

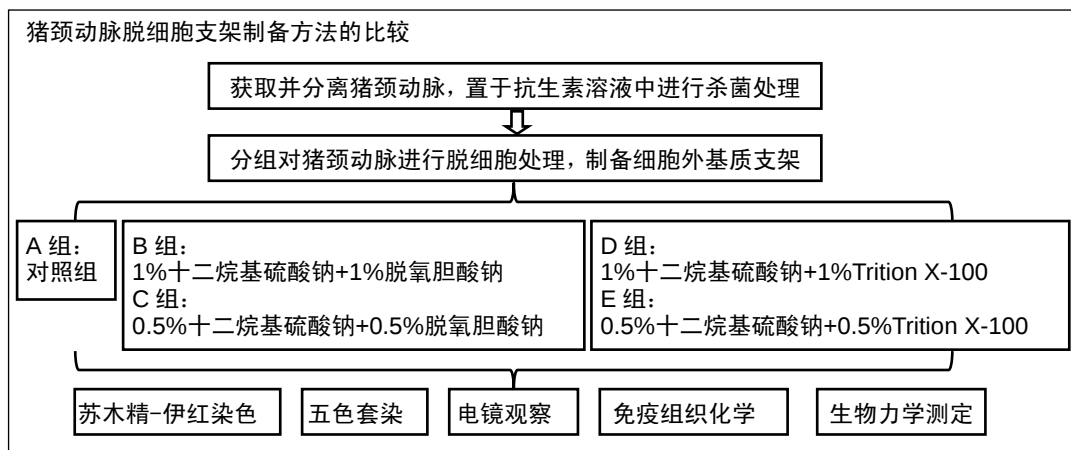
新方法可获得更佳的组织工程小直径血管细胞外基质支架

蒲磊^{1,2}, 潘兴纳¹, 张静³, 吴剑^{1,2}, 李亚雄^{1,2}, 杨应南^{1,2} (昆明医科大学附属延安医院, ¹心脏大血管外科, ²云南省心血管外科研究所, 云南省昆明市 650051; ³昆明医科大学第二附属医院麻醉科, 云南省昆明市 650101)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1570

ORCID: 0000-0001-8729-7158(李亚雄)

文章快速阅读:



蒲磊, 男, 1986 年生, 云南省昆明市人, 汉族, 2017 年昆明医科大学毕业, 博士, 医师, 主要从事心血管组织工程, 皮肤修复重建研究。

通讯作者: 李亚雄, 教授, 博士及硕士生导师, 昆明医科大学附属延安医院心脏大血管外科, 云南省昆明市 650051

通讯作者: 杨应南, 副主任医师, 昆明医科大学附属延安医院心脏大血管外科, 云南省昆明市 650051

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-08



Pu Lei, PhD, Physician,
¹Department of Cardiovascular Surgery,
²Yunnan Provincial Institute of Cardiovascular Surgery, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, Yunnan Province, China

Corresponding author:
Li Yaxiong, Professor, Master's supervisor, Doctoral supervisor, ¹Department of Cardiovascular Surgery, ²Yunnan Provincial Institute of Cardiovascular Surgery, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, Yunnan Province, China

Corresponding author:
Yang Yingnan, Associate chief physician, ¹Department of Cardiovascular Surgery, ²Yunnan Provincial Institute of Cardiovascular Surgery, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, Yunnan Province, China

文题释义:

细胞外基质: 是细胞合成并分泌到胞外, 分布于细胞表面和细胞之间的一类大分子蛋白质的总称, 其可构成复杂的网状支架结构, 为细胞提供结构和生化支持, 调节组织的发生和细胞的生理活动。细胞外基质包括多种分子, 如: 蛋白多糖、非蛋白多糖类多糖、胶原、弹性蛋白、粘连蛋白、层粘连蛋白、细胞外载体。

五色套染: 是一种特殊染色方法, 能用于识别组织中的不同组分, 其由阿利新蓝、Verhoeff 苏木精、天狼星红、酸性品红和番红花粉 5 种染料混合而成, 能够将弹性蛋白和细胞核染成黑色、胶原纤维染成黄色、不定形细胞外基质染成蓝色、纤维蛋白染成亮红色、平滑肌染成红色。

摘要

背景: 获得适宜的支架材料是构建组织工程小直径血管的基础, 前期研究发现, 非离子型去垢剂的脱细胞效果差, 联合应用离子型去垢剂能更有效去除细胞成分。

目的: 比较不同脱细胞方法制备猪颈动脉脱细胞支架的有效性, 探索更适宜的细胞外基质支架制备方法。

方法: 取普通猪颈动脉 30 根, 随机分为 5 组($n=6$), 其中 A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。对各组样本分别行苏木精-伊红染色、五色套染、扫描电镜、免疫组织化学及生物机械力学检测。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色、五色套染显示, B、C 组脱细胞完全, D、E 组于局部可见细胞残留; ②扫描电镜显示, 脱细胞各组胶原纤维束和弹性蛋白保存完整, B 组孔隙结构的形态、尺寸优于 C、D、E 组; ③免疫组织化学评估显示, 脱细胞各组均有异种抗原 α -1, 3-Gal 表达, B 组 α -1, 3-Gal 抗原表达低于 C、D、E 组; ④生物机械力学检测显示, 脱细胞各组爆破压力、缝线保持力和缝合保留强度较 A 组显著下降($P < 0.05$), 脱细胞各组间比较无差异; 脱细胞各组顺应性、长轴断裂伸长率、横轴最大应力、横轴断裂伸长率、横轴杨氏模量与对照组比较无差异($P > 0.05$); 脱细胞各组长轴最大应力和长轴杨氏模量较 A 组显著下降($P < 0.05$), 其中 B、C 组长轴最大应力和长轴杨氏模量下降较 D、E 组明显($P < 0.05$); ⑤结果表明, 基于 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠的方法可获得更佳的猪颈动脉细胞外基质支架, 适用于构建组织工程小直径血管。

