文章编号:1000-5404(2007)13-1313-03

论著

脱细胞脊髓支架的成分分析

郭树章,任先军,蒋 涛,吴 波 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨同种异体脱细胞脊髓支架的制备方法并分析其可能含有的有效成分。**方法** 采用冻融+化学萃取方法制备脱细胞脊髓支架,光镜及扫描电镜观察其结构特征;用免疫组织化学法分析脱细胞支架的主要成分。**结果** 正常的大鼠脊髓组织经脱细胞处理后,清除了所有的细胞成分及髓鞘和轴突,扫描电镜显示保存了细胞外基质成分构成了三维支架结构。成分分析结果显示,存留的支架结构中含有层黏连蛋白(laminin, LN)、纤连蛋白(fibronectin, FN)、Ⅳ型胶原等诱导和促进神经再生、促进细胞黏附和增殖的重要成分。**结论** 脱细胞异体脊髓具有三维支架结构,含有诱导和促进神经再生的相关蛋白,有利于受损神经的再生及移植细胞的存活和增殖。

关键词:脱细胞脊髓;组织工程支架;成分;大鼠

中图法分类号:R318.08;R322.81 **文献标识码**:A

Componential analysis of acellular scaffold of spinal cord

GUO Shu-zhang, REN Xian-jun, JIANG Tao, WU Bo (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To prepare the acellular scaffold of spinal cord and analyze its component. Methods The acellular scaffold was prepared with the freeze thawing and chemical extraction, its structure was observed by HE and SEM, its component was analyzed by immunohistochemistry. Results The cells, myelin sheath and axon of nerve fibers in the rat spinal cord were eliminated, but three-dimensional supports of extracellular matrix were reserved. The analytical results showed the component of the acellular spinal cord contain laminin, fibronectin and type Ⅳ collagen—the necessary components to facilitate and induce the regeneration of the injured nerves and enhance the adhesion and proliferation of cells. Conclusion The acellular spinal cord has three dimensional structure and contains several proteins related to the regeneration of the injured nerves and promotion of the survival and proliferation of cells.

Key words: acellular spinal cord; tissue engineering scaffold; component; rat

组织工程技术是近年来的研究热点[1-3],而组织工程材料应与受体组织具有相似的三维结构和良好的生物相容性;具有生物活性,可诱导细胞生长、分化并被机体降解吸收等。我们采用冻融+化学萃取方法制备了与脊髓组织具有相似结构的脱细胞异体脊髓支架。本研究采用组织学及免疫组织化学的方法对支架可能含有的成分进行分析,从而为脊髓损伤修复的应用提供实验依据。

作者简介:郭树章(1975-),男,天津市人,博士研究生,主治医师,主要从事脊柱外科方面的研究。电话:13228683181,E-mail: gszlch@yahoo.com.cn

通讯作者:任先军,电话:(023)68774081

收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-04-12

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SD大鼠10只,体质量180~200 g,雌雄不限(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),脱氧胆酸钠(北京奥博星公司),DNase、RNase(华美生物工程公司),纤连蛋白(fibronectin, FN)抗体(中杉金桥),层黏蛋白(laminin, LN)抗体、Ⅳ型胶原抗体、SABC试剂盒、DAB显色剂(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 脱细胞脊髓的制备[4]

以戊巴比妥钠将SD大鼠经腹腔麻醉,背部去毛后消毒,取后正中切口,打开椎板,显露脊髓,取胸段脊髓约2 cm。PBS缓冲液清洗,去除表面血迹,参照Ribatti等[5]方法并加以改进:①脊髓置于-80 ℃深低温冰箱中冻存1 h,室温下解冻。②将脊髓组织置于蒸馏水内,在室温下浸泡6 h,每2小时换液1次。

③置于3%的脱氧胆酸钠盐蒸馏水溶液(加入适量1 mol/L NaOH至溶液pH值为8~9)连续震荡4 h(恒温回旋振荡器内持续振荡,25 ℃ 100 r/min)。④蒸馏水中振荡浸泡3 h,1 h换液1次。⑤置于1 kU/ml DNase Ⅰ和RNaseA混合液中持续振荡30 min。⑥蒸馏水浸泡3 h,1 h换液1次。⑦重复③-⑥再萃取1遍,最后将萃取后的脊髓组织置于冷冻干燥机中冻干,^{60}Co照射消毒,照射剂量2.5 Gy,消毒后-80 ℃冰箱保存。

1.3 HE及免疫组织化学观察

将化学萃取的脊髓支架和大鼠正常脊髓用10%中性甲醛缓冲液固定,常规石蜡包埋,两种标本均行横切片和纵切片,切片后进行HE染色,光镜观察。免疫组织化学方法观察FN、LN、Ⅳ型胶原的表达变化情况。

1.4 扫描电镜观察

标本经2.5%戊二醛及锇酸固定后,经液氮快速冷冻,折断标本,临界点干燥,真空喷金KYKY-3200扫描电子显微镜下观察脱细胞脊髓表面结构。

2 结果

2.1 大体观察

在脱细胞、蒸馏水浸泡过程中可见大量白色絮状物自脊髓内析出,脱细胞处理的脊髓支架颜色呈乳白色,半透明状,仍维持圆柱形,直径为处理前的2/3~4/5,略变短。韧性与处理前脊髓组织相似,黏性略有增加。

