

基于脱细胞方法制备 3D 植物肝组织工程支架及表征

胡婧婧^{1,2}, 何松霖¹, 张大旭^{1,2}, 赵烁^{1,2}, 史潇楠^{1,2}, 李伟龙¹, 叶淑君¹, 王静怡¹, 郭全义^{1,2}, 阎丽¹<https://doi.org/10.12307/2024.588>

投稿日期: 2023-11-17

采用日期: 2023-12-23

修回日期: 2024-01-17

在线日期: 2024-02-21

中图分类号:

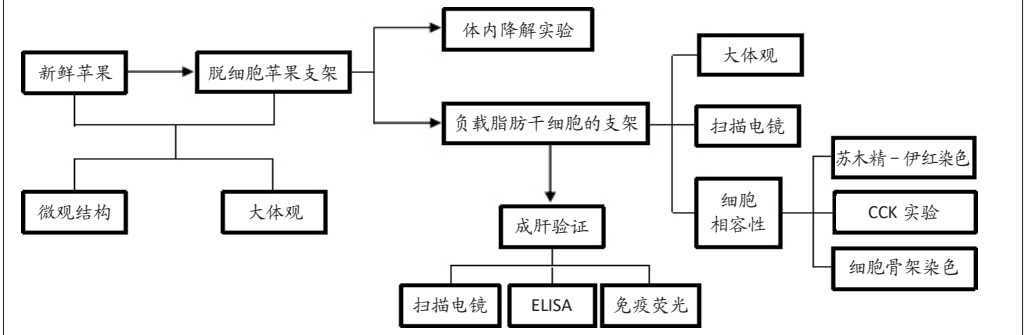
R459.9; R318; R331

文章编号:

2095-4344(2024)29-04645-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 采用脱细胞法制备三维植物肝组织工程支架



文题释义:

脱细胞方法: 是一种通过物理、化学和生物酶法去除组织或器官中的细胞成分, 以消除抗原性, 同时保留器官的微观三维结构和含有生物活性的细胞外基质的技术。经过脱细胞处理获得的组织衍生脱细胞生物材料是组织工程应用中的理想选择。

植物脱细胞支架: 经过脱细胞处理获得, 保留了原有的三维结构和生物活性成分, 能够很好地模拟体内微环境, 具有良好的生物相容性。植物脱细胞支架来源丰富、制作简单, 具有显著的经济及环境友好优势。

摘要

背景: 组织工程为肝衰竭这一临床困境带来了新的希望, 通过简单的制备方法制备植物脱细胞纤维支架对肝脏组织工程具有重要意义。

目的: 采用新鲜苹果切片和十二烷基硫酸钠溶液制备苹果组织脱细胞支架材料, 并评估其生物相容性。

方法: 将新鲜苹果分别采用磷酸盐缓冲液和十二烷基硫酸钠溶液进行脱细胞处理, 然后用磷酸盐缓冲液进行脱毒获得处理后的苹果组织和苹果脱细胞支架材料, 然后在扫描电镜下观察苹果材料的脱细胞效果。实验从BALB/C小鼠腹股沟脂肪中提取脂肪干细胞, 并且通过流式细胞术鉴定其干细胞相关标记物(CD45, CD34, CD73, CD90, CD105)的表达。然后分为无支架对照组和有支架组, 在两组中接种等量脂肪干细胞, 通过CCK-8、苏木精-伊红染色、鬼笔环肽骨架染色评价该脱细胞支架与脂肪干细胞的生物相容性, 在光学显微镜、扫描电镜下观察细胞在支架上的黏附及生长情况。然后将支架分为非诱导组 and 成肝诱导组, 将脂肪干细胞种植在脱细胞苹果支架上, 分别在普通培养基和成肝诱导培养基中培养14 d后进行对比, 通过肝细胞标记物(白蛋白、细胞角蛋白18、细胞色素P450家族1A家族1)进行免疫荧光染色, 通过酶联免疫吸附实验来检测白蛋白、甲胎蛋白的分泌情况, 并通过扫描电镜观察支架上诱导培养的细胞形态, 验证该脱细胞支架材料上肝细胞相关蛋白的表达。最后, 实验通过将钴60照射消毒后的苹果脱细胞支架移植于小鼠肝脏表面, 28 d后通过大体观及苏木精-伊红染色观察该支架的降解情况。

结果与结论: ①扫描电镜结果显示, 脱细胞后的苹果支架材料具有约100 μm大小的孔隙结构, 不存在残余细胞。②通过流式细胞学鉴定, 提取培养的细胞为脂肪间充质干细胞。③CCK-8结果表明, 所制备的苹果组织脱细胞支架材料无细胞毒性; 苏木精-伊红染色和鬼笔环肽骨架染色观察到脂肪间充质干细胞能够在苹果组织脱细胞支架上黏附和聚集生长。④免疫荧光染色、酶联免疫吸附实验结果显示, 培养在苹果组织脱细胞支架上的脂肪间充质干细胞高表达白蛋白、甲胎蛋白、细胞角蛋白18及细胞色素P450家族1A家族1肝脏相关蛋白, 说明被诱导分化为了具有肝细胞功能的肝细胞样细胞。⑤干预7 d时植入的苹果脱细胞支架与肝脏融合, 部分支架已经降解, 干预28 d时苹果脱细胞支架已完全降解, 被新生组织替代。⑥结果表明, 来源于苹果组织制备的脱细胞支架材料具有良好的生物相容性, 可促进脂肪间充质干细胞的增殖、黏附及成肝细胞分化。

关键词: 植物组织; 支架; 脱细胞; 肝衰竭; 脂肪间充质干细胞; 组织工程; 肝细胞样细胞

Preparation and characterization of 3D plant-based scaffold based on decellularization method in liver tissue engineering

Hu Jingjing^{1,2}, He Songlin¹, Zhang Daxu^{1,2}, Zhao Shuo^{1,2}, Shi Xiaonan^{1,2}, Li Weilong¹, Ye Shujun¹, Wang Jingyi¹, Guo Quanyi^{1,2}, Yan Li¹¹Second Medical Center and National Clinical Research Center of Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Institute of

¹解放军总医院第二医学中心老年医学科, 北京市 100853; ²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: 胡婧婧, 女, 1996年生, 汉族, 解放军总医院在读硕士, 主要从事肝脏再生智能化材料相关方向的研究。

通讯作者: 阎丽, 博士, 主任医师, 教授, 解放军总医院第二医学中心老年医学科, 北京市 100853

共同通讯作者: 郭全义, 博士, 主任医师, 教授, 解放军总医院第二医学中心老年医学科, 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/0000-0001-8795-2466> (胡婧婧); <https://orcid.org/0000-0001-8881-1921> (阎丽); <https://orcid.org/0000-0001-7154-2227> (郭全义)

资助: 国家重点研发计划课题(2019YFA0110600), 项目负责人: 郭全义; 国家自然科学基金项目(31971263), 项目负责人:

阎丽

引用本文: 胡婧婧, 何松霖, 张大旭, 赵烁, 史潇楠, 李伟龙, 叶淑君, 王静怡, 郭全义, 阎丽. 基于脱细胞方法制备 3D 植物肝组织工程支架及表征 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(29):4645-4651.



