

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00388

· 论 著 ·

兔毛囊干细胞与尿道黏膜干细胞为种子细胞构建组织工程尿道的比较

彭文标¹, 刘春晓^{1*}, 谢群², 朱臂琳³, 吕腾荣³

1. 南方医科大学珠江医院泌尿外科, 广州 510515

2. 中山市博爱医院泌尿外科, 中山 528403

3. 中山市古镇医院泌尿外科, 中山 528400

[摘要] **目的** 比较兔毛囊干细胞与尿道黏膜干细胞的表型及生物学特性, 探索毛囊干细胞作为组织工程尿道种子细胞的可行性。**方法** 体外分离、培养兔毛囊干细胞和尿道黏膜干细胞, 并使用流式细胞仪分选富集直径 $<10\ \mu\text{m}$ 、 $\text{integrin-}\alpha 6^+/\text{CD71}^-$ 的干细胞。计算两种干细胞的最大扩增倍数和克隆形成能力, 使用流式细胞仪检测两种干细胞 K19、p63、 β_1 -integrin 的阳性表达率。将富集毛囊干细胞和尿道黏膜干细胞接种在尿道支架上, 构建组织工程尿道, 应用组织学、荧光染色法观察体外构建的组织工程尿道的情况。**结果** 兔毛囊干细胞与尿道黏膜干细胞的最大扩增倍数分别为 $(6.1 \pm 0.8) \times 10^4$ 倍、 $(7.1 \pm 1.1) \times 10^3$ 倍, 克隆形成率分别为 $(10.1 \pm 1.3)\%$ 、 $(4.3 \pm 1.1)\%$ 。K19、p63、 β_1 -integrin 在毛囊干细胞中阳性表达率分别为 $(90.53 \pm 6.77)\%$ 、 $(93.31 \pm 5.57)\%$ 、 $(91.17 \pm 6.98)\%$, 在尿道黏膜干细胞中阳性表达率分别为 $(88.50 \pm 4.95)\%$ 、 $(91.63 \pm 5.86)\%$ 、 $(93.35 \pm 6.28)\%$ 。毛囊干细胞与尿道黏膜干细胞在支架上都能形成复层上皮样结构, AE1/AE3 染色阳性。**结论** 兔毛囊干细胞与尿道黏膜干细胞都可以作为种子细胞构建组织工程尿道; 在种子细胞获取方面, 毛囊干细胞优于尿道黏膜干细胞。

[关键词] 毛囊干细胞; 尿道黏膜干细胞; 组织工程; 尿道**[中图分类号]** R 695 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0388-05

Rabbit hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells used as seed cells for urethra tissue engineering: a comparison study

PENG Wen-biao¹, LIU Chun-xiao^{1*}, XIE Qun², ZHU Bi-lin³, LÜ Teng-rong³

1. Department of Urology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

2. Department of Urology, Boai Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528403, Guangdong, China

3. Department of Urology, Guzhen Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528400, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To compare the phenotypes and biological characteristics between the rabbit hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells, and to explore the feasibility of using hair follicle stem cells as seed cells for tissue engineering urethra. **Methods** Rabbit hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells were isolated and cultured *in vitro*, and the cells with diameter $<10\ \mu\text{m}$ and $\text{integrin-}\alpha 6^+/\text{CD71}^-$ were sorted using flow cytometry. The maximum amplification factor and clone forming ability of the two kinds of cells were calculated. The positive rates of K19, p63 and β_1 -integrin in the two kinds of cells were detected by flow cytometry. The enriched stem cells were implanted in the urethral stent to construct tissue engineering urethra. Histology and fluorescent staining were used to observe the tissue-engineered urethra. **Results** The maximum amplification multiples of rabbit hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells were $(6.1 \pm 0.8) \times 10^4$ and $(7.1 \pm 1.1) \times 10^3$, respectively; and the clone formation rates were $(10.1 \pm 1.3)\%$ and $(4.3 \pm 1.1)\%$, respectively. The positive rates of K19, p63, and β_1 -integrin in hair follicle stem cells were $(90.53 \pm 6.77)\%$, $(93.31 \pm 5.57)\%$, and $(91.17 \pm 6.98)\%$, respectively; and those in urethral mucosa stem cells were $(88.50 \pm 4.95)\%$, $(91.63 \pm 5.86)\%$, and $(93.35 \pm 6.28)\%$, respectively. Both hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells formed complex layer epithelioid structure on the stents, with positive staining for AE1/AE3. **Conclusion** Rabbit hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells can

[收稿日期] 2012-11-28**[接受日期]** 2013-04-02**[基金项目]** 广东省自然科学基金(S2011010004029). Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2011010004029).**[作者简介]** 彭文标, 博士生. E-mail: pengwb@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 020-61640114, E-mail: doterpeng@yahoo.com.cn

both serve as seed cells for constructing tissue engineering urethra. As for the availability of seed cells, hair follicle stem cells are more superior to the urethral mucosa stem cells.

