

改良萃取法制备脱细胞神经支架的去髓鞘效果评价

侯 博, 李文胜, 秦 峰, 王 辉, 何海勇, 龚 谨, 叶卓鹏, 张保豫, 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】评价改良化学方法制备脱细胞神经支架的去髓鞘与脱细胞效果。【方法】12 只成年 SD 大鼠(230~280g), 取双侧坐骨神经, 随机分为 3 组, 每组 8 例, 分别采用不同的处理方法。正常对照组: 不作任何处理; Hudson 组: 采用 Triton X-200、磺基三甲铵乙内酯-10(SB-10)、磺基三甲铵乙内酯-16(SB-16)处理; 改良组: 采用 Triton X-200、SB-10、SB-16 联合脱氧胆酸钠(SDC)及过氧乙酸(PAA)处理。处理后行 HE 染色、甲苯胺蓝染色及透射电镜检查, 观察脱细胞、去髓鞘程度及基底膜保存情况。【结果】形态学检查显示, 与对照组相比, Hudson 组中的细胞核结构完全消失, 甲苯胺蓝染色为散在同心的髓鞘结构, 透射电镜下显示髓鞘板层成分保留, 但有崩解断裂, 轴突依然存在; 改良组细胞核完全去除, 与 Hudson 组不同的是, 甲苯胺蓝染色显示为不规则多孔状结构, 髓鞘成分消失, 透射电镜下显示髓鞘及轴突成分彻底去除, 基底膜管壁结构清晰并完整保留。【结论】改良萃取法制备脱细胞神经支架能够有效地去除细胞和髓鞘成分, 同时基底膜管壁结构保留完整。

关键词: 萃取法; 神经; 脱细胞支架; 髓鞘; 基底膜管

中图分类号: R318.08 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)03-0322-04

Demyelination Efficiency of Optimized Extractive Method in Preparation of Acellular Nerve Scaffold

HOU Bo, LI Wen-sheng, QIN Feng, WANG Hui, HE Hai-yong, GONG Jin,

YE Zhuo-peng, ZHANG Bao-yu, GUO Ying*

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

Abstract: 【Objective】 To evaluate the competence of modified extractive method in removing myelin sheath, thereby seek a kind of effective extractive method to prepare acellular nerve scaffold. 【Methods】 Twelve adult SD rats weighing 230–280 g were used. The bilateral sciatic nerves were harvested and divided evenly into three groups according to preparation methods: control group were fresh nerve; Hudson group were treated by Triton X-200; sulfobetaine-10 (SB-10), sulfobetaine-16 (SB-16) and modified group were processed by Triton X-200, SB-10, SB-16, sodium deoxycholate (SDC) and peroxyacetic acid (PAA). HE, toluidine blue, and transmission electron microscope (TEM) were used to monitor the efficiency of extractive method by assess the degrees of decellularization, demyelination and integrity of basal lamina tube. 【Results】 In Hudson group, HE staining showed that cell nuclei totally disappeared. Toluidine blue staining revealed concentrically ringed myelin sheath debris, stratiform structure of myelin sheath was distinct apart from a little incompact and axons were still visible in TEM detection. Modified group presented the same HE results, while Toluidine blue staining and TEM showed sample exhibited irregularly porous structure, myelin sheath and axons were completely removed and basal lamina tubes were integrally preserved, when compared to Hudson group. 【Conclusion】 Modified extractive method exhibited a good efficiency in decellularization and demyelination, and provided protection for extracellular matrix.

Key words: extractive method; nerve; acellular scaffold; myelin sheath; basal lamina tube

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3): 322–325]

优质的脱细胞神经支架应尽可能去除抗原性物质^[1]。目前, 制备方法主要采用 Hudson 的萃取

技术, 该方案能够有效的去除细胞成分同时又能保护基底膜管不受损伤^[2-3], 但我们发现 Hudson 法

收稿日期: 2011-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(30672152) 广东省科技计划项目(2007B031003002) 广东省产学研结合项目(2011B090400098)

作者简介: 侯 博, 硕士研究生, 研究方向: 外周神经再生 E-mail: hbneurology@yahoo.cn; * 通信作者: 郭 英, 教授, 博士生导师, E-mail: guoneurology@yahoo.cn

