

绵羊颈动脉脱细胞基质制备方法的研究

张翊华, 窦忠英

(西北农林科技大学/陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100)

摘要: 【目的】证明酶-去污剂法制备绵羊颈动脉脱细胞基质的可行性, 进一步探索制备绵羊颈动脉脱细胞基质的新方法, 制备比较理想的绵羊颈动脉脱细胞基质, 为构建组织工程化血管提供支架材料。【方法】分别采用反复冻融-1%曲拉通 (Triton X-100) 加蛋白酶抑制剂 (PMSF) 法 (蛋白酶抑制剂 (PMSF) -1%曲拉通 (Triton X-100) 反复冻融法) 和 0.25%胰蛋白酶-1%Triton X-100 法制备绵羊颈动脉脱细胞基质, 标本进行大体、光镜和扫描电镜观察, 力学性能检测并做比较。【结果】反复冻融-1%Triton X-100 加 PMSF 法 (PMSF-1%Triton X 反复冻融法) 不仅能完全脱除细胞、保持基质纤维的正常结构, 而且制备的脱细胞基质能保持良好的形状和力学性能、不塌陷; 0.25%胰蛋白酶-1%Triton X-100 法虽能完全脱除细胞, 但制备的脱细胞基质不能保持良好的形状和张力度, 有不同程度的管腔塌陷。【结论】与 0.25%胰蛋白酶-1%Triton X-100 法比较, 反复冻融-1%Triton X-100 加 PMSF 法是制备绵羊颈动脉脱细胞基质更好的新方法。

关键词: 颈动脉; 脱细胞基质; 绵羊

Study on Methods for Preparing Acellular Matrices of Sheep Carotids

ZHANG Yi-hua, DOU Zhong-ying

(The Research Centre of Stem Cell Engineering Technique in Shaanxi Province, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)

Abstract: 【Objective】 This paper is to test the feasibility of preparing acellular matrices of sheep carotids with enzyme-eradicator method, further explore a new method, and prepare good acellular matrices of sheep carotids to provide scaffolds for constructing tissue-engineering blood vessels. 【Method】 Methods A and B were used for preparing acellular matrices of sheep carotids. A method was that sheep carotids (n=20) were frozen and thawed repeatedly for four times, then treated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% Triton X-100 and $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) for 4-7 d. B method was that sheep carotids (n=20) were treated with PBS containing 0.25% trypsin and 0.04% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) for 1 d, and then with PBS containing 1% Triton X-100 for 3-6 d. Treated specimens were observed with naked eyes, optical microscope and scanning electron microscope, their mechanic properties were measured and compared among them. 【Result】 A method not only entirely removed the cells of samples and maintained the normal structure of matrix fiber in samples, but also maintained good shape and mechanical properties of the acellular matrices prepared with it. Though B method entirely removed the cells of samples, the acellular matrices prepared with it did not maintain shape and strain. 【Conclusion】 Compared with B method, A method is a better and new method for preparing acellular matrices of sheep carotids.

Key words: Carotids; Acellular matrix; Sheep

0 引言

【研究意义】血管脱细胞基质是构建组织工程化

血管比较理想的支架材料。迫切需要寻求更好的制备血管脱细胞基质的方法。本研究目的在于证明酶-去污剂法制备绵羊颈动脉脱细胞基质的可行性, 进一步探

收稿日期: 2006-04-14; 接受日期: 2006-07-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) (2002AA216161) 和教育部重点项目 (03160)

作者简介: 张翊华 (1962-), 男, 陕西凤翔人, 副教授, 博士研究生, 研究方向为哺乳动物干细胞工程技术。Tel: 13319229902; E-mail: zyh19620207@163.com。通讯作者窦忠英 (1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 研究方向为哺乳动物胚胎工程和干细胞工程技术。Tel: 029-87080068; E-mail: zhongyingdou@126.com