[Key words] hair follicle stem cells; urethral mucosa stem cells; tissue engineering; urethra

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 388-392]

近年来,尿道的组织工程研究已取得了阶段性的进展^[1-2],表皮细胞^[3]、口腔黏膜细胞^[4]、脂肪干细胞^[5]和骨髓干细胞^[6]等都曾被报道用于构建组织工程尿道,这些种子细胞各有优势,但来源和数量都相对有限,需要继续探索新的种子细胞来源。毛囊干细胞来源相对丰富,获取过程相对容易,且其生物学特性与表皮干细胞十分相似^[7-8]。因此,毛囊干细胞有可能成为尿道组织工程种子细胞的新来源,但目前鲜有相关报道。本研究拟探讨兔毛囊干细胞作为尿道组织工程种子细胞的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 健康清洁级2月龄新西兰雄兔5只,体质量(1.9±0.1) kg,由南方医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证:SCXK(粤)2011-0015;使用许可证:SYXK(粤)2011-0074]。胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、高糖DMEM培养液、无血清KSM培养液、无钙镁离子的磷酸缓冲液(PBS)均购自美国Gibco公司;I型胶原酶(美国Worthington公司);K19、P63、 β_1 -integrin鼠抗兔抗体(美国Abcam公司),小鼠抗兔AE1/AE3抗体、FITC标记的抗鼠抗体(美国Santa Cruz公司)。

1.2 干细胞的分离、培养与检测

1.2.1 毛囊干细胞的分离、培养 以戊巴比妥30 mg/kg耳缘静脉注射将兔麻醉后,在无菌条件下取兔双侧触须部全层皮肤。组织置于含有青霉素的Hank's液中,用Hank's液冲洗3次,钝性分离单个毛囊组织。采用“二步酶”法从单个毛囊组织中获取单个细胞,参考文献^[3]方法将消化后的单细胞以 2×10^8 /L密度接种到培养瓶中,置于5%CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中培养,每3d换液,待细胞达到90%融合时按1:3传代。

1.2.2 尿道黏膜细胞分离、培养 兔麻醉成功后,切开兔尿道,切取长度为1cm的全层尿道组织,以2.5 U/mL Dispase II(美国Sigma公司)作用组织,4℃下浸泡12~16h,使用器械分离黏膜上皮,将上皮置于0.05%胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA(美国Sigma公司)中,37℃作用10min分离黏膜上皮细胞,PBS清洗,161×g离心5min。去上清,按 $2 \times$

10^8 /L密度接种于培养皿,置于5%CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中培养,每3d换液,待细胞达到90%融合时按1:3传代。

1.2.3 干细胞的分选与富集 应用BD FACSAria流式细胞分选仪(美国BD公司)自带直径10 μm的标准micro-beads校准流式细胞仪,并保存设置参数。调整待分选的细胞悬液体积至10 mL,细胞密度为 1×10^6 /mL,按1:50比例分别加入Integrin- $\alpha 6$ -PE与CD71-FITC抗体(美国Santa Cruz公司),4℃孵育30min,PBS洗涤2次。标记好的细胞上流式细胞仪,分选收集Integrin- $\alpha 6^+$ /CD71⁻并且直径小于10 μm的细胞群。

1.2.4 细胞最大扩增倍数的计算 细胞扩增能力的计算公式: $X_n = N_H / N_1$, X_n 为第 n 代扩增倍数, N_H 为 n 代细胞收获数量, N_1 为 n 代细胞接种数量;总细胞扩增倍数(X)等于 n 代及 n 代以前全部细胞扩增倍数的乘积,计算公式为: $X = X_n \times X_{n-1} \dots \times X_0$ 。

1.2.5 克隆形成率的计算 收集待测细胞,制成单细胞悬液,以100/cm²密度接种于培养皿中,接种24h后,吸走未贴壁细胞,显微镜下观察,计数贴壁细胞,接种14d后,Giemsa染色,肉眼观察并计数克隆,计算克隆形成率。

