文章编号:1000-5404(2010)01-0019-04

论著

2种去细胞方法制备大鼠脱细胞脊髓支架效果的对比研究

郭树章,蒋 涛,任先军 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 比较脱氧胆酸钠+Triton X-100和脱氧胆酸钠+DNA+RNA酶2种脱细胞方法制备脱细胞的同种异体脊髓支架的效果。**方法** 取成年SD大鼠胸段脊髓2 cm,运用冻融+化学萃取的组织工程学方法(脱氧胆酸钠+Triton X-100和脱氧胆酸钠+DNA+RNA酶)处理大鼠脊髓组织,对处理后的脊髓支架分别进行HE染色,髓鞘染色和扫描电镜观察。**结果** 2种方法均较为完全地脱去了细胞和髓鞘成分,脊髓横断面上呈网状结构,未见细胞成分存留,纵切面上呈互相交错的管状通路;未见轴突、髓鞘和细胞核。**结论** 采用冻融+化学萃取的2种组织工程学方法均可制备出理想的天然脊髓支架,该支架与脊髓三维组织结构具有高度相似性,有望作为脊髓损伤后桥接物和神经组织工程种子细胞的支架。

[关键词] 脱细胞脊髓;组织工程支架;大鼠,脱氧胆酸钠;Triton X-100
[中图法分类号] R-331; R318; R322.812 [文献标志码] A

Comparison of 2 decellularizing methods to prepare rat acelluar allograft spinal cord scaffold

Guo Shuzhang, Jiang Tao, Ren Xianjun (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the effect of 2 decellularizing methods, sodium deoxycholate plus Triton X-100 or plus DNase and Rnase, in the preparation of acelluar allograft spinal cord scaffold in order to provide an ideal natural spinal cord scaffold to bridge the nerve gap. **Methods** Spinal cord was removed from health rats, and then decellularized by the method of freeze thawing (immersing in 3% sodium deoxycholate followed by the mixture of 1×10^3 U/ml DNase and RNase), or by chemical extraction (immersing in 1% Triton X-100 and then 1% sodium deoxycholate). HE staining, myelin staining and scanning electron microscopy (SEM) were employed to evaluate the spinal cord scaffold after the 2 methods of decellularization. **Results** Both cells and myelin were completely decellularized with the 2 methods. In cross section, network of the extracellular matrix was presented without axon, sheath and cells nucleus being seen in the scaffold. Typical network of empty tubes were viewed in longitudinal sections. **Conclusion** An ideal spinal cord scaffold can be produced with these 2 decellularizing methods in tissue engineering. The scaffold made by the 2 methods have similar three dimensional structure with normal spinal cord, so can be used as a graft to bridge the nerve gap directly or as a scaffold to implant the seeding cells in spinal cord tissue engineering.

[**Key words**] acellular spinal cord; tissue engineering scaffold; rats; sodium deoxycholate; Triton X-100

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30872600) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (2007C126).
Corresponding author: Ren Xianjun, Tel: 86-23-68774081, E-mail: ren_xianjun@sina.com

脊髓损伤后轴突再生和功能恢复一直是骨科及神经外科的难题,虽然近年来脊髓损伤修复取得了一定的进步,但仍未取得突破性进展。组织工程技术的兴起,为脊髓损伤修复提供了一种新的选择。在目前有限可供选择种子细胞前提下,组织工程支架的选择显得尤为重要。

近年来,一种新的趋势是以天然的脱细胞基质作为神经组织的修复材料,即用同种异体来源的材料,采用脱细胞技术制备的脱细胞基质,形成生物衍生材料(bio-derived material),用于组织工程研究。目前常用酶消化法或细胞洗涤剂(detergent)法去除生物材料中的细胞成分和可溶性蛋白,得到无抗原性且机械性能

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30872600);重庆市自然科学基金面上项目(2007C126)
[通信作者] 任先军,电话:(023)68774081,E-mail: ren_xianjun@sina.com