2.2 HE染色结果

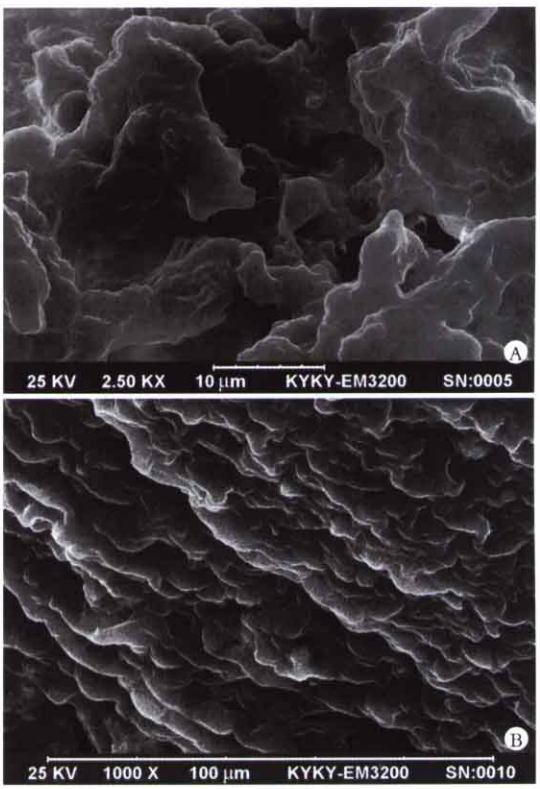
正常大鼠脊髓横切面结构,含有大量神经元和胶质细胞,组织结构致密,髓鞘存在。脱细胞脊髓支架横切面上呈大小不等的网眼状结构,轴突及髓鞘均已消失,未见细胞成份存在。纵切面可见脊髓支架呈交错的纵行管状结构。

2.3 扫描电镜观察结果

在SEM下,标本的细胞成分被完全除去,细胞外基质存在,可见脱细胞后孔隙得以保存,与细胞外基质共同组成三维立体网状结构(图1)。

2.4 免疫组织化学染色结果

在正常脊髓及脱细胞脊髓中,LN、FN及Ⅳ型胶原均呈阳性反应,但脱细胞脊髓染色弱于正常脊髓,细胞结构消失,呈网状结构,表明经过脱细胞处理后,细胞外基质成分大部得到保留。见图2、3。



A: 横切面(×2 500); B: 纵切面(×1 000)

图1 脱细胞脊髓扫描电镜观察

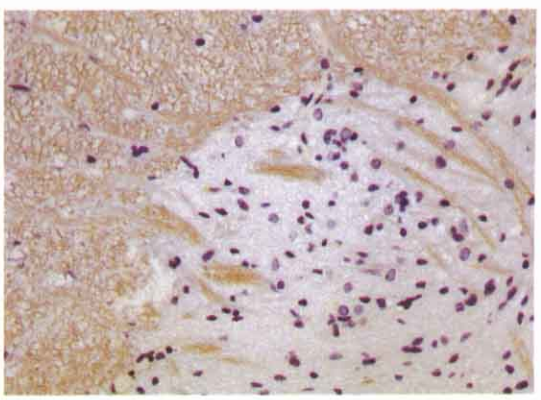
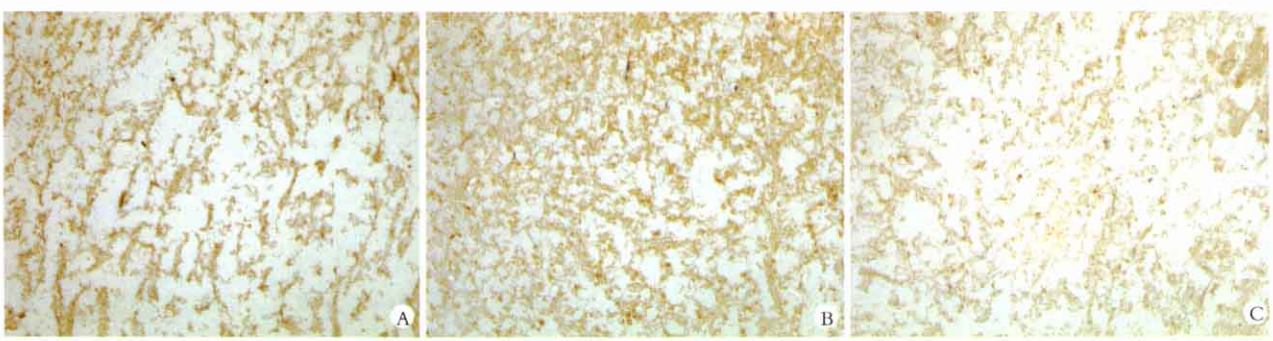


图2 正常大鼠脊髓免疫组化染色结果 FN呈阳性表达 (SABC×400)



