

## 人羊膜细胞外基质修复尿道下裂的实验研究<sup>\*</sup>

舒林飞<sup>1</sup>, 田源<sup>2</sup>, 王雷<sup>3</sup>, 肖跃海<sup>2</sup>, 孙超<sup>2</sup>, 唐开发<sup>2</sup>, 孙发<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004; 3. 河北省秦皇岛中心医院 泌尿外科, 河北 秦皇岛 066000)

**[摘要]** 目的: 研究人羊膜细胞外基质(HAECM)修复新西兰兔阴茎型尿道下裂的效果。方法: 选择新鲜健康剖宫产胎盘分离出羊膜, 制备 HAECM; 将 36 只雄性新西兰白兔切除 1 cm 前尿道黏膜, 建立尿道下裂动物模型, 并随机分为对照组、HAECM 单层修复组及多层修复组, 每组 12 只; 对照组采用传统的加盖岛状皮瓣(Onlay 式)对兔尿道下裂进行手术修复, HAECM 单层和多层修复组分别采用单层和多层 HAECM 作为修复材料对兔尿道下裂进行手术修复, 于术后第 20 和 40 天时行尿道造影和尿道镜检查, 并于术后第 10、20 和 40 天时对术后尿道标本进行病理学观察, 了解术后尿道情况。结果: 成功制备出优质的 HAECM; 尿道病理组织学检查结果示: 术后第 10 天时, 实验组尿道管腔面有少量尿道上皮细胞生长; 术后第 20 天时, 实验组可见尿道管腔被覆上皮已基本覆盖 HAECM 修复区; 术后第 40 天时, 单层修复组、多层修复组脱细胞羊膜修复处尿道管腔被覆尿路上皮细胞完整, 黏膜下层可见平滑肌生长, 纤维组织、小血管增生, 少量炎细胞浸润; 对照组可见尿道管腔完整, 平滑肌层连续性完好, 可见少量炎细胞; 尿道造影检查示术后第 40 天时, 单层、复层修复组和对照组尿道通畅, 未见狭窄、造影剂外渗、憩室形成; 尿道镜检查示术后第 40 天时, 单层、多层修复组和对照组尿道通畅, 未见明显狭窄。结论: 单层和复层 HAECM 对兔尿道下裂修复效果良好, HAECM 是一种前景良好的修复材料。

**[关键词]** 尿道下裂; 修复外科手术; 组织工程; 人羊膜细胞外基质; 新西兰兔

**[中图分类号]** R695; R628 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)03-0263-06

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.004

## Experimental Study on Hypospadias Repair with Human Amnion Extracellular Matrix

SHU Linfei<sup>1</sup>, TIAN Yuan<sup>2</sup>, WANG Lei<sup>3</sup>, XIAO Yuehai<sup>2</sup>, SUN Chao<sup>2</sup>, TANG Kaifa<sup>2</sup>, SUN Fa<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

3. Department of Urinary Surgery, Hebei Provincial Qinhuangdao Central Hospital, Qinhuangdao 066000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the curative results of penis hypospadias repair in New Zealand rabbits with human amnion extracellular matrix (HAECM). **Methods:** HAECM was prepared with fresh health placenta from cesarean and freeze-dried after ethylene oxide sterilization. Hypospadias animal models were made with 36 male New Zealand white rabbits by excision of 1 cm of anterior urethral mucous membrane. The models were randomly divided into 3 groups (12 in each): control group (group C), HAECM single layer repair group (group HS), and HAECM multilayer repair group (group HM). Traditional Onlay hypospadias repair method was adopted to group C, and single layer and multilayer of HAECM as repair material were used in surgery of groups HS and HM respectively. Urethrography and urethroscopy observation were made on the 20<sup>th</sup> and 40<sup>th</sup> days after the surgery. Pathological

