文章编号:1000-5404(2012)09-0797-04

论著

渗透冲击联合超声和去污剂处理对新生牛真皮组织学和生物活性成分的影响

陈 博,彭代智,左海斌,郑必祥,周 灵,周 新,刘 敬 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 采用渗透冲击联合超声和去污剂处理新生牛真皮,观察处理前后新生牛真皮基质的组织学和生物活性成分的变化。**方法** 从8头健康雄性新生牛皮肤获取网状层真皮组织。采用反复渗透压改变、超声震荡和去污剂联合法对新生牛网状层真皮进行处理,HE染色、DAPI染色和核酸电泳检测细胞成分残留情况;扫描电镜(SEM)观察胶原束结构和细胞成分;PicoGreen法、DMMB法和BCA法对脱细胞前后真皮基质的DNA、sGAG和蛋白质含量进行定量分析;ELISA法测定脱细胞前后真皮基质内TGF-β1、EGF、bFGF和KGF含量。**结果** 形态学观察可见脱细胞处理后的真皮三维结构完整,胶原纤维束排列较疏松,细胞清除较彻底,未见明显细胞及细胞碎片残留。与脱细胞处理前比较,脱细胞处理后的DNA含量[(2 516.1±324.2) ng/mg *vs* (249.5±53.8) ng/mg, $P=0.000$)]、sGAG含量[(5.92±0.50) μg/mg *vs* (2.48±0.24) μg/mg, $P=0.000$]、TGF-β1含量[(478.8±196.1) pg/g *vs* (180.3±111.0) pg/g, $P=0.009$]和EGF含量[(10.52±2.78) pg/g *vs* 未能检测到EGF含量]均明显减少;而bFGF含量[(788.6±333.8) pg/g *vs* (364.8±294.8) pg/g, $P=0.424$]下降了53.7%,KGF含量[(0.033±0.000) pg/g *vs* (0.033±0.000) pg/g, $P=0.433$]变化不显著。**结论** 反复渗透冲击联合超声和去污剂处理对新生牛真皮基质明显地清除了细胞及细胞碎片,较好地保留了真皮细胞外基质的三维结构和主要生物活性成分。

[关键词] 真皮;细胞外基质;渗透冲击;超声;生长因子
[中图法分类号] R322.991; R329.24; R329-33 [文献标志码] A

Effect of osmotic shock combined with sonication and detergent treatment on histology and bioactive components of newborn bovine dermis

Chen Bo, Peng Daizhi, Zuo Haibin, Zheng Bixiang, Zhou Ling, Zhou Xin, Liu Jing (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of osmotic shock combined with sonication and detergent treatment on the histology and bioactive components of newborn bovine dermis. Methods The reticular dermis was prepared from neonatal male bovine skin ($n=8$), and sequentially treated with osmotic shock, sonication and Triton X-100. HE staining, DAPI staining and nucleic acid electrophoresis were used to evaluate cellular debris. The collagen bundle structure and cellular components were observed by scanning electron microscopy (SEM). PicoGreen, DMMB and BCA were applied to assay the contents of DNA, sulfate polysaccharide (sGAG) and protein in the dermis before and after decellularization. The contents of TGF-β1, EGF, bFGF and KGF in the dermis were measured by ELISA. Results Morphological observation displayed that the decellularized dermis showed the integral three-dimensional structure, interspersed collagen bundles, and satisfying removal of cells, and no obvious cell or cellular debris were seen. Compared with natural dermis, the treated sample showed significant decrease in the contents of DNA (2 516.1±324.2 *vs* 249.5±53.8 ng/mg, $P=0.000$), sGAG (5.92±0.50 *vs* 2.48±0.24 μg/mg, $P=0.000$), TGF-β1 (478.8±196.1 *vs* 180.3±111.0 pg/g, $P=0.009$) and EGF (10.52±2.78 pg/g *vs* undetectable). The content of bFGF (788.6±333.8 pg/g *vs* 364.8±294.8 pg/g, $P=0.424$) was reduced by 53.7%. No significant change was found in the content of KGF (0.033±0.000 *vs* 0.033±0.000 pg/g, $P=0.433$). Conclusion Osmotic shock combined with sonication and detergent treatment effectively achieves acellular extracellular matrix with integral histological structure and partially preserved major bioactive components of the newborn bovine dermis.