Orthopedics, Beijing Key Lab of Regenerative Medicine in Orthopedics, Key Laboratory of Musculoskeletal Trauma & War Injuries PLA, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Hu Jingjing, Master candidate, Second Medical Center and National Clinical Research Center of Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; Institute of Orthopedics, Beijing Key Lab of Regenerative Medicine in Orthopedics, Key Laboratory of Musculoskeletal Trauma & War Injuries PLA, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Yan Li, MD, Chief physician, Professor, Second Medical Center and National Clinical Research Center of Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Co-corresponding author: Guo Quanyi, MD, Chief physician, Professor, Second Medical Center and National Clinical Research Center of Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; Institute of Orthopedics, Beijing Key Lab of Regenerative Medicine in Orthopedics, Key Laboratory of Musculoskeletal Trauma & War Injuries PLA, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract

BACKGROUND: Tissue engineering has brought new hope to the clinical challenge of liver failure, and the preparation of plant-derived decellularized fiber scaffolds holds significant importance in liver tissue engineering.

OBJECTIVE: To prepare apple tissue decellularized scaffold material by using fresh apple slices and a solution of sodium dodecyl sulfate, and assess its biocompatibility.

METHODS: Fresh apples were subjected to decellularization using phosphate buffer saline and sodium dodecyl sulfate solution, separately. Afterwards, the decellularized apple tissues and apple decellularized scaffold materials were decontaminated with phosphate buffer saline. Subsequently, scanning electron microscopy was used to assess the effectiveness of decellularization of the apple materials. Adipose-derived mesenchymal stem cells were extracted from the inguinal fat BALB/C of mice, and their expression of stem cell-related markers (CD45, CD34, CD73, CD90, and CD105) was identified through flow cytometry. The cells were then divided into a scaffold-free control group and a scaffold group. Equal amounts of adipose-derived mesenchymal stem cells were seeded onto both groups. The biocompatibility of the decellularized scaffold with adipose-derived mesenchymal stem cells was evaluated using CCK-8 assay, hematoxylin-eosin staining, and phalloidine staining. Cell adhesion and growth on the scaffold were observed under light microscopy and scanning electron microscopy. Furthermore, the scaffold was subdivided into the non-induced group and the hepatogenic-induced group. Adipose-derived mesenchymal stem cells were cultured on the decellularized apple scaffold, and they were cultured for 14 days in regular culture medium or hepatogenic induction medium for comparison. Immunofluorescent staining using liver cell markers, including albumin, cytokeratin 18, and CYP1A1, was performed. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the secretion of alpha fetoprotein and albumin. Additionally, scanning electron microscopy was employed to observe the morphology of the induced cells on the scaffold, verifying the expression of liver cell-related genes on the decellularized scaffold material. Finally, the cobalt-60 irradiated and sterilized decellularized apple scaffolds were transplanted onto the surface of mouse liver and the degradation of the scaffold was observed by gross observation and hematoxylin-eosin staining after 28 days.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The scanning electron microscopy results revealed that the decellularized apple scaffold material retained a porous structure of approximately 100 μm in size, with no residual cells observed. (2) Through flow cytometry analysis, the cultured cells were identified as adipose-derived mesenchymal stem cells. (3) CCK-8 assay results demonstrated that the prepared decellularized apple tissue scaffold material exhibited no cytotoxicity. Hematoxylin-eosin staining and phalloidine staining showed that adipose-derived mesenchymal stem cells were capable of adhering and proliferating on the decellularized apple tissue scaffold. (4) The results obtained from immunofluorescence staining and enzyme-linked immunosorbent assay revealed that adipose-derived mesenchymal stem cells cultured on the decellularized apple scaffolds exhibited elevated expression of liver-specific proteins, including albumin, alpha-fetoprotein, cytokeratin 18, and CYP1A1. These results suggested that they were induced differentiation into hepatocyte-like cells possessing functional characteristics of liver cells. (5) The decellularized apple scaffold implanted at 7 days has integrated with the liver, with partial degradation of the scaffold observed. By 28 days, the decellularized apple scaffold has completely degraded and has been replaced by newly-formed tissue. (6) The results indicate that the decellularized scaffold material derived from apple tissue demonstrates favorable biocompatibility, promoting the proliferation, adhesion, and hepatic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells.

Key words: plant tissue; scaffold; decellularization; liver failure; adipose-derived mesenchymal stem cell; tissue engineering; hepatocyte-like cell

Funding: National Key Research and Development Plan Project, No. 2019YFA0110600 (to GQY); National Natural Science Foundation of China, No. 31971263 (to YL)

How to cite this article: HU JJ, HE SL, ZHANG DX, ZHAO S, SHI XN, LI WL, YE SJ, WANG JY, GUO QY, YAN L. Preparation and characterization of 3D plant-based scaffold based on decellularization method in liver tissue engineering. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(29):4645-4651.

