

脱细胞软骨细胞外基质对小鼠巨噬细胞系表型的调控

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3032>李珺琦^{1,2}, 田广招², 陈明学², 王皓², 刘舒云², 眭翔², 黄靖香², 李明³, 郭全义²

2095-4344.3032

投稿日期: 2020-03-28

送审日期: 2020-04-02

采用日期: 2020-05-13

在线日期: 2020-08-25

中图分类号:

R459.9; R392; R684

文章编号:

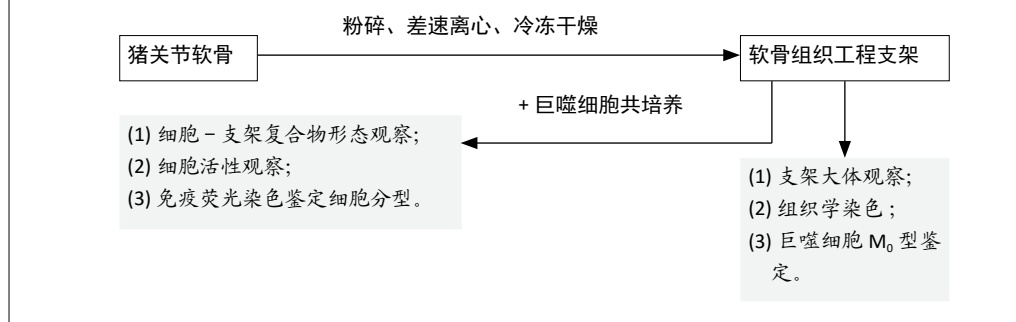
2095-4344(2021)10-01512-05

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△探索猪来源脱细胞软骨细胞外基质支架材料对小鼠巨噬细胞表型的极化作用。



文题释义:

细胞外基质: 是由各种组织和细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子, 主要是一些多糖和蛋白聚糖等构成的复杂网状结构, 有支持并连接组织结构、调节组织的发生和细胞的生理活动。

巨噬细胞: 是天然免疫系统中重要组成部分, 能消灭侵入机体的细菌, 吞噬异物颗粒, 消除体内衰老、损伤的细胞和变性的细胞间质、杀伤肿瘤细胞, 并参与免疫反应。

摘要

背景: 前期研究证实脱细胞软骨细胞外基质可有效促进关节软骨缺损修复再生, 具有良好的修复效果, 但是其促再生机制尚未阐明。

目的: 探究猪来源脱细胞软骨细胞外基质支架对小鼠巨噬细胞系表型极化的调控。

方法: 以猪膝关节软骨为原料, 通过湿法粉碎、差速离心、冷冻干燥的方法制备脱细胞软骨细胞外基质支架。将小鼠RAW264.7巨噬细胞系接种于脱细胞软骨细胞外基质支架, 构建细胞-支架复合物, 体外极化诱导4 d, 采用扫描电镜观察细胞黏附情况, 死/活细胞染色观察细胞生长情况, 免疫荧光染色观察M₁型巨噬细胞特征性表面标志物CD86和M₂型巨噬细胞特征性表面标志物CD206的表达, 进而明确极化诱导情况。

结果与结论: ①扫描电镜显示, 复合物中的巨噬细胞为原来的圆形或类圆形, 沿着支架的管状排列, 广泛分布在支架表面及内部结构中; ②死/活细胞染色显示, 支架上附着的大部分细胞为活细胞, 仅有极少数死细胞; ③免疫荧光染色显示, 复合物中的M₂型巨噬细胞标志物CD206呈80%的高阳性表达, M₁型巨噬细胞标志物CD86的阳性表达甚少; ④结果表明, 猪来源脱细胞软骨细胞外基质支架可诱导极化M₀型巨噬细胞为修复性M₂型巨噬细胞。

关键词: 骨; 软骨; 再生; 细胞外基质; 巨噬细胞; 极化; 组织工程; 免疫

缩略语: 脱细胞软骨细胞外基质: acellular cartilage extracellular matrix, ACECM

Regulatory effect of acellular cartilage extracellular matrix on phenotype of mouse macrophage line

Li Junqi^{1,2}, Tian Guangzhao², Chen Mingxue², Wang Hao², Liu Shuyun², Sui Xiang², Huang Jingxiang², Li Ming³, Guo Quanyi²

¹Department of Basic Medicine, ²Department of Anatomy, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China; ³Institute of Orthopedics of First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing Key Laboratory of Orthopedic Regenerative Medicine, Key Laboratory of Military Orthopedic Warfare Trauma, Beijing 100853, China