在脱髓鞘方面并不理想。髓鞘成分遗留过多将导致更多的炎症细胞入侵,局部炎症反应加剧。髓鞘由致密的板层结构组成,紧密黏附于基底膜管内表面,在不损伤细胞外基质的情况下彻底去除髓鞘较为困难。至今为止,有关制备神经修复支架过程中脱髓鞘的效果方面的研究鲜有报道。本实验选择大鼠坐骨神经为研究对象,在Hudson法基础上加以改良,旨在清除细胞成分、保存基底膜的同时,又能尽可能去除髓鞘等免疫原性物质,以期探索一种更为理想的脱细胞神经修复支架的制备方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物:健康成年SD大鼠12只,雌雄不限,体质量230~280g由中山大学实验动物中心提供。主要材料和仪器:SB-10、SB-16、TritonX-200、SDC均购自美国Sigma公司,PAA购自瑞士Adamas-Beta公司,摇床(江苏金坛)、光学显微镜(Nikon)、超薄切片机(Leica)、sXP-10型解剖显微镜(Leica)均由中山大学第三附属医院中心实验室提供,透射电镜(FEI TECNAI SPIRIT G2)由中山基础医学院电镜室提供。

1.2 方 法

1.2.1 取 材 断头处死动物,无菌条件下切取大鼠双侧坐骨神经(2cm/例),解剖显微镜下尽量去除表面结缔组织及血管,游离出表面略微光滑的神经组织,将标本置于4℃PBS备用。

1.2.2 标本分组及处理 将获取的神经组织随机分为3组,分别给予不同的处理方式:正常对照组($n=8$),Hudson法处理组($n=8$),改良法处理组($n=8$)。对照组:坐骨神经不作任何处理。Hudson组:参照Hudson法制备去细胞神经支架^[2]。改良组:室温下,将神经组织于125mmol/L SB-10溶液浸泡12h;PBS漂洗3次,每次20min;0.6mmol/L SB-16+1.4g/L Triton X-200溶液浸泡24h;PBS漂洗3次,每次20min;125mmol/L SB-10溶液浸泡12h;PBS漂洗3次,每次20min;4g/L脱氧胆酸钠溶液浸泡12h;PBS漂洗3次,每次20min。以上步骤均在摇床震荡条件下(100r/min, $r=1.5$ cm)进行。最后将上述处理过的材料置于1mL/L PAA溶液中静置6h(室温条件

下)。

1.2.3 HE染色、甲苯胺蓝及电镜检测 HE染色:将制备后的标本置于40g/L多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μ m厚切片,标本脱蜡后行HE染色光镜下观察细胞及组织结构。

甲苯胺蓝及透射电镜:标本置于25g/L戊二醛固定2h,10g/L锇酸作用90min,常规梯度乙醇脱水,Poly/Bed 812有机树脂包埋、60℃条件下聚合48h,半薄切片(0.5 μ m)行甲苯胺蓝染色,光镜下观察髓鞘情况及基底膜管结构;超薄切片(60~70nm)置于柠檬酸铅和醋酸双氧铀染色后透射电镜下观察髓鞘、轴突及基底膜管情况。

2 结 果

2.1 HE染色

对照组新鲜神经切面可见排列规则的细胞核,组织结构呈波浪状(图1A);Hudson组切面大部分细胞核被除去,组织结构和正常神经相比并无改变(图1B);改良组细胞核去除更为完全,组织结构有轻微的松散,未见有破裂迹象(图1C)。

2.2 甲苯胺蓝染色

对照组组织整体较为坚实,可见大量形状规则,蓝色深染的髓鞘结构(图2A);Hudson组显示髓鞘发生崩解,大量髓鞘碎片残留(图2B);改良组显示为多孔状结构,形状和正常相比略有改变,但无深染的髓鞘,同时未见有髓鞘碎片残留(图2C)。

2.3 透射电镜检测

电镜显示Hudson组大部分髓鞘结构崩解,可见松散的板层结构呈同心圆状排列,轴突成分依然存在,但有部分较小口径神经束髓鞘被完全去除(图3B)。与HE结果一致,始终未发现细胞核;改良组电镜下变化较为明显,视野均为中空的孔状结构,孔壁较薄,与正常的基底膜管(图3A)相比外形略有改变,但结构依然完整,束间的胶原纤维清晰可见,髓鞘及轴突彻底消失(图3C)。

3 讨 论

脱细胞神经支架为神经再生提供一个有利的内环境:①它们能够引导近端新生轴突向远端爬行;②提供机械性保护免除外界物理性损伤;③阻止成纤维细胞的入侵避免胶质疤痕的形成^[4]。脱

