

·特 讯·

体外培植干细胞复制肠粘膜组织的研究

——在第十九届夏威夷国际烧伤会议上的报告

徐荣祥,王运平,范然

【摘要】目的 探索利用干细胞培植技术体外再生复制组织器官,并在体内验证。方法 取孕 17 天胚胎小鼠肠组织块在体外培养,实验分对照组和实验组,实验组培养液中加入适量的促使肠粘膜复制的组合物 GIC。连续观察、记录各组组织细胞生长情况。另在小鼠胃溃疡模型、胃和十二指肠溃疡病人观察 GIC 的疗效。结果 胚胎鼠小肠组织块体外培养,对照组 10 天后逐渐死亡,而实验组则持续生长、增殖、不断复制形成新的粘膜组织。GIC 对动物和人消化道溃疡也有明显疗效,可使粘膜组织再生修复,无瘢痕愈合。结论 体外复制肠粘膜组织器官是完全可以实现的,这不仅具有重要的组织修复医疗价值,而且为人体生命科学研究提供了从来没有过的肠粘膜组织活体动态模型。

【关键词】干细胞;再生;器官复制;体外培养;肠;GIC

【中图分类号】Q253;R572.3;R45 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1001-0726(2002)02-0065-07

Regeneration and Clone of Intestinal Organ by Culturing Stem Cells in vitro XU Rong - xiang , WANG Yun - ping , FAN Ran . Cellular & Tissular Laboratory , MEBO Global Group , Beijing 100053 , China

【Abstract】 Objective : To explore the potential of regenerating and cloning tissues and organs in vitro by culturing stem cells , and to verify the results in vivo and in situ . **Methods :** Tissue explants of mouse small intestine was harvested from 17 - day mouse embryos and cultured in vitro . The culture was divided into two groups : the control group cultured in normal tissue culture medium (complete MEM) and the experimental group in complete MEM with the addition of a tissue culture composition GIC that promoted the growth of intestinal mucosa . Continuously observe and record the growth of cells in two groups . In addition , the efficacy of GIC was also investigated by treating mice with gastric ulcers and patients with gastric and duodenal ulcers . **Results :** The culture results showed that cells in the control group never survived over 10 days in the culture , while cells in the experimental group continued to actively grow , proliferate and clone to form new mucosal tissue . GIC also showed obvious therapeutic effects on treating gastrointestinal ulcers both in animal model and patients by repairing and regenerating mucosa , which thereby resulted in scar - free healing . **Conclusion :** This result makes it absolutely possible for us to clone intestinal mucosa in vitro by using stem cells as the sources . It is not only valuable for tissue repair and regeneration in medical practice , but also providing a live , dynamic intestinal mucosa model system for life sciences research . This model system is the first one ever existed in the world .

【Key words】 Stem cells ; Regeneration ; Organ clone ; Culture in vitro ; Intestine ; GIC

【CLC number】 Q253 ; R572.3 ; R45 **【Document code】** A **【Article ID】** 1001-0726(2002)02-0065-07

进入二十一世纪,生命科学家的目光均一致转向了干细胞的研究,提出了极具有吸引力的医学梦想,从而把人类生命的新希望,寄托在干细胞的研究上。那么,干细胞的研究真的能给人类带来生命的新希望吗?目前科学家们的研究成果已展现了可能性,如干细胞的分离技术;干细胞的诱导技术;干细胞的移植技术等等,虽然都没有获得实验性临床和临床上的成功,但成功的希望在激励着科学家们在

努力刻苦研究。

体外干细胞研究是大多数科学家研究的共同思路,但其现状仍没有解决体外在培养液里使干细胞持续增殖问题,干细胞在体外不能存活,谈不上培养组织器官,从而无法进入人们设想的体外培植组织器官的第一步——体外培植存活的干细胞。前不久,ACT公司公布的体外克隆胚胎细胞也只有活了几天,距离体外培养组织器官相差甚远。为了与大家