<sup>\*</sup> [基金项目] 国家自然科学基金项目(81360097); 贵州省科技厅项目[黔科合 LH 字(2014)7126]; 贵州省卫计委科技基金项目(gzwmkj2014-1-035); 贵州省卫计委科技基金项目(gzwmkj2015-1-036); 贵阳市科技基金[(2010)筑科农合同第 1-社-25 号]

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: sfguizhou@163.com

网络出版时间: 2017-3-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2319.007.html>

observation was made with urethral sections on the 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, and 40<sup>th</sup> days after the surgery. **Results:** HAECM with good quality was Prepared successfully. Pathological observation showed that, in 10 days after repair surgery, in groups HS and HM, a few urethral epithelial cells were found on urethral lumen surface; On the 20<sup>th</sup> day postoperation, in groups HS and HM, the HAECM repair area was basically covered by urethral lumen lining epithelium; in 40 days after the operation, in acellular amniotic membrane repairing area of groups HS and HM, the urothelial cells coated urethral lumen completely, and growth of smooth muscle, proliferation of fibrous tissue and vascular, and infiltration of inflammatory cells were seen in the submucosa, while in control group, a complete urethral lumen, continuous smooth muscle layer, and a small amount of inflammatory cells were found. On the 40<sup>th</sup> day after operation, the urethrography examination results showed that, in both experimental groups and control group, urethral tract was unobstructed, no stenosis, no contrast agent extravasation, nor diverticulosis was seen, while the urethroscopy results proved urethral tract was unobstructed, and no obvious stenosis could be seen in all of the groups. **Conclusions:** Single layer and multilayer HAECM has good effects in repairing rabbit hypospadias, and is a kind of repairing material with good prospect.

[ **Key words** ] hypospadias; surgical repair; tissue engineering; human amniotic extracellular matrix; New Zealand rabbits

尿道下裂是指尿道异位开口于阴茎腹侧至会阴的任何部位,同时伴包皮分布异常,是泌尿生殖系统常见的先天性畸形,在国内的发病率约为 5.8%<sup>[1]</sup>。关于尿道下裂的治疗一直是医学界的一个难题,目前,主张采用以外科手术治疗为主结合内分泌治疗和心理治疗的综合治疗方法。在尿道下裂手术中,常面临因自身尿道组织不足而难以修复的难题<sup>[2]</sup>,所以临床上常采用患者其他部位的组织,如包皮、阴囊皮肤、口腔黏膜和颊黏膜组织等代替尿道组织作为修复材料修复尿道<sup>[3]</sup>。但 these 方法多以牺牲正常组织作为代价,而且容易出现毛发生长、结石形成、尿道狭窄、憩室等并发症,多数需要再次手术处理,给患者带来新的痛苦和经济负担。人羊膜细胞外基质(human amnion extracellular matrix, HAECM)中不含细胞结构,主要成分是纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、IV 型胶原、硫酸乙酰肝素蛋白多糖,以及其他蛋白多糖大分子和细胞生长因子,包括表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等,这些成分在细胞粘附、迁移、增殖和分化等领域有重要功能<sup>[4]</sup>。目前国内关于 HAECM 作为修复材料修复尿道下裂的研究报道不多,且疗效不确切。本实验建立尿道下裂动物模型,使用人胎盘羊膜制备 HAECM 作为修复材料,分别采用单层或复层 HAECM 修复尿道,探讨 HAECM 作为修复材料用于尿道下裂手术中修复尿道的可行性,为临床上手术治疗尿道下裂提供可靠的新方法。

