

脱细胞基质材料体外激活巨噬细胞的作用

徐斌^{1,2}, 黄秀艳¹, 韦晓慧², 曾耀英¹ (暨南大学生命科学技术学院免疫生物学系, 广东省广州市 510632; ²广东冠昊生物科技股份有限公司, 再生型医用植入器械国家工程实验室, 广东省广州市 510530)

文章亮点:

1 国家标准采用浸提液和细胞株共培养来检测材料对细胞的毒性, 而本实验采用材料与原代腹腔巨噬细胞共培养检测材料对细胞的毒性, 原代细胞未被活化或增殖, 从而可将材料对细胞的毒性更加敏感地显现出来, 方法更具灵敏性。

2 实验中将脱细胞基质材料置于 Transwell 小室上室, 腹腔巨噬细胞接种于下室, 上下两室的培养液都能通过聚碳酸酯膜相互交换, 从而可以观察在非接触状态下脱细胞基质材料对巨噬细胞的影响。另外, 实验也选用了脱细胞基质材料置于下室, 与下室中已经贴壁好的巨噬细胞直接接触共培养, 这就更能反映脱细胞基质材料作用于巨噬细胞后, 脱细胞基质材料对巨噬细胞分泌一氧化氮和细胞因子的影响的程度, 评估了脱细胞基质材料的细胞毒性。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 细胞外基质; 免疫原性; 巨噬细胞; 细胞因子; 炎症

主题词:

细胞外基质; 炎症; 巨噬细胞; 组织工程

基金资助:

广东省重大科技专项再生医学材料共性关键技术研究(2010A080407005)

摘要

背景: 因巨噬细胞在机体炎症反应中有着举足轻重的作用, 所以检测生物材料对巨噬细胞行为的影响, 可评估材料的免疫原性。

目的: 分析脱细胞基质材料对巨噬细胞的激活作用。

方法: 获取 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞, 分 5 组培养: 对照组为单纯细胞培养组; 实验 1 组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验 2 组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验 3 组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞间接接触培养, 实验 4 组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞间接接触培养。培养 48 h 后, MTT 法检测各组 A 值, 判定毒性分级; 培养 24 h 后, 检测细胞培养上清中一氧化氮及细胞因子的分泌。

结果与结论: 实验 1-4 组毒性分别为 2 级、4 级、0 级及 2 级。实验 1 组、实验 2 组一氧化氮水平高于对照组 ($P < 0.05$), 并且实验 2 组高于实验 1 组 ($P < 0.05$)。5 组间白细胞介素 2、白细胞介素 4、干扰素 γ 、白细胞介素 17A 和白细胞介素 10 水平比较差异无显著性意义; 实验 2 组白细胞介素 6 水平高于对照组 ($P < 0.05$); 实验 1 组、实验 2 组、实验 4 组肿瘤坏死因子水平高于对照组 ($P < 0.05$), 并且实验 2 组高于实验 1 组 ($P < 0.05$), 实验 1 组高于实验 4 组 ($P < 0.05$)。说明脱细胞基质材料可在直接接触时激活巨噬细胞。

徐斌, 黄秀艳, 韦晓慧, 曾耀英. 脱细胞基质材料体外激活巨噬细胞的作用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(47):7687-7692.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.47.026

In vitro activation of macrophages by decellularized extracellular matrix materials

Xu Bin^{1,2}, Huang Xiu-yan¹, Wei Xiao-hui², Zeng Yao-ying¹ (¹Department of Immune Biology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; ²Grandhope Biotech Co., Ltd., National Engineering Laboratory for Regenerative Implantable Medical Devices, Guangzhou 510530, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Because macrophages play an important role in the body's inflammatory response, the detection of the impact of biological materials on the behavior of macrophages can assess the immunogenicity of materials.

OBJECTIVE: To analyze the activation effect of decellularized extracellular matrix materials on macrophages.