Li Junqi, Department of Basic Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China; Institute of Orthopedics of First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing Key Laboratory of Orthopedic Regenerative Medicine, Key Laboratory of Military Orthopedic Warfare Trauma, Beijing 100853, China

Corresponding author: Guo Quanyi, MD, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Institute of Orthopedics of First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing Key Laboratory of Orthopedic Regenerative Medicine, Key Laboratory of Military Orthopedic Warfare Trauma, Beijing 100853, China

长治医学院, ¹基础医学部, ²解剖教研室, 山西省长治市 046000; ³中国人民解放军总医院第一医学中心骨科研究所, 骨科再生医学北京市重点实验室, 全军骨科战创伤重点实验室, 北京市 100853

第一作者: 李珺琦, 女, 1997年生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 汉族, 长治医学院本科在读。

通讯作者: 郭全义, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 中国人民解放军总医院第一医学中心骨科研究所, 骨科再生医学北京市重点实验室, 全军骨科战创伤重点实验室, 北京市 100853

<https://orcid.org/0000-0003-3457-4099> (李珺琦)

基金资助: 国家重点研发计划项目(2018YFC1105900), 项目参与者: 刘舒云; 国家自然科学基金委员会资助项目(81772319),

项目负责人: 郭全义

引用本文: 李珺琦, 田广招, 陈明学, 王皓, 刘舒云, 眭翔, 黄靖香, 李明, 郭全义. 脱细胞软骨细胞外基质对小鼠巨噬细胞系表型的调控 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(10):1512-1516.



Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that the extracellular matrix of acellular cartilage can effectively promote the repair and regeneration of articular cartilage defects, and has a good repair effect, but its mechanism of promoting regeneration has not been elucidated.

OBJECTIVE: To investigate the regulation of phenotypic polarization of mouse macrophage cell line by extracellular matrix scaffolds derived from pigs.

METHODS: Using pig knee articular cartilage as raw material, the decellularized cartilage extracellular matrix scaffold was prepared by wet grinding, differential centrifugation, and freeze drying. The mouse RAW264.7 macrophage cell line was inoculated on the decellularized cartilage extracellular matrix scaffold to construct a cell-scaffold complex, which induced polarization *in vitro* for 4 days. Cell adhesion was observed using scanning electron microscopy, and cell growth was observed with dead/viable cells. Immunofluorescence staining was used to observe the expression of CD86, a characteristic surface marker of M₁-type macrophages, and CD206, a characteristic surface marker of M₂-type macrophages, and to clarify the polarization induction.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Scanning electron microscopy showed that the macrophages in the complex were originally round or quasi round, arranged along the tube of the scaffold, and widely distributed on the surface and internal structure of the scaffold. (2) Dead/live cell staining showed that most of the cells attached to the scaffold were living cells, with only a few dead cells. (3) Immunofluorescence staining showed that the M₂ type macrophage marker CD206 in the complex was 80% highly expressed. The positive expression of CD86 the marker of M₁ type macrophages was scarce. (4) The results show that the porcine-derived acellular cartilage extracellular matrix scaffold can induce polarized M₀ type macrophages to repair M₂ type macrophages.

Key words: bone; cartilage; regeneration; extracellular matrix; macrophages; polarization; tissue engineering; immune

Funding: the National Key Research and Development Project, No. 2018YFC1105900 (to LSY); the National Natural Science Foundation of China, No. 81772319 (to GQY)

How to cite this article: LI JQ, TIAN GZ, CHEN MX, WANG H, LIU SY, SUI X, HUANG JX, LI M, GUO QY. Regulatory effect of acellular cartilage extracellular matrix on phenotype of mouse macrophage line. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021;25(10):1512-1516.