良好的支架。基于上述理念,我们从数种脱细胞方案中成功筛选出2种效果较好的脱细胞方案,这2种脱细胞方案均能较为彻底地去除脊髓支架中的细胞成分和髓鞘成分[1,2]。本实验从组织学角度比较2种方法的脱细胞效果,旨在为制备完善的具有三维网状结构的生物衍生组织工程脊髓支架材料提供切实可行的技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脱氧胆酸钠(北京奥博星公司) DNase Ⅰ、RNase A(华美生物工程公司),恒温回旋振荡器(重庆仪器有限公司),Triton X-100(北京奥博星公司),铁明矾、硼砂及铁氰化钾为新桥医院病理科惠赠,扫描电子显微镜(KYKY-3200,中国),普通光学显微镜(Olympus,日本)。

1.2 实验动物

健康成年SD大鼠10只,雌雄不拘,体质量(236.51±0.56)g(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)。

1.3 大鼠脱细胞脊髓支架的制备方案

1.3.1 方案一:脱氧胆酸钠+DNA+RNA酶 参照Ribatti等[3]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)连续振荡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1×10^3 U/ml DNase和RNase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重复步骤③~⑥再萃取1遍,最后将萃取后的脊髓组织置于无菌PBS溶液中4 ℃保存待用。

1.3.2 方案二:脱氧胆酸钠+Triton X-100 参照文献[4]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1% Triton X-100/0.01 mol/L PBS溶液连续振荡3 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;⑤1%脱氧胆酸钠/0.01 mol/L PBS溶液持续振荡3 h;⑥蒸馏水浸泡3 h,1 h换液1次;⑦重复步骤③~⑥再萃取1遍,最后将萃取后的脊髓组织置于无菌PBS溶液中4 ℃保存待用。

1.4 组织学观察

1.4.1 HE染色 将2种方法制备的脊髓支架用14%多聚甲醛磷酸缓冲液固定,常规石蜡包埋,2种标本均行横切片和纵切片,切片后进行HE染色,光镜观察。

1.4.2 髓鞘染色(Weil髓鞘染色法) 组织切片厚5~8 μm,脱蜡至水,Weil苏木精50 ℃孵育15 min(10%纯酒精性苏木精5 ml,4%铁明矾50 ml蒸馏水45 ml),自来水洗15 min,4%铁明矾分化至灰白质分辨明显,必要时用Weigert分化液补充分化(硼砂2 g,铁氰化钾2.5 g,蒸馏水200 ml),自来水洗,脱水,透明,封片,光镜观察。

1.4.3 扫描电镜观察 取脱细胞脊髓支架,0.1 mol/L磷酸盐缓冲液清洗。将标本置于2.5%戊二醛和2%多聚甲醛混合液中固定,保存于4 ℃恒温冰箱中。使用乙醇进行梯度脱水,换入干燥容器后用100%丙酮(加无水$CaCl_2$)进行3次脱水(每次10 min),对样本用100%乙酸异戊酯(加无水$CaCl_2$)置换3次,将置换后的组织片放在带滤纸的样品盒中,临界点干燥。将样品粘贴在样品台上,观察面朝上真空喷金,应用扫描电子显微镜观察脱细胞脊髓的孔性结构及支架的空间排列并计算孔径大小。

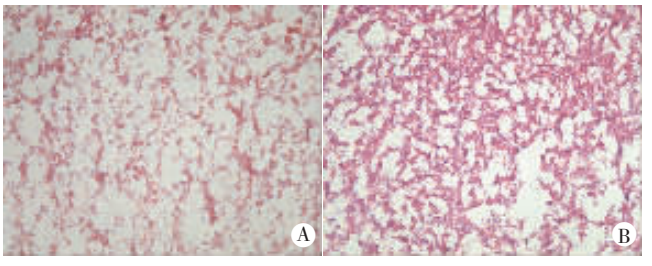
2 结果

2.1 肉眼观察

2组脱细胞脊髓在脱细胞、蒸馏水浸泡过程中可见大量白色絮状物析出,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,粗细为处理前的2/3~4/5,略变短;强度略有下降,韧性与处理前脊髓组织相似,粘性略有增加。方案二中析出物较方案一略少,同时方案二所制备的脱细胞支架韧性略好于方案一制备的支架,但2组脱细胞脊髓在外观上无明显区别。

