

## 论著

文章编号:1000-5404(2012)07-0618-04

### 人脐血单个核细胞移植改善雌鼠压力性尿失禁

曹莉莉,徐惠成 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

**[摘要]** **目的** 探讨人脐血单个核细胞(human cord blood mononuclear cells, HCMNCs)移植对压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)大鼠尿道括约肌的修复和功能重建作用。**方法** 采用反复阴道扩张的方法模拟产道损伤建立雌性SD大鼠SUI模型。40只大鼠按随机数字表法分为模拟组10只、实验组30只(移植组15只,实验对照组15只)。羟乙基淀粉沉淀加密度梯度离心的方法制备HCMNCs,并以4,6-联脒-2-苯基吲哚(DAPI)标记。模型制作成功后即在移植组近端尿道注射已标记HCMNCs  $2 \times 10^6$ 个,对照组注射相同质量PBS液。检测尿动力学指标后获取近端尿道组织,观察荧光细胞的形态和分布以及尿道括约肌的变化。**结果** 通过反复阴道扩张可建立SUI大鼠模型, HCMNCs可在受损尿道括约肌内存活、分布,移植组比较对照组尿道括约肌得以较好修复, SUI大鼠控尿能力明显改善。**结论** HCMNCs可成功移植到SUI大鼠尿道括约肌,改善控尿,促进尿道括约肌的修复。

**[关键词]** 尿失禁,压力性;脐血单个核细胞;移植

**[中图法分类号]** R329-33;R694.54;R459.9

**[文献标志码]** A

### Human cord blood mononuclear cells transplantation in treatment of female stress urinary incontinence in rats

Cao Lili, Xu Huicheng (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate regenerative and functional reconstruction effect of human cord blood mononuclear cells (HCMNCs) transplantation into the urethral sphincter of rats with stress urinary incontinence (SUI). **Methods** A female SD rat model of SUI was established by repetitive vaginal distention to simulate birth trauma. According to random number table method, forty virgin female SD rats were randomly divided into 2 groups, the sham-operation group ( $n = 10$ ) and experimental group ( $n = 30$ ). The rats in the experimental group were further divided 2 subgroups ( $n = 15$ ), that is, the transplantation group and the SUI group. HCMNCs were isolated by density gradient centrifugation, and labeled by 4,6-diamidine-2-phenyl-indole dihydrochloride (DAPI). After 7 days of second vaginal expansion, the transplatation group was injected into HCMNCs (approximately  $2 \times 10^6$  cells) at proximal urethra, whereas the SUI group was injected into the same volume of PBS. The urodynamic indicators, retrograde urethral perfusion pressure (RUPP) and maximum bladder capacity (MBC) were measured and recorded in 7 and 14 d after transplantation. The proximal urethral tissues were collected in 7 d after transplantation, the cell shape and morphology, and fluorescent distribution were observed by HE staining, Masson staining and laser scanning confocal microscopy. **Results** A rat model of female SUI was established successfully through repeated vaginal distention. HCMNCs remained alive and distributed in the damaged urethral sphincter. Consequently, the transplantation group showed better repair compared to the SUI group in damaged urethral sphincter, and the continence function of urethral sphincter in SUI rat models was significantly improved. **Conclusion** HCMNCs can be successfully transplanted into urethral sphincter to improve urinary capacity of SUI rats, and the transplantation promotes the repair of urethral sphincter. Our results suggest HCMNCs transplantation may be an effective method to treat female stress urinary incontinence.

**[Key words]** urinary incontinence, stress; cord blood mononuclear cells; transplantation

Supported by the Foundation of Clinical Science Research of Third Military Medical University (2010XLC21). Corresponding author: Xu Huicheng, Tel: 86-23-68765403, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

**[基金项目]** 第三军医大学临床科研基金(2010XLC21)

**[通信作者]** 徐惠成,电话:(023)68765403, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)的治疗方式主要包括非手术治疗和手术治疗,其中手术治疗存在多种并发症甚至出现矫枉过正的结果。注射疗法作为一种微创的治疗手段,具有操作简便,患者可接受性高,从根本上改善括约肌功能的优点。然而由于既往注射材料的限制,并发症多、远期疗效差。随着组织工程技术的发展,特别是对干细胞认识的不断深入,为SUI提供了崭新的治疗途径。已有大量研究证明干细胞治疗不仅可以改善受损器官短期的功能,而且已显示出其较长期的效能<sup>[1-2]</sup>。脐血干细胞具有来源容易、免疫原性弱,有广泛的增殖能力和多向分化潜能特性,而且含脐血干细胞的脐血单个核细胞更原始,是一多异质性细胞群,具有分泌多种细胞因子的能力,因而可能是一种理想的细胞移植的来源。为SUI的临床研究开启了新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

