

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2019)03-0211-04

家猪脱髓核细胞基质的制备及其生物相容性评价

徐子昂, 刘晨, 肖良, 王效, 徐宏光

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 脊柱外科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 制备家猪脱髓核细胞基质并评价其生物相容性。方法: 分离家猪脊柱髓核组织, 并逐步经过胰酶、核酶及 TritonX-100 处理, 得到脱髓核细胞基质, DAPI 染色观察脱髓核效果及扫描电镜观察脱髓核细胞基质的物理形态特点, 将脱髓核细胞基质溶于醋酸, 制备成脱髓核细胞基质膜, 将大鼠骨髓间充质干细胞接种于基质膜上培养。在第 1~5 天采用 CCK-8 检测骨髓间充质干细胞在脱髓核细胞基质膜上的增殖情况, 并计算细胞相对增殖率 (RGR) 来评价其生物相容性。结果: 制备出的家猪脱髓核细胞基质肉眼呈白色糜状, DAPI 染色发现无细胞残留。扫描电镜下观察发现, 脱髓核细胞基质由无序排列的胶原纤维组成。通过 CCK-8 检测 5 d 内细胞毒性分级在 0 级与 2 级之间。结论: 家猪正常髓核组织能够进行脱髓核处理, 且脱髓核后由无序的胶原纤维组成。脱髓核细胞基质具有很好的生物相容性, 符合生物工程支架选材标准。

【关键词】椎间盘退变; 脱髓核细胞基质; 生物特性; 组织工程支架

【中图分类号】R-332; R 338.2 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.03.002

Preparation of decellularized porcine nucleus pulposus matrix and evaluation of its biocompatibility

XU Ziang, LIU Chen, XIAO Liang, WANG Xiao, XU Hongguang

Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To prepare the decellularized porcine nucleus pulposus matrix and verify its biocompatibility. **Methods:** Nucleus pulposus was carefully isolated from the spine of porcine and treated with trypsin, ribozyme and TritonX-100 to obtain decellularized nucleus pulposus matrix. Decellularization effect and physical properties of acellular nucleus pulposus matrix were observed using DAPI staining and scanning electron microscopy. Then the acellular nucleus pulposus matrix was dissolved in acetic acid to prepare an acellular matrix membrane on which the bone marrow mesenchymal stem cells were planted and cultured. CCK-8 was used to detect the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells on the decellularized nucleus pulposus matrix membrane on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th day following culturing. Relative proliferation rate (RGR) of the cells was calculated to evaluate the matrix biocompatibility. **Results:** Decellularized porcine nucleus pulposus matrix of porcine was presented in white minced profile in naked-eye visualization. DAPI staining indicated no cell residue. Scanning electron microscopy exhibited the decellularized nucleus pulposus matrix consisting of disorderly arranged collagen fibers. CCK-8 assay showed that the cytotoxicity was in grade between 0 and 2 within 5 days. **Conclusion:** Normal nucleus pulposus of porcine can be decellularized with disorderly arranged collagen fibers after decellularization and better biocompatibility with the acellular nucleus pulposus matrix. The findings suggest that this matrix can satisfy the criteria for determining appropriate scaffold in tissue engineering.

【Key words】 intervertebral disc degeneration; decellularized nucleus pulposus matrix; biocompatibility; bioengineering scaffold

下腰痛, 顾名思义, 多指腰骶部的疼痛, 是脊柱外科常见的一种疾病, 严重影响患者的生活质量, 更有甚者, 会导致劳动能力的丧失^[1-2]。椎间盘退变是引起下腰痛的主要原因^[3], 但具体发病机制尚未

明确。根据有关报道, 遗传基因^[4]、年龄^[5]、营养流失^[6]、负重^[7]等是椎间盘退变的重要风险因素。

目前, 临床上对椎间盘退变性疾病的治疗, 无论是缓解症状为目的的药物或物理治疗, 还是以恢复

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81572185); 安徽省自然科学基金面上项目 (1708085MH185); 安徽省科技厅对外科技合作项目 (1704e1002229); 安徽省自然科学基金青年项目 (1708085QH205)

收稿日期: 2018-09-20

作者简介: 徐子昂 (1994-), 男, 2017 级硕士研究生, (电话) 18355350565, (电子信箱) 1906225253@qq.com;

