

壳聚糖体外促进兔膀胱黏膜上皮细胞的增殖

张文达, 郑军华*

(第二军医大学长征医院泌尿外科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**观察壳聚糖对体外培养膀胱黏膜上皮细胞增殖的影响,探讨其治疗间质性膀胱炎的可行性。**方法:**获取新西兰兔膀胱黏膜,Dispase 酶消化收集上皮细胞,分不同浓度(0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 g/L)壳聚糖实验组与对照组进行细胞原代培养,免疫组织化学鉴定培养细胞。培养 72 h 后,光镜下观察细胞生长增殖情况,NAG 酶反应比色法和细胞计数法测定壳聚糖对膀胱上皮细胞增殖的影响。**结果:**免疫组化鉴定培养细胞为膀胱黏膜上皮细胞。与对照组相比,壳聚糖在浓度 >0.3 g/L 时能促进兔膀胱黏膜上皮细胞的增殖,促进作用在浓度为 1.2 g/L 时最明显($P < 0.01$),2.4、4.8 g/L 时渐降低,但仍高于对照组($P < 0.01$)。**结论:**壳聚糖体外可以促进兔膀胱黏膜上皮细胞增殖,值得进一步研究以用于治疗间质性膀胱炎。

[关键词] 膀胱上皮细胞;壳聚糖;细胞增殖**[中图分类号]** R 694.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1248-04Chitosan promotes proliferation of rabbit bladder epithelial cells *in vitro*

ZHANG Wen-da, ZHENG Jun-hua* (Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of chitosan on proliferation of bladder epithelial cells, so as to discuss its feasibility in treatment of interstitial cystitis. **Methods:** Bladder epithelial cells were harvested by enzymatic digestion of the epithelium of New-Zealand rabbit bladder. The cells were cultured in different concentrations of chitosan(0.3, 0.6, 1.2, 2.4 and 4.8 g/L) for 72 h; untreated cells served as control. The growth and proliferation of cells were observed under microscope. The effects of chitosan on proliferation of cells were studied by NAG assay and cell counting. **Results:** Immunohistochemistry staining revealed that the cultured cells were epithelial cells. Chitosan (>0.3 g/L) promoted the growth of epithelial cells, and the promoting effect was significantly when the concentration of chitosan was 1.2 g/L ($P < 0.01$). The promoting effects were decreased when the concentrations of chitosan were 2.4 and 4.8 g/L, but were still higher than that of the control group($P < 0.01$). **Conclusion:** Chitosan can promote the growth of the bladder epithelial cell *in vitro*, which might contribute to the treatment of interstitial cystitis

[KEY WORDS] bladder epithelial cells; chitosan; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1248-1251]

间质性膀胱炎(interstitial cystitis, IC)是一种常见的疾病,其症状十分严重,甚至影响日常生活^[1]。目前比较一致的观点认为由于膀胱黏膜上皮增殖受到抑制导致膀胱黏膜上皮的完整性丧失,膀胱壁内的感觉神经细胞受到尿液成分如钾离子等的刺激,从而产生 IC 的临床症状^[2-3]。目前临床上对其还缺乏真正有效的治疗措施,疗效均不显著。壳聚糖是一种具有良好生物相容性的高分子化合物,具有多种生物学活性,能够保护并促进上皮细胞增殖,促进创面愈合。

本研究观察壳聚糖对体外培养的兔膀胱黏膜上皮细胞增殖的影响,初步探讨将其用于治疗间质性膀胱炎治疗的可能性,希望为间质性膀胱炎的治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及材料 20 g/L 壳聚糖(医用级,上海其胜公司);角质上皮细胞无血清培养基(KS-FM)、Dispase 酶、二乙胺四乙酸二钠(EDTA)、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自 Gibco 公司。N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG,保定长城试剂公司);用 PBS 液配成 5 mg/ml 溶液(滤菌待用),角蛋白抗体(Boster 公司)。

[基金项目] 上海市自然科学基金(054119604). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai(054119604).