## 1 材料及方法

### 1.1 实验动物

经严格检疫合格的新西兰兔(由贵州医科大学实验动物中心提供)36 只,雄性,体质量(3.0 ± 0.5) kg。

### 1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白酶(Amresco 分装)、曲拉通 Triton-100 (Genview 分装)、EDTA Na<sub>2</sub> (乙二胺四乙酸二钠盐)、醋酸纤维薄膜纸(上海过望化工有限公司)、冷冻干燥机(美国 SIM 公司,FD8-5)、超纯水器(美国 PALL 公司,PL5123)、倒置显微镜(上海, XDS-1B)、超低温冰箱(日本 SANYO 公司)、电热恒温干燥箱(成都, DB-210 型)、图像采集系统(日本 OLYMPUS 公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 HAECM 的制备** 经过知情同意后,选取贵州医科大学附属医院产科新鲜健康剖宫产胎盘 20 个,分离出羊膜,置入双抗溶液中浸泡 15 min,将羊膜上皮平铺于乙酸纤维薄膜纸上,采用 100% 甘油溶液脱水 3 次。将脱水后的羊膜取出, PBS 漂洗 5 次,置入 1% Triton-100 溶液中, 37 °C 恒温振荡 24 h。再用 PBS 反复漂洗 5 次,使用 0.25% 胰蛋白酶联合 0.02% EDTA, 37 °C 恒温振荡 4 h, PBS 充分漂洗脱尽细胞。取部分材料行病理切片检查,了解脱细胞情况。将脱尽细胞的 HAECM 平铺于

已消毒的醋酸纤维薄膜纸上,裁剪成 3 cm × 3 cm 大小,放入无菌玻璃瓶中,置入 -20 ℃ 冰箱放置 24 h,后移入 -80 ℃ 低温冰箱保存 24 h,再置入冷冻真空干燥机内 -88 ℃ 冷冻干燥 18 ~ 20 h。取部分羊膜及羊膜细胞外基质行 HE、VG 染色,确认 HAECM 是否符合要求。将制备好的 HAECM 行环氧乙烷消毒灭菌后保存备用。

**1.3.2 尿道下裂动物模型的建立和分组** 将 36 只雄性新西兰白兔随机分为对照组、单层修复组和复层修复组,每组 12 只。麻醉成功后,置入 F8 导尿管,切开会阴,游离显露前尿道在距尿道外口约 1.5 ~ 2.0 cm 处,将前尿道腹侧剪去 1/2 管周,长约 1.0 cm 尿道,建立尿道下裂动物模型。

**1.3.3 HAECM 修复兔尿道下裂手术** 将经环氧乙烷灭菌后的 HAECM 取出,除去醋酸纤维膜,置入生理盐水中 10 min,取出备用。对照组:在制备好尿道缺损模型后,采用加盖岛状皮瓣 (Onlay) 法修复尿道,用 5-0 可吸收线间断缝合,逐层缝合皮下组织及皮肤。单层修复组:采用上述手术方法,用单层 HAECM 材料裁剪后覆盖在尿道缺损处,5-0 可吸收线间断缝合,充分止血,逐层覆盖在尿道缺损处,5-0 可吸收线间断缝合,充分止血,逐层缝合皮下组织及皮肤。多层 HAECM 修复组:前期手术方法同前两组,在造成尿道缺损模型后,将 HAECM 两次对折裁剪后,覆盖在尿道,5-0 可吸收线间断缝合,逐层缝合皮下组织及皮肤。将各组新西兰兔尿管固定稳妥,防止实验兔舔咬伤口及尿管。

**1.3.4 术后处理** 术后肌注青霉素钠及硫酸链霉素 1 周,观察动物的伤口及尿管引流等情况,术后第 10 天拔除尿管。分别于术后第 10、20 和 40 天

分批处死动物,每组每次处死 4 只新西兰兔。

#### 1.4 观察项目

**1.4.1 术后观察** 尿管引流情况、有无尿痿、尿道狭窄,新西兰兔的精神状态、饮食饮水、排尿排便,术区有无肿胀、炎症及感染等。

**1.4.2 人胎盘羊膜、HAECM 和术后尿道观察以及术后尿道病理学检查** 通过标本肉眼和显微镜下观察对人胎盘羊膜和 HAECM 进行观察;采用阴茎脱套法暴露阴茎,观察阴茎外观形态;切取移植部位尿道,观察尿道有无狭窄、瘢痕结节和结石形成、尿道黏膜的连续性和光滑度等。切取的尿道组织标本,采用 HE 染色和 VG 染色,观察尿道组织的愈合情况和纤维增生情况。

