

sulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses trans-
lation in late development [J]. Mol Cell Biol, 1999;19(2): 1262 -
1270

8 Li C, Rock KL, Woda BA, *et al.* IMP3 is a novel biomarker for ade-
nocarcinoma in situ of the uterine cervix: an immunohistochemical
study in comparison with p16(INK4a) expression [J]. Mod Pathol,
2007,20(2):242-247

9 Li HG, Han JJ, Huang ZQ, *et al.* IMP3 is a novel biomarker to pre-
dict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma [J].
J Craniofac Surg, 2011,22(6): 2022-2025

10 Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, *et al.* RNA-binding IMPs pro-
mote cell adhesion and invadopodia formation [J]. Embo J, 2006,25
(7):1456-1468

11 Walter O, Prasad M, Lu S, *et al.* IMP3 is a novel biomarker for triple
negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggres-
sive phenotype [J]. Hum Pathol, 2009,40(11): 1528-1533

(收稿日期:2012-08-20)
(修回日期:2012-09-07)

人咽缩肌细胞体外复合培养的研究

陈静静 沈志森 竺亚斌 康 骋

摘 要 **目的** 探索人咽缩肌细胞体外培养的条件,观察其在相应的生物支架上生长情况,为体外构建人下咽肌组织瓣做前期研究。**方法** 取 9 例下咽癌志愿者癌旁正常的咽缩肌组织进行原代培养,当细胞传代至第 4 代时,将细胞接种于改性的 1mm³ 平面或立体凹槽聚氨酯(polyurethane, PU)生物支架上进行复合培养。通过倒置相差显微镜、免疫荧光和电镜观察鉴定细胞的形态及增殖、分化的状况。**结果** 咽缩肌最佳的体外培养条件是 37℃、5% CO₂ 孵箱环境,选择 DMEM 培养基并添加 20% 胎牛血清,采用组织块培养法可获得足够数目成活的咽缩肌细胞,此细胞在接枝丝素蛋白的凹槽 PU 支架上增殖分化良好并具备定向生长的能力,从而模拟了体内生长的状况。**结论** 组织块培养法获得的咽缩肌细胞与接枝丝素蛋白的凹槽 PU 支架复合培养时其生长状况佳,这为体外构建下咽组织瓣提供了一定的基础。

关键词 人咽缩肌 复合培养 生物支架 丝素蛋白

In vitro Culture of Human Musculus Constrictor Pharyngis Superior Cells for Tissue Engineering Research. Chen Jingjing, Shen Zhisen, Zhu Yabin, Kang Cheng. The Medical School of Ningbo University, Lihuili Hospital of Ningbo University, Zhejiang 315211, China

Abstract Objective To explore in vitro culture condition of human pharyngeal constrictors cell, observe its growth status in the polymeric scaffolds. **Methods** Human pharyngeal constrictors cells from body tissue of nine volunteers of hypopharyngeal carcinoma patients were isolated by explanting method. The 4th generation cells for growing on modified polyurethane (PU) scaffolds were collected with linearly aligned microgrooves. The cell morphology and the status of the proliferation and differentiation were identified by morphology observation and immunohistochemistry analysis. **Results** Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS) under conditions of 37℃, 5% CO₂ as the best condition for vitro culture. Silk fibroin (SF) grafting greatly improved scaffold's biological activity which led to the high cell biocompatibility. **Conclusion** The findings demonstrate that cells obtained from explanting method seeded on such scaffolds hold, which is promise for guiding human pharyngeal constrictors tissue construction.

