

大鼠肠道平滑肌胶原条带构建及周期性拉伸培养的体外评价

于朋鑫, 韩禹秋, 郭丽娜, 王秀丽

<https://doi.org/10.12307/2024.806>

投稿日期: 2023-09-15

采用日期: 2023-12-14

修回日期: 2024-01-23

在线日期: 2024-02-07

中图分类号:

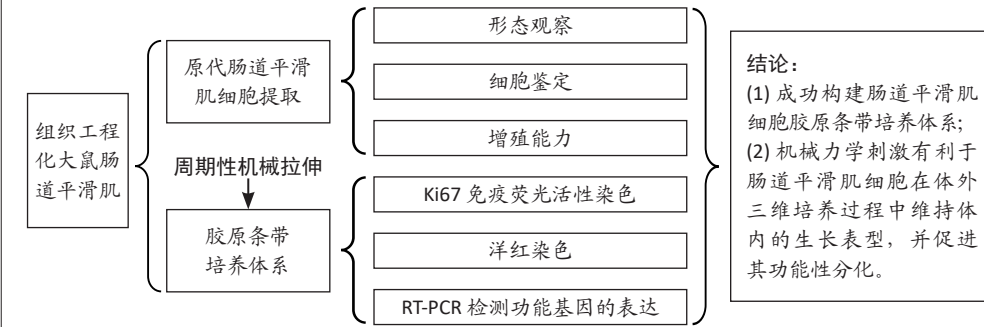
R459.9; R329.3; Q811.9

文章编号:

2095-4344(2024)35-05630-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 周期性机械拉伸对胶原条带内肠道平滑肌细胞生长活性以及功能基因表达的影响



文题释义:

胶原条带: 鼠尾胶原溶液和10×高糖DMEM溶液与大鼠原代肠道平滑肌细胞混匀接种至琼脂糖凝胶模具, 成胶后即获得胶原条带。

组织工程化肠道: 由种子细胞和生物材料支架构成, 通过组织工程方法体外模拟具有体内肠道组织细胞、形态和功能特性的模型。

摘要

背景: 肠道平滑肌层是肠道管壁结构的重要组成部分, 在组织工程化肠道的仿生构建中备受关注。

目的: 探索周期性机械拉伸对胶原条带内肠道平滑肌细胞生长活性以及功能基因表达的影响。

方法: 以自制鼠尾胶原为支架, 以大鼠原代肠道平滑肌细胞为种子细胞, 同时结合自主设计的胶原条带拉伸培养装置, 构建肠道平滑肌细胞胶原条带培养体系, 采用EthD-1/Calcein-AM细胞活性染色、洋红染色、细胞骨架-Ki67免疫荧光染色观察细胞的生长活性与增殖情况, 定量RT-PCR检测desmin、 α -sma、vimentin功能基因的表达。

结果与结论: ①成功构建肠道平滑肌细胞胶原条带培养体系, 条带内肠道平滑肌细胞具有良好的细胞活性; ②与静态培养相比, 周期性拉伸动态培养条件下Ki67阳性表达的细胞数量增多且显著高表达标志性基因desmin、 α -sma、vimentin($P < 0.001$); ③结果表明: 机械力学刺激有利于肠道平滑肌细胞在体外培养过程中维持生长状态, 并促进其功能性分化。

关键词: 组织工程; 肠道平滑肌; 胶原条带; 动态拉伸; 胶原支架; 三维培养

The construction of rat intestinal smooth muscle collagen band and evaluation of periodic stretching culture *in vitro*

Yu Pengxin, Han Yuqiu, Guo Lina, Wang Xiuli

Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Yu Pengxin, MD, Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Xiuli, MD, Professor, Doctoral supervisor, Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Abstract

BACKGROUND: The *in vitro* construction of intestinal smooth muscle layer, as an important component of the intestinal wall, has attracted much attention in the bionic construction of tissue-engineered intestinal canal.

OBJECTIVE: To explore the effects of cyclic mechanical stretching on the growth activity of intestinal smooth muscle cells and the expression of functional genes within collagen strips.

METHODS: The collagen band culture system of intestinal smooth muscle cells was constructed using a self-designed collagen strip stretching culture device with self-made rat tail collagen as a scaffold and primary rat intestinal smooth muscle cells as seed cells. EthD-1/Calcein-AM cell activity staining, magenta staining, cytoskeleton-Ki67 immunofluorescence staining were used to observe the growth activity and proliferation of the cells, and quantitative RT-PCR was used to detect the expression of desmin, α -sma, and vimentin functional genes.

RESULTS AND CONCLUSION: The collagen band culture system of intestinal smooth muscle cells was successfully constructed, and intestinal smooth muscle cells in the band had good cell activity. The number of Ki67 positive cells increased and desmin, α -sma and vimentin were significantly overexpressed under cyclic stretching and dynamic culture conditions ($P < 0.001$). To conclude, mechanical stimulation is beneficial to maintain the growth phenotype of smooth muscle cells and promote their functional differentiation during three-dimensional culture *in vitro*.

