

# 人脐静脉脱细胞基质的制备\*

王海江<sup>1</sup>, 范应中<sup>2</sup>, 李泸平<sup>2</sup>, 张震<sup>2</sup>, 张大<sup>2</sup>

## Preparation of extracellular matrix of human umbilical veins

Wang Hai-jiang<sup>1</sup>, Fan Ying-zhong<sup>2</sup>, Li Lu-ping<sup>2</sup>, Zhang Zhen<sup>2</sup>, Zhang Da<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Preparation of extracellular matrix (ECM) aims to remove the cellular components in tissues, there is no uniform standard for the current acellular methods, but the prepared ECM should be proved to be without residual cells.

**OBJECTIVE:** To prepare human umbilical vein ECM by using hypotonic and hypertonic solutions, detergent and proteinase in a multistep process, mixed solution of Triton X-100 and ammonia water, and to explore the ideal method of preparing human umbilical vein ECM.

**METHODS:** ECM of human umbilical veins was prepared by use of hypotonic and hypertonic solutions, detergent and proteinase in a multistep process and solution of Triton X-100 and  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . The physical properties and hematoxylin-eosin staining of human umbilical vein before and after acellular matrix were observed, the amount of residual cell debris in 50 images at 400 magnification was measured.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The acellular umbilical veins exhibited translucent porcelain-white jelly-like tubular structure. The cell components of the human umbilical veins resulting from hypotonic and hypertonic solutions, detergent and proteinase were almost removed, ECM maintained an integrity, and fibrous structures were preserved. ECM resulting from solution of Triton-X100 and  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  had different quantities of remaining cellular elements. There were significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ). Hypotonic and hypertonic solutions, detergent and proteinase are ideal methods to prepare ECM from human umbilical veins.

<sup>1</sup>Department of Surgery, The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Wang Hai-jiang★, Master, Attending physician, Department of Surgery, The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China  
Whaj2008@163.com

Correspondence to: Fan Ying-zhong, Doctor, Professor, Department of Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
fanyingzhong@126.com

Received: 2010-05-10  
Accepted: 2010-06-12

Wang HJ, Fan YZ, Li LP, Zhang Z, Zhang D. Preparation of extracellular matrix of human umbilical veins. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(47): 8783-8786. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 细胞外基质的制备以去除组织中的细胞成分为目的, 目前脱细胞方法尚无统一的标准, 但是制备的细胞外基质均需证实有无细胞残留。

**目的:** 观察应用酶消化、去污剂、渗透溶液法和 TritonX-100 与氨水混合液方法制备脐静脉脱细胞基质的效果, 以探讨制备人脐静脉脱细胞基质的理想方法。

**方法:** 分别采用酶消化、去污剂、渗透溶液法和曲拉松与氨水混合液两种方法处理人脐静脉, 制备人脐静脉脱细胞基质。观察脱细胞处理前后脐静脉基质的物理性状和苏木精-伊红染色结果, 随机观察 50 个 400 倍镜像下残留细胞碎片数目。

**结果与结论:** 脐静脉经脱细胞处理后呈瓷白色半透明胶冻样管状结构。酶消化、去污剂、渗透溶液法组的人脐静脉细胞成分几乎全部去除, 细胞外基质保持完好, 纤维结构完整, 曲拉松与氨水混合液方法组有不同数量的残余细胞成分, 两组差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 酶消化、去污剂和渗透溶液法是制备人脐静脉脱细胞基质较为理想的方法。

**关键词:** 细胞外基质; 人脐静脉; 制备; 组织工程; 酶消化; 去污剂; 渗透溶液

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.47.011

王海江, 范应中, 李泸平, 张震, 张大. 人脐静脉脱细胞基质的制备[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47):8783-8786. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

尿道狭窄或缺损一直是泌尿外科面临的棘手问题, 关键是缺乏理想的替代材料。近年来, 一种组织工程材料细胞外基质在修复组织缺损中表现出良好的促再生特性。作者采用不同方法处理人脐静脉, 制备人脐静脉脱细胞基质, 为尿道组织工程研究提供较为理想的支架材料。