选取3~4月龄Sprague-Dawley雌性大鼠40只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量210~270 g。相对密度1.077淋巴细胞分离液(天津灏洋生物),胎牛血清(PAA公司),L-DMEM培养基(Hyclone公司),DAPI(碧云天公司),RM6240多道生理信号采集系统(成都仪器厂)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 HCMNCs提取和标记 脐血来至第三军医大学西南医院产科,采血量50~100 ml,6 h内分离。脐血与羟乙基淀粉(万汶)1:1混匀,沉降红细胞,取上清液按2:1比例叠加于1.077 g/L Ficoll-paque分离液上,4℃低温离心取中间单个核细胞白膜层, PBS液洗涤3次,制成单个核细胞悬液。以 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于含10%胎牛血清的L-DMEM培养基中,培养48 h后加入终浓度为30 mg/L的DAPI工作液,在37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的细胞培养箱中孵育24 h,之后离心收集脐血单个核细胞, PBS洗涤6遍,再加入PBS重悬细胞 $1.0 \times 10^5/\mu\text{l}$ 备用。

1.2.2 动物分组和SUI模型建立 40只大鼠按随机数字表法分为模拟组10只、SUI实验组30只,随机取实验组中已建好模型的15只行HCMNCs注射组成移植治疗组,另15只同时注射相同质量的PBS液组成实验对照组。SUI模型建立参见文献<sup>[3-4]</sup>,大鼠以质量浓度为10 g/L的戊巴比妥钠腹腔麻醉,碘伏消毒会阴部,然后放置经润滑的8-Fr Foley尿管(剪去部分头端)入阴道内,3/0丝线缝合固定在阴道外口,3 ml生理盐水注入气囊,经过2 h阴道扩张,抽出气囊,拔出尿管,7 d后重复扩张1次。模拟组只置入导尿管而不扩张。移植治疗组在第2次扩张后7 d注射已标记培养的重悬HCMNCs,同时对对照组注射

相同质量的PBS液。对SUI模型行喷嚏试验(先排空大鼠膀胱,根据测得的最大膀胱容量,注入量为容量一半的生理盐水,用剪断的大鼠胡须刺激大鼠鼻孔,致其出现喷嚏反射),并检测扩张前后阴道变化(游标卡尺于大鼠阴道口3点和9点位置测量),以及尿动力学检测。

1.2.3 HCMNCs局部注射 麻醉后从阴道前壁入针,在尿道近端处取时钟3点、9点注射,注射量为每侧10  $\mu\text{l}$ ,每只大鼠每侧注入 $1.0 \times 10^6$ 个。

1.2.4 尿动力学测定 分别于建模前后、细胞移植7、14 d各组分别取5只大鼠行尿动力学检测,测定尿道逆向灌注压(retrograde urethral perfusion pressure, RUPP)<sup>[5]</sup>和最大膀胱容量(maximum bladder capacity, MBC)。排空膀胱后用经润滑的硬膜外导管光滑端插入大鼠尿道内,约3 cm,硬膜外导管通过一根硅胶导管与1个三通管相连,三通管一端接微量注射泵,另一端和压力传感器相连,保证管道内无空气,微量注射泵以12 ml/h速度向尿道内持续灌注生理盐水,记录尿道内压力变化,当膀胱内压升高,尿道压力突然降低时记录压力。以尿道口出现第1滴液体为准,记录当时的膀胱容量为MBC。每只大鼠检测3次,取平均值。

1.2.5 组织学检查 移植治疗组第7天取2只大鼠近端尿道OCT包埋冰冻切片,于激光共聚焦显微镜下观察移植细胞存活、分布情况。其余大鼠近端尿道行HE染色、Masson染色。

### 1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析和t检验。

## 2 结果

### 2.1 模型建立

大鼠喷嚏试验有漏尿,竖立垂直上提时也有漏尿发生。SUI大鼠与建模前阴道比较差异具有统计学意义 $[(8.389 \pm 0.962) \text{ mm vs } (5.118 \pm 0.635) \text{ mm}, P < 0.05]$ 。

阴道扩张前后尿动力学检测:分别随机检测5只,对比阴道扩张前后RUPP和MBC,见表1。经Masson染色,扩张前尿道组织连接紧密,肌层排列连续、整齐。经阴道反复扩张后组织肿胀明显,肌层较稀疏,纤维呈现明显断裂、紊乱,见图1。