徐宏光, 男, 主任医师, 教授, (电子信箱) pumchxuhg@126.com, 通信作者。

椎体稳定结构为目的的外科手术治疗,结果均不理想^[8],而生物学疗法为椎间盘退变的治疗带来了新思路,其中以组织工程替代品置换为椎间盘退变性疾病治疗带来了新希望^[8-11]。近年来生物材料技术的发展提高了人类组织或器官在退变或死亡过程中的修复和再生能力,在各种生物材料中,脱细胞基质材料支架的使用越来越广泛,它保持了各种组织器官的天然形态、细胞外基质构成和框架构成,并经去细胞步骤去掉本身的免疫原性,可以负载各种需要的细胞、细胞因子^[12]和药物^[13]等。

本实验通过一定方法从猪髓核组织中获得脱髓核细胞基质,并鉴定其物理特性及其生物相容性,以期为后续的支架构建及治疗椎间盘退变奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂 0.25% 含有 EDTA 的胰蛋白酶 (Gibco)、TritonX-100 (Sigma)、DAPI 染色液 (Solarbio)、核糖核酸 (RNA) 酶 (Solarbio)、脱氧核糖核酸 (DNA) 酶、CCK-8 增殖试剂盒 (凯基生物)、酶标仪 (iMark, BIO-RAD)、扫描电镜 (HITACHI S-4800)。

1.2 实验方法

1.2.1 脱髓核细胞基质的制备 髓核位于上下椎体中间的椎间盘组织中的最中央,分离购买的新鲜家猪脊柱周边的肌肉组织,从正中切开椎体之间的椎间盘,刮下髓核组织,使用 PBS 冲洗干净,加入质量浓度为 0.25% 的胰酶溶液,置于温度为 37°C,摇晃速度为 150 r/min 的摇床中。每 6 h 换液 1 次,持续 3 d。接着再次使用 PBS 冲洗,每次 30 min,再加入浓度为 1% 的 Triton-100 消化 24 h,继续使用 PBS 进行冲洗,最后加入含有核酶溶液(含有 50U/mL DNAase 和 1U/mL RNAase,溶于 tri-HCL, pH = 7.5)继续消化 24 h 后,使用 PBS 冲洗 6 次,每次 30 min。

1.2.2 扫描电镜下观察脱髓核细胞基质 制备一定浓度的醋酸溶液,将获得的脱髓核细胞基质溶解,并用磁力搅拌过夜,吸取 500 μL 悬液加入 24 孔板,自然风干后,加入浓度为 0.1% 的 Tritonx-100 使细胞膜通透性增高, PBS 溶液接着冲洗 3 次,每次 5 min,然后加入 500 μL DAPI 染液避光条件下染色 8 min, PBS 冲洗 3 次,倒置相差荧光显微镜下观察细胞核的残留情况。使用不同浓度的乙醇阶梯脱水,每个阶梯浓度脱水 20 min,超临界点干燥 6 h,喷金,制样成功后进行电镜扫描,观察脱细胞效果及脱髓核细胞基质的形态特点。

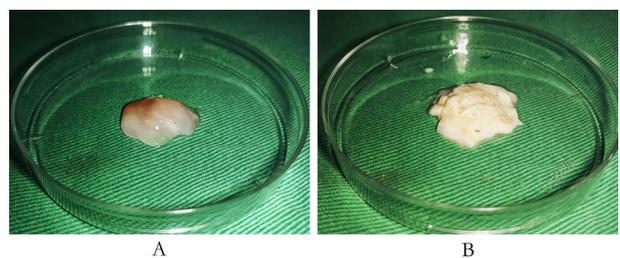
1.2.3 脱髓核细胞基质的细胞相容性评价 将已

溶于一定浓度醋酸的脱髓核细胞基质,按照每孔 50 μL 加到 96 孔板中,充分震荡使脱髓核细胞基质悬液均匀铺在孔底,自然条件下风干,紫外线照射 24 h 进行灭菌处理。该实验分为两组,每组各取 5 块 96 孔板,实验组将大鼠骨髓间充质干细胞按照 5×10^3 个/孔接种于铺被脱髓核细胞基质的 96 孔板上,对照组直接将间充质干细胞接种于 96 孔板,每孔接种相同的细胞密度。置于培养箱培养,1 d 后,每孔加入 40 μL CCK-8 溶液,置于避光环境下 2 h,置于酶标仪上,选择 450 nm 波长检测两组各孔的吸光度,按照上述步骤连续检测 2、3、4、5 d 的细胞增殖情况。

