

猪血管脱细胞细胞外基质制备的初步探讨*

赵 瑛

(重庆师范大学 重庆市动物生物学重点实验室 生命科学学院, 重庆 400047)

摘 要:采用高渗、低渗溶液,结合去污剂—酶联合处理猪腹主动脉,进行组织学检查,从而制备血管脱细胞细胞外基质。结果表明,经该法处理的猪血管细胞全部脱落,细胞外基质保持完好,未见胶原纤维、弹性纤维有断裂现象。作者认为,高渗、低渗溶液结合去污剂—酶联合处理,是制备血管脱细胞细胞外基质理想的方法。

关键词:脱细胞基质 猪血管 制备

中图分类号: Q813.1⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2006)01-0061-03

A Preliminary Study on Preparation of Acellular Vascular Matrix

ZHAO Ying

(Key Lab of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: To carry out the preparation of acellular matrix from pigs, hypotonic and hypertonic solutions, detergent and proteinase were applied for a multistep process in this study. Morphological analyses indicated that the cells were removed effectively from pig aorta, the elastic fibers and collagen fibers were preserved. Acellular matrix prepared from multistage cell removing can be used as the scaffold to construct tissue engineering vessels.

Key words: acellular matrix, pig vessels, preparation

血管疾病是目前死亡率最高的疾病之一。血管损伤、缺血性疾病以及动脉瘤等疾病,都需要合适的血管移植物,全球每年大约超过60万人需要各种血管的外科手术。目前,血管移植物包括自体血管、异体血管和人工合成材料血管。自体血管来源有限,供区牺牲较大,又因易形成血栓、内膜增生、管壁纤维化和血管瘤等,限制了其应用^[1]。涤纶或四氟乙烯等人工材料血管,可部分模拟人体血管的某些功能,但与自身血管相比弹性系数低,顺应性及组织相容性差。异体血管从理论上讲,是目前最理想的重建血管移植物,但至今未能在临床应用,关键是异体组织抗原性排斥反应的难题未能得到解决。与异体血管移植排斥反应直接有关的是异体血管壁细胞及胶原成分,其中起主要作用的是血管壁细胞,因此,提出去除细胞保留细胞外基质作为组织工程血管支架。猪血管是理想的异体血管源,它来源广泛,制备成本低,具有与一般血管类似的生物学特性。作者

用高渗、低渗溶液结合去污剂—酶联合法对猪腹主动脉进行处理,制备血管脱细胞外基质,以期能为血管组织工程支架研究提供资料。

1 材料、试制与方法

1.1 材料、试制

1.1.1 材料 于屠宰场获取80~100kg家养猪腹主动脉。

1.1.2 试剂 胰蛋白酶、TritonX-100、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、DNAase、RNAase等试剂均为Sigma公司生产。青霉素和链霉素购于重庆师范大学医院,组织切片试剂购于重庆市化学试剂商店。

1.2 方法

猪腹主动脉离体后,小心剥去血管外膜,将其浸入1%新洁尔灭溶液中浸泡30min消毒,用加双抗的PBS冲洗若干遍,以去除血管表面的新洁尔灭。

* 收稿日期: 2005-07-19

资助项目: 重庆师范大学科研基金

作者简介: 赵瑛(1962-),女,四川彭州人,副教授,研究方向为生物医学工程。

取新鲜的血管在 37℃、0.5% 的环境中,分别用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02 EDTA + 双抗的溶液振荡处理 24h,在 0.02% EDTA + 4% NaCl + 双抗 + 50mmol TrisHCl 溶液和 0.02% EDTA + 双抗 + 10mmol Tris HCl 溶液各处理 24h,2% Triton X-100 + 双抗 + 5mmol Tris HCl 溶液中处理 168h,最后在 DNAase 和 RNAase 混合溶液中消化 12h,用加双抗的 PBS 冲洗 3d。

1.3 组织学检查

将处理好的血管用 10% 福尔马林溶液固定,常规石蜡切片,片厚 5 μ m,作 HE 和 Mallory-heidenhain 快速一步法染色,在光镜下观察脱细胞是否完全以及胶原纤维和弹性纤维的情况。

2 结果

2.1 大体观察结果

处理前的血管淡黄色,剥去外膜后,管壁弹性良好,管腔无塌陷,内膜光滑。脱细胞处理后,血管壁呈现乳白色,管腔较处理前稍薄,无塌陷。

2.2 光镜观察结果

可见处理前的 HE 石蜡切片血管壁中有大量核被蓝染的细胞存在,清晰可见胶原纤维亮红色,呈波浪状平行排列(图 1)。处理后的 HE 切片未见核被蓝染的细胞,胶原纤维仍呈波浪状平行排列,有许多细胞和可溶性蛋白质脱除后的间隙(图 2)。Mallory-heidenhain 快速一步法染色可见完整的蓝色胶原纤维,红色弹性纤维(图 3)。

3 讨论

同种组织或器官的来源有限,远远不能满足临床的需要。目前有两种方法可望解决这一问题。一是利用干细胞克隆技术,因为干细胞能够分化成为组织和器官,例如血管、神经等。二是利用组织工程将体外培养扩增的正常组织细胞,吸附于一种生物相容性良好,并可被机体吸收的生物材料上形成复合物,将细胞-生物材料复合物植入机体组织、器官的病损部分,细胞在生物材料逐渐被机体降解吸收的过程中,形成在形态和功能方面与相应器官、组织相同的新的器官、组织,从而达到修复创伤和重建功能的目的。

