

脱细胞肠系膜制备生物膜支架的实验研究

付勇^{1,2}, 廖斌¹, 于凤旭¹, 李新¹, 万居易¹, 邓明彬¹

(1.西南医科大学附属医院 心脏大血管外科, 四川 泸州 646000; 2. 四川医之源生物科技有限公司, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 应用肠系膜脱细胞基质制备生物膜支架,探讨其理化特性和生物学特性。方法 应用反复冻融肠系膜组织后,将肠系膜置于胰蛋白酶消化脱肠系膜脱细胞,并分为肠系膜基质组(A组)和去细胞肠系膜基质组(B组),通过HE染色、电镜、DNA检测、细胞毒性实验、拉伸力学测试,检测两组肠系膜基质的理化特性;制备覆膜支架,植入兔髂血管,术后1周、1月、2月超声检测血管血流情况,血管取材病理检测。结果 HE染色、电镜检测结果表明,B组基质组织疏松,纤维排列较整齐,未见细胞存留;DNA检测结果表明,B组DNA表达水平低,脱细胞较彻底;CCK-8细胞毒性实验检测结果表明,两组均无细胞毒性;FDA-PI荧光染色结果表明,两组细胞存活良好,未见死亡细胞;拉伸力学测试结果表明,两组最大拉伸力、最大力伸长率、屈服强度、屈服点伸长率差异无统计学意义;脱细胞肠系膜支架植入兔血管后超声检测两组早期通畅性良好,支架植入2月内皮增生较明显。结论 冻融和酶消化法脱肠系膜细胞,肠系膜基质去除细胞彻底,无细胞毒性,力学特征良好;肠系膜支架植入血管后早期通畅性良好,2月后内皮增生明显。

关键词:肠系膜;去细胞基质;生物膜支架

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.01.018

Experimental Study on Preparation of Biofilm Scaffolds from Acellular Mesentery

FU Yong^{1,2}, LIAO Bin¹, YU Fengxu¹, LI Xin¹, WAN Juyi¹, DENG Mingbin¹

(1. Department of Cardiovascular Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; 2. Sichuan Yizhiyuan Biotechnology Co., Ltd., Luzhou 646000, Sichuan, China)

Abstract: Objective To prepare biofilm scaffolds by using mesenteric acellular matrix, so as to investigate their physicochemical and biological characteristics. **Methods** The mesenteric tissues were subjected to trypsin digestion, and the mesenteric cells were removed after repeated freezing and thawing of mesenteric tissue. Mesenteries were divided into mesenteric matrix group (Group A) and acellular mesenteric matrix group (Group B). The physical and chemical properties of mesenteric matrix in two groups were tested by HE staining, electron microscopy, DNA detection, cytotoxicity test and tensile mechanics test. The blood flow of the vessels was detected by ultrasonography at 1st week, 1st month and 2nd month, and the vessels were observed by pathological examination. **Results** HE staining and electron microscopy showed that the mesentery of Group B was loose in acellular mesentery matrix, and the arrangement of fibers was neat, with no cells remaining. Compared with Group A, the expression level of DNA in Group B was lower, with more completely decellularized cells. CCK-8 cytotoxicity test showed that there was no cytotoxicity in Group A and Group B. FDA-PI fluorescence staining

showed no cytotoxicity of cells in both groups. Cells in Group A and Group B survived well, and no dead cells were found. Tensile mechanics test showed that there were no significant differences in maximum tensile force, maximum elongation, yield strength, yield point elongation between Group A and Group B. The early patency of acellular mesenteric stent implantation was good, and endothelial hyperplasia was obvious at 2nd month after stent implantation. **Conclusions** Mesenteric cells were removed by freeze-thaw and enzymatic digestion. Mesenteric stroma was completely removed without cytotoxicity, which showed good mechanical characteristics. Mesenteric stent implantation had good early patency and endothelial proliferation after 2 months.