2.2 HE染色

2组脱细胞技术处理所获得的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,未见细胞成分存在。纵切面可见脊髓支架呈交错的纵行管状结构,2组处理方法均较为彻底地去除了细胞和髓鞘成分,但方案二处理的脱细胞支架细胞外基质破坏相对较少(图1)。

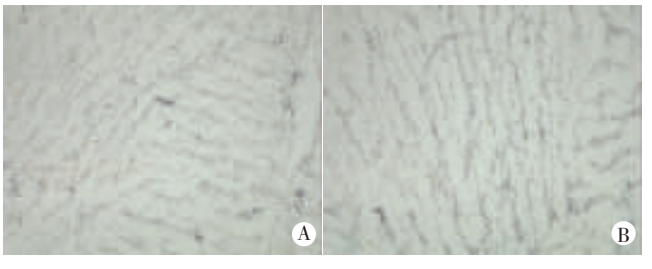


A:方案一;B:方案二

图1 2种方法脱细胞效果观察 (HE ×400)

2.3 髓鞘染色

在正常髓鞘染色中,可见完整髓鞘存在,而经过脱细胞处理后,在2组脱细胞脊髓中均未见髓鞘成分或存在极少量髓鞘碎片,表明髓鞘成分去除较为彻底,二者在脱髓鞘效果上无明显区别(图2)。

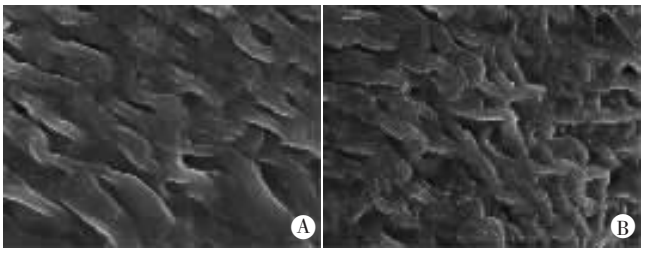


A:方案一;B:方案二

图2 2种方法脱细胞处理后髓鞘染色观察 (Weil髓鞘染色 ×400)

2.4 扫描电镜观察

在SEM下,2组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。各通道之间互相沟通形成三维立体网状结构,支架的三维网状结构得到较为完整的保存(图3)。



A:方案一;B:方案二

图3 2种方法脱细胞处理超微结构观察 (SEM ×1 500)

3 讨论

脊髓损伤后轴突再生和功能恢复一直是骨科及神经外科的难题,虽然近年来脊髓损伤修复取得了一定的进步,但仍未取得突破性进展[5]。许多学者已经意识到单纯依靠某种细胞或神经营养因子难以彻底解决治疗中所遇到的问题,对于脊髓损伤的治疗应包括组织水平的重建,整合治疗研究的各种有效策略,诱导轴突再生并提供良好的三维通道,减少胶质瘢痕和空洞形成。组织工程或许是达到这一理想要求的有效途径。在目前有限可供选择种子细胞前提下,组织工程支架的选择显得尤为重要。目前尚无与脊髓三维结构高度相似且在理化性能也与脊髓相似的支架材料。为此我们设想采用天然的大鼠脊髓组织为材料脱细胞基质作为脊髓组织的修复材料,用于组织工程研究。

脱细胞技术在构建组织工程化膀胱[6]、小肠[7]、心瓣膜[8]、肌肉[9]、周围神经[10]等方面已有广泛应用,并被证明免疫排斥反应轻微。

在大量周围神经异体移植的实验中证明,去除细胞及髓鞘的异体周围神经移植后几乎不引起免疫排斥反应[11]。在中枢神经系统中,Ribatti等[3]将SD大鼠脑组织脱细胞处理后植入鸡胚绒毛膜尿囊膜,结果显示能明显促进血管新生,并且没有发现炎细胞浸润。能否对脊髓组织进行脱细胞处理,构建理想的组织工程支架,目前尚少见相关文献报道。

基于这一理念,我们参照国外学者周围神经脱细胞方案及脑组织脱细胞方案[3,4]并进行适当改进后,从多种脱细胞方案中筛选出2种较为成功的脱细胞方法[1,2]。目前文献中对2种脱细胞方法没有进行综合比较研究,不同方法的优劣性很难判明。本实验就这2种脱细胞法进行比较以考察其可行性,从实验结果看,在组织切片上观察不出二者的明显差异,表明二者均可作为脱细胞方案制备脱细胞脊髓支架。

