文章编号:1000-5404(2005)09-0837-04

论著

仿生髓核组织工程细胞支架的免疫原性研究

李长青,周 跃 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨自行设计构建髓核组织工程支架材料的免疫原性。**方法** 将75只SD大鼠随机分为3组:正常组、对照组及移植组。将自行设计构建的支架材料植入移植组大鼠皮下,以未植入支架组作为对照。分别于术后1、3、7、14、28、56、84 d取支架及周围组织,并分离血清。行组织学观察及RT-PCR检测IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10 mRNA表达,ELISA检测血清中抗Ⅱ型胶原抗体水平。**结果** 支架材料在大鼠体内表现为轻度的炎性反应,逐步为纤维肉芽组织取代。RT-PCR未检测到IFN-γ、IL-2 mRNA表达,IL-4、IL-10 mRNA表达增高,反映支架材料移植后促进T辅助细胞向Th2方向转化,抑制机体炎症发生。同时血清中未检测到抗Ⅱ型胶原抗体表达增高。**结论** 自行设计的髓核组织工程支架材料无明显免疫原性,可进行深入研究。

关键词: 支架;髓核;组织工程;免疫原性
中图法分类号: R68, R318.08; R392.11 **文献标识码:** A

Study on immunogenicity of a novel bionic scaffold of nucleus pulposus tissue engineering

LI Chang-qing, ZHOU Yue (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the immunogenicity of a novel bionic scaffold of nucleus pulposus tissue engineering. **Methods** The biocompatibility of a subcutaneously implanted scaffold of nucleus pulposus tissue engineering was studied in SD rats by analyzing tissue reactions up to 3 months using histological and ultrastructural methods. The expression of IFN-γ, IL-2, IL-4 and IL-10 mRNA was measured by RT-PCR, and the levels of serum antibodies to porcine type Ⅱ collagen were measured by ELISA. **Results** There was less inflammatory reaction in rats induced by subcutaneously implanted scaffold. By degrees, a granulation tissue had developed within the implant, which had disappeared by 3 months. The expression of IFN-γ, IL-2 mRNA by RT-PCR was of no changes. But the expression of IL-4 and IL-10 mRNA increased, which meant the implant induced Th cell into Th2 cell and the induction inhibited the inflammatory reaction. No antibodies to porcine type Ⅱ collagen were found in the sera of implanted rats. **Conclusion** There was less immunogenicity in rats induced by implanted scaffold of nucleus pulposus tissue engineering.

Key words: scaffold; nucleus pulposus; tissue engineering; immunogenicity

下腰痛是现代社会中一种常见病和多发病,作为仅次于上呼吸道感染的疾病,是导致劳动力丧失的主要原因之一[1]。腰椎间盘突出症等椎间盘退行性变是引起下腰痛最常见的原因。研究开发符合椎间盘和/或髓核结构与功能的移植物,对退变椎间盘进行功能重建,已成为治疗退行性椎间盘疾病比较理想的解决方案。近年来组织工程学技术的迅速发展,为体外构建理想的椎间盘组织创造了极其有利的条件并提供了可能。采用组织工程学技术构建椎间盘的研究目前国外尚处于起步阶段,国内少见报道。目前文献报道中应用于组织工程化髓核的细胞支架基本来源于骨或软骨组织工程的生物材料,文献少见报道髓核组织工程设计构建的专用支架材料。我们以生理条件下髓核细胞外基质的主要成份:Ⅱ型胶原(collagen type Ⅱ, $C_{Ⅱ}$)、6-硫酸软骨素(6-chondroitin sulfate, 6-CS)、透明质酸(hyaluronic acid, HyA)构建了仿生髓核组织工程细胞支架,以用于髓核组织工程研究。本研究以大鼠皮下包埋实验,检测所构建支架材料引发的免疫原性反应。以评价所构建的仿生支架材料的临床应用的适用性。

1 材料与方法

1.1 仿生髓核组织工程细胞支架的构建

1.1.1 $C_{Ⅱ}$/HyA海绵的构建 将猪$C_{Ⅱ}$(购自广州创尔生物

作者简介:李长青(1970-),男,天津市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脊柱外科基础与临床方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68774908,E-mail: younglee881@163.com