Key words Human pharyngeal constrictors ; In vitro culture ; Polyurethane scaffold; Silk firbrin

头颈部恶性肿瘤是常见恶性肿瘤之一,约占全部恶性肿瘤患者的 8%。近年来,尽管医疗技术不断进步,咽喉癌为主体的头颈部恶性肿瘤发生率居高不下,总体生存率改善不明显^[1]。而目前咽喉肿瘤多

采用以手术为主的综合治疗,但是手术后往往伴随着咽喉头颈部组织缺损,吞咽、发音及呼吸功能的障碍,严重影响了患者尤其是中晚期患者的生存率与生存质量^[2]。咽缩肌组织是人体重要构件,其收缩和放松活动是人体完成吞咽的基础。各种外界刺激可引起肌组织的损伤及坏死,而肌组织修复能力有限,其修复是一个由外部力学因素和内部细胞因素两者共同协调完成的复杂且呈多阶段的过程,因此无法达到功能和解剖上的恢复,这极大的影响了人们的生

基金项目:浙江省杰出青年团队项目(R2101166);宁波市重大(重点)课题(2008C50019)
作者单位:315211 宁波大学医学院(陈静静、竺亚斌、康骋);
315040 宁波市医疗中心李惠利医院(沈志森)
通讯作者:沈志森,电子信箱:szs7216@163.com

活^[3,4]。随着体外培养技术的日益发展,新型人工生物材料的不断开发,为修复和重建下咽癌术后咽上缩肌组织提供了新的方法,对于提高术后生存质量有十分重要的意义。随着近年来肌组织工程迅猛发展,借助生物支架使细胞的生长具有特定的方向和分布,将有利于其功能的发挥并减少移植的排斥反应^[5]。体外构建的组织工程化咽缩肌将有希望修复或替代病变肌组织,提高病患的生活质量^[6]。通过体外培养人咽缩肌细胞,分离高浓度有活力的肌细胞种植在无、可降解的生物支架上,为构建人类下咽组织瓣,形成具有功能的肌组织奠定了基础。

材料与方法

1. 标本来源:经伦理委员会的允许,取下咽癌志愿者癌旁正常咽缩肌组织(病理证实为正常的组织),且患者无其他系统疾病。大小约 10mm × 10mm,重量约 200g。患者年龄 45 ~ 60 岁,平均年龄 50 岁。

2. 体外培养并将细胞种植于 PU 生物支架上:标本用双抗清洗 2 遍,PBS 缓冲液清洗 3 遍,小心去除表层筋膜与腱性组织,剪成 1mm³,取 5 ~ 7 块放入培养瓶中,加入 2ml 培养基,充分振荡使组织均匀的贴附于瓶壁上。然后将培养瓶直立放入培养条件为 37℃、饱和湿度 5% CO₂ 孵箱。第 2 天加入新鲜培养基至 5ml,并将瓶身放平,使培养基没过组织块。首次换液在 4 天后进行,7 ~ 9 天细胞已爬满组织块周围,将组织块弃之,之后每 3 天换液 1 次,直至细胞爬满培养瓶底面的 80% 后传代,传至 4 ~ 5 代则将细胞冻存。用特制的 96 孔规格打孔器将 PU 膜打成小圆片状,在接种细胞前,先用乙醇浸泡 6 ~ 8h,再用 PBS 缓冲液洗 3 ~ 4 次,每次 6h。处理完毕后将置于 96 孔板中,且紧贴板的底壁。调节细胞浓度为 4×10^5 /ml,取 200μl 细胞培养基混合物移入已放置 PU 支架的 96 孔板中,置 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养,每隔 4 ~ 5 天换液 1 次。

3. 主要试剂:DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(FBS, Hyclone 公司),胰蛋白酶(Trypsin, Sigma 公司),PBS 缓冲液(本室配制),青霉素、链霉素(国产),MyoD 抗体(abcam),二抗(武汉博士德生物技术公司)

4. 聚氨酯(PU)生物支架的制作:聚氨酯(美国诺誉公司)