国内外许多学者用Triton X-100和脱氧胆酸钠进行了各种组织脱细胞基质的制备。Sondell等[4]使用三硝基甲苯和脱氧胆酸钠对大鼠周围神经作萃取处理,可将神经组织内的细胞全部溶解,而神经基底膜管及其外周的胶原成分则被完整保留下来。

Triton X-100是一种非离子表面活性剂,是一种相当柔和的除垢剂,在水中不解离,在溶液中稳定性高,不易受强电解质无机盐类的影响,并且不改变组织的天然结构,目前已广泛用于脱细胞血管、脱细胞瓣膜和脱细胞神经的制作。Triton X-100结构上的亲水基团能够溶解细胞膜及细胞器表面膜结构的蛋白质,并且能够清除磷脂类物质,使细胞成分溶于Triton X-100溶液中,从而达到清除组织中细胞成分的目的;疏水端也能与膜蛋白的疏水区结合形成复合物,溶解于溶液中[12,13]。因此,Triton X-100能彻底破坏生物膜,使细胞及其内的细胞器溶解破坏。用脱氧胆酸钠溶液浸泡组织能进一步溶解细胞中的脂类、蛋白质等,能有效去除神经髓鞘和其他细胞内容物;脱氧胆酸钠可以使蛋白以单体的形式被分离,但对蛋白质的变性作用也较弱,对结构影响不大。用PBS反复漂洗神经,能将破坏的细胞成分彻底洗脱出来。非离子型去垢剂Triton X-100和脱氧胆酸钠均对组织结构影响不大,去除细胞彻底。本研究结果显示Triton X-100和脱氧胆酸钠脱细胞作用温和,脱细胞时间相对较长,时间控制较为方便。DNA酶和RNA酶能分解组织细胞中的核酸物质,组织基因组DNA含量平均下降91%,但细胞破坏作用较为强烈,故脱细胞时间较短,需严格控制脱细胞时间。本研究结果显示2种脱细胞方法处理的脊髓经组织学证实细胞基本完全脱落,支架内未见轴突、髓鞘、细胞残留物,细胞支架结构保存完好,电镜下三维网状结构完整存在。在实验过程中我们体会到,在实验中浸泡和冲洗时间一定要充足,才能保证将破坏的细胞成分以及化学试剂全部从组织中清除。研究表明所制备的细胞外基质主要成分是层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、Ⅳ型胶原等[2],具有促进引导神经再生的作用;对种子细胞的黏附及其成熟和功能表达又有促进作用。本实验利用组织工程学方法成功地制备仿真脊髓支架,其形态结构是以细胞外基质为主的完整的三维网架,具有良好的仿生性,有可能成为新型理想脊髓组织工程支架。

参考文献：

[1] 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.

[2] 郭树章，任先军，蒋涛，等. 脱细胞脊髓支架的成分分析[J]. 第三军医大学学报，2007，29(13)：1313－1315.

[3] 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.

[4] Sondell M，Lundborg G，Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction[J]. Brain Res，1998，795(1)：44－54.

[5] Branco F，Cardenas D D，Svircev J N. Spinal cord injury：a comprehensive review[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am，2007，18(4)：651－679.

[6] Bolland F，Korossis S，Wilshaw S P，*et al*. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering[J]. Biomaterials，2007，28(2)：1061－1070.

[7] Knight R L，Wilcox H E，Korossis S A，*et al*. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves[J]. Proc Inst Mech Eng，2008，222(H1)：129－143.

[8] Conconi M T，Nico B，Mangieri D，*et al*. Angiogenic response induced by acellular aortic matrix *in vivo*[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol，2004，281(2)：1303－1307.

[9] Zhong H，Chen B，Lu S，*et al*. Nerve regeneration and functional recovery after a sciatic nerve gap is repaired by an acellular nerve allograft made through chemical extraction in canines[J]. J Reconstr Microsurg，2007，23(8)：479－487.

