

不同部位喉黏膜间充质细胞的分离培养 *

刘 阳 韩 鹏 梁媛媛 邓志宏[△]

(第四军医大学西京医院全军耳鼻咽喉头颈外科中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨不同部位喉黏膜间充质细胞的分离、培养方法,为喉部组织工程提供更多的可供选择的种子细胞。方法:收集临床上喉部手术病人切下的不同部位的喉黏膜,主要是会厌的背侧黏膜和声带的黏膜,各3例,共计6例。对会厌背侧的黏膜采用消化培养的方法,对声带部位的黏膜采用组织块培养法。最后通过免疫荧光染色对两种方法所获得的细胞进行鉴定,确定其来源于喉黏膜的间充质。结果:通过两种方法均可以成功获得相应部位的细胞,免疫荧光染色 vimentin 均呈阳性表达且 CK 均呈阴性表达,证明了获得的细胞确实是来源于间充质。结论:本实验成功的培养出了喉部不同部位的间充质细胞,为喉部的组织工程提供了更多的可供选择的种子细胞。

关键词 喉黏膜; 间充质细胞; 组织工程

中图分类号 R767.92 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2011)08-1440-03

Isolation and cultivation of mesenchymal cells from the different parts of laryngeal mucosa*

LIU Yang, HAN Peng, LIANG Yuan-yuan, DENG Zhi-hong[△]

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study isolation and cultivation of mesenchymal cells from the different parts of laryngeal mucosa for laryngeal tissue engineering. **Methods:** We collected different parts of the laryngeal mucosa from clinically patients underwent laryngeal surgery, including epiglottis dorsal mucosa and vocal fold mucosa, each 3 cases, total 6 patients. Digestion method was used for epiglottis dorsal mucosa and tissue culture method was used for vocal fold mucosa. Two kinds of cells from the different parts of laryngeal mucosa were identified by immunofluorescence staining. **Results:** Two kinds of cells from the different parts of laryngeal mucosa could both be obtained. Immunofluorescence staining also proved that two kinds of cells derived from mesenchyme, which vimentin was positive and CK was negative. **Conclusions:** In this experiment, we have successfully cultured mesenchymal cells from different parts of the laryngeal mucosa, which will offer more alternative laryngeal seed cells for laryngeal tissue engineering.

Key Words:Laryngeal mucosa; Mesenchymal cells; Tissue engineering

Chinese Library Classification(CLC):R767.92 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1440-03

前言

根据流行病学调查,喉部疾病的发病率逐年上升。手术是解决喉部疾病的一个重要手段,特别是目前的微创手术可以在显微镜下借助激光等手段切除声带癌前病变及早期声带癌,但病变切除的同时,造成了声带固有层的缺失及术后瘢痕形成,影响了患者的发音。由此我们可以看出,声带瘢痕已成为我们迫切需要解决的一个重要问题。

声带瘢痕多是由声带创伤、炎症等造成的,一般发生在固有层。声带瘢痕的治疗已成为嗓音外科研究的热点和难点,声带注射是解决此难题的有效途径^[1-5]。现有的用于声带注射的细胞主要是来源于不同部位的间充质干细胞^[6-8],而使用原位的间充质干细胞还未见报道。为此我们首先对喉部黏膜不同部位的间充质来源细胞进行分离培养,为后面寻找其中的间充质干细胞打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源 实验所用的组织来源于第四军医大学西京医院耳鼻咽喉头颈外科喉部手术病人切下的正常黏膜,共6例,3例是会厌背侧黏膜,3例是声带黏膜,均为男性,年龄在55-65岁,供体无传染病及内分泌疾病。手术前与患者谈话并征得其同意。

1.1.2 主要试剂和实验用品 DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、型胶原酶(Gibco 公司),PBS(北京百灵克公司),青、链霉素溶液、胎牛血清(杭州四季青公司),小鼠抗人 Vimentin CK(1:100, Chemicon, USA),细胞培养瓶、培养板、培养皿、离心管(丹麦 nunc 公司)。

1.2 实验方法

* 基金项目:国家自然科学基金(30973285)