0 引言 Introduction

目前,肝衰竭的治疗方式主要有内科综合治疗、人工肝治疗和原位肝移植治疗等^[1-8]。内科综合治疗肝病目前缺乏特效药物,原位肝移植受供肝的缺乏等因素限制无法在临床广泛应用,人工肝治疗则仅仅是提供临时的替代或过渡治疗,无法达到临床治愈的目的^[9-10]。近年来,组织工程技术的发展,为治疗肝脏疾病提供了一种新型治疗策略,有可能克服目前临床治疗的局限性^[11-14]。在各种类型的种子细胞中,脂肪间充质干细胞因显著的多能分化能力和易于获取,以及改变微环境以减轻肝损伤和促进肝组织再生的能力而受到高度重视^[15]。然而,脂肪间充质干细胞在肝脏上的直接应用一直伴随着血栓形成和细胞保留不足等问题^[16]。为了成功生成工程肝组织,研究人员通常使用生物材料联合种子细胞植入损伤肝脏,但选择适宜的支架材料仍是肝脏组织工程所面临的重要问题^[17-18]。

组织工程中所选择的生物材料应尽可能的去模拟体内微环境,立体多孔的结构可为细胞的代谢提供结构支撑,保证营养物质更好的交换,促进细胞的黏附和增殖,利于组织的

再生^[19]。对于肝脏组织工程,生物材料除了应具有生物相容性外,还应具有能够模拟肝脏组织结构的稳定三维微环境,以及能够与肝脏重建血管以进行物质交换和废物代谢^[20-23]。为了实现此目的,血管系统的重建至关重要^[24-26]。目前,基于3D打印的方法和基于动物脱细胞组织的方法由于存在精度不足、成本昂贵和伦理等问题,并不能满足这一需求^[27-29]。然而有研究表明,植物和动物组织的脉管系统都遵循默里定律:在有限体积内连接的多孔网络将所有毛孔的运输阻力降至最低,并确保整个网络的顺畅传输^[30-31]。近年来,植物基材料在组织再生中的应用逐渐增加,主要是由于其制备简单、可获得性广且生物相容性好^[32-34]。然而,目前尚无关于在肝组织工程中使用植物性材料构建血管系统的报道。细胞不仅围绕植物脉管系统生长,同时植物支架的微观结构可引导细胞行为、维持细胞形态和功能^[35-36]。在没有任何促血管生成因子的情况下,未经修饰的植物脱细胞材料在体内具有良好的生物相容性和促血管形成能力^[37-39]。因此,植物脱细胞支架有望成为组织工程中潜在的生物材料,帮助解决血管网络重建的难题。

实验首先利用扫描电镜观察苹果纤维素支架的微观结构,发现苹果纤维素支架和肝小叶具有类似多面体腔的微观结构;然后通过与脂肪干细胞共培养对其进行细胞相容性和生物学性能评估,并进行体外成肝诱导分化。此外,实验将苹果脱细胞支架移植于小鼠肝脏表面,28 d后通过大体观及苏木精-伊红染色观察该支架的降解情况,探究其作为肝脏组织工程支架的可行性,为组织工程材料的选择提供新的思路,为体内修复受损肝脏相关实验研究提供理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物实验,评估制备的苹果脱细胞支架的生物相容性,独立样本 *t* 检验,单因素方差分析和 Bonferroni 事后检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 1 月至 2023 年 11 月在中国人民解放军总医院第一医学中心骨科研究所完成。

1.3 材料 新鲜苹果,品种:红富士,产地:山东省烟台市。

1.3.1 实验动物 BALB/c 乳鼠 10 只,6-8 周龄 BALB/c 小鼠 20 只,雌雄不限,均购于中国人民解放军总医院实验动物中心,合格证号:SCXK(京)2019-0010。实验得到中国人民解放军总医院动物实验伦理委员会批准,批准号:2019YFA010600,批准时间:2019-03-05。

1.3.2 实验主要试剂及仪器 DMEM/F-12 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗(美国 Gibco 公司);体积分数 0.25% 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁公司);DAPI 染液(美国 Molecular Probes 公司);苏木精-伊红染色液、十二烷基硫酸钠溶液(北京索莱宝科技有限公司);多聚甲醛(北京化学试剂有限公司);酶联免疫吸附试验试剂盒(北京诚林生物科技有限公司);Actin 微丝红色荧光探针(上海碧云天生物技术有限公司);Alexa Fluor® 488 二抗、Anti-CYP1A1、Anti-Albumin(英国 Abcam 公司),Anti-Cytokeratin18(美国 Cell Signaling 公司);扫描电子显微镜(日本 Hitachi S-4800 公司);EPOCH TAKE 3 酶标仪(美国 BioTek 公司);激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)等。

1.4 实验方法

1.4.1 制备苹果组织脱细胞支架 将新鲜的苹果切成 3 mm 厚的薄片,弃去靠近果核处苹果组织后将薄片切成直径为 1.5 cm 的圆形片。将苹果片分为 2 组,其中一组为磷酸盐缓冲液对照组,另一组为支架组。磷酸盐缓冲液对照组置于磷酸盐缓冲液中,支架组置于含有体积分数 1% 十二烷基硫酸钠溶液的磷酸盐缓冲液中,二者连续振荡 48 h,每 12 h 更换 1 次液体。然后将两组置于磷酸盐缓冲液中连续振荡 48 h 进行脱毒。随后,将获得的脱细胞苹果组织在钴 60 射线照射后立即使用,或在 4 °C 冰箱中储存不超过 1 周。将得到的磷酸盐缓冲液处理的苹果组织与脱细胞苹果组织分别在电镜下观察微观结构。

1.4.2 苹果组织脱细胞支架的理化性质评估 取新鲜及脱细胞后的苹果组织,观察脱细胞处理前后苹果组织的大体形态,之后经过冻干及真空喷金处理于扫描电镜下观察脱细胞前后

实验中使用的脱细胞支架材料介绍

项目	材料名称
来源	新鲜苹果(品种:红富士,产地:山东省烟台市)
组成成分	纤维素
材料外形	直径为 1.4 cm 的圆片,偏向透明状
制备方法	使用体积分数 1% 十二烷基硫酸钠溶液进行脱细胞 48 h,然后在磷酸盐缓冲液连续振荡 48 h 脱毒制备而成
理化性质	不溶于水,吸水性强
功能	为细胞提供三维立体结构,为组织再生提供支撑作用
不良反应	未知