Key words: tissue engineering; intestinal smooth muscle; collagen band; dynamic stretching; collagen scaffold; three-dimensional culture

大连医科大学, 辽宁省大连市 116000

第一作者: 于朋鑫, 女, 1994年生, 山东省威海市人, 汉族, 大连医科大学在读博士后, 主要从事肠道器官芯片方面的研究。

通讯作者: 王秀丽, 博士, 教授, 博士生导师, 大连医科大学, 辽宁省大连市 116000

<https://orcid.org/0000-0002-0867-1816> (王秀丽)

基金资助: 国家重点研发计划-政府间国际合作项目(2019YFE0117700), 项目负责人: 王秀丽

引用本文: 于朋鑫, 韩禹秋, 郭丽娜, 王秀丽. 大鼠肠道平滑肌胶原条带构建及周期性拉伸培养的体外评价[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(35):5630-5635.



Funding: National Key R&D Program of China, No. 2019YFE0117700 (to WXL)

How to cite this article: YU PX, HAN YQ, GUO LN, WANG XL. The construction of rat intestinal smooth muscle collagen band and evaluation of periodic stretching culture in vitro. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(35):5630-5635.

0 引言 Introduction

人体肠道是消化、吸收营养和水分、抵御病原体以及清除废物的重要器官。多种肠道疾病比如炎症性肠病、短肠综合征^[1]、癌症等严重影响了人类的生活质量和生命健康^[2]。现有相关疾病的医疗策略有很大的局限性：一方面全胃肠外营养会导致短肠综合征患者死亡率升高^[3-4]；另一方面肠道移植面临供者短缺、器官排斥和需要终身免疫抑制治疗等问题。因此，通过组织工程体外构建功能性肠道以实现替代治疗将可能为患者带来新的希望^[5-6]。

生理肠道的肠壁主要包括黏膜层、黏膜下层、肌层以及外膜层 4 层组织结构。目前组织工程化肠道的体外构建大多聚焦于肠道黏膜上皮的构建与评价研究^[7-8]。肠道内环外纵排列的平滑肌层不仅为肠壁提供主要的结构支持，而且在肠道的功能维持方面也发挥重要作用，比如肠道蠕动、免疫激活等。近年来肠平滑肌功能障碍被发现与多种疾病有关，包括肠假性梗阻、短肠综合征和帕金森病^[9-10]。因此，优化肠道平滑肌细胞培养体系对于功能性组织工程化肠道的构建和肠道疾病的研究均具有重要意义，但目前相关研究并不多见。

该研究以大鼠原代肠道平滑肌细胞为种子细胞，以胶原基质为培养支架，尝试建立肠道平滑肌细胞胶原条带培养体系，同时结合自主设计的拉伸培养装置对胶原条带实施周期性动态拉伸培养，通过对照静态培养体系，初步探索不同培养条件对胶原条带内细胞生长活性以及功能基因表达的影响。该研究预期建立肠道平滑肌胶原条带体外维持培养体系，从而为功能性组织工程化肠道的优化构建和肠道平滑肌相关疾病的研究奠定理想的模型基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外组织工程构建与观察实验，以大鼠原代肠道平滑肌细胞为种子细胞，以胶原基质为培养支架，建立肠道平滑肌细胞胶原条带培养体系，并对其实施周期性动态拉伸培养，组间比较采用 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 3-7 月在大连医科大学组织胚胎学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 新生 SD 大鼠 4-6 只，雌雄不限，体质量 12-16 g；雌性成年 SD 大鼠 1 只，体质量 220 g，由大连医科大学动物实验中心提供。所有动物实验及操作均按照大连医科大学动物伦理委员会规定进行，审批号为 AEE23106。

1.3.2 实验试剂和仪器 胶原酶 II 型、高糖 DMEM 培养基 (Gibco)；多聚赖氨酸 (Beyotime)；青链霉素混合液 (Solarbio)；胰蛋白酶-EDTA 消化液 (Solarbio Life Sciences)；琼脂糖 (Biowest)；洋红 (Sigma)；多聚甲醛、抗体稀释液、中性树脂 (Solarbio)；异丙醇、二甲苯 (科密欧)；Trizol 试剂 (Ambion

Life Technologies)；Live/Dead 染色试剂盒 (Invitrogen)；鼠尾胶原 (Collagen I)(Corning)；DAPI、肌间线蛋白 (Desmin) 兔抗人多克隆抗体 (Proteintech)；波形蛋白 (Vimentin) 兔抗人多克隆抗体、Ki67 兔抗人多克隆抗体、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 兔抗人多克隆抗体 (Abcam)；细胞培养箱、超净工作台 (Thermo)；激光共聚焦显微镜 (Leica DM4000B)；PCR 仪 (BIO-RAD)；恒温培养振荡器 (上海智城)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠肠道平滑肌细胞的分离培养 新生 SD 大鼠经体积分数 75% 乙醇浸泡 15-30 min 后沿腹部正中线打开腹腔，取出小肠并纵向剖开，然后用含 2% 双抗的 PBS 溶液反复漂洗，保留 1.0-2.0 cm 小肠备用。在解剖显微镜下分离肠肌层，机械剪碎组织后加入 0.2% 胶原酶 II 水浴 (37 °C) 消化 40 min；然后用细胞筛过滤收集所有消化后组织悬液；离心后 (1 500 r/min, 5 min) 重悬细胞沉淀至含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养基；计数细胞数量，以 5×10^6 密度接种至经多聚赖氨酸溶液 (0.01 mg/mL) 预包被的 10 cm 培养皿中，置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中静置培养。此后每 3 d 更换 1 次培养基，待细胞达 90% 融合后常规消化传代，标记细胞代数。批量冻存原代细胞 (P1-P3) 以备实验使用。

