

·技术研究·

新型脱细胞脑组织修复支架的制备及其细胞相容性

何海勇, 李文胜, 王 辉, 蔡梅钦, 龚 瑾, 郭 英*

(中山大学附属第三医院神经外科, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】研制天然脱细胞脑组织修复支架,并对其形态结构、主要成分和细胞相容性进行分析,为研制出理想的脑损伤修复支架提供初步的实验依据。【方法】取成年SD大鼠脑皮质,运用冻融、Triton X-100、脱氧胆酸钠、DNA/RNA酶等进行脱细胞处理并予京尼平(GP)交联,对处理后的支架材料进行形态结构观察、主要成分分析和细胞相容性观察。【结果】经脱细胞处理后,脑组织细胞成分已去除,形态上具有高度仿生的三维立体空间网状结构。经GP交联后脱细胞支架空间网状结构变得更为明显,无菌保留3个月未见明显降解。平均孔径(14.9 ± 2.5) μm ,孔隙率达(90.4 ± 2.2)%。脱细胞支架细胞外基质成分层粘连蛋白(LN)强阳性表达、纤维粘连蛋白(FN)和IV型胶原(Col IV)弱阳性表达。神经干细胞与脱细胞支架共培养,HE可见细胞外基质支架间大量细胞粘附;SEM下可见大量神经干细胞粘附在支架材料表面,部分细胞表面有突起。【结论】初步研制的脱细胞脑组织支架呈立体空间网状结构,部分保留了细胞外基质成分,并具有良好的细胞相容性。

关键词: 脱细胞脑组织; 支架; 交联**中图分类号:** R651.1+5**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-3554(2012)01-0111-05

Preparation and Cytocompatibility of Acellular Rat Brain Matrix for Tissue Engineering Scaffolds

HE Hai-yong, LI Wen-sheng, WANG Hui, CAI Mei-qin, GONG Jin, GUO Ying*

(Department of Neurosurgery, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To prepare the acellular rat brain matrix scaffold and detect its cytocompatibility with neural stem cells. 【Methods】After anesthesia with 10% chloral hydrate, Sprague Dawley rats' brain was removed, and then cerebral cortex was isolated. Being made use of freeze-thaw, Triton X-100, sodium deoxycholate, DNA enzyme, and RNA enzyme, the acellular scaffold of rat brain tissue was prepared, and after being cross-linked with Genipin, an initial acellular rat brain matrix scaffold was made. Then, Haematoxylin and Eosin staining (HE) was used to evaluate its content. Scanning electron microscopy (SEM) was used to view the ultrastructure of the samples and measure the pore size of specimens. Immunohistochemical analysis of acellular scaffold was carried out to seek the distribution and content of the three major extracellular matrix-FN, LN and Col IV. The cytocompatibility of the acellular scaffold was assessed by observing NSCs' growth, proliferation, and adhesion when co-cultured with the scaffold. 【Results】After being treated by a variety of reagents, cells within rat brain tissue had been largely removed. The acellular scaffold had forms of three-dimensional network structure, good hydrophilicity, and a high degree of bionic. After being cross-linked by Genipin, the three-dimensional scaffold had become more porous, with an average pore size (14.9 ± 2.5) μm , porosity was (90.4 ± 2.2)%. The degradation of scaffold, and no significant residual cell debris within scaffold was found. LN expression in the acellular scaffold was strong positive, while FN and Col IV expression were weakly positive. Had been cultured onto cross-linked scaffolds for 7 days, the NSCs had a pretty proliferation and adhesion to the scaffold. HE staining showed that there were a large number of cells in extracellular matrix. SEM showed that a large number of NSCs adhere to the surface of material, and some cells grew processes. 【Conclusion】The initial development of the acellular rat brain matrix scaffold has the structure of three-dimensional network, partly retains the extracellular matrix and has good cytocompatibility.

