论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2164-04

京尼平交联对大鼠脱细胞脊髓生物学特性的影响

蒋 涛,任先军,阴 洪,田永阳,唐北川,王开见 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 探讨新型生物交联剂京尼平对大鼠脱细胞脊髓生物学特性的影响。**方法** 从成年SD大鼠(体质量200~250 g,雌雄不限)获取大鼠胸段脊髓,采用化学萃取法对大鼠脊髓组织进行脱细胞处理,再用生物交联剂京尼平(5 g/L)进行化学交联。分别采用HE染色和扫描电镜观察京尼平交联前后脱细胞脊髓的微观结构,并进行孔径大小、交联率、含水量、在PBS溶液及胰酶溶液中的稳定性能检测,再将大鼠骨髓间充质干细胞分别与京尼平交联前后的脱细胞脊髓浸提液共培养,采用MTT法在体外评估该支架材料交联前后的细胞毒性情况。**结果** 京尼平交联前后的脱细胞脊髓拥有类似的多孔结构,孔径大小约30 μm,最终交联率可达90%,交联后的脱细胞脊髓含水率从(283.4±11.2)%降至(229.7±12.5)%,但其在PBS及胰蛋白酶中的稳定性得到了明显的增强。交联前后的脱细胞脊髓都未观察到明显的细胞毒性。**结论** 京尼平交联的脱细胞脊髓部分生物学特性得到改善,为应用于脊髓损伤修复的组织工程材料提供了一种新的选择。

[关键词] 脱细胞脊髓;京尼平;化学交联;细胞毒性
[中图法分类号] R329.25;R331.22;R979.19 [文献标志码] A

Effect of genipin cross-linking on biological characteristics of rat acellular spinal cord

Jiang Tao, Ren Xianjun, Yin Hong, Tian Yongyang, Tang Beichuan, Wang Kaijian (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To investigate *in vitro* biological characteristics of genipin (GP)-crosslinked acellular spinal cord in order to provide an ideal biomaterial for tissue engineering application of spinal cord injury. Methods Rat spinal cord tissues were decellularized by the chemical extraction method, followed by chemical crosslinking with 5 g/L genipin solution. The micro-structure of the un-crosslinked and GP-crosslinked acellular spinal cords were observed with HE staining and scanning electron microscopy, and the properties of pore size, crosslinking degree, water uptake ratio, and stability in PBS and tripsin were tested as well. The rat bone marrow mesenchymal stem cells were cultured in lixivium of un-crosslinked and GP-crosslinked acellular spinal cord, and then, MTT assay was used to evaluate *in vitro* cytotoxicity. Results The un-crosslinked and GP-crosslinked acellular spinal cords possessed a similar porous structure with an average pore diameter about 30 μm, the final crosslinking rate was about 90%, the water uptake ratio were decreased from (283.4±11.2)% to (229.7±12.5)% and the stability in PBS and trypsin were significantly enhanced by GP-crosslinking. Furthermore, no obvious cytotoxicity was observed in both group. Conclusion The GP-crosslinked acellular spinal cord is a potential tissue engineering material for spinal cord injury repairing application.

[**Key words**] acellular spinal cord; genipin; chemical cross-linking; cytotoxicity

Supported by the National Science Foundation for Young Scholars of China (31000438), the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271362), and "the Key Project of Twelvth Five-year" of Medical Science and Technology of PLA (BWS 11C 040). Corresponding author: Ren Xianjun, E-mail: ren_xianjun@sina.com

[基金项目] 国家自然基金青年基金(31000438);国家自然科学基金面上项目(81271362);全军医学科技"十二五"科研重点项目(BWS11C040)
[通信作者] 任先军, E-mail: ren_xianjun@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130917.1442.006.html(2013-09-17)