作者简介:刘阳(1982-),男,硕士研究生,医师,研究方向:喉部的组织工程,Email: waebh@126.com

[△]通讯作者:邓志宏,Email: dengzhifmmu@126.com

(收稿日期:2011-01-02 接受日期:2011-01-23)

1.2.1 会厌背侧黏膜的分离和培养 将手术获得的黏膜用含有双抗的 PBS 冲洗,去除表面的残留物。将黏膜平铺在培养皿底部,用弯剪去除黏膜表面残留的肌肉及其它组织,用手术刀片将黏膜切成宽 1 cm 的长条放入离心管中,加入其 3 倍体积的 Dispase 酶。将离心管置于 37 ℃ 的 CO₂ 孵箱中放置 30 min,体式显微镜下利用显微镊去除上皮,留下固有层。向黏膜固有层中加入 3 倍体积 Ⅰ型胶原酶,用弯剪刀剪成细小的颗粒后置于离心管中放于 37 ℃ 的 CO₂ 孵箱中消化 50 min,用 100 目筛网对消化后的组织进行过滤,将滤液接种入培养瓶置于 37 ℃ 的 CO₂ 孵箱中放置 3 d,贴壁后 3 d 换液一次,待细胞培养至 80 % 融合时,用适量的 0.25 % 的胰酶消化并按 1:2 的比例传代。

1.2.2 声带黏膜的分离和培养 将手术获得的黏膜用含有双抗的 PBS 冲洗,去除表面的残留物。将黏膜平铺在培养皿底部,用弯剪去除黏膜表面残留的肌肉及其它组织。用手术刀片将黏膜切成小块,长、宽各 0.3 cm 左右放入培养皿中,滴一滴培养液将培养皿倒置放入 37 ℃ 的 CO₂ 孵箱中孵育 1 h。取出培养皿小心加入适量培养液,避免贴壁的组织块浮起。3 d 换液一次,待 1 w 左右细胞爬出后去除组织块,用适量的 0.25 % 的胰酶消化并将细胞接种入培养瓶。贴壁后 3 d 换液一次,待细胞培养至 80 % 融合时,用适量的 0.25 % 的胰酶消化并按 1:2 的比例传代。

1.2.3 免疫荧光染色 准备第四代细胞,以 1×10⁵ /ml 的浓度接种于 24 孔培养板中,当细胞贴壁生长达 80 % 融合时,按照说明书进行 vimentin 和 CK 的免疫荧光染色。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

2.1.1 会厌背侧黏膜细胞形态 原代培养的会厌背侧黏膜细胞在 2 d 左右开始贴壁,成短梭形,贴壁 24 h 牢固后细胞伸展成长梭形,形态类似成纤维细胞,核较大,呈椭圆形。贴壁后细胞迅速生长,5 d 左右融合至 80 %,以后每 3 d 传代一次,至 14 代细胞形态及倍增时间无明显改变(图 1)。

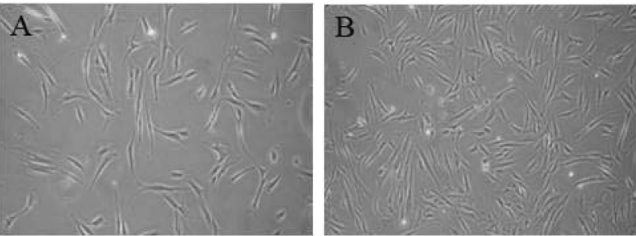


图 1 A: 为原代获得的会厌背侧黏膜间充质细胞 B:为 14 代时细胞至 14 代时细胞形态无明显变化,细胞状态良好。(×40)
Fig 1 A: P0, epiglottis dorsal mucosa mesenchymal cells B: P14 No Differences between P0 and P14, showing cells are in good condition. (×40)

2.1.2 声带黏膜细胞形态 原代培养的声带黏膜细胞在 2 d 左右开始贴壁,起初成短梭形,贴壁 24 h 牢固后细胞伸展成长梭形,但较会厌背侧黏膜细胞和成纤维细胞均更为细长,核较大,呈椭圆形。贴壁后细胞迅速生长,5 d 左右融合至 80 %,以后每 3 d 传代一次,至 14 代细胞形态及倍增时间无明显改变(图 2)。

