

# 下咽壁工程化咽缩肌的形态观察与功能研究

郭珊珊 沈志森 陈静静 康 骋 裘世杰 叶 栋 任 远

**摘 要** **目的** 本实验通过检测成肌细胞在不同的空间结构和不同蛋白表面改性的聚氨酯上的黏附、增殖和分化情况,比较不同聚氨酯薄膜的细胞相容性,希望为聚氨酯作为骨骼肌组织工程支架材料的可行性提供依据。**方法** 制备不同的聚氨酯薄膜,对其进行性能检测并将其与从人的咽缩肌提取和体外培养的第3代成肌细胞共培养。采用MTT法、扫描电镜和Western blot检测成肌细胞在不同的支架上的黏附和生长情况。**结果** 成肌细胞在三维的聚氨酯支架上呈现明显的极性分布。经丝素蛋白表面改性的聚氨酯薄膜力学性能好,黏附细胞数量多且细胞大量表达特异性肌源调节因子(Myod)。其他各组细胞少,肌源性调节因子表达少。**结论** 聚氨酯的生物力学性能良好,适用于骨骼肌组织工程。丝素蛋白作为一种天然的纤维蛋白,可以促进成肌细胞的增殖和分化。

**关键词** 聚氨酯 丝素蛋白 咽缩肌 成肌细胞 三维支架

**Morphology and Function of Engineered Pharyngeal Constrictor.** Guo Shanshan, Shen Zhisen, Chen Jingjing, Kang Cheng, Qiu Shijie, Ye Dong, Ren Yuan. The Medical School, Ningbo University, Jiangsu 315211, China

**Abstract Objective** This experiment is aimed to test the adhesion, proliferation and differentiation ability of myoblast on polyurethane with different spatial structure and different surface modification. There is feasibility of polyurethane applied in the skeletal muscle tissue engineering as the result of cell compatibility of different scaffolds. **Methods** The characterizations of different polyurethane films were detected, and were cultured with myoblast which extracted from human pharyngeal constrictors. The adhesion and growth of myoblast on different scaffolds were valued by MTT method, scanning electron microscopy (SEM) and Western blot detection. **Results** Myoblasts on 3D polyurethane rendered polarity distribution obviously. Polyurethane membrane modified with silk fibroin had a better mechanical performance, more cell adhesion and MyoD expression. **Conclusion** Polyurethane is applicable to the skeletal muscle tissue engineering for its good biomechanical properties. Silk fibroin, as a natural protein fiber, can promote the proliferation and differentiation of myoblasts.

**Key words** Polyurethane; Silk fibroin; Pharyngeal constrictor; Myoblast; Three - dimensional (3D) scaffold

骨骼肌是人机体最丰富的组织,具有协调运动的功能,但是骨骼肌的再生能力有限,损伤后的瘢痕愈合,极大的限制了运动的功能<sup>[1]</sup>。咽缩肌包括咽上缩肌、咽中缩肌和咽下缩肌3对,自下而上呈叠瓦状排列,包绕咽侧壁及后壁。各咽缩肌共同收缩时可使咽腔缩小。吞咽食物时,各咽缩肌由上而下依次进行收缩,将食物压入食管。此外,咽下缩肌在发声方面也有重要的功能。近年来,由于精神压力增大导致吸烟酗酒人群比例升高,以及环境污染的日益严重,下咽癌的发生率逐年上升<sup>[2]</sup>。手术治疗是下咽癌的首选治疗方法,但手术治疗所造成的咽缩肌损伤,极大

的损害了患者的吞咽和发声功能,降低了术后患者的生存质量。虽然临床上尝试用体静脉、肠管和肌皮瓣等移植修复缺损,但是手术操作复杂且术后移植体缺血坏死、呛咳、误吸等各种并发症屡见不鲜,给吞咽和发声功能重建带来巨大的困难<sup>[3-6]</sup>。近年来,通过体外培养人的成肌细胞,与具有良好生物相容性、可降解的生物支架复合培养,构建具有极性的细胞支架复合物,可移植到缺损部位。随着生物支架的降解和细胞的增殖分化,最终形成具有一定功能的咽缩肌。

## 材料与方 法

1. 材料:聚氨酯(PU,中国),DEME培养基(Hyclone公司),胎牛血清(FBS,Hyclone公司),胰蛋白酶(Sigma公司),成肌相关蛋白MyoD单克隆抗体(Abcam公司),二抗(武汉博士德生物技术公司),青霉素、链霉素溶液(Gibco公司)。