[作者简介] 张文达,硕士,主治医师。

E-mail: zhangwd282@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: zhengjh0471@sina.com

1.2 兔膀胱黏膜上皮细胞的获取 取 4 周龄新西兰大白兔(中国科学院上海实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 2.0~2.5 kg, 空气栓塞处死后, 无菌条件下切取膀胱, 立即置入含庆大霉素(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的磷酸盐缓冲液(PBS)中浸泡, 并漂洗 3 次。将膀胱组织剪成 1.0~2.0 mm^3 的小块后移入加有 Dispase 酶消化液的瓶中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 消化 18 h, 使黏膜层和基质层分离, PBS 洗涤 1 次, 用器械将移行上皮层收集于混合消化液(0.02% EDTA + 0.25% 胰酶)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化 10 min, 每 2~3 min 用吸管吹打一次, 成单细胞悬液, 血清终止消化, PBS 洗涤 2 遍, 100 目不锈钢网过滤, 将滤液移入离心管, TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器有限公司)离心 10 min (1 000 r/min), 去上清, 加入无血清培养液。活细胞计数大于 95%, 对制得的表皮细胞悬液进行细胞计数, 调整细胞密度至 $10^5/\text{ml}$ 。

1.3 兔膀胱黏膜上皮细胞的培养及免疫组化鉴定

1.3.1 上皮细胞的培养 将制备好的细胞悬液接种入 96 孔培养板, 每孔注入细胞悬液 100 μl 。6 孔为一组, 设 5 个实验组和 1 个对照组。每组按等比稀释法加入壳聚糖溶液, 第 1~5 组分别加入壳聚糖浓度为 0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 g/L 的培养液, 对照组只加入培养液。培养板在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下培养 72 h。

1.3.2 上皮细胞的鉴定 上述培养的细胞接种于盖玻片上 5~7 d, 待细胞完全贴壁后, 以 PBS 液冲洗后, 甲醇、丙酮固定 10 min, 以抗角细胞广谱角蛋白单克隆抗体(AE1/AE3)为一抗, 并以二氨基联苯胺(DAB)为底物进行卵白素-生物素系统(ABC)法免疫组化染色, 棕色反应为阳性染色, 以鉴定培养细胞是否为膀胱上皮细胞, 以兔膀胱黏膜下组织为阴性对照。

1.4 不同浓度壳聚糖对体外培养膀胱黏膜上皮细胞增殖的影响

1.4.1 光镜观察 倒置显微镜每日动态观察细胞形态变化及生长、增殖情况。

1.4.2 NAG 反应比色试验 取上述培养细胞进行 NAG 反应比色试验, 操作按试剂盒说明进行, 每孔加入 100 μl 新鲜培养液和 50 μl NAG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 200 μl DMSO, 震荡 5 min, 每孔加入 25 μl 甘氨酸缓冲液, 自动生化分析仪上测定各孔 450 nm 处光密度(D)值。

1.4.3 细胞计数法 取消化后膀胱上皮细胞按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 24 孔板。分组及加药同 1.4.2 项下 NAG 反应比色试验。计数时用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 加入锥虫蓝试剂置室温 5 min 左右, 细胞板上计数(四角的 4 个大方格内细胞总数 $\div 4 \times 10\ 000 =$ 每毫升的细胞数)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间多重比较采用单因素方差检验。

2 结果

2.1 培养细胞的鉴定结果 角蛋白是上皮细胞特异性表达蛋白, 实验组和对照组培养后移行上皮细胞抗广谱角蛋白免疫组化染色可见胞质呈棕黄色, 着色均匀, 苏木精衬染的核呈蓝色; 阴性对照组(膀胱黏膜下层)只见淡蓝色的核, 胞质未见着色性(图 1)。以上结果证实本研究分离培养的细胞是单一的膀胱移行上皮细胞。



图 1 壳聚糖处理组(0.6 g/L)膀胱上皮细胞免疫组化染色阳性

Fig 1 Immunohistochemistry revealed positive keratin staining in 0.6 g/L chitosan-treated group (arrow indicates positively stained cell, $\times 200$)