苹果支架的微观结构并采集照片。

1.4.3 小鼠脂肪间充质干细胞的分离培养和鉴定 取 BALB/c 雄性 3 d 乳鼠 10 只,在无菌条件下分离腹股沟脂肪组织置于含有青霉素-链霉素双抗的磷酸盐缓冲液中,剔除小鼠脂肪组织周围的皮下与筋膜组织,将其剪成小于 1 cm³ 的碎块,置于含 1 mg/mL 的 I 型胶原酶的磷酸盐缓冲液中进行消化,加入培养基终止消化后,细胞重悬接种于 25 cm² 培养瓶,加入适量含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基,每隔 48-72 h 更换 1 次培养基。然后每日在显微镜下观察细胞生长情况,待细胞融合度达到 80%-90% 时进行传代培养至 P3 代备用。采用流式细胞术来鉴定所提取、培养的细胞是否为脂肪间充质干细胞。通过胰蛋白酶消化、收集培养的细胞,在 4 °C 下用体积分数 70% 乙醇固定细胞。用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤后,向样品中加入 500 μL 碘化丙啶染色剂,37 °C 条件下避光孵育 30 min。然后,使用流式细胞仪(BD FACS Celesta, USA)检测,最后使用 FlowJo 软件进行分析。

1.4.4 细胞接种至支架及培养 取 P3 代脂肪间充质干细胞,消化计数后种植于无菌的苹果脱细胞支架上,细胞密度为 1×10⁶ 个/支架,置于 37 °C 细胞培养箱中孵育 120 min 后细胞黏附于苹果脱细胞支架上,添加含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基置于 37 °C 恒温细胞培养箱中进行培养,每隔 48 h 换液 1 次,用于后续实验。

1.4.5 支架细胞毒性检测 细胞接种步骤同前。细胞密度 2 000 个/支架作为实验组,细胞密度 2 000 个/孔作为对照组(无支架),分别在 96 孔板中培养 1, 3, 5, 7 d 后,将支架在磷酸盐缓冲液中漂洗 2 遍,然后每孔加入含 10 μL CCK-8 溶液及含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 110 μL,置于恒温细胞培养箱中孵育 120 min 后,在紫外线 450 nm 波长处检测吸光度值。每组样品重复进行 3 次实验,结果取平均值。

1.4.6 支架上细胞的黏附情况和细胞形态观察 细胞接种步骤同前。脂肪间充质干细胞接种至苹果脱细胞支架中培养 5 d 后,以磷酸盐缓冲液清洗 3 次,取足量的 40 g/L 多聚甲醛溶液完全覆盖样品,固定 10 min,随后以磷酸盐缓冲液清洗 3 遍,加入适量鬼笔环肽染色工作液覆盖样品,室温下避光染色 30 min,磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍后加入 DAPI 染液覆

盖样品，避光条件下染色 15 min，最后于共聚焦显微镜下观察，采集图片。

1.4.7 支架上脂肪间充质干细胞的诱导分化 脂肪间充质干细胞接种至苹果脱细胞支架中培养 24 h 后，加入成肝诱导培养基（含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中加入 50 ng/mL 肝细胞生长因子，25 ng/mL 胰岛素样生长因子 4，30 ng/mL 抑瘤素 M，20 ng/mL 表皮生长因子，25 ng/mL 酸性成纤维细胞生长因子，10 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子，1× 胰岛素转铁蛋白硒）继续培养 14 d 后，在扫描电镜下观察支架上细胞黏附情况。与之前干细胞电镜进行对比，观察诱导后肝细胞样细胞的形态，通过酶联免疫吸附实验检测细胞上清中白蛋白、甲胎蛋白的分泌情况，对诱导后的细胞进行肝细胞标记物 [白蛋白、细胞角蛋白 18(CK18)、细胞色素 P450 家族 1 亚家族 1 (CYP1A1)] 免疫荧光染色，使用激光共聚焦显微镜进行观察，并用 Image J 软件统计荧光表达强度。

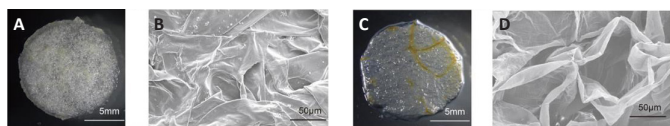
1.4.8 支架在小鼠体内的降解情况 6-8 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注射 50 mg/kg 体积分数 1% 戊巴比妥钠全身麻醉后，将苹果脱细胞支架植入到小鼠肝脏表面，并在体内观察，于 0，7，28 d 取材，在每个时间点通过肝脏组织大体观及苏木精-伊红染色病理图片来观察降解情况。

1.5 主要观察指标 苹果组织脱细胞前后的大体观、微观结构、细胞毒性及组织学染色比较，脱细胞苹果支架作为三维细胞培养支架对脂肪间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的影响，脱细胞苹果支架在小鼠肝脏表面的降解情况。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析。每组数据均使用直方图判断符合正态分布，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据差异用独立样本 t 检验，多组间数据差异采用单因素方差分析和 Bonferroni 事后检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过中国人民解放军总医院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 苹果组织脱细胞前后的大体观和微观结构 图 1A 为新鲜苹果组织的大体观，呈不透明状，图 1B 为脱细胞后的苹果组织，偏向透明状。为观察苹果组织脱细胞前后的微观结构，扫描电镜结果显示，图 1C 为未经脱细胞处理的新鲜苹果，为孔隙结构不明显的致密结构，图 1D 中可见脱细胞苹果支架具有疏松多孔、纤维交错纵横的微观结构。



图注：图 A，C 分别为苹果组织脱细胞前后的大体观（标尺为 5 mm）；B，D 分别为电镜下苹果组织脱细胞前后的微观结构（标尺为 50 μm）。致密的苹果组织在脱细胞处理后，呈现多孔的三维结构。

图 1 | 脱细胞前后苹果组织的大体观和微观结构

Figure 1 | Gross view and microscopic structure of apple tissue before and after decellularization

2.2 脂肪间充质干细胞鉴定结果 图 2A-D 中流式细胞术结果表明，从脂肪组织中提取到的细胞高表达 CD90，CD73，CD105 干细胞标记物，CD34，CD45 表达为阴性，说明该细胞为脂肪间充质干细胞。

2.3 脱细胞苹果支架的细胞毒性 在培养的第 1，5 天，实验组（支架上培养脂肪干细胞）与对照组（平面条件下培养脂肪干细胞）的细胞增殖吸光度值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；培养第 3，7 天时，实验组增殖细胞吸光度值大于对照组 ($P < 0.05$)，见图 2E。结果表明，实验所制备的苹果组织脱细胞支架没有细胞毒性，具有良好的生物相容性。