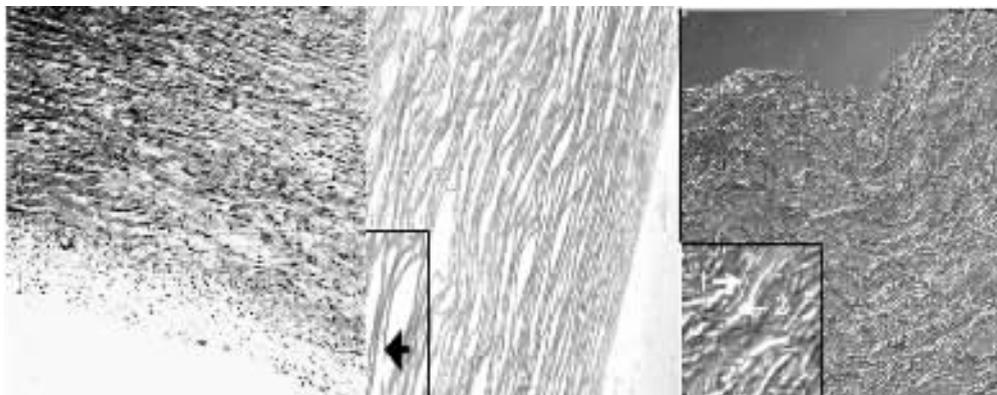


图 1(左) 猪腹主动脉,胶原纤维呈波浪状平行排列,纤维间有大量细胞(HE \times 200)

图 2(中) 脱细胞后,胶原纤维(\leftarrow 示)呈波浪状平行排列,纤维间无细胞(HE \times 400)

图 3(右) 脱细胞后,胶原纤维(1 \rightarrow 示)、弹性纤维(\leftarrow 2 示)呈波浪状平行排列(Mallory-heidenhain 快速一步法 \times 400)

组织是由形态相似、功能相关的细胞和细胞外基质(ECM)组成。ECM 具有支持、连接、保水和保护等物理功能,对细胞发挥动态的影响和调控作用^[2]。

ECM 替代物可通过两条途径制成。一是人工合成,主要为聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA),以及两者的混合物聚乳酸羟基丁酸(PLGA)、聚乙交酯(PLLA)、聚氨酯(Pu)等,其优点是对微结构、机械性能、形态以及降解时间等都能预先设计和调控,最

终完全降解可以避免异物所引起的不良反应,缺点是因为缺乏细胞外基质中的生物信号和功能基因,与种子细胞的粘附性较差。二是天然材料,如胶原蛋白、弹性蛋白、多肽等,由于这些材料多由正常组织细胞外的高分子合成,本身包含许多生物信息,能够提供细胞所需的信号,对细胞的粘附及维持具有优势,缺点是机械强度差,抗压力弱,性能随批次不同而有差异^[3,4]。脱细胞血管作为组织工程血管,充分利用胶原固有的三维结构从而发挥了血管壁的

最大活性功能^[5]。

脱细胞的方法有两种,一是去污剂法:它是一类可溶于水的脂类,有亲水部分和疏水部分,因此能裂解脂膜、溶解抗原,清除免疫复合物。二是消化酶法。作者采用两种方法的结合处理猪腹主动脉。先用胰酶对血管壁中的某些基质进行溶解和对细胞的完整性加以破坏,然后用高渗、低渗溶液进一步导致细胞膜破裂,TritonX-100 通过其上的亲水基团而溶解细胞膜,及细胞器表面结构的蛋白质,并且清除磷脂类核物质,从而达到清除血管壁细胞成分的目的,最后用核酸酶水解核酸成份。实验结果证明,细胞被彻底清除,胶原纤维、弹性纤维排列正常,结构完整。进一步的工作将对处理后的脱细胞血管支架进行细胞种植实验,希望能为临床移植人工血管提供依据。

参考文献:

[1] HAMMERMEISTER K E ,SETHI G K ,HENDERSON W G ,

et al. A Comparison of Outcomes in Men 11 Years After Heart Valve Replacement With a Mechanical Valve or Bi-prothesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Hear Disease[J]. N Engl J Med ,1993 ,328(18) :1289-1296.

[2] NIKLASON L E ,GAO J ,ABBOTT W M ,et al. Functional Arteries Grown Invitro[J]. Science ,1999 ,284 :489-493

[3] 熊猛,艾玉峰,王颀,等. 采用组织工程方法体外血管模型的初步实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001 , 15(2) :109.

[4] WALLUSCHECK K P ,STEINHOFF G ,HAVERICH A. Endothelial Cell Seeding of Native Vascular Surfaces[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg ,1996 ,11(3) 290.

[5] TEEBKEN O E ,BADER A ,STEINHOFF G. Tissue Engineering of Vascular Grafts :Human Cell Seeding of Decellularised Porcine Matrix[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg , 2000 ,19(4) 381-386.

(责任编辑 许文昌)