2.2 光镜观察结果 光镜下观察, 各组的单个细胞形态没有明显的差别。细胞贴壁前为体积较小的圆形、类圆形细胞, 胞质均匀、透亮, 轮廓清晰, 细胞核不清楚; 接种后 24 h 有些细胞开始贴壁; 24~72 h 贴壁细胞逐渐增多, 细胞开始伸展, 细胞核清晰可见。但从细胞密度上看, 在对照组中, 上皮细胞数量少, 细胞生长正常; 而壳聚糖实验组, 随着壳聚糖浓度的增加, 细胞数量增多, 生长旺盛, 以 1.2 g/L 浓度时的细胞数量为最多(图 2)。

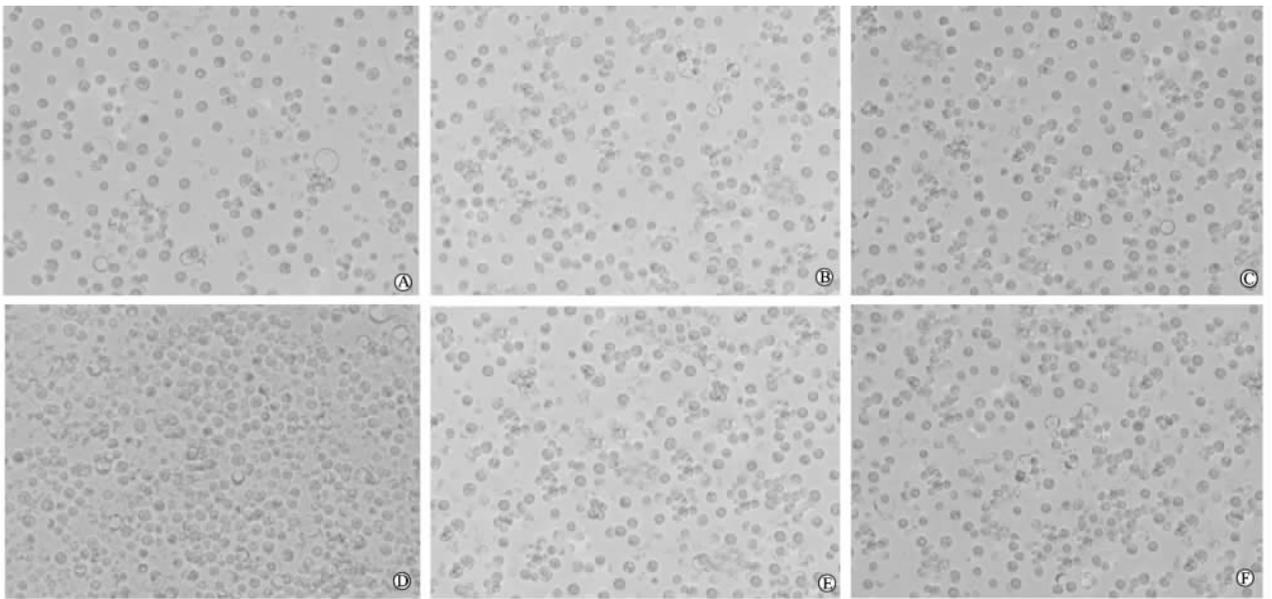


图 2 培养 72 h 对照组(A)、0.3 g/L(B)、0.6 g/L(C)、1.2 g/L(D)、2.4 g/L(E)、4.8 g/L(F)壳聚糖组兔膀胱上皮细胞镜下观察结果

Fig 2 Rabbit bladder epithelial cells of control(A) group and cultured with 0.3 g/L(B), 0.6 g/L(C), 1.2 g/L(D), 2.4 g/L(E), 4.8 g/L(F) chitosan (×200)

2.3 NAG 反应比色试验及细胞计数结果 当壳聚糖的浓度 > 0.3 g/L 时, 实验各组的平均光密度值均高于对照组, 有统计学差异(壳聚糖浓度为 0.6 g/L 时, $P < 0.05$; 壳聚糖浓度 > 0.6 g/L 时, $P < 0.01$)。同样, 以细胞计数法得到的各实验组细胞数也均高于对照组, 且有统计学差异(壳聚糖浓度为

