

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.016

组织工程重建修复犬膀胱后对上尿路的影响*

郭宇¹, 陈伟¹, 贾维胜¹, 马超¹, 侯祥麟², 戴建武², 叶钢^{1△}

(1. 第三军医大学新桥医院泌尿外科, 重庆 400037; 2. 中国科学院遗传与发育研究所, 北京 100190)

摘要:目的 组织工程技术重建膀胱后对上尿路结构及功能影响的分析和评估。方法 将 8 只雄性比格犬随机分为两组: 假手术对照组(A 组)4 只, 胶原支架修复组(B 组)4 只, 建立 B 组膀胱缺损动物模型, 利用胶原支架材料修复重建膀胱。两组于修复前及修复后 23 周行肾功能相关生化指标测定以及肾脏超声检查, 术后 24 周行标本大体形态观察及组织学检查。结果 肾脏超声检查两组动物肾脏形态、血流信号正常。大体观察两组实验动物肾脏及输尿管无结石、新生物。两组肾功能相关生化指标比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。组织学检查提示组织结构完整, 两组肾单位无明显病理改变。结论 利用胶原支架材料重建膀胱后对上尿路结构及功能未产生不良影响, 这种组织工程方法具有较好的可行性。

关键词:组织工程; 胶原支架; 膀胱重建; 肾功能试验; 输尿管

中图分类号: R699.5

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)25-3311-03

Effects of tissue engineering bladder reconstruction in canines on upper urinary tract*

Guo Yu¹, Chen Wei¹, Jia Weisheng¹, Ma Chao¹, Hou Xianglin², Dai Jianwu², Ye Gang^{1△}

(1. Department of Urological Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. Genetic and Developmental Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Objective To analyze and evaluate the effects of the tissue engineering bladder reconstruction on the upper urinary tract structure and function. **Methods** The 8 male beagles were randomly divided into the two groups: sham-operation group (group A, $n=4$) and the collagen scaffold repair group (group B, $n=4$). The bladder defect animal model was established in the group B by using the collagen scaffold materials to repair the bladder. The renal function related biochemical indicators were detected and the renal Doppler ultrasonic examination was performed in each group before repair and in 23 weeks after repair. The specimens from the two groups were performed the gross morphology observation and the histology examination on postoperative 24 weeks. **Results** The renal Doppler ultrasound examination showed the normal kidney morphology and normal blood flow signal. In the general observation, no calculi and neoplasm were found in the kidney and ureter of the experimental dogs. The renal function related biochemical indicators had no statistically significant differences between the two groups ($P>0.05$). The histological examination indicated that the organization structure was integrity, the nephrons in each group had no obvious pathological changes. **Conclusion** Using the collagen scaffold materials to reconstruct the canine bladder has no adverse influence on the upper urinary tract structure and function, this tissue engineering approach has good feasibility.

Key words: tissue engineering; collagen scaffold; bladder reconstruction; kidney function tests; ureter

近年来随着在组织工程领域的进步与发展, 组织工程技术已在一些临床应用中获得了成功, 作为该领域在泌尿系统中应用也逐渐成为研究和探索的热点^[1-4]。临床上常见到由于先天性疾病、创伤、炎症、感染、肿瘤等各种因素导致膀胱结构与功能的严重破坏, 需要进行修复与重建^[5]。既往组织工程技术修复与重建膀胱的研究表明, 利用人工提取合成胶原支架材料在膀胱重建上获得了一定的成功^[6-9]。但鲜有提及重建后对于上尿路结构及功能的影响, 因为它对该组织工程的进一步研究及应用, 甚至于未来推广到临床将会产生深远的影响。通过对组织工程重建膀胱后上尿路的预后评估与分析研究, 某种程度上决定着该组织工程技术的成败。本实验研究利用胶原支架材料重建膀胱后, 对上尿路结构及功能进行系统评估, 论证了该方法的可行性。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 主要材料 实验动物为国际标准化实验用犬(比格犬), 由四川都江堰市养麝研究所提供。胶原支架材料由中国科学院遗传与发育研究所提供。胶原支架来源于牛皮肤胶原提取物, 经工业加工制备成直径 8.0 cm×8.0 cm 大小圆形膜片, 厚度为 2.0 mm, 一次性灭菌成品包装。