1.2.6 K19、p63、 β_1 -integrin阳性表达率的检测 以K19检测为例,离心收集待测细胞,1%多聚甲醛固定15min后用PBS冲洗,加Triton-100作用15min,PBS冲洗,加鼠抗兔K19单克隆抗体(1:100)4℃孵育30min,PBS冲洗,以FITC标记的抗鼠抗体(1:100)4℃孵育30min,PBS冲洗并调整体积至200~500 μL。以PBS代替一抗,重复以上步骤设定空白对照。每个样本吸取约10 000个细胞,上流式细胞仪检测。

1.3 组织工程尿道体外构建与检测

1.3.1 兔皮肤成纤维细胞分离、培养 按1.2.1项下方法获得兔全层皮肤,并将其中毛囊与表皮去除,再将真皮组织剪成直径1~3mm的组织块,将组织块按照一定间距铺于直径10cm培养皿中,置37℃、饱和湿度培养箱中静置30min,使组织块更好地贴壁,再向培养皿加入10mL DMEM培养液,置培养箱内培养。每3d换液,待细胞达到90%融合时按

1:3传代。

1.3.2 膀胱脱细胞基质支架材料制备 切取兔膀胱,生理盐水冲净血迹,将兔膀胱置于10 mmol/L PBS(pH 7.0)和0.1%叠氮钠(德国Merck公司)的混合溶液中浸泡搅拌过夜,0.4%胰蛋白酶(美国Gibco公司)37℃消化5 h,0.2%戊二醛交联保护10 min,40 kU/L DNA酶(美国Sigma公司)37℃浸泡搅拌8 h,4%脱氧胆酸钠(美国Sigma公司)和0.1%叠氮钠溶液中搅拌6 h,反复漂洗,冷冻干燥后封装,环氧乙烷消毒,保存备用。取膀胱脱细胞基质支架材料与正常膀胱,经4%多聚甲醛固定。

1.3.3 组织工程尿道构建 将兔皮肤成纤维细胞按 3×10^9 /L密度滴注在膀胱脱细胞基质支架材料上,5%CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中培养24 h后,再将毛囊干细胞或尿道黏膜干细胞按 1×10^9 /L密度滴注在支架材料上。将细胞材料复合物置于KSFM培养液中培养1周,再改用气液交界(air-liquid interface)继续培养至1个月。取组织工程尿道并将其两等分,一部分制备冰冻切片,另一部分经4%多聚甲醛固定。

1.3.4 组织学观察 将4%多聚甲醛固定的膀胱脱细胞基质支架材料、正常膀胱和组织工程尿道脱水、石蜡包埋,5 μm厚切片,H-E染色观察。

1.3.5 AE1/AE3表达的检测 将组织工程尿道冰冻组织切片用PBS洗涤3次;4%多聚甲醛固定15 min;Triton X-100处理10 min;PBS洗涤3次;用含10%羊血清的BSA封闭,37℃孵育30 min;加入小鼠抗兔AE1/AE3单克隆抗体,4℃冰箱避光过夜;PBS洗涤3次;加入FITC标记的兔抗鼠IgG

二抗,37℃孵育30~60 min;PBS洗涤3次;碘化丙啶避光衬染30~60 s;PBS洗涤3次;暗光下荧光显微镜下检测。

1.4 统计学处理 使用SAS 8.2统计软件对实验数据进行统计学分析。所有实验数据均为重复5次的结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 富集后干细胞最大扩增倍数比较 根据细胞扩增能力的计算公式计算得出,毛囊干细胞可被连续培养12代,最大扩增倍数为 $(6.1 \pm 0.8) \times 10^4$ 倍;尿道黏膜干细胞可被连续培养10代,最大扩增倍数为 $(7.1 \pm 1.1) \times 10^3$ 倍。二者差异有统计学意义($n=5, P < 0.05$)。

2.2 富集后干细胞克隆形成率比较 毛囊干细胞的克隆形成率为 $(10.1 \pm 1.3)\%$,尿道黏膜干细胞的克隆形成率为 $(4.3 \pm 1.1)\%$,二者差异有统计学意义($n=5, P < 0.05$)。