计算细胞相对增殖率 (RGR) (%) = (实验组吸光度平均值/对照组平均值) × 100%。分为 6 级: RGR 相对增殖率 ≥ 100% 为 0 级, 75% ≤ RGR < 100% 为 1 级, 50% ≤ RGR < 75% 为 2 级, 25% ≤ RGR < 50% 为 3 级, 1% ≤ RGR < 25% 为 4 级, RGR < 1% 为 5 级。0 ~ 1 级表示细胞增殖能力优秀,脱细胞基质膜对细胞增殖基本无影响; 1 ~ 2 级表示细胞增殖能力良,脱细胞基质膜对细胞增殖产生部分影响; 3 ~ 4 级表示细胞增殖能力一般,脱细胞基质膜对细胞增殖产生较大影响; 5 级表示细胞增殖能力差,脱细胞基质膜对细胞增殖产生严重影响。

2 结果

2.1 脱髓核细胞基质的外观特征 分离出的髓核组织肉眼观察呈半透明的胶质状(图 1A)。在分离中,位于颈椎间盘的髓核比位于腰椎间盘的髓核组织更加透明。而经脱细胞处理后,组织含量大大降低,肉眼观察呈乳白色的糜状(图 1B)。

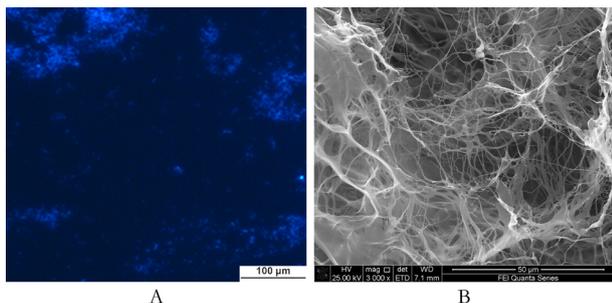


A. 家猪未退变的髓核组织,呈半透明状; B. 家猪髓核组织经脱细胞方法处理后,呈乳白色。

图 1 髓核组织经脱细胞前后的形态变化

2.2 脱髓核细胞基质的结构特征 将获得的脱髓核细胞基质溶于醋酸,通过制备脱髓核细胞基质膜并使用 DAPI 染色,显微镜下观察无细胞核被染成蓝色(图 2A),说明髓核组织经脱细胞后效果良好,无明显细胞残留,达到预期实验标准。在扫描电镜

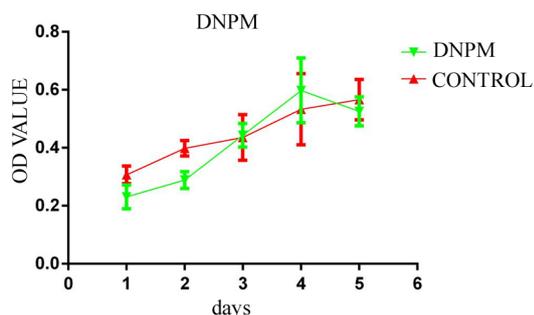
下,明显观察到髓核组织经脱细胞后,由许多无序排列的胶原纤维组成(图2B)。且能够更进一步证实,脱细胞后无细胞残留。



A. DAPI 染色,显微镜下未见到有染成蓝色的细胞核,标尺为 100 μm; B. 扫描电镜下,可以看出脱髓核细胞由无序的胶原纤维排列而成,标尺为 50 μm。

图2 脱髓核细胞的 DAPI 染色和电镜观察

2.3 脱髓核细胞基质的细胞相容性 通过 5 d 的细胞增殖检测及绘制的增殖曲线发现,实验组与对照组具有相似的增殖趋势(图3),说明骨髓间充质干细胞种植于脱髓核细胞基质和对照组相比,同样具有分裂增殖能力。计算细胞相对增殖率,根据表1进行评级,实验组骨髓间充质干细胞前 2 d 内细胞毒性评级分别为 1 级和 2 级,表明实验组的增殖速度略低于对照组;第 3~4 天内评级为 0 级,表明实验组增殖速度大于对照组,第 5 天内细胞评级为 1 级,表明实验组增殖速度稍低于对照组,通过评级,骨髓间充质干细胞与脱髓核细胞基质膜具有很好的生物相容性。



绿色曲线代表实验组,红色曲线代表对照组。

图3 大鼠骨髓间充质干细胞在脱细胞髓核基质膜上的增殖曲线

3 讨论

在分离家猪的髓核组织过程中,我们发现同一家猪个体的不同节段的髓核组织肉眼观察具有很大的区别,比如在脊柱的腰椎段,髓核组织呈半透明状,而在颈胸椎段,髓核组织多呈透明状。这可能与退变的程度有关,因此,在选材上,应尽量选择腰椎段的髓核组织。另外,在进行脱细胞的过程中,需要的髓核组织较多,因此选材的量要足够才行。