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2005-03-18

科技有限公司)溶于0.01 mol/L HCl(pH 2.3),4 ℃下搅拌,制成1.25%(W/V)的$C_{Ⅱ}$溶液,调整$C_{Ⅱ}$溶液的pH值至1~2。继续4 ℃搅拌的条件下,按9:1(V/V)比例逐滴加入以超纯水溶解的4 ℃、1.25%HyA(购于Sigma公司)溶液,速度控制在0.5 ml/min。混合后,4 ℃下300 r/min搅拌4 h,3 000 r/min、4 ℃离心15 min,去除气泡,将混合溶液倾入一次性培养皿中,轻轻震摇,使液面平整,立即置于-70 ℃冰箱冷冻。经两次冷冻干燥制成$C_{Ⅱ}$/HyA海绵。

1.1.2 $C_{Ⅱ}$/HyA-CS支架的构建 $C_{Ⅱ}$/HyA海绵按每50毫克干重浸泡于20 ml含50 mmol/L 2-吗啉乙烷磺酸(pH 5.5)的40%乙醇溶液中30 min(室温),然后将胶原浸泡在20 ml含50 mmol/L MES、24 mmol/L EDC、5 mmol/L琥珀酰胺和2% 6-CS(购于Sigma公司)的40%乙醇溶液中,室温(20~25 ℃)下交联24 h。将此支架在0.1 mol/L Na_2HPO_4中清洗2次,共1 h;1 mol/L NaCl中清洗2次,共2 h;2 mol/L NaCl中清洗24 h(期间更换6次),用超纯水清洗10次,冷冻干燥机中2次冻干得到$C_{Ⅱ}$/HyA-CS支架。将支架材料修剪成2 cm×2 cm×0.5 cm大小,质量约5 mg。^{60}Co消毒备用。

1.2 动物实验

1.2.1 实验分组 清洁级75只SD大鼠(第三军医大学新桥医院实验动物中心提供),体质量250~300 g,雌雄不拘。应用随机数字表进行完全随机化的分组,分为3组:正常组($n=5$)、对照组($n=35$)和移植组($n=35$)。对照组和移植组大鼠戊巴比妥30 mg/kg腹腔内麻醉,背部正中切口,深筋膜下分离形成一小袋样空隙。移植组植入支架。

1.2.2 标本采集 对照组和移植组动物各取5只分别于术后1、3、7、14、28、56、84 d取支架及周围皮下组织标本,部分标本常规石蜡包埋,行石蜡切片,常规HE染色。剩余的组织块立即放入液氮中快速冰冻、保存。同时心脏取血,分离血清,-70 ℃保存。正常组取皮下组织,部分标本行HE染色,剩余组织行液氮保存。心脏取血、分离血清,-70 ℃保存备检。

1.3 Th1/Th2细胞因子mRNA的测定

1.3.1 总mRNA的提取 应用Tripure试剂抽提组织块的总RNA,75%乙醇清洗2次,沉淀用DEPC处理的去离子水溶解。逆转录(试剂盒由Promega公司提供)按说明书操作。

1.3.2 PCR反应条件 以β-actin作为内参照。IL-4和IL-10:94 ℃ 3 min、94 ℃ 30 s、57 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s 35个循环,72 ℃ 5 min;IL-2和IFN-γ:94 ℃ 3 min、94 ℃ 30 s、60 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s 35个循环,72 ℃ 5 min,2%琼脂糖凝胶电泳,拍照后,经5500凝集图像分析系统记录并计算各目的基因与β-actin的IVD比值。引物由上海生工生物工程公司合成。引物序列见表1。

1.4 血液中Ⅱ型胶原抗体的检测

采用Chondrex公司的大鼠抗猪Ⅱ型胶原抗体ELISA检测试剂盒检测大鼠抗猪Ⅱ型胶原抗体的表达。

1.5 统计学方法

所得数据以$\bar{x}\pm s$表示。SPSS 11.5统计软件中Nonparametric Tests进行数据正态性检验和单因素方差分析和组间比较。

表1 RT-PCR引物序列与扩增片段长度

Tab 1 Primer sequence and length of RT-PCR amplified products

Objective gene		Primer sequence	Fragment length (bp)
IL-2	Forward primer	5′-CAGCTCGCATCTTGTGTTGCAC-3′	431
	Reverse primer	5′-CTACCTATCGGTAGACAGTTTCG-3′	
IFN-γ	Forward primer	5′-GTCATCGAATCGCACCTGATCAC-3′	304
	Reverse primer	5′-GGTCTCCTTACAGATATGTAGCC-3′	
IL-4	Forward primer	5′CTGTCACCCTGTTTCTGCTTT-3′	345
	Reverse primer	5′-TTACTCAGGTGCGAGTGTTG-3′	
IL-10	Forward primer	5′-CTGCTATGTTGCCTGCCTT-3′	417
	Reverse primer	5′-CATTCTTCACCTGCTCCAC-3′	
β-actin	Forward primer	5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′	540
	Reverse primer	5′-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′	