生物支架的制作步骤如下:①将 PU 按照 1:8 的比例溶解于 1,4-二氧六环中;②至彻底溶解 PU 浇铸于 2 种不同规格的模具上(平面、凹槽),其中槽宽为 200μm,间隔的高和宽为 30μm;③将其放入 37℃ 烘箱 12h,待其充分烘干。然后揭下成型的 PU 膜,将其置于 30℃ 真空烘箱 24h;④用乙醇漂洗 PU 膜 2 ~ 3h 以去除残留的油渍,大量的蒸馏水冲洗,然后用滤纸吸干膜表面的水分;⑤为了提高 PU 生物支架的亲水性,用二元胺胺解的方法在 PU 膜的表面引入活性基团 -NH₂,即将已成型的 PU 膜放入 37℃ 胺解液中(0.06g/ml 1,6-乙二胺/正丙醇)10min,然后用大量的蒸馏水冲洗,置于真空烘箱至恒重。

5. 接枝细胞相容性因子明胶和丝素蛋白:将胺解完的 PU 膜置于 1% 戊二醛中固定 3 ~ 4h,然后用大量的蒸馏水冲洗避免戊二醛的残留。将 PU 膜置入明胶溶液中(2mg/ml)或丝素蛋白溶液中(17mg/ml)4℃ 24h,使其充分接枝上明胶或丝素蛋白。

6. 形态学观察和绘制生长曲线:倒置显微镜观察 PU 生物支架上咽上缩肌细胞的形态并摄片。比较接枝不同细胞活性因子的 PU 生物支架对肌细胞增殖的影响。细胞计数的时间点为 1、4、7、14 天。

7. 免疫荧光检测:PBS 缓冲液浸洗种有咽缩肌细胞的 PU 支架 3 遍,每次 5min,4% 多聚甲醛室温固定 30min;0.02% 曲拉通破膜 10min,羊血清室温封闭 1h;加入稀释 200 倍的适量一抗(anti-MyoD),置于 4℃ 冰箱过夜(10 ~ 12h);加入稀释 50 倍的 FITC 标记的荧光二抗,室温避光放置 30min ~ 1h;加入 10μg/ml 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核 5min,共聚焦显微镜下观察并摄片。

8. 电镜观察:将种有咽缩肌细胞的 PU 支架用 PBS 缓冲液清洗 3 遍,用 2.5% 戊二醛固定 30min。用蒸馏水充分浸洗 10min。待支架风干后喷金,用电镜(Philips Electronics Nederland BV, eindhoven 公司,荷兰)观察细胞和支架。

结 果

1. 咽上缩肌组织的形态学观察:采用组织块培养法,经过 4 ~ 5 天,有少量肌细胞从咽缩组织块中爬出。7 天时,肌细胞大量爬出。10 天时,细胞停止从组织块中爬出,组织块周围已聚集一定数量的细胞(图 1)。

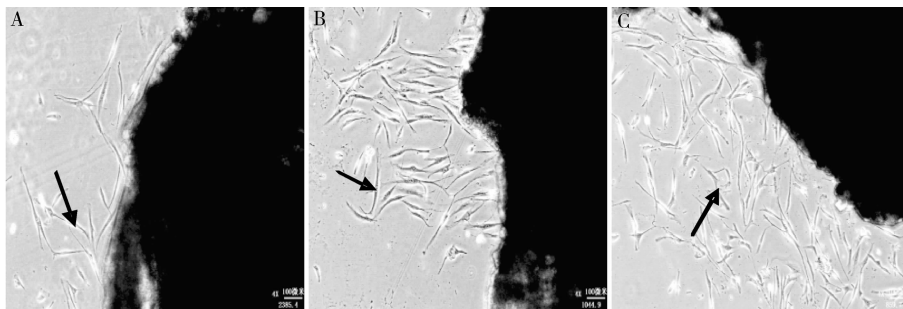


图 1 原代培养肌细胞从组织块中爬出的状态(×4)

箭头所指的梭形细胞为咽缩肌。A. 4 天;B. 7 天;C. 10 天

2. 细胞和支架的亲水性:在接枝过细胞活性因子的 PU 支架上肌细胞生长的数量明显多于未接枝的,其中接枝丝素的(PU - silk)支架上肌细胞生长的数量最多(图 2、图 3)肌细胞和生物支架的亲水性很大程度上取决于支架表面的亲水性,接枝细胞活性因子

