

## • 基础研究 •

## 小肠粘膜下层在膀胱组织修复中生长因子释放的研究

林茂虎<sup>1,2</sup>, 郁华亮<sup>2</sup>, 苗芮<sup>2</sup>, 秦万长<sup>2</sup>, 贾宁<sup>3</sup>, 李娟<sup>4</sup>

[摘要] 目的 了解小肠粘膜下层(SIS)在膀胱组织修复中外源性生长因子血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)释放。方法 用 ELISA 法和 MTT 法体外测量冻干 SIS 在 PBS 孵育液中 VEGF 和 bFGF 的含量及对上皮细胞的增殖作用;用猪小肠粘膜下层行大鼠膀胱部分修复。术后在不同时间观察大鼠膀胱修复情况,并用组织学免疫组化方法观察 VEGF 和 bFGF 的表达,单纯大鼠粘膜及部分肌层缺损组作为对照。结果 SIS 在 PBS 孵育液中 bFGF 含量约为 $(121.8 \pm 2.683) \text{ ng/L}$ , VEGF 含量约为 $(93.8 \pm 3.033) \text{ ng/L}$ ,且对上皮细胞有促进增殖作用。移植的 SIS 上可见新生毛细血管和平滑肌肌束。实验组和对照组 VEGF 和 bFGF 在术后第 1 周均呈弱阳性表达,第 2 周以后实验组 VEGF 和 bFGF 表达逐渐增强,至第 6 周达到高峰,第 8 周 VEGF 和 bFGF 的表达逐渐减弱;而对照组在第 1~10 周 VEGF 和 bFGF 的表达均呈弱阳性,未见明显的表达高峰。结论 SIS 作为载体将外源性生长因子带入大鼠体内,在 SIS 逐渐降解的同时释放生长因子,刺激血管生成和宿主细胞的长入和分化。

[关键词] 小肠粘膜下层(SIS);膀胱;修复;血管内皮生长因子(VEGF);成纤维细胞生长因子(FGF);大鼠

Bladder Regeneration by Small Intestinal Submucosa with Release of Exogenous Growth Factors LIN Mao-hu, YU Hua-liang, MIAO Rui, et al. Postgraduate College of the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, Shaanxi, China

**Abstract:** **Objective** To explore the release of exogenous growth factors from small intestinal submucosa (SIS) in bladder regeneration. **Methods** The release of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) from SIS in vitro were evaluated by ELISA and MTT method. The defected bladder walls of rats in experimental group were repaired with porcine small intestinal submucosa. Partial bladder mucosa and smooth muscle of the rats in control groups were destroyed. At regular intervals, the VEGF and bFGF expression were observed by histological and immunohistochemical methods. **Results** The concentration of bFGF and VEGF released in vitro from SIS in PBS solution were  $(121.8 \pm 2.683) \text{ ng/L}$  and  $(93.8 \pm 3.033) \text{ ng/L}$  respectively, and showed proliferation of vascular endothelial cell. In the SIS framework, the capillary and smooth muscle were observed followed histological evaluation. The weak expression of VEGF and bFGF in both experimental and control groups were found in the first week. Since the second week the VEGF and bFGF expression in experimental group began to increase with a peak in the 6th week, and began to decrease after 8 weeks. In the control group, the weak VEGF and bFGF expression were shown during the observation. **Conclusion** SIS functions as a carrier for exogenous growth factors release in rat bladder regeneration.

**Key words:** small intestinal submucosa (SIS); bladder; regeneration; vascular endothelial growth factor (VEGF); fibroblast growth factor (FGF); rats

[中图分类号] R694 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)07-0578-03

[本文著录格式] 林茂虎,郁华亮,苗芮,等.小肠粘膜下层在膀胱组织修复中生长因子释放的研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(7):578—580.

膀胱扩大术和替代术是治疗由先天性或因炎症、感染、肿瘤、创伤引起的膀胱病损的常用术式。由于缺乏足够的自体泌尿系组织作为修复物,人们尝试用天然或合成材料作为膀胱重建术的替代材料。聚乙烯海绵、尼龙等曾被作为替代材料用于实验或临床中,但因合成材料存在结构、组织相容性或机械性能等方面的问题而限制了其使用;目前临床多采用胃肠道组织作为替代材料,但会产生如生理代谢异常、感染、穿孔、形

成结石或发生恶性肿瘤等不同程度的不良反应。小肠粘膜下层(small intestinal submucosa, SIS)是天然细胞外基质类生物衍生材料,通常由猪小肠制备,具有免疫原性低和生物相容性好的特点,引起了人们广泛关注。SIS 植入宿主体内后,能迅速诱导细胞浸润,刺激血管生成和宿主细胞的长入和分化,产生的再生组织在结构和功能上均与原有组织相似,但其确切机制还不清楚。我们制备了 SIS,将其应用于大鼠膀胱重建,并在体外和大鼠体内对血管内皮细胞生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的含量及对细胞的增殖作用进行了观察。