**1.4.3 尿道镜检查及尿道逆行造影检查** 术后第 40 天麻醉各组剩余的新西兰兔后,固定稳妥、会阴部消毒,输尿管镜由尿道外口进镜至尿道,观察尿道内情况。同时,经尿道外口注入造影剂,采集 X 线照片图像,观察尿道及膀胱显影情况。

#### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件分析,计量资料用均数 ± 标准 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示;各组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HAECM

**2.1.1 肉眼观察** HAECM 质地柔软、光滑,半透明、薄膜状,有一定弹性和柔韧;冷冻干燥、灭菌后的 HAECM 呈薄片状、半透明、无色、质地略韧,有一定机械强度,可折叠弯曲。见图 1。



图 1 HAECM 和灭菌封装的 HAECM

Fig. 1 Raw HAECM and the sterilization packaging of HAECM

**2.1.2 显微镜观察** HAECM 未见细胞及细胞碎片残留,细胞脱除完全,无蓝染细胞核物质;可见大量浅红色纤维组织,未见神经、血管和淋巴组织,与

脱细胞前的胎盘羊膜组织有明显区别。见图 2。

### 2.2 术后尿道观察

**2.2.1 术区观察和手术并发症** 所有实验动物手

术当天可以进食水,导尿管引流通畅;术后前3 d,所有动物术区均轻度肿胀,之后肿胀逐渐减退;术后1~3 d出现间歇性轻度血尿。单层、多层HAECM修复组拔除尿管后漏尿(8.3%,8.3%)低于对照组(16.7%),差异无统计学意义( $P>0.05$ );各组兔术后尿管堵塞和死亡情况无明显差异( $P>0.05$ ),多层HAECM修复组伤口感染(16.7%)高于对照组(8.3%)和单层HAECM修复组(8.3%),但各组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1。

表1 各组新西兰兔术后并发症( $\bar{x}\pm s,n$ )  
Tab.1 Comparison of postoperative complications  
in each group of rabbits

分组	n	术后并发症(n,%)			
		尿漏	尿管堵塞	伤口感染	死亡
对照组	12	2(16.7)	4(33.3)	1(8.3)	1(8.3)
单层修复组	12	1(8.3)	3(25.0)	1(8.3)	0(0.0)
多层修复组	12	1(8.3)	4(33.3)	2(16.7)	1(8.3)
$\chi^2$		0.563	0.262	0.563	1.059
P		0.755	0.877	0.755	0.589

**2.2.2 伤口和尿道恢复情况** 术后第10天时,各组新西兰兔伤口愈合均良好,包皮水肿减退,缝合处线头清晰可见,单层修复组尿道修复处可见皱缩;各组修补处均未见明显狭窄及结石形成,尿道管腔通畅,可见线头。术后第20天时,兔尿道伤口基本愈合,修复缝合处线头大部分脱落,尿道周围组织生长良好,血液循环正常;多层修复组尿道通畅,组织结构较第10天时清晰;各组尿道修复部位均未见明显瘢痕形成,无明显结石形成。术后第40天时,兔尿道伤口已完全愈合,可见轻度手术瘢痕,多层修复组兔尿道通畅,尿道黏膜光滑均匀,与正常组织无明显界限,与对照组无明显差异;对照组尿道光滑,管腔通畅。

**2.2.3 术后尿道组织学观察** 术后第10天时,HE染色光镜下可见:HAECM单层、多层修复组尿道管腔面有少量尿道上皮细胞生长,黏膜下层可见大量炎症细胞浸润;对照组可见管腔面不规则,修复处炎症细胞浸润。术后20 d时,单层、多层HAECM修复组可见尿道管腔被覆上皮已基本覆盖HAECM修复区,但细胞层次较少,排列欠规则,黏膜下层可见纤维组织、小血管生长及炎细胞浸润,对照组可见尿道管腔已基本被上皮细胞覆盖,平滑肌细胞、毛细血管生长,炎症细胞浸润。术后