0 引言 Introduction

目前对于关节软骨的再生修复仍是充满挑战性的科学难题,组织工程的快速发展使得软骨损伤的再生修复成为可能^[1-2]。近年来越来越多的文献报道,免疫反应在组织再生过程中发挥着重要作用^[3-7],而巨噬细胞作为天然免疫系统中重要组成部分,其激活后的 M₂ 型巨噬细胞已被证实可促进组织的重塑和再生^[5, 8]。

巨噬细胞是一种具有很高可塑性和多能性的细胞群体,可以根据激活类型表现为 2 种主要表型,具有明显不同的生物学功能。未激活的巨噬细胞称为 M₀ 型巨噬细胞,其特征性表面标志物包括 CD14、CD68、F4/80(小鼠特有)^[9-10]。经过初始刺激后巨噬细胞可获得不同的表型: M₁ 型巨噬细胞是“经典激活”类型,特征性表面标志物为 CD80、CD86,具有抗原提呈、分泌促炎性细胞因子和毒性介质的功能,从而达到杀灭细菌、病原体和肿瘤细胞的目的,但时常也会导致炎症反应的过度表达,造成组织细胞的损伤^[9-12];而 M₂ 型巨噬细胞称为“替代激活”巨噬细胞,特征性表面标志物为 CD163、CD206,其主要的功能是分泌抗炎细胞因子,驱动免疫调节和促进伤口愈合及组织重塑^[9, 13]。激活后的巨噬细胞因表型不同而具有不同的功能,因此巨噬细胞和组织再生的关系较为复杂,表现为既可以促进组织再生又可以抑制组织再生,总体而言, M₁ 型巨噬细胞主要参与炎症反应,不利于组织再生,而 M₂ 型巨噬细胞表现出可以抑制炎症,参与组织再生^[14]。因此诱导巨噬细胞向 M₂ 型巨噬细胞极化,从而通过调控局部免疫环境来促进组织再生,是目前组织工程领域常用的策略之一。

研究团队前期研究显示,脱细胞软骨细胞外基质 (acellular cartilage extracellular matrix, ACECM) 支架原位植入动物关节软骨缺损后可有效促进关节软骨缺损修复再生,具有良好的修复效果^[15-16],但其促再生机制尚未阐明。既往的相关研究主要关注 ACECM 支架材料本身的物理特性(如:孔径、孔隙率、力学强度、可降解性等)及其保留的天然细胞外基质成分(如:胶原、糖胺多糖、生长因子及细胞因子等)对组织再生的影响,而关于软骨组织工程支架对免疫反应的调节研究较少,因此

实验初步探索猪来源 ACECM 支架材料对小鼠巨噬细胞表型的极化作用,为软骨组织工程支架材料促进组织再生提供新的研究思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 巨噬细胞极化体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 8 月至 2019 年 1 月在中国人民解放军总医院骨科研究所完成。

1.3 材料 新鲜 10 月龄猪关节 20 个购自北京市屠宰场; RAW264.7 巨噬细胞系(ATCC 公司);苏木精-伊红染色、甲苯胺蓝染色、番红 O 染色、天狼星红染色及 DAPI 染色试剂(北京索莱宝科技有限公司);死/活细胞染色试剂盒(Invitrogen 公司);HDMEM 细胞培养基(美国 Sigma 公司);胎牛血清(北京元亨金马生物科技有限公司);单克隆抗 CD68、单克隆抗 CD86、单克隆抗 CD206(美国 Abcam 公司);CO₂ 培养箱 Heraeus BB5060 型(德国 Heraeus 公司);Olympus IX70 型倒置显微镜、BH-2 型生物显微镜、IX70 型荧光显微镜(日本东京 Olympus 公司);超净工作台月坛双人水平层流型(北京半导体元件一厂);S-4800 型扫描电镜(日本 Hitachi 公司);冷冻干燥机(北京博医康技术有限公司);Beckman Allegra X-22R 离心机(美国 Beckman 公司);TCS SP8 共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 ACECM 支架的制备 具体方法参照实验室前期发表的文献制备 ACECM 支架^[17-18],简而言之,取新鲜猪膝关节的软骨组织,通过湿法粉碎和差速离心制备纳米级不含细胞的猪软骨细胞外基质,然后通过冷冻干燥制备 ACECM 支架。

1.4.2 ACECM 支架组织学染色 取 ACECM 支架, OCT 包埋后进行冰冻切片(约 7 μm 厚),室温下丙酮固定 30 min,备用。

苏木精-伊红染色:切片至水 2 min,苏木精染液 5-10 min,盐酸乙醇分化数秒,返蓝数秒,伊红染液 30-60 s,常规脱水透明,中性树脂胶封固,显微镜下观察。