[**Key words**] dermis; extracellular matrix; osmotic shock; ultrasonic; growth factor

Supported by the National High Technology Research and Development Program (863 Program, 2006AA02A121) and the Independent Research Project of State Key Laboratory (SKLZZ200904). Corresponding author: Peng Daizhi, Tel: 86-23-68754226, E-mail: dzpengmd@126.com

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2006AA02A121);国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ200904)
[通信作者] 彭代智,电话:(023)68754226,E-mail:dzpengmd@126.com

天然来源的细胞外基质生物材料在再生医学和组织工程领域的应用越来越多。脱细胞组织和器官已经开始应用于动物实验和临床[1]，Alloderm® 就是人皮肤来源的脱细胞真皮基质应用于临床的例子。脱细胞的过程就是要求从组织和器官去除细胞成分，而尽可能保持细胞外基质的复杂结构和功能分子。由于组织和器官在组成成分、细胞构成、密度、脂类含量和厚度等方面存在很大差异，所以对于不同组织和器官的脱细胞方法不尽相同[2]。每一种脱细胞处理方法都会对组织和器官的组成成分、超微结构和机械性能等造成影响，多数学者倾向于不同原理的脱细胞方法进行组合以尽量减少对组织天然结构和生物学性能的影响[3]。因此，本研究主要探讨渗透冲击联合超声和去污剂处理对新生牛真皮组织学和生物活性成分的影响，为进一步改进脱细胞真皮的制备方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 新生牛网状层真皮的获取与制备

从乳牛场获得雄性新生牛皮肤（$n=8$）后刮除背部毛发，0.1%新洁尔灭溶液浸泡15 min，再经过络合碘溶液浸泡5 min，无菌条件下使用取皮鼓去除皮下脂肪、表皮和部分真皮组织，从而获得真皮网状层（0.2 mm厚），使用无菌磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS 0.01 mol/L, pH=7.4）清洗后二等分（$n=8$），一半用于制备脱细胞真皮（acellular dermal matrix, ADM），另一半真皮基质（dermal matrix, DM）作对照。样本-20 ℃保存备用。

1.2 制备脱细胞真皮基质

将网状层真皮复温至室温，在连续震荡条件下浸泡在双蒸水内2 h，再浸泡在1 mol/L NaCl溶液内2 h，重复该循环2次。再将网状层真皮置于超声震荡器（KQ-250DE，舒美，中国）内，使用0.5% Triton X-100（Amresco公司，美国）作为去污剂浸泡，维持去污剂溶液温度20~30 ℃，超声震荡洗涤8 h后更换去污剂，连续震荡12 h，重复以上循环2次后使用无菌PBS溶液洗涤3次，每次15 min。所得脱细胞前后样本使用冻干机（Savant 2081, Thermo公司, 美国）冻干备用。

1.3 脱细胞前后形态学检测

1.3.1 苏木精-伊红（HE）染色　脱细胞前后网状层真皮样本使用4%中性多聚甲醛溶液固定48 h后经过脱水、石蜡包埋、切片，常规HE染色，光镜下观察网状层真皮内细胞成分和组织学结构。

1.3.2 DAPI染色　4′,6二脒基-2-苯吲哚盐酸（4′,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI）染色可以观察细胞核的去除情况。冰冻切片使用DAPI染液（碧云天公司，中国）染色约1 min后参照说明书光镜（DM 6000B, Leica公司，德国）下在364 nm处观察细胞核情况。

1.3.3 扫描电镜（scanning electron microscope, SEM）观察　所得到的脱细胞前后网状层真皮样本经过2.5%戊二醛固定3 d（4 ℃），PBS溶液清洗3次后，依次经过脱水、临界点干燥、喷金等步骤在扫描电镜（Scanning electron microscopy, SEM, S-3400, Hitachi公司，日本）下观察样本的结构和表面情况。