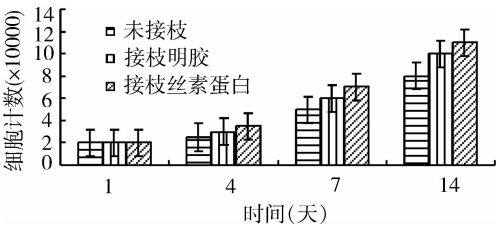


图 2 未接枝、接枝明胶或接枝丝素蛋白的 PU 平面支架上 1、4、7、14 天咽缩肌细胞生长数量的比较

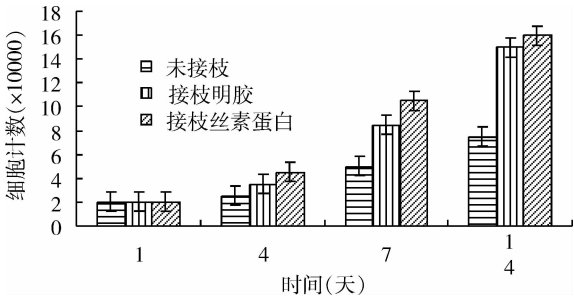


图 3 未接枝、接枝明胶或接枝丝素蛋白的 PU 凹槽支架上 1、4、7、14 天咽缩肌细胞生长数量的比较

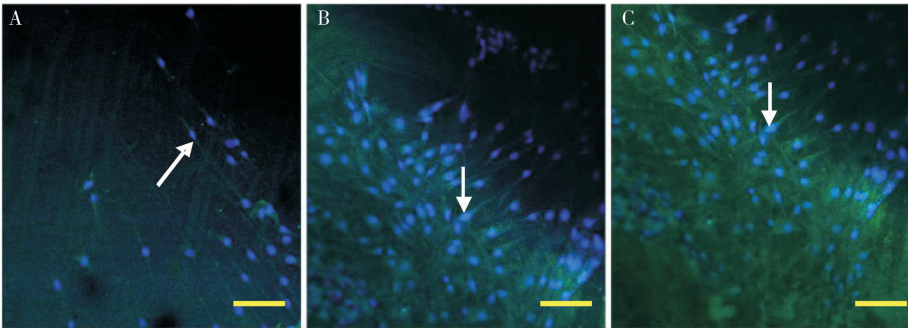


图 4 平面 PU 支架上咽缩肌生长状况

箭头所指是咽缩肌细胞,细胞核为蓝色,细胞质为绿色。A. 未接枝;B. 接枝明胶;C. 接枝丝素蛋白(比例尺:100μm)