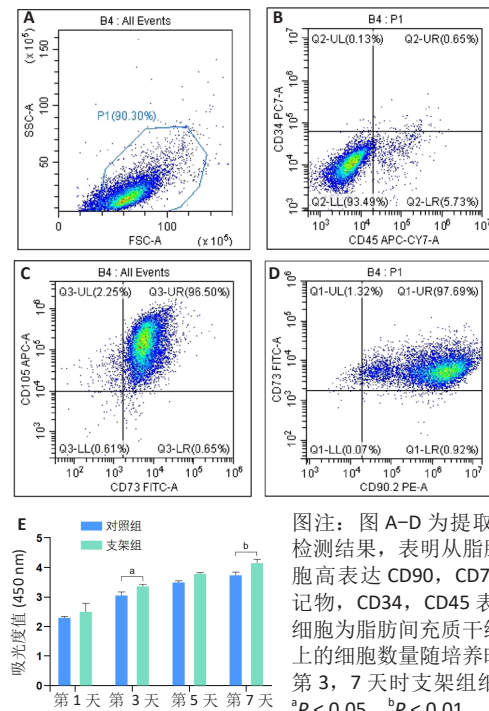
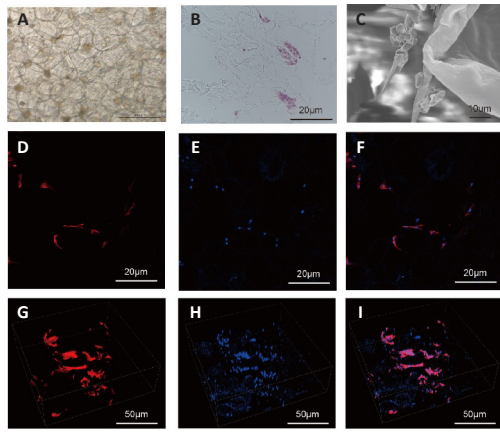


图 2 | 脂肪干细胞鉴定和苹果脱细胞支架毒性鉴定结果
Figure 2 | Identification of adipose-derived mesenchymal stem cells and toxicity assessment of decellularized apple scaffold

2.4 脱细胞苹果支架上的细胞黏附及形态观察结果 脂肪间充质干细胞在支架上培养 7 d 后，如图 3A-B 所示，光学显微镜下直接观察及苏木精-伊红染色后结果表明苹果脱细胞支架中有细胞存活。扫描电镜下可见脂肪干细胞黏附在支架纤维上聚集，成团生长，见图 3C。图 3D-I 中所示，共聚焦显微镜观察所见，鬼笔环肽（红色荧光）染色后的脂肪间充质干细胞能够在支架上黏附、生长、延伸，细胞形态呈梭形。以上结果说明将脱细胞苹果组织作为体外细胞培养支架，脂肪间充质干细胞能更好的伸展及增殖。

2.5 脱细胞苹果支架上的细胞诱导分化成肝细胞的能力 加入成肝诱导培养基继续培养 14 d 后，在扫描电镜下观察，诱导培养后的细胞较脂肪干细胞体积增大大约 10 倍，细胞黏附于纤维支架上分散分布，细胞形态呈现为椭圆形和多边形，见图 4A。为验证经过诱导培养后的细胞是否为肝细胞样细胞，实验收集了诱导后的细胞上清进行白蛋白、甲胎蛋白的酶联免疫吸附实验，图 4B 结果表明与对照组相比，实验组细胞



图注: 图 A 为光学显微镜下观察种植有脂肪干细胞的苹果脱细胞支架 (标尺为 200 μm); B 为苏木精 - 伊红染色 (标尺为 20 μm); C 为扫描电镜下观察支架上脂肪干细胞的黏附情况 (标尺为 10 μm), 可以看到细胞很好地黏附在支架上, 并且有成团分布, 生长空间充足; D, G 为细胞骨架 (标尺为 20 μm , 50 μm), 染色剂为鬼笔环肽; E, H 为细胞核染色 (标尺为 20 μm , 50 μm), 染色剂为 DAPI; F, I 为两种染色的合并图像 (标尺为 20 μm , 50 μm)。表明苹果脱细胞支架可以为脂肪干细胞提供良好的生长空间, 促进脂肪干细胞的黏附和迁移。

图 3 | 脂肪干细胞在苹果脱细胞支架上的生长状况

Figure 3 | Growth status of adipose-derived mesenchymal stem cells on decellularized apple scaffold

上清中白蛋白及甲胎蛋白的表达量明显增加, 在培养第 2, 5, 7, 14 天均高于对照组 ($P < 0.05$)。实验还对在苹果组织支架上诱导培养的细胞进行肝细胞标记物 (白蛋白、CK18、CYP1A1) 的免疫荧光染色, 细胞均能够表达肝细胞标记物, 见图 4C-L。以上结果表明在支架上诱导培养的细胞为具有部分肝细胞功能的肝细胞样细胞, 脱细胞苹果支架不影响脂肪间充质干细胞的干性。

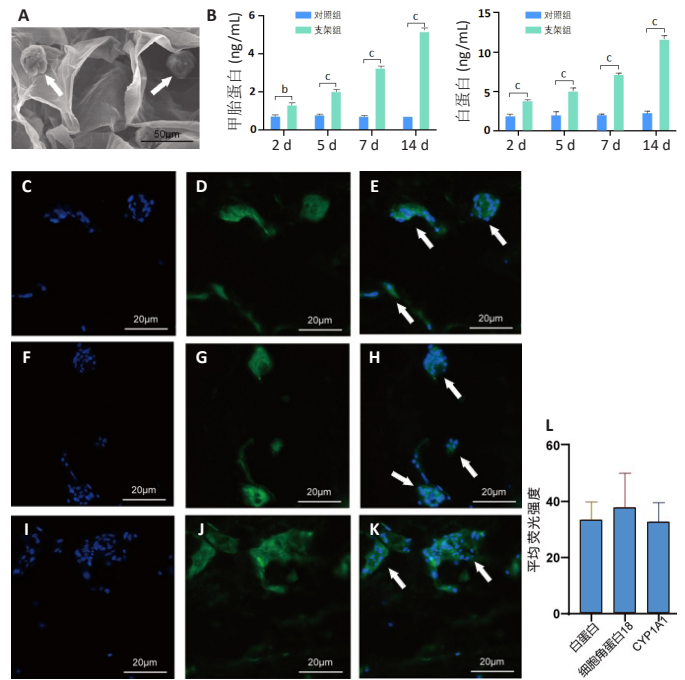
2.6 脱细胞苹果支架的生物相容性 由 CCK-8 实验、ELISA 实验、细胞染色及黏附实验结果可知, 苹果脱细胞支架具有良好的生物相容性。