## 1 材料和方法

**设计:** 对比观察。

**时间及地点:** 于2008-04/06在郑州大学基

础医学院病理生理实验室完成。

### 材料:

试剂及仪器	来源
甲醛	上海溶剂厂
磷酸盐缓冲液(PBS) 粉装剂、EDTA	上海协瑞
胰蛋白酶、DNA 酶、	科技有限公司
乙二胺四乙酸	
戊二醛、叠氮钠、脱氧胆酸	郑州宝赛生物
钠、氯化钠、青霉素、链	科技有限公司
霉素、Triton X-100、氨水	
倒置显微镜(XSP-18CE)	上海长方光学仪器有限公司
恒温摇床(26~75 °C)、微孔滤	中国, 上海
膜滤菌器、电热压力蒸汽灭	
菌器(LDZX-40AI)、自动双重	
纯水蒸馏器(SZ-93)	

<sup>1</sup>深圳市第三人民医院外科, 广东省深圳市 518020; <sup>2</sup>郑州大学第一附属医院小儿外科, 河南省郑州市 450052

王海江★, 男, 1973年生, 河南省虞城县人, 汉族, 2009年郑州大学第一临床学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事组织工程方面的研究。  
Whaj2008@163.com

通讯作者: 范应中, 博士, 教授, 郑州大学第一附属医院小儿外科, 河南省郑州市 450052  
fanyingzhong@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2010)47-08783-04

收稿日期: 2010-05-10  
修回日期: 2010-06-12  
(20100421012/W·Y)

根据国务院《医疗机构管理条例》规定<sup>[1]</sup>, 经产妇同意后, 自郑州大学第一附属医院产科获得健康新生儿脐带标本。

### 实验方法:

**脐静脉脱细胞基质的制备:** 酶消化、去污剂、渗透溶液方法: 经产妇同意后自郑州大学第一附属医院产科获得脐带标本, 无菌条件下肝素盐水冲洗脐静脉, 去除残血。从脐带中分离脐静脉, 剥去血管外膜及结缔组织, 将标本于新洁尔灭溶液中浸泡30 min消毒处理, 取出后用磷酸盐缓冲液冲洗两三次。剪成3.0 cm左右的小段, 置于10 mmol PBS和0.1%叠氮钠的混合溶液中, 恒温摇床连续振荡24 h; 然后置于0.5 mmol/L EDTA和4 g/L胰蛋白酶的混合溶液中, 37 °C恒温摇床中连续振荡5 h; PBS漂洗后用体积分数为1%甲醛、2 g/L戊二醛液对组织进行交联保护10 min; 1 mol/L NaCl、40 U/mL DNA酶溶液, 37 °C恒温摇床中连续振荡8 h; 再置于40 g/L脱氧胆酸钠和1 g/L叠氮钠溶液中振荡6 h; 用大量三蒸水反复漂洗。置入含青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)两种抗生素的PBS溶液中, 4 °C冰箱内保存备用。随机切取长5 mm的标本50份作苏木精-伊红染色组织切片, 观察细胞去除情况。

**TritonX-100与氨水混合液方法:** 将消毒处理后的脐静脉标本浸泡在蒸馏水中, 置于4 °C的恒温摇床中连续振荡24~48 h, 初步溶解细胞, 去除部分细胞碎屑。再将脐静脉组织取出, 浸于1%的TritonX-100与0.1%的氨水混合液中, 4 °C恒温摇床中连续振荡72 h; 用磷酸盐缓冲液冲洗标本两三次, 随机切取长5 mm的标本50份作苏木精-伊红染色组织切片, 观察细胞去除情况。标本置入含青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)两种抗生素的PBS溶液中, 4 °C冰箱内保存备用。

**主要观察指标:** ①脱细胞处理前后脐静脉基质的物理性状观察。②脱细胞处理后脐静脉基质组织学观察。③两种方法处理的脐静脉基质行苏木精-伊红染色后, 各随机观察50个400倍镜像下残留细胞碎片数目。

**设计、实施、评估者:** 设计为第一作者, 实施为第一、三、四作者; 评估为第二、五作者, 实验参与者均受过相关专业培训。

**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS统计软件包进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 脐静脉脱细胞处理前后大体观察** 脐静脉处理前为淡红色, 管壁弹性良好, 管腔无塌陷, 内膜光滑, 见图1。倒置显微镜下细胞排列呈铺路石样, 见图2。脐静脉经脱细胞处理后呈瓷白色半透明胶冻样管状结构, 见图3。倒置显微镜下观察呈网状结构, 可见细胞脱落后留下的蜂窝状孔隙, 见图4。