一起探索体外复制组织器官的奥妙所在,作者决定把利用自己原位干细胞培植经验设计出的体外培植肠组织器官技术发表公布,望给大家的干细胞研究提供经验。

美国《科学》杂志 2001 年 12 月 7 日发表了一篇关于小鼠肠粘膜来源和组成的研究报告,其中的设计模型和粘膜组织结构形态与作者的研究结果相似,我完全赞同研究者的报告,因我们的研究虽然采取的方式不同,但有着同样的结果。所不同的是:《科学》杂志报道的是对 17 天胚胎鼠肠粘膜的实体组织学检查结果,而作者的研究报告是利用胚胎 17 天的小鼠肠组织细胞,在体外培养液中重新培植出的肠粘膜组织器官。作者的研究结果证明了科学家们所提出的体外复制组织器官的设想是完全可以实现的。本篇报道着重报道小鼠粘膜体外复制的操作过程和结果,有关机理和调控将另行专题报告。

一、材料和方法

1. 培养液制备:实验分对照组和实验组,两组加等量的培养液培养。实验组在 MEM 培养液中加适量的促使肠粘膜复制的组合物(GIC,由作者实验室提供);对照组加入与实验组 GIC 等量的 MEM 培养液。两组同时换培养液,培养条件相同。

2. 取纯种 17 天胚胎小白鼠,取其小肠壁组织。将小肠壁碎断,贴壁培养,具体方法,如图 1~9 所示。

3. GIC 是作者实验室研制的促使胃肠粘膜干细胞增殖的天然成分组合物。

二、结果

1. 实验组:小肠组织在培养液中存活 4 天后,贴壁的小肠组织开始见组织细胞从组织植块中迁移分离,直至小肠组织块完全松解分离。第 10 天,迁移的细胞分裂增殖活跃。第 18 天见粘膜组织形成。第 28 天,可见到完整的粘膜形成,并同时可见各时期新的粘膜组织复制。在 110 天的培养期间中,不断的形成新的粘膜组织,培养液中的细胞继续持续增殖分裂和形成新的肠粘膜组织(见图 10~21)。

2. 对照组:第 4 天后,培养液中开始也见大量的单个细胞从组织中迁移;但第 10 天后,培养液中的组织及迁移的细胞逐渐全部死亡(见图 22~26)。

三、讨论

1. 体外肠粘膜复制过程的规律

利用 17 天胚胎鼠的肠组织,在体外培植复制新的肠粘膜组织。之前,通过美国和中国的信息检索

数据库检索,在近 20 年的资料中,未查见类似的报道。在干细胞的研究进展中,也未见任何信息报告。作者通过对小鼠肠粘膜体外复制的反复实验研究,总结认为肠壁组织在培养液中变化规律有五个环节(1)肠壁组织细胞迁移分离(2)迁移分离细胞的干细胞持续增殖(3)多细胞连接和克隆(4)肠粘膜组织的形成(5)肠粘膜器官的形成。根据肠粘膜体外复制过程中所表现出的规律,作者认为,第一个环节所表现出的肠壁组织细胞从组织中迁移分离现象是肠壁组织中具有干细胞潜能细胞自然分离的过程,是肠粘膜复制的细胞来源和必须先导程序;第二个环节是干细胞转化的表达,是肠壁组织复制的干细胞开始程序;第三个环节是干细胞形成组织的过程,它表现出的是多细胞的连接组合及克隆复制;是肠粘膜复制的实质组织表达;第四个环节是粘膜组织复制成型的实体表达,表现出多种细胞共同复制成粘膜组织的结果;第五个环节表达了完整粘膜器官复制完成的结果。实验中所表达出的规律揭示了肠粘膜复制的全部过程,与胚胎中粘膜形成的规律不相同。

2. 研究结果的比较

2001 年 12 月 7 日美国《科学》杂志发表了 Nessian 等的研究报告,文章中认为,小鼠小肠的上皮由四种起源于同种专能干细胞的主要细胞类型组成:肠上皮细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞和潘氏细胞。研究表明分泌细胞(杯状细胞、肠内分泌细胞和潘氏细胞)产生自表达 Math1 的同一祖细胞,而吸收细胞(肠上皮细胞)起源于 Math1 非依赖型的祖细胞。这些细胞的迅速持续地更新使肠上皮成为干细胞再生和谱系研究的模型系统。图 27 为 17 天胚胎鼠肠粘膜的组织细胞学形态表达实体照片。而作者的孕 17 天胚胎小鼠小肠植块在体外培养复制的肠粘膜组织器官在细胞形态上与 Nessian 的报告一致(见图 28),但从所参与构成的细胞活体形态分析,肠粘膜组成细胞至少有四种,其来源也有待于进一步证实,见体外复制的各个时期的肠粘膜组织活体形态图(见图 10~21)。从实验的结果看,体外复制的肠粘膜,不仅具有重要的组织修复医疗价值,而且为科学家的人体生命科学研究提供了从来没有过的肠粘膜组织活体动态模型。

