

文章编号:1004-7220(2013)04-0448-06

不同脱细胞方法对猪尾纤维环 生物力学特性及组织结构的影响

许海委^{1a}, 徐宝山^{1a}, 杨强^{1a}, 李秀兰^{1b}, 马信龙^{1a}, 夏群^{1a}, 张春秋², 伍耀宏^{1a}, 曾超^{1a}

(1. 天津市天津医院 a. 脊柱外科, b. 骨研所细胞工程室, 天津 300211; 2. 天津理工大学 机械工程学院, 天津 300384)

摘要: **目的** 探讨不同脱细胞处理方法对猪尾椎间盘纤维环生物力学特性及组织结构的影响, 为构建组织工程纤维环提供实验依据。 **方法** 取新鲜猪尾纤维环 60 个, 随机分为 4 组, 每组 15 个。 Triton X-100 组(A 组): 先将纤维环放入 Tris-HCl 低渗缓冲液中振荡 48 h, 再用 TritonX-100、DNase I 和 RNase A 对纤维环脱细胞处理; SDS 组(B 组): 将纤维环冻融 3 次, 接着用 SDS、DNase I 和 RNase A 对纤维环脱细胞处理; 胰蛋白酶组(C 组): 用含胰蛋白酶、DNase I 和 RNase A 的 Tris 缓冲液对纤维环脱细胞处理; 对照组(D 组): 纤维环不做任何处理。 采用 HE 染色与扫描电镜方法, 观察各组脱细胞情况以及纤维环超微结构的变化; 采用生物化学和生物力学方法检测各组纤维环的胶原含量、氨基葡聚糖(GAG)含量及力学参数。 **结果** 与对照组比较, HE 染色及扫描电镜可见 A、B、C 3 组均无细胞残留; A 组纤维环超微结构未见破坏, C 组纤维环超微结构可见轻度破坏, B 组纤维环超微结构可见明显破坏。 A、B、C 3 组纤维环胶原含量与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 但 GAG 含量均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。 A、C 两组的力学参数(极限载荷、极限应力、韧度、弹性模量、断裂功耗)与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$), B 组上述力学参数均低于对照组 ($P < 0.05$)。 **结论** Triton X-100 组处理后的猪尾椎间盘纤维环无细胞残留, 结构无破坏, 基质成分及力学性能保存良好, 适合于构建组织工程纤维环。

关键词: 脱细胞; 纤维环; 力学特性; 组织工程; 生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of different decellularization methods on biomechanical properties and histological structure of annulus fibrosus in pigtail

XU Hai-wei^{1a}, XU Bao-shan^{1a}, YANG Qiang^{1a}, LI Xiu-lan^{1b}, MA Xin-long^{1a}, XIA Qun^{1a}, ZHANG Chun-qiu², WU Yao-hong^{1a}, ZENG Chao^{1a} (1. a. Department of Spine Surgery, b. Cell Engineering Laboratory of Orthopaedic Institute, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2. School of Mechanical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

Abstract: **Objective** To investigate effects of different decellularization methods on biomechanical properties and histological structure of annulus fibrosus in pigtails and provide experimental evidence for the construction of tissue engineering annulus fibrosus. **Methods** Sixty fresh annulus fibrosus were dissected from caudal disks of pigs and randomly assigned to 4 groups with 15 in each group. Triton X-100 group (Group A): annulus fibrosus were treated with hypotonic Tris-HCl buffer for 48 hours and de-cellularized with Triton X-100, DNase I and RNase A. SDS group (Group B): annulus fibrosus were subjected to 3 cycles of freeze-thaw and subsequently de-cellularized with SDS, DNase I and RNase A. Trypsin group (Group C): annulus fibrosus were de-cellularized with Tris buffer containing trypsin, DNase I and RNase A. Control group: fresh annulus fibrosus underwent no treatment. After the decellularization process was completed, hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted to ex-

收稿日期:2012-09-11; 修回日期:2012-10-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272046, 31000432, 11172208), 中国博士后科学基金项目(2011M500530, 2012T50235)。