2.7 脱细胞苹果支架的降解情况 培养 7 d 取材时发现支架已经与小鼠肝脏融合, 部分已降解, 培养 28 d 取材发现支架在体内降解, 被新生组织替代, 见图 5A-F。

3 讨论 Discussion

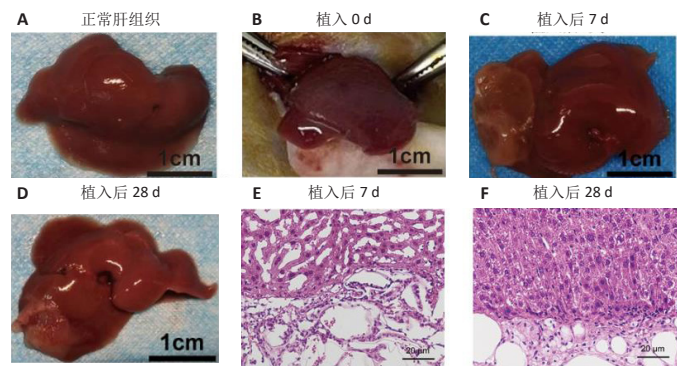
供肝缺乏、免疫排斥及术后并发症等因素限制了肝脏移植的临床广泛应用^[40-42], 近年来, 肝脏组织工程是治疗肝脏疾病最有潜力的方法^[43-45]。目前肝脏组织工程的支架材料主要涉及人工合成材料和天然生物材料。人工合成材料, 如聚己内酯、聚乳酸及聚二甲基硅氧烷等通过 3D 打印等技术来模拟组织微结构^[46-50], 具有优良的机械性能和可加工性, 但生物相容性较差、制作复杂、成本高昂。而天然生物材料包括海藻酸盐、壳聚糖、胶原蛋白和细胞外基质等^[51-55], 虽具有较好的生物相容性, 但存在伦理和免疫反应等问题。

此研究首次将苹果脱细胞支架作为肝组织工程的生物材料。结果表明, 苹果脱细胞支架作为肝脏组织工程材料具有 3 个主要优点: ①具有良好的生物相容性; ②与肝小叶微观结构类似的立体结构; ③制作成本低廉, 具有良好的经济效



图注: A 为扫描电镜下观察支架上脂肪干细胞诱导培养后的细胞形态 (标尺为 50 μm); B 为酶联免疫吸附实验检测显示, 诱导培养 14 d 内的细胞上清中甲胎蛋白及白蛋白分泌逐渐增加, 并且显著高于对照组, 说明细胞诱导为肝脏样细胞, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$; C-E 为脱细胞苹果支架上种植的脂肪干细胞诱导培养 14 d 后进行肝细胞标记物白蛋白免疫荧光染色 (标尺为 20 μm), 图 E 中箭头所指为白蛋白阳性细胞; F-H 为脱细胞苹果支架上种植的脂肪干细胞诱导培养 14 d 后进行肝细胞标记物 CK18 免疫荧光染色 (标尺为 20 μm), 图 H 中箭头所指为 CK18 阳性细胞; I-K 为脱细胞苹果支架上种植的脂肪干细胞诱导培养 14 d 后进行肝细胞标记物 CYP1A1 免疫荧光染色 (标尺为 20 μm), 图 K 中箭头所指为 CYP1A1 阳性细胞; L 为 Image J 分析后的绿色相对荧光强度, 白蛋白, CK18, CYP1A1 均高表达, 这表明脂肪干细胞在苹果脱细胞支架上被诱导为肝细胞样细胞。CK18 为细胞角蛋白 18, CYP1A1 为细胞色素 P450 家族 1 亚家族 1。

图 4 | 培养在苹果脱细胞支架上的脂肪干细胞可诱导分化为肝细胞样细胞
Figure 4 | Adipose-derived mesenchymal stem cells on the decellularized apple scaffold can be induced to differentiate into hepatic-like cells



图注: 图 A 为正常肝组织形态 (标尺为 1 cm); B 为刚植入时苹果脱细胞支架形态 (标尺为 1 cm); C 为植入后 7 d 苹果脱细胞支架形态 (标尺为 1 cm), 部分支架已经降解与肝脏融合; D 为植入后 28 d 苹果脱细胞支架形态 (标尺为 1 cm), 支架已降解; E 为植入后 7 d 苏木精 - 伊红染色图片 (标尺为 20 μm), 显示支架与肝脏融合, 支架部分降解; F 为植入后 28 d 苏木精 - 伊红染色图片 (标尺为 20 μm), 显示支架已完全降解, 被新生组织替代。

图 5 | 苹果脱细胞支架在小鼠体内的降解情况

Figure 5 | Degradation of decellularized apple scaffold in mice *in vivo*

益。植物组织经过脱细胞处理后能保持原有精细微观结构，并且可以促进细胞的增殖及分化^[56-60]。实验首先通过电镜表征发现了苹果脱细胞支架中的类肝小叶样结构。在通过流式细胞术鉴定提取到的脂肪干细胞后，CCK-8 实验发现，干预 7 d 内苹果脱细胞支架具有促进细胞增殖的作用，这证明了苹果脱细胞支架无毒，且具有促进细胞增殖作用。而在光学显微镜、苏木精 - 伊红染色、电镜和细胞骨架染色观察中，可以观察到干细胞聚集分布，并且能保持良好形态，这说明苹果脱细胞支架一方面可以促进脂肪干细胞的黏附和聚集，另一方面可以为细胞生长提供支撑和立体空间。在成肝诱导后，负载在支架上的干细胞分化为肝细胞样细胞，酶联免疫吸附实验和免疫荧光染色显示肝细胞标记物（白蛋白、甲胎蛋白、CK18 及 CYP1A1）显著表达，证明了其可以作为成肝诱导的生物活性支架。在体内的降解实验证明，在干预 28 d 时，苹果脱细胞支架可以逐步降解，与肝脏融合。这说明苹果脱细胞支架与肝脏具有良好的生物相容性。