索制备绵羊颈动脉脱细胞基质的新方法, 制备比较理想的绵羊颈动脉脱细胞基质, 为构建组织工程化血管提供支架材料。【前人研究进展】目前制备血管脱细胞基质的方法主要有 3 种, 酶消化法、去污剂法和酶-去污剂法。由于单纯的酶消化法对细胞外基质成分有损害, 单纯的去污剂法又难以全部脱除细胞, 所以人们普遍将酶消化法和去污剂法结合起来制备血管脱细胞基质。根据资料, 酶-去污剂法制备血管脱细胞基质的效果还不一致, 有些报道效果良好^[1-5], 有些报道基质管腔塌陷或不全塌陷^[6]。【本研究切入点】鉴于酶-去污剂法脱细胞效果的不确定性, 本研究从证明酶-去污剂法制备绵羊颈动脉脱细胞基质的可行性入手, 进而以此为基础, 寻求制备绵羊颈动脉脱细胞基质的新方法。【拟解决的关键问题】保持基质结构完整和形态良好是构建组织工程化血管对支架材料的基本要求。本研究拟在酶-去污剂法的基础上探索能够维持绵羊颈动脉基质结构完整和形态良好的脱细胞新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜屠宰绵羊颈动脉 50 根, 立即置于无菌生理盐水中, 用冰壶带回实验室, 热缺血时间不超过 10 min。冲净管腔积血, 截为 10 cm 长, 套于玻璃棒上, 剥除外膜, -20℃冰箱保存。

1.2 主要仪器和试剂

THZ-D 型台式恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂), DMIRB 型相差显微镜(Leica, 德国), MDF-330 型低温冰箱(SANYO, 日本), DK-8D 型电热恒温水箱(北京西城区医疗器械厂), AO 型组织切片机(上海中华医疗器械厂), 450 型日立扫描电镜, PT-680 型微电脑抗张测定仪(宝大国际仪器有限公司), 蛋白酶抑制剂(PMSF)(Merk 公司), Triton X-100(Sigma 公司), 胰蛋白酶和 EDTA(Gibico 公司)。

1.3 方法

1.3.1 脱细胞处理 将样品(50 根)随机分成试验 1 组(20 根)、试验 2 组(20 根)和对照组(10 根)。

试验 1 组: 采用反复冻融-1%曲拉通(Triton X-100)加蛋白酶抑制剂(PMSF)法处理。

(1) -20℃冰箱和 4℃冰箱(各 1 d)交替放置, 反复冻融 4 次。

(2) 0.5%新洁尔灭 PBS 溶液浸泡 30 min, PBS 振荡冲洗 3 次, 每次 30 min。

(3) 1%Triton X-100 PBS 溶液+1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF, 室温(22~30℃)振荡 4~7 d, PBS 溶液振荡冲洗 3 次, 每次 30 min。

试验 2 组: 采用 0.25%胰蛋白酶-1%Triton X-100 法处理。

(1) 0.5%新洁尔灭 PBS 溶液浸泡 30 min, PBS 振荡冲洗 3 次, 每次 30 min。

(2) 0.25%胰蛋白酶 PBS 溶液(含 EDTA 0.04%) 在 37℃、5%CO₂ 培养箱中作用 1 d。

(3) 1%Triton X-100 PBS 溶液室温(22~30℃) 振荡 3~6 d, PBS 溶液振荡冲洗 3 次, 每次 30 min。

对照组: 置 4℃冰箱解冻后不做任何脱细胞处理, 只用于管壁厚度和力学性能检测。

1.3.2 组织学观察 从脱细胞处理后的第 5 d 开始, 每天抽取样品, 制作石蜡切片, 进行 H.E 染色, 在光镜下观察细胞脱除情况, 纪录样品中细胞成分被完全脱除时的处理时间, 并抽取完全脱除细胞后的样品, 制作石蜡切片, 进行 Van Gieson 和 Weigert 染色, 观察弹力纤维和胶原纤维及其排列结构。