METHODS: The peritoneal macrophages of BALB/c mouse were obtained and cultured by dividing into five groups. Control group was simple cell culture group, experimental group 1 was acellular matrix membrane material directly contacting with macrophage for culture, experimental group 2 was fresh pericardial material directly contacting with the macrophage for culture, experimental group 3 was acellular matrix membrane material indirectly contacting with macrophages for culture, experimental group 4 was fresh pericardium material

徐斌, 男, 1970 年生, 广东省防城港市人, 汉族, 暨南大学在读博士, 主要从事生物材料及人工器官研究工作。

通讯作者: 曾耀英, 教授, 研究员, 暨南大学生命科学技术学院免疫生物学系, 广东省广州市 510632

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)47-07687-06

稿件接受: 2015-09-24

http://www.crter.org

Xu Bin, Studying for doctorate, Department of Immune Biology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; Grandhope Biotech Co., Ltd., National Engineering Laboratory for Regenerative Implantable Medical Devices, Guangzhou 510530, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zeng Yao-ying, Professor, Researcher, Department of Immune Biology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-09-24

indirectly contacting with macrophages for culture. After 24 hours of culture, the secretion of nitric oxide and cytokines in cell culture supernatant was determined. After 48 hours of culture, the absorbance value was determined by MTT method and the toxicity grading was determined.

RESULTS AND CONCLUSION: The toxicity grading in experimental groups 1–4 was respectively grades 2, 4, 0, 2. The nitric oxide level in experimental groups 1 and 2 was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the nitric oxide level in the experimental group 2 was higher than that in the experimental group 1 ($P < 0.05$). There were no significant differences in interleukin-2, interleukin-4, interferon γ , interleukin-17A and interleukin-10 levels between these five groups. The interleukin-6 level in the experimental group 2 was higher than that in the control group ($P < 0.05$); The expression levels of tumor necrosis factors in experimental group 1, 2 and 4 were higher than those in the control group ($P < 0.05$), and experimental group 2 higher than the experimental group 1 ($P < 0.05$), experimental group 1 higher than the experimental group 4 ($P < 0.05$). These results show that acellular matrix material can activate macrophages in direct contact.

Subject headings: Extracellular Matrix; Inflammation; Macrophages; Tissue Engineering

Funding: a grant of Regenerative Medicine Materials Common Key Technology Research of Major Science and Technology Projects of Guangdong Province, China, No. 2010A080407005

Xu B, Huang XY, Wei XH, Zeng YY. In vitro activation of macrophages by decellularized extracellular matrix materials. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(47):7687-7692.

0 引言 Introduction

巨噬细胞是炎症的主要操纵者，也是炎症的放大器，将炎症递质和炎症信号播散到局部乃至全身。巨噬细胞是一群异质性很高的细胞，几乎分布于所有组织，因组织定位而名称各异。概括起来，巨噬细胞的功能大概有以下5个方面^[1-3]：①通过Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)等受体感受外源病原生物和内源危险信号。②炎症应答启动器。③通过吞噬清除病原体。④操控适应性免疫应答。⑤在组织损伤修复中有重要作用。感受器功能是其功能的前提和基础，而后面4点是巨噬细胞的效应功能。在早期有关巨噬细胞极化的研究中，将巨噬细胞的活化模式分为M1和M2^[4-7]，后来人们认为M1和M2的分型过于简单，故把巨噬细胞的极化分为3种模式，即“传统活化巨噬细胞”、“组织愈合巨噬细胞”和“调节性巨噬细胞”。显然，后者的分类较前者更进了一步。其实，不管哪种分类，都离不开对巨噬细胞效应功能的强调，也就是所谓“极化”。正因为巨噬细胞在机体炎症反应中有着举足轻重的作用，因此，本实验将脱细胞基质材料对巨噬细胞行为的影响纳入其免疫原性评价体系中^[8-19]，包括脱细胞基质材料对巨噬细胞的毒性作用及其对巨噬细胞分泌一氧化氮、细胞因子的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2010年3月至2015年5月在暨南大学生命科学技术学院免疫生物学系实验室设计与完成。