2 结果

2.1 炎症反应的动态变化

术后1 d,对照组在粘膜下纤维脂肪组织中可见中性粒细胞、淋巴细胞浸润。移植组支架周围及支架内部可见轻度中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞浸润。术后3 d,对照组粘膜肌层下可见少量淋巴细胞、嗜酸性粒细胞浸润,血管扩张、充血。移植组支架周边组织中可见血管扩张、充血。支架内可见少量中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞浸润。术后7 d,对照组未见明显炎性细胞浸润。支架中可见少量淋巴细胞、嗜酸性粒细胞。术后14 d,对照组未见明显异常。移植组部分区域支架结构开始消失,并有纤维肉芽组织形成。术后28 d,移植组支架部分被纤维肉芽组织取代。术后56 d,移植组支架大部分被纤维肉芽组织取代。术后84 d,移植组支架结构消失,完全为纤维肉芽组织取代(图1)。

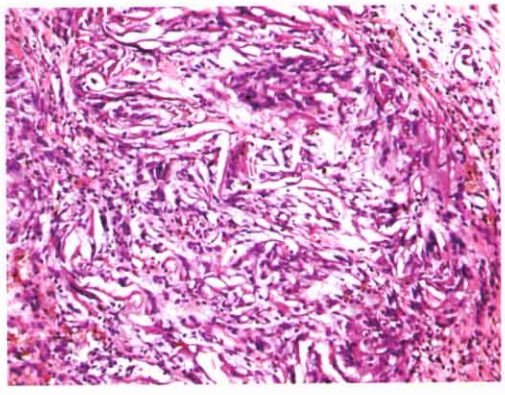


图1 移植后84 d,支架结构消失,代之以肉芽组织形成 (HE×200)

Fig 1 Structure of the implanted scaffold disappeared and granulation instead for full scaffold at postoperation day 84 (HE×200)

2.2 Th1/Th2细胞因子mRNA的表达

见表2、3。结果显示:IL-2、IFN-γ mRNA在两组组织中均未检测到。IL-10 mRNA及IL-4 mRNA在移植组各个时相点的表达均明显高于对照组及正常组($P<0.05$或$P<0.01$);对照组在术后14 d内表达高于正常组($P<0.01$),术后28~84 d表达与正常组无明显差异。在正常皮下组织中有低表达。

2.3 血清抗体水平检测

见表4。

表 2　各组 IL-4 mRNA 的表达（%，$\bar{x} \pm s$，IVD）

Tab 2　Expression of IL-4 mRNA in different groups（%，$\bar{x} \pm s$，IVD）

Group		After surgery						
		1 d	3 d	7 d	14 d	28 d	56 d	84 d
Normal	0.32 ± 0.09							
Control		0.62 ± 0.15△	0.74 ± 0.14△	0.77 ± 0.16△	0.76 ± 0.17△	0.45 ± 0.17	0.38 ± 0.13	0.37 ± 0.14
Implanted		0.94 ± 0.18△☆	0.99 ± 0.16△☆	1.00 ± 0.19△☆	1.01 ± 0.23△☆	0.86 ± 0.10△☆☆	0.79 ± 0.14△☆☆	0.80 ± 0.13△☆☆

△：$P < 0.01$，*vs* normal group；☆：$P < 0.05$，☆☆：$P < 0.01$，*vs* control group

表 3　各组 IL-10 mRNA 的表达（%，$\bar{x} \pm s$，IVD）

Tab 3　Expression of IL-10 mRNA in different groups（%，$\bar{x} \pm s$，IVD）

Group		After surgery						
		1 d	3 d	7 d	14 d	28 d	56 d	84 d
Normal	0.40 ± 0.06							
Control		0.61 ± 0.09△	0.71 ± 0.17△	0.64 ± 0.15△	0.63 ± 0.16△	0.48 ± 0.15	0.44 ± 0.11	0.42 ± 0.07
Implanted		0.84 ± 0.13△☆	0.96 ± 0.16△☆	0.89 ± 0.17△☆	0.87 ± 0.19△☆	0.95 ± 0.19△☆☆	0.96 ± 0.19△☆☆	0.86 ± 0.13△☆☆

△：$P < 0.01$，*vs* normal group；☆：$P < 0.05$，☆☆：$P < 0.01$，*vs* control group

表 4　血清中大鼠抗猪Ⅱ型胶原抗体表达变化（U/ml，$\bar{x} \pm s$）

Tab 4　Expression of rat anti-porcine collagen type Ⅱ IgG antibody（U/ml，$\bar{x} \pm s$）