## 1 材料与方法

1.1 材料 雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 200~250 g (动物质量合格证号:SCXK-(军)2002-001); VEGF 和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30300349)。

作者单位:1.第四军医大学研究生院,陕西西安市 710032;2.解放军总医院第一附属医院泌尿外科,北京市 100037;3.解放军总医院医院感染与疾病控制科,北京市 100853;4.二炮通信总站卫生队,北京市 100085。作者简介:林茂虎(1969-),男,黑龙江齐齐哈尔市人,主治医师,主要从事泌尿外科临床工作。

bFGF ELISA 试剂盒:晶美生物公司;免疫组化抗体和 MTT:华美生物工程公司;人内皮细胞株 ECV-304 由军事医学科学院惠赠。

1.2 方法

1.2.1 SIS 的制备 无菌操作取一段实验用小型猪小肠,剪去肠系膜,刮去小肠外膜层及肌层,翻转小肠,使粘膜层朝外,同法刮去粘膜上皮层和固有层,剩下一层约 0.1 mm 厚,白色半透明的薄膜,浸泡于 10 %硫酸新霉素溶液中消毒约 20 min,冻干保存。

1.2.2 大鼠膀胱重建 将大鼠按随机数字分为实验组和对照组,每组 18 只。实验组大鼠麻醉成功后,取腹正中切口切开显露膀胱,游离出膀胱顶部,切除约 1 × 1 cm,取消毒处理后的小肠粘膜下层,用可吸收线全层吻合于膀胱缺损区,吻合后边缘用丝线标记。对照组制作同实验组面积相同的膀胱粘膜及部分肌层缺损。分别在术后 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周取植入的小肠粘膜下层和再生组织,固定于 4 %多聚甲醛溶液中 24 h,脱水、透明、浸腊包埋后切片,苏木精-伊红染色,观察大鼠膀胱修复情况。

1.2.3 免疫组化染色 经 95 %乙醇固定 10 min, PBS 洗涤 2 次,每次 3 min;室温干燥后加入 30 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温下 20 min 灭活内源性过氧化物酶, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入 100 ml/L 羊血清封闭 30 min,甩掉多余血清。向细胞爬片中依次滴加 1:1000 稀释的 VEGF 一抗和 bFGF 一抗,37 ℃静置 1 h, PBS 洗涤 3 次,加入生物素标记的 VEGF 二抗和 bFGF 二抗,37 ℃ 40 min, PBS 洗涤,加入 SABC 复合物,37 ℃ 30 min,显微镜下用 DAB 显色。常规脱水至透明及封片,光镜下观察。每张组织切片光镜下随机取 1 个视野,观察 100 个细胞,统计 VEGF 和 bFGF 阳性细胞数。

1.2.4 ELISA 法检测 SIS 内 VEGF 和 bFGF 蛋白含量 取冻干的 SIS 10 mg,置于 PBS 1 ml (pH = 7.4) 中 37 ℃摇动孵育,于不同时间点取样,按 ELISA 试剂盒说明书测定标准品及样品 VEGF 和 bFGF 的蛋白含量。

1.2.5 MTT 法检测 VEGF 和 bFGF 的生物学活性 将人内皮细胞株 ECV-304 用含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基培养后,以 2 × 10<sup>3</sup>/孔的密度接种于 96 孔培养板中,24 h 后换无血清培养基培养 12 h,将各孔换成 10 %胎牛血清液,分别加入 1/2 体积的上述 SIS 孵育液或 PBS,继续培养 48 h,加入 MTT 后 4 h 弃上清液,再加入 DMSO 液 100 μl,震荡摇晃,待蓝色沉淀充分溶解后,用酶标仪测定各孔 OD<sub>480</sub> 光密度值。

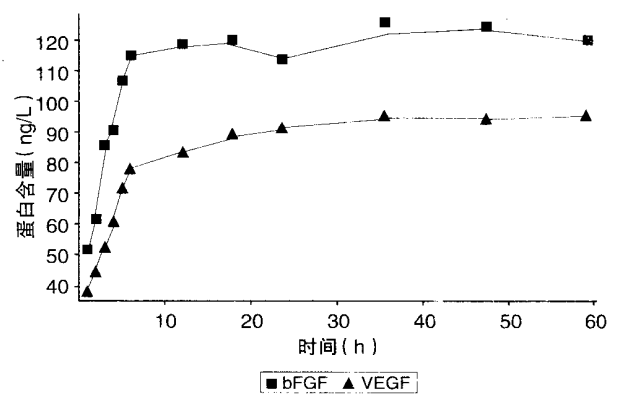
1.3 统计学方法 采用 SAS 6.0 软件进行 t 检验, P

< 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 体外 SIS 中 VEGF 和 bFGF 的蛋白含量和活性

