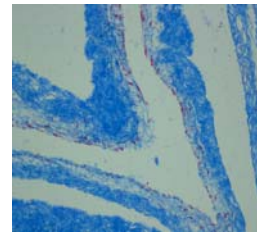
细胞-支架复合物细胞生长曲线, 实验组与对照组细胞生长曲线基本一致, 均在培养七八天进入生长平台期, 说明细胞在材料表面生长良好, 细胞与材料生物相容性较好, 见图7。细胞-支架复合物体外复合培养, 每 48 h 更换新鲜K-SFM完全培养基, 培养至第7天, 多聚甲醛固定, 行Masson染色, 光镜下观察可见1-3层细胞铺于支架材料表面, 见图8。



注: 实验组与对照组细胞生长曲线基本一致, 均在培养七八天进入生长平台期, 说明细胞在材料表面生长良好, 细胞与材料生物相容性较好。

图 7 毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质复合培养后细胞生长曲线

Figure 7 Cell growth curve of the composite material



注: 培养至第 7 天光镜下观察可见 1-3 层细胞铺于支架材料表面。

图 8 毛囊干细胞与膀胱脱细胞基质复合培养 1 周 Masson 染色($\times 100$)

Figure 8 The Masson staining of hair follicle stem cells co-cultured with bladder acellular matrix for 1 wk ($\times 100$)

3 讨论 Discussion

随着组织工程学近年来的发展, 膀胱脱细胞基质在各种实验中均显示出其相对于其他生物材料的优越性^[5-6]。膀胱脱细胞基质的优点主要表现在: ①能为正常膀胱组织细胞提供与原生长环境极其相似的三维空间, 有利于细胞附着、生长、连接, 并为其营养的流动传输及废料的代谢提供场所。②具有与膀胱组织再生相匹配的降解率和吸收率。③其表面化学性质适于细胞吸附、生长及分化。④去除含细胞抗原的细胞成分, 仅保留胶原蛋白、蛋白多糖、糖蛋白等低抗原物质, 移植后不易产生排斥反应, 能够为膀胱黏膜、平滑肌、血管、神经提供再生的支架^[7-8]。脱细胞膀胱黏膜下层是一种天然的细胞外基质生物材料, 主要由 I、III 型纤维胶原蛋白构成, 是一种理想的生物支架材料^[6]。

2006年Atala等^[9]首次报告了组织工程膀胱应用于临床的研究。他们选择了7例脊髓脊膜膨出伴膀胱功能异常的患者,先体外扩增患者自体的尿路上皮细胞和平滑肌细胞,再植入到膀胱脱细胞基质移植或胶原和聚乳酸材料复合支架上(早期的4例患者选用的是膀胱脱细胞基质移植,后3例选用的是胶原和聚乳酸材料的复合支架)。细胞支架复合物与保留三角区的原膀胱残基吻合,其中选用膀胱脱细胞基质移植支架的1例和选用胶原复合聚乳酸材料支架的3例均采用大网膜包裹以增加血供。术后平均随访46个月,膀胱顺应性在单纯膀胱脱细胞基质移植支架组较术前增加15%,而大网膜包裹组较术前增加67%。膀胱活检显示组织工程膀胱具有移行上皮、黏膜下层和肌层的正常结构,免疫组织化学染色进一步证实膀胱平滑肌和移行上皮表型正常。这一研究被众多学者誉为在膀胱重建手术中“具有里程碑意义”。Yang等^[10]研究表明,膀胱脱细胞基质中含有多种促组织再生和创面愈合的功能性生长因子,主要包括成纤维细胞生成因子(FGF)、转化生长因子 β (TGF- β)和血管内皮生长因子(VEGF)等,这些生长因子可能在诱导种子细胞向目的细胞分化方面起着重要的促进作用。任鹏程等^[11]将正常猪的膀胱用低渗、80℃反复冻融、DNase和RNase混合液消化和NaOH裂解连续方法制备脱细胞膀胱黏膜下层,结构保存完好,有良好的组织相容性,结果证明猪膀胱黏膜下层可能成为组织工程修复的替代材料。