2. 丝素蛋白(SF)的提取:丝素蛋白通过传统方法从天然蚕丝中提取<sup>[7]</sup>。将蚕丝浸没于0.5%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液中煮沸1h后再用大量水冲洗以去除丝胶。烘干后按照1:20的溶比

基金项目:宁波市重大(重点)课题(2008C50019);宁波市重大课题(2012C5015);宁波市科技创新团队(2012B82019)

作者单位:315211 宁波大学医学院(郭珊珊、陈静静、康骋);315400 宁波市医疗中心李惠利医院(沈志森、裘世杰、叶栋、任远)

通讯作者:沈志森,电子邮箱:szs7216@163.com

在 80℃ 下将其溶解于  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  中。待完全溶解后用透析袋在室温下透析 3~4 天,每 4h 更换 1 次双蒸水以彻底去除离子。

3. 支架的制备及表面改性:聚氨酯(PU)按照 1:8 的溶比在 37℃ 下溶解于 1,4-二氧六环中。待完全溶解后将溶液浇注于“平面”和“纹路”两种不同的模具上。在室温下挥发 12h 后可以形成一种平面的半透明薄膜和一种宽 200 $\mu\text{m}$ 、高 30 $\mu\text{m}$  的带纹路的薄膜。将膜沉浸在 95% 的乙醇溶液中 3h 以去除油性污物并用大量双蒸水冲洗以去除乙醇。随后在 37℃ 下将膜浸没于 0.06g/ml 的 1,6-己二胺/正丙醇溶液中 10min 进行氨解并洗去多余的 1,6-己二胺。接着将膜置于 30℃ 的真空干燥箱中抽真空 12h 以去除多余的正丙醇。将氨解后的 PU 膜在室温下浸泡于 1% 的戊二醛溶液中 4~6h 使氨基转换成醛基以增强其结合明胶或丝素蛋白的亲合力。最后分别将膜浸泡在 2mg/ml 的明胶/PBS 溶液和前期制备的丝素蛋白溶液中 24h 使蛋白与膜充分结合。用符合 96 孔板规格的打孔器将支架制成小圆片状。用 75% 的乙醇溶液消毒并用无菌 PBS 溶液去除多余乙醇后置于 96 孔板中供细胞培养使用。

4. 支架的性能检测:(1)力学性能检测:力学性能检测通过拉力测试机 (Instron 3366, 美国) 完成。将膜分为对照 (PU)、接枝明胶 (PU-Gelatin) 和接枝丝素蛋白 (PU-SF) 3 组,分别制成中间部分长 22mm、横断面 (0.2~0.3) mm  $\times$  3.8mm 的哑铃型,并以 60mm/min 的速率进行拉伸。每组样品重复 3 次。(2)降解性测试:将 3 组样品称重后 (记为  $W_0$ ) 置于高温灭菌的含青霉素和链霉素 (100U/ml) 的 PBS 溶液 (pH 值 7.4) 中,在 37℃ 的恒温箱中进行孵育。分别于 20、100、140、180 和 220 天时取出样品,真空干燥后称重 (记为  $W_1$ )。质量损失的计算公式如下:质量损失 =  $(W_0 - W_1)/W_0 \times 100\%$  每组样品重复 3 次。(3)接触角测量:接触角的测量通过表面张力接触角仪 (Digidrop, GBX, 法国) 完成。在相同的环境湿度和温度下,将 1.0 $\mu\text{l}$  左右的去离子水滴于样品表面并进行测量。

5. 细胞培养:在伦理委员会批准和下咽癌患者知情同意的前提下,取 10 例患者的癌旁正常咽缩肌组织 (经病理检查证实) 置于 4℃ 高温灭菌的含青霉素和链霉素 (100U/ml) 的 PBS 溶液 (pH 值 7.4) 中保存,并立即带往实验室进行进一步处理。用大量的 PBS 溶液冲洗咽缩肌组织并彻底去除脂肪和肌腱组织,将其剪成 1mm  $\times$  1mm  $\times$  1mm 大小的组织块后转移入培养瓶 (Corning, 美国) 中。使组织块粘附在培养瓶上,加入 2ml 含 20% FBS 的培养基直立放置于 37℃、 $\text{CO}_2$  浓度为 5% 的培养箱中,次日将瓶身放平并加入新鲜培养基没过组织块,每 3 日更换一次培养基。待细胞爬满组织块周围后弃去组织块。用 0.25% 的胰蛋白酶进行传代。取第 3~5 代的成肌细胞以  $6 \times 10^4/\text{ml}$  的密度接种于支架上进行培养。