Key words: acellular rat brain matrix; scaffolds; cross-linking

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(1): 111-115]

收稿日期: 2011-05-25**基金项目:** 国家自然科学基金(30672152); 广东省科技计划项目(2007B03100302)**作者简介:** 何海勇, 博士研究生, 住院医师; * 通信作者: 郭 英, 教授, E-mail: gzguoying@hotmail.com

脑损伤后功能恢复一直是神经外科的难题,虽然近年来脑损伤修复取得了一定的进步,但仍未取得突破性进展。目前应用于脑损伤修复的人工合成支架,由于制作工艺的限制和脑组织结构的复杂性,尚不能制作出与脑高度相似的三维网状结构,难以真正模拟正常脑组织的结构,不具有仿生性。近年来一种新的趋势是采用脱细胞技术将同种异体来源的材料制备成生物衍生材料,以求在物理性能、生物性能及其形态结构达到高度仿生^[1-4]。本研究探索运用冻融+化学萃取的方法制备脱细胞天然脑组织支架,并对其形态结构、主要成分和细胞相容性进行分析,为研制出理想的脑损伤修复支架提供初步的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

3月龄健康SD大鼠(中山大学实验动物中心提供),脱氧胆酸钠(Sigma),DNase I(Sigma)、RNase A(Sigma),Triton X-100(Sigma),京尼平(Genipin,GP)(上海沪云医药),纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)抗体、层粘连蛋白(Laminin, LN)抗体、IV型胶原(Collagen IV, Col IV)抗体(北京博奥森),CY-3荧光II抗(Jackson),恒温回旋振荡器(苏州大隆)、解剖显微镜(奥林巴斯)。

1.2 大鼠脱细胞脑组织支架的制备

3月龄健康 Sprague-Dawley (SD)大鼠10只,雌雄不限,体质量(180 ± 20)g。体积分数10%水合氯醛深度麻醉后取出大脑,在解剖显微镜下去除脑膜、血管结构,剖取脑皮质,制成大约 $5\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ 大小的长方体小块。脱细胞组:取脑皮质小块20块,置入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存1 h,室温下解冻;双蒸水置换至溶液清亮后放 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存过夜;将样本置于双蒸水中恒温回旋振荡器内振荡2 h($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 r/min , $r = 15\text{ cm}$);体积分数1% Triton X-100中振荡2 h($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 r/min);双蒸水置换至溶液清亮;3 g/L 脱氧胆酸钠振荡45 min($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 r/min);双蒸水置换至溶液清亮;1 kU/mL DNase 和 RNase 混合液中振荡30 min;双蒸水置换至溶液清亮。将制备好的支架置于22 mmol/L GP 室温下交联3 d, PBS 冲洗3遍,过氧乙酸消毒后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。新鲜对照组:同样大小数量的脑皮质样本仅使用 PBS 液浸泡,过程同脱细胞组^[1-4]。

1.3 组织形态学观察

1.3.1 HE 观察 将制备好的支架材料与新鲜脑组织用40 g/L的多聚甲醛溶液固定4 h,常规石蜡包埋,切片后HE染色,显微镜下观察。

1.3.2 SEM 观察 将制备好的支架材料与新鲜脑组织浸泡于体积分数2.5%戊二醛中约4 h;梯度酒精脱水;叔丁醇置换;冰冻干燥;喷金;贴台;NEC JSM-6330F 型场发射扫描电子显微镜下观察;在材料内部选取5个高倍视野(500倍),每视野测量10个孔径值,计算材料的平均孔径。采用液体位移法^[3]测定支架的孔隙率。每个样本测5次,取其均值。

1.4 细胞外基质成分免疫荧光分析

①样本切片脱蜡至水;②0.88 mmol/L H_2O_2 去除内源性过氧化物酶;③加入1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 微波炉高火8 min 煮沸,然后低火20 min,缓慢冷却至常温;④质量分数4%胃蛋白酶消化($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min);⑤滴加体积分数10%正常山羊血清($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min);⑥分别加入第I抗体,兔抗LN(1:100),兔抗FN(1:100),兔抗Col IV(1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;⑦出切片恢复至常温后滴加抗兔CY3(1:400),常温孵育30 min, PBS 洗3次,每次5 min;⑧体积分数90%的缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察。用正常脑组织阳性片作阳性对照,以PBS代替第一抗体作阴性对照。