关键词:

脱细胞; 细胞外基质; 组织工程小直径血管; 细胞外基质支架

主题词:

细胞外基质; 人工血管; 生物力学; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

缩略语:

十二烷基硫酸钠: sodium dodecyl sulfate, SDS

Acquisition of a suitable extracellular matrix scaffold for tissue-engineered small-diameter blood vessel using a novel decellularization protocol

Pu Lei^{1,2}, Pan Xingna¹, Zhang Jing³, Wu Jian^{1,2}, Li Yaxiong^{1,2}, Yang Yingnan^{1,2} (¹Department of Cardiovascular Surgery, ²Yunnan Provincial Institute of Cardiovascular Surgery, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, Yunnan Province, China; ³Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: A proper scaffold is the basis for construction of tissue-engineered small diameter blood vessels. Preliminary study has shown non-ionic detergents with limited effects of decellularization, and combined application of ionic detergents exhibits more effective decellularization.

OBJECTIVE: To compare the effectiveness of different preferable methods for preparing porcine carotid artery derived extracellular matrix scaffold, and to explore the optimal preparation method.

METHODS: Porcine carotid arteries ($n=30$) were obtained and randomized into five groups ($n=6$ per group). Then porcine carotid arteries were decellularized, followed by treatment with 1% sodium dodecyl sulfate and 1% sodium deoxycholate (group B), 0.5% sodium dodecyl sulfate and 0.5% sodium deoxycholate (group C), 1% sodium dodecyl sulfate and 1% Triton X-100 (group D), 0.5% sodium dodecyl sulfate and 0.5% Triton X-100 (group E). Native porcine carotid artery served as control (group A). Tissue samples of each group underwent hematoxylin-eosin staining, and Movat's pentachrome staining, scanning electron microscope, immunohistochemistry and biomechanical test.

RESULTS AND CONCLUSION: Hematoxylin-eosin staining and Movat's staining revealed that the cellular components were completely removed in the groups B and C; however, cellular residues were visualized in the groups D and E. Under the scanning electron microscope collagen and elastin fiber bundles were well preserved in the decellularization groups; however, the morphology and size of porous structure in the group B were superior to those in the groups C, D and E. Immunohistochemistry staining showed that the xenogeneic antigen, α -1,3-Gal, expressed in the decellularization groups; however, the expression of α -1,3-Gal was lower in the group B than the other groups. Biomechanical test indicated that burst pressure, suture-holding capacity and suture-holding strength were significantly decreased in the decellularization groups compared with group A ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the compliance, longitudinal elongation at brake, circumferential ultimate tensile stress, circumferential elongation at break and circumferential Young's modulus compared with control group ($P > 0.05$). Decellularization caused a significant decrease in the longitudinal ultimate tensile stress and longitudinal Young's modulus in the decellularization groups ($P < 0.05$). Furthermore, the longitudinal ultimate tensile stress and longitudinal Young's modulus in the groups B and C were significantly lower than those in the groups D and E ($P < 0.05$). Our results suggest that the novel decellularization method based on 1% sodium dodecyl sulfate and 1% sodium deoxycholate optimizes the extracellular matrix scaffold for the construction of tissue-engineered small-diameter blood vessel.

Subject headings: Extracellular Matrix; Blood Vessel Prosthesis; Biomechanics; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

血管旁路移植手术是许多血管闭塞性疾病的有效治疗手段,而自体血管材料的不足使很大一部分患者无法得到有效治疗^[1-2]。基于涤纶和聚四氟乙烯的人造血管已被成功用于大直径血管重建,然而其在小直径血管($< 6\text{ mm}$)中的应用却面临血栓栓塞、内膜增生和通畅率低等问题的困扰,因此临床医生急需研发一种无血栓、无免疫原性和具备一定机械强度的血管移植植物^[3]。组织工程在骨、软骨和肌腱再生,皮肤、膀胱重建,心脏瓣膜、血管移植物和器官构建等领域具有广阔的应用前景。应用工程学原理,联合支架材料、细胞和生物信号分子构建的组织工程小直径血管,为解决血管旁路移植植物来源不足问题提供了新的思路,是目前最具潜力的方式^[2, 4]。

适宜的支架材料是决定组织工程小直径血管能否取得成功的首要步骤,也是限制其研发的关键问题。在组织工程研究中,常用的支架有聚合物材料和生物材料,脱细胞生物支架已被成功用于构建组织工程移植植物,获得了良好的临床前研究和临床结果^[5-6]。脱细胞生物支架具有天然的解剖结构,特异的细胞外基质成分和结构,一定的机械性能和相容性^[7],这些优势使其有望成为最适合的支架,用于构建组织工程小直径血管。脱细胞的目的在于完全去除细胞成分,获得多孔结构,尽可能降低对细胞外基质的破

坏,维持一定的机械强度。虽然获得血管脱细胞支架的方法已有不少报道,但这些方法获得的细胞外基质支架与理想的支架还存在差距,特别是针对脱细胞支架生物力学性能的研究较少。研究表明,基于胰酶的脱细胞方法会引起细胞外基质严重受损和支架机械力学性能的下降,而基于去垢剂的脱细胞方法不能完全去除细胞和获得多孔结构^[2, 7]。可以认为,脱细胞方法的选择决定脱细胞支架的应用潜力,去垢剂已被广泛用于制备细胞外基质支架。前期研究发现,非离子型去垢剂的脱细胞效果差,其联合应用离子型去垢剂能更有效去除细胞成分^[8]。然而,应用离子型去垢剂制备细胞外基质支架的脱细胞有效性、细胞外基质损坏程度和生物力学性能变化与去垢剂浓度是否有关尚待进一步研究。因此,此次研究联合不同去垢剂对猪颈动脉进行脱细胞,观察脱细胞和异种抗原 α -1, 3-Gal移除的有效性,更重要的是评价细胞外基质的破坏和生物力学性能,探索最适合的小直径血管异种细胞外基质支架制备方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 探索性观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年10月至2016年9月在昆明医科大学附属延安医院中心实验室完成。