1.4 脱细胞前后生物化学分析

1.4.1 DNA电泳　将脱细胞前后网状层真皮样本剪成粉末状使用蛋白酶K（50 μg/ml，天根公司）消化2 h（60 ℃）直至无肉眼可见残留物，按照TIANamp Genomic DNA Kit（天根公司，中国）说明书提取基因组DNA。1% 琼脂糖电泳后紫外光下观察。

1.4.2 DNA含量测定　称取5 mg粉末状脱细胞前后网状层真皮样本，1 mg/ml木瓜蛋白酶（Worthington, USA）溶液（5 mmol/L L-cysteine, 100 mmol/L Na_2HPO_4, 5 mmol/L EDTA-Na_2, pH=6.0）消化24 h（60 ℃）后离心，收集上清，为DNA样本测定和硫酸化糖胺聚糖（sulphated Glycosaminoglycan, sGAG）测定备用。DNA含量测定使用Pico-Green DNA定量试剂盒（Invitrogen, 美国）。取25 μl木瓜蛋白酶消化液上清加入含有75 μl 1×TE缓冲液的96孔板内，再向每孔内加入100 μl Quant-iT PicoGreen反应液（1∶200稀释），立即调整荧光光度计激发波485 nm，发射波长为530 nm进行测定。使用小牛胸腺DNA分别配制浓度为500、400、300、200、100、50、10、0 μg/ml溶液测定光密度值，并绘制标准曲线。

1.4.3 sGAG测定　sGAG含量测定采用二甲氨基甲叉基蓝（dimethylmethylene blue, DMMB）光谱测定法[4]。向96孔板内加入20 μl木瓜蛋白酶消化液，再加入200 μl DMMB，525 nm处测定光密度值[D(252)值]。配制50、40、30、20、10、5、0 μg/ml牛硫酸软骨素B（Sigma，美国）溶液525 nm处测定光密度值，并绘制标注曲线。

1.5 网状层真皮基质蛋白质和生长因子测定

1.5.1 制备基质蛋白质提取液　100 mg真皮粉末加入1 ml含有蛋白酶抑制剂（1 mmol/L Phenylmethylsulfonyl Fluoride PMSF, 1×蛋白酶抑制剂，1×磷酸酶抑制剂）（KC-440，康成公司）的蛋白提取液（2 mol/L尿素，50 mmol/L Tris，pH=7.4）中，在旋转混合仪内混合24 h（4 ℃），4 ℃下12 000×g离心30 min，收集上清。再向沉淀内加入1 ml蛋白提取液，4 ℃下旋转混合仪内混合24 h，12 000×g离心30 min（4 ℃）[5]。将2次上清充分混匀。采用BCA法测定提取液内蛋白含量。

1.5.2 测定网状层真皮内生长因子含量　网状层真皮内生长因子含量的测定采用VEGF（Quantikine DVE00，美国），bFGF（Quantikine DFB50，美国），TGFβ1（Quantikine DB100B，美国），KGF（Quantikine DKG00, 美国），EGF（Quantikine DEG00，美国），ELISA试剂盒，参照说明书操作，每个样本测定2次。多功能读板仪（Varioskan flash, Thermo, USA）测定光密度值。