第40天时:单层、多层HAECM修复组修复处尿道管腔被覆尿路上皮细胞完整,黏膜下层可见平滑肌生长,纤维组织、小血管增生,少量炎症细胞浸润情况较前明显减轻,对照组可见尿道上皮被覆,平滑肌层连续性完好,可见少量炎症细胞。见图3。

**2.2.4 逆行尿道造影** 术后第40天时单层、多层HAECM修复组和对照组,尿道造影检查见显影结果良好,尿道通畅,未见狭窄、造影剂外渗、憩室形成,膀胱大小形态正常;单层、多层HAECM修复组造影显示较对照组无明显差异。见图4。

**2.2.5 术后尿道镜检查** 术后第40天时单层、多层HAECM修复组和对照组,可见尿道通畅,管腔形态正常,未见结石、憩室,黏膜光滑、血运正常,未见明显瘢痕组织及狭窄。见图5。

### 3 讨论

羊膜具有较低的抗原性,是因为羊膜不表达HLA-A、B抗原,不会引起机体对羊膜移植物的排斥反应。作为一种天然的细胞支架材料,人羊膜细胞外基质具有良好的生物相容性和组织相容性,其降解产物对机体无毒性等特点。此外,人羊膜细胞外基质含有肝细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等物质,可增强上皮细胞的粘附,并有利于上皮细胞分化移行,能抑制和阻止成纤维细胞增殖,下调转移生长因子 $\beta$ ,抑制瘢痕形成<sup>[4]</sup>。本实验中,成功制备出良好的HAECM材料,并结合临床遵循无菌原则,将制备的HAECM材料经冷冻干燥、环氧乙烷灭菌,便于保存,手术中将制备好的HAECM置入动物体内修复尿道,避免移植物引起的感染。

尿道下裂是男性泌尿生殖系统最常见的先天性畸形之一,治疗困难,手术失败率高。尿道下裂手术中常需要修补缺损的尿道,直接修补张力大,容易造成修复失败。某些复杂性尿道下裂的患者,自体组织来源有限,且治疗中增加新的手术创伤,增大手术并发症的发生几率<sup>[3]</sup>。以往采用的人工合成材料,如聚乳酸、聚羟基乙酸等,由于降解引发的炎症反应剧烈,影响尿道的修复效果。近年来随着组织工程技术的发展,组织工程化尿道修复技术是解决这一难题的有效方法<sup>[5-6]</sup>。

本实验中,术后第10天时HAECM上已有上皮细胞生长,周围见炎症反应细胞,主要有淋巴细胞和单核细胞核巨噬细胞,表明HAECM组织相容

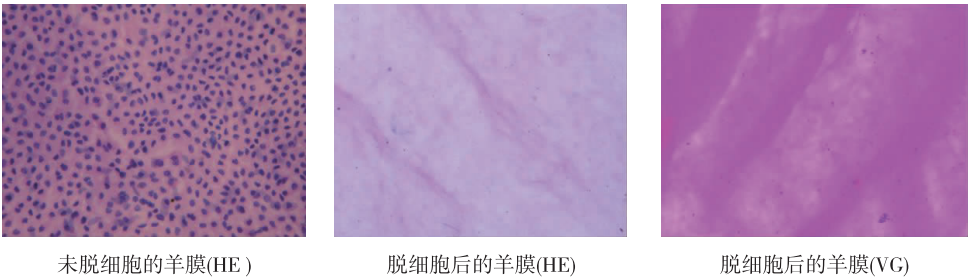


图 2 未脱细胞和脱细胞后的胎盘羊膜(200 × )

Fig. 2 Placenta amnion that cells were not taken off, and placenta amnion that cells were taken off

