

去细胞方法及其在组织工程中的应用*

侯楠 朱力

(成都医学院第一附属医院耳鼻喉科 四川 成都 610500)

摘要:去细胞基质在组织工程及再生医学的大量应用为解决组织器官的修复和重建等难题带来了希望。去细胞方法大致可以分为三类:化学处理法、物理处理法及酶学处理法,且已经应用于组织工程及再生医学的各个方面。本文总结并分类目前常用的去细胞方法及其在组织工程各方面的应用,对目前国内外常用的去细胞方法及其在组织工程及再生医学中的应用进行回顾总结与分析。

关键词:去细胞;去细胞基质;组织工程

中图分类号:Q813,R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2010)02-381-03

Decellularized Methods and Its Application on Tissue Engineering*

HOU Nan, ZHU Li

(Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College, Chengdu, 610500 Sichuan, China)

ABSTRACT: Application of decellularized methods and decellularized matrix scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine bring hope to solve the problems of organ and tissue reparation and reconstruction. The methods of decellularization can be summarized as chemical methods, physical methods and enzymatic methods. And it has successfully been used in a variety of tissue engineering and regenerative medicine. this article summarized the regular decellularized methods and its application in a variety of tissue engineering and regenerative medicine and analyzed on the basis of recent related literatures inside and outside.

Key Words: Decellularization; Decellularized matrix; Tissue engineering

Chinese Library Classification (CLC): R318, Q813 **Document Code:** A

Article ID:1673-6273(2010)02-381-03

引言

近年来组织工程及再生医学的迅猛发展为组织与器官的修复和重建等难题提供了新的解决途径。组织工程的研究主要包括种子细胞和支架材料两大方面。其中种子细胞的体外培养技术已经相对成熟;如何构建出适应种子细胞生长所需的支架材料则成了组织工程研究的关键。理想的组织工程支架材料需有以下几方面特点:(1)良好的生物相容性和降解性;(2)具有三维立体多孔结构;(3)可塑性及一定的机械强度;(4)良好的材料-细胞界面。去细胞基质天然支架材料是一种广泛存在于物种间并能很好地被异种宿主耐受^[1],在体内容易被机体降解。其三维结构与体内细胞生长的天然环境接近,不仅可以起着支架材料的作用,而且具有特殊的生理功能,所包含的多种生长因子在组织修复和重建中有重要促进作用,即使经过去细胞制备过程处理仍有活性^[2]是细胞生长的理想环境。因此目前去细胞技术与方法的研究已越来越受到重视。

1 去细胞方法

去细胞化方法的目的在于有效的去除细胞及细胞核物质同时对剩余细胞外基质的副作用最小化,尽可能保留其成分、生物活性及机械活动的完整性而降低其免疫源性。去细胞方法的基本原理是运用物理方法或离子溶剂将细胞膜溶解,然后应

用酶学处理使细胞与细胞外基质分离,再用离子剂使细胞核与细胞外基质产生增溶作用,最后将细胞碎片移除^[2]。在这过程中进行机械搅拌可增强其效力。去细胞基质的获取可采取多种方法。目前常用的去细胞方法有物理处理法、化学处理法、酶学处理法。

1.1 化学方法

化学处理方法是目前使用最多的一类方法,包括离子去污剂,非离子去污剂,两性离子去污剂,酸碱处理法,低渗盐法及高渗盐法。

1.1.1 离子去污剂 离子去污剂能同时溶解细胞质及细胞核膜,但容易破坏蛋白质间相互作用使蛋白质发生变性。最常用的离子去污剂是十二烷基硫酸钠(SDS)、去氧胆酸钠及TritonX-200。

SDS能有效地从组织去除细胞成分,完全去除细胞核残留物及细胞质内蛋白,而保持胶原成分。Ott等^[3]曾用1% SDS经大鼠冠状动脉对大鼠离体心脏进行灌注,保留了心脏的天然结构,经鉴定胶原蛋白I、III、层粘连蛋白及弹性蛋白仍存在于薄层去细胞化细胞外基质中。纤维组成(网眼、支架、螺旋结构)及心肌细胞外基质的方向性均存在,同时心肌细胞被去掉。去氧胆酸钠也能有效去除细胞残留物,但与SDS相比对组织自身结构造成的破坏程度更大,一般不单独应用,而是与两性离子去污剂合用对神经组织行去细胞作用。TritonX-200与两性

* 基金项目:四川省教育厅基金(09ZC033)

作者简介:侯楠(1983-),女,硕士,医师,主要研究方向:组织工程喉气管,

E-mail:bihaichaoxin.hn@163.com

△通讯作者:侯楠, E-mail:bihaichaoxin.hn@163.com

(收稿日期:2010-09-06 接受日期:2010-09-30)