Figure 1 Gross observation of umbilical veins before treatment  
图1 脐静脉处理前大体观

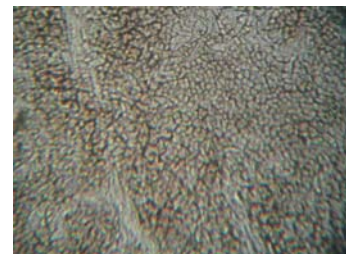


Figure 2 Inverted microscopy observation of umbilical veins before treatment (x400)  
图2 脐静脉处理前倒置显微镜下观(x400)



Figure 3 Gross observation of umbilical veins after treatment  
图3 脐静脉脱细胞处理后大体观

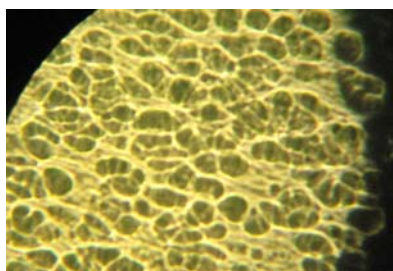


Figure 4 Inverted microscopy observation of umbilical veins after treatment  
图4 脐静脉脱细胞处理后倒置显微镜下观( $\times 400$ )

2.2 脐静脉脱细胞处理前后苏木精-伊红染色光镜观察  
处理前脐静脉苏木精-伊红染色石蜡切片中有大量蓝染的细胞核, 胶原纤维呈红色, 波浪状平行排列, 见图5。



Figure 5 Umbilical veins before treatment (Hematoxylin-eosin staining,  $\times 400$ )  
图5 脐静脉处理前(苏木精-伊红染色,  $\times 400$ )

酶消化、去污剂、渗透溶液方法组处理后的脐静脉苏木精-伊红切片几乎见不到蓝染的细胞核, 胶原纤维呈波浪状平行排列, 有许多细胞和可溶性蛋白质脱离后的间隙, 见图6。



Figure 6 Umbilical veins after treatment (Hematoxylin-eosin staining,  $\times 400$ )  
图6 脐静脉脱细胞处理后(苏木精-伊红染色,  $\times 400$ )

TritonX-100与氨水混合液方法处理后的脐静脉比前一种方法苏木精-伊红切片残留的细胞数量多, 两种方法脱细胞后脐静脉基质残留细胞数目差异有显著性意义 $[(0.88\pm 1.33)$ 个,  $(15.7\pm 4.68)$ 个,  $P < 0.05$ ]。

### 3 讨论

组织工程技术的兴起为尿道的修复与重建开辟了新的途径, 细胞外基质作为一种天然的生物衍生物材料已愈来愈成为医学界的研究热点。理想的细胞外基质替代物应具备以下性能<sup>[2-3]</sup>: ①有良好的组织相容性。②可降解性, 其降解产物对人体无害, 可吸收。③有一定力学强度, 可塑形。④能调节细胞黏附、增殖、迁移和分化, 能诱导组织再生的能力。⑤有一定空隙率。

El-Ahmed等<sup>[4]</sup>采用片状和管状的猪小肠黏膜下层两种方法进行尿道成形的动物实验结果显示, 单层的和管状的猪小肠下黏膜不适合作为替代物。Palminer等<sup>[5]</sup>报道利用猪小肠下黏膜作为补片分别从背侧、腹侧和侧面置入的方法对20例尿道狭窄的患者行尿道成形术, 认为猪小肠下黏膜可以作为尿道替代物治疗尿道狭窄。朱英坚等<sup>[6]</sup>应用猪小肠黏膜下层修复兔部分尿道缺损, 实验证明猪小肠黏膜下层对于兔尿道损伤的修复是一种有用的材料, 该基质制作简单, 在尿道的结构和功能重建方面具有良好的特性。Xie等<sup>[7]</sup>将猪颈动脉进行处理获得弹性蛋白制成补片或将管状结构在兔身上进行尿道重建。结果强调弹性蛋白材料仅可作为补片支架进行尿道修复, 但管状化的弹性蛋白不适宜用作尿道重建。实验还有应用猪膀胱黏膜下组织进行脱细胞制作支架<sup>[8]</sup>、同种及异种的膀胱脱细胞基质支架修补兔尿道缺损等<sup>[9-11]</sup>, 均取得一定的研究成果。