1.5 神经干细胞分离培养与鉴定

参见我们既往方法^[6]。取生后3 d内SD大鼠6只(雌雄不限)处死,分离海马组织,剪碎,用1.33 g/L胰酶消化30 min(恒温 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$)。用含体积分数10%胎牛血清的PBS液中中止消化,吸管反复吹打约50次,经220目铜网滤过后,离心去上清,沉淀再加入4 mL NSCs 的DMEM/F12培养液,调整细胞密度为 $5 \times 10^8/\text{L}$ 进行培养。每隔2 d 半换培养液1次。6~7 d左右行第1次传代,然后每6~7 d用1.25 g/L胰酶+0.2 g/L EDTA 酶解分离细胞克隆球传代1次。将拟检测的NSCs 细胞集落接种到预先涂有多聚鸟氨酸的盖玻片上,使悬浮的NSCs 贴壁生长,制作成细胞爬片。用含体积分数1% Triton X-100 和质量分数2% PFA 的PBS 固定破膜25 min后,质量分数2% BSA 封闭30 min;然后加I抗nestin(1:500),放人 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保湿孵育过夜;第2天取出后加II抗-CY3(1:100),室温避光保湿孵育1 h;DAPI 复染核,避光保湿孵育

15 min; ACE 封片; 荧光显微镜下观察。

1.6 脱细胞基质支架细胞相容性检测

用含有 DMEM/F12、N2、bFGF 的完全培养基重悬神经干单细胞, 制成 $7 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞悬液; 将 50 μL 悬液接种到 96 孔培养板中的支架材料上; 孵育支架 3 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2); 3 h 后每孔添加新鲜培养液 150 μL ; 24 h 后小心全量换液; 根据需要或每 3 天换液; 共培养 1 周后通过 HE 染色和扫描电子显微镜观察细胞与支架粘附、生长情况。用同样密度的细胞悬液悬浮培养作为对照组。

2 结 果

2.1 组织形态学观察

2.1.1 大体观察 脱细胞支架材料置于 PBS 中成透明海绵状, 质地柔软、疏松, 离开 PBS 后成团状; 重新置入 PBS, 结构难于复原; 倒置相差显微镜下, 材料呈三维立体孔洞网络结构; 消毒后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 3 月出现明显降解。经 22 mmol/L GP 交联后支架呈蓝紫色, 从 PBS 中取出后重新置入结构完全复原; 消毒后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 3 月未见明显降解。

2.1.2 HE 观察 脑组织脱细胞前 HE 染色可见大量细胞核, 且结构致密 (图 1A); 脱细胞后细胞成分已基本去除, 形成条索网孔状结构, 未见明显细胞残留 (图 1B)。

2.1.3 SEM 观察 未交联支架材料空间结构坍塌粘连, 孔隙率较低, 未见细胞残留, 但可见少量细胞碎片 (图 2A); 交联支架呈空间网状结构, 未见细胞碎片 (图 2B)。平均孔径为 $(14.9 \pm 2.5) \mu\text{m}$, 孔隙率为 $(90.4 \pm 2.2)\%$ 。

2.1.4 细胞外基质成分免疫组化观察 正常脑组织中细胞外基质成分 LN 有强阳性表达 (图 3A), FN 有阳性表达 (图 3B), 而 Col IV 为弱阳性表达 (图 3C), 主要分布于脑内血管的基底膜上。而脱细胞修复支架 LN 仍有强阳性表达 (图 3D)、FN (图 3E) 和 Col IV (图 3F) 均为弱阳性表达。

2.2 脱细胞基质支架细胞相容性检测

倒置相差显微镜下观察可见细胞增殖良好, 7 d 时大量神经干细胞与修复支架材料黏附, 部分增殖成神经球; HE 可见细胞外基质支架间大量细胞黏附 (图 4A); SEM 下同样可见大量神经干细胞黏附在支架材料表面, 部分细胞表面有突起 (图

4B), 与正常神经干细胞形态结构相似 (图 4C)。

3 讨 论

天然的脱细胞基质具有与正常组织相接近的网架结构、生物学性能, 其表面的细胞膜受体识别位点、部分活性因子有利于细胞的黏附生长及发挥生理功能, 因此是很有实用意义的支架材料。近年来天然的脱细胞基质得到了国内外广大学者的重视。脱细胞技术在周围神经、皮肤、心肌、心瓣膜、膀胱等方面已得到了广泛的应用并取得了较好的效果。在中枢神经系统方面则鲜有报道。这可能与脑组织与脊髓组织、周围神经在结构、质地和组成等方面均存在一定的差异, 且和其结构更为复杂有关。