0.6 g/L 时, $P < 0.05$; 壳聚糖浓度 > 0.6 g/L 时, $P < 0.01$)。促进增殖作用以壳聚糖浓度为 1.2 g/L 时最明显; 浓度 > 1.2 g/L 时细胞计数和平均光密度值有所下降, 但仍高于对照组, 且有统计学差异(表 1)。

表 1 壳聚糖对兔膀胱上皮细胞增殖的影响

Tab 1 Effects of chitosan on proliferation of rabbit epithelial cells

($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	D	Ratio(%)	Cell number (2×10^5)
Control	0.513 ± 0.035	—	2.718 ± 0.667
Chitosan($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	0.3	1.559	2.759 ± 1.511
	0.6	$0.599 \pm 0.036^*$	$3.174 \pm 0.335^*$
	1.2	$0.961 \pm 0.058^{**}$	$5.092 \pm 1.708^{**}$
	2.4	$0.750 \pm 0.086^{**}$	$4.402 \pm 1.253^{**}$
	4.8	$0.707 \pm 0.048^{**}$	$3.745 \pm 1.055^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. Ratio = $(D_{Chitosan}/D_{Control} - 1) \times 100\%$

3 讨论

间质性膀胱炎是一种侵袭膀胱壁组织且严重影响生活质量的慢性非细菌性膀胱炎。间质性膀胱炎的治疗一直是泌尿外科一个比较棘手的问题。IC 最常见的组织学异常为膀胱黏膜上皮的缺损或者变薄, 所以目前比较一致的观点认为 IC 的发病机制是由于膀胱黏膜上皮增殖受到抑制从而导致膀胱黏膜

上皮完整性的丧失, 膀胱壁内的感觉神经细胞受到尿液成分如钾离子等的刺激, 产生了 IC 的临床症状。这使人们想到了直接将保护膀胱上皮或者是促进上皮修复的药物灌注于膀胱内, 从而达到治疗或者是改善 IC 症状的效果。膀胱内灌注治疗由于直接作用于膀胱黏膜, 所以显示了比较确切的疗效^[4], 但不同的灌注药物其有效率差别比较大, 有的停药后症状易反复。另外, 部分灌注药物受国外专利保

护, 价格偏贵, 不适合在我国推广使用。因此, 寻找一种更加有效且经济的膀胱黏膜上皮保护剂就成为目前 IC 治疗的研究方向之一。

壳聚糖(chitosan)是壳多糖(chitin)的衍生物, 其化学名为聚-1,4- β -D-葡萄糖胺, 相对分子质量为 $7 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$, 目前不少实验^[5]已经对其疗效及作用机制进行了较深入的研究, 是一种具有良好生物相容性、可降解性及生物学活性的高分子材料。国内外研究^[6-7]发现, 壳聚糖具有选择性组织再生、促进创面愈合、预防组织粘连的作用。Mi 等^[8]以壳聚糖膜治疗动物皮肤伤口, 发现伤口上皮化的比例比对照组要高, 上皮下胶原的排列比对照组有规律。近年来壳聚糖在膀胱灌注方面的应用越来越受到人们的重视。膀胱黏膜黏附力较差, 这是多数药物膀胱灌注疗效差的原因。膀胱表面的黏附力决定于黏膜及聚合物的结构和电荷。Bogataj 等^[9]研究证明壳聚糖与膀胱黏膜表面的葡糖胺聚糖(GAG)层之间由于结构和电荷的作用可增强膀胱黏膜黏附力。近年来壳聚糖为膀胱内用药开辟了一片新的天地^[10]。壳聚糖作为良好的载体及膀胱黏膜的黏附剂使膀胱灌注药物能定量并可可靠的作用于膀胱壁, 大大改进了药物膀胱灌注的效果^[11-12]。早在 1995 年, Okamura 等^[13]学者证明壳聚糖能够有效降低环磷酰胺诱导的出血性膀胱炎大鼠的病死率, 减少其严重出血症状的发生率, 减轻其膀胱黏膜的坏死和炎症程度, 并提出壳聚糖对于膀胱黏膜上皮可能具有保护作用, 但缺乏后续相关报道。