毛囊干细胞是存在于毛囊外根鞘隆突部中的具有多向分化能力的干细胞,通过自身的分裂增殖及分化产生各种机体所需要的细胞,毛囊干细胞的研究直到其标志物CD34、K15及 β 1整合素等确定后才有了进一步的发展^[12]。毛囊干细胞相对于其他成体干细胞而言具有以下优势:来源丰富、位于体表取材容易、无创伤,且生长周期短,易于扩增。毛囊干细胞已被证明是再生医学的一个极好资源。Drewa等^[13]将鼠的毛囊干细胞种植于膀胱脱细胞基质中,然后回植于膀胱壁缺损的大鼠体内以观察其膀胱壁再生情况,实验显示,膀胱容量与正常膀胱容量相似且形状也较为规则,平滑肌层较厚并可见尿路上皮再生。而对照组单独移植膀胱脱细胞基质,虽容量与正常膀胱壁相似,但膀胱壁形状不规则且平滑肌层较薄。结果表明,将毛囊干细胞种植于膀胱脱细胞基质中可以发现再生的平滑肌层和尿路上皮细胞,可用于大鼠的膀胱壁的重建,但毛囊干细胞的安全性和相关诱导机制还需要进一步阐明。

本实验脱细胞膀胱基质的制备中参考Piechota等^[14]、张丽萍等^[15]的方法,最终联合采用显微分离及化学法对膀胱黏膜下层进行脱细胞处理,并在反复试验中不断改进,采用叠氮钠、脱氧胆酸钠、DNase-I等试剂对膀胱黏膜下层进行脱细胞处理,脱细胞后通过扫描

电镜及组织学检测,发现没有细胞残留,反复试验可证明该方法可以获得完全的脱细胞效果。需要注意的是,脱细胞化学试剂均具有细胞毒性(如叠氮钠属于无机剧毒物品),组织长时间浸泡在其中,经过各步骤脱细胞处理后,即使组织间仅残存微量脱细胞化学试剂,也会影响细胞的黏附和生长。重复实验结果也证明,大量PBS反复漂洗的支架材料负载的种子细胞,其细胞生长状态以及扩增的效率均优于对照组。因此,在脱细胞处理过程中,大量PBS反复漂洗对制备支架材料至关重要。

细胞与支架材料的不同结合方式和培养条件的选择是构建细胞-支架复合物首先面临的问题。Kim等^[16]将平滑肌细胞种植于可降解的生物支架材料上,对比平滑肌细胞在支架材料上静态培养与动态培养的区别,研究发现后者附着密度及分泌的弹性蛋白量均高于前者,将二者置于生物反应器中培养的效果更佳。

生物反应器有旋转式和搅拌式两种,理想的生物反应器应具备模拟组织或器官本身生理状态的功能,主要包括温度、酸碱度、生化信号、电生理及机械力学性能等。目前用于组织工程的生物反应器在组织工程皮肤、血管、骨等方面已有较多研究。种子细胞接种到支架材料上,再在生物反应器中进行三维动态培养并予以适当的电信号刺激或机械力学刺激,不仅有利于物质和气体交换,还有利于细胞外基质合成和组织发育、成熟^[17]。为满足储尿和排尿的需求,组织工程膀胱应具备可扩张、高顺应性等机械力学特征^[18]。目前,提供适合于膀胱功能特征的电信号及机械力学刺激的生物反应器尚处在研究摸索阶段,构建组织工程膀胱壁尚缺乏理想的生物反应器。

作者这次研究中,采用了二次沉淀法,即在第1次接种静置20 min后以同样方法接种第2次,目的在于使接种细胞更均匀的接种到支架表面,尽量使细胞与支架材料充分黏附并向材料内部渗透^[19]。通过组织切片染色可以看到,虽然大量的细胞仍主要集中在支架材料表面,但有部分细胞渗透到支架材料内部。这是由于静态接种时细胞悬液静置于材料表面,部分细胞随着液体向材料内部扩散而进入了材料内部,但这种被动的向内运动是有限的,大多数细胞在重力作用下仍堆积在材料表面,导致材料表面有大量细胞贴附,内部则较少。实验过程中发现,由于支架材料较小,静态接种时接种悬液体积通常仅有1.0-2.0 mL,要得到高的接种密度,只有提高接种悬液的浓度,而高的细胞悬液浓度容易导致细胞成团,造成孔隙堵塞,影响细胞进入材料内部。同时由于材料表面的细胞结合位点有限,很多细胞仅是松散地停留在表面,当加入培养基时,这部分细胞极易在加入培养基过程中脱离材料表面,因此接种率随着接种浓度的增加反而降低。所以充分考虑这两方面的原因,经过反复实验筛选,最终选择了 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的接种浓度,通