3. 体外复制技术在原位组织器官修复中的应用实验

按照体外复制肠粘膜的技术要点,将促使肠壁

干细胞增殖的天然组合物 GIC ,制成适合原位活体组织修复的剂型 ,用于小白鼠急性胃溃疡模型的治疗和人体胃粘膜损伤和溃疡的治疗 ,均获得了理想的效果(见图 29 ~ 34) 。详细临床应用研究将另行专题报告。

4. 继续研究的课题

本报道虽然完成了小鼠肠粘膜的体外复制 ,为人类体外由干细胞直接复制多细胞多组织器官获得了基本的资料数据 ,使干细胞复制器官的设想变为可能 ,但其中的生命奥秘尚未揭示 ,需要众多的科学家们共同探讨研究。

研究成果与临床效果图片展示



图 1 昆明种孕鼠，孕期 17 天。

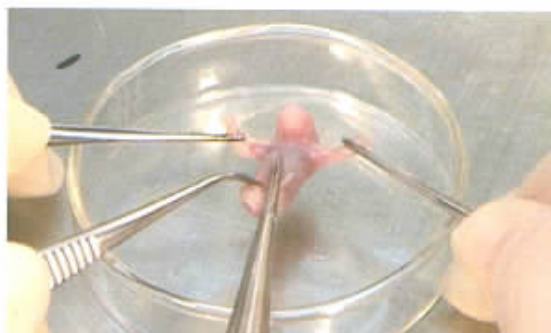


图 2 取胚胎鼠，剪开腹壁全层，暴露内脏。



图 3 沿胃下端截取一段约 2cm 的小肠，用双抗(青霉素和链霉素)一冷 PBS 洗两次，每次 1 分钟。洗掉腹腔液、红细胞等杂质。

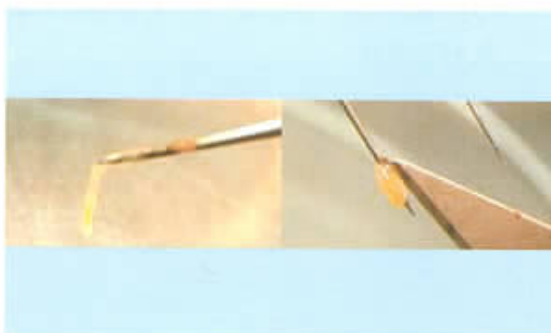


图 4 用显微外科镊子穿透肠腔，纵行切开肠管。



图 5 将切开的小肠，充分外翻，置干双抗一冷 PBS 中洗涤 2 次，将肠粘膜面洗净。



图 6 将小肠组织切成约 1mm³ 大小的块，成为植块。

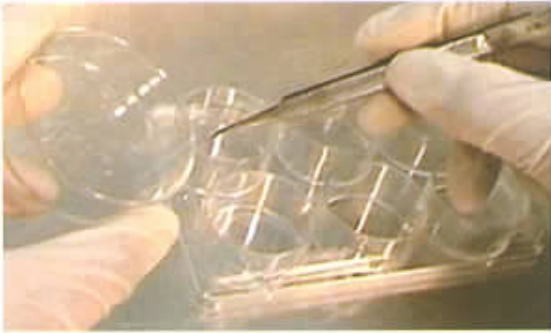


图7 铺板。将植块铺在培养板孔底部，并轻轻按压。



图8 铺板完毕，植块铺在培养板孔中央，布局及疏密适当。加少量培养液后预孵育。



图9 第二次加液，漫过植块，务必缓慢加液，切勿冲起植块。最后置5%CO₂细胞培养箱中37℃培养。



图10 实验组培养第1天。



图11 实验组培养第4天。



图12 实验组培养第9天。



图13 实验组培养第18天。

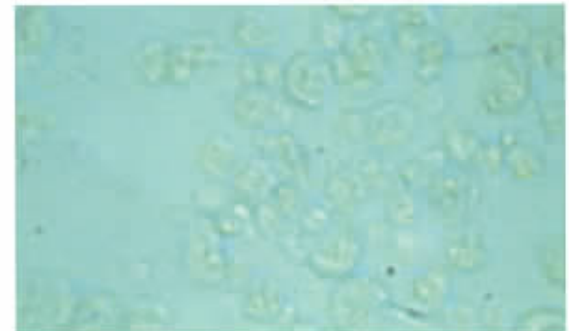


图14 实验组培养第24天。



图 15 实验组 MEM+GIC 促进干细胞克隆连接, 形成小肠粘膜组织。



图 16 实验组培养第 38 天。



图 17 实验组培养第 42 天。



图 18 实验组培养第 50 天。



图 19 实验组培养第 80 天。



图 20 实验组培养第 90 天。



图 21 实验组培养第 97 天。



图 22 对照组培养第 1 天。