本研究旨在观察壳聚糖体外对兔膀胱上皮细胞增殖的影响, 为进一步的应用研究奠定基础。结果显示, 对照组上皮细胞数量少, 细胞生长缓慢; 而壳聚糖实验组, 随着壳聚糖浓度的增加, 细胞数量增多, 细胞生长旺盛, 角蛋白抗体免疫组化染色呈阳性, 证实培养细胞为移行上皮细胞。NAG 反应比色法测定各组光密度值也逐渐升高; 壳聚糖浓度为 0.6 g/L 时即能明显促进膀胱上皮细胞的增殖 ($P < 0.05$)。促进作用随壳聚糖浓度的增加而增强, 在 1.2 g/L 浓度时达到高峰, 以后随浓度的增加细胞增殖又有所下降, 但仍高于对照组 ($P < 0.01$)。这种现象可能与壳聚糖浓度过高时改变了细胞生长的某些外环境有关, 但具体作用机制仍有待进一步的研究。

总之, 本研究结果表明壳聚糖体外能够促进兔膀胱黏膜上皮增殖, 促进上皮细胞生长, 且其为黏稠

状胶体, 可以较长时间地滞留于膀胱内, 减少尿液与膀胱黏膜之间直接接触, 具有保护脆弱的新生上皮细胞的作用, 值得进一步研究以用于临床治疗间质性膀胱炎。

(志谢 本研究得到中国科学院神经研究所张弛老师、陈旻博士的指导和帮助, 在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Whitmore K, Siegel J F, Kellogg-Spadt S. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome as a cause of sexual pain in women; a diagnosis to consider[J]. J Sex Med, 2007, 4: 720-727.
- [2] Burkman R T. Chronic pelvic pain of bladder origin; epidemiology, pathogenesis and quality of life[J]. J Reprod Med, 2004, 49(3 Suppl): 225-229.
- [3] Slobodov G, Feloney M, Gran C, et al. Abnormal expression of molecular markers for bladder impermeability and differentiation in the urothelium of patients with interstitial cystitis[J]. J Urol, 2004, 171: 1554-1558.
- [4] Aghamir S M, Mohseni M G, Arasteh S. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin for treatment of refractory interstitial cystitis [J]. Urol J, 2007, 4: 18-23.
- [5] 侯春林, 顾其胜. 几丁质与医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 10.
- [6] Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions[J]. Pharm Res, 2004, 21: 43-49.
- [7] Kean T, Roth S, Thanou M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency[J]. J Control Release, 2005, 103: 643-653.
- [8] Mi F L, Shyu S S, Wu Y B, et al. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing[J]. Biomaterials, 2001, 22: 165-173.
- [9] Bogataj M, Vovk T, Kerec M, et al. The correlation between zeta potential and mucoadhesion strength on pig vesical mucosa [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26: 743-746.
- [10] Grabnar I, Bogataj M, Mrhar A. Influence of chitosan and polycarbophil on permeation of a model hydrophilic drug into the urinary bladder wall[J]. Int J Pharm, 2003, 256(1-2): 167-173.
- [11] Eroglu M, Irmak S, Acar A, et al. Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer [J]. Int J Pharm, 2002, 235(1-2): 51-59.
- [12] Ozturk E, Eroglu M, Ozdemir N, et al. Bioadhesive drug carriers for postoperative chemotherapy in bladder cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2004, 553: 231-242.
- [13] Okamura T, Masui T, St-John M K, et al. Evaluation of effects of chitosan in preventing hemorrhagic cystitis in rats induced by cyclophosphamide [J]. Hinyokika Kyo, 1995, 41: 289-296.

[收稿日期] 2007-04-17

[修回日期] 2007-09-30

[本文编辑] 贾泽军