2.3 富集后干细胞K19、p63、β₁-integrin阳性细胞百分率比较 流式分析结果(图1)显示,在富集毛囊干细胞中K19⁺细胞百分率为 $(90.53 \pm 6.77)\%$,p63⁺细胞百分率为 $(93.31 \pm 5.57)\%$,β₁-integrin⁺细胞百分率为 $(91.17 \pm 6.98)\%$;在富集尿道黏膜干细胞中,K19⁺细胞百分率为 $(88.50 \pm 4.95)\%$,p63⁺细胞百分率为 $(91.63 \pm 5.86)\%$,β₁-integrin⁺细胞百分率为 $(93.35 \pm 6.28)\%$ 。两种干细胞中K19⁺、p63⁺、β₁-integrin⁺细胞百分率差异均无统计学意义($n=5, P > 0.05$)。

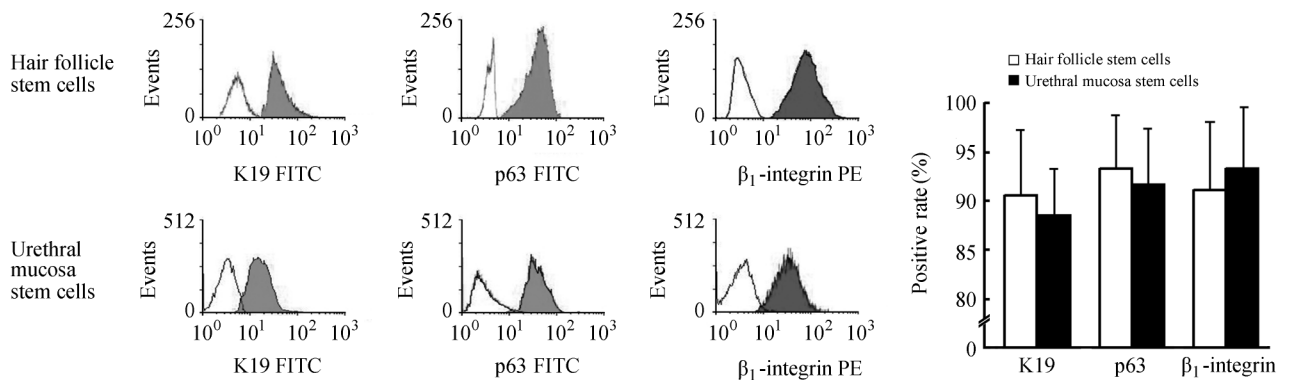


图1 毛囊干细胞和尿道黏膜干细胞的K19、p63、β₁-integrin表达分析

Fig 1 K19, p63, and β₁-integrin expression in hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells

$n=5, \bar{x} \pm s$

2.4 膀胱脱细胞基质支架材料与正常膀胱的组织学比较 膀胱脱细胞基质支架材料 H-E 染色只显示伊红染色,视野内未见细胞核结构,说明脱细胞彻底(图 2A)。正常膀胱组织黏膜层与黏膜下层清晰,组织内细胞及细胞核结构清晰明显(图 2B)。

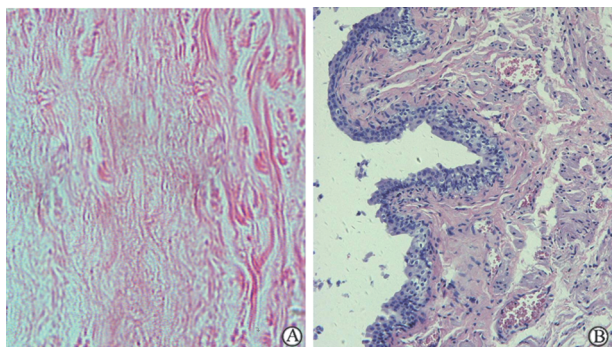


图 2 膀胱脱细胞基质支架材料与正常膀胱的 H-E 染色观察

Fig 2 H-E staining of bladder acellular matrix graft and normal bladder tissue

A: Bladder acellular matrix graft; B: Normal bladder tissue. Original magnification: $\times 100$

2.5 两种干细胞构建的组织工程尿道组织学比较 毛囊干细胞与尿道黏膜干细胞体外构建 1 个月的组织工程尿道 H-E 染色显示,两种干细胞在支架上都能形成复层上皮样结构,两类细胞所构建的组织在组织学上结构相似,黏膜下未见明显瘢痕组织增生(图 3)。