离子剂 S16、S10 合用也能使神经组织完全去细胞化^[4,5],其效果还优于去氧胆酸钠。也有报道将脱氧胆酸和 TritonX100 联合使用构建去细胞食道支架,结果发现脱氧胆酸钠能更有效保留支架原有特性^[6]。

1.1.2 非离子去污剂 非离子去污剂由于其对组织结构损害较小已广泛用于去细胞技术中。非离子去污剂破坏脂肪链间和脂蛋白间的相互作用,但保存了蛋白与蛋白之间的相互作用,因此经过非离子去污剂处理的器官或组织中剩余的蛋白质仍保留原有的功能构象。去细胞化技术中最常用的非离子去污剂是 TritonX-100。但使用此种溶剂进行去细胞化结果利弊兼有,其有效性还依赖于所要去细胞的组织^[7,9]。Grauss^[11]等用 Triton-X100 对猪心脏瓣膜进行去细胞处理,发现 TritonX-100 可以在 24 小时以后将细胞核内物质全部移除而保留瓣膜原有的结构。然而对细胞外基质成分鉴定后发现 TritonX-100 造成瓣膜组织的葡萄糖胺聚糖全部丢失,粘连蛋白和胶原蛋白含量降低。但也有研究报道单用 TritonX-100 对血管、筋膜及韧带等组织进行处理,第四天时仍未将细胞内容物有效去除。Woods^[8]等用 TritonX-100 对前十字交叉韧带进行处理 4 天以后硫酸葡萄糖胺聚糖却并未丢失,对组织进行组织学及免疫组化染色发现细胞支架弹力蛋白及胶原蛋白仍存在。但 Cartmell^[10]等用 TritonX-100 处理鼠尾肌腱 24 小时以后发现胶原蛋白从肌腱中分离出来,造成肌腱性质严重改变。由此看来 TritonX-100 虽然是一种有效的去细胞剂,但是其有效性还依赖于所要去细胞的组织及与其联合使用的去细胞技术。

1.1.3 两性离子去污剂 两性离子去污剂同时有着离子去污剂与非离子去污剂的特性。相对于非离子去污剂来说更容易使蛋白质变性。两性离子去污剂包括 CHAPS 缓冲液、SB-10 和 SB-16。CHAPS 缓冲液一般用于血管去细胞,经其处理后的血管经组织学检测保持正常血管的弹性胶原及组织学形。SB10、SB16 则用于周围神经去细胞,其一般与 TritonX-200 联合应用的方法进行去细胞化。此种联合应用的方法比 TritonX-100 与去氧胆酸钠联合应用对神经细胞外基质结构的影响更小^[4,5]。

1.1.4 酸碱处理法 去细胞技术中运用酸碱处理法主要是溶解掉细胞质成分及核酸如 RNA 和 DNA。比如:乙酸、过氧乙酸、盐酸、硫酸及氢氧化铵都能有效溶解细胞膜及细胞器。用浓度大约 0.1%-0.15%的过氧乙酸可以将猪小肠粘膜下层及膀胱输尿管粘膜层去细胞^[12]。Badylak^[13]、Hodde^[14]等分别对小肠粘膜下层和膀胱基底膜反复研究表明这两种物质是体外细胞培养较好的支架,在体外用过氧乙酸去细胞并且消毒后已成功地用于体外组织工程细胞培养。Burugapalli 等^[15]用机械法先后分离出胆囊壁环肌层及浆膜层下结缔组织,并用过氧乙酸与乙醇联合处理去细胞化,成功地制造出完整的胆囊网状细胞外基质,并证实弹力蛋白含量并未减少,也未对细胞外基质生物支架的生物活性造成不良影响。

1.1.5 低渗盐法及高渗盐法 低渗盐法和高渗盐法常用于组织或器官脱水而导致细胞溶解。Dahl 等^[7]曾将离体血管置于 Trizima 盐酸 /EDTA 低渗盐溶液中浸泡数小时,然后再在 Trizima 盐酸 /氯化钠 /EDTA 高渗盐溶液中浸泡数小时,发现能使细胞溶解,但由于组织中 DNA 有生物粘性容易附着在细胞外基质蛋白上,所以并不能完全溶解掉细胞残余物。需进一步的酶学或化学处理方法加速细胞残余物的清除过程。

1.2 物理学方法

物理学方法可以加速去细胞进程,包括:冻干法、直接加压法、声裂法及搅拌法。快速冻干法是在严格控制温度变化的速

率下,快速冷冻使组织在细胞内形成冰晶破坏细胞膜,导致细胞溶解。常用于腱膜及韧带的去细胞。Jackson 等^[16,17]曾用冻干法处理山羊前十字交叉韧带,发现运用此法处理的山羊前十字交叉韧带机械性能与处理前无明显差别,但其后用于临床研究中发现冻干灭菌法制作的前十字交叉韧带在植入机体后会产生非特异性免疫排斥反应,能否用于临床需进一步研究。直接加压法也能使细胞溶解,但只适用于稀疏排列的细胞外基质(如肺、肝)或天然组织分层的器官(如小肠粘膜、膀胱),可以有效地保留其细胞外基质的三维结构。机械搅拌法可以运用磁力搅拌器、定轨振荡器、叠放式转动机等。机械搅拌和声裂法与化学处理法同时运用可以加速细胞溶解和细胞碎片的移除。