6. MTT 检测:细胞培养 2、5 和 10 天后分别进行 MTT 检测。每孔中加入 20 $\mu\text{l}$  的 MTT 溶液 (0.5mg/ml) 于 37℃ 黑暗条件下孵育 4h。弃去培养基后加入 150 $\mu\text{l}$  二甲亚砜 (DMSO) 充分溶解紫色甲瓩晶体,用 ELISA 测试仪 (MaxM5, Spectra) 在

490nm 处测量吸光度值。每组样品重复 3 次。

7. 电镜观察:细胞培养 10 天后弃去培养基并用 PBS 清洗 3 次,每次 10min。用 4% 多聚甲醛溶液室温固定 30min 后用双蒸水洗涤 3 次,每次 10min。真空干燥后镀金,在扫描电镜 (飞利浦, CM100, 荷兰) 下观察并摄影。

8. Western blot 检测:(1)蛋白提取:细胞培养 10 天后用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5min。每个样品中加入含 PMSF 的裂解液 200 $\mu\text{l}$  于冰上孵育 30min。将裂解产物移入离心管中在 4℃ 下 12000r/min 离心 15min。将上清液移入新的离心管中待进一步实验。(2)上样:上清液中加入 5 $\times$  上样缓冲液至终浓度为 1 $\times$ ,煮沸 5min 灭活后上样于 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中。(3)电泳:以 100V 的电压在电泳缓冲液中进行 2h。转膜:在 4℃ 的转膜缓冲液中将蛋白转移至 PVDF 膜上。免疫反应:膜在 1% 的 BSA 室温下封闭 1h 后用一抗 (1:500 anti-MyoD1) 4℃ 孵育 12h。经 TBST 洗涤 3 次,每次 10min 后,在室温下二抗 (1:5000 HRP 标记的二抗) 孵育 1h。洗涤后加适量的发光剂 (ECL) 于膜上在凝胶成像系统 (Tanon-4200SF) 下曝光并摄影。

## 结 果

1. 支架的性能:拉伸应力是试样在拉伸时产生的应力,其值为所施加的力与试样的原始截面积之比,反应了材料抗拉压的能力。拉伸应变是材料受到拉力后在拉伸方向上的尺寸变量,变形量比上原来的尺寸,反应了材料的弹性。接枝丝素蛋白的聚氨酯薄膜 (PU-SF),其拉伸应力和应变都最高,明胶 (PU-Gel) 次之,对照组 (PU) 最低 (图 1)。在降解性方面,PU-Gel 降解速率最快,PU-SF 次之,PU 最慢 (图 2)。接触角是指将一滴水滴到一水平光滑的固体表面时,若液滴不完全润湿固体表面,固体表面上的固液气三相交界点处,气液界面和固液界面两切线把液相夹在其中时所形成的角。接触角是表征湿润性的重要指标,反应了材料的亲水性。接触角  $> 90^\circ$  为疏水,  $< 90^\circ$  为亲水,度数越小亲水性越好。由此可知,PU-SF 的亲水性最好,PU-Gel 次之,PU 疏水 (图 3)。