综上所述，经过脱细胞处理后的苹果脱细胞支架无毒且具有良好的生物相容性和降解性，经济效益高。该支架的三维微结构有利于细胞黏附，帮助细胞维持立体形态，有利于细胞的增殖。该支架具有的类肝小叶样结构有利于干细胞向肝细胞分化，促进干细胞表达肝脏相关蛋白。因此，脱细胞苹果支架作为肝脏组织工程中新型的支架材料具有很高的应用潜能。在未来，一方面需要进一步加工探究其作为生物墨水的可能性，另一方面需进一步探究评估体内肝衰竭模型中的修复效果，完善肝脏再生修复的理论基础。

致谢：感谢解放军总医院第一医学中心骨科研究所提供的细胞实验平台，动物实验平台，实验仪器等各方面帮助。

作者贡献：实验设计为阎丽和郭全义。全体作者参与实验实施。实验评估为阎丽和郭全义。胡婧婧撰写成文。阎丽和郭全义校审并评估。资料收集为何松霖、张大旭、赵烁和史潇楠。

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。

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。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：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。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊投稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] WANG FS, FAN JG, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China. *Hepatology*. 2014;60(6):2099-2108.
- [2] XIAO J, WANG F, WONG NK, et al. Global liver disease burdens and research trends: analysis from a Chinese perspective. *J Hepatol*. 2019; 71(1):212-221.
- [3] TUJIOS S, STRAVITZ RT, LEE WM. Management of acute liver failure: update 2022. *Semin Liver Dis*. 2022;42(3):362-378.
- [4] AGARWAL B, CANIZARES RB, SALIBA F, et al. Randomized, controlled clinical trial of the DIALIVE liver dialysis device versus standard of care in patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol*. 2023; 79(1):79-92.
- [5] SALIBA F, BANARES R, LAESEN FS, et al. Artificial liver support in patients with liver failure: a modified DELPHI consensus of international experts. *Intensive Care Med*. 2022;48(10):1352-1367.
- [6] WANG Y, ZHENG Q, SUN Z, et al. Reversal of liver failure using a bioartificial liver device implanted with clinical-grade human-induced hepatocytes. *Cell Stem Cell*. 2023;30(5):617-631.
- [7] XU W, ZHU S, YANG L, et al. Safety and efficacy of double plasma molecular adsorption system with sequential low-volume plasma exchange in intermediate-stage hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *J Med Virol*. 2023;95(3):e28650.
- [8] GIGLIO MC, DOLCE P, YILMAZ S, et al. European Liver and Intestine Transplant Association (ELITA). Development of a model to predict the risk of early graft failure after adult-to-adult living donor liver transplantation: an ELTR study. *Liver Transpl*. 2023. doi: 10.1097/LVT.0000000000000312.
- [9] SARIN SK, CHOUDHURY A. Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13(3):131-149.
- [10] LUO J, LI J, LI P, et al. Acute-on-chronic liver failure: far to go-a review. *Crit Care*. 2023;27(1):259.
- [11] HONG G, KIM J, OH H, et al. Production of multiple cell-laden microtissue spheroids with a biomimetic hepatic-lobule-like structure. *Adv Mater*. 2021;33(36):e2102624.
- [12] BERNAL PN, BOUWMEESTER M, MADRID-WOLFF J, et al. Volumetric bioprinting of organoids and optically tuned hydrogels to build liver-like metabolic biofactories. *Adv Mater*. 2022;34(15):e2110054.
- [13] TAYMOUR R, CHICAIZA-CABEZAS NA, GELINSKY M, et al. Core-shell bioprinting of vascularized in vitro liver sinusoid models. *Biofabrication*. 2022. doi: 10.1088/1758-5090/ac9019.
- [14] HEYDARI Z, NAJIMI M, MIRZAEI H, et al. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*. 2020;9(2):304.
- [15] XU L, WANG S, SUI X, et al. Mesenchymal stem cell-seeded regenerated silk fibroin complex matrices for liver regeneration in an animal model of acute liver failure. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(17): 14716-14723.
- [16] FURLANI D, UGURLUCAN M, ONG L, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Mesenchymal stem cells and intravital microscopy*. *Microvasc Res*. 2009;77(3):370-376.
- [17] BHATIA SN, UNDERHILL GH, ZARET KS, et al. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med*. 2014;6(245):245sr2.
- [18] JIAN H, LI X, DONG Q, et al. In vitro construction of liver organoids with biomimetic lobule structure by a multicellular 3D bioprinting strategy. *Cell Prolif*. 2023;56(5):e13465.
- [19] HOSSEINI V, MAROUFI NF, SAGHATI S, et al. Current progress in hepatic tissue regeneration by tissue engineering. *J Transl Med*. 2019; 17(1):383.
- [20] JIANKANG H, DICHEN L, YAXIONG L, et al. Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5(1):453-461.
- [21] GRIGORYAN B, PAULSEN SJ, CORBETT DC, et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science*. 2019;364(6439):458-464.
- [22] CHANDRA P, ATALA A. Engineering blood vessels and vascularized tissues: technology trends and potential clinical applications. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(9):1115-1135.
- [23] WANG L, WANG C, WANG Z, et al. Transforming the spleen into a liver-like organ in vivo. *Sci Adv*. 2020;6(24):eaaz9974.