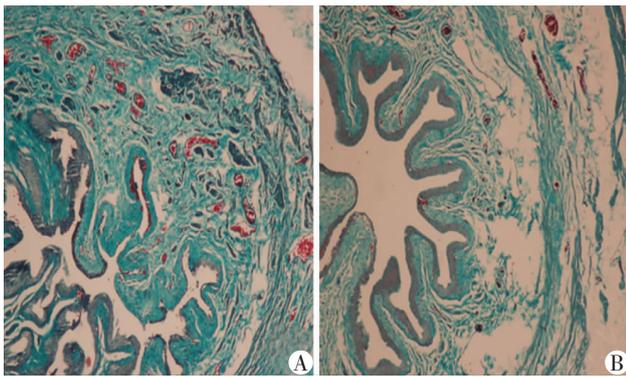
表1 大鼠阴道扩张前后尿动力学结果( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

时间	最大膀胱容量(ml)	尿道逆向灌注压(cmH <sub>2</sub> O)
阴道扩张前	1.45 ± 0.08	40.58 ± 0.97
阴道扩张后	2.87 ± 0.88 <sup>a</sup>	25.72 ± 0.86 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ ,与阴道扩张前比较

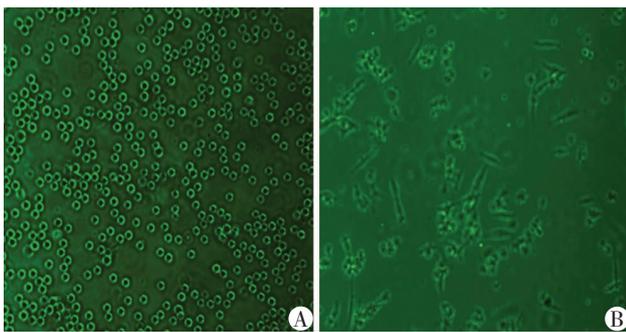
### 2.2 脐血单个核细胞培养前后形态变化

培养前HCMNCs数量较多,体积较小,形态一致,直径约为17  $\mu\text{m}$ 。培养后细胞胞体增大,见梭形细胞和团簇样细胞,梭形细胞形似骨髓MSCs,见图2。



A: 阴道扩张前; B: 阴道扩张后

图1 大鼠阴道扩张前后近端尿道 Masson 染色观察 (×200)



A: 原代 HCMNCs; B: 培养 3 d

图2 HCMNCs 培养前后形态变化 (×100)

### 2.3 SUI 模型大鼠行 HCMNCs 移植后尿动力学检测

检测注射后 7、14 d 模拟组、对照组和细胞治疗组的 RUPP 和 MBC, 见表 2。对照组 RUPP 逐渐恢复, 细胞治疗组移植后第 7 天和第 14 天, RUPP 均得到显著提高, 但移植后 MBC 没有明显改变。

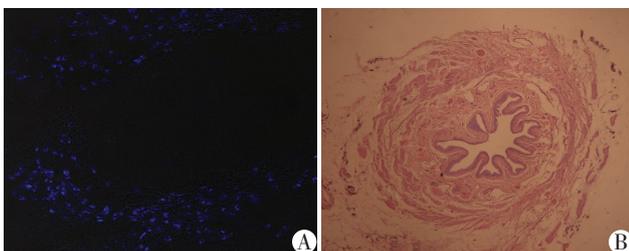
表2 细胞移植后 SUI 大鼠尿动力学结果 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	第7天		第14天	
	MBC(ml)	RUPP(cmH <sub>2</sub> O)	MBC(ml)	RUPP(cmH <sub>2</sub> O)
模拟组	1.44 ± 0.09	40.26 ± 2.46	1.48 ± 0.08	40.13 ± 1.91
对照组	2.73 ± 0.57 <sup>a</sup>	29.32 ± 1.81 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.57 <sup>a</sup>	34.18 ± 0.70 <sup>a</sup>
治疗组	2.65 ± 0.51 <sup>a</sup>	34.02 ± 0.91 <sup>ab</sup>	2.79 ± 0.68 <sup>a</sup>	39.78 ± 2.83 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与模拟组比较; b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

### 2.4 移植细胞移植后分布

移植治疗组细胞注射第 7 天, 细胞核呈 DAPI 染色阳性的移植细胞较均匀的存在分布于尿道周围肌肉 (图 3A), 呈蓝色荧光, 表明移植的 HCMNCs 在尿道括约肌内存活; 部分染色阳性的细胞形态呈扁平状, 并参与到肌内的组成 (图 3B)。