1.3.3 扫描电镜观察 抽取脱除细胞后的样品, 用 4%戊二醛固定, 送电镜室进行扫描电镜观察并拍照。

1.4 管壁厚度和力学性能检测

用千分尺测量 2 试验组和对照组样品的管壁厚度, 用微电脑抗张测定仪测量样品的最大张力和伸长率。用 SPSS 13.0 软件进行分析, 统计数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

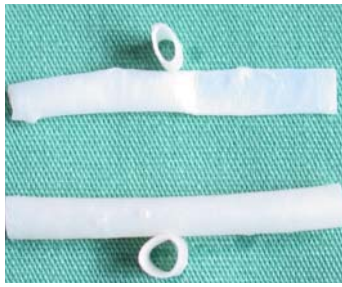
2 结果与分析

2.1 大体观察结果

绵羊颈动脉被剥去外膜、充分冲洗后, 管壁呈淡黄色, 弹性良好, 管腔不塌陷, 内膜光滑, 经一次性冻存后没有明显改变, 反复冻融后(试验 1 组)表面变粘。脱除细胞后的样品, 管腔内面光滑, 管壁呈乳白色、半透明状; 试验 1 组样品管腔不塌陷, 管壁弹性良好(图 1 下); 试验 2 组样品管腔轻微塌陷, 管壁弹性较差(图 1 上)。

2.2 光镜观察结果

在脱细胞处理的第 5~6 d, 样品中的细胞碎片从外向内逐渐减少; 到第 7 d(约 156 h), 2 试验组样品中的细胞成分被完全脱除。脱除细胞后的样品, 除试验 2 组管壁较薄外, 其余结构 2 实验组基本相似, 即管腔内表面比较光滑、基底膜清晰, 管壁纤维排列规律、呈网格状、形态结构完整。样品切片经 Van



上: 试验 2 组; 下: 试验 1 组
up: trial group 2; down: trial group 1

图 1 颈动脉变化
Fig. 1 The change of coratide

Gieson 染色后镜检, 可见被染成紫红色的胶原纤维, 粗细不一, 相互交织, 形成条梭状网孔, 网孔中无细胞成分 (图 2); 经 Weigert 染色后镜检, 可见被染成蓝黑色的弹力纤维和土黄色的胶原纤维, 粗细不一, 相互交织, 呈网格状, 网孔中无细胞成分 (图 3)。

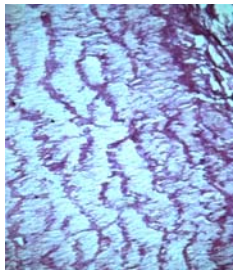


图 2 Van Gieson 染色 (×200)
Fig. 2 Van Gieson's dyeing (×200)

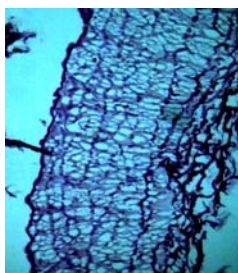


图 3 Weigert 染色 (×100)
Fig. 3 Weigert's dyeing (×100)

2.3 扫描电镜观察结果

管壁纵切面观, 基底膜结构完整、致密 (图 4), 中膜纤维结构完整、相互交织呈网格状, 孔径约 50~

150 μm (图 5)。管壁内表面观, 基底膜纤维细而稠密, 相互交织呈微小的网格状, 孔径约 2~10 μm (图 6)。管壁外表面观, 纤维呈波浪状, 粗细不一, 排列疏松、自然, 孔径约 100~200 μm (图 7)。

2.4 管壁厚度和力学测定

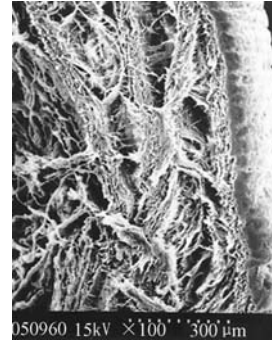


图 4 纵切面 (×100)
Fig. 4 Slit surface (×100)