Group		After surgery						
		1 d	3 d	7 d	14 d	28 d	56 d	84 d
Normal	1.43 ± 0.12							
Control		1.71 ± 0.36	1.81 ± 0.22	1.83 ± 0.26	1.53 ± 0.42	1.74 ± 0.40	1.95 ± 0.58	1.89 ± 0.61
Implanted		1.44 ± 0.16	1.85 ± 0.30	1.58 ± 0.21	1.41 ± 0.57	1.96 ± 0.19	1.92 ± 0.32	1.94 ± 0.52

3　讨论

组织工程学的研究已开展 10 多年。采用组织工程学技术构建椎间盘的研究目前国外尚处于起步阶段[2,3]，国内少见报道。设计和构建理想的支架材料是椎间盘组织工程研究的难点和热点之一。免疫原性是评价支架材料性能的重要指标之一。评价支架材料的免疫原性通常采用支架材料的皮下包埋实验[4]，或支架提取液的机体致敏实验[5]。两种实验方法相比较，机体致敏实验反映的是支架材料所引发的体液免疫，即抗体的形成。而皮下包埋实验不仅能观测机体对支架材料的体液免疫，同时还可观测支架材料植入后机体的细胞免疫情况。

本研究采用皮下包埋实验观测自行设计、构建的仿生髓核组织工程支架材料的免疫原性时发现大鼠对皮下包埋的支架材料具有良好的耐受性。与强刺激性异物反应不同的是所表现出的炎症反应是暂时的。主要表现在：术后的 3 d 内是以中性粒细胞浸润为主，7 d 后转变为淋巴细胞、嗜酸性粒细胞为主，并数量逐渐减少。与手术创伤反应的组织学变化过程相吻合。术后 7 d 出现血管增生、充血，并出现肉芽组织逐渐长入支架内，边缘的支架组织开始降解。炎性细胞逐渐消失。至术后 3 个月，支架材料完全被新生的肉芽组织所取代。表明机体并无强烈的排斥反应，随着时间的延长，炎症细胞逐渐死亡，浸润的微血管将闭塞，支架将被宿主同化，成为机体的一部分。因此，就细胞免疫而言，支架材料仅在移植初期引起大鼠体内轻度的炎性细胞反应。

T 辅助细胞通过分泌不同的细胞因子在机体免疫反应的调节中具有十分重要的作用。T 辅助细胞分泌的细胞因子分为 Th1 和 Th2 亚群。Th1 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 等，促进细胞免疫应答；而 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-10 等细胞因子，促进体液免疫应答同时具有抑制炎症反应和排斥反应的作用。当 T 辅助细胞反应向着某个方向（Th1 或 Th2）发展，则相应的亚群通过自分泌方式增强其作用，同时抑制相反方向的发展[6]。我们的研究结果表明：①对照组在术后 14 d 内 IL-10、IL-4 表达高于正常组，是由于手术创伤应激可以诱导 T 辅助细胞向 Th2 细胞转化，从而抑制炎症反应[7]。这与组织学变化过程相吻合。②移植组中 IL-10、IL-4 表达均高于正常组及对照组。一方面与手术创伤应激可以诱导 T 辅助细胞向 Th2 细胞转化，从而抑制炎症反应[6]有关；另一方面表明支架移植后主要诱导 T 辅助细胞向 Th2 细胞转化。然而移植组血清抗体表达水平未见升高，表明 IL-4、IL-10 细胞因子的表达增高可能主要抑制了 IL-2、INF-γ 的表达，从而抑制炎症反应和排斥反应，表现为在实验中支架材料移植后局部炎症反应轻微和无明显排斥反应。③移植组中未检测出 IL-2、IFN-γ 的表达增高，表明支架材料未引发明显的细胞免疫反应。因此就细胞免疫而言，支架材料无明显的免疫原性。

同时我们检测了大鼠体内抗猪Ⅱ型胶原抗体的分

泌情况，结果显示：各时相点实验组与对照组及正常组比较，抗体表达无明显变化。表明自行构建的支架材料在大鼠体内未引发机体的体液免疫，即在体液免疫方面，所设计构建的支架材料无免疫原性。

因此，通过本实验研究表明：自行设计、构建的仿生髓核组织工程支架材料无明显的免疫原性，可以对所构建的支架材料进行深入研究。

参考文献：

[1] Schvartzman L, Weingarten E, Sherry H, *et al*. Cost-effectiveness analysis of extended conservative therapy versus surgical intervention in the management of herniated lumbar intervertebral disc [J]. Spine, 1992, 17(2): 176 - 182.