1.4.2 大鼠肠道平滑肌细胞的鉴定

(1) 免疫荧光染色：收集原代肠道平滑肌细胞的细胞爬片，经 PBS 冲洗后用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定，经 PBS 清洗、0.5% Triton X-100 溶液透膜、体积分数 5% 山羊血清封闭液处理后，分别与鼠抗人 Ki67 抗体 (1 : 200)， α -SMA 抗体 (1 : 200)，Desmin 抗体 (1 : 200) 和 Vimentin 抗体 (1 : 200) 于 4 °C 冰箱中孵育 12 h，经 PBS 充分清洗后与二抗羊抗鼠 -Alexa Fluor™ 488 (1 : 1 000) 于室温孵育约 1 h，用 DAPI 液 (2 μ g/mL) 室温复染细胞核 15 min，抗猝灭封片剂封固，荧光显微镜下观察拍照。

(2) 定量 RT-PCR：取大鼠小肠组织以及离心收集原代肠道平滑肌细胞沉淀，加入 TRIZOL 液溶解后采用氯仿-异丙醇方法提取总 RNA，微量核酸测定仪 (Nanodrop2000) 测定所提取 RNA 纯度与浓度。依据 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒说明反转录合成 cDNA，反应条件为：37 °C 15 min、85 °C 5 s、4 °C 保存。以 cDNA 为模板，依据 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 PCR 扩增，引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

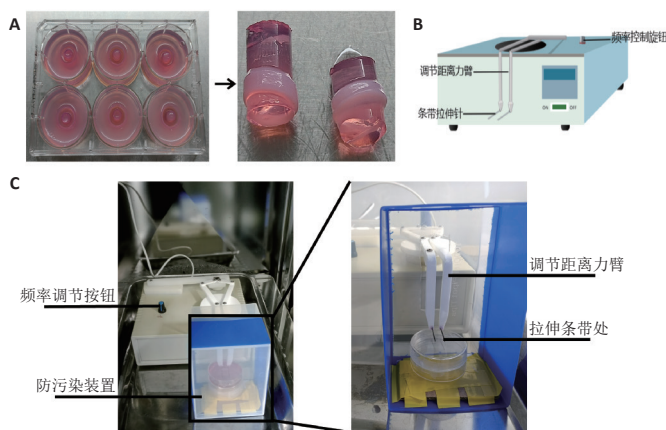
基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (3'-5')
vimentin	GTC CGT GTC CTC GTC CTC CTA C	AGT TGG CGA AGC GGT CAT TCA G
desmin	GTG GAG CGT GAC AAC CTG ATA GAC	TCA GAG ATG TTC TTA GCC GCA ATG G
α -sma	TAG AAC ACG GCA TCA TCA CCA ACT G	CAT CTC CAG AGT CCA GCA CAA TAC C
GAPDH	TCC AGT ATG ACT CTA CCC ACG	CAC GAC ATA CTC AGC ACC AG

表注：vimentin 为波形蛋白；desmin 为肌间线蛋白； α -sma 为 α -平滑肌肌动蛋白。

扩增条件为：95 °C 预变性 30 s，95 °C 变性 3 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s，40 个循环。实验中以 GAPDH 为内参、使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。每组样品至少设置 3 个复孔并进行 3 次独立重复实验。

1.4.3 鼠尾胶原制备 取 1 只成年 SD 大鼠鼠尾，体积分数 75% 无水乙醇浸泡 24 h 灭菌，剥离皮肤后将其剪成小节，抽取暴露的尾腱，并将之剪碎溶于 100 mL 体积分数 0.1% 冰醋酸，4 °C 放置待其充分溶解后，干燥差重法粗测胶原溶液浓度，所得胶原溶液放置 4 °C 保存备用。

1.4.4 肠道平滑肌胶原条带的体外构建与维持培养 应用 2% 琼脂糖溶液用于胶原条带制备的模具，见图 1。待琼脂糖凝胶模具定型后，采用无血清高糖 DMEM 培养基平衡 24 h。平滑肌胶原条带的制备过程：首先将胶原溶液 (2 mg/mL) 与 10× 高糖 DMEM 溶液按 9 : 1 体积比混合，然后加入适量 NaOH 溶液 (2 mol/L) 调整 pH 值至中性，调整胶原溶液终质量浓度为 2 mg/mL，置于冰浴内备用。



图注：图 A 为琼脂糖凝胶模具制作的胶原条带；B 为胶原条带拉伸装置示意图；C 为自制胶原条带拉伸装置实物图。

图 1 | 肠道平滑肌胶原条带的制备与拉伸方法

Figure 1 | The preparation and stretch of intestinal smooth muscle collagen bands

(1) 静态培养：将原代肠道平滑肌细胞 ($1 \times 10^9 L^{-1}$) 与胶原溶液 (2 mg/mL) 充分混匀并快速接种至琼脂糖凝胶模具，第 2 天脱模，获得环状条带，将其放入 6 孔板中，加入肠道平滑肌细胞培养基维持培养 4 d，隔天换液。