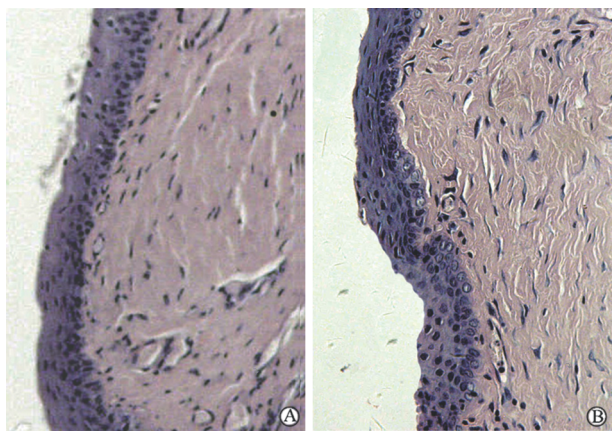


图 3 两种干细胞体外构建的组织工程尿道 H-E 染色观察
Fig 3 H-E staining of tissue-engineered urethra constructed with hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells

A: Tissue-engineered urethra constructed with hair follicle stem cells; B: Tissue-engineered urethra constructed with urethral mucosa stem cells. Original magnification: $\times 200$

2.6 两种干细胞构建的组织工程尿道的免疫荧光

观察 毛囊干细胞和尿道黏膜干细胞体外构建 1 个月的组织工程尿道,上皮组织内均表达 AE1/AE3,可见明显绿色荧光表达(图 4)。

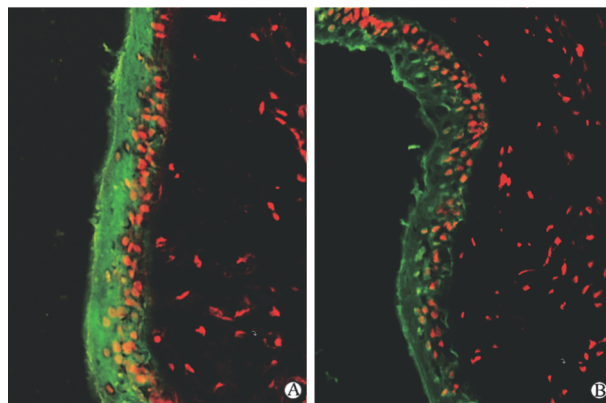


图 4 两种干细胞体外构建的组织工程尿道免疫荧光 AE1/AE3 染色观察

Fig 4 AE1/AE3 immunofluorescence staining in tissue-engineered urethra constructed by hair follicle stem cells and urethral mucosa stem cells

A: Tissue-engineered urethra with hair follicle stem cells; B: Tissue-engineered urethra with urethral mucosa stem cells. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

近年来,组织工程技术修复尿道缺损的研究受到广泛关注。已经有研究者分别尝试利用皮肤表皮细胞以及口腔黏膜细胞成功地构建了组织工程尿道的上皮组织,并且成功地修复了兔尿道缺损^[9-10]。杨青等^[7]研究发现,表皮干细胞与毛囊干细胞有很强的相似性,二者均可以作为皮肤组织工程的种子细胞,后者表达的干细胞标记显著高于前者,认为毛囊干细胞相比表皮干细胞更有优势。同时,由于毛囊干细胞来自于毛囊,获取容易,利用毛囊干细胞构建组织工程尿道的研究更有意义。

上皮干细胞的收集一般采取的方法是“二步酶消化法”,该方法操作简单,但所收集的干细胞纯度较低。张群等^[8]曾报道采用差速贴壁法分离培养毛囊干细胞,获得了相对较高纯度的干细胞;但该方法操作相对复杂。邓辰亮等^[11]报道了多参数分选表皮干细胞的方法,即在“酶消化法”的基础上,再次收集直径小于 $10 \mu\text{m}$ 同时表达 $\text{integrin-}\alpha 6^+/\text{CD}71^-$ 表型的细胞,结果使得干细胞被显著富集。本研究采用邓辰亮等^[11]的方法分选并富集干细胞,并采用 $\text{K}19^{\text{[3]}}$ 、 $\text{p}63^{\text{[4]}}$ 、 $\beta_1\text{-integrin}^{\text{[3]}}$ 作为毛囊干细胞与黏膜

干细胞通用的标记对干细胞进行鉴定,结果发现,富集后的毛囊干细胞 K19⁺ 细胞百分率为(90.53±6.77)%,p63⁺ 细胞百分率为(93.31±5.57)%,β₁-integrin⁺ 细胞百分率为(91.17±6.98)%;而且本研究中所得的富集毛囊干细胞克隆形成率为(10.1±1.3)%,略高于邓辰亮等^[11]分选表皮干细胞时得到的(7.49±1.80)%的克隆形成率。可见该方法同样适用于毛囊干细胞的分选。