[2] Sato M, Asazuma T, Ishihara M, *et al*. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method [J]. Spine, 2003, 28(6): 548 - 553.

[3] Mizuno H, Roy A K, Vacanti C A, *et al*. Tissue-engineered composites of anulua fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement [J]. Spine, 2004, 29(12): 1290 - 1298.

[4] Anselme K, Bacques C, Charriere G, *et al*. Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural, and immunological study[J]. J Biomed Mater Res, 1990, 24(6): 689 - 703.

[5] DeLustro F, Condell R A, Nguyen M A, *et al*. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen[J]. J Biomed Mater Res, 1986, 20(1): 109 - 120.

[6] 吴秋合，姚 敏，潘银根，等. 异种(猪)脱细胞真皮基质移植后炎症免疫反应的实验研究[J]. 中华整形外科杂志，2002，18(5)：266 - 268.

[7] 郑峻松，彭代智，黄文华. Th1、Th2细胞与外科应激[J]. 国外医学临床生物化学与检验分册，1999，20(4)：164 - 166.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)09-0840-01

先天性食管闭锁误诊分析

Misdiagnosis of congenital esophageal atresia

龙 华，姜小华 (重庆市涪陵中心医院新生儿监护中心，涪陵 408000)

先天性食管闭锁是较少见的先天性消化道疾病，发病率为0.16% ~ 0.4%[1]，现将2例被误诊的先天性食管闭锁分析如下。

1 临床资料

例1：女婴5 h。胎龄39+4周，因"羊水过多"行剖宫产，产质量2.2 kg，Apgar评分：1 min 6分，5 min 8分，生后即出现气促，紫绀，以"新生儿窒息，新生儿吸入性肺炎"收住。查体：体温36.5 ℃，脉搏102次/min，呼吸56次/min，前囟平软，面色、唇周发绀，双肺呼吸音粗，闻及大量粗中湿啰音，心律齐，心音有力，肝脾未扪及，四肢肌张力正常，原始反射顺利引出。入院后摄胸片提示肺炎，给予控制感染，持续低流量给氧，吸痰等处理，治疗1 d多，患儿病情无好转，口腔中有大量泡沫痰，似螃蟹样，喂奶后不能咽下，即从口腔、鼻腔中溢出，疑有消化道畸形，置胃管自口腔内返出，予以食道造影摄片确诊为先天性食管闭锁。例2：男婴18 h，胎龄37周，自然分娩，产质量2.2 kg，羊水量多，生后即出现口吐白沫，唇周发绀，以"新生儿吸入性肺炎"收住。住院后发现患儿一直吐大量泡沫痰，喂奶后出现呕吐，疑有消化道畸形，给予置胃管，第1次置入，第2次失败，从口腔中返出。予以食道造影检查，确诊为先天性食管闭锁。

2 讨论

先天性食管闭锁是新生儿消化系统较严重的发育畸形。临床诊断并不困难，但往往被忽视而误诊。临床遇有新生儿生后口吐白沫，量多，喂水或喂奶后出现呕吐，呛咳，青紫或呼吸困难，再加以母亲有羊水过多史或伴有其他先天畸形，就应怀疑本病[2]。简易方法可从鼻孔插入胃管受阻折返而由口腔或鼻腔返出，为早期较特异的诊断依据，确诊还需食道X线造影检查。先天性食管闭锁易合并吸入性肺炎，这2例早期误诊的原因是满足于肺炎的诊断而未试插胃管或胃管插入后盘曲在近端食管盲端内，而造成进入胃的假象[3]。因此，凡是出现类似现象的患儿就应该考虑新生儿先天性食管闭锁，争取在尚未发生肺部炎症时尽早明确诊断，及时转外科手术治疗，以提高治愈率和成活率。

关键词：新生儿；食管闭锁；误诊

中图法分类号：R655.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄 海，陶建平，曾其毅. 新生儿先天性食管闭锁合并食道气管瘘高频震荡通气治疗的机理与临床(附9例报告)[J]. 现代临床医学生物工程学杂志，2000，6(1)：7 - 8.

[2] 陈明清. 新生儿先天性食管闭锁一例报告[J]. 中国优生与遗传杂志，2002，10(6)：104.

[3] 吴 玲，钱龙宝. 新生儿先天性食管闭锁[J]. 实用儿科临床杂志，1994，9(2)：115 - 116.

(编辑 刘洪娥)

作者简介：龙 华(1963 -)，女，重庆涪陵市人，副主任医师，主要从事新生儿方面的研究，发表论文5篇。电话：(023)72220428

收稿日期：2004-12-20；修回日期：2005-03-11