(2) 拉伸培养：将原代肠道平滑肌细胞 ($1 \times 10^9 L^{-1}$) 与胶原溶液 (2 mg/mL) 充分混匀并快速接种至琼脂糖凝胶模具，第 2 天脱模，获得环状条带，将其挂载至拉伸装置的拉伸臂部，按照 30 次 /min 的频率进行拉伸，持续拉伸 4 d，隔天换液。

采用自制拉伸装置对平滑肌胶原条带进行拉伸培养，见图 1C。该胶原条带拉伸装置由作者所在实验室自行设计组装，主要包括电机主件和拉伸臂原件 2 个功能单元。实验前对拉伸装置进行紫外照射灭菌处理，然后将平滑肌胶原条带从琼脂糖模具上缓慢脱离，挂载至拉伸装置的拉伸臂部，打开控制电机即可实现对胶原条带的周期性机械拉伸。设定参数为：频率 30 次 /min，整个胶原条带拉伸培养装置在培养过程

中放置于细胞培养箱内，体外培养 4 d，更换新鲜培养基 2 次。

1.5 主要观察指标

1.5.1 细胞活性染色 培养 4 d 后分别收集静态培养和拉伸培养的平滑肌胶原条带，PBS 清洗后直接加入 EthD-1/Calcein-AM 细胞活性染液，37 °C 避光孵育 2 h，然后用 PBS 清洗两三次以去除多余染液，最终置于激光共聚焦显微镜下进行观察、拍照。其中活细胞因产生钙黄绿素呈现绿色荧光，而死亡细胞则因细胞膜受到破坏而易于被 EthD-1 染色，呈现红色荧光。

1.5.2 洋红染色观察细胞的形态 培养 4 d 后分别收集静态培养和拉伸培养的平滑肌胶原条带，经 PBS 清洗后用 40 g/L 多聚甲醛室温固定，PBS 冲洗，加入 1% 洋红染液，在室温避光条件下振荡染色 24 h，然后将样品依次放入体积分数 30%，70%，90%，100% 无水乙醇中梯度脱水，再经二甲苯溶液透明后滴加中性树胶进行封固，37 °C 烘箱干燥，Keyence 显微镜下观察并拍照。

1.5.3 细胞骨架 -Ki67 免疫荧光染色观察细胞的生长与增殖情况 培养 4 d 后分别收集静态培养和拉伸培养的平滑肌胶原条带，用 40 g/L 多聚甲醛室温固定，经 PBS 清洗、0.5% Triton X-100 溶液透膜、体积分数 5% 山羊血清封闭液处理后，与鼠抗人 Ki67 抗体 (1 : 200) 于 4 °C 冰箱中孵育 12 h，经 PBS 充分清洗后与二抗羊抗鼠 -Alexa Fluor™ 488 (1 : 1 000) 于室温孵育约 1 h，经 PBS 充分清洗后用 DAPI 液 (2 μg/mL) 室温复染细胞核 15 min，经 PBS 充分清洗后继续加入 Phalloidin-FITC 染液进行室温染色 1 h，充分清洗后直接在激光共聚焦显微镜下进行观察、拍照。

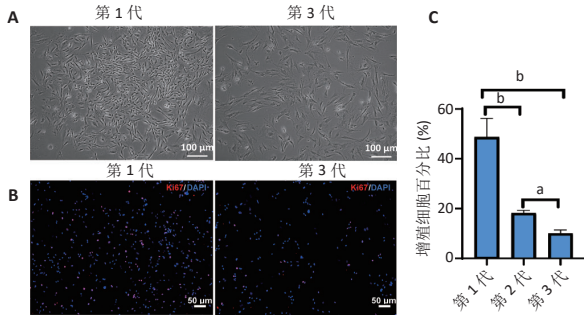
1.5.4 定量 RT-PCR 检测平滑肌细胞的功能性基因表达 培养 4 d 后分别收集静态培养和拉伸培养的平滑肌胶原条带，加入 TRIZOL 液溶解后用氯仿 - 异丙醇方法提取总 RNA，微量核酸测定仪 (Nanodrop2000) 测定所提取 RNA 纯度与浓度。反转录 cDNA 合成、目的基因 PCR 扩增以及结果分析如前 1.4.2 所述。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经通过大连医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 大鼠肠道平滑肌细胞的生长与形态表征 倒置显微镜下观察新分离的细胞呈椭圆形或梭形，长度各异，提示细胞可能处于不同的收缩舒张状态。培养 36 h 后细胞均已贴壁，呈梭形或多边形，单个细胞核居中，为卵圆形；胞质向外伸出长短不一的突起，多数细胞有两三个突起；细胞较悬浮状态时折光度降低，立体感强，胞浆丰富，无明显颗粒和空泡，见图 2A。细胞贴壁后可行体外传代扩增，但培养至第 3 代后，Ki67 免疫荧光染色阳性细胞数量降低，占总细胞百分比减少，见图 2B, C。第 6 代后细胞体积增加，形态呈衰老形态。