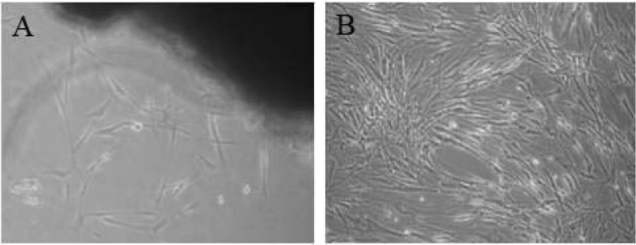


图 2 A: 为原代获得的声带黏膜间充质细胞 B:为 14 代时细胞至 14 代时细胞形态无明显变化,细胞状态良好。(×40)
Fig 2 A: P0, vocal fold mucosa mesenchymal cells B: P14 No Differences between P0 and P14, showing cells are in good condition. (×40)

2.2 免疫荧光染色

两个部位的细胞免疫荧光染色,vimentin 均呈阳性表达,CK 均无表达(图 3-4)。

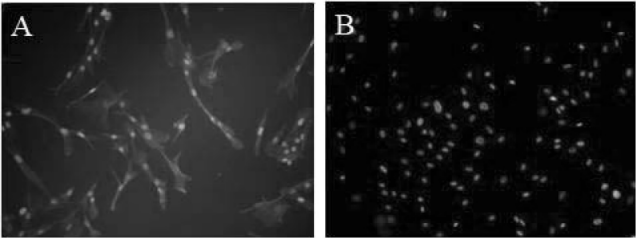


图 3 会厌背侧黏膜间充质细胞免疫荧光染色 A: vimentin 呈阳性表达。B: CK 无表达。此结果证明了获得的细胞是来源于间充质且不含有表皮细胞。(×40)
Fig 3 Immunofluorescence staining of epiglottis dorsal mucosa mesenchymal cells A: Vimentin was positive. B: CK was negative. It proved that epiglottis dorsal mucosa cells derived from mesenchyme without epidermal cells. (×40)

3 讨论

近年来,随着干细胞研究的深入,干细胞作为治疗声带疤痕的一种新的治疗手段,为我们带来了希望。人们尝试利用骨髓间充质干细胞^[9-10]、肌源性干细胞^[11]及脂肪基质干细胞^[12-14]等治疗声带疤痕,然而,尽管以上干细胞在修复声带固有层损伤中取得一定疗效,但其植入声带组织后,可诱导分化为软骨、骨、脂肪,甚至出现腺体组织,组织结构差异较大,长期疗效不理想^[15]。因此,寻找取材方便,组织来源、组织结构最接近声带固有层的组织材料用于声带固有层损伤的修复治疗是我们的目标。

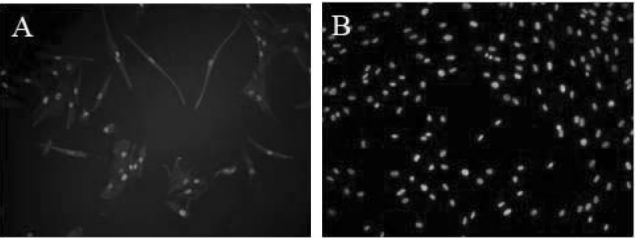


图 4 声带黏膜间充质细胞免疫荧光染色 A: Vimentin 呈阳性表达。B: CK 无表达。此结果证明了获得的细胞是来源于间充质且不含有表皮细胞。(×40)
Fig 4 Immunofluorescence staining of vocal fold mucosa mesenchymal cells A: Vimentin was positive. B: CK was negative. It proved that vocal fold mucosa cells derived from mesenchyme without epidermal cells. (×40)