甲苯胺蓝染色:切片至水 2 min,甲苯胺蓝染色液滴染 15-20 min,流水稍冲洗,去除切片表面染液,常规脱水透明,

中性树胶封固，显微镜下观察。

番红 O 染色：切片至水 2 min，番红 O 染色液滴染 15–20 min，流水稍冲洗，去除切片表面染液，常规脱水透明，中性树胶封固，显微镜下观察。

天狼星红染色：切片至水 2 min，天狼星红染色液滴染 15–20 min，流水稍冲洗，去除切片表面染液，常规脱水透明，中性树胶封固，显微镜下观察。

1.4.3 巨噬细胞的培养和传代 复苏 RAW264.7 巨噬细胞，添加到含有体积分数 10% 胎牛血清、高糖型 DMEM(HDMEM) 培养基的 75 cm² 培养瓶中，置于 37 °C、含体积分数 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养，每 2 d 更换一次培养液，相差显微镜下观察巨噬细胞生长情况，待细胞生长至 80%–90% 融合时进行传代备用。

1.4.4 巨噬细胞 M₀ 型免疫鉴定 将培养后的巨噬细胞制成细胞悬液，计数，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，滴加巨噬细胞培养液重悬制成 1×10¹⁰ L⁻¹ 的细胞悬液。用 20 μL 移液枪吸取 10 μL 细胞悬液 (1×10⁵ 细胞) 接种在 ACECM 支架上，构成细胞–支架复合物，置于 37 °C、含体积分数 5%CO₂ 细胞培养箱中培养 4 d 后，在 OCT 中包埋，进行冰冻切片 (约 7 μm 厚)，室温下丙酮固定 30 min，PBS 浸洗切片，室温通透 30 min，PBS 浸洗切片，在切片上滴加 1%BSA，室温封闭 30 min，每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗 CD68(1 : 500) 并放入湿盒，4 °C 孵育过夜；PBS 浸洗后滴加稀释好的荧光二抗，湿盒中孵育，PBS 浸洗切片，最后滴加 DAPI 避光进行染核，PBS 洗去多余的 DAPI，用含抗荧光淬灭剂的封固液封固，荧光显微镜下观察。

1.4.5 巨噬细胞的极化诱导 将 3 个直径 3.5 mm、厚 1 mm 的 ACECM 支架分别置于无菌的 48 孔板中，取培养后的巨噬细胞，制成细胞悬液，计数，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，滴加巨噬细胞培养液重悬制成 1×10¹⁰ L⁻¹ 的细胞悬液。用 20 μL 移液枪吸取 10 μL 细胞悬液 (含细胞 1×10⁵) 滴加到支架上，然后将 48 孔板移至 37 °C、含体积分数 5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育。每隔 30 min 用 20 μL 移液枪吸取适当的巨噬细胞培养液滴加至细胞–支架复合物上，保证细胞–支架复合物处于湿润状态。4 h 后每孔加入 1 mL 巨噬细胞培养液，隔天换液。

1.4.6 扫描电镜观察 对构建的细胞–支架复合物体外极化诱导 4 d 后取出，PBS 冲洗，在 2.5% 戊二醛及 1% 锇酸中进行固定，PBS 冲洗干净，梯度乙醇进行脱水，醋酸异戊酯中浸泡 40 min，六甲基二硅胺烷干燥，粘托，样品表面电镀喷金后扫描电镜下观察。

1.4.7 死/活细胞染色共聚焦观察 对构建的细胞–支架复合物体外极化诱导 4 d 后取出，PBS 冲洗 2 次，按照死/活细胞染色试剂盒说明书操作，将 A、B 混合进行染色，在共聚焦激光显微镜下观察细胞–支架复合物上巨噬细胞的生长情况。

1.4.8 诱导后巨噬细胞表型鉴定 对体外极化诱导 4 d 的细胞–支架复合物在 OCT 中包埋，进行冰冻切片 (约 7 μm 厚)，室温下丙酮固定 30 min，PBS 浸洗切片，室温通透 30 min，

PBS 浸洗切片，在切片上滴加 1%BSA，室温封闭 30 min，每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗 (CD86+CD206) 并放入湿盒，4 °C 孵育过夜；PBS 浸洗后滴加稀释好的荧光二抗，湿盒中孵育，PBS 浸洗切片，最后滴加 DAPI 进行染核，PBS 洗去多余的 DAPI，用含抗荧光淬灭剂的封固液封固后，200 倍荧光显微镜观察拍摄，每个支架拍摄 3 个不同视野，采用 Image J 进行荧光定量分析，采用 GraphPad prism 7 进行绘图处理。

1.5 主要观察指标 巨噬细胞在 ACECM 支架的黏附情况和生长情况，M₂ 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD206 在细胞–支架复合物中的表达情况。