目前, 脱细胞方法有多种, 但单纯依靠某一种方法难于获得满意的效果。要获得比较理想的脱细胞效果, 并能最大程度地保存原有的组织结构以适合组织工程的需要, 常需几种方法的联合应用。本研究在冻融破坏脑组织细胞的基础上, 应用 Triton X-100 和脱氧胆酸钠进一步破坏细胞, 同时利用脱氧胆酸钠在碱性条件下作用增强的特点, 加入适量 NaOH 从而增强其破坏细胞能力, 而且 NaOH 本身具有细胞破坏作用, 最后加入核酸酶彻底破坏细胞及细胞核。在实验过程中蒸馏水浸泡和冲洗时间一定要充足, 才能保证将破坏的细胞成分从组织中清除。HE 染色和扫描电镜结果显示, 运用这种冻融和化学萃取的脱细胞方法处理的脑组织支架已较彻底去除了细胞。

由于在制备脱细胞脑组织支架过程中, 支架表面分子及结构受到破坏, 强度下降。交联技术的出现一定程度上弥补了这些不足, 它一方面增强了材料的生物稳定性, 同时也可在一定程度上降低其抗原性^[5-6]。目前用于交联的试剂主要有戊二醛、多聚环氧化合物 (polyepoxy compound, PC)、GP 等。因戊二醛有很强的细胞毒性, PC 交联中形成的化学结构不稳定, 本实验选择天然交联剂 GP, 它与生物组织上的自由胺基反应生成杂环结构的 3 级胺, 其键结则较为稳定。因此以 GP 交联处理的生物组织较为稳定, 组织中也不易释放出有毒物质, 如 Wang 等实验^[7]表明 GP 交联的支架不影响成骨细胞的增殖。经过交联的支架强度提高, 空间网状结构更为明显, 残留的细胞碎片更容易通

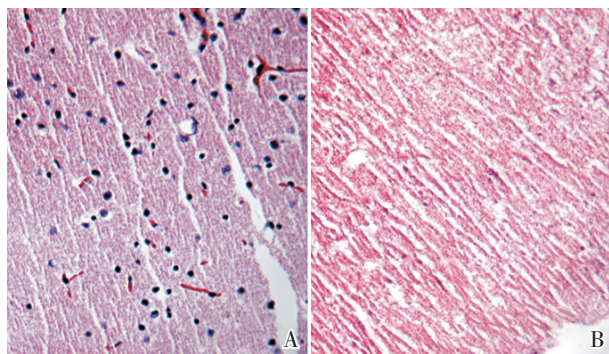


图 1 脱细胞前后大鼠脑基质 HE 染色对比图

Fig.1 Light micrograph of matrix of rat brain before and after treatment

A: fresh matrix of rat brain; B: acellular matrix of rat brain, the cells were completely removed; HE stain($\times 400$).

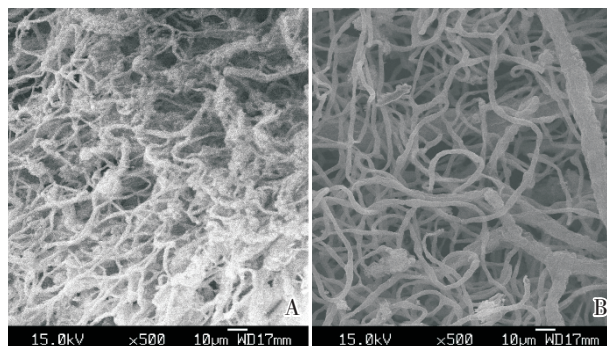


图 2 脱细胞脑基质支架 Genipin 交联前后扫描电镜对比图

Fig.2 Scanning electron micrograph of acellular matrix of rat brain before and after crosslinking with Genipin

A: before crosslinking; B: after crosslinking with Genipin, 3D scaffold is porous, and had no significant residual cell debris; $\times 500$