Key words: mesentery; acellular matrix; biofilm scaffold

目前治疗主动脉搏管疾病除了传统开胸手术以外,部分主动脉夹层和主动脉瘤临床采用血管覆膜支架植入术。该覆膜支架治疗最常选用涤纶作覆膜材料,涤纶覆膜支架的覆膜均为人造涤纶膜^[1],这种膜厚、硬、顺应性差,而且贴附性和组织相容性差,易产生炎症反应,血管内皮修复功能差。临床覆膜支架植入术后,常出现内漏,且经久不愈,可能与移植物与主动脉相容性差有关^[2]。为改善覆膜支架的生物学特点,使其具备更好的组织相容性以及良好的内膜修复功能,本课题组采用猪肠系膜脱细胞处理,制备生物膜支架,检测其理化特性以及在体功能特点,以期临床提供一种新的覆膜支架生物材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

取新鲜猪肠系膜,5℃冷藏转移至实验室,选取无损伤、厚度均匀的肠系膜部分,PBS清洗3遍后,迅速剔除脂肪块,分割肠系膜组织,分别进行常规去污和脱细胞处理。实验分为肠系膜基质组和肠系膜脱细胞基质组。

实验动物:大白兔,雄性,体质量2.8~3.0 kg,由西南医科大学实验动物中心提供。实验方案均经过西南医科大学附属医院伦理委员会批准。

胎牛血清(Gibco公司,美国),高糖DMEM培养液(Sigma公司,美国),青霉素+链霉素(Gibco公司,美国),0.25%胰酶(碧云天生物技术公司,中国),CO₂细胞培养箱(Thermo公司,美国),倒置荧光显微镜(Zeiss公司,德国),摇床(上海一恒科学仪器有限公司),血管支架(上海微创医疗器械(集团)有限公司),BMW导引导丝(Abbott公司,美国),静脉穿刺包(深圳市益心达医学新技术有限公司),万能材料

拉力试验机(东莞市力显仪器科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 肠系膜脱细胞制备 清除肠系膜附着脂肪组织,PBS溶液中漂洗3次,每次20 min。A组:恒温水浴37℃摇床震荡24 h,PBS溶液4℃洗涤24 h,漂洗2次,铺片,转移至-80℃冻存备用。B组:反复冻融肠系膜组织后,将肠系膜置于0.25%胰蛋白酶+0.05% EDTA溶液中,恒温水浴37℃摇床震荡24 h,PBS溶液4℃洗涤24 h,漂洗2次;将脱细胞处理的肠系膜铺片于转移至-80℃冻存备用。

1.2.2 生物膜支架制备 取出制备的肠系膜铺片,根据支架2 mm×7 mm修剪肠系膜成条状约5 mm×7 mm,用7-0 prolene线将肠系膜缝于支架表面,使其两端与支架平齐,中间与支架紧密贴合,缝制肠系膜支架。

1.2.3 HE染色 将标本用4%中性甲醛固定,脱水、透明、石蜡包埋,制备4 μm切片,行常规HE染色,观察肠系膜脱细胞情况及纤维排列情况。

1.2.4 电镜观察 将两组样本用2.5%戊二醛固定,梯度酒精逐级脱水,临界点干燥,先喷碳,后喷金,扫描电镜观察两组肠系膜基质脱细胞和纤维排列情况。

1.2.5 伸展性能 两组肠系膜基质切割成1 cm×4 cm大小的长条,进行机械性能检测。在拉力试验机上加载拉伸力,加载速度为10 mm/min,测定材料的最大张力、最大伸长率、断裂伸长率。

1.2.6 细胞毒性检测 CCK8法检测细胞毒性,提取组织浸提液,浸提液和内皮细胞共培养,检测细胞活性改变;FDA-PI荧光染色,观察细胞存活、死亡情况。

1.2.7 DNA含量检测 称取各组肠系膜基质20 mg(n=5),按照DNA抽提试剂盒步骤抽提、溶解DNA。采用微量分光光度计测量各组DNA含量。

1.2.8 兔体内实验 成年新西兰大耳兔,体质量 2.8~3.0 kg,术前 3 d 给予阿司匹林 10 mg/kg、氯吡格雷 10 mg/kg 管喂。耳缘静脉注射 2% 戊巴比妥钠 1.5 mL/kg,常规脱毛,备皮,腹股沟区切开皮肤、皮下组织、分离股动脉,并悬吊血管。假手术组 ($n=5$):未行覆膜支架置入,仅悬吊血管 30 min;覆膜支架血管植入组 ($n=5$):悬吊血管后,5F 穿刺针穿刺并置入导丝,送入血管鞘,更换 BMW 导丝,沿导丝送入球囊覆膜支架,于髂动脉处扩张球囊,与血管壁充分贴合,撤出导丝、球囊导管、7-0 prolene 线缝合血管穿刺口,逐层缝合皮下层及皮肤。术后给予管喂阿司匹林 5 mg/kg,氯吡格雷 5 mg/kg,血管超声术后 1 周、1 月、2 月随访检测支架血流情况,2 月后取材血管组织。