为了鉴定分离后的肠道平滑肌细胞，分别检测了平滑肌细胞的特异性标志蛋白 α -SMA、Desmin 的表达。免疫荧光染

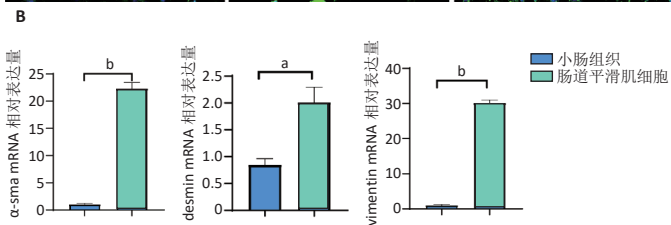
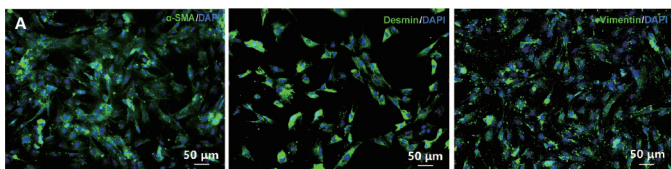


图注：图A为新分离的第1代及第3代大鼠肠道平滑肌细胞光镜图片（倒置相差显微镜），可见第3代增殖能力显著减弱；B为第1代及第3代大鼠肠道平滑肌细胞 Ki67 免疫荧光染色（红色），细胞核经 DAPI 染色显示蓝色荧光，可见第3代细胞 Ki67 表达降低（荧光显微镜）；C为免疫荧光染色半定量分析，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.001$ 。

图2 | 大鼠肠道平滑肌细胞的生长与形态表征

Figure 2 | The growth and morphology characterization of rat intestinal smooth muscle cells

色显示：肠道平滑肌细胞均阳性表达 α -SMA(+)、Desmin(+), Vimentin(+), 见图 3A。与之相一致，RT-PCR 检测结果也显示：所分离的细胞在基因转录水平可高表达标志基因 *desmin*, α -sma, *vimentin*, 见图 3B。上述结果证明已成功分离获得了新生大鼠肠道平滑肌细胞。



图注：图A为 α -sma、desmin 及 vimentin 免疫荧光染色（绿色），细胞核经 DAPI 染色显示蓝色荧光，提示所分离细胞正常表达平滑肌细胞的特异性标志蛋白（荧光显微镜）；B为 RT-PCR 检测大鼠小肠组织及肠道平滑肌细胞 *desmin*, α -sma, *vimentin* mRNA 的表达，提示所分离的细胞在基因转录水平可高表达标志基因，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.0001$ 。 α -SMA： α -平滑肌肌动蛋白；Desmin：肌间线蛋白；Vimentin：波形蛋白。

图3 | 大鼠肠道平滑肌细胞的免疫荧光及基因鉴定

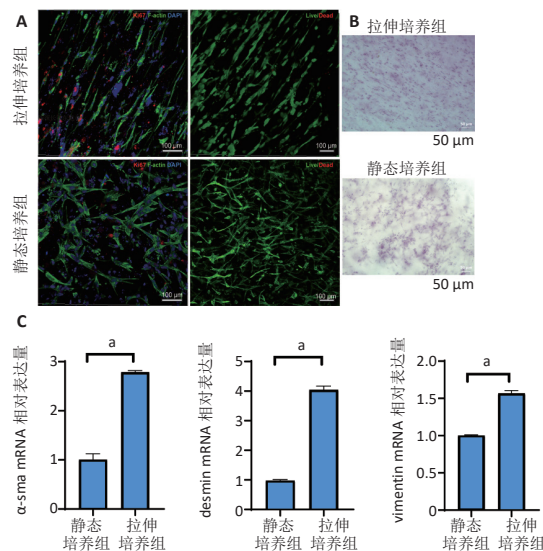
Figure 3 | Immunofluorescence and gene identification of rat intestinal smooth muscle cells

2.2 肠道平滑肌胶原条带的成功制备与表征 倒置相差显微镜下可观察到：大鼠肠道平滑肌细胞均呈现圆形，均匀分布于胶原凝胶内。胶原在模具内凝固后，大体可见胶原条带紧紧收缩环绕在琼脂糖凝胶柱的周边，见图 1A。由于收缩后的条带变得更为致密，导致透光性下降，因而在镜下难以进行清晰成像拍照。但镜下仍能够辨认出肠道平滑肌细胞形态变得更加伸展。随着培养时间的延长，胶原条带内的细胞数量有所增加，这提示胶原不但能够为肠道平滑肌细胞体外维持培养提供三维培养空间，而且还有利于细胞增殖与活性的体外维持。

对胶原条带内肠道平滑肌细胞进行 EthD-1/Calcein-AM 活性染色发现：大多数细胞均显示绿色荧光，少有细胞被 EthD-1 染色而显示红色荧光，见图 4A。该结果表明条带内肠道平滑肌细胞具有良好的细胞活性。

2.3 周期性拉伸维持培养对胶原条带平滑肌细胞生长表型与基因表达的影响 为了优化胶原条带的体外维持培养条件，实验室自行设计搭建了可用于胶原条带拉伸的机械装置。当把胶原条带搭载到拉伸臂后，因为受到机械张力的作用，游离的条带不会发生“shrink”，从而利于胶原条带和条带内细胞保持其初始形态。