1.1.2 试剂及仪器 PBS 缓冲液(博士德公司); 甲醛溶液分析纯化 AR(成都科龙化工试剂厂); 组织固定液 OCT(SaRura, USA); 3% 戊巴比妥钠(惠利公司); 超净工作台; 倒置显微镜; 德国 Eppendorf 公司台式离心机; 美国 GE 公司 LOGIQ C5 型全身彩色多普勒超声仪; 德国西门子 ADVIA 全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及组织工程重建膀胱模型建立 雄性比格犬 8 只,10 个月龄,体质量(10±1)kg,随机分为 A、B 两组(n=4)。其中 A 组为假手术对照组,B 组为胶原支架修复组。3% 戊巴比妥钠(1 mL/kg)经犬腹腔注射麻醉。麻醉满意后常规消毒铺巾,取犬下腹正中纵行切口长约 6 cm,逐层切开皮肤、皮下及前后鞘,开腹充分暴露膀胱,行膀胱次全切除,将膀胱上部约占膀胱总体积 2/3 予以切除,保留膀胱三角区及膀胱颈。应用胶原支架修补重建 B 组膀胱缺损,逐层缝合关闭切口。留置 F8 号猪尾巴管作为尿管引流膀胱尿液,远端缝合固定于包皮上,保留 2 周后拔除。术后第 2 天恢复进食,常规应用抗菌药物 3 d。

1.2.2 24 h 尿量测定、24 h 尿蛋白定量测定及肾功能生化测定 于术后 23 周行肾功能生化指标、24 h 尿量、24 h 尿蛋白定量测定,评估术后肾脏功能改变情况。比格犬禁食 12 h,在清醒不麻醉状态下于后肢内侧隐静脉采血约 4~5 mL,注入血清生化指标测定的采血管,3 000~4 000 r/min 离心 5~8 min,分离血清,为待检血清生化指标样品。同时经留置于犬膀胱猪尾巴管,收集 24 h 尿量,进行防腐处理,测定尿量后,测算体表面积,同法于后肢内侧隐静脉采血约 4 mL。应用全自动生化分析仪对上述采样标本进行生化检测。

1.2.3 肾脏超声多普勒检查 根据实验犬体质量按 1 mL/kg,腹腔内注射戊巴比妥钠灭菌溶液,麻醉生效后,将犬取仰卧位固定于检查台上,腹部及腰背部剃毛备皮,采用美国

GE 公司 LOGIQ C5 型全身彩色多普勒超声仪,探头频率 5.0 MHz,二维常规观察肾脏、输尿管形态、结构,彩色多普勒血流显像观察肾脏血流信号。

1.2.4 大体形态及组织学观察 于术后 24 周处死动物行标本取材。观察两组实验动物肾脏、输尿管有无明显炎性及恶性肿瘤改变,是否有结石、憩室等并发症存在。标本经 10% 中性福尔马林缓冲液固定 24 h 后,乙醇梯度脱水及 4% 石蜡包埋固定,切片厚度为 5 μm 行 HE 染色镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 术后一般情况 B 组实验组动物术后均正常生存,肉眼血尿于术后 4 d 消失,手术切口无感染。于 2 周后拔除尿管,均能正常自行排尿。

2.2 大体观察 术后 24 周处死动物行标本取材,两组肾脏、输尿管表面浆膜层完整,大小、形态正常,色泽红润,无异常包块占位病变,无明显充血炎症改变。剖开输尿管管腔见黏膜连续性完整,输尿管管腔内未见狭窄、结石、憩室、新生物形成,无僵硬纤维化改变。剖开肾脏后见肾皮质、髓质分界清晰,肾实质未见占位、囊性改变,皮质无受压变薄,肾脏各盏无牵拉受压变形,盏颈、肾柱、肾乳头等解剖结构清晰,盏内未见结石、新生物,黏膜光滑,无炎症充血表现。A、B 两组术后 24 周取材,见图 1。