1.3 材料

实验动物: 8–10周龄清洁级BALB/c小鼠，雌雄不拘，体质量(25±3) g，购自广东省动物医学实验中心，许可证号：SCXK(粤)：2008-0002。

1.4 方法

新鲜膜材料的制备: 取牛心包膜材料，经⁶⁰Co照射灭菌。将新鲜膜材料剪成均匀大小，以便放于24孔培养板或Transwell上层小室。

脱细胞基质材料体外激活巨噬细胞实验用材料、试剂与仪器：

材料、试剂与仪器	来源
脱细胞基质膜材料	广东冠昊生物科技股份有限公司，经过专利技术US patent, #6106555特殊处理
DMEM/LOW培养基、PBS、胎牛血清、 β -二巯基乙醇、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素、HEPES、非必需氨基酸、丙酮酸钠	美国GIBCO公司
脂多糖、离心机(3-16K)	美国Sigma公司
CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit、0.5/1.0/15/50 mL离心管、流式管12 mm×75 mm、8.0 μ m cell culture inserts	美国BD-Pharmingen公司
Griess Reagent Kit	美国Promega公司
流式细胞仪FACS Canto II	美国Becton Dickinson公司
超净工作台SW-CJ-IF型	新加坡ESCO 公司
倒置显微镜	中国重庆光学仪器厂
酶标仪	美国BioTek公司
CO ₂ 细胞培养箱	美国Thermo公司
细胞培养板96/24/6孔	美国Corning公司

脱细胞基质膜材料的制备: 在传统工艺的基础上添加了磷酸二酯酶。将脱细胞基质材料剪成均匀大小，以便放于24孔培养板或Transwell上层小室。

小鼠腹腔巨噬细胞的获取: 眼球放血处死BALB/c小鼠，以体积分数75%乙醇中浸泡1 min消毒，乙醇棉球擦拭皮肤，沿腹中线剪开皮肤并向身体两侧撕扯至露出腹膜，用无菌眼科镊轻轻提起暴露的腹膜，用无菌注射器吸取3 mL DMEM/LOW无血清基础培养基，轻轻地注射到小鼠腹腔内，轻柔5 min，用无菌眼科剪在腹膜右侧剪开一小口，小心吸取腹腔细胞，收集到15 mL 离心管中，冷PBS洗1次(4 $^{\circ}$ C、1 500 r/min离心5 min)，DMEM/LOW无血清基础培养基重悬细胞，调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。将上述细胞悬液接种于24孔培养板中，每孔1 mL，于37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂

培养箱中孵育过夜。24 h 后, 轻轻吸取丢掉含有未贴壁细胞的上清, 并用DMEM/LOW无血清基础培养基轻轻洗涤3次, 剩下的贴壁细胞即为巨噬细胞, 用巨噬细胞标记物F4/80抗体染色鉴定纯度, 此种方法得到的巨噬细胞纯度(F4/80⁺细胞比例)>90%, 可用于以下实验。

小鼠腹腔巨噬细胞的培养: 以DMEM/LOW无血清基础培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种于24孔板, 24 h 后轻轻吸取丢掉含有未贴壁细胞的上清, 并用DMEM/LOW无血清基础培养基轻轻洗涤3次, 将Transwell小室放入24孔平底细胞培养板, 在Transwell小室与24孔平底细胞培养板每孔中分别加入1 mL新鲜的DMEM/LOW完全培养基, 分组培养: 对照组下室中不加入任何物质, 实验1组在24孔平底细胞培养板中加入脱细胞基质材料, 实验2组在24孔平底细胞培养板中加入新鲜心包膜材料, 实验3组在Transwell小室中加入脱细胞基质材料, 实验4组在Transwell小室中加入新鲜心包膜材料。每组3个复孔, 放置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养。

1.5 主要观察指标

MTT检测细胞增殖: 培养48 h后移除Transwell小室, 向培养板孔中加入200 μL 5 g/L的MTT溶液, 在培养箱中继续避光培养4 h, 300 $\times\text{g}$ 离心5 min, 吸掉上清, 加入100 μL DMSO, 室温避光振荡10 min, 以充分溶解孔内的紫色结晶, 在酶标仪用490 nm波长处检测各孔的吸光度(A_{490} 值), 并计算细胞相对增殖率, 评估细胞毒性。细胞相对增殖率(%)=实验组 A_{490} 值/对照组 A_{490} 值 $\times 100\%$ 。当细胞相对增殖率 $\geq 100\%$ 时, 毒性为0级; 在80%–99%之间, 为1级; 在50%–79%之间, 为2级; 在30%–49%之间, 为3级; 在0–29%之间, 为4级。实验结果0或1级反应为合格; 为2级反应的, 应结合细胞形态分析, 综合评价; 3至4级反应为不合格。