Whole-mount 洋红组织学染色结果显示：不同培养条件下（动态拉伸培养或静态培养），胶原条带内细胞的生长形态差异显著，见图 4B。经拉伸培养后，肠道平滑肌细胞形态显示为典型的长梭形，细胞长轴多沿胶原条带的长轴反向进行纵向排列，显示出明显的排列方向性—该特征与其体内形态更为接近。与该结果相一致，细胞活性染色和细胞骨架荧光染色结果又进一步明确了这种定向排列的分布特征：细胞方向性排列，具有良好的细胞活性。而与之相对比，静态培养胶原条带内的细胞形态并未呈现出明显的延展拉伸形态特征，且在胶原条带内的分布排列随机，并不具备明显的方向性。此外研究结果还发现：对比静态培养条件下的平滑肌胶原条带，经体外周期性拉伸培养的胶原条带内 Ki67 阳性表达的细胞数量增多，见图 4A。这提示周期性拉伸动态培养条件可能更利于肠道平滑肌细胞在体外三维培养过程中维持增殖活性。



图注：图A为胶原条带内肠道平滑肌细胞的细胞骨架（绿色）以及 Ki67（红色）免疫荧光染色，细胞核经 DAPI 染色显示蓝色荧光，可见拉伸培养组 Ki67 阳性表达的细胞数量增多；EthD-1/Calcein-AM 活性染色中活细胞显示绿色，死细胞显示红色，说明细胞活性良好（荧光显微镜）；B为胶原条带 Whole-mount 洋红组织学染色，可见细胞的生长形态差异显著（荧光显微镜）；C为定量 RT-PCR 检测标志基因 *desmin*, α -sma, *vimentin* 的表达，可见拉伸培养组标志基因显著高表达，^a $P < 0.001$ 。 α -SMA： α -平滑肌肌动蛋白；Desmin：肌间线蛋白；Vimentin：波形蛋白。

图4 | 胶原条带培养大鼠原代肠道平滑肌细胞的生长表型与基因表达
Figure 4 | Growth phenotype and gene expression of primary rat intestinal smooth muscle cells before and after collagen band stretching

定量 RT-PCR 检测结果显示：与静态培养组相比，拉伸培养组内肠道平滑肌细胞可显著高表达标志性基因 *desmin*、*α-sma*、*vimentin*，见图 4C。该结果证明：周期性机械力学刺激能够促进肠道平滑肌细胞的功能性分化。

3 讨论 Discussion

肠道被称为人体的“第二大脑”，肠道的组织工程化构建研究越来越为基础医学和临床转化研究领域所关注^[11-12]。功能性组织工程化肠道不但能够为肠道发育及疾病研究提供理想的生理与病理模型^[13]，还能够为肠道衰竭患者提供理想的临床替代治疗潜能^[14]，并且能够促进肠道术后恢复^[15]，在临床具有广泛应用前景。

肠道的生理功能依赖于蠕动这一独特的运动模式^[16]，主要由神经系统和平滑肌控制^[17]。平滑肌是构成肠壁的重要组织结构，其特有的内环行、外纵行的组织学结构，不但能够为中空性肠壁提供机械支撑，而且还能协同肠道神经系统调控肠道功能所需的蠕动收缩力，其功能失调是导致肠动力障碍的重要因素。此外，肠道平滑肌细胞还参与肠道分化和维持黏膜上皮的稳态，在肠道炎症的发生、发展以及肠道神经-免疫微环境调节中发挥重要作用^[18-19]。研究发现，在鸡胚中肠的胚胎发育过程中，肠神经系统的发育与早期肠平滑肌细胞的分化密切相关^[20]。而在炎症肠病的早期阶段，肠道平滑肌还参与肠神经系统活性的调控，炎性细胞因子能够上调肠道平滑肌细胞中神经营养因子的表达水平^[21]。在人类疾病和动物模型中，肠道平滑肌细胞的增生与肥大伴随炎症反应是肠道慢性炎症和纤维化的主要病理改变，即使在炎症缓解后也难以逆转，导致肠道狭窄，从而使肠道消化与吸收功能的异常^[22]。由此可见，肠道平滑肌在肠道生理及病理性过程中均扮演重要角色。

该实验研究聚焦于肠道平滑肌层的组织工程化体外构建，以大鼠原代肠道平滑肌细胞为种子细胞，以鼠尾胶原为培养支架，同时结合自主设计的胶原条带拉伸培养装置，成功构建了肠道平滑肌细胞胶原条带培养体系，并建立了相关的细胞与组织学检测评价平台。前期也有肠道平滑肌模型体外构建的相关报道。有研究者先后以去细胞化细胞外基质^[23-25]、胶原海绵^[26-27]、负载生长因子的聚乙醇酸支架^[28-29]、聚己内酯电纺丝为支架体外构建了平滑肌细胞的三维培养体系^[30-31]。但这些培养体系内的平滑肌细胞随机分布，并不具备方向性排列，从而显著区别于体内肠道平滑肌“内环外纵”的特定排布特征。已有研究由于重建平滑肌层排列存在挑战而再生肠道平滑肌层失败^[32]。为了进一步优化构建肠平滑肌三维模型，Bitar 实验室通过接种兔结肠源纵层平滑肌细胞至经层粘连蛋白包被的具有纵行拓扑结构的硅胶模板表面，成功建立了具有纵向排列特征的平滑肌三维培养模型^[33-34]；后期该团队进一步将兔结肠源环层平滑肌细胞接种在凝血酶聚合的纤维蛋白原水凝胶后再整合胶原-壳聚糖管状支架，成功构建了组织工程化环状平滑肌培养模型，该模型体系内平滑肌细胞不但具有与体内平滑肌细胞相似的组织形态学特征，而且还