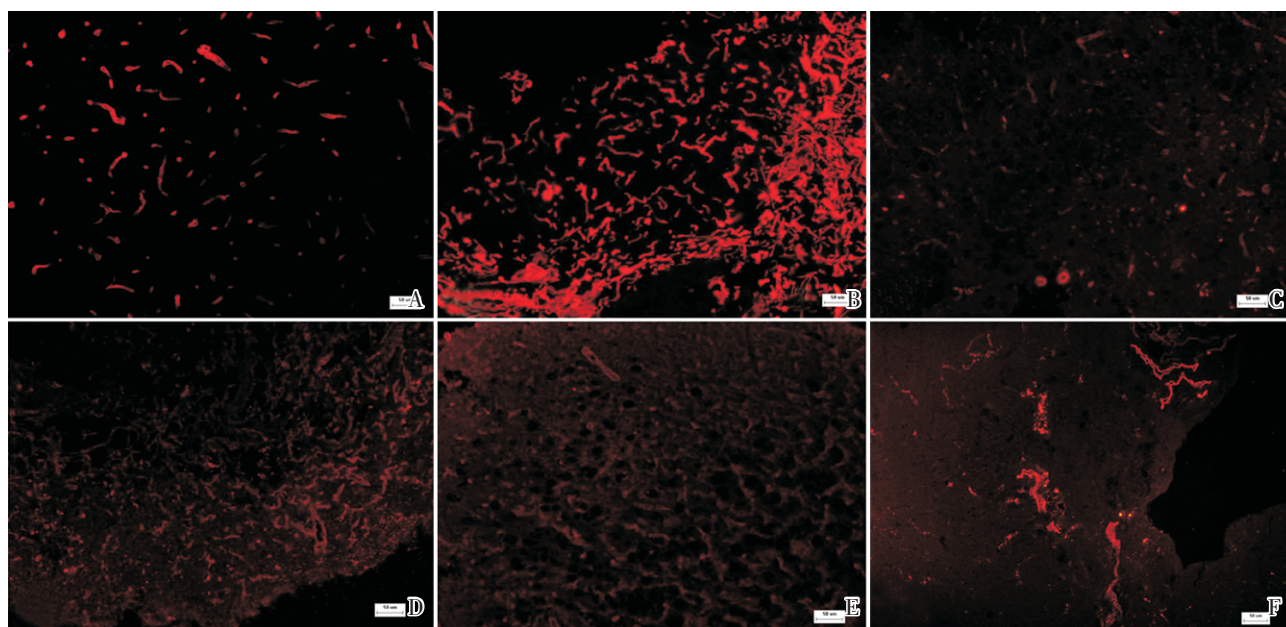


图 3 脱细胞前后大鼠脑基底层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、IV型胶原免疫荧光染色对比图

Fig.3 Immunofluorescence staining for LN, FN, Col-IV of rat brain matrix before and after treatment

A-C: fresh matrix of rat brain; D-F: acellular matrix of rat brain; A: LN expression is strongly positive; D: LN expression is strongly positive; B: FN expression is positive; E: FN expression is weakly positive; C: Col-IV expression is weakly positive; F: Col-IV expression is weakly positive; $\times 200$.

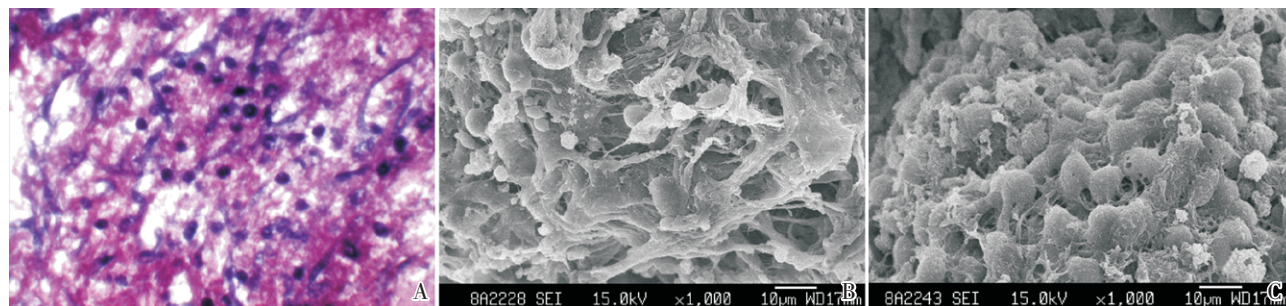


图 4 神经干细胞与脱细胞脑基质支架共培养图

Fig.4 Micrograph of neural stem cells being cocultured with acellular matrix scaffold

A: A large number of NSCs proliferate among the scaffold, HE stain, $\times 1000$; B: A large number of NSCs proliferate among the scaffold, some process grew in some cells, SEM $\times 1000$; C: control group, Normal neural stem cells, SEM $\times 1000$.