[10] Kajbafzadeh A M，Payabvash S，Salmasi A H，*et al*. Time-dependent neovasculogenesis and regeneration of different bladder wall components in the bladder acellular matrix graft in rats[J]. J Surg Res，2007，139(2)：189－202.

[11] Rovak J M，Bishop D K，Boxer L K，*et al*. Peripheral nerve transplantation：the role of chemical acellularization in eliminating allograft antigenicity[J]. J Reconstr Microsurg，2005，21(3)：207－213.

[12] Angele P，Abke J，Kujat R，*et al*. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices[J]. Biomaterials，2004，25(14)：2831－2841.

[13] Uluoglu C，Zengil H. Comparison of different de-endothelization procedures in the isolated rat thoracic aorta：a short communication[J]. Res Common Mol Pathol Pharmacol，2003，11(3)：289－297.

（**收稿**：2009-09-20；**修回**：2009-11-16）

（编辑　栾　嘉）

（上接12页）

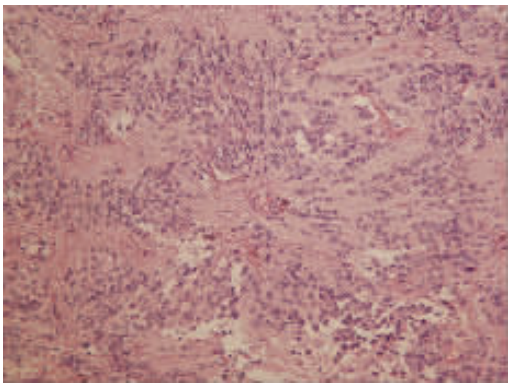


图2　脊髓内脑室外神经细胞瘤病理学观察　（HE ×100）

2　讨论

原发于脊髓的脑室外中枢神经细胞瘤临床上十分罕见，目前国内尚少见文献报道，国外共报道8例，其中1例为椎管内脊髓外神经细胞瘤[2-4]。发病以男性多见，8～72岁均有发病，平均年龄约40岁，一般发生于颈段或上胸段。临床表现为患部疼痛，相应脊髓平面以下患肢麻木、乏力、胀痛等，严重者合并活动障碍及深、浅感觉异常。该病组织学分化良好，主要由具有向神经元分化潜能的小圆细胞组成，并可见大量均质纤维性基质。突触素(Syn)及神经元特异性烯醇酶(NSE)阳性，可确定其神经元来源。

影像学上，由于脊髓内脑室外神经细胞瘤偏良性，多呈境界清楚的占位性肿块，MRI表现T_1WI呈等信号，T_2WI呈高信号，增强后有不同程度强化[2-4]。血管造影显示多数肿瘤血供较丰富，但罕见供血动脉。本例脊髓神经细胞瘤MRI表现比较典型，与文献报道基本一致，不同之处在于：①患者为女性，与文献报道男性多见不同，可能与样本量少有关，结果缺乏统计学意义。②本例肿瘤T_2WI可见液平面及周边环状低信号影，其原因可能与坏死、出血后陈旧性凝血块及含铁血黄素沉着有关。③肿瘤血供一般，与多数文献报道肿瘤血供较丰富不一致，其血供问题尚有待进一步验证。总之，脊髓内脑室外神经细胞瘤临床极为罕见，由于目前报道的病例数十分有限，对该病临床和影像学特点的总结还需进一步的病例积累。全切除肿瘤是目前首选的治疗方式，多数患者预后良好，少数有复发。

参考文献：

[1] Louis D N，Ohgaki H，Wiestler O D，*et al*. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. Acta Neuropathol，2007，114(2)：97－109.

[2] Gokhan G A，Gurer I E，Akyuz M，*et al*. A case of extraventricular neurocytoma of the spinal cord[J]. Neuropathology，2008，28(3)：322－325.

[3] Singh A，Chand K，Singh H，*et al*. Atypical neurocytoma of the spinal cord in a young child[J]. Childs Nerv Syst，2007，23(2)：207－211.

[4] Tatter S B，Borges L F，Louis D N. Central neurocytomas of the cervical spinal cord：report of two cases[J]. J Neurosurg，1994，81(2)：288－293.

（**收稿**：2009-04-04；**修回**：2009-05-06）

（编辑　王　红）