

牛心包组织工程心脏瓣膜支架 脱细胞方法的比较

杨岷 陈长志 成少飞 王学宁 叶清 王维俊 王小妹

【摘要】 目的 对比去污剂-酶消化法、胰蛋白酶消化法和去氧胆酸钠法去除新鲜牛心包组织上细胞的效果和保护基质的能力,为组织工程心脏瓣膜的构建提供较满意的平台。方法 应用 3 种方法处理新鲜牛心包组织,用光学显微镜、扫描电镜观察脱细胞效果和胶原纤维、弹力纤维改变;用热皱缩实验、拉力测试观察基质的物理性能变化;用 DNA 抽提比较脱细胞前后细胞数量差异。结果 3 种方法均能完全去除细胞,与去污剂-酶消化法比较,另 2 种方法对基质破坏明显。结论 去污剂-酶消化法脱细胞效果好,且有良好的保护基质的能力。

【关键词】 组织工程 心脏瓣膜,人工 生物假体外循环 去细胞基质

Comparison of decellularizative procedures of bovine pericardium tissue-engineering heart valve scaffold YANG Min, CHEN Chang-zhi, CHENG Shao-fei, et al. Department of Cardio-Thoracic Surgery, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China

【Abstract】 Objective Compared with different decellularization procedures for their potential of cell removal and the ability to preserve the matrix. **Methods** Specimens of bovine pericardiums were treated by 3 approaches (detergent and enzyme extraction, trypsin, Triton-X 100 and sodium-deoxycholate). Tissue samples were then observed by HE staining and scanning electron microscopy to confirm the removal of cells. Von Gieson (VG) staining and Gomori staining were used for showing the integrity of collagen and elastin. DNA content was examined by the method of DNA extraction. Tissue shrinkage temperature and mechanical properties were also studied. **Results** Completely decellularization were achieved in 3 groups. While trypsin, Triton-X 100 and sodium-deoxycholate caused severe structural destruction and declined of mechanical properties of the matrix. In contrast, detergent and enzyme extraction achieved completely decellularization and effectively preservation the matrix structure. **Conclusion** This research demonstrated detergent and enzyme extraction could achieve both complete decellularization and preservation of the matrix structure. This approach may provide an ideal platform for the construction of tissue-engineering heart valves.

【Key words】 Tissue engineering Heart valve prosthesis Bioprosthesis Extracellular matrix

将受体活性细胞种植在生物可降解材料支架上,构建的组织工程心脏瓣膜(TEHV),无免疫原性,无须抗凝,耐久性强,不易感染,有生长和自身修复能力。我们的研究旨在比较不同方法脱除牛心包细胞成分的效果,为构建 TEHV 提供理想的生物材料。

材料和方法

采集热缺血时间小于 2 h 的成年黄牛心包,分割成 5 cm × 10 cm 大小心包片,4℃ Hanks 液漂洗。随机分为 3 个实验组和 1 个对照组,每组各 30 片;实验组对牛心包组织进行脱细胞处理。去污剂-酶消化法(detergent and enzyme extraction, DEE)组:采用

经典去污剂-酶消化法处理牛心包组织^[1]。胰蛋白酶消化法(trypsin, TS)组:牛心包片在 37℃、5% CO₂ 培养箱中用 1% 胰蛋白酶(AMRESCO 公司)、0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)、RNase A(Sigma-Aldrich 公司)、DNase I(Sigma-Aldrich 公司)摇动消化 24 h。去氧胆酸钠法(Triton-X 100 and sodium-deoxycholate, TSD)组:在 37℃、5% CO₂ 培养箱中将牛心包片置于 0.5% Triton-X100(国药化剂公司进口分装)、0.5% 去氧胆酸钠(SERVA Electrophoresis GmbH)、0.02% EDTA、和 RNase A、DNase I 液中摇动消化 24 h,再在 0.25% Triton-X100、0.25% 去氧胆酸钠、0.02% EDTA 和 RNase A、DNase I 液中摇动消化 48 h。标本用 PBS 反复冲洗去除残余物质。

监测指标(1)每组心包片各取 10 片,裁成 5 mm × 5 mm 试条,用收缩温度测定仪,以蒸馏水为介

质,从室温开始,每分钟升高 2℃,测试组织的热皱缩温度。

(2)各组取心包片 10 片,裁成 4 mm 宽试条。室温下,用 HD-10 型厚度仪(精度 0.01 mm)测量试条厚度,算出原截面积 = 宽度 × 厚度。应用万能材料试验机(中国科学院上海硅酸盐研究所,岛津 Shimadzu AG-5kN, Japan),牵拉速度为 5 mm/min,测拉伸负荷,计算拉伸强度 = 拉伸负荷/原截面积、弹性模量、最大变形量、最大载荷、拉伸率,绘制拉伸强度 - 拉伸率曲线(max 点表示材料的断裂点,对应的纵坐标为最大拉伸强度,对应的横坐标为最大拉伸率)。

(3)组织学观察。各组取心包片 5 片置入 10% 甲醛中固定,石蜡包埋,切片,苏木素伊红(HE)染色观察细胞数目;VG 结缔组织和 Gomori 弹力纤维染色观察胶原纤维和弹力纤维分布。