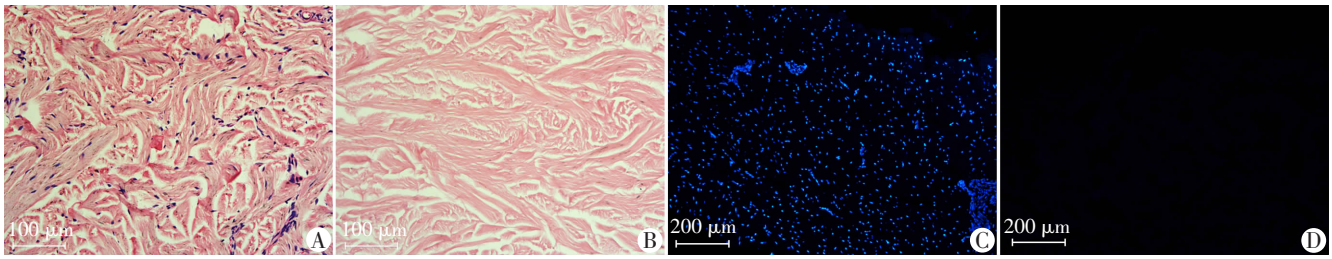
1.6 统计学分析

数据用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件行成对t检验。

2 结果

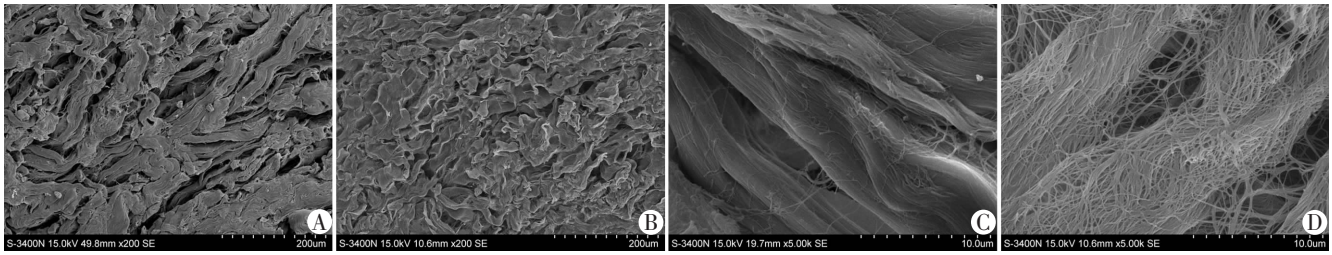
2.1 组织形态学观察

2.1.1 HE染色　与未脱细胞真皮比较，脱细胞处理后真皮内细胞、毛囊及汗腺等皮肤附件结构消失。胶原纤维束结构排列疏松，未见胶原纤维束结构明显紊乱及破坏（图1A、B）。DAPI染色结果显示，未脱细胞真皮组织内含有大量细胞核组织（图1C），脱细胞处理后，真皮内未见DNA着色（图1D）。



A:未脱细胞真皮 HE 染色;B 脱细胞真皮 HE 染色;C:未脱细胞真皮 DAPI 染色;D:脱细胞真皮 DAPI 染色

图 1　脱细胞前后新生牛真皮组织形态学观察



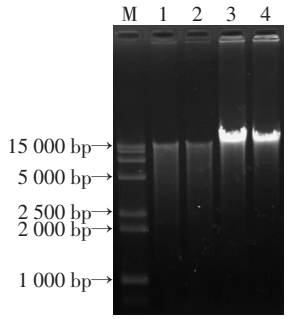
A:未脱细胞真皮 （×200）;B:脱细胞真皮 （×200）;C:未脱细胞真皮 （×5 000）;D:脱细胞真皮 （×5 000）

图 2　脱细胞前后新生牛真皮 SEM 观察

2.1.2　SEM 观察　　未脱细胞真皮胶原纤维束排列较紧密，脱细胞真皮胶原纤维束的结构松散，高倍镜观察可见胶原纤维束排列疏松，并且未发现细胞残留（图 2）。

2.2　残留 DNA 测定

DNA 的凝胶电泳显示残留 DNA 片段长度与基因组 DNA 长度相似，但在脱细胞步骤中大部分基因组 DNA 已被去除（图 3）。PicoGreen DNA 定量测定结果证实 DNA 含量[（2 516.1 ± 324.2）ng/mg *vs*（249.5 ± 53.8）ng/mg，$P = 0.000$]在脱细胞后显著减少。



M:标准;1,2:脱细胞组;3,4:未脱细胞组

图 3　脱细胞前后 DNA 凝胶电泳结果

2.3　sGAG 定量分析

DMMB 法测定脱细胞前后 sGAG 含量为[（5.92 ± 0.50）μg/mg *vs*（2.48 ± 0.24）μg/mg，$P = 0.000$]，含量保留约 41.9%。