通信作者:杨强, 主治医师, Tel: (022)28336343; E-mail: yangqiang1980@126.com。

amine the efficacy on cell removal, and the ultrastructure of annulus fibrosus were observed by scanning electron microscopy. The collagen content, glycosaminoglycan (GAG) content and biomechanical parameters in each group were also detected. **Results** HE staining and scanning electron microscopy showed that no residual cells were found in Group A, B and C. The structure of annulus fibrosus in Group A was not disturbed, while that in Group B and C was damaged severely and slightly, respectively. There was no statistical difference in collagen content among Group A, B and C, as compared to the control group ($P > 0.05$). But the GAG content was significantly more lower in Group A, B and C than in the control group ($P < 0.05$). There was no statistical difference in ultimate load, ultimate stress, toughness, elastic modulus and mechanical work to fracture between Group A, C and control group ($P > 0.05$), while these parameters of Group B were lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The Triton X-100-treated annulus fibrosus retained the major extracellular matrix composition after cell removal and preserved the major structure and mechanical strength, which is preferable for the construction of tissue engineering annulus fibrosus.

Key words: Decellularization; Annulus fibrosus; Mechanical properties; Tissue engineering; Biomechanics

目前用于构建组织工程纤维环的支架材料较多,但均不理想。脱细胞基质能够去除细胞和可溶性蛋白等引起免疫反应的物质,保留组织的天然成分、复杂结构和力学性能,是一种理想的支架载体,异体脱细胞真皮基质、猪脱细胞心瓣膜、猪脱细胞膀胱已被批准应用于临床^[1-2]。基于上述脱细胞基质作为支架的成熟及临床应用,推断脱细胞纤维环可充分保留细胞外基质成分及天然复杂的斜交叠层结构,无论在成分、结构还是在力学性能方面都与天然纤维环十分接近,是构建组织工程纤维环较为理想的支架载体。因此,本实验拟探讨不同脱细胞处理方法对猪尾椎间盘纤维环生物力学特性及组织结构的影响,为构建组织工程纤维环提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

健康猪 50 头(6~7 月龄,雌雄不限),处死后立即截取新鲜猪尾 50 条。抑肽酶、Triton X-100、十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸钠、DNase I、RNase A、木瓜蛋白酶、1,9-二甲基亚甲蓝、6-硫酸软骨素(Sigma,美国);三羟甲基氨基甲烷(Tris)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所);平板振荡器(江苏省荣华仪器制造有限公司);分析天平(北京光学仪器厂);闭式四用游标卡尺(苏州利丰精密仪器有限公司);光学显微镜(Nikon 公司,日本);场发射扫描电子显微镜 1530VP(LEO 公司,德国);微材料力学性能测试系统(MTF-100)(上海大学,中国)。

1.2 实验方法

分离猪尾椎间盘,去除中央髓核及外周肌肉组织,选取大小相近的纤维环 60 个(外径 9~11 mm,平均 10 mm;厚度 4.5~5.5 mm,平均 5 mm),随机分为 4 组,每组 15 个。

Triton X-100 组(A组):将纤维环放入 10 mmol/L Tris-HCl 低渗缓冲液中(含 0.1% EDTA、10 KIU/mL 抑肽酶)4 °C 振荡 48 h,去离子水冲洗干净;用含 3% TritonX-100、0.1% EDTA、10 KIU/mL 抑肽酶的 Tris 缓冲液 4 °C 振荡 72 h,每 24 h 换液 1 次,去离子水冲洗干净;用含 0.2 mg/mL DNase I、20 μg/mL RNase A 的 Tris 缓冲液 37 °C 振荡 24 h,去离子水冲洗干净^[3-4]。

SDS 组(B组):将纤维环于 -80 °C 冷冻 3 h,室温融化 4 h,反复 3 次;用含 0.5% SDS、0.1% EDTA、10 KIU/mL 抑肽酶的 Tris 缓冲液室温振荡 72 h,每 24 h 换液 1 次,去离子水冲洗干净;用含 0.2 mg/mL DNase I、20 μg/mL RNase A 的 Tris 缓冲液 37 °C 振荡 24 h,去离子水冲洗干净^[5-6]。

胰蛋白酶组(C组):将纤维环用含 0.5% 胰蛋白酶、0.2% EDTA、0.2 mg/mL DNase I、20 μg/mL RNase A 的 Tris 缓冲液 37 °C 振荡 72 h,每 24 h 换液 1 次,去离子水冲洗干净^[7-8]。