Griess法检测巨噬细胞培养上清中一氧化氮的分泌: 培养24 h 后, 收集细胞培养上清, 用于一氧化氮的检测。先把Griess试剂盒平衡至室温15–30 min, 并按照该试剂盒的说明书稀释不同浓度的标准品, 即各浓度梯度的标准品为(0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$), 并取各浓度的标准品50 μL 和培养上清50 μL 分别加入到96孔平底酶标板中, 再加入50 μL Griess试剂A, 室温避光反应8–10 min, 然后加入50 μL Griess试剂B, 室温避光反应8–10 min, 混匀, 在30 min内用酶标仪在540 nm波长处检测各孔的吸光度(A_{540}), 用标准品的浓度与对应的 $A_{540 \text{ nm}}$ 数值绘制标准曲线, 计算其直线回归方程式为: $Y=0.0033X+0.0777$, $R^2=0.9994$, 其中Y为NO浓度($\mu\text{mol/L}$), X为对应的 $A_{540 \text{ nm}}$ 数值。将不同样本的 $A_{540 \text{ nm}}$ 吸光度(X值)代入回归方程即可得出待测培养上清中一氧化氮浓度。

流式CBA法检测巨噬细胞培养上清中细胞因子的分泌: 培养24 h后, 收集细胞培养上清, 用于细胞因子的检测。用BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/ Th17

Cytokine Kit, 通过流式细胞仪检测白细胞介素2、白细胞介素4、白细胞介素6、干扰素 γ 、肿瘤坏死因子、白细胞介素17A和白细胞介素10, 具体操作过程如下: 将试剂盒放置于室温平衡30 min左右; 标准品配制, 按照说明书用适量的Assay Diluent溶解标准品的冻干粉, 制备成5 000 ng/L的起始质量浓度, 用Assay Diluent系列稀释标准品, 最终得到5 000, 2 500, 1 250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 0 ng/L的标准品; 混合Capture Beads, 10 $\mu\text{L}/\text{test}$, 即标准品数加上样本数乘以10 μL , 就是吸取每种细胞因子的体积数, 混匀, 然后吸取50 μL 的Capture Bead到标记好的流式管中; 在相应的流式管中加50 μL 的标准品或待测培养上清; 向各流式管中加入50 μL 的PE Detection Reagent; 均匀, 室温, 避光孵育2 h; 用1 mL Wash Buffer (100 $\times\text{g}$ 离心5 min)洗涤一次; 用300 μL Wash Buffer重悬后, 待测。取50 μL Setup Beads于流式管中, 再加入450 μL Wash Buffer, 校正仪器参数; 流式细胞仪(BD FACSCanto II)获取数据; 用FCAP Array v 1.0软件获得标准曲线和计算样本浓度。

1.6 统计学分析 获得的结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, n 为样本量。统计作图软件用GraphPad Prism 5。统计方法用one-way t 检验, $P < 0.05$ 时为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 脱细胞基质材料对巨噬细胞的毒性 实验1组对细胞均有一定的毒性, 而实验3组对细胞无明显毒性, 说明脱细胞基质材料对巨噬细胞的毒性是由材料表面的附着物造成的, 而且这些物质不会释放到培养液中, 因为实验3组未显示出明显的毒性; 然而, 实验2组和实验4组对巨噬细胞均有一定的毒性, 说明新鲜心包膜材料的毒性物质可以释放到培养液中, 见表1。

表1 脱细胞基质膜材料或新鲜心包膜材料与腹腔巨噬细胞共培养48 h后对细胞的毒性评级

Table 1 Cytotoxicity rating after the acellular matrix membrane material or fresh pericardium material co-cultured with peritoneal macrophages for 48 hours

组别	A 值($\bar{x} \pm s$)	细胞相对增殖率(%)	毒性评级
对照组	1.312 \pm 0.034		
实验1组	0.743 \pm 0.024	56.63	2级
实验2组	0.236 \pm 0.017	17.99	4级
实验3组	1.320 \pm 0.020	100.61	0级
实验4组	0.784 \pm 0.056	59.76	2级