2 结果 Results

2.1 ACECM 支架大体观 制备成的 ACECM 支架大体观为规则圆形，表面光滑 (图 1A)。扫描电镜显示 ACECM 支架呈规则管状排列，疏松，有明显的三维立体结构 (图 1B)。

2.2 ACECM 支架组织学染色 天狼星红染色显示 ACECM 支架胶原成分得到很好的保留 (图 1C)，番红 O 染色和甲苯胺蓝染色均呈阳性 (图 1D, E)，表明该 ACECM 支架保留了原有的特异性的糖胺多糖成分；苏木精–伊红染色后未见蓝染的情况，显示无细胞核结构 (图 1F)。

2.3 M₀ 型巨噬细胞观察 倒置显微镜下观察显示，M₀ 型巨噬细胞大多呈接触式生长，为圆形或类圆形，无伪足，贴壁牢固 (图 2)。

2.4 M₀ 型巨噬细胞免疫荧光染色鉴定 用 M₀ 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD68(红色) 标记细胞，荧光显微镜观察可见细胞–支架复合物中有 M₀ 型巨噬细胞特征性标志物 CD68 阳性表达 (图 3)，提示接种的细胞为 M₀ 型巨噬细胞。

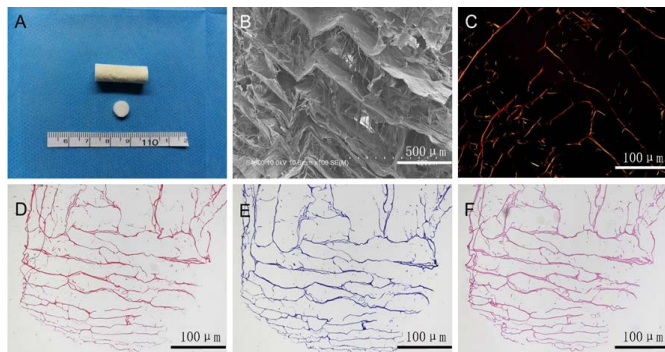
2.5 巨噬细胞的极化诱导

2.5.1 大体观察 体外极化诱导 4 d 后，细胞–支架复合物仍然呈规则的完整圆形结构，疏松具有弹性，镊子挤压后仍可恢复原来的形状。

2.5.2 扫描电镜观察 体外极化诱导 4 d 后，细胞–支架复合物中巨噬细胞为原来的圆形或类圆形，沿着支架的管状排列，广泛分布在支架的表面及内部结构中 (图 4)，表明巨噬细胞在 ACECM 支架上黏附良好。

2.5.3 死/活细胞染色共聚焦观察 支架上附着的大部分细胞为活细胞的绿色荧光，仅有极少数细胞为死细胞的红色荧光 (图 5)，表明支架上巨噬细胞生长良好且具有很高的存活性。

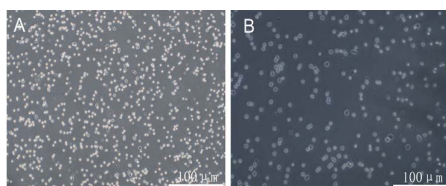
2.6 诱导后巨噬细胞表型鉴定 将 M₀ 型巨噬细胞接种在 ACECM 支架上体外极化诱导 4 d 后，冰冻切片以 M₁ 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD86(绿色) 和 M₂ 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD206(红色) 进行免疫荧光双重染色鉴定，结果显示 M₂ 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD206 呈 80% 的高阳性表达，提示细胞–支架复合物中有大量的 M₂ 型巨噬细胞存在；而 M₁ 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD86 的阳性表达甚少 (图 6)。



图注: A 为支架大体观, 为规则圆形, 表面光滑; B 为支架扫描电镜图, 呈规则管状排列, 疏松, 有明显的三维立体结构; C 为支架天狼星红染色, 胶原成分得到很好的保留; D 为支架番红 O 染色, 保留了原有的特异性的糖胺多糖成分; E 为支架甲苯胺蓝染色, 保留了原有的特异性的糖胺多糖成分; F 为支架苏木精 - 伊红染色, 无细胞核结构