- [24] YANG W, CHEN Q, XIA R, et al. A novel bioscaffold with naturally-occurring extracellular matrix promotes hepatocyte survival and vessel patency in mouse models of heterologous transplantation. *Biomaterials*. 2018;177:52-66.
- [25] WU Q, LI Y, YANG Z, et al. Ectopic expansion and vascularization of engineered hepatic tissue based on heparinized acellular liver matrix and mesenchymal stromal cell spheroids. *Acta Biomater*. 2022;137:79-91.
- [26] LE GUILCHER C, MERLEN G, DELLAQUILA A, et al. Engineered human liver based on pullulan-dextran hydrogel promotes mice survival after liver failure. *Mater Today Bio*. 2023;19:100554.
- [27] LEE JW, CHOI YJ, YONG WJ, et al. Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. *Biofabrication*. 2016;8(1):015007.
- [28] KASTURI M, MATHUR V, GADRE M, et al. Three dimensional bioprinting for hepatic tissue engineering: from in vitro models to clinical applications. *Tissue Eng Regen Med*. 2023; 21(1):21-52.
- [29] ZHENG Y, CHEN J, CRAVEN M, et al. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:9342-9347.
- [30] ZHENG X, SHEN G, WANG C, et al. Bio-inspired Murray materials for mass transfer and activity. *Nat Commun*. 2017;8:14921.
- [31] GERSHLAK JR, HERNANDEZ S, FONTANA G, et al. Crossing kingdoms: using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2017;125:13-22.
- [32] CONTESSI NEGRINI N, TOFFOLETTO N, FARÈ S, et al. Plant tissues as 3D natural scaffolds for adipose, bone and tendon tissue regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:723.
- [33] CHENG YW, SHIWARSKI DJ, BALL RL, et al. Engineering aligned skeletal muscle tissue using decellularized plant-derived scaffolds. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(5):3046-3054.
- [34] HICKEY RJ, MODULEVSKY DJ, CUERRIER CM, et al. Customizing the shape and microenvironment biochemistry of biocompatible macroscopic plant-derived cellulose scaffolds. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(11):3726-3736.
- [35] BAI H, XIE B, WANG Z, et al. Application of the tissue-engineered plant scaffold as a vascular patch. *ACS Omega*. 2021;6(17):11595-11601.
- [36] FONTANA G, GERSHLAK J, ADAMSKI M, et al. Biofunctionalized plants as diverse biomaterials for human cell culture. *Adv Healthc Mater*. 2017. doi: 10.1002/adhm.201601225.
- [37] MODULEVSKY DJ, CUERRIER CM, PELLING AE. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157894.
- [38] S H A, MOHAN CC, P S U, et al. Decellularization and oxidation process of bamboo stem enhance biodegradation and osteogenic differentiation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;119:111500.
- [39] HICKEY RJ, PELLING AE. Cellulose biomaterials for tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:45.
- [40] SONG Z, HAN H, GE X, et al. Deficiency of neutrophil high-mobility group box-1 in liver transplant recipients exacerbates early allograft injury in mice. *Hepatology*. 2023;78(3):771-786.
- [41] KULKARNI AV, REDDY R, SHARMA M, et al. Healthcare utilization and outcomes of living donor liver transplantation for patients with APASL-defined acute-on-chronic liver failure. *Hepatol Int*. 2023;17(5):1233-1240.
- [42] SCHLEGEL A, VAN REEVEN M, CROOME K, et al. A multicentre outcome analysis to define global benchmarks for donation after circulatory death liver transplantation. *J Hepatol*. 2022;76(2):371-382.
- [43] KIM W, GWON Y, PARK S, et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioact Mater*. 2022;19:50-74.
- [44] LIU C, WANG L, XU M, et al. Reprogramming the spleen into a functioning 'liver' in vivo. *Gut*. 2022;71(11):2325-2336.
- [45] VELAZQUEZ JJ, LEGRAW R, MOGHADAM F, et al. Gene regulatory network analysis and engineering directs development and vascularization of multilineage human liver organoids. *Cell Syst*. 2021; 12(1):41-55.e11.
- [46] SPHABMIXAY P, RAREDON MSB, WANG AJ, et al. High resolution stereolithography fabrication of perfusable scaffolds to enable long-term meso-scale hepatic culture for disease modeling. *Biofabrication*. 2021. doi: 10.1088/1758-5090/ac23aa.
- [47] PROVIN C, TAKANO K, YOSHIDA T, et al. Low O₂ metabolism of HepG2 cells cultured at high density in a 3D microstructured scaffold. *Biomed Microdevices*. 2009;11(2):485-494.
- [48] GAO Y, CALLANAN A. Influence of surface topography on PCL electrospun scaffolds for liver tissue engineering. *J Mater Chem B*. 2021;9(38):8081-8093.
- [49] HE J, ZHOU C, XU X, et al. Scalable formation of highly viable and functional hepatocellular carcinoma spheroids in an oxygen-permeable microwell device for anti-tumor drug evaluation. *Adv Healthc Mater*. 2022;11(18):e2200863.
- [50] MA P, JIANG L, LUO X, et al. Hybrid polydimethylsiloxane (PDMS) incorporated thermogelling system for effective liver cancer treatment. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2623.
- [51] BADEKILA AK, PAI V, VIJAYAN V, et al. Engineering alginate/carboxymethylcellulose scaffolds to establish liver cancer spheroids: Evaluation of molecular variances between 2D and 3D models. *Int J Biol Macromol*. 2023;254(Pt 3):128058.
- [52] KHODABAKHSH AGHDAM S, KHOSHFETRAT AB, RAHBARGHAZI R, et al. Collagen modulates functional activity of hepatic cells inside alginate-galactosylated chitosan hydrogel microcapsules. *Int J Biol Macromol*. 2020;156:1270-1278.
- [53] SHIT A, PARK S, LEE Y, et al. Stimuli-responsive pressure-strain sensor-based conductive hydrogel for alleviated non-alcoholic fatty liver disease by scavenging reactive oxygen species in adipose tissue. *Acta Biomater*. 2023;171:406-416.
- [54] VASUDEVAN A, MAJUMDER N, SHARMA I, et al. Liver extracellular matrix-based nanofiber scaffolds for the culture of primary hepatocytes and drug screening. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023;9(11):6357-6368.
- [55] SONG Y, LIU C, XU X, et al. Chitosan-based multifunctional hydrogel with bio-adhesion and antioxidant properties for efficient wound hemostasis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023;234:113697.
- [56] CHEN Z, CHEN L, KHOO KS, et al. Exploitation of lignocellulosic-based biomass biorefinery: a critical review of renewable bioresource, sustainability and economic views. *Biotechnol Adv*. 2023;69:108265.
- [57] HACHIMI ALAOUI C, RÉTHORÉ G, WEISS P, et al. Sustainable biomass lignin-based hydrogels: a review on properties, formulation, and biomedical applications. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13493.
- [58] ISWARYA S, THEIVASANTHI T, GOPINATH SCB. Sodium alginate/hydroxyapatite/nanocellulose composites: synthesis and potentials for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2023;148:106189.
- [59] YE J, LI J, WANG X, et al. Preparation of bacterial cellulose-based antibacterial membranes with prolonged release of drugs: emphasis on the chemical structure of drugs. *Carbohydr Polym*. 2024;323:121379.
- [60] ZHENG Z, ZHANG H, QIAN K, et al. Wood structure-inspired injectable lignin-based nanogels as blood-vessel-embolic sustained drug-releasing stent for interventional therapies on liver cancer. *Biomaterials*. 2023; 302:122324.

(责任编辑: WJ, ZN, QY, YJ)