图 23 对照组培养第 4 天。

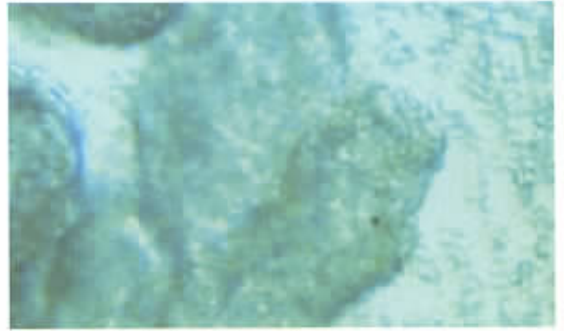


图 24 对照组培养第 9 天。



图 25 对照组培养第 18 天。

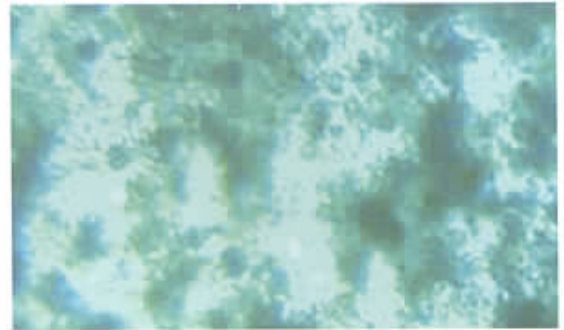


图 26 对照组培养第 24 天。



图 27 孕 17 天胚胎鼠肠粘膜的组织细胞学形态。



图 28 孕 17 天胚胎小鼠小肠植块在体外培养复制的肠粘膜组织器官形态。



图 29 小鼠急性胃溃疡模型，对照组。



图 30 小鼠急性胃溃疡模型，GIC 治疗组。



图 31 人胃溃疡, 治疗前。



图 32 人胃溃疡, GIC 治疗后痊愈。



图 33 人十二指肠球部溃疡, 治疗前。



图 34 人十二指肠球部溃疡, GIC 治疗后痊愈。

成体干细胞原位再生修复深度烧伤创面的研究 ——在第十九届夏威夷国际烧伤会议上的报告

徐荣祥¹, 许增禄²

【摘要】 目的 利用深度烧伤创面的残存皮下组织细胞的皮肤干细胞再生潜能进行培植, 实现皮肤全层功能器官的原位全部再生。方法 以成人深度烧伤为研究对象, 以人体原位角蛋白 19 型表皮干细胞作为皮肤干细胞标志, 以人体原位未传代的组织切片连续跟踪皮肤全层原位再生复制全过程。结果 1、烧伤后残存的皮下组织细胞可转化为皮肤干细胞 2、原位成体干细胞可再生复制全层皮肤器官 3、成体干细胞再生复制皮肤全层器官是同由人体再生潜能和人为调控共同完成 4、成体干细胞再生复制皮肤全层器官已成功用于特大面积、特重烧伤的临床治疗。结论 利用成体干细胞原位再生复制修复创面是从临床实践获得的成果, 为人类提供了保障健康长寿的生命技术、方法和物质, 使人们从对干细胞的研究从单细胞生命活动的探索阶段, 直接跨入了生命体实际应用阶段, 开辟了再生医学的新领域。

【关键词】 成体干细胞 再生 原位 创面修复 烧伤 MEBT/MEBO

【中图分类号】 Q253 ; R644 ; R45 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726(2002)02-0071-07

[作者单位] 1. 北京光明中医烧伤创疡研究所, 北京 100053。

2. 北京协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005。

万方数据