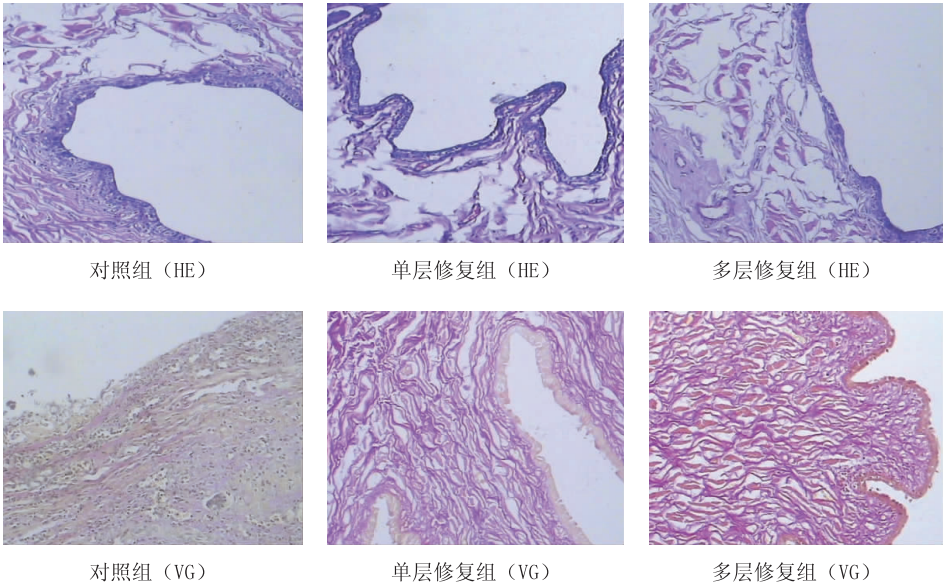


图 3 各组新西兰兔 HAECM 组织学观察(术后第 40 天, ×100)

Fig. 3 Hitological sections of HAECM in New Zealand rabbit on the 40<sup>th</sup> day after operation

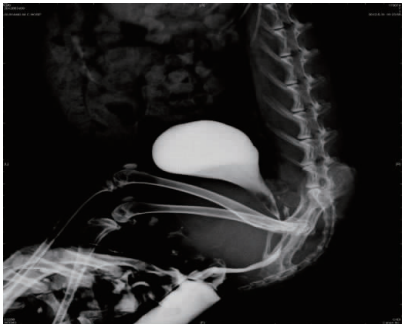


图 4 尿道造影结果(术后第 40 天)

Fig. 4 Urethrography result on the 40<sup>th</sup> day after operation

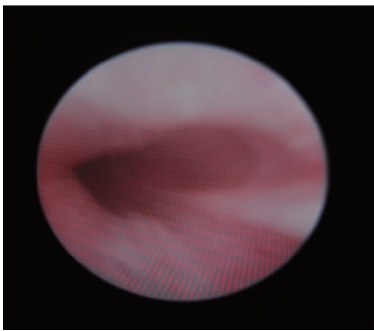


图 5 尿道镜结果(术后第 40 天)

Fig. 5 Urethroscope examine result on the 40<sup>th</sup> day after the operation

性好,排斥反应轻微,与文献报道相符<sup>[7]</sup>。术后第 20 天时可见缺损修复处被尿道上皮细胞完全覆盖,但细胞层次较周围正常黏膜上皮减少,黏膜下层组织疏松,周围可见炎细胞浸润,小血管形成,本实验表明,修复处平滑肌的生长速度要明显落后于

尿道上皮细胞的生长速度。术后第 40 天时可见脱细胞羊膜修复处尿道管腔被覆尿路上皮细胞完整,与周围正常组织无法区分,修复材料基本降解完,修复部位周围平滑肌和黏膜下层基本修复完毕,并且修复处黏膜层、黏膜下层和肌层形态清晰,连续