脱细胞脊髓作为一种新型的脱细胞基质(acellular extracellular matrix, AECM)生物衍生材料,已应用于脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)修复的组织工程研究。本课题组前期将大鼠脊髓进行脱细胞处理,可有效去除细胞及髓鞘成分,而多种重要的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)得以保留,具有良好的生物相容性和独特的天然三维网状结构[1-2]。但自身结构稳定性差、抗酶解能力弱、三维网状结构难以维持的弱点阻碍了其进一步应用,需要改良。化学交联改性可在一定程度上改善生物衍生材料的上述缺点,但戊二醛等传统化学交联剂细胞毒性强,降低了改性材料的细胞相容性。京尼平是一种提取于传统中药杜仲的天然生物交联剂,细胞毒性小[3-5]。本实验拟采用京尼平对大鼠脱细胞脊髓进行化学交联处理,观察改性支架材料的形态特征、结构稳定性、抗酶解能力和细胞毒性,为其在脊髓组织工程中的后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

成年健康SD大鼠40只,体质量250~300 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,TritonX-100(北京奥博星公司),台式恒温振荡器(THZ-22,江苏太仓市实验设备厂),普通光学显微镜及摄像系统(德国Leica公司),S-3400N型扫描电镜(日本日立公司),-70 ℃深低温冰箱(日本Sanyo公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脱细胞脊髓的制备与交联改性 成年SD大鼠经2%戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔麻醉后取胸段脊髓,长约20 mm,采用化学萃取法进行脱细胞处理[5]:①超纯水浸泡6 h;②1% TritonX-100溶液振荡3 h(20 ℃,100 r/min,下同);③0.1 mol/L PBS振荡漂洗3 h;④1%脱氧胆酸钠溶液振荡3 h;⑤0.1 mol/L PBS振荡漂洗3 h;⑥重复步骤②~⑤1遍,脱细胞处理结束。化学交联:将脱细胞脊髓浸入5 g/L的京尼平溶液,在37 ℃条件下交联处理24 h,用0.01 mol/L PBS振荡漂洗3 h,每小时换液1次。交联前后的脱细胞脊髓样品经真空冷冻干燥后密封包装,Co^{60}(16 kGy)照射灭菌(第三军医大学辐照中心),于-20 ℃保存。

1.2.2 形态学观察 肉眼观察交联前后脱细胞脊髓的形状、大小、颜色。交联前后脱细胞脊髓经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察其组织结构;或经2%戊二醛固定,干燥,喷金,扫描电子显微镜下观测其超微结构,并测量孔径。

1.2.3 交联率测定 用水合茚三酮法测定脱细胞脊髓与5 g/L的京尼平交联3、6、12、24 h和48 h的交联率。样品内自由氨基酸与茚三酮溶液在100 ℃下共热20 min后可生成蓝紫色溶液,测定光吸收值(570 nm),该值与自由氨基酸含量成正相关,以不同浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL)的甘氨酸绘制标准曲线,可测算出样品中自由氨基酸含量。交联率=(未交联支架材料中自由氨基酸含量-交联支架材料中自由氨基酸含量)/未交联支架材料中自由氨基酸含量×100%[6]。

1.2.4 含水率测定 测得交联前后冻干样品质量为W0,在0.01 mol/L PBS(pH=7.4,37 ℃)中浸泡24 h后,测得湿质量为W1,含水率=(W1 - W0)/W0×100%。

1.2.5 PBS及胰酶溶液中的稳定性检测 测得交联前后冻干样品质量为W0,分别在0.01 mol/L PBS(pH=7.4)和2.5 g/L胰酶溶液中持续振荡(37 ℃,100 r/min),在第1、3、7、14天取出样品,冷冻干燥后测得干质量为W1,失重率(Wt)=(W0 - W1)/W0×100%。将在PBS中振荡第7天的样品行HE染色,光镜下观察样品结构差异。

1.2.6 细胞毒性实验 按细胞培养液(含10%胎牛血清的L-DMEM培养液)体积与冻干样品质量比0.1 mL/mg,在37 ℃无菌条件下浸提24 h制备浸提液。将前期冻存的大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)复苏后传代,将生长良好的BMSCs制成5×10^5/mL细胞悬液,以每孔100 μL接种于96孔培养板中,分别加入100 μl交联前后样品浸提液,阴性对照组以100 μl细胞培养液代替浸提液,每组5个平行样,在培养箱中培养(37 ℃,5% CO_2),于培养1、3、5、7 d,采用MTT法检测细胞活性:在490 nm波长检查光密度值[D(490)值],按公式计算细胞相对生长率。相对生长率=浸提液组光密度值/阴性对照组光密度值×100%[7]。