图 1 术后 24 周后取材

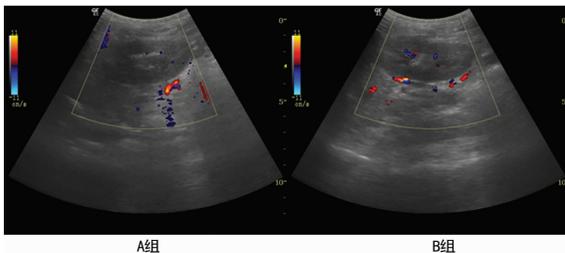


图 2 术前肾脏超声多普勒检查

2.3 肾脏超声多普勒检查 根据术前及术后 23 周超声多普勒检查,手术前后两组肾脏形态、大小正常,肾实质厚度正常,轮廓完整,没有萎缩表现,皮质、髓质交界欠清,肾实质内未见

强回声、液性暗区表现,各盏结构清晰,无扩张、牵拉受压表现,盏内未见强回声表现,肾脏血流信号均正常,未发现肾积水、肾结石及肾脏囊性甚至实性占位病变,见图 2、3。

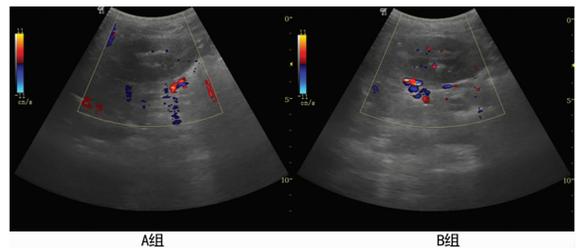


图 3 术后 23 周肾脏超声多普勒检查

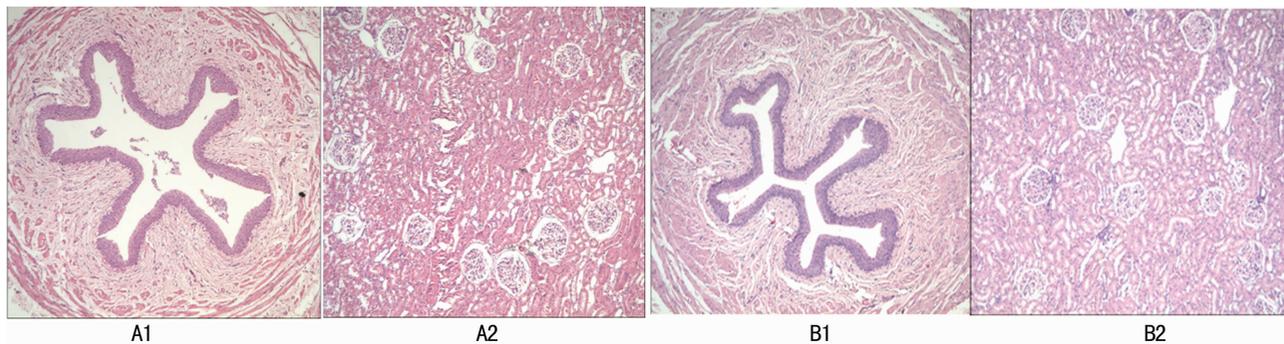
2.4 24 h 尿量测定、24 h 尿蛋白定量测定及肾功能生化测定数据分析 通过对术后 23 周收集两组动物 24 h 尿量及血液生化标本采集,测定 24 h 尿量、24 h 尿蛋白定量、肾功能生化指标测定结果,将上述结果进行统计学分析,两组间各项指标差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.5 组织学观察 术后 6 个月取材标本经石蜡包埋处理切片后行 HE 染色光镜下观察,见两组间的组织学相似,输尿管黏膜层细胞覆盖完整,上皮细胞排列有序,平滑肌层细胞亦见规律排布,层次完整分明,未见输尿管及肾间质局部出血水肿及大量炎性细胞浸润。两组肾脏肾小球体积大小正常,少数肾小球可见轻度充血,系膜区未见系膜细胞大量增生及基质增加,

未发现异型细胞,肾小管上皮细胞排列整齐有序,无大量坏死、脱落现象,未见细胞肿胀、空泡样变性,官腔未见扩张、狭窄,无管型形成,肾单位完整,见图 4。

表 1 术后 23 周两组 24 h 尿量测定、24 h 尿蛋白定量测定及肾功能生化测定($\bar{x}\pm s, n=4$)

检测项目	A 组	B 组	P
24 h 尿量($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	19.50±2.08	19.25±3.40	0.91
血尿素氮(mmol/L)	4.60±0.51	4.55±0.52	0.90
肌酐($\mu\text{mol/L}$)	61.03±8.17	61.28±9.62	0.97
24 h 尿蛋白定量(mg/kg)	49.93±4.74	55.30±6.97	0.25