图 1 | 脱细胞软骨细胞外基质支架大体及组织学染色观察

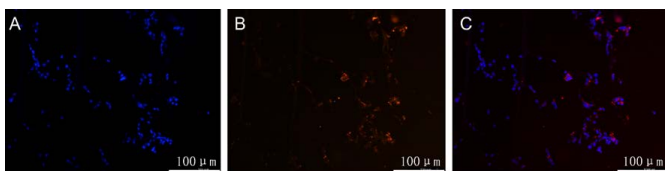
Figure 1 | General observation and observation of histological staining of acellular cartilage extracellular matrix scaffold



图注: A 为复苏 1 d 的 M_0 型巨噬细胞; B 为复苏 4 d 的 M_0 型巨噬细胞

图 2 | M_0 型巨噬细胞形态观察

Figure 2 | Morphological observation of M_0 macrophages



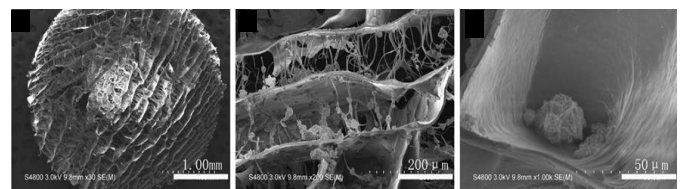
图注: A 为 DAPI 染色, B 为 CD68 特异染色, C 为 A 和 B 叠加图。细胞 - 支架复合物中有 M_0 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD68 阳性表达

图 3 | 脱细胞软骨细胞外基质支架上巨噬细胞特征性表面标志物 CD68 免疫荧光染色观察

Figure 3 | Immunofluorescence staining of macrophage specific marker CD68 on acellular cartilage extracellular matrix scaffold

3 讨论 Discussion

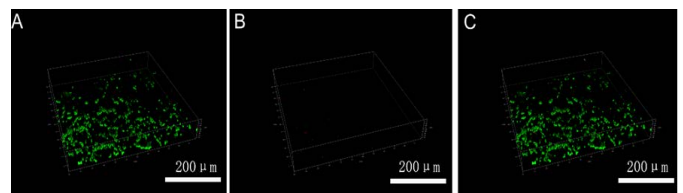
巨噬细胞是免疫系统的多功能和可塑性效应细胞, 参与多种免疫功能, 包括清除病原体或凋亡细胞、激活和化解炎症及组织愈合, 巨噬细胞一直被认为是重要的免疫效应细胞。越来越多的证据表明, 从炎症性 M_1 表型到抗炎 M_2 表型的适当转变有利于软骨内骨化的骨再生^[19-20]。巨噬细胞所处的微环境不同会出现不同的极化状态。一般情况下, 巨噬细胞在脂多糖、 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 和粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子等炎症因子刺激时极化为 M_1 型巨噬细胞, 能被 Toll 样受体 4、胶原结构巨噬细胞受体、CD86 等识别, 分泌促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 12、白细胞介素 6、诱导性一氧化氮合酶等发挥杀菌、杀死肿瘤细胞的功能^[21]。巨噬细胞在白细胞介素 10、白细胞介素 13、转化生长因子 β 等抗炎性因子或细胞因子的刺激下可极化为 M_2 型巨噬细胞,



图注: 复合物中的巨噬细胞为原来的圆形或类圆形, 沿着支架的管状排列, 广泛分布在支架的表面及内部结构中

图 4 | 巨噬细胞 - 脱细胞软骨细胞外基质支架复合物扫描电镜图

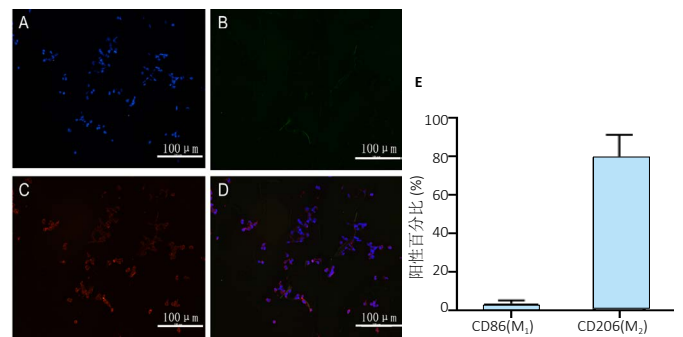
Figure 4 | Scanning electron microscopy of macrophage-acellular cartilage extracellular matrix scaffold complex



图注: 图 A 显示大多数为活细胞, 呈绿色荧光染色; B 显示极少数死细胞, 呈红色荧光染色; C 为 A 和 B 叠加图

图 5 | 巨噬细胞 - 脱细胞软骨细胞外基质支架复合物死 / 活细胞染色观察

Figure 5 | Observation of dead/living cell staining of macrophage-acellular cartilage extracellular matrix scaffold complex