1.3 材料

实验主要试剂及仪器：十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、脱氧胆酸钠、万古霉素、两性霉素B、环丙沙星、庆大霉素(Sigma公司, 美国); Triton X-100(MP公司, 美国); 1%青霉素-链霉素(BI公司, 以色列); 五色套染试剂盒(Scy Tek公司, 美国); 兔抗猪 α -1, 3-Gal多克隆抗体(1:5, US Biological公司, 美国); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(Dako公司, 丹麦); 恒温摇床(Thermo公司, 美国); 光镜(Nikon公司, 日本); 扫描电镜(Hitachi公司, 日本); 万能材料试验机MTS DY-30(Adamel Lhomargy公司, 法国); 精密数字压力表(创威科技有限公司, 陕西); 5-0 Polypropylene缝线(COVIDIEN公司, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 颈动脉的获取 在当地生猪定点屠宰交易中心相对清洁环境下, 获取市售猪双侧颈动脉40根, 热缺血时间小于30 min, 冰上转运至实验室, 解剖并分离颈动脉, 去除颈动脉周围脂肪及结缔组织。检查分离颈动脉的完整性, 保留完整的颈动脉30根, 直径4.0-5.0 mm, 长10-13 cm, 其余丢弃。将30根颈动脉平均放入含万古霉素(120 mg/L)、两性霉素B(250 μ g/L)、环丙沙星(3 mg/L)和庆大霉素(120 mg/L)的PBS(200 mL)中, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱内过夜, 行杀菌处理。

1.4.2 实验分组及脱细胞处理 无菌条件下, 分别将30根颈动脉随机分为5组($n=6$), 其中对照组置于4 $^{\circ}$ C冰箱(A组), 不行脱细胞处理。另外4组进行脱细胞处理, 恒温摇床持续震荡, 24 $^{\circ}$ C条件下250 r/min, 为去除细胞外基质支架残存的去垢剂, 脱细胞处理后, 所有组均用PBS漂洗。
①B组: 双蒸水进行破膜处理24 h, 加入去垢剂1%SDS+1%脱氧胆酸钠混合溶液35 mL脱细胞72 h, 24 h更换, PBS漂洗120 h, 12 h换液;
②C组: 双蒸水进行破膜处理24 h, 加入去垢剂0.5%SDS+0.5%脱氧胆酸钠混合溶液35 mL脱细胞72 h, 24 h更换, PBS漂洗120 h, 12 h换液;
③D组: 双蒸水进行破膜处理24 h, 加入去垢剂1%SDS+1%Triton X-100混合溶液35 mL脱细胞72 h, 24 h更换, PBS漂洗120 h, 12 h换液;
④E组: 双蒸水进行破膜处理24 h, 加入去垢剂0.5%SDS+0.5%Triton X-100混合溶液35 mL脱细胞72 h, 24 h更换, PBS漂洗120 h, 12 h换液。

1.5 主要观察指标

1.5.1 苏木精-伊红染色 脱细胞处理后, 观察各组标本大体形态, 取3-5 mm组织样本, 以中性甲醛固定24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明处理后, 石蜡包埋, 切片(4 μ m), 脱蜡后行标准苏木精-伊红染色, 脱水, 干燥后中性树脂封固, 显微镜下观察脱细胞有效性和脱细胞支架的大体形态。

1.5.2 五色套染 应用五色套染评估各组脱细胞方法对猪颈动脉细胞外基质的影响。取各组石蜡包埋样本, 切片(4 μ m), 脱蜡, 按五色套染试剂盒内所附的操作流程进行染色, 显微镜下观察。平滑肌细胞染成红色, 细胞核染成

黑色, 弹性蛋白染成棕色或褐色, 胶原染成黄色, 不定形的细胞外基质(糖胺聚糖、蛋白聚糖类)染成蓝色。

1.5.3 扫描电镜 取组织样本, 3.5%戊二醛室温固定48 h, 应用磷酸盐缓冲液漂洗, 经1%鹅脱氧胆酸固定2 h, 梯度乙醇脱水, 叔丁醇渗透, 冷冻干燥, 电镀喷金处理后, 应用扫描电镜观察各组脱细胞支架内膜面内皮细胞移除及基底膜破坏情况, 观察横切面细胞外基质纤维完整性和多孔结构。

1.5.4 免疫组织化学 通过观察异种抗原 α -1, 3-Gal的表达情况, 评估异种抗原移除有效性, 研究采用Envision系统行免疫组织化学检测。石蜡包埋样本切片(4 μ m), 脱蜡后采用煮沸法行抗原修复, 体积分数3%双氧水阻断内源性过氧化物酶, 加一抗 α -1, 3半乳糖, 室温孵育1 h, PBS漂洗, 加入二抗, 室温孵育, DAB显色, 苏木精染色后封固, 显微镜下观察。

1.5.5 单轴应力测试 为评价脱细胞支架的单轴机械应力, 研究应用万能材料试验机测定各组猪颈动脉的单轴机械性能。沿长轴取猪颈动脉样本3 cm, 两端分别固定于万能材料试验机的夹具上, 以20 mm/min的速度拉伸, 测定长轴最大应力, 于样本断裂时记录最大应力和位移。

沿长轴取猪颈动脉样本1 cm, 将样本套入2个自制金属钩, 将金属钩固定万能材料试验机夹具上, 确保血管处于自然状态, 以20 mm/min的速度拉伸, 测定横轴最大应力, 于样本断裂时记录最大应力和位移。按公式计算断裂伸长率, 断裂伸长率(%)=位移(mm)/初长度(mm)。计算杨氏模量(ϵ), $\epsilon=(F \cdot L_0)/(A \cdot \Delta L)$, 其中F为最大应力, L_0 为初长度, A为横截面积, ΔL 为位移。