SIS 在 PBS 液中孵育 36 h 后,VEGF 和 bFGF 浓度达到高峰,VEGF 含量约为 (93.8 ± 3.033) ng/L, bFGF 含量约为 (121.8 ± 2.683) ng/L (图 1)。MTT 法检测 SIS 孵育液对上皮细胞的增殖作用中,实验组 OD 值为 (0.232 ± 0.054),高于对照组 (0.087 ± 0.029) (P = 0.014) 图 1 SIS 体外培养时 VEGF 和 bFGF 变化



2.2 大鼠体内 SIS 组织修复再生的组织学变化 实验组术后 1 周 SIS 上可见膀胱移行上皮形成,同时有炎性细胞浸润;第 2 周 SIS 上可见新生毛细血管渗入;第 4 周已有完整膀胱移行上皮形成,同时可见少量不成熟平滑肌纤维细胞;第 10 周可见明显的平滑肌肌束。对照组术后第 1 周膀胱缺损区已有膀胱移行上皮形成,第 2 周新生的膀胱粘膜已覆盖缺损区。免疫组化显示,实验组和对照组 VEGF 和 bFGF 在术后第 1 周均呈弱阳性表达,第 2 周以后实验组 VEGF 和 bFGF 表达逐渐增强,至第 6 周达到高峰,第 8 周 VEGF 和 bFGF 的表达逐渐减弱;而对照组在第 1 ~ 10 周 VEGF 和 bFGF 的表达均呈弱阳性,未见明显的表达高峰。见表 1,封三彩图 1.1 ~ 1.4。

表 1 术后不同时间点 bFGF 和 VEGF 表达的比较 (n = 3)

时间	bFGF		VEGF	
	对照组	实验组	对照组	实验组
术后 1 周	13.6 ± 1.8	18.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	16.3 ± 3.3	17.1 ± 2.6
术后 2 周	14.8 ± 2.5	24.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	19.2 ± 2.4	21.3 ± 3.4
术后 4 周	13.2 ± 2.7	28.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	16.9 ± 3.1	30.5 ± 2.8 <sup>a</sup>
术后 6 周	14.1 ± 3.1	38.5 ± 3.6 <sup>a</sup>	16.7 ± 4.0	39.2 ± 2.2 <sup>a</sup>
术后 8 周	13.7 ± 2.4	29.4 ± 3.1 <sup>a</sup>	15.1 ± 2.7	31.1 ± 2.7 <sup>a</sup>
术后 10 周	12.6 ± 2.3	21.1 ± 3.5 <sup>a</sup>	15.6 ± 2.8	24.5 ± 3.1 <sup>a</sup>

注:a:与对照组比较, P < 0.05。

3 讨论

小肠粘膜下层是一种新型的具有良好生物降解性及胶原组织结构的细胞外基质框架,在超过 1000 种的跨种交叉移植实验中均表现为无免疫原性,直接诱发

实验无应答反应<sup>[1]</sup>,同时 SIS 具有良好的细胞相容性,可促进多种细胞在材料上粘附、生长和分化,Atala 等曾将 SIS 应用于鼠和狗膀胱扩大术,术后经组织学检查证明,SIS 移植有泌尿上皮、平滑肌与浆膜再生<sup>[2-4]</sup>。细胞能够在移植上增殖、定向分化并形成有生物功能的替代物的关键在于解决细胞的营养问题。研究证实,如果没有新生毛细血管的长入,超过数  $\text{mm}^2$  的组织无法在体内成活。

VEGF 和 bFGF 已证明与组织修复密切相关,能促进内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞分裂,促进形成新的毛细血管和肉芽组织。在本实验中,冻干 SIS 在体外 PBS 孵育液中可检测到 VEGF 和 bFGF,且显示对上皮细胞有增殖活性;同时组织学证实,大鼠 SIS 移植组术后第 2 周 SIS 上可见新生毛细血管渗入,第 4 周已有完整膀胱移行上皮形成,且可见少量不成熟平滑肌纤维细胞,第 10 周可见明显的平滑肌肌束。免疫组化显示,实验组和对照组 VEGF 和 bFGF 在术后第 1 周均呈弱阳性表达,第 2 周以后实验组 VEGF 和 bFGF 表达逐渐增强,至第 6 周达到高峰,第 8 周 VEGF 和 bFGF 的表达逐渐减弱,而对照组在第 1 ~ 10 周 VEGF 和 bFGF 的表达均呈弱阳性,未见明显的表达高峰。可见 SIS 不仅是一种生物相容性良好的细胞外基质框架,而且可作为载体将外源性生长因子带入大鼠体内,在 SIS 逐渐降解的同时释放生长因子,诱导细胞浸润,刺激血管生成和宿主细胞的长入和分化。Voytik-Harbin 等也报道了用尿素和盐酸胍抽提 SIS,将抽提物与 swiss 3 T3 成纤维细胞共同培养,分析抽提物对细胞增殖和对细胞 DNA 合成的影响,发现尿素抽提物作用类似 bFGF,而盐酸胍抽提物可改变细胞的形态,其作用类似  $\text{TGF-}\beta$ ,但具体成分还不太清楚<sup>[5]</sup>。另外,SIS 由 I 型、III 型纤维胶原蛋白构成,含有少量的 IV、V 型胶原,IV 型胶原是促使血管内皮细胞向形成微血管方向分化的主要物质,研究表明,当 I、