(4)应用基因组 DNA 抽提试剂盒(Sangon 公司),将每组 10 个样本剪碎,液氮降温,匀浆,蛋白酶 K 和去污剂裂解,UNIQU-10 柱吸附样品中基因组 DNA,洗涤后 Elution Buffer 回收基因组 DNA;分光光度计按 $1OD_{260} = 50 \mu\text{g}$ 测定样本 OD 值,以 OD 值表达组织基因组 DNA 含量。

(5)标本用 2% 戊二醛固定,1% 锇酸缓冲液处理、脱水、干燥、喷金后做扫描电镜观察。

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 软件,先行方差齐性检验, $P > 0.05$ 。方差齐则组间两两比较用 Dunnett T 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;方差不齐则组间两两比较用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 热皱缩温度:DEE、TS、TSD 和对照组热皱缩温度分别为 $(64.50 \pm 2.13)^\circ\text{C}$ 、 $(64.12 \pm 2.42)^\circ\text{C}$ 、 $(65.36 \pm 1.70)^\circ\text{C}$ 、 $(66.26 \pm 2.01)^\circ\text{C}$, $P > 0.05$,差异无统计学意义。

2. 机械性能见图 1,拉伸强度 - 拉伸率曲线见图 2。

对弹性模量、拉伸强度、最大变形量、最大载荷、拉伸率 5 个指标进行 One-Way ANOVA 检验,弹性模量 (elastic module)、拉伸强度(max-stress)、最大变形量 (max-disfiguration)方差齐,组间两两比较用 Dunnett T 检验;最大载荷 (max-load)、拉伸率(max-strain)方差不齐,组间两两比较用 Dunnett T3 检验。DEE 组与对照组各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),而 TS、TSD 2 组与对照组在 5 项指标的差异

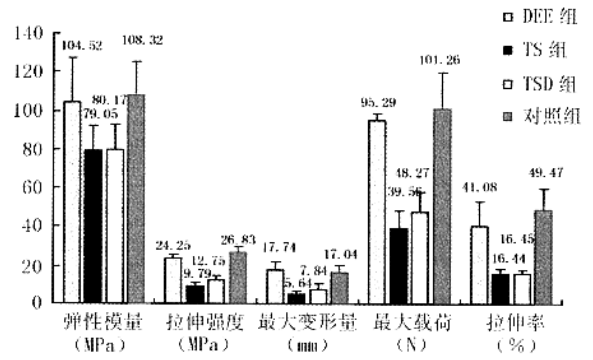
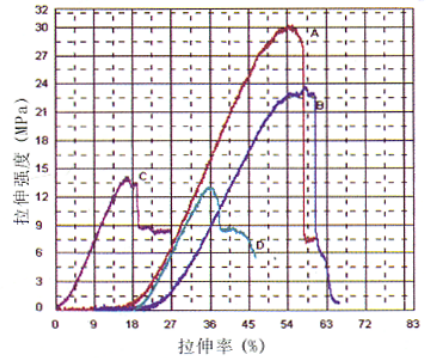


图 1 牛心包机械性能测量结果



随机抽取单一心包片:A:对照组;B:DEE组;C:TS组;D:TSD组

图 2 牛心包拉伸强度 - 拉伸率曲线

均有统计学意义 ($P < 0.05$)。从拉伸强度 - 拉伸率曲线也可看出:对照组最大拉伸强度和最大拉伸率最大,DEE 组略减小,而 TS 组和 TSD 组均明显降低。

3. 组织学观察:对照组组织切片 HE 染色见大量细胞均匀分布;VG 染色见胶原纤维呈波浪状,排列致密;Gomori 染色见弹力纤维清晰、连续。3 个实验组 HE 染色均组织内无细胞;VG 染色 DEE 组胶原纤维仍呈波浪状,排列较松散,TS 组胶原纤维呈现水肿、断裂明显,排列紊乱,TSD 组胶原纤维水肿、断裂,排列欠整齐;Gomori 染色 DEE 组弹力纤维较清晰、连续,TS 组弹力纤维断裂明显、排列紊乱,TSD 组弹力纤维断裂明显、排列尚整齐。

4. 基因组 DNA 抽提结果 ($\mu\text{g}/\text{mg}$):DEE 组 0.054 ± 0.007 ;TS 组 0.056 ± 0.010 ;TSD 组 0.051 ± 0.012 ;对照组 0.602 ± 0.102 。3 个实验组分别与对照组比较,进行 One-Way ANOVA 检验:方差齐性检验, $P < 0.05$,用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$,差异均有统计学意义。