1.5.6 爆破压力测定和顺应性测定 爆破压力和顺应性是评估支架材料能否耐受体内血流动力环境和血管弹性的重要指标, 因此研究应用精密数字压力表测定爆破压力。取各组猪颈动脉样本4 cm, 分别将两端固定于50 mL注射器和精密数字压力表换能器, 将PBS以5 mL/min的速度持续泵入, 于0 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)时用游标卡尺测定各样本内径和厚度, 分别于80和120 mmHg压力时用游标卡尺测定移植体外径, 记录猪颈动脉破裂时的最大压力。参照ANSI 7 198标准, 按公式计算顺应性:

$$\text{顺应性}(\%) / 100 \text{ mm Hg} = \frac{10^4 (R_{ip2} - R_{ip1}) / R_{ip1}}{P2 - P1},$$

$$R_{ipn} = \sqrt{R_{ipn}^2 - (R_i + t_0)^2} + R_i^2$$

其中, P2为120 mm Hg, P1为80 mm Hg, R_{ipn} 为压力n时颈动脉样本的外半径(mm), R_i 为静息状态下(0 mm Hg)颈动脉样本的内半径(mm), t_0 为静息状态下(0 mm Hg)颈动脉样本的厚度(mm)。

1.5.7 缝合保留强度测定 缝合保留强度是判断支架材料能否耐受移植早期局部血管张力和是否出现缝线切割局部撕脱的关键指标, 因此研究应用万能材料试验机测定各

组样本的缝线保持性能和缝合保留强度。取各组血管移植1.5 cm, 其中一端修剪成水平方向和45°角斜面, 分别用5-0 Polypropylene缝线等距缝合3针, 进针点距切缘2 mm, 将移植体和缝线分别固定于万能材料试验机夹具上, 以20 mm/min的速度拉伸, 于样本断裂时记录水平方向和倾斜方向的缝线保持力(N), 按公式计算缝合保留强度, 缝合保留强度(MPa)=SHC/(As×Am), 其中SHC为缝线保持力(N), As为缝线横截面积(mm²), Am为颈动脉样本厚度(mm)。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素ANOVA, 组内比较采用S-N-K法; 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 组织学观察结果 脱细胞处理后, 猪颈动脉呈乳白色, 血管形态与对照组无差异, 弹性良好。苏木精-伊红染色显示, B组及C组脱细胞完全; D组及E组于中膜层内侧局部区域可见细胞核残留, 未完全去除细胞成分; 对照组结构紧密, 平滑肌细胞均匀分布于中膜层, 各脱细胞组细胞外基质与对照组相比变得疏松, 见图1。

五色套染显示, 弹性蛋白位于中膜层, 胶原纤维位于外膜层; A组平滑肌细胞位于中膜层, 被弹性蛋白和细胞外基质包绕; 脱细胞处理后, 弹性蛋白和胶原纤维完整性良好, 排列整齐, 而糖胺聚糖和蛋白聚糖类不定形细胞外基质成分遭到不同程度破坏, B组和C组平滑肌细胞完全去除, D组和E组局部可见红色平滑肌显色, 见图2, 进一步表明B组和C组的脱细胞方案能完全去除猪颈动脉的细胞成分, 而D组和E组只能去除绝大部分细胞成分。

2.2 扫描电镜观察结果 观察内膜面拓扑结构, A组颈动脉内膜面可见均匀分布的内皮细胞, 局部略隆起, 呈鹅卵石样; 各脱细胞组内皮细胞被有效去除, B组和C组基底膜被破坏, 细胞外基质纤维完整, 多处可见多孔结构, D组基底膜局部遭到破坏, 可见细胞外基质纤维多孔结构, 而E组基底膜较完整, 未见细胞外基质纤维暴露, 见图3。

观察猪颈动脉横截面的细胞外基质纤维和多孔结构, A组可见细胞成分, 纤维束完整、形态良好; 各脱细胞组细胞外基质纤维束完整, B组和C组纤维束较对照组和未完全脱细胞组(D组、E组)变薄, 同时B组和C组的多孔结构较D组、E组多, B组“蜂房”样多孔结构优于C组, 见图4。

2.3 免疫组织化学检测结果 免疫组织化学评估显示, A组异种抗原 α -1, 3-Gal均匀分布于颈动脉的内膜、中膜和外膜层; 脱细胞能去除部分异种抗原 α -1, 3-Gal, 异种抗原 α -1, 3-Gal移除程度与脱细胞有效性密切相关, 脱细胞处理后, B组猪颈动脉中膜较其他组疏松, α -1, 3-Gal抗原表达亦低于其他组, 见图5。

2.4 单轴力学性能检测结果 与A组相比, 脱细胞处理导致猪颈动脉长轴-最大应力和杨氏模量不同程度的降低

($P=0$), 其中B组、C组的长轴-最大应力和杨氏模量较A组、D组、E组显著降低($P < 0.05$), D组和E组与A组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。脱细胞处理后, 长轴断裂伸长率, 横轴最大应力、断裂伸长率和杨氏模量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图6。

2.5 爆破压力和顺应性检测结果 脱细胞处理导致猪颈动脉支架的抗爆破能力降低, 与A组相比, 脱细胞组爆破压力均降低($P < 0.001$), 各脱细胞组间比较无明显差异($P > 0.05$); 与A组相比, 脱细胞处理未引起显著的猪颈动脉支架顺应性改变($P > 0.05$), 见图7。

2.6 缝合保留强度检测结果 与A组比较, 脱细胞处理导致猪颈动脉支架的缝线保持力和缝合保留强度在水平方向和斜面方向均下降($P < 0.001$), 然而在各脱细胞组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图8。