1.3 酶学处理

去细胞技术中的酶包括蛋白酶、钙螯合剂及核酸酶。胰蛋白酶是去细胞技术中最常用的消化酶之一,螯合剂 EDTA 多与其联合使用。Schenke 等^[18]将猪肺血管浸泡在胰蛋白酶 /EDTA 溶液中搅拌数小时后可以细胞去除掉,不影响组织中的胶原量。但长时间浸泡在胰蛋白酶 /EDTA 混合液中会使正常肺血管的细胞外基质结构遭到破坏,降低细胞外基质中层粘连蛋白、纤维连接蛋白、弹力素、葡萄糖胺聚糖及硫酸葡萄糖胺聚糖含量。因此严格控制组织浸泡在胰蛋白酶 /EDTA 中的时间将使细胞外基质超微结构及组成的破坏程度最小化。

2 去细胞方法的应用

目前一系列以细胞外基质为支架材料的产品及去细胞相关技术已经用于临床,包括人体皮肤、猪小肠粘膜下层 SIS、猪膀胱、猪心脏瓣膜。其它组织或器官也已进行了大量的临床前期研究^[19]。在心血管方面,Dohmen 等^[20]对病人进行了组织工程肺动脉瓣移植,将供体肺动脉瓣膜去细胞化,从受试患者的前臂或隐静脉取材,消化扩增血管上皮细胞接种至去细胞肺动脉瓣膜上,并移植入患者体内,中期随访结果表明被移植的组织工程心瓣膜有良好的血流动力学性能。吕卫东等^[21]用去细胞方法处理牛颈静脉血管壁,经检测细胞成分完全去除,弹性蛋白含量相对减少,热收缩温度降低,组织稳定性下降,证明细胞外基质成分需进行进一步交联才能用于组织工程支架材料。Mirsadraee 等^[22]将人心包标本先后用低张液,SDS,核酸酶进行处理,得到去细胞支架,再将皮肤成纤维细胞接种于其上,并植大鼠体内后发现去细胞心包膜未发生免疫排斥反应,具有良好的组织相容性。在泌尿系统方面,Rosario 等^[23]报道将猪膀胱粘膜下层分离后进行去细胞化并消毒,然后将泌尿道基质细胞与膀胱上皮细胞置于膀胱粘膜下层联合培养,发现膀胱粘膜下层去细胞基质能够作为以上两种细胞培养的支架,此研究为泌尿道重建带来希望。Mantovani 等^[24]将猪脱细胞小肠黏膜基质用于临床修复 5 例长段尿道缺损,术后 1 月随访时都能保持尿道通畅及正常尿流量,2 个月后可见自体尿道组织长入基质支架,6 个月时尿道造影及动力学检测结果均满意。在神经系统方面,朱国臣等^[25]用 Triton-X100 和脱氧胆酸钠制备兔化学去细胞神经,桥接大鼠神经 6mm 缺损,结果化学去细胞神经未被宿主排斥,证明化学去细胞神经异种移植可能是修复面神经缺损的一种有前景的研究方法。在其他各方面去细胞方法的应用均有报道。Xu 等^[26]通过高渗盐溶液及核酸消化牛声带后脱水制成了声带去细胞支架并将人声带成纤维细胞植入其上培养,发现其弹力系数和动态黏度与人类声带相近,此研究给声带重建及再生带来了希望。Lumpkins 等^[27]用 Triton X-100,丙酮 /乙

醇溶液, SDS 对猪颞颌关节盘去细胞化, 发现用 SDS 去细胞化后组织的韧性与去细胞前相似。

3 结语与展望

去细胞基质是一种良好的组织工程天然支架材料, 其制备通常是用物理、化学及酶学相结合的方法, 依赖于组织的特异性, 去除器官或组织的细胞而保留其天然三维空间结构, 其主要成分是细胞外基质, 无免疫性或低免疫性, 为新组织的生成提供结构性支架及诱导细胞黏附增殖^[1]。理想的去细胞方法是对需要保留的细胞外基质无功能及结构的破坏, 但任何一种方法都会不同程度影响到细胞外基质的结构和功能。