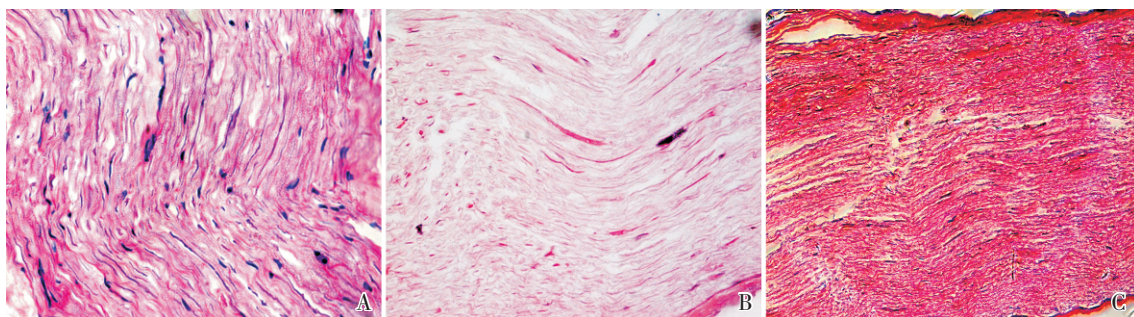


图 1 脱细胞支架 HE 染色对比图

Fig.1 The pathology photomicrograph of acellular nerve scaffold by HE staining

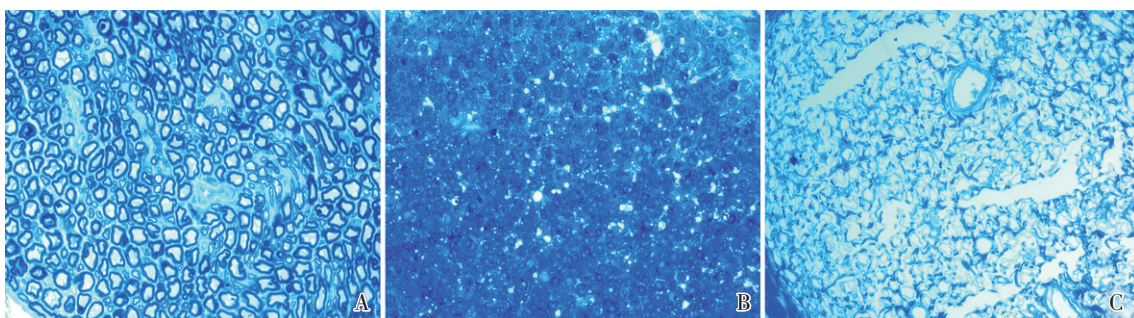
A: Control group $\times 400$; B: Hudson group $\times 400$; C: Modified group $\times 200$.

图 2 脱细胞支架甲苯胺蓝染色对比图

Fig.2 Toluidine blue staining of acellular nerve scaffold

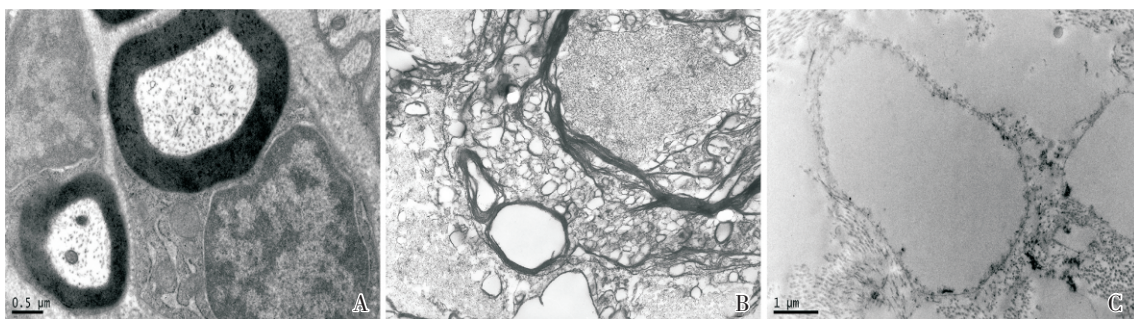
A: Control group; B: Hudson group; C: Modified group; $\times 40$.