表注: 对照组为单纯细胞培养组; 实验1组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验2组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验3组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞间接接触培养, 实验4组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞间接接触培养。

2.2 脱细胞基质材料与腹腔巨噬细胞共培养后的一氧化氮分泌 对照组、实验1组、实验2组、实验3组与实验4组的一氧化氮浓度分别为(1.90 \pm 0.03), (8.74 \pm 0.47), (34.38 \pm 0.89), (1.24 \pm 0.23), (3.11 \pm 0.11) $\mu\text{mol/L}$, 见图1。

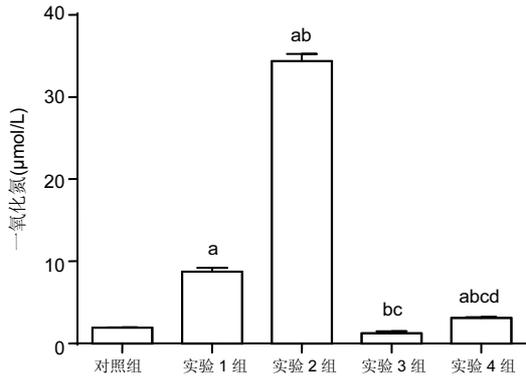


图 1 脱细胞基质材料或新鲜心包膜材料与腹腔巨噬细胞共培养后分泌一氧化氮浓度的比较

Figure 1 Comparison of the concentration of nitric oxide secreted after acellular matrix membrane material or fresh pericardium materials co-cultured with peritoneal macrophages

图注: 对照组为单纯细胞培养组; 实验 1 组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验 2 组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验 3 组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞间接接触培养, 实验 4 组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞间接接触培养。与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与实验 1 组比较, ^b $P < 0.01$; 与实验 2 组比较, ^c $P < 0.01$; 与实验 3 组比较, ^d $P < 0.01$ 。