对照组(D组):不做任何处理,放入 PBS 中 4 °C 保存待测。

1.3 观察指标

1.3.1 HE 染色 取各组纤维环,以 10% 中性福尔马林固定 24 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,5 μm 切片,固定于载玻片上,行 HE 染色,

观察脱细胞情况及大体组织结构。

1.3.2 扫描电镜观察 取各组纤维环冷冻干燥,表面喷金,扫描电镜观察纤维环横截面结构。

1.3.3 胶原含量测定 精确称取各组标本干重30 mg,按照羟脯氨酸试剂盒说明书进行操作,测定各组羟脯氨酸含量,计算胶原蛋白含量。

1.3.4 氨基葡聚糖(GAG)含量测定 参考相关文献[9],采用1,9-二甲基亚甲蓝测定法测定标本中的GAG含量,操作步骤如下:精确称取各组标本干重10 mg放入试管,每管加入1 mL木管蛋白酶消化液,60℃孵育24 h。取每组样本混合液40 μL移入96孔微量滴定板的相应位置,每孔加入250 μL 1,9-二甲基亚甲蓝染液,充分混合后,酶联免疫检测仪在540 nm处测定吸光度(A)值。用6-硫酸软骨素作为标准品,配置不同浓度的标准品溶液,测定吸光值,绘制标准曲线,将测得的各组吸光值与标准曲线对比,计算各组标本GAG含量。

1.3.5 生物力学参数检测 应用微材料力学性能测试系统(MTF-100)测量各组纤维环力学参数。分别取各组剩余纤维环($n = 10$),于前侧外层截取15 mm × 4 mm × 1 mm大小的长方体^[10],如图1所示,PBS中浸泡4 h后固定于力学性能测试系统卡具上,旋紧卡具,设定初始长度为10 mm,以1 mm/min恒速拉伸至完全断裂,拉力和位移每秒被取样10次,测试过程中用PBS保持样本湿润。

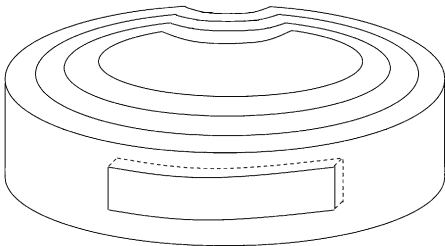


图1 纤维环力学标本的取材位置示意图

Fig.1 Schematic of location for annulus fibrosus test specimens

计算机配套软件记录各个时间点的位移、载荷值,并以位移为横坐标,载荷为纵坐标,绘制载荷-位移曲线。读取每个样本的极限载荷,计算极限应力、极限应变、韧度、弹性模量、断裂功耗。其中,极限载荷为载荷-位移曲线中的最高点对应的载荷值;极限应力 = 极限载荷/横截面积(MPa);极限应变 = 极限载荷对应的位移/样本的初长度;韧度为载荷-位移

曲线中直线部分的斜率 = 载荷/位移(N/mm);弹性模量 = 应力/应变(MPa);断裂功耗 = 载荷-位移曲线中极限载荷点左侧曲线下的面积。典型载荷-位移曲线如图2所示。

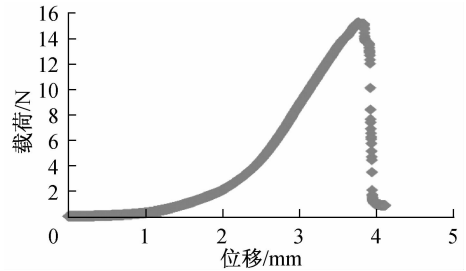


图2 典型载荷-位移曲线

Fig.2 Load-displacement curve

1.4 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件包进行分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色

对照组纤维环呈层状排列,各层胶原排列紧密,细胞均匀地分布于纤维环基质中。与对照组比较,A组纤维环胶原排列整齐,保留层状结构,纤维环结构相对疏松;B组纤维环胶原排列紊乱,层状结构被打乱,胶原多处出现断裂;C组纤维环胶原排列相对整齐,可见层状结构,但纤维环比A组更为疏松,偶尔可见断裂胶原;A、B、C3组纤维环中均未见细胞(见图3)。