3 讨论 Discussion

获得适宜的支架材料是构建组织工程小直径血管面临的一个重要挑战, 理想的血管组织工程支架应具备以下性能: 适合的三维立体结构和生物机械力学性能; 良好的细胞相容性、血液相容性和组织相容性; 具有适当的多孔结构, 易于种子细胞迁移和组织重塑; 可控的生物降解率^[2, 9]。目前, 各种合成和天然的脱细胞生物材料已被用于构建组织工程小直径血管, 然而这些血管移植体均未能满足临床应用的要求。获得细胞外基质支架的方法大致分为物理法、酶处理法和化学试剂脱细胞法, 为了完全去除细胞成分和异种抗原, 通常应用基于胰蛋白酶的方法, 然而多个研究表明, 胰蛋白酶处理会导致细胞外基质的严重破坏, 致使其生物力学性能的下降^[10]。因此需要探索新的、能完全去除细胞成分、保留细胞外基质完整性和生物机械强度, 同时获得较好孔隙结构的脱细胞方法。通过比较4种不同脱细胞方法获得的猪颈动脉细胞外基质支架, 此次研究发现基于1%SDS+1%脱氧胆酸钠的脱细胞方案能获得最适宜的猪颈动脉细胞外基质支架, 用于构建组织工程小直径血管。该方法可完全去除细胞成分, 保留完整的弹性蛋白和胶原纤维, 移除异种抗原 α -1, 3-Gal, 获得最佳的多孔结构和适宜的生物机械力学性能。

脱细胞生物支架的核心内容是完全去除细胞成分, 移除异种抗原, 尽可能完整的保留细胞外基质, 具备一定的生物力学性能。SDS和脱氧胆酸钠属于离子型去垢剂, 通过溶解细胞成分得到细胞外基质, 脱细胞效果较好。Triton X-100属于非离子型去垢剂, 通过破坏脂-脂和脂-蛋白间的分子连接而去除细胞, 其脱细胞作用温和^[11-12]。之前引用不同去垢剂对猪主动脉脱细胞的研究表明, 基于脱氧胆酸钠和Triton X-100的脱细胞方案不能完全去除细胞成分^[9]。此次研究基于SDS和脱氧胆酸钠的2种方法获得良好的结果, 苏木精-伊红染色和五色套染未见细胞核成分残余, 细胞外基质完整性良好, 然而基于SDS和Triton X-100的方法

可于局部观察到细胞核成分,表明未完全脱细胞。细胞核成分残留可能引起不良的体内炎症反应,目前对于细胞核成分残留与体内免疫反应程度之间的关系尚未完全阐释清楚。虽然一些含有细胞核成分的商业化医用产品临床应用已取得成功,但研究证实,基于戊二醛固定的牛心包或猪主动脉瓣制备的生物瓣,钙化首先发生于细胞成分残余局部^[13]。Keane等^[14]的研究表明,脱细胞有效性及巨噬细胞极化和体内重塑结局密切相关,未有效脱细胞组以M1型巨噬细胞为主,重塑结局不良。因此认为,B、C组的脱细胞方案优于D、E组,基于SDS和Triton X-100的脱细胞方案有待进一步改进,提高脱细胞有效性。

异种抗原 α -1, 3-Gal是引起异种移植超急性免疫排斥的关键分子^[15],脱细胞的其中一个要素就是去除异种抗原。异种移植超急性免疫排斥是引起移植早期移植物衰败和功能障碍的主要原因之一。因此,为削弱超异种移植超急性免疫排斥的强度,需要降低或有效去除 α -1, 3-Gal。此次研究表明,脱细胞能移除异种抗原 α -1, 3-Gal,但不能全部移除。Böer等^[16-17]应用去垢剂对马颈动脉脱细胞的实验表明,基于去垢剂的方法不能完全去除 α -1, 3-Gal。有学者认为, α -1, 3-Gal主要表达于细胞膜^[18];也有学者认为, α -1, 3-Gal通过特定糖链结合于哺乳动物(人和高级灵长类动物除外)的蛋白及脂类分子^[19]。此次研究中,细胞膜和细胞外基质也可观察到 α -1, 3-Gal表达,在此作者认为, α -1, 3-Gal不仅表达于内皮细胞表面,可能表达于细胞外基质或与某些细胞外基质蛋白形成紧密连接。目前,已有不少关于 α -1, 3-Gal基因缺失猪来源组织用于构建组织工程移植物的报道^[15-20]。

支架材料应具备一定数目和大小孔隙结构,易于种植细胞黏附和迁移,促进细胞养分的供应和代谢产物的运输。虽然基底膜是细胞黏附和增殖的理想锚基,但Faulk等^[21]的研究显示完整的基底膜影响细胞迁移。此次研究中扫描电镜观察显示,B组和D组脱细胞方案引起明显的基底膜破坏,C组和E组基底膜完整性较好;脱细胞支架横截面扫描电镜观察显示,B组细胞外基质支架孔隙结构的大小、形态和孔隙间连接均优于C组。

血管支架材料应具备足够的机械强度和爆破压力,以承受体内血流和压力,应具有同天然血管相近的顺应性,以规避移植物与天然血管之间顺应性不匹配导致的血栓形成和内膜增生。脱细胞处理通常引起细胞外基质完整性破坏和生物机械力学的改变,然而针对主要细胞外基质结构破坏与机械性能改变的关系报道较少。因此,此次研究基于猪颈动脉和4种脱细胞方案,探讨细胞外基质和力学性能间的关系。五色套染结果显示,脱细胞处理导致动脉结构完整性破坏,主要细胞外基质蛋白胶原纤维和弹性蛋白完整性良好,B组和C组平滑肌细胞被完全移除,细胞外基质疏松;D组和E组局部有平滑肌着色,细胞外基质尚紧密。此外,不定形细胞外基质(蛋白聚糖和糖胺聚糖类)的破坏