支架材料中黏附蛋白和葡萄糖胺聚糖的丢失会减慢细胞贴附在支架上的过程并影响支架材料本身的生物活性; 胶原网的破坏会改变支架的机械活动及胶原蛋白活性; 去细胞物质的降解也是影响支架材料生物活性及机械强度的另一重要原因; 某些化学试剂会促使支架材料对某些消化酶有亲和力, 这就会迅速降低支架材料的韧性。因此没有任何一种联合使用的方法能完全将细胞去除掉, 各种方法制备去细胞基质的研究都需不断改进, 以期达到更好的效果。目前的各种去细胞方法仍可以使大多数细胞去除掉并安全地作为支架材料。大量的生物支架应用于组织工程及再生医学使得去细胞化技术与临床更加密切, 并促进去细胞技术不断发展, 为最终的组织与器官的修复和重建带来了希望。

参考文献(References)

- [1] 金岩. 组织工程原理与技术, 第 1 版. 西安: 第四军医大学出版社 [M], 2004, 3-6
Jin Yan. The principles and techniques of tissue engineering [M]. 1st edition. Xian: the fourth military medical university publishing company, 2004, 3-6
- [2] Gilbert TW, Sellaro TL, Badyak SF, et al. Decellularization of organs and tissues [J]. Biomaterials, 2006, 27:3675-3683
- [3] Ott HC, Taylor DA, Thomas SM, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart [J]. Nature Med, 2008, 14(2):213-221
- [4] Hudson TW, Zawko S, Deister C, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration [J]. Tissue Eng, 2004, 10(11-12):1641-1651
- [5] Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE, et al. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing [J]. Tissue Eng, 2004, 10(9-10):1346-1358
- [6] Ozeki M, Narita Y, Kagami H, et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells [J]. J Biomed Mater Res A, 2006, 79(4):771-778
- [7] Dahl SL, Koh J, Parabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation [J]. Cell transplant, 2003, 12:659-666
- [8] Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft [J]. Biomaterials, 2005, 26:7339-7349
- [9] Schmidt CE, Baier JM. A cellular vascular tissue: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering [J]. Biomaterials, 2000, 21:2215-2231
- [10] Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatment on tendon cellularity and mechanical properties [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49:134-140
- [11] Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, et al. Histological evaluation of decellularized porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2005, 27:566-571
- [12] Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 79:211-216
- [13] Badyak S, Liang A, Record R, et al. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold [J]. Biomaterials, 1999, 20:2257-2263
- [14] Hodde JP, Record RD, Tullius RS, et al. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization [J]. Tissue Eng, 2002, 8(2):225-234.
- [15] Burugapalli K, Thapasmittu A, Chan JC, et al. Scaffold with a natural mesh-like architecture: isolation, structural, and in vitro characterization [J]. Biomacromolecules, 2007, 8(3):928-936
- [16] Jackson DW, Grood ES, Arnoczky SP, et al. Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. Preliminary studies in a goat model [J]. Am J Sports Med, 1987, 15(5):482
- [17] Jackson DW, Grood ES, Wilcox P, et al. The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone-anterior cruciate ligament-bone allografts [J]. Am J Sports Med, 1988, 16(2):101-105
- [18] Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves [J]. J Struct Biol, 2003, 143(3):201-218
- [19] 杨志明. 组织工程进展与展望 [J]. 解剖学杂志, 2007, (30)521-522, 537
Yang Zhi-ming. The development of tissue engineering. The journal of anatomy, 2007, (30)521-522, 537
- [20] Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D. Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure [J]. Ann Thorac Surg, 2007, 84(3):729-736
- [21] 吕卫东, 吴忠仕, 胡铁辉等. 去细胞处理对牛颈静脉带瓣管细胞外基质骨架的影响 [J]. 中南大学学报, 2007, 32(5):819-823
Lv Wei-dong, Wu Zhong-shi, Hu Tie-hui, et al. Effect of decellular treatment on the framework of extracellular matrix in bovine jugular vein conduit [J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2007, 32(5):819-823
- [22] Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG, et al. Biocompatibility of acellular human pericardium [J]. J Surg Res, 2007 Dec; 143 (2):407-414
- [23] Rosario DJ, Reilly GC, Ali Salah E. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract [J]. Tissue Eng Med. 2008; 3(2):145-156
- [24] Mantovani F, Trinchieri A, Mangiarotti B, et al. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix: preliminary results [J]. Arch Ital Urol Androl, 2002, 74(3):127-128
- [25] 朱国臣等. 兔化学去细胞神经桥接大鼠面神经缺损 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14(11):627-629
Zhu Guo-chen, Xiao Da-jiang, Wu Siha, et al. Repair of rat facial nerve defects acellular nerve by chemical extraction with rabbit [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2007, 14(11):627-629
- [26] Xu CC, Chan RW, Tirunagari N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria [J]. Tissue Eng, 2007, 13(3):551-566
- [27] Lumpkins SB, Pierre N, McFetridge PS. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc [J]. Acta Biomater, 2008, 4(4):808-16