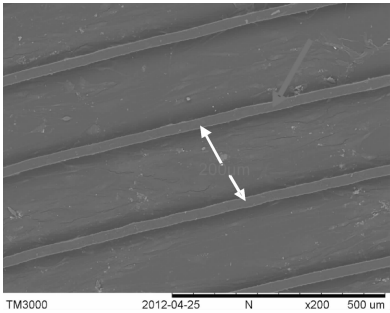


图 5 凹槽支架电镜图

凹槽宽为 200μm,红色箭头所指的间隔高和宽为 30μm

后,支架的亲水性大大提高,从而使细胞更好在支架上增殖和分化。

3. 免疫荧光检测接枝不同细胞活性因子后肌组织中 MyoD 表达:对接枝不同细胞活性因子的在共聚焦荧光显微镜下观察,3 种接枝状态下,特异性转录因子 MyoD 阳性表达呈绿色荧光,主要表达于增殖期细胞,DAPI 染核呈蓝色荧光,接枝丝素蛋白的阳性表达明显增多(图 4)。分别进行平面、凹槽培养(图 5)并对诱导分化肌管进行免疫荧光检测,以明确二种培养模式咽上缩肌特异性标志蛋白的表达差异。在共聚焦荧光显微镜下观察,二种模式培养状态下,凹槽模式阳性表达明显增多且分化均匀、多核极性排列(图 6)。两种模式细胞诱导分化所形成的肌纤维都有增殖、分化潜能和成肌特性。但凹槽培养模式下,特异性标志蛋白 MyoD 表达更密集,多核清晰可见,有明显的方向性排列,共聚焦技术清晰显示排列紧密、极性多核,更接近其生理结构。而平面培养其特异性标志蛋白的阳性表达明显稀疏,多核肌管少而排列杂乱,无极性和层次立体感。

4. 电镜观察咽上缩肌细胞和 PU 支架:扫描电镜观察可见:凹槽支架组有大量的肌细胞在 PU 支架底部黏附,细胞“吸附”于支架上,生长良好,呈平行于支架生长(图 7)。

讨 论

随着组织工程学逐渐发展为前沿学科,有关头颈肿瘤术后损伤修复、再生和重建的研究日益受到重视。下咽癌术后由于器官体积较小,术后可供修复的自身原位组织材料较少,尤其是对中晚期下咽癌手术切除术后组织缺损范围大,给修复带来很多困难。而体外培养技术为解决此难题开辟了新的思路,目前对肌细胞的体外培养多采用分步酶消化法,所用酶主要有胶原酶、透明质酸酶、胰蛋白酶和链激酶等^[7]。当

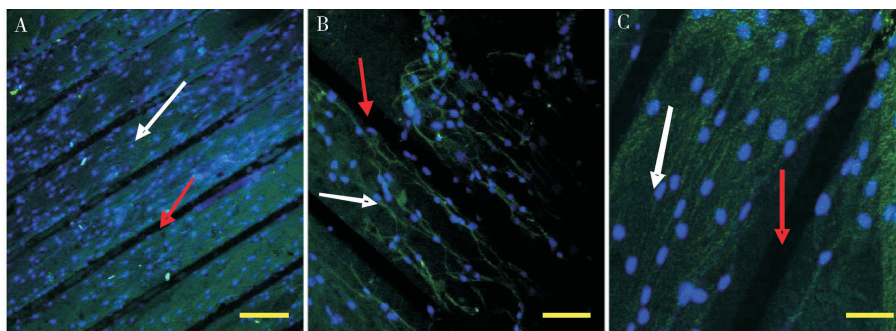


图6 在凹槽支架上咽缩肌细胞生长具有极性,多核清晰可见,且有明显的方向性排列
白色箭头所指为咽缩肌细胞,细胞核为蓝色,细胞质为绿色;红色箭头所指为凹槽间隔(比例尺:100 μ m)

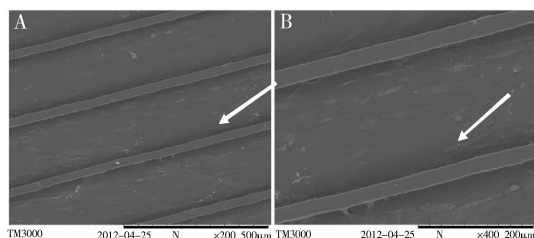


图7 电镜所示咽缩肌细胞在凹槽支架中能沿着支架壁,平行支架生长
箭头所指的是咽缩肌细胞,B图为A图放大

人咽缩肌组织在分步酶消化后采取差速贴壁法以去除混杂的成纤维细胞。细胞接种数小时后,成纤维细胞先贴壁,此时将悬浮细胞取出进行第2次接种,获得较纯净的咽缩肌细胞,但是随着培养时间的延长,细胞数量并不增多,其原因可能在多步酶消化法清除肌细胞的表面抗原,使得细胞的完整性受到破坏,从而导致细胞功能的紊乱。而采用组织块培养法,此难题得到了根本的解决,咽缩肌细胞增殖分化能力明显提高。但是将成活的细胞直接移植到受损的组织内并使其发挥生物功能目前还面临很大的困境,如受损部位的肌组织的基膜已破坏,缺乏丰富的血液循环和神经支配,这都不利于体外培养的肌细胞在体内生长,加上体内免疫系统对异物排斥作用,使移植成功率降低。另外,体外成活的细胞移植体内后,由于缺乏细胞外基质的支持而无法沿着特定的方向生长,也无法形成功能性肌组织^[8]。这就需要借助具有诱导作用的支架材料来构建具有良好方向性的肌组织。