李森恺等^[1]曾经成功收集培养人尿道黏膜细胞,发现人尿道上皮细胞体外可连续传9~10代(1:2传代),生长期50~60d。我们在研究中发现,兔尿道黏膜干细胞体外可以被连续培养10代(1:3传代),最大扩增倍数为(7.1±1.1)×10³倍,而兔毛囊干细胞的最大扩增能力和克隆形成率显著高于尿道黏膜干细胞,说明毛囊干细胞足以满足组织构建对种子细胞数量的要求。

我们在进一步的研究中还发现,毛囊干细胞与尿道黏膜构建的组织工程尿道组织学上无明显差异,免疫荧光实验结果也显示,两种干细胞构建的尿道组织都表达AE1/AE3;因此,毛囊干细胞不仅可以从数量上满足组织工程尿道构建的需要,同时也能从质量上满足组织工程尿道构建的需要。

需要指出的是,移植毛囊长出毛发必须依靠毛囊最小单位,而不是毛囊干细胞^[12]。毛囊单位只在胚胎发育特定时期的特定条件下才能形成,毛囊、汗腺的数量在哺乳动物出生前就已经决定^[13]。毛囊的再生并不容易,长出毛发则更为困难,尤其通过体外培养的毛囊干细胞形成毛囊组织,需要在特定的条件下才能形成毛囊^[14]。本研究中虽采用毛囊干细胞,但并不具备形成毛囊并长出毛发的特殊条件。因此,移植毛囊干细胞组织工程尿道后导致尿道长毛的可能性几乎没有。尽管如此,尿道中长发情况是应该被绝对避免的,在后续的研究中还需进一步观察。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 李森恺,陈文,李养群,贾文英,蒋华,史宏道. 人体尿道粘膜上皮细胞的连续培养[J]. 中华实验外科杂志,2003,20:371-372.

[2] 卢慕峻,王忠,周广东,俞斌,刘伟,曹谊林. 组织工程尿道粘膜的体外构建[J]. 中华男科学杂志,2008,14:1071-1076.

[3] Fu Q,Deng C L,Song X F,Xu Y M. Long-term study of male rabbit urethral mucosa reconstruction using epidermal cell[J]. Asian J Androl,2008,10:719-722.

[4] Li C,Xu Y,Song L,Fu Q,Cui L,Yin S. Preliminary experimental study of tissue-engineered urethral reconstruction using oral keratinocytes seeded on BAMG[J]. Urol Int,2008,81:290-295.

[5] 张亚,周云,贾立山,苗小芬,严向明,张婷. 脂肪干细胞复合多孔丝素材料修复兔尿道缺损[J]. 江苏医药,2010,36:199-201.

[6] 黄红军,张金明,储海函. 兔骨髓间充质干细胞构建组织工程化海绵体尿道的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11:2665-2668.

[7] 杨青,李秀兰,张杨,郭悦,孙晓雷. 表皮干细胞与毛囊干细胞生物学特性的比较[J]. 中国组织工程研究,2012,16:5034-5038.

[8] 张群,杨光辉,丛笑倩,崔磊,张文杰,刘伟,等. 差速贴壁法分选人毛囊干细胞的研究[J]. 中华实验外科杂志,2006,23:755-757.

[9] Fu Q,Deng C L,Liu W,Cao Y L. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix[J]. BJU Int,2007,99:1162-1165.

[10] Li C,Xu Y M,Song L J,Fu Q,Cui L,Yin S. Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts[J]. J Urol,2008,180:1538-1542.

[11] 邓辰亮,王佳鸣,崔磊,杨光辉,刘伟,曹谊林. 多参数复合分选表皮干细胞的初步实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志,2006,2:102-104.

[12] Wang S,Li Y, Ji Y C,Lin C M,Man C,Zheng X X. The most efficient follicular regenerating unit and the smallest follicular regenerating unit; potential treatments for hair loss[J]. Med Hypotheses,2009,73:1035-1037.

[13] Holbrook K A. Structure and function of the developing human skin[M]//Goldsmith L A. Biochemistry and physiology of the skin. Oxford: Oxford University Press,1983:64-101.

[14] Asakawa K,Toyoshima K E,Ishibashi N,Tobe H,Iwadata A,Kanayama T, et al. Hair organ regeneration via the bioengineered hair follicular unit transplantation[J]. Sci Rep,2012,2:424.

[本文编辑] 孙岩