性好,结构分明,与相关研究报道相符<sup>[5]</sup>。尿道镜检查见修复处尿道黏膜光滑完整,尿道管腔通畅,无新生组织向管腔突出,与相关研究结果相符<sup>[8]</sup>。尿道造影检查证实,尿道通畅,造影剂通过顺利,无明显尿道狭窄,与相关报道相似<sup>[5]</sup>。

本实验中还进行了单层修复和多层修复手术的比较。本实验结果中,对照组和复层 HAECM 修复组各有 1 只兔死亡,均因动物腹泻而引起死亡,与修复手术无明显关系,HAECM 修复组与对照组相似;HAECM 修复组尿漏、伤口感染和尿管堵塞等并发症发生率与对照组相似。说明 HAECM 材料可安全用于尿道下裂手术中,且疗效确切,与相关报道相符<sup>[6,9]</sup>。单层羊膜修复组,由于材料较薄,易撕裂,手术操作不便,相比较复层材料修复组,修复材料机械强度大,便于手术操作,节省手术时间。为了增加移植吻合部位强度,防止术后尿瘘的发生,在人羊膜细胞外基质和尿道的吻合过程中,采用错层缝合的方式,将不同组织层次交错缝合在一起,在吻合口上部覆盖 4~5 层组织,以减少尿瘘等并发症的发生。本研究发现,多层 HAECM 材料,术中使用方便,手术修复效果较好。

综上所述,本实验通过 HAECM 的制备及 HAECM 体内移植手术,显示在尿道下裂手术修复中,HAECM 作为支架材料重建兔尿道,尿道上皮细胞能够在支架材料上生长爬行,最终形成完整的尿道黏膜上皮层和肌层,能恢复尿道的泌尿通道功能。作为修复尿道缺损的支架材料,植入新西兰兔体内的 HAECM 可作为兔尿道组织的替代物,为其重建提供适合细胞再生、分化、增殖的体内环境和空间结构,修复、重建尿道组织。本实验研究为将来 HAECM 在尿道下裂手术修复中的使用做出了新探索,但如何进一步减少人羊膜细胞外基质修复尿道下裂的感染、尿漏等并发症的发生,以及如何

进一步安全应用于人体尿道下裂的手术中尚需进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] Wang R, Dong Z, Wang W, et al. Mutation analysis of the SRD5A2, AR and SF-1 genes in 52 Chinese boys with hypospadias[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2013 (9-10):887-893.
- [2] Mouraviev VB, Coburn M, Santucci RA. The treatment of posterior urethral disruption associated with pelvic fractures: comparative experience of early realignment versus delayed urethroplasty[J]. J Urol, 2005 (3):873-876.
- [3] Parnigotto PP, Gamba PG, Conconi MT, et al. Experiment defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic[J]. Uro Res, 2000 (1):46-51.
- [4] Enosawa S, Sakuragawa N, Suzuki S. Possible use of amniotic cells for regenerative medicine[J]. Nippon Rinsho, 2003(3):396-400.
- [5] Chen F, Yoo JJ, Atala A. Experimental and clinical experience using tissue regeneration for urethral reconstruction[J]. World J Urol, 2000(18):67-70.
- [6] Palminteri E, Berdondini E, Colombo F, et al. Small intestinal submucosa (SIS) graft urethroplasty: short-term results[J]. Eur Urol, 2007(51):1695-1701.
- [7] 谢伟,李盛宽,邓耀良,等. 脱细胞羊膜修复兔尿道组织缺损的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009(53):10469-10472.
- [8] El-Kassaby AW, Retik AB, Yoo JJ, et al. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix[J]. J Urology, 2003(1):170-173.
- [9] Iijima K, Igawa Y, Imamura T, et al. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats[J]. Tissue Eng, 2007 (3):513-524.

(2017-01-01 收稿, 2017-03-01 修回)

中文编辑: 文箫颖; 英文编辑: 苏晓庆