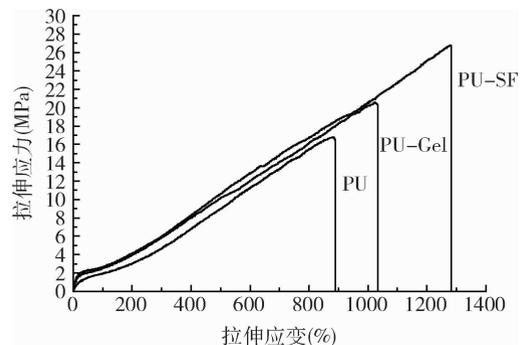


图 1 3 组支架的应力-应变曲线

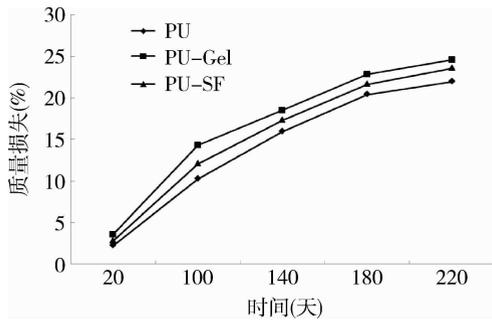


图2 3组支架在37°C的PBS中降解的速率

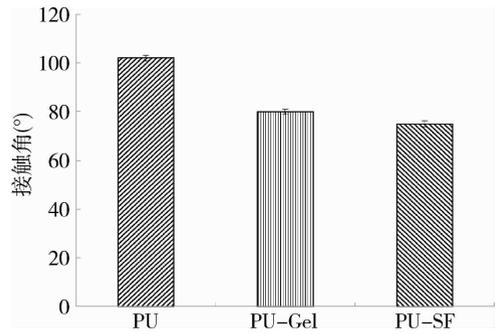


图3 3组支架的静态接触角

2. 电镜观察细胞在不同空间结构支架上的排列:笔者对两种不同空间构象的聚氨酯支架上细胞的排列进行了电镜观察、在平面(二维)的聚氨酯薄膜

上,细胞呈现不规则的排列,而在有纹路(三维)的支架上,细胞数量多且与纹路平行排列(图4)。

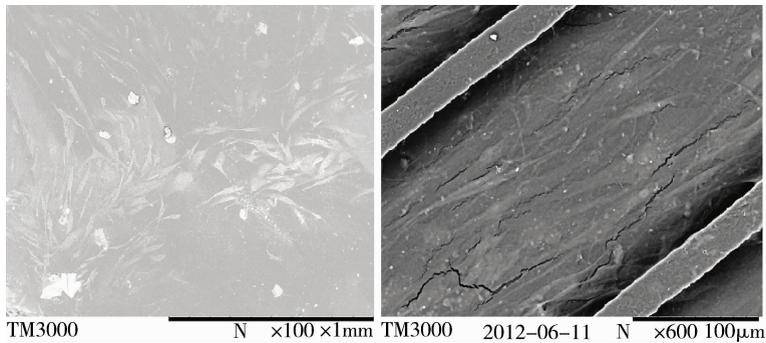


图4 成肌细胞分别在平面和带纹路支架上培养10天的电镜观察图  
细胞接种密度为  $6 \times 10^4$ /ml

3. 细胞在不同表面改性支架上的增殖和分化情况:笔者在3种不同表面改性的支架上接种相同密度的细胞,并在不同的时间点进行MTT检测。对各组而言,细胞的增殖速率并不快。但是组间进行比较时,PU-SF组略高于PU-Gel组,PU组最低(图5)。MyoD是一种生肌调节因子,其表达量的多少反应了细胞的分化状态。提取培养第10天的细胞,对组细胞的蛋白表达进行Western blot检测。PU-SF组略高于PU-Gel组,PU组最低(图6)。

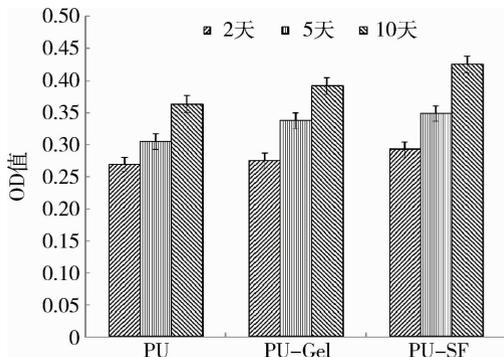


图5 成肌细胞在3组支架上的增殖速率

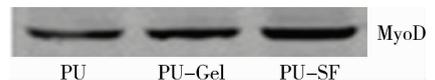


图6 成肌细胞在3组支架上分化情况的Western blot检测

### 讨 论

咽缩肌作为吞咽和发声过程的重要构件,其功能缺失严重影响了下咽癌患者术后的生存质量。骨骼肌作为终末分化组织,不具有再生能力,损伤后多为瘢痕组织取代,失去了收缩功能。这就要求寻找一种合适的支架材料,成功构建工程化的骨骼肌组织,修复缺损的骨骼肌。聚氨酯(PU)作为一种新型有机高分子材料,已经广泛应用于皮肤、血管、食管、骨骼和软骨组织工程等领域,而在骨骼肌组织工程中的应用较少<sup>[8,9]</sup>。PU因疏水性和缺乏活性基团而不利于细胞生长,我们可以在其表面接枝生物大分子如丝素蛋白、明胶、胶原蛋白、透明质酸和壳聚糖等增加表面亲水性,从而增强PU与细胞之间的黏附<sup>[9]</sup>。丝素蛋白是一种天然可降解的纤维蛋白,因其良好的机械性能

和生物相容性而广泛应用于各种生物医学材料<sup>[10]</sup>。本研究将丝素蛋白和明胶接枝于聚氨酯表面,与对照组相比,支架的亲水性明显提高。丝素蛋白还能提高支架的抗拉压能力和弹性,从而更好地模拟骨骼肌的收缩和舒张。此外,丝素蛋白比明胶降解慢,这也适应了成肌细胞增殖慢的特点。