细胞外基质的制作方法自Meezan等<sup>[12]</sup>提出了化学除污剂法, 并以此法制作了一些脱细胞基质后, 许多新的脱细胞方法应运而生, 主要包括酶消化法、去垢剂法等。吴春根等<sup>[13]</sup>应用十二烷基硫酸钠和核酸酶联合消化人脐动脉, 制备脱细胞血管支架。光镜下对照组样品中观察到深蓝色的细胞核, 实验组细胞结构被完全破坏, 核破碎后被彻底清除, 未见核碎片, 血管壁纤维组织染成红色, 呈整齐排列。Wilson等<sup>[14]</sup>应用化学除污剂+酶联合对狗颈总动脉进行脱细胞处理, 组织学及电镜观察无细胞成分存在, 在基质中主要为胶原和弹性蛋白, 结构良好。张金明等<sup>[4]</sup>采用曲拉松与氨水混合液处理兔尿道11 d后, 尿道基质组织中未见细胞存在, 有排列规则的胶原及弹力纤维组成, 管腔光滑, 证明脱细胞尿道基质制备成功。

细胞外基质的制备以去除组织中的细胞成分为目的, 目前脱细胞方法尚无统一的标准, 但是制备的细胞外基质均需证实有无细胞残留。本研究参考文献报道分别采用酶消化、去污剂、渗透溶液法和TritonX-100与氨水混合液两种方法处理人脐静脉, 制备人脐静脉脱细胞基质, 探讨制备人脐静脉脱细胞基质的较好方法<sup>[15-19]</sup>。Triton X-100为非离子型去垢剂, 通过其上的亲水基团而

溶解细胞膜及细胞器表面结构的蛋白质, 并且清除磷脂类物质, 从而达到清除血管壁细胞成分的目的。

本实验结果显示该法脱细胞效果不理想, 基质中有较多的细胞残留。酶消化、去污剂、渗透溶液方法组采用几种方法联合处理脐静脉, 脱细胞效果较为理想, 细胞外基质苏木精-伊红染色光镜下观察50例, 30例未见细胞残留, 其余20例只有较少细胞。本方法首先使用包括低渗10 mmol/L的PBS和高渗的1 mol/L NaCl处理脐静脉, 利用渗透压的变化使细胞膜破裂, 细胞从基质上分离而达到脱细胞的目的。然后采用酶消化法对材料进行处理, 使脱细胞更加充分。低浓度的胰蛋白酶能够破坏组织的细胞膜和细胞器结构, 使细胞完全裂解, 细胞内的成分完全释放出来并使细胞与基质分离, 达到脱细胞的目的。但对基质中的胶原蛋白和弹性蛋白结构并不造成破坏, 保持基质的完整性。再使用DNA酶消化处理组织内的核酸成分, 使细胞组织进一步脱落。最后使用去污剂脱氧胆酸钠, 能溶解残余细胞膜的双层脂质结构和残余的细胞内脂质成分。并且在制备的3个步骤中采用振荡搅拌机械的方法使细胞更容易脱落, 用大量的PBS液漂洗, 更有利于深层的细胞破坏脱出并随同细胞碎屑冲洗到溶液中去。在制备过程中, 戊二醛和甲醛的加入起到不可低估的作用。戊二醛和甲醛对组织进行交联保护, 增加细胞外基质的强度, 延长其体内降解时间, 保证足够的机械性能。使制备的脐静脉脱细胞基质富有弹性和韧性。

实验采用人脐静脉进行研究, 避免了异种细胞外基质存在的一些不足。异种细胞外基质虽然去除了细胞的成分, 但是仍含有少量的异种抗原<sup>[20]</sup>, 在动物源性疾病传播上, 存在着一定的风险。而人脐静脉细胞外基质, 生物性能更接近人体, 免疫原性进一步降低, 管径与小儿的尿道接近, 更适用于小儿尿道的组织重建。并且脐带来源丰富, 没有创伤。实验结果证明, 使用酶消化、去污剂、渗透溶液方法制备的细胞外基质, 细胞基本被彻底清除, 胶原纤维、弹性纤维排列正常, 结构完整。因此, 人脐静脉细胞外基质作为同种尿道支架, 不失为组织工程化尿道提供了一种良好的生物支架材料, 为进一步的研究打下了基础。

#### 4 参考文献

- [1] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01. 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.
- [2] Zheng JM, GU HQ, Touxi yu Rengong Qiguan. 2003;1(4): 36-39. 郑建明, 顾汉卿. 天然细胞外基质及其在泌尿外科组织工程和再生医学中的应用与发展[J]. 透析与人工器官, 2003,1(4): 36-39.
- [3] Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, et al. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. Ann Thorac Surg. 1999;68(6):2298-2304.
- [4] El-Assmy A, El-Hamid MA, Hafez AT. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. BJU Int. 2004;94: 1132-1135.
- [5] Palminteri E, Berdondini E, Colombo F, et al. Small intestinal submucosa (SIS) graft urethroplasty: short term results. Eur Urol. 2007;51: 1695-1701.