为使外科手术后组织缺损得到更好的修复,提高下咽癌患者尤其是中晚期患者的术后生存质量,本研究对咽缩肌细胞进行体外培养并希望借助构型合理的生物材料构建下咽组织瓣。而下咽其自身的结构特点,至今未有直接可利用的生物修复材料或可供使

用的人类下咽组织瓣。临床上带血管蒂肌皮瓣、肌筋膜瓣或游离皮瓣、肌皮瓣等虽是主要的组织修复材料,但是对微血管缝合技术要求高,且组织损伤大^[9]。近年来有人采用聚乳酸、聚羟基乙酸、乙烯、乙醇共聚物、血纤维蛋白、壳聚糖等材料用于构建组织工程支架材料的报道,这表明生物支架不仅仅是“支架”,他扮演着细胞外基质的角色,对移植细胞的影响举足轻重^[10,11]。Zhao等^[12]通过光刻、电旋转等技术对聚硅酮橡胶弹性生物材料进行铸型,然后将细胞、纤粘连蛋白凝胶、基质胶等混合并接种在凹槽里,通过凹槽对分化肌管的体积进行限定和极性诱导,进而构建出骨骼肌组织模型。Bian等^[13]用聚二甲基硅氧烷(PDMS)铸成三维多孔的模型,这种多孔形状模型有利于营养成分和氧气的运输,大大提高了肌细胞的成活率。本研究选择了具有良好的生物相容性、可降解性、无毒性、低免疫原性、以及相应的生物学功能和空间结构的PU生物材料,并接枝丝素蛋白或明胶,使咽缩肌细胞在改性的凹槽PU支架上诱导分化形成数量密集、有序规律生长的肌管^[14]。

综上所述,咽缩肌细胞在改进了的PU生物支架上具有良好的亲和性,能维持细胞的表型和功能,从而模拟了体内微环境^[15]。但是组织工程咽缩肌用于临床的有效性尚有待进一步评估,如组织工程咽上缩肌结构功能的重塑、神经血管化的建立、伦理问题的探讨等难题都需要进一步研究,也是笔者课题组长期以来的研究重点。

参考文献

- 1 Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Clin Invest, 2012, 122(6): 1951-1957
- 2 Mihara M, Iida T, Hara H, et al. Reconstruction of the larynx and aryepiglottic fold using a free radial forearm tendocutaneous flap after partial laryngopharyngectomy: a case report[J]. Microsurgery. 2012,