1.2.9 统计学处理 实验数据均以均数 \pm 标准差表示,两组数据间的差异采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 生物膜形态

脱细胞处理前,肠系膜组织脱水皱缩,组织厚,弹性差;脱细胞后组织柔软,伸缩性能良好。HE 染色结果表明:A 组未去细胞肠系膜基质,可见较多深染的细胞核,纤维排列致密;B 组未见深染的细胞核,纤维排列疏松(见图 1)。

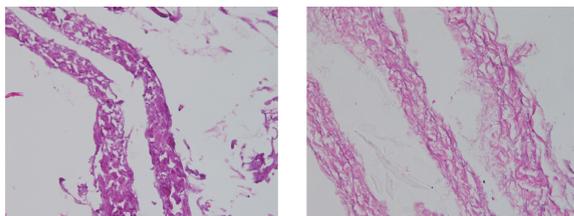


图 1 肠系膜基质 HE 染色(10 \times)

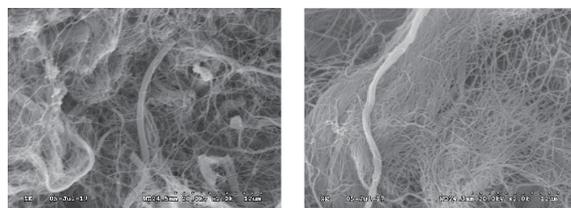
Fig.1 HE staining of mesenteric matrix (a) Unacellular mesenteric matrix, (b) Acellular mesenteric matrix

2.2 电镜结果

两组肠系膜进行扫面电镜检查。观察结果表明:A 组未去细胞肠系膜基质,纤维散乱、排列致密;B 组纤维排列疏松(见图 2)。

2.3 伸展性能

将两组肠系膜基质剪成 1 cm \times 4 cm,进行力学检



(a) 未脱细胞肠系膜基质 (b) 脱细胞肠系膜基质

图 2 肠系膜基质扫描电镜(2 000 \times)

Fig.2 Mesenteric matrix scanning electron microscopy

(a) Unacellular mesenteric matrix, (b) Acellular mesenteric matrix

测。两组肠系膜基质最大拉伸力、最大力伸长率、屈服强度、屈服点伸长率的差异无统计学意义(见表 1)。

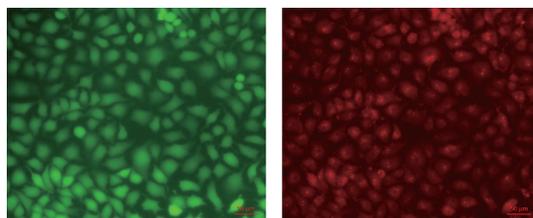
表 1 两组肠系膜基质伸展性能比较($n=3$)

Tab.1 Comparison of mesenteric matrix stretch ability between two groups

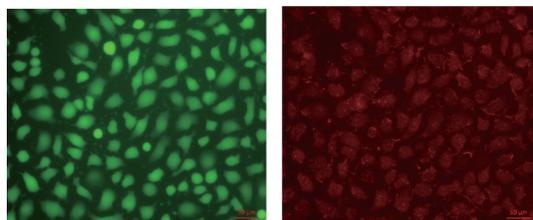
组别	最大拉伸力/N	最大力伸长率/%	屈服强度/MPa	屈服点伸长率/%
A 组	31.41 \pm 7.09	118.83 \pm 15.79	8.35 \pm 6.46	118.83 \pm 17.24
B 组	25.15 \pm 7.13	111.09 \pm 15.99	7.43 \pm 4.53	95.16 \pm 22.46
P 值	0.342	0.583	0.850	0.756

2.4 细胞毒性检测

提取 A、B 组组织浸提液和人脐静脉内皮细胞共培养,CCK-8 法检测细胞毒性。结果表明,两组细胞活性改变无差异;两组浸提液脐内皮细胞共培养 FDA-PI 荧光染色,观察细胞存活、死亡情况,结果未见明显死亡细胞(见图 3)。



(a) 未脱细胞肠系膜基质浸提液培养



(b) 脱细胞肠系膜基质浸提液培养

图 3 人脐静脉内皮细胞 FDA-PI 染色(20 \times)