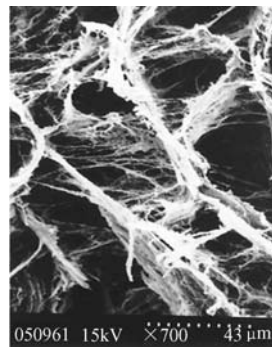


图 5 中膜 (×700)
Fig. 5 Middle layer (×700)

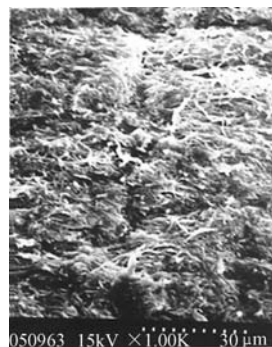


图 6 内表面 (×1000)
Fig. 6 Inner surface (×1000)

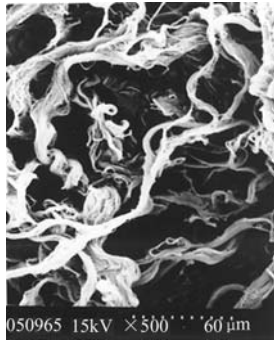


图7 外表面 (×500)

Fig. 7 Outer surface (×500)

表 不同方法制备的绵羊颈动脉脱细胞基质管壁厚度和力学性能比较

Table Comparison of pipe wall thickness and mechanics properties of acellular matrices of sheep carotids prepared with different methods ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别 Group	管壁厚度 Pipe wall thickness (mm)	最大张力 Most strain (N)	伸长率 Elongation rate (%)
试验 1 组 Trial group 1	0.222±0.0125 b	12.819±2.628 c	120.97±13.718
试验 2 组 Trial group 2	0.181±0.0174 a,b	8.790±1.943 a,c	115.29±7.795
对照组 Control group	0.239±0.0171 a	13.145±2.345 a	119.89±9.619

a 表示与对照组相比差异极显著 ($P<0.001$); b 表示 2 试验组之间差异极显著 ($P<0.001$); c 表示 2 试验组之间差异极显著 ($P<0.002$)

a represents remarkable difference between test and control group ($P<0.001$), b represents remarkable difference between two test groups ($P<0.001$), c represents remarkable difference between two test groups ($P<0.002$)

血管脱细胞基质的主要成分是胶原蛋白和弹性蛋白, 此外还有非胶原糖蛋白和粘多糖等^[7]。本试验中, 在样品的 Van Gieson 和 Weigert 染色切片上观察到大量被染成紫红色的胶原纤维和被染成蓝黑色的弹力纤维, 这与文献报道一致^[5,7]。

本试验所获得的血管脱细胞基质, 呈网孔状或蜂窝状。中膜层纤维结构完整、疏松, 孔径约 50~150 μm ; 基底膜纤维结构致密, 网孔直径约为 2~10 μm , 这与郭铁芳等人^[5]的测量结果基本一致。中膜层结构疏松, 有利于细胞种植与长入。基底膜结构致密, 有利于内皮细胞贴附和防止血栓形成, 但会妨碍受体细胞的通过或长入。有人^[8]将血管脱细胞基质用激光打孔, 密度为 50 个/ cm^2 , 孔径为 50 μm , 然后进行活体移植, 结果发现, 打孔有利于受体细胞长入。

在生理条件下, 血管壁细胞外基质有调节和控制细胞形态、功能、增殖和分化的作用, 也有支持、连接和保护细胞的功能, 对细胞发挥动态的影响和调控作用。业已证明, 血管脱细胞基质也具有良好的生物相容性, 有利于内皮细胞粘附、生长和分化, 还能影响血管平滑肌细胞的表型转变、增殖和移行^[9,10], 而

应用 SPSS 13.0 统计软件在 $\alpha=0.01$ 标准下对组间平均数进行 t 检验。管壁厚度在试验 1 组与对照组之间差异不显著 ($P>0.01$), 在试验 2 组与对照组之间差异极显著 ($P<0.001$), 在 2 试验组之间差异极显著 ($P<0.001$)。最大张力在试验 1 组与对照组之间差异不显著 ($P>0.01$), 在试验 2 组与对照组之间差异极显著 ($P<0.001$), 在 2 试验组之间差异极显著 ($P<0.002$)。伸长率在 3 个组之间差异均不显著 ($P>0.01$) (表)。