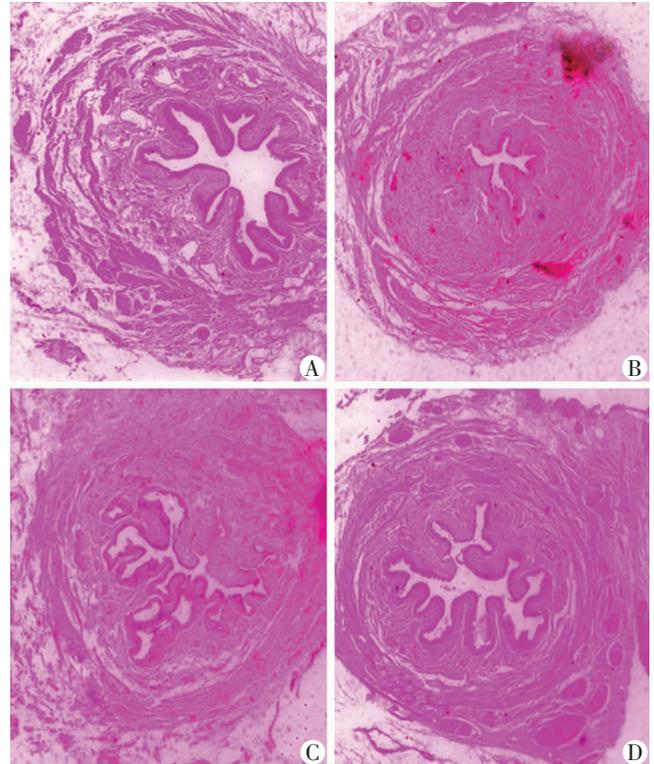


A: 激光共聚焦显微镜观察 (×50); B: HE 染色观察 (×100)

图3 移植 7 d 后 HCMNCs 形态变化

### 2.5 组织形态学变化

PBS 液注射 14、21 d 组织肿胀缓解, 黏膜层和平滑肌层逐渐恢复, 横纹肌层断裂少见, 但较紊乱, 肌肉组织仍然较稀疏。移植治疗组与对照组比较组织得以较快恢复, 组织连接紧密, 平滑肌层厚, 横纹肌层排列连续, 并见较多血管分布 (图 4)。提示尿道括约肌功能得到恢复。



A: PBS 注射 14 d (阴道扩张后 21 d); B: 细胞移植 14 d; C: PBS 注射 21 d (阴道扩张后 28 d); D: 细胞移植 21 d

图4 大鼠近端尿道组织形态学观察 (HE ×100)

### 3 讨论

目前压力性尿失禁的治疗主要以耻骨后尿道悬吊术和尿道下悬吊带术为主, 即使 III 型尿失禁, 治疗仍是以悬吊为主。但是随着吊带的大量运用, 术后并发症日益显现<sup>[6-7]</sup>。与理想的悬吊材料应具有合并症低、取材容易、耐用、无免疫原性并具有可塑性的要求还相差很远。手术并发症包括膀胱穿孔、出血、肠管损伤、阴道膨出以及网片侵蚀等, 有的甚至引起难以弥补的严重后果。注射填充物质可以引起慢性炎症、异物巨细胞反应、尿道周围脓肿、膀胱尿道腐蚀甚至移位到器官内部、肺栓塞等, 而且长期疗效差。近年来通过移植细胞修复受损的组织结构并恢复它的功能来治疗尿失禁, 已取得了一些初步成果<sup>[8-9]</sup>。可是用于移植的细胞存在许多问题, 如取材困难、细胞数量有限、细胞存活率低以及增殖能力不强等限制。然而脐带血干细胞却具有以下特点: 来源广泛, 采集方便; 脐带血中

的干/祖细胞较成人骨髓中的干/祖细胞更原始,有更强的增殖分化能力;血中淋巴细胞的免疫原性较弱,移植抗宿主病发生率较低;富含内皮祖细胞,对血管发生具有重要作用<sup>[10]</sup>;以及不会有肿瘤细胞产生等等。含脐血干细胞的 HCMNCs 具有分泌多种细胞因子的能力,获取操作过程容易,不易污染,数量较多,而且已在临床上其他领域得以广泛运用,因而可能是一种理想的细胞移植的来源。