A:FN; B:LN; C:Ⅳ型胶原

图3 免疫组化结果显示脱细胞脊髓LN、FN及Ⅳ型胶原均呈阳性反应 (SABC×400)

3　讨论

组织工程技术有望成为治疗脊髓损伤的重要手段，其研究已取得一定的进展。目前应用于脊髓的组织工程支架多采用可降解性天然或合成高分子生物材料，但均有各自的优缺点：天然可降解性高分子材料生物相容性好，降解产物易于被吸收而不产生炎症反应，但力学性能差，难以构建多孔三维支架；可降解性合成高分子材料降解速度和强度可调，容易塑型和构建高孔隙度三维支架，但其降解产物容易产生炎症反应，降解时会使局部环境酸度过高，该类材料对细胞亲和力弱，不利于细胞黏附及生长，且目前制备技术难以达到完全模仿脊髓组织复杂三维的结构的要求。

近年来一种新的趋势是采用天然的脱细胞基质作为神经组织的修复材料，用同种异体来源的材料，采用脱细胞技术形成生物衍生材料，用于组织工程研究及临床应用。去除细胞后的支架成分免疫原性显著下降，郭树章等[6,7]用免疫学方法证明了细胞外基质（extracellular matrix，ECM）大分子物质在同种异体间几乎无免疫原性。

本研究采用冻融 + 脱氧胆酸钠 + NaOH + DNase Ⅰ、RNase A 方法可去除脊髓细胞成分，保留细胞外基质并构成三维网状结构。经免疫组织化学检测，支架含有 LN、FN 以及Ⅳ型胶原等细胞外基质的主要成分。ECM 是由胶原和弹性蛋白构成的网状结构的支持性支架。胶原是主要的支架结构。FN 和 LN 是 ECM 的重要组成成分，为重要组成基质结构，对其组装、产生、细胞黏附、分化和增殖也起重要作用。ECM 中 FN 参与细胞活动，对细胞起趋化作用，与细胞分裂有关。正常细胞可借助 FN 黏附于基底膜和 ECM 上，FN 与胶原构成细胞黏附和迁移的正常基质。在神经系统中 LN 和 FN 是引导神经轴突生长方向、刺激轴突生长作用很强的物质。Tom 等[8]研究发现 FN 在大鼠白质轴突再生中具有重要作用。Blackmore 等[9]研究发现在脊髓损伤后 LN 表达明显减少，并认为其与轴突生长密切相关。使用经 FN 或 LN 处理的多聚体支架，增强联合培养的细胞黏附率，在神经组织工程中促进 Swan 细胞黏附和神经突生长[10,11]。

本实验将异体大鼠脊髓经脱细胞处理后，FN、LN 及Ⅳ型胶原仍保留在细胞外基质内，有助于细胞的黏附、存活和增殖，从而有助于脊髓损伤后功能的恢复。当然在细胞外基质中还存在其他成分，有待于进一步研究。总之，本实验制备的同种异体脊髓支架，具有三维立体结构，含有促进受损神经再生的生物活性物质，具有良好的仿生性和组织相容性，可作为桥接脊髓缺损的移植物及和种子细胞种植的支架材料，将会有广阔的应用前景。

参考文献：

[1] 李长青，周　跃. 仿生髓核组织工程细胞支架的免疫原性研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：837－840.

[2] 刘　杰，许建中，王序全，等. 脱钙骨基质支架构建组织工程骨的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：888－891.

[3] 李长青，周　跃，张传志. 仿生髓核组织工程细胞支架的构建及初步理化指标分析[J]. 第三军医大学学报，2005，27(13)：1351－1354.

[4] 郭树章，任先军，蒋　涛，等. 脱细胞脊髓天然支架的制备及形态学观察[J]. 中国矫形外科杂志，2007，15(3)：226－228.

[5] Ribatti D，Conconi M T，Nico B，*et al*. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane[J]. Brain Res，2003，989(1)：9－15.

[6] 郭树章，任先军，蒋　涛，等. 大鼠脱细胞异体脊髓支架的免疫原性研究[J]. 中国矫形外科杂志，2007，15(16)：444－446.

[7] Gulati A K. Immunological fate of Schwann cell-populated acellular basal lamina nerve allografts[J]. Transplantation，1995，59(11)：1618－1622.

[8] Tom V J，Doller C M，Malouf A T，*et al*. Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter[J]. J Neurosci，2004，24(42)：9282－9290.

[9] Blackmore M，Letourneau P C. Changes within maturing neurons limit axonal regeneration in the developing spinal cord[J]. J Neurobiol，2006，66(4)：348－360.

[10] Miller C，Jeftinija S，Mallapragada S. Micropatterned Schwann cell-seeded biodegradable polymer substrates significantly enhance neurite alignment and outgrowth[J]. Tissue Eng，2001，7(6)：705－715.

[11] Biran R，Webb K，Noble M D，*et al*. Surfactant-immobilized fibronectin enhances bioactivity and regulates sensory neurite outgrowth[J]. J Biomed Mater Res，2001，55(1)：1－12.

（编辑　王小寒）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每 3 位分 1 节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如 2,431 改为 2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部