与脱细胞完全性密切相关。生物机械性能测定显示,脱细胞导致长轴最大应力、长轴杨氏模量、爆破压力、缝线保持力和缝合保留强度不同程度下降,其中完全脱细胞组(B、C组)长轴最大应力和杨氏模量较未完全脱细胞组(D、E组)下降明显,参照ANSI 7 198标准,脱细胞对横轴最大应力、横轴杨氏模量、断裂伸长率等生物机械力学指标无显著影响。五色套染显示,B、C组平滑肌细胞完全移除,D、E组仍有平滑肌细胞着色,胶原纤维和弹性蛋白着色未见明显差异;扫描电镜观察显示胶原纤维束和弹性蛋白板层完整性良好,在脱细胞组和A组间无明显差异,这些结果表明平滑肌细胞移除是导致机械性能改变的首要因素,特别是长轴最大应力和长轴杨氏模量。Venkatasubramanian等^[22]对猪股动脉冻融处理的研究显示,平滑肌细胞破坏是引起机械性能改变的关键因素。顺应性不匹配是引起血管移植物血栓形成和内膜增生的限制性因素^[23],因此移植物顺应性与靶血管是否匹配决定血管移植物的应用潜能。此次研究结果表明,脱细胞未引起猪颈动脉支架的顺应性改变;Murase等^[24]对犬颈动脉脱细胞的研究与此次研究结果相似,脱细胞未引起顺应性改变。虽然脱细胞导致爆破压力下降,然而爆破压力的最低值(2 000 mm Hg)远远高于生理血压的极限。此外,脱细胞支架具备一定的缝线保留强度。

此次研究存在一定不足:首先,研究从组织学角度探索细胞移除的有效性,可考虑从DNA、细胞膜和细胞器相关蛋白的定性和定量分析角度探索是否完全去除细胞成分;其次,生物相容性是决定异种颈动脉细胞外基质支架临床应用的重要方面,需要在组织相容性、血液相容性和细胞相容性等方面进行研究;再次,炎症反应是介导移植物体内重塑、成熟的基础,然而具体的哪一类炎性细胞或哪一类炎性因子经过相应信号通路调控移植物重塑的分子机制仍待阐释;在今后的研究工作中,将针对这些方面进行探索。

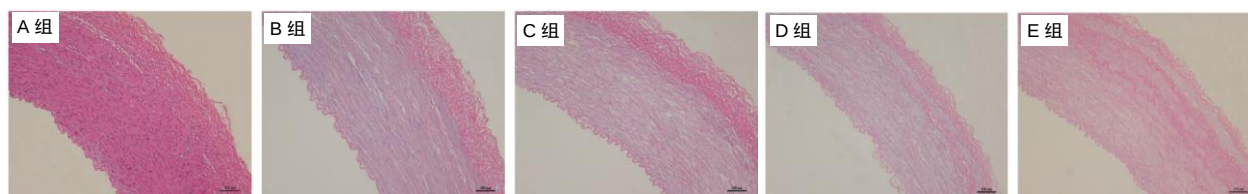
综上,基于1%SDS+1%脱氧胆酸钠的脱细胞方案获得的猪颈动脉支架优于其他3种方案,该方案获得的猪颈动脉细胞外基质支架,具有极大的潜力用于构建组织工程小直径血管,值得进一步研究。脱细胞无法避免猪颈动脉支架不定形细胞外基质的破坏和生物机械力学性能的改变,平滑肌细胞的移除是引起力学性能下降的关键因素。遗憾的是异种抗原 α -1, 3-Gal未完全移除,其不但表达于细胞膜,还表达于细胞外基质。

作者贡献: 蒲磊进行实验设计,实验实施为蒲磊、潘兴纳,实验评估为李亚雄,资料收集为张静、吴剑,蒲磊成文,杨应南审核。

经费支持: 该文章未接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

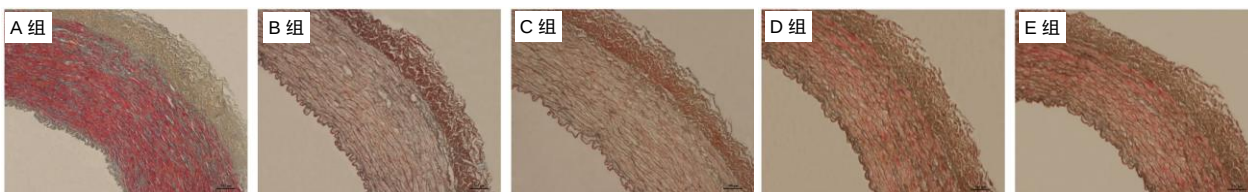
机构伦理问题: 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。B、C 组脱细胞完全; D、E 组中膜层内侧局部区域可见细胞核残留, 未完全去除细胞成分。

图 1 各组颈动脉样本苏木精-伊红染色观察结果(标尺为 100 μm)

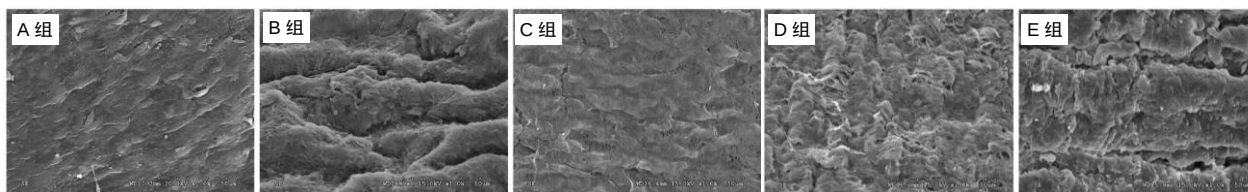
Figure 1 Hematoxylin-eosin staining results of carotid arteries in each group (scale bars=100 μm)



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。B、C 组显示平滑肌细胞完全去除, D、E 组显示局部可见红色平滑肌显色。

图 2 各组颈动脉样本五色套染观察结果(标尺为 100 μm)

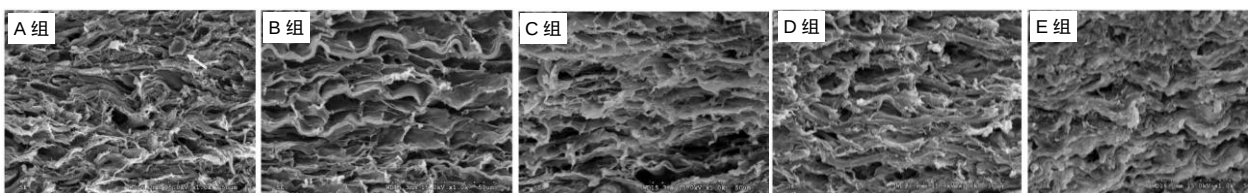
Figure 2 Movat's pentachrome staining results of carotid arteries in each group (scale bars=100 μm)