3 讨论

3.1 血管脱细胞基质的组成、结构、功能及特点

且具有与天然血管相似的可缝合性^[2,11]和免疫原性低^[12]等特点。因此, 血管脱细胞基质具有人工材料无法相比的生物活性, 是构建组织工程血管首选的支架材料。

3.2 制备血管脱细胞基质的常用方法及其原理

目前制备血管脱细胞基质常用的方法是酶-去污剂法, 即先用胰蛋白酶消化 24 h, 然后用 Triton X-100 或/和十二烷基硫酸钠 (SDS) 振荡洗剂若干小时, 时间长短随血管样品的粗细和来源不同而异。胰蛋白酶的浓度范围在 0.1%~0.5% 之间, Triton X-100 的最佳浓度为 1%^[8], SDS 的常用浓度为 1%。Triton X-100 和 SDS 脱细胞的原理都是破坏细胞的脂质膜结构, 使细胞及细胞器碎裂而脱除。Triton X-100 属非离子型去污剂, 脱细胞作用比较温和, 细胞内蛋白酶释放缓慢, 因此对细胞外基质损伤比较小。SDS 为离子型去污剂, 脱细胞效果强, 会使大量细胞在短时间内破裂、释放大量蛋白酶, 从而损伤较多的细胞外基质纤维, 影响血管基质的结构和力学特性。据文献报道 SDS 处理后会使得血管壁中的弹性膜变直, 失去弹性^[13]。

本试验中采用 0.25% 胰蛋白酶-1% Triton X-100 法

所获得的血管脱细胞基质样品,管壁变薄,管腔轻微塌陷,弹性较差,但微观结构没有明显变化,说明胰蛋白酶对管壁两侧的基质纤维有损伤,使基质的张力强度明显减弱。范恒华^[2]等人用高渗和/或低渗溶液代替胰蛋白酶消化、单独应用去污剂制备血管脱细胞基质,虽然步骤较多,但取得了比较满意的效果。

3.3 反复冻融-1%Triton X-100 加 PMSF 法的优点

反复冻融-1%Triton X-100 加 PMSF 法是本试验探索出的制备血管脱细胞基质的新方法,它与目前常用的方法相比具有以下优点:

(1) 反复冻融对整个样品中的所有细胞结构有同样的破坏作用,而胰蛋白酶消化先从样品表面开始、逐渐向内破坏细胞;

(2) 反复冻融对基质纤维成分几乎没有损伤,试验 1 组样品经脱细胞处理后管壁厚度没有明显改变、管腔不塌陷、弹性良好就说明这一点;

(3) 反复冻融是在-20℃冰箱和 4℃冰箱之间的低温条件下进行的,有效的抑制了细胞内蛋白酶的活性,保护了基质纤维成分,使其最大张力与对照组没有明显差异;

(4) 反复冻融可降低基质的免疫原性;

(5) 1%Triton X-100 PBS 溶液中加入 PMSF,抑制了细胞内蛋白酶活性,不但保护了基质纤维成分,而且使该步骤可在常温下进行;

(6) 反复冻融-1%Triton X-100 加 PMSF 法步骤少,操作简单。

4 结 论

0.25%胰蛋白酶-1%Triton X-100 法虽能完全脱除绵羊颈动脉中的细胞,但对其基质纤维有一定程度的损伤,会使基质管壁变薄,管腔轻微塌陷,张力强度降低。与其相比,反复冻融-1%Triton X-100 加 PMSF 法不仅能完全脱除细胞、保持基质纤维的正常结构,而且制备的脱细胞基质能保持良好的形状和力学性能,是制备血管脱细胞基质更好的新方法。