2.2 扫描电镜

对照组纤维环孔洞排列整齐,具有明显的层状结构,A、C组结构与对照组相似,孔洞保留层状排列,B组孔洞大小不一,排列无序,失去层状结构(见图4)。

2.3 胶原含量及GAG含量

各组纤维环胶原含量从大到小依次是:A组 > 对照组 > B组 > C组,但经统计学分析,各组之间均无统计学差异,胶原含量如图5所示。各组纤维环GAG含量从大到小依次是:对照组 > A组 > B组 > C组,经统计学分析,A、B、C3组均与对照组均有统计学差异($P < 0.05$),GAG含量如图6所示。

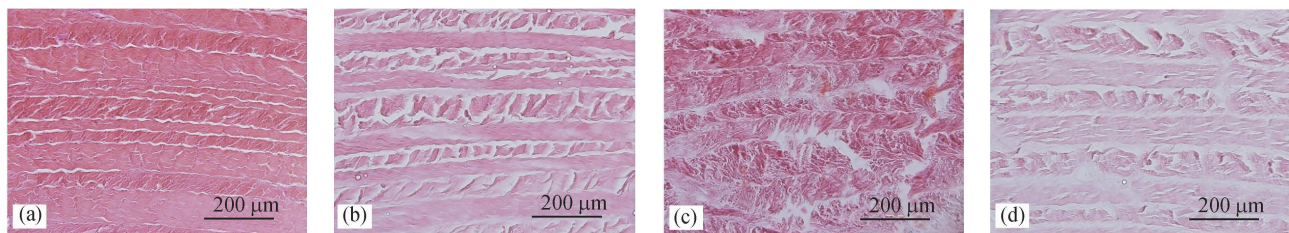


图3 各组纤维环 HE 染色(×200) (a)对照组,(b)A组,(c)B组,(d)D组

Fig.3 HE staining of annulus fibrosus in each group(×200) (a) Control group, (b) Group A, (c) Group B, (d) Group C

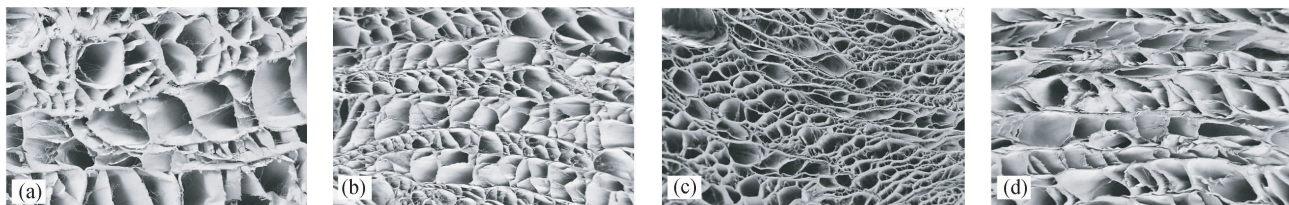


图4 各组纤维环电镜观察 (a)对照组(×200),(b)A组(×80),(c)B组(×80),(d)C组(×80)

Fig.4 Scanning electron microscopy view of annulus fibrosus in each group (a) Control group(×200), (b) Group A(×80), (c) Group B(×80), (d) Group C(×80)

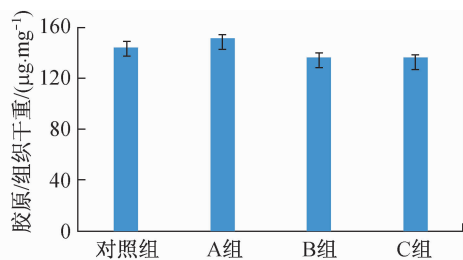


图5 各组纤维环胶原含量

Fig.5 Collagen content of annulus fibrosus in each group

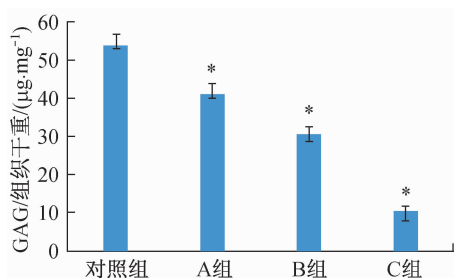


图6 各组纤维环 GAG 含量(* $P < 0.05$)