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。B、C 组的基底膜被破坏, 细胞外基质纤维完整, 多处可见多孔结构; D 组的基底膜局部遭到破坏, 可见细胞外基质纤维多孔结构; E 组的基底膜较完整, 未见细胞外基质纤维暴露。

图 3 各组颈动脉样本内膜面扫描电镜观察结果(标尺为 50 μm)

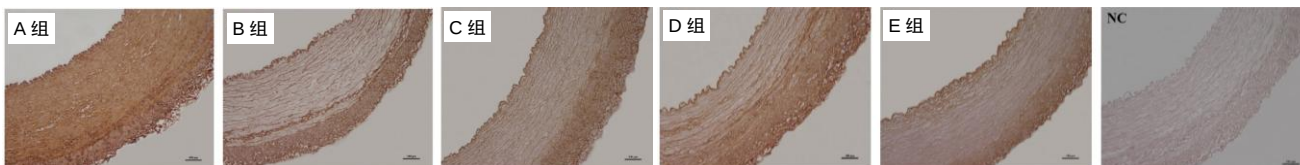
Figure 3 Intimal surface of carotid arteries in each group under scanning electron microscope (scale bars=50 μm)



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。各脱细胞组细胞外基质纤维束完整, B、C 组纤维束较 A、D、E 组变薄, 同时 B、C 组的多孔结构较 D、E 组多, B 组的“蜂房”样多孔结构优于 C 组。

图 4 各组颈动脉样本横截面扫描电镜观察结果(标尺为 50 μm)

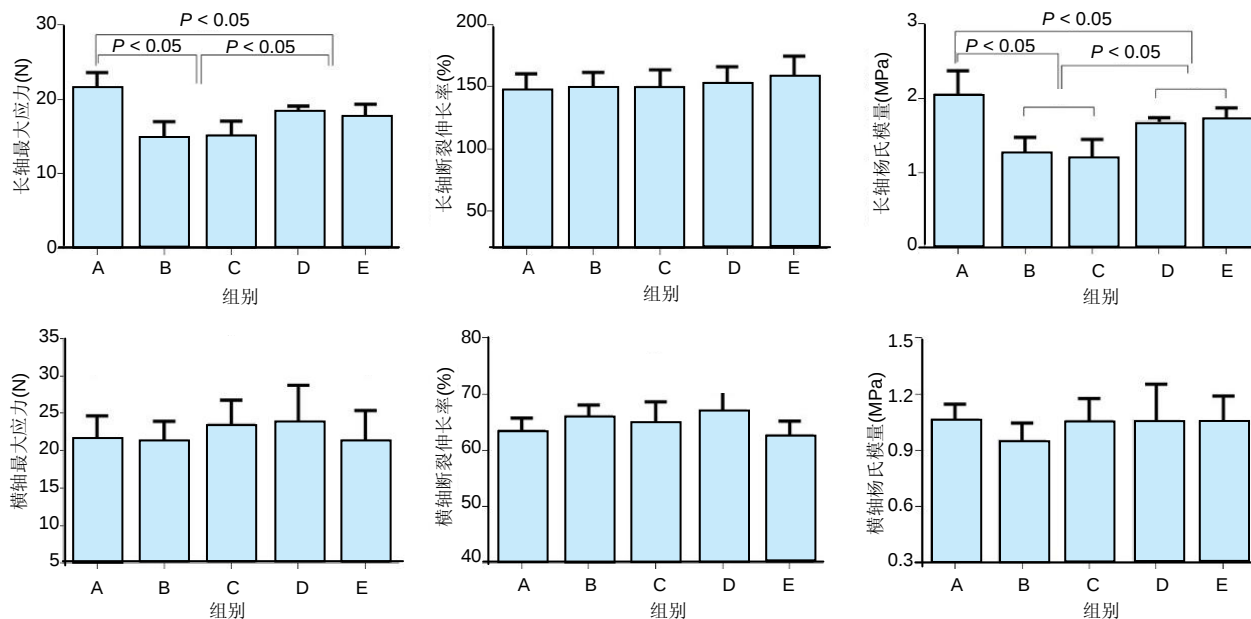
Figure 4 Cross-sectional observation of carotid arteries in each group under scanning electron microscope (scale bars=50 μm)



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理; NC 为空白对照。B 组的猪颈动脉中膜较其他组疏松, α-1, 3-Gal 抗原表达亦低于其他脱细胞处理。

图 5 各组颈动脉样本 α-1, 3-Gal 免疫组织化学观察结果(标尺为 100 μm)

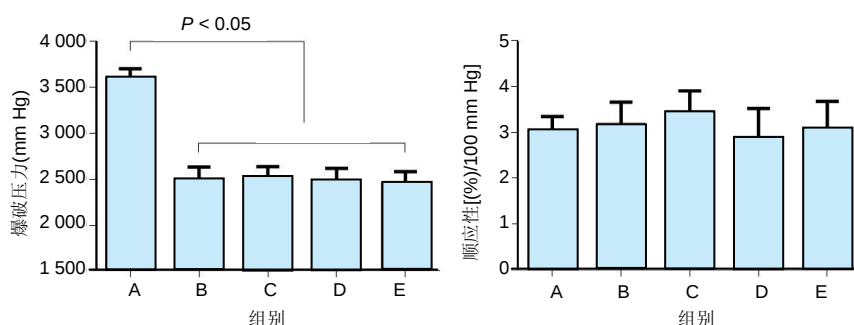
Figure 5 Immunohistochemistry observation of α-1,3-Gal in carotid arteries of each group (scale bars=100 μm)