References

- [1] 顾春虎,刘维永,张近宝,王云雅,刘洋,谭红梅,宿学家.不同试剂脱除猪胸主动脉壁细胞的对比研究.心脏杂志,2005,17:207-209.
Gu C H, Liu W Y, Zhang J B, Wan Y Y, Liu Y, Tan H M, Su X J. Primary study on cell extraction from porcine thoracic aortas. *Chinese Heart Journal*, 2005, 17: 207-209. (in Chinese)
- [2] 范恒华,张伯勋,梁向党,汪爱媛,赵斌,崔雪梅,胡益云,吴迪,周华,王岩.脱细胞血管基质制备和异体移植的实验研究.中华外科杂志,2005,43:870-874.
Fan H H, Zhang B X, Liang X D, Wang A Y, Zhao B, Cui X M, Hu Y Y, Wu D, Zhou H, Wang Y. Experimental study on preparation of decellularized artery vascular graft matrix and explantation of carotid artery allografts. *Chinese Journal of Surgery*, 2005, 43: 870-874. (in Chinese)
- [3] 顾春虎,刘维永,张近宝,易定华,谭红梅,王云雅.猪胸主动脉脱细胞血管基质的制备.中华实验外科杂志,2004,21:1040-1041.
Gu C H, Liu W Y, Zhang J B, Yi D H, Tan H M, Wang Y Y. Primary study on cell extraction from porcine thoracic aortas. *Chinese Journal of Experiment Surgery*, 2004, 21: 1040-1041. (in Chinese)
- [4] 郭铁芳,杨大平,韩雪峰,杜金荣,张颖.脱细胞基质与血管内皮细胞体外相容性的研究.中国修复重建外科杂志,2003,17:165-168.
Guo T F, Yang D P, Han X F, Du J R, Zhang Y. Experimental study of compatibility between acellularized allogenic matrix and endothelial cell *in vitro*. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2003, 17: 165-168. (in Chinese)
- [5] 刘德伍,胡翔,毛远桂.骨髓间充质干细胞复合脱细胞血管基质构建组织工程血管的初步研究.中国美容医学,2005,14:404-405.
Liu D W, Hu X, Mao Y G. Preliminary study of tissue engineered blood vessels constructed by using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and blood vessels acellular matrix. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2005, 14: 404-405. (in Chinese)
- [6] 韩雪峰,杨大平,郭铁芳.曲拉通 X-100 对制备脱细胞血管基质影响的实验研究.中华外科杂志,2002,40(1):27-29.
Han X F, Yang D P, Guo T F. Effect of triton X-100 on preparing porcine thoracic aortas acellular matrix. *Chinese Journal of Surgery*, 2002, 40(1): 27-29. (in Chinese)
- [7] Grauss R W, Hazekamp M G, Oppenhuizen F, van Munsteren C J, Gittenberger-de Groot A C, DeRuiter M C. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2005, 27: 566-571.
- [8] Bergmeister H, Boeck P, Kasimir M T, Flech T, Fitzal F, Husinsky W, Mittlboeck M, Stoehr H G, Losert U, Wolner E, Grabenwoeger M. Effect of laser perforation on the remodeling of acellular matrix grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005, 74(1): 495-503.
- [9] Wilcox H E, Korossis S A, Booth C, Watterson K G, Kearney J N,

- Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *Journal of Heart Valve Disease*, 2005, 14: 228-236.
- [10] McFetridge P S, Daniel J W, Bodamyli T, Horrocks M, Chaudhuri J B. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2004, 70: 224-234.
- [11] Schaner P J, Martin D N, Tulenko T N, Shapiro I M, Tarola N A, Leicher R F, Carabasi R A, Dimuzio P J. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery*, 2004, 40(1): 146-153.
- [12] Ketchedjian A, Jones A L, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger L J, Hopkins R. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2005, 79: 888-896.
- [13] Chang Y, Hsu C K, Wei H J, Chen S C, Liang H C, Lai P H, Sung H W. Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biotechnology*, 2005, 120: 207-219.

(责任编辑 高 雨)