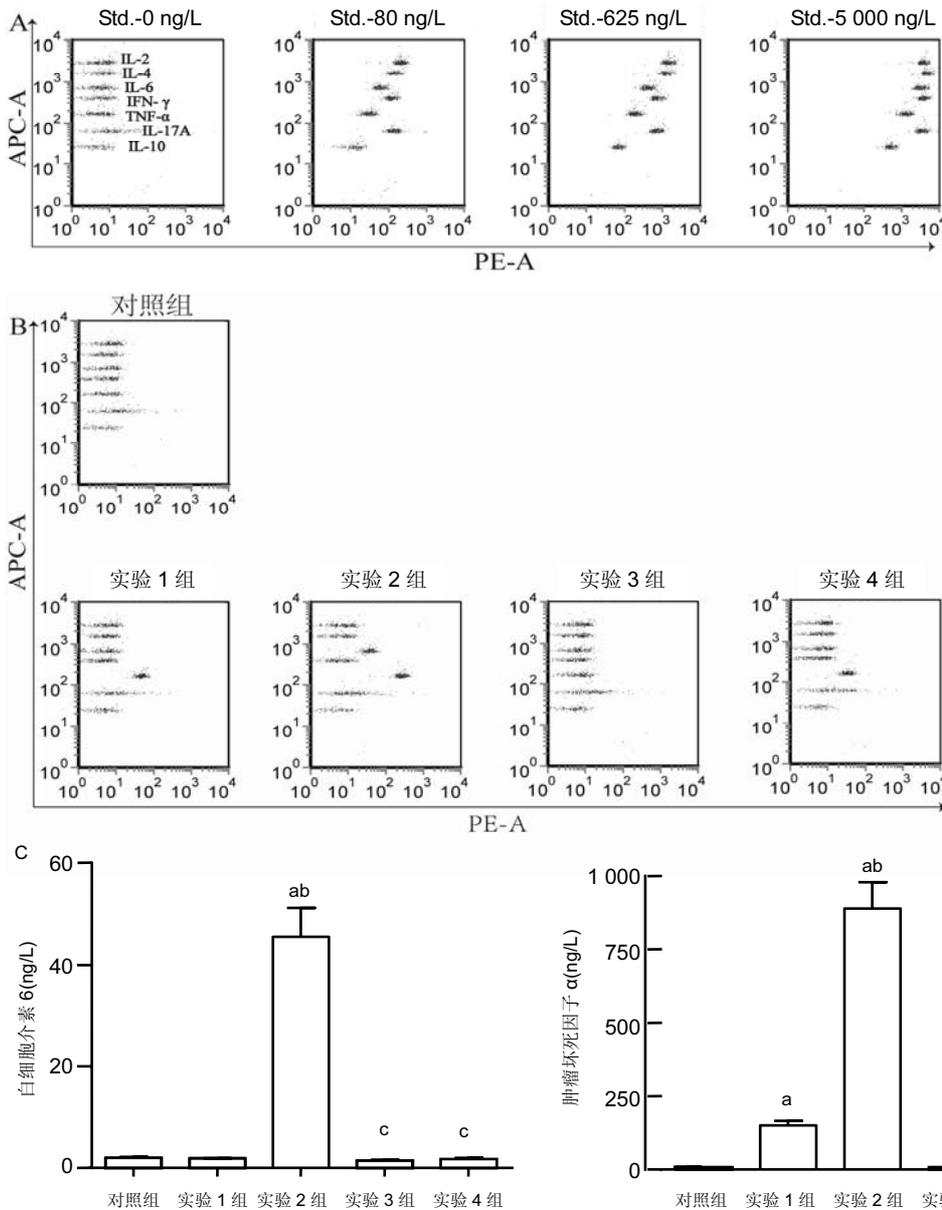


图 2 脱细胞基质材料或新鲜心包膜材料与腹腔巨噬细胞共培养后分泌细胞因子浓度的比较

Figure 2 Comparison of the concentration of cytokines secreted after acellular matrix membrane material or fresh pericardium materials co-cultured with peritoneal macrophages

图注: 图中 A 为 4 个浓度标准品的 CBA 流式示意图(0, 80, 625, 5000 ng/L); B 为 5 组细胞培养上清的 CBA 流式示意图; C 为白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平统计图。对照组为单纯细胞培养组; 实验 1 组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验 2 组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞直接接触培养, 实验 3 组为脱细胞基质膜材料与巨噬细胞间接接触培养, 实验 4 组为新鲜心包膜材料与巨噬细胞间接接触培养。与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与实验 1 组比较, ^b $P < 0.01$; 与实验 2 组比较, ^c $P < 0.01$; 与实验 3 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

与对照组比较, 实验1组、实验2组、实验4组会刺激巨噬细胞产生一氧化氮($P < 0.01$), 而实验3组不会刺激巨噬细胞产生一氧化氮($P > 0.05$); 与实验2组比较, 实验1组、实验4组刺激巨噬细胞产生的一氧化氮明显减少($P < 0.01$); 材料直接接触组分泌的一氧化氮水平高于相应的材料间接接触组($P < 0.01$), 说明材料表面的附着物不易溶于培养液中。

2.3 脱细胞基质材料对腹腔巨噬细胞分泌细胞因子的影响 见图2。

白细胞介素2、白细胞介素4、干扰素 γ 、白细胞介素17A和白细胞介素10: 从图2可以看出, 两种材料对巨噬细胞分泌白细胞介素2、白细胞介素4、干扰素 γ 、白细胞介素17A和白细胞介素10无显著影响。

白细胞介素6: 对照组、实验1组、实验2组、实验3组与实验4组的白细胞介素6质量浓度分别为(1.98 ± 1.15), (1.91 ± 1.23), (44.56 ± 2.52), (1.49 ± 1.34), (1.85 ± 1.08) ng/L。与对照组比较, 实验1组、实验3组、实验4组未刺激巨噬细胞产生白细胞介素6($P > 0.05$), 而实验2组会刺激巨噬细胞产生大量的白细胞介素6($P < 0.01$); 与实验2组比较, 实验1组分泌的白细胞介素6质量浓度显著减少($P < 0.01$)。