- 32(1):50-54
- 3 Goetsch KP, Kalmeyer K, Niesler CU. Decorin modulates collagen I - stimulated, but not fibronectin - stimulated, migration of C2C12 myoblasts[J]. Matrix Biology, 2011,30(2):109-117
- 4 Rodriguez ED, Bluebond - Langner R, Copeland C, *et al.* Functional outcomes of posttraumatic lower limb salvage: a pilot study of antero-lateral thigh perforator flaps versus muscle flaps[J]. J Trauma, 2009, 66(5):1311-1314
- 5 Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, *et al.* Engineered whole organs and complex tissues[J]. Lancet, 2012,379(9819):943-952
- 6 Maclean S, Khan WS, Malik AA, *et al.* The potential of stem cells in the treatment of skeletal muscle injury and disease[J]. Stem Cells Int, 2012,28:23-48
- 7 Wei Y, Li Y, Chen C, *et al.* Human skeletal muscle - derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture [J]. Exp Cell Res, 2011,317(7):1016-1027
- 8 Kamelger FS, Marksteiner R, Margreiter E, *et al.* A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model[J]. Biomaterials, 2004, 25(9):1649-1655
- 9 Omori K, Tada Y, Suzuki T, *et al.* Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. Annals of otology[J]. Rhinology and Laryngology, 2008,117(9):673-678
- 10 Qureshi AT, Terrell L, Monroe WT, *et al.* Antimicrobial biocompatible bioscaffolds for orthopaedic implants[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, doi: 10.1002/term.1532
- 11 Wei D, Zhang X, Gu J, *et al.* Preparation of alpha - tricalcium phosphate/HA whisker/carboxymethyl chitosan - gelatin composite porous bone cement[J]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2012,29(3):491-495
- 12 Zhao Y, Zeng H, Nam J, *et al.* Fabrication of skeletal muscle constructs by topographic activation of cell alignment[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102(2):624-631
- 13 Bian W, Bursae N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture [J]. Biomaterials, 2009, 30(7):1401-1412
- 14 Tatai L, Moore TG, Adhikari R, *et al.* Thermoplastic biodegradable polyurethanes; the effect of chain extender structure on properties and in - vitro degradation[J]. Biomaterials, 2007, 28(36):5407-5417
- 15 Bi P, Kuang S. Meat Science and Muscle Biology Symposium: stem cell niche and postnatal muscle growth[J]. J Anim Sci, 2012,90(3):924-935

(收稿日期:2012-09-14)

(修回日期:2012-10-15)

血浆 vWF:Ag、蛋白 C 活性在 ALI/ARDS 患者诊断和预后中的意义

夏炎火 林锡芳 潘景业 王 丹 李卓英 杨 梅

摘 要 **目的** 探讨血浆血管性血友病因子抗原(vWF:Ag)、蛋白 C(PC)活性在急性肺损伤(ALI)/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者早期诊断和预后判断中意义。**方法** 对 49 例 ALI/ARDS 患者和 21 例非 ALI/ARDS 患者分别测定血浆 vWF:Ag 和 PC 活性,并进行急性生理及慢性健康状况(APACHE)Ⅱ评分和肺损伤评分(LIS),进一步将 ALI/ARDS 患者按预后、病因和器官衰竭数目(除肺外)分组,计算病死率,对结果进行比较。利用受试者工作特征(ROC)曲线评价 vWF:Ag 和 PC 活性的诊断分辨率。**结果** 与非 ALI/ARDS 组相比,ALI/ARDS 组病死率和 LIS 评分明显升高,PaO₂/FiO₂ 明显降低,ALI/ARDS 组患者血浆 vWF:Ag (104%~752%)明显增高($P=0.026$),而 PC 活性(14%~125%)明显降低($P=0.002$)。ALI/ARDS 患者中死亡组、感染组和≥2 个器官功能衰竭组血浆 vWF:Ag 明显高于对照组,而 PC 活性明显低于对照组,感染组和≥2 个器官功能衰竭组病死率明显高于对照组。PC 活性对预测 ALI/ARD 准确性较好(AUC=0.709,95% CI:0.588~0.811, $P=0.002$),PC 活性≤83%时,预测 ALI/ARDS 的敏感度和特异性分别为 77.75%和 57.14%,而 vWF:Ag 在预测 ALI/ARDS 准确性较差(AUC=0.584,95% CI:0.460~0.701, $P=0.243$)。**结论** 血浆 vWF:Ag 升高和 PC 活性降低对判断 ALI/ARDS 预后都有重要作用,血浆 vWF:Ag 越高,PC 活性越低则预后越差;但在预测 ALI/ARDS 上有差异,血浆 PC 活性预测 ALI/ARDS 的准确性较好,而血浆 vWF:Ag 预测 ALI/ARDS 的诊断价值有争议。

关键词 ALI/ARDS vWF:Ag PC 活性 诊断 预后

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20110167)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院 ICU