能够对生理相关神经递质如乙酰胆碱产生应答，从而表现出收缩与舒张的功能活性^[28]。还有研究通过构建取向性丝蛋白支架影响接种细胞的定向排列以模拟生理状态肠道结构^[35]。近期作者所在实验室合作团队在此领域也有相关报道：采用经向和纬向卷曲整合的拓扑丝素蛋白纤维支架可仿生构建具有“内环外纵”结构特征的肠平滑肌层^[36]。由此可见，肠道平滑肌的取向仿生构建已取得了若干具有重要意义的研究进展。

但需要指出是：上述研究中所构建的平滑肌培养模型却少有考虑机械力学因素对平滑肌细胞定向生长的影响。在胚胎早期，静态纵向的机械应力会导致肠道的延伸生长^[37]，且肠道的蠕动高度依赖于机械刺激^[38]。已有研究证明：机械力学刺激是促进肌细胞生长与分化的关键因素。对体外培养的心肌细胞施以周期性拉伸的机械刺激后，心肌细胞不但能够高表达特异性功能基因与蛋白（ZO-1, Occludin, Troponin-T），而且还能够改善肌丝定向排列和闰盘形成，进而增强细胞的功能活性^[39]。与之相类似，对血管平滑肌细胞施加周期性力学刺激可显著提升血管平滑肌细胞的表型与功能活性^[40]。该研究对所构建的肠道平滑肌胶原条带实施机械拉伸后，发现胶原条带内平滑肌细胞的增殖活性显著提高，且具有典型的拉伸后形态改变：长梭形胞体拉长，沿胶原条带长轴定向排列，同时显著上调标志性功能基因表达。这些结果均提示：机械力学刺激有利于平滑肌细胞在体外三维培养过程中维持体内的生长表型，并促进其功能性分化。该研究结果也为深入论证“机械力学刺激是促进肌细胞生长与分化的关键微环境因素”这一科学论点提供了新的实验数据支撑。

该研究模型构建采用大鼠原代肠道平滑肌细胞为种子细胞，原代细胞通常存在多次传代后增殖速度减慢的问题，因此控制种子细胞代数为 3 代以内。此外，所用的三维培养基质为生物相容性更为理想的胶原凝胶，这一方面更利于真实模拟体内肠道平滑肌细胞生长微环境中的基质因素，另一方面也利于在体外培养过程中实现机械性拉伸刺激。该研究对所构建的肠道平滑肌模型体系仅进行了细胞生长、形态和表型方面的基本评价，而有关功能活性的检测仍有待进一步深入完善。

综上，该研究以大鼠原代肠道平滑肌细胞为种子细胞，以鼠尾胶原条带为培养支架，同时结合自主设计的胶原条带拉伸培养装置，成功构建了肠道平滑肌细胞胶原条带培养体系。该研究工作将可能为组织工程化功能性肠道的体外构建奠定实验基础，同时所构建的肠道平滑肌胶原条带将可能为肠道平滑肌的生理及病理性研究提供新的模型工具。