图 3 脱细胞支架超微结构对比图

Fig.3 Ultramicrostructure change of acellular nerve scaffold

A: Control group $\times 18\ 500$; B: Hudson group $\times 11\ 500$; C: Modified group $\times 13\ 500$.

细胞神经支架来自正常的神经组织,它们去除了组织中的细胞、髓鞘及轴突等神经免疫原性物质,同时保留了细胞外基质成分(基底膜管)。该种支架具有低免疫原性、天然的超微结构,同也具有某些生物活性因子^[5]。这样特点都是人工支架无法比拟的,因此从理论上来讲该种支架最符合理想支架的要求。

1998年 Sodell 首次利用 Triton X-100 及 SDC

成功制备出神经支架,并且体内试验证明该支架有促进神经再生的功能^[6]。而 2004 年, Hudson 提出一种新的改良神经萃取技术^[9],即采用较为温和的萃取剂 SB-10、SB-16 和 Triton X-200 来制备。并证实该法和 Sodell 法相比其优越之处在于可以最大限度的保护细胞外基质,从而更有利于神经轴突的再生。但是,在大量的重复实验中,我们发现电镜下采用 Hudson 法制备的神经支架虽

然基底膜管保留完整,但髓鞘仅有部分松散崩解,仍然有大量轴突存在。研究发现,髓鞘和轴突也含有主要组织相容性抗原(MHC)成分,同样会引起移植物排斥反应^[8]。因此,要保证支架安全、有效,不仅要彻底去除细胞成分,同时还要有效地去除髓鞘和轴突。

髓鞘的板层结构紧贴于基底膜管,其粘附性和坚韧性比细胞要强,有证据表明去细胞的程度和去髓鞘的程度并非正比关系^[9]。另外,SB-10、SB-16均是兼性离子去污剂,本身作用温和,而Triton X-200常需与兼性离子去污剂联合使用,只起到辅助萃取作用^[10]。鉴于此,我们对Hudson法进行了改良,将最后步骤中的SB-16+Triton X-200更换为SDC(具体步骤参见实验方法),并且利用PAA进一步去除支架残余的细胞碎片。PAA是阴离子去污剂中作用较强的一种,因它有溶解胞浆、核酸成分的能力,被广泛用于萃取过程^[11]。有证据表明0.10%~0.15%(v/v)就可以满足消毒和萃取目的^[12]。尽管PAA可能会改变细胞外基质的微结构,但不会对支架成分及组织的力学特性产生影响,而且可以保护某些活性因子的结构和功能(TGF- β 、b-FGF、VEGF等)^[13],在体内最终分解成无细胞毒性的水、氧气和二氧化碳。通过上述改良,不仅完整保留了基底膜管,而且完全去除了支架中髓鞘成分,这点在甲苯胺蓝染色及透射电镜中得到证实。

综上所述,本实验对Hudson法加以改良,利用Triton X-200、SB-10、SB-16联合SDC及PAA有效的去除神经组织的髓鞘结构,而且完整的保护细胞外基质结构,制备出更为满意的脱细胞神经支架。不足之处是本实验的评价结果只是建立在形态学的基础之上,尚缺乏该支架在体内的效果。因此我们未来的工作是对改良法所制备的支架活性成分,宿主的免疫反应,以及促神经再生能力等方面做进一步的评估。

参考文献:

- [1] Johnson EO, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides[J]. *Injury*, 2008, 39 Suppl 3: S30-S36.
- [2] Hudson TW, Zawko S, Deister C, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(11-12): 1641-1651.
- [3] 王冠军,孙明学,卢世璧,等.改良化学去细胞同种异体神经制备方法的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007(12), 213-216.
- [4] Gu X, Ding F, Yang Y, et al. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 93(2): 204-230.
- [5] Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(1): 1-13.
- [6] Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction[J]. *Brain Res*, 1998, 795(1-2): 44-54.
- [7] Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(9-10): 1346-1358.
- [8] Evans PJ, Midha R, Mackinnon SE. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology [J]. *Prog Neurobiol*, 1994, 43(3): 187-233.
- [9] 孙明学,王鑫,赵斌,等.化学去细胞法对粗大神经质量评价方法及影响因素的探讨[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006(8): 779-782.
- [10] Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(22): 2215-2231.
- [11] Hodde J, Janis A, Ernst D, et al. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2007, 18(4): 537-543.
- [12] Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79(2): 211-216.
- [13] Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa[J]. *J Cell Biochem*, 1997, 67(4): 478-491.

(编辑 徐杰)