A1: A 组输尿管;A2: A 组肾脏;B1: B 组输尿管;B2: B 组肾脏。

图 4 术后 24 周组织学检测(HE, ×100)

3 讨论

膀胱的大面积修复与重建一直以来都是困扰泌尿外科的一大难题。过去采用以胃肠道节段为主的重建修复方法存在大量难以避免的问题,严重影响患者预后^[10]。随着近年来组织工程领域的不断进步为该难题的解决带来了曙光。但关于膀胱重建后对于上尿路结构及功能的评估和分析却鲜有报道,仅停留在单纯对重建区域及组织工程材料的研究^[11-14]。从而缺乏标准化上尿路的量化指标,对于其所可能产生的远期预后影响无法进行及时、准确有效的判断,这个盲区有可能导致该组织工程技术可行性受到质疑,甚至出现对其潜在可能的风险预判不足,由此导致整个治疗方案的失败。

在组织工程重建后对上尿路检测指标方面,本实验采取了既往国内外曾经通常采取的常规检查进行相关研究^[15-16]。Laroute 等^[17]曾对成年犬的肾脏功能的检测计算方法及相关指标测定进行了有益的探索和研究,对检测方法优缺点进行了深入的比较和分析。通过对组织工程重建膀胱半年后上尿路形态病理学、超声影像学以及相关反映肾脏功能生化指标的检测及对比,从中可以看到上尿路的宏观形态结构能够得以正常维持,微观方面反映作为输尿管这个肌性管道的肌层结构以及反映肾脏功能的肾小球、肾小管、肾单位的完整排布,反映肾脏功能方面的生化指标也未出现异常,能够有效承担起生命支持保障的使命。从而有力论证了该组织工程技术对上尿路未产生负面的影响,具有可行性。

同时由于半年的观察时间仍然有限,对该方法的远期影响仍缺乏判断,以及实验观察指标有待进一步规范和完善。上述这些方面都是需要进一步进行相关研究的方面。但仍能反映出

至少在短期内该组织工程重建膀胱后,上尿路功能及结构的完整性。通过本研究结果证明了应用胶原生物支架结合组织工程修复膀胱的可行性,对上尿路结构及功能未产生不良影响。

参考文献:

[1] Wu S, Wang Z, Bharadwaj S, et al. Implantation of autologous urine derived stem cells expressing vascular endothelial growth factor for potential use in genitourinary Reconstruction[J]. J Urol, 2011, 186(2): 640-647.

[2] Geutjes P, Roelofs L, Hoogenkamp H, et al. Tissue engineered tubular construct for urinary diversion in a preclinical porcine model[J]. J Urol, 2012, 188(2): 653-660.

[3] Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, et al. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need Reconstruction; an observational study [J]. Lancet, 2011, 377 (9772): 1175-1182.

[4] 王颖楠, 范雪梅, 赵敏, 等. 脱细胞膀胱基质复合大鼠骨髓间充质干细胞体外构建组织工程化吊带治疗压力性尿失禁的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(22): 2269-2273.

[5] Kollhoff DM, Cheng EY, Sharma AK. Urologic applications of engineered tissue[J]. Regen Med, 2011, 6(6): 757-765.

[6] 刘杰, 傅强. 组织工程技术在下尿路修复重建中的应用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(33): 6218-6222.

激巨噬细胞促进其泡沫化, 激活巨噬细胞分泌炎症细胞因子, 能直接或间接地影响免疫炎症反应, 启动 AS 炎症反应, 对 AS 发生有重要促进作用^[5-7]。罗布麻提取物的主要成分为黄酮类和萜类化合物^[8], 有研究显示: 罗布麻可抑制 ox-LDL 参与 AS 过程^[9]。本研究结果表明: 罗布麻浓度依赖性抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞表达 TNF- α 的表达和释放, 说明罗布麻有一定的抗 AS 作用。

TNF- α 是一种主要由巨噬细胞分泌的炎症因子, 具有调节免疫诱发炎症反应等多种生物学功能。研究表明它是 AS 中重要的炎症因子, 可直接作用于血管内皮致内皮细胞损伤, 启动 AS 过程; 可诱导内皮细胞产生 IL-6 和 IL-8, 促进血管内皮细胞表达黏附分子和其他炎症介质, 增强局部的炎症反应; 趋化、活化单核细胞向内膜下迁移; 促进新血管和血栓形成, 加速 AS 的发生、发展^[10-11]。