表2 两组第 1~5 天吸光度值与细胞毒性分级

培养时间	实验组	对照组	RGR/%	评级
第 1 天	0.193 ± 0.041	0.251 ± 0.030	76.9	1 级
第 2 天	0.236 ± 0.024	0.374 ± 0.027	63.1	2 级
第 3 天	0.464 ± 0.041	0.436 ± 0.096	106.4	0 级
第 4 天	0.602 ± 0.112	0.533 ± 0.122	112.9	0 级
第 5 天	0.526 ± 0.049	0.566 ± 0.069	92.9	1 级

通过电镜扫描,发现髓核经脱细胞后,由大量无序的胶原纤维构成,这为我们后期的实验奠定了良好的基础。当然,本实验也存在一些不足之处。比如未对脱髓核细胞基质的组成、是否含有细胞因子进行分析等,在后期的实验中,我们将会弥补并做相关的检测。

在检测脱髓核细胞基质的生物相容性时,我们遇到的最大问题就是如何对材料进行灭菌处理,良好的灭菌是进一步实验的基础,因为只有这样细胞才能不被污染地长于基质膜上。⁶⁰Co 及紫外线照射可以做到对材料的基本灭菌处理,但是⁶⁰Co 灭菌成本较大,对基础设施条件要求高,于是我们对紫外线照射灭菌法进行了大量的实验,发现紫外线照射灭菌的效果随着照射时间的延长而递增,因此,我们选用了紫外线照射 24 h 灭菌处理,灭菌效果能够达到实验的要求,骨髓间充质干细胞接种于基质膜上时无污染发生。而在后期将骨髓间充质干细胞种植于脱髓核基质膜上时,由于先前脱髓核细胞基质是溶解于醋酸中的,因此我们预先加入含有 5% 双抗的培养基不断进行浸泡,直到培养基不变色。

生物相容性是指材料在宿主的特定环境和部位,与宿主直接或间接接触时所产生相互反应的能力。目前评价材料相容性的方法有两类,一类为体外细胞直接接触培养法,另一类是动物体内组织相容性检测。细胞实验较体内植入实验更加客观和准确,是近年来研究生物相容性的主要方法。本实验通过计算相对增殖率,能够将实验组与对照组的差异量化出来,并且通过评级系统来判断这些差异是否影响到细胞在材料上的增殖情况,本实验表明了骨髓间充质干细胞与脱髓核细胞基质膜具有很好的生物相容性,为选择生物组织工程支架材料提供了理论依据。

脱髓核细胞基质作为组织工程椎间盘支架来源,仍存在一些不足之处^[14]。第一,目前制备的脱髓核细胞基质大都孔隙率较低、孔径较小,合适的孔径是细胞迁移形成正常髓核团簇状分布的前提^[15]。

(下转第 218 页)

[2] MOJICA FJ ,DIEZ-VILLASENOR C ,GARCIA-MARTINEZ J ,*et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol* ,2005 ,60 (2) : 174 - 182.

[3] POURCEL C ,SALVIGNOL G ,VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA ,and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology* 2005 ,151(Pt 3) : 653 - 663.

[4] DOUDNA JA ,CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science* 2014 , 346(6213) : 1258096.

[5] WANG H ,YANG H ,SHIVALILA CS *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell* 2013 ,153(4) : 910 - 918.

[6] YANG H ,WANG H ,SHIVALILA CHIKDU S *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by crispr/cas-mediated genome engineering [J]. *Cell* 2013 ,154(6) : 1370 - 1379.

[7] LIANG X ,POTTER J ,KUMAR S *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection [J]. *Journal of Biotechnology* 2015 ,208:44 - 53.

[8] CONG L ,RAN FA ,COX D *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science* 2013 ,339(6121) : 819 - 823.

[9] MILLER JC ,TAN S ,QIAO G *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nature Biotechnology* ,2010 ,29: 143.

[10] ZHOU X ,XIN J ,FAN N *et al.* Generation of CRISPR/Cas9-media-

ted gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell Mol Life Sci* 2015 ,72(6) : 1175 - 1184.

[11] WAN H ,FENG C ,TENG F *et al.* One-step generation of p53 gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res* 2015 ,25(2) : 258 - 261.

[12] ZHAO P ,ZHANG Z ,KE H *et al.* Oligonucleotide-based targeted gene editing in *C. elegans* via the CRISPR/Cas9 system [J]. *Cell Res* 2014 ,24(2) : 247 - 250.