阴道分娩可致下尿路肌肉神经组成的机械损伤、缺血或去神经化<sup>[11]</sup>。Foldspang<sup>[12]</sup>发现 2/3 的 30 ~ 44 岁的 SUI 妇女至少有 1 次阴道分娩经历。分娩时第 2 产程过长可引起盆底神经肌肉损伤<sup>[13]</sup>,甚至可导致阴部神经损伤,严重者可引起盆底肌肉松弛,致腹压不能传至近端尿道而出现 SUI。因而通过扩张阴道,模拟产道损伤可以建立 SUI 动物模型,用于研究 SUI 的发病机制和治疗。RUPP 可以反映出尿道在持续扩张状态下的弹性阻力,间接表达尿道的关闭能力。MBC 则反映出膀胱的储尿能力。正常机体局部组织损伤后会发生组织再生修复,但尿道括约肌的再生能力有限。本研究建立的模型同时有尿道括约肌结构和功能缺陷,类似于人类由于 ISD 导致 SUI。

本实验方法获得的细胞注射到大鼠近端尿道,1 周后较均匀地分布到尿道黏膜下组织,并未局限在注射部位,提示移植的 HCMNCs 已发生迁移。HCMNCs 移植改善尿控功能的机制可能与以下因素有关:细胞整合到宿主纤维,增加收缩强度;再生有神经支配的肌纤维;分泌细胞因子促进损伤肌肉神经的修复;促进周围血管生成改善组织缺血、缺氧状态利于组织的恢复;以及移植物的填充效应等。本研究结果与文献<sup>[14]</sup>报道一致,通过 Masson 染色可见尿道括约肌损伤后肌纤维减少,结缔组织成分增多<sup>[2]</sup>。研究中细胞移植后见尿道括约肌肌层明显增厚,并见较多肌束和血管分布,由此推测移植的细胞不只是发挥填充效应。移植后 RUPP 显著提高,但移植后 MBC 没有明显改变,我们推测在尿道注射后移植细胞仅作用于近端尿道组织,对于受损的逼尿肌没有改善,本实验尚缺乏较远期的结果证明移植细胞对膀胱的作用。

细胞移植依靠的是移植细胞能够在受体内存活、分化、增生。尽管现在技术能够成功分离培养和增殖得到足量的目的细胞用于修复重建。但是要使它成为一个切实可行的方法来代替目前的治疗手段应用于临床,还需要进一步的临床试验研究。本实验为组织工程化干细胞治疗 SUI 的研究打下基础。

## 参考文献:

- [1] Passier R, van-Laake L W, Mummery C L. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart[J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 322 - 329.
- [2] Mitterberger M, Pinggera G M, Marksteiner R, et al. Adult stem cell therapy of female stress urinary incontinence[J]. *Eur Urol*, 2008, 53(1): 169 - 175.
- [3] Lin A S, Carrier S, Morgan D M, et al. Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat [J]. *Urology*, 1998, 52(1): 143 - 151.
- [4] Lin Y H, Liu G, Li M, et al. Recovery of continence function following simulated birth trauma involves repair of muscle and nerves in the urethra in the female mouse [J]. *Eur Urol*, 2010, 57(3): 506 - 512.
- [5] Rodriguez L V, Chen S, Jack G S, et al. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(5): R1332 - R1338.
- [6] Tijdink M M, Vierhout M E, Heesakkers J P, et al. Surgical management of mesh-related complications after prior pelvic floor reconstructive surgery with mesh[J]. *Int Urogynecol J*, 2011, 22(11): 1395 - 1404.
- [7] Boulanger L, Boukerrou M, Rubod C, et al. Bacteriological analysis of meshes removed for complications after surgical management of urinary incontinence or pelvic organ prolapse[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2008, 19(6): 827 - 831.
- [8] Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211 - 228.
- [9] Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, et al. Autologous myoblasts and fibroblasts versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2007, 369(9580): 2179 - 2186.
- [10] Droetto S, Viale A, Primo L, et al. Vasculogenic potential of long term repopulating cord blood progenitors [J]. *FASEB J*, 2004, 18(11): 1273 - 1275.
- [11] Altman D, Ekstrom A, Forsgren C, et al. Symptoms of anal and urinary incontinence following cesarean section or spontaneous vaginal delivery[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 197(5): 512. e1 - 512. e7.
- [12] Foldspang A, Mommsen S, Lam G W, et al. Parity as a correlate of adult female urinary incontinence prevalence[J]. *J Epidemiol Community Health*, 1992, 46(6): 595 - 600.
- [13] Damaser M S, Whitbeck C, Chichester P, et al. Effect of vaginal distension on blood flow and hypoxia of urogenital organs of the female rat [J]. *J Appl Physiol*, 2005, 98(5): 1884 - 1890.
- [14] Lim J J, Jang J B, Kim J Y, et al. Human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation in rats with intrinsic sphincter deficiency[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(5): 663 - 670.

(收稿:2011-09-21;修回:2011-12-12)

(编辑 吴培红)