5. 扫描电镜结果见图 3。

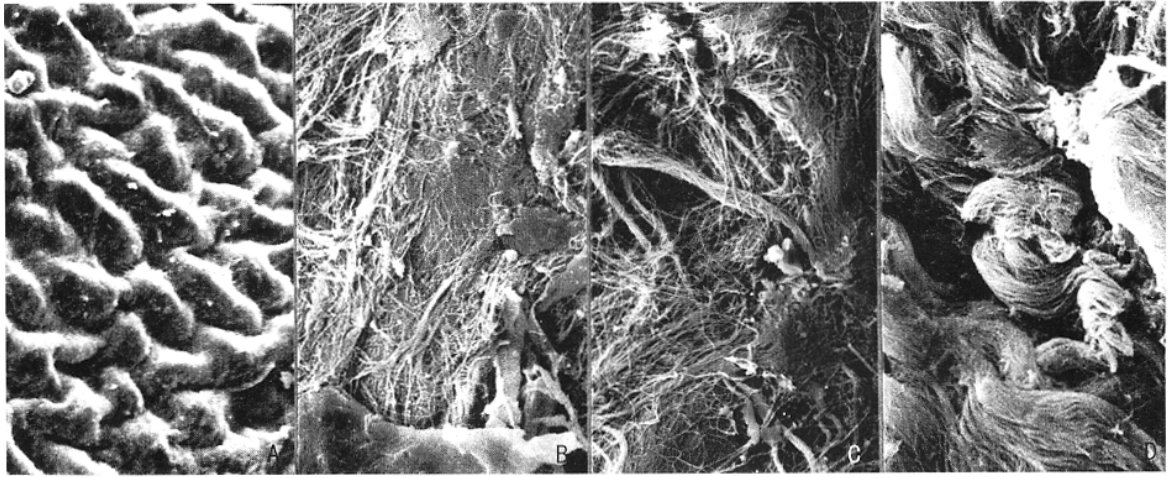


图3 各组牛心包组织扫描电镜:对照组(A \times 800)呈典型内皮细胞的鹅卵石样形态。实验组均能完全去除细胞。DEE组(B \times 1500)对基质超微结构影响很小,纤维排列致密、有序,无明显断裂;TS组(C \times 1500)基质质量明显减少,纤维松散、排列紊乱、多见断裂;TSD组(D \times 1500)基质排列较松散、纤维呈束状改变、间隙大而不规则,部分有断裂改变

讨论

生物瓣膜的免疫原性几乎均来自其细胞成分,导致瓣膜早期发生钙化、瓣膜衰坏^[2,3]。经去细胞处理的瓣膜材料如果去细胞不完全,将直接影响所构建瓣膜的免疫原性、抗钙化和耐久性等。瓣膜基质几乎无免疫原性,基质内的胶原纤维和弹性纤维的相互作用对维持组织的结构和功能及其重要^[4]。理想的天然可降解支架 TEHV 应是去除细胞成分、同时保留基质的胶原蛋白和弹性蛋白,不引起脱细胞基质结构和功能的变化,在明显降低组织的免疫原性同时保持其耐久性。

天然可降解支架的获得方法主要有:去污剂-酶消化法、去氧胆酸钠法、胰蛋白酶消化法等。目前对几种脱细胞方法的效果各家观点不同^[5-9]。

我们的研究分别应用上述方法处理新鲜牛心包组织,为严格比较,胰蛋白酶、Triton-X100 和去氧胆酸钠等试剂均参照国外经典脱细胞方法所用浓度^[7-9]。结果显示,3种方法脱细胞效果均满意。在保护基质结构和功能方面,去污剂-酶消化法效果最理想,能够完整保留胶原纤维和弹力纤维,仅排列较疏松,与细胞脱除有关;组织中胶原蛋白三维结构稳定性的标志——热皱缩(变性)温度仅略降低,说明其三维结构完好,胶原的交联及结构稳定性无明显变化,机械强度略降低,与新鲜牛心包组织的机械强度差异无统计学意义,说明其对组织机械性能影响小。去氧胆酸钠法对组织胶原纤维和弹力纤维有一定的破坏,继而使组织机械强度明显下降。胰

蛋白酶消化法对基质的结构和功能破坏最大,对机械强度的影响也最显著。

总之,去污剂-酶消化法在有效脱除细胞和可溶性成分,降低其免疫原性的同时,抑制基质水解,使结构蛋白完好保存,机械强度良好,效果明显优于其他2种方法,可为构建 TEHV 提供较理想的生物材料。

参考文献

- 1 杨岷,陈忠堂,吴静,等.脱除猪主动脉瓣细胞的研究.中华实验外科杂志,2003,20:953.
- 2 Oei FB, Stegmann AP, van der Ham F, et al. The presence of immune stimulatory cells in fresh and cryopreserved donor aortic and pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis*, 2002, 11: 315 - 324.
- 3 Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 23: 1002 - 1006.
- 4 Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*, 2004, 12: 367 - 377.
- 5 Kim WG, Park JK, Lee WY. Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts. *Int J Artif Organs*, 2002, 25: 791 - 797.
- 6 Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, et al. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*, 1994, 28: 655 - 666.
- 7 Steinhoff G, Stock U, Karim N, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogeneic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*, 2000, 102(19 Suppl 3): III50 - 55.
- 8 Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, et al. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals: an in vitro study. *Cardiovasc Res*, 2003, 60: 497 - 509.
- 9 Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*, 2003, 26: 421 - 427.

(收稿日期:2005-06-01)