- [6] Zhu YJ, Lu MJ, Liu GH, et al. Linchuang Erke Zazhi. 2009;(02) 172-175. 朱英坚, 卢慕峻, 刘国华, 等. 应用猪小肠粘膜下层进行兔尿道缺损修补的研究[J]. 临床儿科杂志, 2009,(02) 172-175.
- [7] Xie H, Campbell CE, Shaffer BS, et al. Different outcomes in urethral reconstruction using elastin and collagen patches and conduits in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;81(1): 269-273.
- [8] Fu Q, Deng CL, Liu W, et al. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. BJU Int. 2007; 99(5):1162-1165.
- [9] Barbagli G, Lazzeri M. Urethral reconstruction. Curr Opin Urol. 2006; 16(6):391-195.
- [10] Chen F-Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "of the shelf" biomaterial for urethra repair. Urology. 1999;54(3): 407-410.
- [11] Sievert K, Bakircioglu M, Nunes L, et al. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation J Urol. 2000;163: 1958-1965.
- [12] Meezan E, Hjele JT, Brendel K. A simple versatile nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. Life Sic. 1975;17(11): 1721-1732.
- [13] Wu CG, Fang NT, Pan LF. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;26(11): 2082-2085. 吴春根, 方宁涛, 潘鸾凤. 人脐动脉脱细胞支架的制备及其生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,26(11): 2082-2085.
- [14] Wilson GJ, Yeger H, Klement P, et al. Acellular matrix allograft small caliber vascular prostheses. ASAIO Trans. 1990;36(3):M340-343.
- [15] Zhang JM, Cui YY, Xu LS. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2005;9(42): 48-49. 张金明, 崔永言, 徐路生. 兔脱细胞尿道基质制备的可行性[J]. 中国临床康复. 2005,9(42):48-49.
- [16] Sievert KD, Bakircioglu ME, Nunes LK, et al. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and function evaluation. J Urol. 2000;163:1958-1965.
- [17] Paru igotto PP, Gamba PG, Conconi MT, et al. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. Urol Res. 2000; 28: 46-51.
- [18] Merquerian PA, Reddy PP, Barrieras DJ, et al. Acellular bladder matrix allograft in the regeneration of functional bladder: evaluation of large segment (>24 cm) substitution in porcine model. Br J Urol. 2000; 85:894-898.
- [19] Yang SX, Song C, Wang LL. Zhonghua Miniao Waikexue Zazhi. 2003; 24(8):555-557. 杨嗣星, 宋超, 王玲瓏. 尿道细胞外基质的研制[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(8):555-557.
- [20] Ketchedian A, Kreuger P, Lukoff H, et al. Ovine panel reactive antibody assay of HLA responsiveness to allograft bioengineered vascular scaffolds. J Thorac Cardiovasc Surg. 2005;129(1):159-166.

#### 来自本文课题的更多信息——

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的意义:** 人脐带来源人类, 并且取材没有创伤, 人脐静脉脱细胞基质应用于临床, 避免了异种细胞外基质存在的一些不足, 生物性能更接近人体, 免疫原性进一步降低, 管径与小儿的尿道接近, 更适用于小儿尿道的组织重建。

**课题评估的“金标准”:** 细胞外基质的制备以去除组织中的细胞成分为目的, 目前脱细胞方法尚无统一的标准, 但是制备的细胞外基质均需证实有无细胞残留。

**课题的偏倚与不足:** 酶消化、去污剂、渗透溶液法处理人脐静脉, 制备人脐静脉脱细胞基质, 仍不能保证完全脱细胞, 同时对细胞外基质的活性成分造成一定的破坏, 细胞外基质的交联保护及制作的过程仍需进一步完善。

**提供临床借鉴的价值:** 人脐静脉管腔与小儿尿道内径相似, 不需要再缝制成管状, 组织来源丰富, 与临床上目前应用自体皮肤修复缺损相比, 可以大大降低远期的结石形成和毛囊分泌而致感染等并发症的发生率。因来源于人体, 可以避免异种组织移植所带来的风险。并且人脐静脉组织易于获得, 不涉及伦理问题; 其细胞外基质容易制备, 易于保存, 手术方式简化, 创伤小, 修复快。随着进一步研究, 人脐静脉脱细胞基质有望成为小儿尿道成形重建的良好支架材料。