1.3 统计学方法

材料交联率、含水率及在PBS和胰酶溶液中的稳定性检测试验各重复5次,取其均值,数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,组间比较采用Student's t检验。

2 结果

2.1 形态学观察

正常大鼠胸段脊髓为圆柱形,直径为(2.95±0.32) mm,呈灰白或灰黄色,经脱细胞处理后基本维持原有形态和大小,呈乳白色,京尼平交联后呈淡蓝色(图1)。HE染色显示,未交联和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓均呈大小不等的网眼状结构,细胞成分去除较为彻底,偶有极少量细胞碎片残留(图2)。扫描电镜显示,未交联和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓内基质纤维保存完好,相互交织成网状三维结构,内部孔洞连通,孔径分别为(34.5±17.4) μm和(31.1±15.6) μm,两组间差异无统计学意义($P>0.05$,图3)。

2.2 交联率

脱细胞脊髓与5 g/L京尼平交联3、6、12、24 h和48 h时的交联率分别为(34.6±3.6)%、(57.1±4.5)%、(72.5±5.3)%、(90.6±7.1)%、(90.5±7.6)%,交联前期,交联率随时间逐步增加,有统计学差异($P<0.05$),交联24 h后,交联率已达上限,和48 h比较无统计学差异($P>0.05$)。



图1 正常大鼠脊髓(A)、未交联大鼠脱细胞脊髓(B)和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓(C)的大体观察

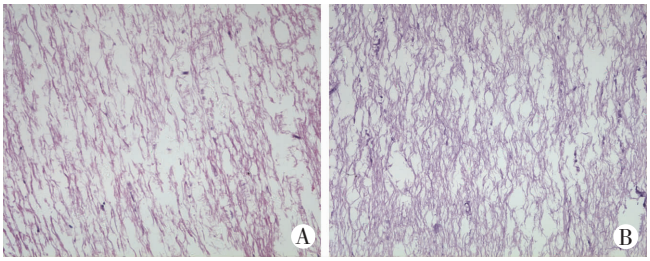


图2 HE染色观察未交联大鼠脱细胞脊髓(A)和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓(B) (×200)

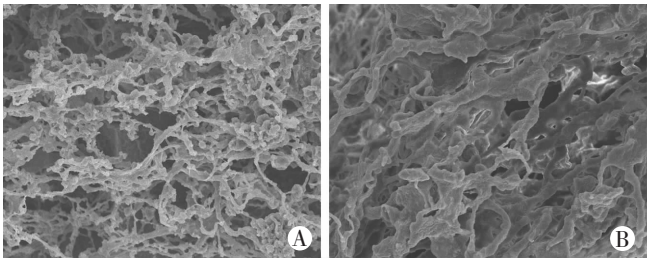


图3 扫描电镜观察未交联大鼠脱细胞脊髓(A)和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓(B) (×400)

2.3 含水率

未交联和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓的含水率分别为(283.4±11.2)%、(229.7±12.5)%,两组间具有统计学差异($P<0.05$)。

2.4 PBS中的稳定性

在PBS中持续振荡1、3、7、14 d,未交联脱细胞脊髓的失重率分别为(13.2±4.1)%、(37.6±5.0)%、(54.4±4.2)%、(94.6±6.3)%,京尼平交联大鼠脱细胞脊髓的失重率分别为(2.4±0.3)%、(3.2±0.2)%、(4.2±0.5)%、(4.5±0.9)%,两组间具有统计学差异($P<0.05$)。振荡7 d时的HE染色结果进一步显示,未交联脱细胞脊髓在PBS中稳定性差,纤维溶解断裂,结构破坏明显,而京尼平交联大鼠脱细胞脊髓在PBS中稳定性良好,结构基本完整,仅少量纤维溶解断裂(图4)。