肿瘤坏死因子 α : 对照组、实验1组、实验2组、实验3组与实验4组肿瘤坏死因子 α 质量浓度分别为(8.23 ± 32.23), (150.77 ± 25.35), (889.26 ± 34.43), (7.96 ± 18.75), (90.24 ± 25.98) ng/L。与对照组比较, 实验1组、实验2组、实验4组会刺激巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 α ($P < 0.01$), 而实验3组不会刺激巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 α ($P > 0.05$); 实验1组肿瘤坏死因子 α 质量浓度高于实验3组($P < 0.01$), 实验2组肿瘤坏死因子 α 质量浓度高于实验4组($P < 0.01$); 实验1组肿瘤坏死因子 α 质量浓度低于实验2组($P < 0.01$), 却高于实验4组($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

巨噬细胞作为重要的炎症反应介导细胞^[20-28], 它的激活会分泌大量炎症因子, 包括一氧化氮和细胞因子, 这些炎症因子会通过自分泌作用于巨噬细胞自身或作用于其他细胞(包括免疫细胞, 血管内皮细胞, 上皮细胞等), 多细胞共同参与放大炎症级联反应。此外, 巨噬细胞作为重要的专业抗原提呈细胞, 它的激活会上调很多协同刺激分子, 辅助T细胞识别抗原。因此, 拟系统性评价脱细胞基质材料的免疫原性, 首先应检测脱细胞基质材料对巨噬细胞的刺激作用。

本实验采用贴壁法获得高纯度的小鼠腹腔巨噬细胞, 研究在Transwell小室环境条件下脱细胞基质材料直接或间接共培养时对巨噬细胞功能的影响及其差异。Transwell膜为聚碳脂膜, 膜上有孔, 孔径为8 μm , 这样使得整片脱细胞基质材料不与培养板板底的巨噬细胞直接接触, 又能让生物大分子自由通过膜的微孔。实验中将脱细胞基质材料置于上室, 腹腔巨噬细胞接种于下室, 上下两室的培养液都能通过聚碳脂膜相互交换, 从而可以观察在

非接触状态下脱细胞基质材料对巨噬细胞的影响。另外, 本实验也选用了脱细胞基质材料置于下室, 与下室中已经贴壁好的巨噬细胞直接接触共培养, 这就更能反映脱细胞基质材料作用于巨噬细胞后, 脱细胞基质材料对巨噬细胞分泌一氧化氮和细胞因子的影响的程度, 评估了脱细胞基质材料的细胞毒性, 较国标里采用浸提液方式进行细胞毒性实验进行了更深层次的分析。

本实验结果显示, 新鲜心包膜材料与巨噬细胞直接接触可显示出明显的细胞毒, 而脱细胞基质材料的细胞毒性明显小于新鲜心包膜材料; 通过对比材料直接接触和间接接触的毒性大小差异, 发现材料直接接触产生的毒性明显高于间接接触, 说明材料表面附着的毒性物质不易溶于培养液。另外, 尽管新鲜心包膜材料可以在一定程度上引发巨噬细胞死亡, 但还是能够很显著的刺激巨噬细胞分泌一氧化氮、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α , 其中一氧化氮是巨噬细胞合成用来杀灭入侵微生物的活性分子, 但有研究表明一氧化氮可以引起炎症灶的其他细胞凋亡; 而白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 作为重要的炎症细胞因子, 不仅仅参与损伤和感染, 而且还具有调制修复、代谢、再生和造血等生物活性。因此仅凭体外实验, 无法确认脱细胞基质材料引起这些物质的释放是有利还是有害, 如果这种应答是可控或者自限性的, 可能不会造成严重后果甚至可能是有益的, 原因是组织修复过程是一个低度的自限性炎症过程。

另外, 由于脱细胞基质材料是不可溶的物质, 当巨噬细胞贴壁好之后再与脱细胞基质材料共培养时, 在一定时间内培养液是否可以充分透过膜材料而给细胞提供足够的营养, 脱细胞基质材料与细胞直接接触共培养时的激活作用部分原因是否是由于材料对细胞的物理因素引起的呢? 还需进一步研究以明确一氧化氮和细胞因子的作用机制和影响时间, 下一步的研究计划是将脱细胞基质材料植入实验动物体内, 对模型动物的免疫状态进行长期的观察与评估, 为最终的临床应用打下基础。