Fig.3 Human umbilical vein endothelial cells FDA-PI staining

(a) Culture of unacellular mesenteric matrix extract,

(b) Culture of acellular mesenteric matrix extract

2.5 DNA 含量检测

经微量分光光度计检测,两组 DNA 浓度分别为 (88.30 ± 2.79) 、 (450.17 ± 90.90) $\text{ng}/\mu\text{L}$, 差异具有统计学意义。

2.6 生物膜支架大体观察

脱细胞肠系膜制备覆膜支架前,裸支架形态,支架镂空,呈网状;制备覆膜支架后,支架外紧密贴敷脱细胞肠系膜,表面平滑(见图4)。

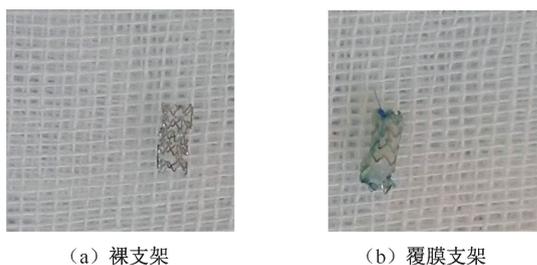


图4 支架形态

Fig.4 Stent morphology (a) Bare stent, (b) Stent graft

2.7 血管病理检测

假手术组血管结构清晰,包括外膜、中层平滑肌、内膜,未见明显增厚改变;肠系膜支架植入术后2月,可见内膜增生明显、管腔狭窄(见图5)。

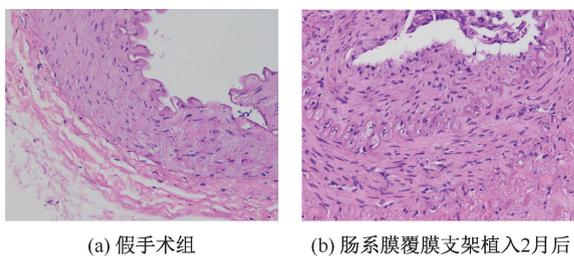
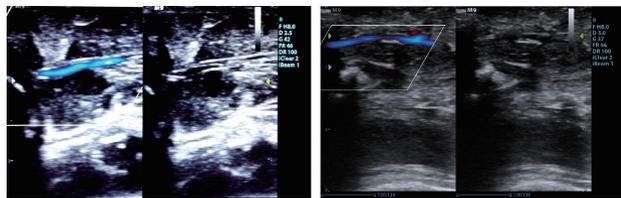


图5 血管结构 HE 染色(10 \times)

Fig.5 HE staining of vascular structures (a) Sham operation group, (b) Mesenteric stent graft implantation after 2 months

2.8 超声检测

超声检测结果表明,假手术组血管血流通畅;覆膜支架植入术后1月,支架血管形态及血流情况,显示支架扩张良好,血流通畅。术后2月,检测支架血管形态及血流情况,显示存在支架狭窄,血流加速(见图6)。



(a) 术后1月

(b) 术后2月

图6 血管超声图像

Fig.6 Vascular ultrasound image (a) 1 month postoperatively, (b) 2 months postoperatively

3 讨论与结论

生物膜是具有较高开发和应用前景的一种组织工程材料。生物膜主要来自源于自体或异体浆膜组织、静脉血管、小肠黏膜下层及胶原纤维等组织或器官^[1,3,4]。和其他组织工程材料一样,生物膜应该具有可控制的生物降解速度,低免疫原性,生物相容性和力学性能良好,不需要体外细胞,易于生产及加工^[2,5]。

本实验采用猪肠系膜作为生物膜材料。猪肠系膜有其自身结构特点,由中间的疏松结缔组织和两面被覆的间皮构成,疏松结缔组织主要由胶原纤维、弹性纤维、成纤维细胞、巨噬细胞、肥大细胞等组成。经脱细胞制备成肠系膜基质,其具备良好的力学性能。该脱细胞基质是一个极性基质,一侧有一个紧凑的基底,另一侧有一个开放的纤维结构^[6]。经病理切片染色、电镜检测,肠系膜脱细胞基质未见残留细胞,DNA 检测脱细胞基质表达少,说明该肠系膜基质中细胞残留少,该细胞基质脱细胞彻底,减少宿主免疫反应发生的可能。基底面结构有利于支架血管腔内保持光滑,防止血细胞聚集形成血栓,而电镜检测到开放侧纤维结构疏松,空隙度大,开放纤维结构可以为受损血管内皮细胞的黏附、增殖和产生新的血管内膜提供支架,避免种植种子细胞移植带来的免疫反应。