Fig.6 GAG content of annulus fibrosus in each group

2.4 生物力学测试

各组极限载荷从大到小排列是:A组 > 对照组 > C组 > B组;其中,A、C两组与对照组相比均无统计学差异,B组与对照组有统计学差异($P < 0.05$)。

各组极限应力从大到小排列是:A组 > 对照组 > C组 > B组;其中,A、C组均与对照组无统计学差异,B组与对照组有统计学差异($P < 0.05$)。

各组极限应变从大到小依次是:A组 > B组 > 对照组 > C组,但均无统计学差异。

各组刚度从大到小排列是:C组 > 对照组 > A组 > B组;其中,A、C两组与对照组相比均无统计学差异,B组与对照组有统计学差异($P < 0.05$)。

各组弹性模量从大到小排列是:C组 > 对照组 > A组 > B组;其中,A、C两组与对照组相比均无统计学差异,B组与对照组有统计学差异($P < 0.05$)。

各组弹性模量从大到小排列是:C组 > A组 > 对照组 > B组;其中,A、C两组与对照组相比均无统计学差异,B组与对照组有统计学差异($P < 0.05$)。各组纤维环的生物力学测试结果见表1。

3 讨论

理想的纤维环支架应该具备良好的生物相容性、良好的孔隙结构以及适当的降解性能,此外还应该在成分、形状、结构、力学性能上与纤维环相似^[11-12]。近年来用于构建组织工程纤维环的支架材料种类繁多,但均不理想,如取向性电纺丝纳米支架^[13-14],成分与天然纤维环相差很大,生物相容性差;取向性藻酸盐/壳聚糖复合支架^[15],力学性能与

表1 各组纤维环的生物力学特征 ($n=10$)

Tab.1 Biomechanical properties of annulus fibrosus in each group

分组	极限载荷/N	极限应力/MPa	极限应变/%	韧度/(N·mm ⁻¹)	弹性模量/MPa	断裂功耗/mJ
对照组	22.98 ± 2.10	5.86 ± 1.13	0.34 ± 0.05	17.00 ± 2.89	30.71 ± 5.47	29.62 ± 5.26
A组	24.52 ± 3.83	6.02 ± 0.83	0.41 ± 0.05	15.58 ± 1.62	28.89 ± 5.50	30.85 ± 5.15
B组	11.27 ± 2.68	2.86 ± 0.34	0.39 ± 0.07	5.45 ± 1.10	14.71 ± 1.19	16.23 ± 4.27
C组	20.18 ± 3.31	4.94 ± 0.58	0.28 ± 0.06	17.67 ± 3.28	34.94 ± 3.53	35.14 ± 4.93

天然纤维环相差甚远;聚己酸内酯苹果酸三醇/脱钙骨基质明胶双相纤维环支架^[16],内外层结合不牢、容易脱落,且生物相容性差;脱矿脱细胞骨基质环支架^[17],可塑性差,与天然纤维环的斜交叠层复杂结构相差甚远。

脱细胞基质去除了细胞和可溶性蛋白等引起免疫反应的物质,并且保留了组织的天然成分、复杂结构及力学性能,是一种理想的支架载体。因此,脱细胞纤维环有望作为一种理想的支架载体用于构建组织工程纤维环。本实验从脱细胞效果、结构保留情况、胶原及GAG含量、生物力学性能几方面对3种脱细胞方法进行比较,以寻求一种理想的纤维环脱细胞方法。

脱细胞效果及结构保留情况:HE染色显示3种方法均能够完全去除纤维环中的细胞;单纯就脱细胞效果,3种方法处理后的纤维环均能用于构建组织工程纤维环,但结构保留情况Triton X-100组优于胰蛋白酶组和SDS组,SDS组胶原结构最为紊乱,多处出现断裂。另外,通过电镜观察可见Triton X-100组纤维环结构保留最好,与对照组最为接近。

胶原及GAG含量:胶原及GAG是纤维环的主要组成成分,对纤维环细胞黏附、增殖及细胞表型的维持具有重要意义。经测定各组纤维环胶原含量与对照组均无差别,3种方法脱细胞过程均无造成胶原丢失,而各组GAG均有不同程度的丢失,胰蛋白酶组GAG丢失最为严重,SDS组次之,TritonX-100组GAG丢失最少,与对照组含量最为接近。就胶原及GAG的保留情况,Triton X-100组效果最好。