2.4　生长因子含量的测定

脱细胞前后蛋白提取液内蛋白含量分别为（4.91 ± 1.61）、（2.08 ± 0.74）μg/mg（$P = 0.006$），下降了约 57.6%。ELISA 检测蛋白提取液内生长因子的含量：脱细胞前后TGF-β1 含量分别为（478.8 ± 196.1）、（180.3 ± 111.0）pg/g（$P = 0.009$），脱细胞前 EGF 含量为（10.52 ± 2.78）pg/g，脱细胞后未能检测到 EGF 含量；脱细胞前后 bFGF 含量分别为（788.6 ± 333.8）、（364.8 ± 294.8）pg/g（$P = 0.424$），KGF 含量分别为（0.033 ± 0.000）、（0.033 ± 0.000）pg/g（$P = 0.433$）。在脱细胞前后样本中，均未检测到 VEGF 含量。

3　讨论

组织和器官脱细胞处理最为理想化的方法是去除细胞成分的同时又能最大程度保留细胞外基质成分和结构。一般来讲，脱细胞处理从裂解细胞膜开始，常用方法有冻融、渗透压改变、超声或离子溶液等。细胞膜裂解后使用去污剂、酶制剂等将细胞质和细胞核等成分从 ECM 上洗脱、消化，最终将细胞碎片完全去除。此过程可以采用震荡、超声等物理措施以增加去污剂、酶制剂等的效率。制备理想的脱细胞真皮基质须联合两种或者两种以上的脱细胞方法，这便涉及不同脱细胞机制方法的最佳组合。本研究的目的在于观察渗透压改变与超声震荡洗涤的组合方法对脱细胞真皮基质组织学与生物活性成分的影响，为探索一种制备步骤简单、对环境友好的脱细胞方法提供技术参数。

本研究采用渗透压改变结合超声震荡洗涤的方法制备脱细胞真皮基质。首先通过渗透压改变处理新生牛真皮组织，通过高渗盐水对细胞产生极强的渗透应力，破坏蛋白与 DNA 之间的连接；低渗溶液处理通过简单的渗透作用引起细胞的裂解，而对细胞外基质分子结构产生较小的影响[6]，高渗、低渗处理交替进行多个循环可使渗透压改变处理取得最好效果[2]。该步骤虽能裂解细胞，也能部分去除细胞碎片，但无法有效地去除细胞残余物质，所以接下来我们采用洗涤剂配合超声震荡这一化学结合物理手段的方法去除细胞残余物质。HE 和 DAPI 染色结果显示，脱细胞真皮基

质的细胞成分已被有效去除,光镜下未见明显 DNA 残留。DNA 定量结果也提示处理前后 DNA 含量下降了约 90.1%,证实大部分 DNA 已被去除。凝胶电泳也观察到大部分 DNA 已去除,但仍然存在较大片段的残留,可能与 DNA 的"黏性",且有附着细胞外基质蛋白的特性有关[3]。文献[7-8]报道同类脱细胞支架材料 DNA 残留量百分比为 0% ~8.5%,与之相比较本研究所制备的脱细胞真皮支架在脱细胞 DNA 效果上还有一定的差距,提示本方法还需要进一步改进。并且均采用了酸、碱、胰蛋白酶和核酸酶等方法进行处理,有研究提示使用酸、碱对 GAG、生长因子和胶原等成分破坏性较大,胰蛋白酶对 ECM 结构有潜在破坏性,并且可能会去除层粘连蛋白、纤连蛋白、弹性纤维和 GAG 等[2-3]。

关于高渗性盐水对 DNA 的损伤有学者曾有报道[9],但未对其具体机制做深入探讨。应用超声震荡洗涤制备脱细胞真皮基质的方法国内张国安等[10]有过深入地研究。细胞在由超声引发的空化效应产生的气泡破碎时所产生冲击力作用下被乳化、扩散,结合化学洗涤剂的作用,从而达到去除细胞碎片、抗原成分的目的。超声对 DNA 的损伤也有报道,有学者认为超声致 DNA 的损伤机制是通过超声所产生的机械剪切力实现的[11]。有学者认为外源性 DNA 可导致机体的天然免疫系统激活,并分泌多种细胞因子[12]。但也有学者报道微量的 DNA 残留(1 ng/mg),可能不会引起临床上严重的宿主反应[7],并且引起免疫反应 DNA 残留量的阈值仍然不清楚。