图注: A 为 DAPI 染色; B 为 CD86 特异染色; C 为 CD206 特异染色; D 为 A、B 和 C 叠加图; E 为巨噬细胞特征性表面标志物 CD206 与 CD86 阳性百分比 ($n=5$)

图 6 | 脱细胞软骨细胞外基质支架上巨噬细胞特征性表面标志物 CD206 与 CD86 免疫荧光染色观察

Figure 6 | Immunofluorescence staining of macrophage specific markers CD206 and CD86 on acellular cartilage extracellular matrix scaffold

能被 CD163、CD206 和 FIZZ1、精氨酸酶 1 等识别, 分泌白细胞介素 10、转化生长因子 β 等, 发挥抗感染、促进组织再生和修复等功能^[22]。

ACECM 支架取自天然软骨组织, 所以可以更好地为种子细胞提供生长、繁殖、分化的微环境, 又经过脱细胞的处理, 可以在最大限度上去除其原有的免疫原性, 保留细胞外基质中的胶原及蛋白聚糖等有利于细胞增殖分化的成分^[23]。在前期研究的基础上, 此次实验旨在探究猪来源 ACECM 支架对小鼠巨噬细胞系表型极化的调控。为确保实验室前期所制备的 ACECM 支架中无细胞残留, 且其结构和成分均适合细胞生长, 将 ACECM 支架进行了扫描电镜和组织化学染色 (苏木精 - 伊红染色、甲苯胺蓝染色、番红 O 染色、天狼星红染色) 处理, 结果证明了该支架中无细胞残留, 其成分均得到很好的保留。接下来, 将 M_0 型巨噬细胞接种至 ACECM 支架中构

建细胞-支架复合物,为观察 M_0 型巨噬细胞在 ACECM 支架上的生长情况,取在体外极化诱导 4 d 的细胞-支架复合物,扫描电镜观察显示细胞-支架复合物中的巨噬细胞仍为原来的圆形或类圆形,沿着支架的管状排列,广泛分布在支架的表面及内部结构中,巨噬细胞在 ACECM 支架上黏附良好;死/活细胞染色共聚焦观察显示,ACECM 支架上附着的大部分细胞为绿色荧光的活细胞,仅有少数细胞为红色荧光的死细胞,巨噬细胞在 ACECM 支架上生长良好,且具有很高的存活性。为进一步探究 ACECM 支架对巨噬细胞的极化诱导能力,取体外极化诱导 4 d 的细胞-支架复合物进行免疫荧光染色观察, M_1 型巨噬细胞用其特征性表面标志物 CD86 标记(绿色), M_2 型巨噬细胞用其特征性表面标志物 CD206 标记(红色),荧光显微镜观察可见细胞-支架复合物中有 M_2 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD206(红色)的高阳性表达,而 M_1 型巨噬细胞特征性表面标志物 CD86(绿色)呈弱阳性甚至没有表达,即 M_0 型巨噬细胞可被诱导极化成修复性 M_2 型巨噬细胞,这为软骨组织的再生提供了良好的免疫微环境,对软骨再生具有重要意义。

天然的细胞外基质含有胶原、蛋白聚糖、透明质酸及其他非胶原蛋白和糖蛋白,以及多种生长因子、细胞因子和蛋白酶等成分。透明质酸是天然细胞外基质中最重要的糖胺聚糖之一,完整的高分子量透明质酸具有显著的抗炎作用,可诱导巨噬细胞产生白细胞介素 10,而受损的低分子量透明质酸可促进促炎表型,从而刺激肿瘤坏死因子 α 的表达^[24]。硫酸乙酰肝素是另一种重要的糖胺聚糖,可与细胞外基质蛋白结合形成蛋白聚糖,也可以与免疫系统相互作用,调节细胞黏附、免疫细胞因子的可获得性和白细胞的迁移^[25]。由于实验采用湿法粉碎、差速离心方法制备 ACECM,研究团队前期研究结果证实 ACECM 可以很好地保留这些具有极化诱导潜能的成分^[15, 17-18],因此猜测 ACECM 支架极化诱导的机制也可能与此类似。

研究存在着两点局限性:第一,只初步证实 ACECM 支架可以促进 M_0 型巨噬细胞激活为 M_2 型巨噬细胞,但未阐明具体极化诱导机制,未来需要进一步研究,阐明诱导机制;第二,仅为体外研究,未来需要进一步的体内实验验证。