[13] HRUSCHA A ,KRAWITZ P ,RECHENBERG A ,*et al.* Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish [J]. *Development* 2013 ,140(24) : 4982 - 4987.

[14] SHAN Q ,WANG Y ,LI J *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol* 2013 , 31(8) : 686 - 688.

[15] MORGENS DW ,WAINBERG M ,BOYLE EA *et al.* Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens [J]. *Nature Communications* 2017 ,8: 15178.

[16] TAKEI H ,BABA Y ,HISATSUNE A *et al.* Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor-kappaB activity in lung epithelial cells ,but not through glucocorticoid receptors [J]. *J Pharmacol Sci* 2008 ,106(3) : 460 - 468.

[17] FAURIE C ,REBERSEK M ,GOLZIO M ,*et al.* Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation [J]. *J Gene Med* ,2010 ,12 (1) : 117 - 125.

[18] XU Y ,LU Y ,XING W. An individually addressable suspended-drop electroporation system for high-throughput cell transfection [J]. *Lab Chip* 2014 ,14(4) : 686 - 690.

(上接第 213 页)

第二 ,目前脱髓鞘核支架暂停留在支架的制备及性能检测 ,未接种种子细胞在体外及体内构建出椎间盘^[16]。第三 ,脱髓鞘核细胞基质本身会不会对种子细胞向髓核细胞分化具有诱导作用 ,以及对髓核细胞表型具有维持作用? 需要接下来进一步研究。目前脱髓鞘核细胞基质构建组织工程椎间盘的研究还处于初步阶段 ,相信通过后续临床研究和体外研究的深入 ,脱髓鞘核细胞基质作为组织工程基质具有良好的发展前景。

【参考文献】

[1] ANDERSSON GB. Epidemiological features of chronic low-back pain [J]. *Lancet* ,1999 ,354(9178) : 581 - 585.

[2] TONG F ,LV Q ,LI A *et al.* An epidemiological study of the prevalence rate of inflammatory back pain and axial spondyloarthritis in a university in the south of China [J]. *Clin Rheumatol* ,2018 ,37 (11) : 3087 - 3091.

[3] HUGHES SP ,FREEMONT AJ ,HUKINS DW *et al.* The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain [J]. *J Bone Joint Surg Br* , 2012 ,94(10) : 1298 - 1304.

[4] KALICHMAN L ,HUNTER DJ. The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes [J]. *Joint Bone Spine* ,2008 ,75 (4) : 388 - 396.

[5] ADAMS MA ,ROUGHLEY PJ. What is intervertebral disc degener-

ation and what causes it [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* ,2006 ,31 (18) : 2151 - 2161.

[6] MASSEY CJ ,VAN DONKELAAR CC ,VRESILOVIC E ,*et al.* Effects of aging and degeneration on the human intervertebral disc during the diurnal cycle: a finite element study [J]. *J Orthop Res* , 2012 ,30(1) : 122 - 128.

[7] ADAMS MA ,FREEMAN BJ ,MORRISON HP *et al.* Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000 ,25(13) : 1625 - 1636.

[8] 周志杰. 腰椎融合术后邻近节段退变的手术相关危险因素分析和早期临床观察 [D]. 杭州: 浙江大学 ,2012.

[9] 董视师 ,李景峰 ,周逸驰 ,等. 腰椎间盘退变: 组织工程修复及生物力学评价 [J]. *中国组织工程研究* ,2015 ,(37) : 6024 - 6030.

[10] 陶铁卿. II 型胶原荷载成髓核细胞分化的脂肪间充质干细胞修复椎间盘退变的体内外研究 [D]. 杭州: 浙江大学 ,2016.

[11] 崔翔. 骨髓间充质干细胞结合静电纺丝生物活性支架治疗椎间盘退变的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学 ,2014.

[12] 李大鹏. IGF - 1 促进大鼠退变髓核细胞 Aggrecan 和 II 型胶原的表达及其机制 [D]. 苏州: 苏州大学 ,2013.

[13] 潘宗友. 吉非替尼治疗椎间盘退变与半月板损伤的效应和机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学 ,2018.

[14] 谭伟. 去细胞髓核基质来源三维多孔支架构建组织工程髓核的研究 [D]. 广州: 南方医科大学 ,2015.

[15] 谭伟 ,吕海 ,周初松. 去细胞基质支架构建组织工程椎间盘: 最为接近正常髓核三维结构 [J]. *中国组织工程研究* ,2015 ,(8) : 1289 - 1294.

[16] 曹纬. 同种异体脱髓鞘核支架的构建及其性能的体外初步研究 [D]. 广州: 南方医科大学 ,2014.