组织工程生物材料的理化特性决定其作为移植物的效果。良好的伸缩特性、组织相容性、无细胞毒性是作为支架材料的一个重要特性,其性能直接决定肠系膜支架移植重建效果。经力学检测,未脱细胞肠系膜基质的最大拉伸力、最大力伸长率、屈服强度、屈服点伸长率大于脱细胞肠系膜基质,但这种差异尚不具有统计学差异,表明反复冻融和

酶消化肠系膜基质对组织纤维损伤较小,去细胞肠系膜基质仍具备良好的生物力学特性,其屈服强度大于 7 mPa,能满足制备生物膜支架的材料特性要求^[7]。经 CCK-8 细胞毒性检测,未见脱细胞基质及其降解产物对脐带内皮细胞产生毒性作用,该脱细胞基质对机体无毒无害^[8]。

经制备生物膜支架植入兔髂动脉,手术前后给予阿司匹林、氯吡格雷管喂,超声检测术后早期血管通畅情况良好,未见血栓形成;术后 1 月超声检测血管腔未变窄,2 月后经超声检测血管腔变窄,经病理切片检测为内皮细胞增生,兔髂血管较细,血管内皮增生致管腔狭窄^[9]。

肠系膜脱细胞制备生物膜支架,可用于修复受损的血管组织,但仍存在内膜增生程度调控困难。后续将进一步优化脱细胞肠系膜覆膜支架,提高其生物学性能,减少应力集中效应^[10],使血管内皮的增生控制在合适的程度,既达到修复血管的目的,又不影响血管的通畅。在后续的实验中也将进行大动物脱细胞肠系膜覆膜支架植入,更真实地反映该支架的生物力学性能及对血管损伤的修复作用,为脱细胞肠系膜的临床应用奠定理论基础。

参考文献:

- [1] WATANABE T, KANDA K, YAMANAMI M, *et al.* Long-term animal implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 98(1): 120-126.
- [2] KAWAJIRI H, MIZUNO T, MORIWAKI T, *et al.* Development of tissue-engineered self-expandable aortic stent grafts (Bio stent grafts) using in-body tissue architecture technology in beagles [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015, 103(2): 381-386.
- [3] NAKAYAMA Y, TSUJINAKA T. Acceleration of robust “biotube” vascular graft fabrication by in-body tissue architecture technology using a novel eosin Y-releasing mold [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014, 102(2): 231-238.
- [4] NEETHLING W, BRIZARD C, FIRTH L, *et al.* Biostability, durability and calcification of cryopreserved human pericardium after rapid glutaraldehyde-stabilization versus multi-step ADAPT (R) treatment in a subcutaneous rat model [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 45(4): e110-117.
- [5] 赵广建, 赵耀. 不同生物材料构建血管支架的组织相容性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(25): 4679-4682.
- [6] TSAI PC, ZHANG Z, FLOREK C, *et al.* Constructing human skin equivalents on porcine acellular peritoneum extracellular matrix for *in vitro* irritation testing [J]. *Tissue Eng Part A*, 2016, 22(1-2): 111-122.
- [7] 孟庄源, 马韬, 王盛章, 等. 覆膜支架治疗主动脉夹层的有限元分析 [J]. *医用生物力学*, 2018, 33(4): 326-331.
- [8] MENG QY, MA T, WANG SZ, *et al.* Finite element analysis of aortic dissection treated with stent graft [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(4): 326-331.
- [9] MENG Q, HU X, HUANG H, *et al.* Microfracture combined with functional pig peritoneum-derived acellular matrix for cartilage repair in rabbit models [J]. *Acta Biomater*, 2017, 53: 279-292.
- [10] 安乾, 崔文军, 司江涛, 等. 镁合金支架在兔腹主动脉中的降解 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(18): 2864-2869.
- [11] 申祥, 邓永泉, 谢中敏, 等. 同形状血管中医用支架扩张力学行为的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(2): 194-198.
- [12] SHEN X, DENG YQ, XIE ZM, *et al.* Advances in expansion property of stent in vessels with different shapes [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(2): 194-198.