II 型胶原存在时,可诱导内皮细胞增生,但仅增生融合成单层,只有在长期培养时,才可偶然见到管样毛细血管结构;在含有 IV 型胶原的培养基里,内皮细胞可形成管样结构<sup>[6]</sup>。最近,Kane matsu 等也报道天然和合成的胶原基质中的 I 型胶原可作为载体储存并释放生长因子<sup>[7-8]</sup>。

虽然本实验证实了小肠粘膜下层在膀胱组织修复中存在外源性生长因子的释放,但外源性生长因子的释放在 SIS 植入 8 周左右开始下降。如何充分利用 SIS 作为生长因子的载体,并使生长因子能得以持续释放,实现重建膀胱的血管化,解决细胞-基质材料移植血液供应,有待我们深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, et al. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a Th2-restricted immune response[J]. Transplantation, 2001, 71(11): 1631 - 1635.
- [2] Atala A. Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system[J]. Am J Transplant, 2004, 4 (Suppl. 6): 58 - 73.
- [3] Hodde J. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration[J]. Tissue Engineering, 2002, 8(2): 295 - 308.
- [4] Campodonico F, Benelli R, Michelazzi A, et al. Bladder cell culture on small intestinal submucosa as bioscaffold: experimental study on engineered urothelial grafts[J]. Eur Urol, 2004, 46(5): 531 - 537.
- [5] Voytik-Harbin SL, Hillemonds D, Simmons C, et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa[J]. J Cell Biochem, 1997, 67(4): 478 - 481.
- [6] 罗静聪 杨志明. 小肠黏膜下层在组织修复中的应用[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2005, 28(1): 52 - 55.
- [7] Kane matsu A, Yamamoto S, Ozeki M, et al. Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors[J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4513 - 4520.
- [8] Kane matsu A, Marui A, Yamamoto S, et al. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor[J]. J Control Release, 2004, 99(2): 281 - 292.

(收稿日期: 2006-03-13)

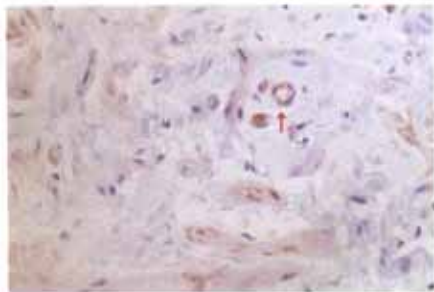


图 1.1 术后第6周对照组  
(毛细血管内皮细胞和炎症细胞)

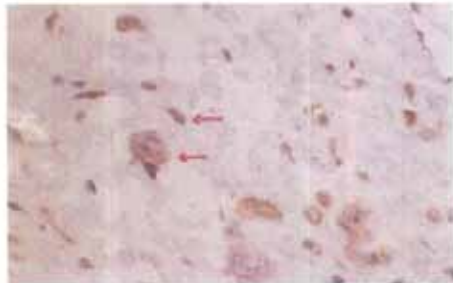


图 1.2 术后第4周实验组  
(毛细血管内皮细胞和炎症细胞)

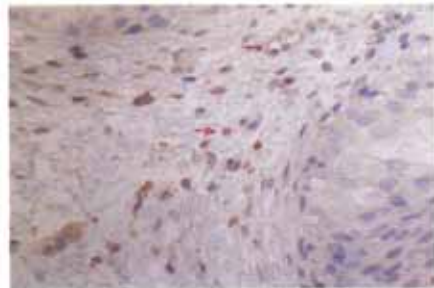


图 1.3 术后第4周对照组  
(毛细血管内皮细胞和炎症细胞)

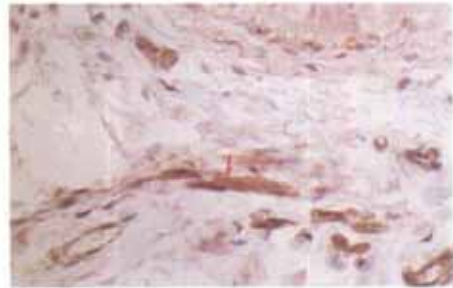


图 1.4 术后第4周实验组  
(平滑肌纤维细胞)