我们考虑到以上存在的问题, 决定进行原位取材来寻找新型的间充质干细胞。喉黏膜范围广泛, 包括声带、室带、下咽等区域组织, 其中除声带黏膜取材会对发音造成影响外, 其它部位黏膜具有取材方便、相对隐蔽、术后不留瘢痕、不影响发音等优点。进行干细胞鉴定的前提是获得充足的细胞, 而本实验通过采用常用的细胞培养方法, 成功的实现了这一目的, 为后期的细胞鉴定工作打下了良好的基础。

喉部的黏膜主要是分为两类, 一类是具有较高韧性的声带黏膜, 一类是喉部的正常黏膜组织。针对喉部不同部位黏膜的组织结构特点, 我们采用了不同的培养方法。声带是我们的发声器官, 因此具有较高的韧性和弹性, 组织结构较为致密, 所以我们希望直接分离表皮是十分困难的, 只能采用组织块贴壁培养法。喉部其它部位的黏膜不具有发声的功能, 组织结构较为疏松, 可以采用直接分离上皮的消化培养法。

通过对获得细胞进行形态学观察, 我们发现会厌部位的细胞形态较为规则, 更加接近于成纤维细胞, 而从声带黏膜所获得的间充质细胞则更为细长, 这很有可能与其声带的发声功能有着密切的联系。免疫荧光染色的结果, 间充质细胞的特异性抗体呈阳性表达, 而表皮细胞的抗体无表达, 证明了我们所获得的喉部两个不同部位的细胞确实是来源于间充质。本文成功的从喉部的不同部位分离获得了两种具有不同形态的间充质细胞, 为以后原位筛选能够用于喉部组织工程的间充质干细胞提供了实验基础。

参考文献 (References)

- [1] Thibeault SL, Klemuk SA, Smith ME, et al. In vivo comparison of biomimetic approaches for tissue regeneration of the scarred vocal fold. [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15:1481-1487
- [2] Hagemann M, Seifert E. The use of polydimethylsiloxane for injection laryngoplasty. [J]. World J Surg, 2008, 32(9):1940-7
- [3] Rousseau B, Ge PJ, Ohno T, French LC, Thibeault SL. Extracellular matrix gene expression after vocal fold injury in a rabbit model. [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2008 Aug, 117(8):598-603
- [4] Hertegrd S, Cedervall J, Svensson B, Forsberg K, Maurer FH, Vidovska D, Olivius P, Ahrlund-Richter L, Le Blanc K. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. [J]. Laryngoscope. 2006 Jul, 116

(7):1248-54

- [5] Dursun G, Boynukalin S, Bagis Ozgursoy O, Coruh I. Long-term results of different treatment modalities for glottic insufficiency. [J]. Am J Otolaryngol. 2008 Jan-Feb, 29(1):7-12
- [6] Kanemaru S, Nakamrua T, Omori K, et al. Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2003, 112(11):915-920
- [7] Halum SL, Naidu M, Delo DM, et al. Injection of autologous muscle stem cells (myoblasts) for the treatment of vocal fold paralysis: a pilot study. [J]. Laryngoscope, 2007, 117(5):917-922
- [8] Lu F, Mizuno H, Uysal CA, et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. [J] Plast Reconstr Surg, 2008, 121(1):50-8
- [9] Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, et al. Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold. [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2005, 114(12):907-12
- [10] Hertegard S, Cedervall J, Svensson B, et al. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. [J]. Laryngoscope 2006, 116:1248-1254
- [11] Halum SL, Hiatt KK, Naidu M, et al. Optimization of autologous muscle stem cell survival in the denervated hemilarynx. [J] Laryngoscope, 2008, 118(7):1308-12
- [12] Byung JL, Soo GW, Jin SJ, et al. The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. [J]. Cells Tissues Organs, 2006, 184:198-204
- [13] Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blind, multicenter, controlled trial. [J]. Vet Ther. 2007 Winter, 8(4): 272-84
- [14] Lo Cicero V, Montelatici E, Cantarella G, Mazzola R, Sambataro G, Rebulli P, Lazzari L. Do mesenchymal stem cells play a role in vocal fold fat graft survival? [J]. Cell Prolif 2008, 41:460-473
- [15] Hertegard S, Cedervall J, Svensson B, et al. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. [J] Laryngoscope, 2006, 116:1248-1254