本实验结果显示: TNF- α 在 ox-LDL 诱导 U937 单核细胞形成泡沫细胞中表达增加, 这一结果印证了 ox-LDL 在 AS 过程中发挥重要作用的观点; 经过不同剂量的罗布麻提取物作用后, TNF- α 表达呈减少趋势。本研究结果表明: 罗布麻可通过抑制炎症因子的表达发挥抗 AS 作用。

综上所述, 本实验初步探讨了罗布麻提取物抗 AS 的作用及可能作用途径, 推测罗布麻除现有降压、抗氧化作用外, 还可作为防治动脉硬化的药物, 但罗布麻在 AS 中的具体作用途径尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 165-197.
- [2] Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20(5): 363-369.
- [3] Li D, Patel AR, Klibanov AL, et al. Molecular imaging of atherosclerotic plaques targeted to oxidized LDL receptor LOX-1 by SPECT/CT and magnetic resonance[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010, 3(4): 464-472.
- [4] Zhang YC, Wei JJ, Wang F, et al. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein correlate positively with C-reactive protein in patients with acute coronary syndrome[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(2): 365-372.
- [5] Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2311-2316.
- [6] 何玉萍, 匡忠生, 何玉珊, 等. 氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞及促血管平滑肌细胞增殖的机制[J]. *中国老年学杂志*, 2013(4): 837-839.
- [7] 李厚轩, 雷浪, 闫福华. 氧化低密度脂蛋白诱导泡沫细胞形成过程中细胞因子水平的变化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(8): 742-745.
- [8] 薛华茂, 钱学射, 张卫明, 等. 罗布麻的化学成分研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2005, 24(4): 6-8, 12.
- [9] 张素琼, 燕虹, 李青山. 罗布麻叶有效部位降血脂及抗动脉粥样硬化的研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007(9): 831-832.
- [10] 吴俊, 陈琛, 汪道文. 高表达 CYP2C8 基因对动脉粥样硬化小鼠肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(3): 31-34.
- [11] Lee J, Cho JY, Kim WK. Anti-inflammation effect of Exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis[J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(3): 284-291.
- [12] Lu SH, Sacks MS, Chung SY, et al. Biaxial mechanical properties of muscle-derived cell seeded small intestinal submucosa for bladder wall reconstitution[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(4): 443-449.
- [13] Cen L, Liu W, Cui L, et al. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(5): 492-496.
- [14] Montzka K, L ufer T, Becker C, et al. Microstructure and cytocompatibility of collagen matrices for urological tissue engineering[J]. *BJU Int*, 2011, 107(12): 1974-1981.
- [15] 李秋波, 康纪平, 冯晓科, 等. Beagle 犬正常血液学指标及血清生化指标测定[J]. *四川动物*, 2011, 30(2): 265-267.
- [16] 王冬平, 洪宝庆, 李慕, 等. 比格犬生化指标及不同性别的比较[J]. *实验动物科学*, 2008, 25(5): 62-64.
- [17] Laroute V, Chetboul V, Roche L, et al. Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs[J]. *Res Vet Sci*, 2005, 79(2): 161-167.

(收稿日期: 2014-03-16 修回日期: 2014-06-21)

(上接第 3313 页)

- [7] Falke G, Caffaratti J, Atala A. Tissue engineering of the bladder[J]. *World J Urol*, 2000, 18(1): 36-43.
- [8] 廖云峰, 刘春晓, 邹晓峰. 种子细胞在膀胱重建中的研究进展[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(50): 9937-9940.
- [9] Yamzon JL, Kokorowski P, Koh CJ. Stem cells and tissue engineering applications of the genitourinary tract[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(5): 472-477.
- [10] Gerharz EW, McDougal WS. Metabolic and functional Consequences of urinary diversion through intestinal segments[J]. *World J Urol*, 2004, 22(3): 155-156.
- [11] Brown AL, Farhat W, Merguerian PA, et al. 22 week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(10): 2179-2190.
- [12] Lu SH, Sacks MS, Chung SY, et al. Biaxial mechanical properties of muscle-derived cell seeded small intestinal

(收稿日期: 2014-03-25 修回日期: 2014-05-22)