作者贡献：实验设计为王秀丽，实验实施为韩禹秋、于朋鑫，实验评估为郭丽娜。王秀丽和于朋鑫成文，王秀丽审核。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] TULLIE L, JONES BC, DE COPPI P, et al. Building gut from scratch - progress and update of intestinal tissue engineering. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022;19(7):417-431.
- [2] BINES JE. Intestinal failure: A new era in clinical management. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24 Suppl 3:S86-92.
- [3] WALES PW, DE SILVA N, KIM J, et al. Neonatal short bowel syndrome: population-based estimates of incidence and mortality rates. *J Pediatr Surg.* 2004;39(5):690-695.
- [4] SPENCER AU, NEAGA A, WEST B, et al. Pediatric short bowel syndrome: redefining predictors of success. *Ann Surg.* 2005;242(3):403-409.
- [5] BITAR KN, ZAKHEM E. Bioengineering the gut: future prospects of regenerative medicine. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(9):543-556.
- [6] ZAKHEM E, RAGHAVAN S, SUHAR RA, et al. Bioengineering and regeneration of gastrointestinal tissue: where are we now and what comes next? *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19(6):527-537.
- [7] COSTA J, AHLUWALIA A. Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:144.
- [8] LI N, WANG D, SUI Z, et al. Development of an improved three-dimensional in vitro intestinal mucosa model for drug absorption evaluation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;19(9):708-719.
- [9] POIRIER AA, AUBÉ B, CÔTÉ M, et al. Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Parkinsons Dis.* 2016;2016:6762528.
- [10] CARROLL RE, BENEDETTI E, SCHOWALTER JP, et al. Management and Complications of Short Bowel Syndrome: an Updated Review. *Curr Gastroenterol Rep.* 2016;18(7):40.
- [11] BEIN A, SHIN W, JALILI-FIROOZINEZHAD S, et al. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018;5(4):659-668.
- [12] COLLIER CA, MENDIONDO C, RAGHAVAN S. Tissue engineering of the gastrointestinal tract: the historic path to translation. *J Biol Eng.* 2022;16(1):9.
- [13] MOYSIDOU CM, BARBERIO C, OWENS RM. Advances in Engineering Human Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;8:620962.
- [14] DUNN JCY. Intestinal Bioengineering. *Clin Transpl.* 2016;32:1-4.
- [15] GRIKSCHIT TC, SIDDIQUE A, OCHOA ER, et al. Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection. *Ann Surg.* 2004;240(5):748-754.
- [16] LAMBONI L, XU C, CLASOHM J, et al. Silk sericin-enhanced microstructured bacterial cellulose as tissue engineering scaffold towards prospective gut repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;102:502-510.
- [17] HU Y, QIN Z, YOU R, et al. The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. *Adv Mater Sci Eng.* 2012;2012:185905-185909.
- [18] SZCZEPANSKI HE, FLANNIGAN KL, MAINOLI B, et al. NR4A1 modulates intestinal smooth muscle cell phenotype and dampens inflammation-associated intestinal remodeling. *FASEB J.* 2022;36(11):e22609.
- [19] LIU J, ZHANG P, ZHENG Z, et al. GABAergic signaling between enteric neurons and intestinal smooth muscle promotes innate immunity and gut defense in *Caenorhabditis elegans*. *Immunity.* 2023;56(7):1515-1532.e9.
- [20] CHEVALIER NR, AGBESI RJA, AMMOUCHE Y, et al. How Smooth Muscle Contractions Shape the Developing Enteric Nervous System. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:678975.
- [21] HAN TY, LOURENSSEN S, MILLER KG, et al. Intestinal smooth muscle phenotype determines enteric neuronal survival via GDNF expression. *Neuroscience.* 2015;290:357-368.
- [22] CHEN H, LI X, GAO L, et al. Construction and identification of an immortalized rat intestinal smooth muscle cell line. *Neurogastroenterol Motil.* 2022;34(8):e14359.
- [23] PATIL PB, CHOUGULE PB, KUMAR VK, et al. Recellularization of acellular human small intestine using bone marrow stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(4):307-315.
- [24] FINKBEINER SR, FREEMAN JJ, WIECK MM, et al. Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids. *Biol Open.* 2015;4(11):1462-1472.
- [25] DEW L, ENGLISH WR, CHONG CK, et al. Investigating Neovascularization in Rat Decellularized Intestine: An In Vitro Platform for Studying Angiogenesis. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(23-24):1317-1326.
- [26] HORI Y, NAKAMURA T, MATSUMOTO K, et al. Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. *Int J Artif Organs.* 2001;24(1):50-54.
- [27] NAKASE Y, HAGIWARA A, NAKAMURA T, et al. Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng.* 2006;12(2):403-412.
- [28] ZAKHEM E, RAGHAVAN S, GILMONT RR, et al. Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials.* 2012;33(19):4810-4817.
- [29] LIU Y, NELSON T, CROMEENS B, et al. HB-EGF embedded in PGA/PLLA scaffolds via subcritical CO₂ augments the production of tissue engineered intestine. *Biomaterials.* 2016;103:150-159.
- [30] KOBAYASHI M, KHALIL HA, LEI NY, et al. Bioengineering functional smooth muscle with spontaneous rhythmic contraction in vitro. *Sci Rep.* 2018;8(1):13544.
- [31] DULING RR, DUPAIX RB, KATSUBE N, et al. Mechanical characterization of electrospun polycaprolactone (PCL): a potential scaffold for tissue engineering. *J Biomech Eng.* 2008;130(1):011006.
- [32] HORI Y, NAKAMURA T, KIMURA D, et al. Experimental study on tissue engineering of the small intestine by mesenchymal stem cell seeding. *J Surg Res.* 2002;102(2):156-160.
- [33] RAGHAVAN S, LAM MT, FOSTER LL, et al. Bioengineered three-dimensional physiological model of colonic longitudinal smooth muscle in vitro. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(5):999-1009.
- [34] RAGHAVAN S, BITAR KN. The influence of extracellular matrix composition on the differentiation of neuronal subtypes in tissue engineered innervated intestinal smooth muscle sheets. *Biomaterials.* 2014;35(26):7429-7440.
- [35] 吴数. 体外构建各向异性的丝蛋白三维肠道模型的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [36] CHEN Y, GUO C, MANOUSIOUTHAKIS E, et al. Bi-layered Tubular Microfiber Scaffolds as Functional Templates for Engineering Human Intestinal Smooth Muscle Tissue. *Adv Funct Mater.* 2020;30(17):2000543.
- [37] CHEVALIER NR, DE WITTE TM, CORNELISSEN AJM, et al. Mechanical Tension Drives Elongational Growth of the Embryonic Gut. *Sci Rep.* 2018;8(1):5995.
- [38] SPENCER NJ, COSTA M, HIBBERD TJ, et al. Advances in colonic motor complexes in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2021;320(1):G12-G29.
- [39] ZHAO YS, WANG CY, LI DX, et al. Construction of a unidirectionally beating 3-dimensional cardiac muscle construct. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(8):1091-1097.
- [40] KIM BS, MOONEY DJ. Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions. *J Biomech Eng.* 2000;122(3):210-215.

(责任编辑: LWJ, MZH, ZN, WL)