过漂洗清除, 本实验 SEM 结果也印证了这一点。另外, 交联后支架降解明显减慢, 这可能与 GP 与支架反应生成大分子, 减缓生物酶降解有关。

脱去细胞后留下了细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 它的结构主要包括纤维、糖蛋白、蛋白多糖。在正常脑组织中 ECM 含量较外周组织少, 主要有位于血管基底膜和细胞间质中的 FN、LN 和 Col IV。它们对 ECM 的组装、产生、细胞粘附、趋化、分化和增殖起重要作用。此外, 细胞外基质中亦存在神经干细胞(neural stem cell, NSC)识别位点, 如 LN 或其他整合素受体可激活 NSC 的胞内信号通路, 调节细胞内多种蛋白质的功能, 细胞骨架蛋白和信号蛋白的磷酸化, 促进细胞的粘附、迁移和轴突的生长。本实验的免疫荧光结果显示, 脱细胞脑组织修复支架含有较多 LN, 而 FN, 特别是 Col IV 含量相对较少。这可能和它们本身在脑组织中含量相对偏少有关^[8-9]。另外, 在脱细胞过程中, 各种化学试剂可使存在于细胞外基质纤维和基底膜中可溶性 FN 丢失, 而 FN 对 Col IV 的装配具有骨架作用, 故破坏 FN 成分后 Col IV 也遭破坏而丢失^[10]。因此, 在制备脱细胞脑组织支架材料过程中, 如何能在有效去除细胞成分的同时尽可能保留重要细胞外基质的结构和成分, 值得我们对制备过程做进一步优化。

我们制备的脱细胞脑基质支架去除了细胞, 虽然支架的大部分抗原成分已去除, 但仍应对其生物相容性进行检测。生物支架材料的相容性是构建组织工程化组织或器官的一个关键问题。目前, 用于评价材料生物相容性的公认方法是细胞毒性试验。我们将神经干细胞直接滴放在支架材料上进行共培养^[11], 发现神经干细胞在支架上粘附良好, 并可沿支架空隙向内部生长, 团状增殖, 还可见部分轴突生长, 并与正常神经干细胞形态结构相似, 这提示支架的残留毒性小, 细胞相容性好, Triton X-100 等脱细胞试剂无明显残留毒性, 适合神经干细胞种植。

本实验初步制备的脱细胞脑组织支架呈立体空间网状结构, 部分保留了细胞外基质成分, 并具有良好的细胞相容性和仿生性, 可作为脑缺损的

移植物及和神经干细胞种植的支架材料。

参考文献:

- [1] Domenico R. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane [J]. Brain Res, 2003, 989(1): 9-15.
- [2] 郭树章, 任先军, 蒋涛, 等. 大鼠脱细胞异体脊髓支架的免疫原性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(6): 444-446.
- [3] 陆军, 张镜方, 陈欣欣, 等. Triton X-100 法制备牛颈静脉脱细胞血管支架[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2008, 29(3): 347-350.
- [4] Bhrany AD, Lien CJ, Beckstead BL, et al. Crosslinking of an oesophagus acellular matrix Tissue scaffold [J]. Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(6): 365-372.
- [5] Harini GS, Gary AM, Norman AL, et al. Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 87(2): 308-320.
- [6] Guo Y, Shi D, Li W, et al. Proliferation and neurogenesis of neural stem cells enhanced by cerebral microvascular endothelial cells[J]. Microsurgery, 2008, 28(1): 54-60.
- [7] Wang C, Lau TT, Loh WL, et al. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker-Genipin with therapeutic model cells [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011, 97(1): 58-65.
- [8] Preston M, Sherman LS. Neural stem cell niches: Roles for the hyaluronan-based extracellular matrix[J]. Front Biosci; Schol Ed, 2011, 1(3): 1165-1179.
- [9] Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 16: 2031-2045.
- [10] Yamada Y, Katagiri F, Hozumi K, et al. Cell behavior on protein matrices containing laminin $\alpha 1$ peptide AG73 [J]. Biomaterials, 2011, 32(19): 4327-4335.
- [11] Wei HJ, Chen SC, Chang Y, et al. Porous acellular bovine pericardia seeded with mesenchymal stem cells as a patch to repair a myocardial defect in a syngeneic rat model[J]. Biomaterials, 2006, (27): 5409-5419.

(编辑 刘清海)