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。

图 6 各组颈动脉样本的单轴生物力学测定结果

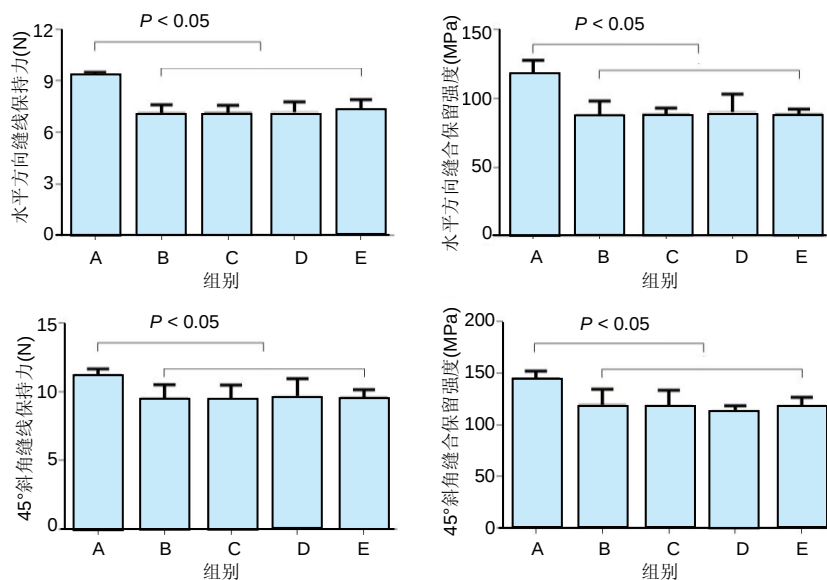
Figure 6 Uniaxial biomechanical test of carotid arteries in each group



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。1 mm Hg=0.133 kPa

图 7 各组颈动脉样本爆破压力和顺应性测定结果

Figure 7 Burst pressure and compliance tests of carotid arteries in each group



图注: A 组不进行脱细胞处理; B 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; C 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%脱氧胆酸钠进行脱细胞处理; D 组采用 1%十二烷基硫酸钠+1%Triton X-100 进行脱细胞处理; E 组采用 0.5%十二烷基硫酸钠+0.5%Triton X-100 进行脱细胞处理。

图 8 各组颈动脉样本缝线保持力和缝合保留强度测定结果

Figure 8 Suture holding capacity and suture holding strength tests of carotid arteries in each group

文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经昆明医科大学附属医院生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Hoenicka M, Schrammel S, Bursa J, et al. Development of endothelium-denuded human umbilical veins as living scaffolds for tissue-engineered small-calibre vascular grafts. J Tissue Eng Regen Med. 2013;7(4):324-336.
- [2] Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, et al. Small-diameter vascular tissue engineering. Nat Rev Cardiol. 2013; 10(7): 410-421.
- [3] Desai M, Seifalian AM, Hamilton G. Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. Eur J Cardiothorac Surg. 2011;40(2):394-398.
- [4] Huang AH, Niklason LE. Engineering of arteries in vitro. Cell Mol Life Sci. 2014;71(11):2103-2118.
- [5] Quint C, Kondo Y, Manson RJ, et al. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(22):9214-9219.
- [6] Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A, et al. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. Circulation. 2011;124(11 Suppl):S115-S123.
- [7] Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, et al. Engineered whole organs and complex tissues. Lancet. 2012;379(9819): 943-952.
- [8] 蒲磊, 吴剑, 孟明耀, 等. 不同脱细胞方案制备主动脉细胞外基质支架的比较研究[Z]. 2014;28,1413-1421.
- [9] Bouten CV, Dankers PY, Driessen-Mol A, et al. Substrates for cardiovascular tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63(4-5):221-241.
- [10] Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. Med Eng Phys. 2002;24(3):173-183.
- [11] Gilbert T, Sellaro T, Badylak S. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006;27(19):3675-3683.
- [12] Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, et al. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. Proc Inst Mech Eng H. 2008;222(1):129-143.
- [13] Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. Ann Thorac Surg. 2005;79(3):1072-1080.
- [14] Keane TJ, Londono R, Turner NJ, et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. Biomaterials. 2012;33(6):1771-1781.
- [15] Wilczek P, Lesiak A, Niemiec-Cyganek A, et al. Biomechanical properties of hybrid heart valve prosthesis utilizing the pigs that do not express the galactose-alpha-1, 3-galactose(alpha-Gal) antigen derived tissue and tissue engineering technique. J Mater Sci Mater Med. 2015;26(1): 5329.
- [16] Böer U, Lohrenz A, Klingenberg M, et al. The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts. Biomaterials. 2011;32(36):9730-9737.
- [17] Böer U, Buettner FF, Klingenberg M, et al. Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI. PLoS One. 2014;9(8):e105964.
- [18] Naso F, Gandaglia A, Iop L, et al. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. Acta Biomater. 2011;7(4):1728-1734.
- [19] Naso F, Gandaglia A, Iop L, et al. Alpha-Gal detectors in xenotransplantation research: a word of caution. Xenotransplantation. 2012;19(4):215-220.
- [20] 员海超, 蒲春晓, 魏强, 等. 组织工程细胞外基质材料研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 6(10):1251-1254.
- [21] Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, et al. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. Acta Biomater. 2014;10(1):183-193.
- [22] Venkatasubramanian RT, Wolters WF, Sheno MM, et al. Freeze-thaw induced biomechanical changes in arteries: role of collagen matrix and smooth muscle cells. Ann Biomed Eng. 2010;38(3):694-706.
- [23] Crapo PM, Wang Y. Physiologic compliance in engineered small-diameter arterial constructs based on an elastomeric substrate. Biomaterials. 2010;31(7):1626-1635.
- [24] Murase Y, Narita Y, Kagami H, et al. Evaluation of compliance and stiffness of decellularized tissues as scaffolds for tissue-engineered small caliber vascular grafts using intravascular ultrasound. ASAIO J. 2006;52(4):450-455.