致谢: 向暨南大学生命科学技术学院免疫生物学系的老师和同学表示感谢。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为第四作者, 评估者经过正规培训。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学要求。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 巨噬细胞的功能? 巨噬细胞是一种位于组织内的白血球, 源自单核细胞, 而单核细胞又来源于骨髓中的前体细胞。巨噬细胞和单核细胞皆为吞噬细胞, 在脊椎动物体内参与非特异性防卫(先天性免疫)和特异性防卫(细胞免疫)。它们的主要功能是

以固定细胞或游离细胞的形式对细胞残片及病原体进行噬菌作用(即吞噬及消化),并激活淋巴细胞或其他免疫细胞,令其对病原体作出反应。

作者声明: 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Liu VW,Huang PL.Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice.*Cardiovasc Rev.*2008;77(1):19-29.
- [2] Ray A, Dittel BN.Isolation of mouse peritoneal cavity cells.*J Vis Exp.*2010; (35):1488.
- [3] Malaviya R,Gow AJ,Francis M,et al.Radiation-induced lung injury and inflammation in mice: role of inducible nitric oxide synthase and surfactant protein D.*Toxicol Sci.* 2015;144(1): 27-38.
- [4] Hidalgo LG,Halloran PF.Role of IFN-gamma in allograft rejection.*Crit Rev Immunol.*2002;22(4):317-349.
- [5] Dejager L,Dendoncker K,Eggermont M,et al.Neutralizing TNF α restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation.*Mucosal Immunol.*2015.doi: 10.1038/mi.2015.12.
- [6] Arnold CE,Gordon P,Barker RN,et al.The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. *Immunobiology.* 2015;220(1): 10-19.
- [7] Farage MA,Miller KW,Elsner P,et al.Maibach characteristics of the aging skin.*Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(1): 5-10.
- [8] 崔福斋,冯庆玲.生物材料学[M].北京:清华大学出版社, 2004: 261-277.
- [9] 姚康德,尹玉姬.组织工程相关生物材料[M].北京:化学工业出版社,2003:255-256.
- [10] 王身国,杨健,蔡晴,等.组织工程用生物材料及细胞支架研究进展[J].*中华整形外科杂志*,2000,16(6):328-330.
- [11] Saboo S, Ouyang H,Tay JTE.Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering.*Tissue Eng.*2006;1(12):91-99.
- [12] 生物材料和医疗器材生物学评价技术要求.卫生部药政管理局, 1997.
- [13] 医疗器械和材料生物相容性评价.国家药品监督管理局医疗器械司,2001.
- [14] 郝和平. 医疗器械生物学评价标准实施指南[M]. 北京:中国标准出版社,2000:102, 285-295, 334-347.
- [15] Radulovic K,Niess JH.CD69 Is the Crucial Regulator of Intestinal Inflammation: A New Target Molecule for IBD Treatment? *J Immunol Res.*2015. doi: 10.1155/2015/497056.
- [16] Kasahara DI, Kim HY, Mathews JA, et al. Pivotal role of IL-6 in the hyperinflammatory responses to subacute ozone in adiponectin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(6):L508-520.
- [17] Ju JM, Lee H, Oh K, et al. Kinetics of IFN- γ and IL-17 Production by CD4 and CD8 T Cells during Acute Graft-versus-Host Disease. *Immune Netw.*2014;14(2):89-99.
- [18] 闻学雷,张彩霞,刘晓亮,等.生物材料体内外试验相关性研究—体外白细胞趋化试验与体内肌肉埋植试验的相关性探讨[J].*生物医学工程学杂志*,1999,16(3):15.
- [19] GB/T16886.1-2001/ISO 10993-1:1997, 医疗器械生物学评价-第1部分:评价与实验[S].
- [20] 步宏,王华,魏启欧,等.异种移植与中国地方猪种资源的利用[J].*中国修复重建外科杂志*, 2000,4(2):115.
- [21] Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2014;15(12):802-812.
- [22] Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(12):786-801.
- [23] Fu RH, Wang YC, Liu SP. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant.* 2014;23 (4-5): 621-630.
- [24] Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell.* 2014;54(2): 289-296.
- [25] Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.*2013; 38(5):855-869.
- [26] Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, et al. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol.*2014;14(8):521-528.
- [27] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011; 32(12):3233-3243.
- [28] 曹正国,李成章.常用蛋白交联方法及其对胶原的影响[J].*国外医学:生物医学工程分册*,2001,24(4):187-191.