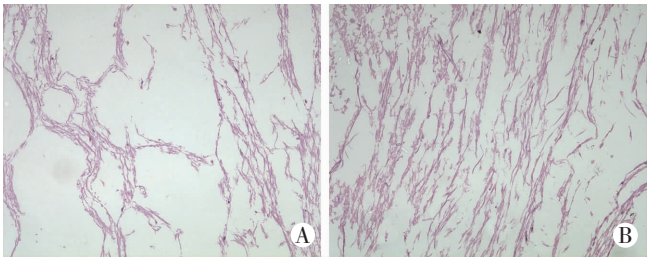


图4 HE染色观察未交联大鼠脱细胞脊髓(A)和京尼平交联大鼠脱细胞脊髓(B)在0.01 mol/L PBS中持续振荡7 d时的变化 (×200)

2.5 胰酶中的稳定性

在2.5 g/L胰酶溶液中持续振荡1、3、7、14 d,未交联大鼠脱细胞脊髓失重率分别为(73.4±5.4)%、100%、100%、100%,京尼平交联大鼠脱细胞脊髓的失重率分别为(4.4±0.7)%、(7.2±1.5)%、(11.2±3.1)%、(22.5±4.6)%,两组间具有统计学差异($P<0.05$)。

2.6 细胞毒性实验

细胞培养第1、3、5、7天,大鼠BMSCs在未交联脱细胞脊髓浸提液中的相对生长率分别为(102.7±15.1)%、(104.3±9.5)%、(98.1±8.7)%、(100.1±13.4)%,在京尼平交联大鼠脱细胞脊髓浸提液中的相对生长率分别为(101.6±13.9)%、(99.6±11.4)%、(97.8±10.5)%、(98.2±8.9)%,均无明显细胞毒性,两组之间无统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

作为组织工程研究的基本要素,理想的支架材料在进行组织水平的脊髓重构中具有极其重要的意义。近年来,学者尝试采用天然的脱细胞基质材料来构建组织工程支架,即将同种异体来源的组织标本经过脱细胞处理,保留细胞外基质成分及其三维构架,形成生物衍生材料用于组织工程支架构建。这一方法为脊髓组织工程支架材料的研制提供了新的思路[8]。

本研究采用前期已建立的化学萃取法构建大鼠脱细胞脊髓支架材料[1]。从图1B、2A、3A可知,脊髓组织脱细胞后,细胞成分已基本去除干净,偶有极少量细胞碎片残留,而大部分细胞外基质得以保留并构成三维网状结构,其优势在于天然的细胞外基质含有细胞识别信号,加上独特的三维网状结构,更利于细胞黏附、迁移、增殖及分化,且免疫原性极弱。但该材料仍存在自身结构稳定性差、抗酶解能力弱、三维网状结构难以维持的弱点,需要经过交联处理改善部分生物学性状改良,以应用于组织修复。

京尼平是提取于传统中药杜仲的天然生物交联剂,是一种环烯醚萜类化合物,具有羟基、羧基等多个活性官能团,可以与生物材料中赖氨酸、羟赖氨酸及精氨酸等残基的自由氨基反应,形成杂环结构的分子内及分子间交联体,进而使生物材料交联形成一种深蓝色物质,从而达到增强其结构稳定性的目的[9-12]。由图1C、2B、3B可见,京尼平交联后的脱细胞脊髓,其表面形貌没有明显改变,其中基质纤维结构保持良好,孔径与交联前基本保持一致,适合于细胞渗透生长。材料的含水率检测结果显示,京尼平交联后,脱细胞脊髓含水率稍有下降,这可能是由于交联过程中脱细胞脊髓亲水基团(氨基或羧基)被消耗的结果,但仍超过200%,显示出良好的亲水性。