渗透压改变和超声震荡洗涤对重要的细胞外基质成分的影响也是本研究的重要目的之一。层粘连蛋白主要存在于皮肤基底膜,有文献报道异种脱细胞真皮的基底膜和真皮乳头层免疫反应最强[13],所以本研究在制备真皮时就选用了机械法制备网状层真皮来制备脱细胞真皮基质。sGAG 的含量保留了 41.9%,bFGF 下降了 53.7%,TGF-β1 下降了 57.5%,KGF 含量无差异。GAGs 有维持水合、结合细胞外基质中的生长因子和细胞因子的作用。所以这也就不难解释脱细胞之后 GAGs 的下降,细胞膜相关的 GAGs 溶解在脱细胞步骤之中,而 GAGs 的下降也不可避免地带来细胞外基质中的生长因子含量的下降。脱细胞处理之后仍然可以检测到多种生长因子,比如 TGF-β1、bFGF 和 KGF,通常认为这些生长因子被蛋白聚糖类所"捕获",使其在脱细胞过程中得以保存[5]。文献[14]报道冻融可降低皮肤中 VEGF 的含量,所以在标本制备过程中尽量减少反复冻融的次数可使实验结果更接近天然状态下生长因子含量的水平。另外,皮肤离体后,细胞膜、溶酶体膜破裂,致使大量生物活性酶被激活,导致生长因子等生物活性物质降解,因此,在处理过程中加入酶抑制剂、尽可能低温环境处理样本可能会减少生物活性物质的降解。Reing 等[15]采用多种不同处理方法对猪真皮进行处理后结果显示,仅经过去离子水处理的样本 bFGF 含量有显著下降,VEGF 和 TGF-β1 的含量在经过处理后均未能检测到,GAG 的含量在经过处理后也未能检测到。这与本研究结果的趋势是一致的。

参考文献:

[1] Badylak S F, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds [J]. Ann Rev Biomed Eng, 2011, 13: 27-53.

[2] Crapo P M, Gilbert T W, Badylak S F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes [J]. Biomaterials, 2011, 32(12): 3233-3243.

[3] Gilbert T W, Sellaro T L, Badylak S F. Decellularization of tissues and organs [J]. Biomaterials, 2006, 27(19): 3675-3683.

[4] Farndale R W, Buttle D J, Barrett A J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue [J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 883(2): 173-177.

[5] Chun S Y, Lim G J, Kwon T G, *et al*. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix [J]. Biomaterials, 2007, 28(29): 4251-4256.

[6] Xu C C, Chan R W, Tirunagari N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria [J]. Tissue Eng, 2007, 13(3): 551-566.

[7] Gilbert T W, Freund J M, Badylak S F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials [J]. J Surg Res, 2009, 152(1): 135-139.

[8] Wainwright J M, Czajka C A, Patel U B, *et al*. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(3): 525-532.

[9] Cox B, Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics [J]. Nat Protoc, 2006, 1(4): 1872-1878.

[10] 张国安, 宁方刚, 钟京鸣, 等. 反复冻融配合超声振荡洗涤制备猪脱细胞真皮基质[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(41): 8280-8284.

[11] 王东, 师明磊, 王洋, 等. 超声处理导致交联 DNA 序列特异性断裂 [J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 504-508.

[12] Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells [J]. Cell, 2010, 140(5): 619-630.

[13] Srivastava A, DeSagun E Z, Jennings L J, *et al*. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats [J]. Ann Surg, 2001, 233(3): 400-408.

[14] Balaiya S, Grover S, Murthy R K, *et al*. Freezing adversely affects measurement of vascular endothelial growth factor levels in human aqueous samples [J]. Clin Ophthalmol, 2011, 5: 81-85.

[15] Reing J E, Brown B N, Daly K A, *et al*. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds [J]. Biomaterials, 2010, 31(33): 8626-8633.

(**收稿**:2012-01-08;**修回**:2012-02-07)

(编辑 吴培红)