过组织切片检查, 结果较为理想。

实验结果表明, 毛囊干细胞与异种膀胱脱细胞基质体外培养具有良好的生物相容性, 这为进一步诱导分化提供了有利的实验基础。同时, 毛囊干细胞在异种膀胱脱细胞基质上的诱导分化过程中, 为更好的促进尿路上皮细胞、平滑肌组织以及血管、神经的再生, 是否需要再选择添加其他外源性诱导因子及其添加方式、具体剂量等方面也有待研究, 膀胱脱细胞基质诱导毛囊干细胞定向分化的机制将是进一步深入研究的重点。

作者贡献: 实验设计为第一、二作者, 实施为第一作者, 评估为第二、三作者, 第一作者成文, 通讯作者审核, 第一作者对文章负责。

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直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例, 并经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会审批通过。

学术术语: 膀胱脱细胞基质-是采用物理或化学方法脱去细胞后得到的膀胱黏膜下层组织, 仅保留 I、III 型胶原蛋白和弹性蛋白等低抗原物质, 移植后基本上不发生强烈的排斥反应, 能够为泌尿系种子细胞的再生提供良好的生物支架。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Cilento BG, Freeman MR, Schneck FX, et al. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol.* 1994;152(2 Pt 2):665-670.
- [2] Lai JY, Yoon CY, Yoo JJ, et al. Phenotypic and functional characterization of in vivo tissue engineered smooth muscle from normal and pathological bladders. *J Urol.* 2002;168(4 Pt 2):1853-1857.
- [3] Liu JY, Peng HF, Gopinath S, et al. Derivation of functional smooth muscle cells from multipotent human hair follicle mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(8): 2553-2564.
- [4] Drewa T. Using hair-follicle stem cells for urinary bladder-wall regeneration. *Regen Med.* 2008;3(6):939-944.
- [5] Atala A. Bladder regeneration by tissue engineering. *BJU Int.* 2001;88(7):765-770.
- [6] 王涌泉, 甘秀国, 安瑞华, 等. 膀胱无细胞基质移植重建同种异体兔膀胱的研究[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(18):1219-1222.
- [7] Fu Q, Deng CL, Liu W, et al. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int.* 2007;99(5):1162-1165.
- [8] Wallis MC, Yeger H, Cartwright L, et al. Feasibility study of a novel urinary bladder bioreactor. *Tissue Eng Part A.* 2008; 14(3):339-348.
- [9] Atala A, Bauer SB, Soker S, et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006;367(9518):1241-1246.
- [10] Yang B, Zhang Y, Zhou L, et al. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(5):1201-1211.
- [11] 任鹏程, 张旭东, 吕海港, 等. 脱细胞膀胱黏膜下层支架材料的生物学评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(8): 1365-1368.
- [12] 王祝迁, 木拉提·热夏提, 李佳, 等. 大鼠触须毛囊干细胞的分离培养和鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(27): 5031-5034.
- [13] Drewa T, Joachimiak R, Kaznica A, et al. Hair stem cells for bladder regeneration in rats: preliminary results. *Transplant Proc.* 2009;41(10):4345-4351.
- [14] Piechota HJ, Gleason CA, Dahms SE, et al. Bladder acellular matrix graft: in vivo functional properties of the regenerated rat bladder. *Urol Res.* 1999;27(3):206-213.
- [15] 张丽萍, 杨嗣星, 王玲珑. 膀胱细胞外基质的研制[J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2004, 25(3):339-341.
- [16] Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, et al. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng.* 1998; 57(1):46-54.
- [17] Sypniewski D, Machnik G, Mazurek U, et al. Distribution of porcine endogenous retroviruses (PERVs) DNA in organs of a domestic pig. *Ann Transplant.* 2005;10(2):46-51.
- [18] Martin Y, Vermette P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials.* 2005;26(35):7481-7503.
- [19] 徐明曦, 周哲, 张明, 等. 人脂肪来源干细胞与胶原支架共培养的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2012, 8(4):189-194.