ACECM 支架可以极化诱导 M_0 型巨噬细胞为 M_2 型巨噬细胞,为 ACECM 支架通过免疫调节促进组织再生提供新的研究思路。

作者贡献: 郭全义和田广招进行实验设计,实验实施为李珺琦,实验评估为李珺琦、田广招、陈明学,资料收集为王皓、刘舒云、睦翔、黄靖香、李明,李珺琦成文,田广招、陈明学审核。

经费支持: 该文章接受了“国家重点研发计划项目(2018YFC1105900);国家自然科学基金委员会资助项目(81772319)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

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。

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。

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

- JOHNSTONE B, ALINI M, CUCCHIARINI M, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater.*2013;25:248-267.
- 张彬,沈师,鲜海,等.3D 打印制备 PLGA/脱细胞软骨细胞外基质支架材料及其理化特性研究[J].中国修复重建外科杂志,2019,33(8):1011-1018.
- THERET M, MOUNIER R, ROSSI F. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. *Development.*2019;146(9):dev156000.
- BROWN BN, RATNER BD, GOODMAN SB, et al. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials.*2012;33(15):3792-3802.
- JULIER Z, PARK AJ, BRIQUEZ PS, et al. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater.*2017;53:13-28.
- 朱方强,陈民佳,朱明,等.炎症与组织再生修复[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2017,12(1):72-76.
- BROWN BN, HASCHAK MJ, LOPRESTI ST, et al. Effects of age-related shifts in cellular function and local microenvironment upon the innate immune response to implants. *Semin Immunol.*2017;29:24-32.
- DZIKI JL, WANG DS, PINEDA C, et al. Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype. *J Biomed Mater Res A.*2017;105(1):138-147.
- MATSUI H, SOPKO NA, HANNAN JL, et al. M1 Macrophages Are Predominantly Recruited to the Major Pelvic Ganglion of the Rat Following Cavernous Nerve Injury. *J Sex Med.*2017;14(2):187-195.
- 周静.激活素 A 诱导树突状细胞分化及巨噬细胞成熟的作用研究[D].长春:吉林大学,2009
- TIAN L, LI W, YANG L, et al. Cannabinoid Receptor 1 Participates in Liver Inflammation by Promoting M1 Macrophage Polarization via RhoA/NF- κ B p65 and ERK1/2 Pathways, Respectively, in Mouse Liver Fibrogenesis. *Front Immunol.*2017;8:1214.
- WANG LX, ZHANG SX, WU HJ, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol.*2019;106(2):345-358.
- LI J, LIU Y, XU H, et al. Nanoparticle-Delivered IRF5 siRNA Facilitates M1 to M2 Transition, Reduces Demyelination and Neurofilament Loss, and Promotes Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. *Inflammation.*2016;39(5):1704-1717.
- 徐志鹏,左国平,靳建亮.巨噬细胞异质性及其在炎症调控中的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(12):1711-1714.
- ZHANG Y, LIU S, GUO W, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis Cartilage.*2018;26(7):954-965.
- ZHENG X, LU S, ZHANG W, et al. Mesenchymal stem cells on a decellularized cartilage matrix for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.*2011;16(3):593-602.
- YANG Q, PENG J, GUO Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials.*2008;29(15):2378-2387.
- 鹿亮,刘彬,尚希福,等.脱细胞软骨细胞外基质取向支架复合软骨细胞构建组织工程软骨的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2018,32(3):291-297.
- SCHLUNDT C, EL KHASSAWNA T, SERRA A, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone.*2018;106:78-89.
- SICARI BM, DZIKI JL, SIU BF, et al. The promotion of a constructive macrophage phenotype by solubilized extracellular matrix. *Biomaterials.*2014;35(30):8605-8612.
- MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.*2014;41(1):14-20.
- GORDON S, MARTINEZ FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.*2010;32(5):593-604.
- 肖统光,张一民,郭维民,等.细胞外基质来源支架在软骨组织工程中的应用[J].中国组织工程研究,2016,20(38):5737-5744.
- RAYAHIN JE, BUHRMAN JS, ZHANG Y, et al. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng.*2015;1(7):481-493.
- COLLINS LE, TROEBERG L. Heparan sulfate as a regulator of inflammation and immunity. *J Leukoc Biol.*2019;105(1):81-92.