传统的体外细胞培养使用的是二维生长表面,这有利于识别细胞结构和分化状况。但体内肌细胞的细胞外基质是三维的,这种二维的环境迫使细胞以非自然的形态生长,因此二维环境对三维的骨骼肌来说是不合适的。此外,三维支架还可以增强成肌细胞的增殖和分化。应用“密纹”技术可以获得平息排列的纤维。密纹就是用模具制造有纹路的三维支架,从而促进细胞的定向生长。Huang 等用聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成一种带纹路的薄膜,他们发现骨骼肌卫星细胞在带纹路的支架上沿着纹路融合成肌管,且肌管比在不带纹路支架上的长。本研究应用聚氨酯制成三维支架,促进了细胞的增殖和定向排列,接枝丝素蛋白和明胶后,促进了成肌细胞的相互融合和肌管的形成。

表面改性后的三维聚氨酯生物支架,其亲水性和生物相容性有明显提高,促进了体外成肌细胞的增殖和肌管的融合及定向排列。然而体内肌细胞生长于复杂的微环境中,其增殖和分化受到各种生物因子的调节和理化因素的影响。移植后的工程化骨骼肌组织其神经血管化的建立也是亟待解决的问题。因此,我们课题组接下来将着重在动物实验方面进行研究。

参考文献

- 1 Yusuf F, Brand - Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 138(2): 187 - 199
- 2 Patel D, Kuriakose MA, Iyer S, et al. Reconstruction of the laryngopharynx[J]. *Indian J Plast Surg*, 2007, 40(12): 44 - 51
- 3 Hsiao HT, Leu YS, Chang YC, et al. Voice and swallowing after laryngopharyngectomy and free ileocolic flap reconstruction for hypopharyngeal cancer[J]. *Ann Plast Surg*, 2009, 62(4): 390 - 394
- 4 Yamawaki S, Sawabe K, Kataoka K, et al. The combined use of hyoid bone flap and radial forearm free flap for reconstruction following partial laryngopharyngectomy[J]. *Ann Plast Surg*, 2011, 66(3): 257 - 260
- 5 Liu HW, Li ZD, Dong HL, et al. Application of free anterolateral thigh flap in head and neck surgery[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2011, 46(5): 378 - 381
- 6 Wang WH, Hwang TZ, Chang CH, et al. Reconstruction of pharyngeal defects with a submental island flap after hypopharyngeal carcinoma ablation[J]. *ORL*, 2012, 74(6): 304 - 309
- 7 Khan MMR, Tsukada M, Gotoh Y, et al. Physical properties and dyeability of silk fibers degummed with citric acid[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(21): 8439 - 8445
- 8 de Mulder ELW, Hannink G, Koens MJW, et al. Characterization of polyurethane scaffold surface functionalization with diamines and heparin[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, 101:919 - 922
- 9 Stachelek SJ, Alferiev I, Fulmer J, et al. Biological stability of polyurethane modified with covalent attachment of di - tert - butyl - phenol [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, 82(4): 1004 - 1011
- 10 Fan S, Zhang Y, Shao H, et al. Electrospun regenerated silk fibroin mats with enhanced mechanical properties[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 56:83 - 88

(收稿日期:2013 - 03 - 23)

(修回日期:2013 - 04 - 01)

## 利用环介导恒温扩增法快速检测空肠弯曲菌

刘孝波 蒋栋能 蒲晓允

**摘 要 目的** 利用环介导恒温扩增技术,以空肠弯曲菌的 VS1 基因设计引物,建立快速检测空肠弯曲菌的方法,以期能应用于急性腹泻和肠炎等疾病的快速检验。**方法** ①通过基因比对与引物设计,设计针对空肠弯曲菌的环介导恒温扩增检测(LAMP)方法;②用钙黄绿素、亚甲基蓝、结晶紫、溴化乙锭 4 种 DNA 染料对扩增产物进行染色,评价各染料染色效果;③检测该 LAMP 方法对空肠弯曲菌及其他干扰菌的扩增情况,评价其特异性;④将该 LAMP 方法与培养法比较,进行统计学分析。**结果** ①设计出针对空肠弯曲菌的 LAMP 检测方法;②钙黄绿素与扩增产物结合后颜色变化明显,是该 LAMP 方法中较好的 DNA 染料物质;③本 LAMP 检测方法只针对空肠弯曲菌有扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性;④试验共检测了 60 株临床和标准菌株,对于菌株的培养物,LAMP 检测结果与培养鉴定法比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.3333, P > 0.05$ )。**结论** 本试验设

作者单位:400037 重庆,第三军医大学第二附属医院检验科

通讯作者:蒲晓允,电子邮箱:puxiaoyun@yahoo.cn