交联率反映了支架材料与交联剂反应的程度,通常采用水合茚三酮法测定支架材料中自由氨基的含量而间接反映其交联率。图4结果显示,脱细胞脊髓与京尼平交联24 h后即达上限,组织内的自由氨基含量降低达90%以上。由于脊髓组织中的羧基、氨基等成分与京尼平交联后形杂环结构,使得材料在结构上更趋稳定。图4显示,京尼平交联的大鼠脱细胞脊髓在PBS中的结构稳定性及抗酶解能力较交联前明显增强,从而避免了在PBS和胰酶中的快速崩解。由此推测,京尼平交联大鼠脱细胞脊髓在增强结构稳定性和抗酶解能力后,可以延长其在组织构建过程中降解的时间,更利于其三维空间结构的稳定,确保体内移植后有足够时间促进组织的修复。

细胞毒性是采用化学交联处理后支架材料可能存在的一大弊端,为了检测京尼平交联大鼠脱细胞脊髓的细胞毒性,本研究采用MTT检测了大鼠BMSCs在材料浸提液中的生长情况。结果显示,BMSCs在京尼平交联脱细胞脊髓浸提液中的相对生长率与其在未交联脱细胞脊髓浸提液中非常接近,均未观察到明显的细胞毒性,表明京尼平交联后并未增加脱细胞脊髓的细胞毒性。Sung等[13]对比研究了京尼平和戊二醛化学交联后的细胞毒性影响,结果发现京尼平的细胞毒性远低于戊二醛,表明京尼平作为化学交联剂具有细胞毒性低的优势。

综上所述,京尼平交联后的大鼠脱细胞脊髓其大体与微观结构与交联前相差不大,保持了其完整性,同时,固有的结构稳定性差、抗酶解能力弱的问题得到有效改善,并且未发现明显的细胞毒性,为该材料在脊髓损伤修复的组织工程研究中的进一步应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Guo S Z, Ren X J, Wu B, *et al*. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility[J]. Spinal cord, 2010, 48(7): 576-581.

[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] Cheng N C, Estes B T, Young T H, *et al*. Genipin-crosslinked cartilage-derived matrix as a scaffold for human adipose-derived stem cell chondrogenesis[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(3/4): 484-496.

[4] Schek R M, Michalek A J, Iatridis J C. Genipin-crosslinked fibrin hydrogels as a potential adhesive to augment intervertebral disc annulus repair[J]. Eur Cell Mater, 2011, 21: 373-383.

[5] Paul A, Cantor A, Shum-Tim D, *et al*. Superior cell delivery features of genipin crosslinked polymeric microcapsules: preparation, *in vitro* characterization and pro-angiogenic applications using human adipose stem cells[J]. Mol Biotechnol, 2011, 48(2): 116-127.

[6] Yan L P, Wang Y J, Ren L, *et al*. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications[J]. J Biomed Mater Res A. 2010, 95(2): 465-475.

[7] Lu X, Zhai W, Zhou Y, *et al*. Crosslinking effect of Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on decellularized heart valve scaffold for tissue engineering[J]. J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(2): 473-480.

[8] Zhang X Y, Xue H, Liu J M, *et al*. Chemically extracted acellular muscle: a new potential scaffold for spinal cord injury repair[J]. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(3): 578-587.

[9] Liu T X, Wang Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin [J]. Acta Ophthalmol, 2013, 91(4): e253-e257.

[10] Arteche-Pujana M, Perez-Alvarez L, Cesteros-Iturbe L C, *et al*. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin[J]. Carbohydr Polym, 2013, 94(2): 836-842.

[11] Sarem M, Moztarzadeh F, Mozafari M. How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues? [J]. Carbohydr Polym, 2013, 93(2): 635-643.

[12] Qiu J, Li J, Wang G, *et al*. *In vitro* investigation on the biodegradability and biocompatibility of genipin cross-linked porcine acellular dermal matrix with intrinsic fluorescence[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(2): 344-350.

[13] Sung H W, Huang R N, Huang L L, *et al*. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1999, 10(1): 63-78.

(**收稿**:2013-07-26;**修回**:2013-09-03)

(编辑 龙 亮)