力学性能:支架不仅是为细胞提供附着、增殖的场所,还起到结构支撑的作用,代替组织行使各种功能,所以必须具备与其修复组织相似的生物力学性能(强度、弹性模量等),以更好地适应新生的修复细胞和组织替代的过程,故脱细胞过程应尽量保持

纤维环的结构及力学性能不受影响。本实验对各组纤维环进行了力学测试,计算各组纤维环的力学参数,包括极限载荷、极限应力、极限应变、韧度、弹性模量、断裂功耗。SDS组纤维环的抗拉伸力学参数(极限载荷、极限应力、韧度、弹性模量、断裂功耗)均低于对照组($P < 0.05$),而TritonX-100组、胰蛋白酶组上述力学参数与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$),表明SDS组纤维环抗拉伸力学性能明显减弱。拉伸力学性能与胶原的含量及排列方式有关,由于SDS组纤维环胶原排列紊乱,且多处出现断裂,故抗拉伸力学性能低于对照组;Triton X-100组和胰蛋白酶组结构保留良好,胶原排列有序,故生物力学特性与对照组无统计学差异。就力学性能而言,TritonX-100组与胰蛋白酶组纤维环均符合纤维环支架的要求。

综上所述,Triton X-100组处理的纤维环组织细胞去除完全,结构保留完整,基质含量及力学性能与天然纤维环相近,可作为组织工程纤维环构建的支架材料。

参考文献:

- [1] Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(19): 3675-3683.
- [2] 张燕,李瑞欣,张西正,等.壳聚糖-脱细胞真皮三维材料作为骨组织工程支架材料的研究[J].*医用生物力学*, 2010, 25(1): 11-15.
Zhang Y, Li RX, Zhang XZ, et al. Study on the three-dimensional chitosan-decellularised-derma scaffolds for bone tissue engineering [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(1): 11-15.
- [3] Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, et al. Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells expressing Cbfa [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(10): 2226-2233.
- [4] Cheng HL, Loai Y, Beaumont M, et al. The acellular matrix

- (ACM) for bladder tissue engineering; A quantitative magnetic resonance imaging study [J]. *Magn Reson Med*, 2010, 64(2): 341-348.
- [5] Kheir E, Stapleton T, Shaw D, *et al.* Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 99(2): 283-294.
- [6] Stapleton TW, Ingram J, Fisher J, *et al.* Investigation of the regenerative capacity of an acellular porcine medial meniscus for tissue engineering applications [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(1-2): 231-242.
- [7] Deng C, Dong N, Shi J, *et al.* Application of decellularized scaffold combined with loaded nanoparticles for heart valve tissue engineering in vitro [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31(1): 88-93.
- [8] Orbay H, Takami Y, Hyakusoku H, *et al.* Acellular dermal matrix seeded with adipose-derived stem cells as a subcutaneous implant [J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2011, 35(5): 756-763.
- [9] Hoemann CD, Sun J, Chrzanoski V, *et al.* A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage [J]. *Anal Biochem*, 2002, 300(1): 1-10.
- [10] Ambard D, Cherblanc F. Mechanical behavior of annulus fibrosus; A microstructural model of fibers reorientation [J]. *Ann Biomed Eng*, 2009, 37(11): 2256-2265.
- [11] 张西正. 组织工程研究的现状与进展[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(1): 1-3.
Zhang XZ. Status and progress of tissue engineering research [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(1): 1-3.
- [12] 闫中胜, 徐宝山, 杨强, 等. 新型组织工程椎间盘纤维环支架的制备与性能检测[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(3): 399-403.
- [13] Gruber HE, Hoelscher G, Ingram JA, *et al.* Culture of human annulus fibrosus cells on polyamide nanofibers; Extracellular matrix production [J]. *Spine*, 2009, 34(1): 4-9.
- [14] 杨力, 李良. 天然-人工合成聚合物混合纳米纤维在生物医学领域中的应用[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 105-108.
Yang L, Li L. Application of mixed natural-artificial synthetic polymer nanofibers in biomedicine [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 105-108.
- [15] Shao X, Hunter CJ. Developing an alginate/chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 82(3): 701-710.
- [16] Wan Y, Feng G, Shen FH, *et al.* Biphasic scaffold for annulus fibrosus tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(6): 643-652.
- [17] 潘勇, 周跃, 郝勇, 等. 脱矿脱细胞骨基质环支架体外构建组织工程化椎间盘纤维环[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19(6): 451-457.