

基础研究

大鼠脱细胞脊髓的形态学观察

李宏波¹, 李万里², 池永龙¹, 李玉丽³

(1 温州医学院附属第二医院脊柱外科 325027 温州市; 2 浙江大学医学院附属第二医院骨科 310009 杭州市;
3 温州医学院生物医学工程研究院 325027 温州市)

【摘要】目的:观察大鼠脱细胞脊髓的形态特点,探讨其作为脊髓组织工程支架的可行性。**方法:**取 11 条 SD 大鼠脊髓,采用冻融+化学萃取法进行脱细胞处理,其中 2 条采用 HE 染色观察脱细胞情况,立春红 2R-亮绿 SF 染色观察脱髓鞘情况;3 条取颈、胸、腰段横切片行 Mallory 三色胶原染色和透射电镜检查,3 条取颈、胸、腰段纵切片行 Mallory 三色胶原染色,3 条取颈、胸、腰段贴片行扫描电镜检查,观察其形态构成等参数,比较不同部位材料内部结构的差异。**结果:**经脱细胞处理的脊髓呈乳白色扁长条状,干燥,体积较处理前略变小,韧性及强度增加,表面脊膜包裹完好,无异味。HE 染色显示脊髓内未见细胞残留;丽春红 2R-亮绿 SF 染色证实神经细胞轴突脱髓鞘完全。颈、胸及腰段脊髓横断面均呈网格状结构,纵断面均呈平行管状结构。颈、胸及腰段横断面网格大小及纵断面平行管状结构间距行统计学两两比较,颈段网格长径明显大于胸段($P<0.05$),胸段网格短径明显小于腰段($P=0.05$),其余均无统计学差异($P>0.05$)。**结论:**SD 大鼠脊髓经脱细胞处理后颈、胸和腰段脱细胞彻底,保留了原脊髓的主体结构,可作为脊髓组织工程的支架。

【关键词】脊髓损伤;组织工程;脱细胞脊髓支架;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.09.14

中图分类号:R318.5,R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-09-0754-05

Morphology study of decellularized rat spinal cord/LI Hongbo, LI Wanli, CHI Yonglong¹, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(9): 754~758

【Abstract】Objective: To observe the morphology of rat decellularized spinal cord and to investigate the its feasibility of working as spinal cord tissue engineering scaffolds. **Method:** Eleven SD rat spinal cords adopt were processed by the method of freeze-thaw and chemically extracted for the preparation of decellularized and demyelinating spinal cord scaffold material. Two scaffold materials were processed for HE staining to observe acellular and Ponceau Red 2R-Brilliant Green SF staining to observe demyelinating. 3 cross-sectional specimens from cervical, thoracic and lumbar sections were stained by Mallory trichrome collagen and observed under transmission electron microscope. 3 longitudinal specimens from cervical, thoracic and lumbar sections were stained by Mallory trichrome collagen, and 3 specimens from cervical, thoracic and lumbar sections were observed under transmission electron microscope. Their morphology and inner structure of varied site were observed and compared. **Result:** The decellularized spinal cord was cream color and displayed flat long strip, with the features of dry, slightly decreased volume and increased flexibility and strength, it had complete superficial duramater and no unusual smell. HE staining indicated no cell in the spinal cord; Ponceau Red 2R-Brilliant Green SF staining showed complete demyelination. Cross-section specimen presented with grid structure in cervical, thoracic and lumbar spinal cord, and longitudinal specimen presented with parallel-tube structure. The grid size and longitudinal distance between the parallel tube of cervical, thoracic and lumbar specimen were compared mutually, the results showed longer diameter of cervical grid than thoracic ones ($P<0.05$), and the short diameter of lumbar grid larger than thoracic ones ($P=0.05$), while no significance remained for the rest. **Conclusion:** After relative management, spinal cord of cervical, thoracic and lumbar present with complete decellularization, the main structure of the original spinal cords are retained, which is apt to be used as spinal cord tissue engineering scaffold.

【Key words】 Spinal cord injury; Tissue engineering; Decellularized spinal cord; Rat

基金项目:浙江省自然科学基金项目(编号:Y2080507)及浙江省卫生厅课题(编号:2007A140)

第一作者简介:男(1982-),在读硕士研究生,住院医师,研究方向:脊柱外科

电话:(0577)88879034 E-mail:lihongbo24@163.com 通讯作者:李万里 E-mail:liwanli99@126.com

【Author's address】 Department of Spine Surgery, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325027, China

组织工程研究结果表明,生物支架材料及其特定的形态结构对于损伤脊髓的修复效果具有至关重要的作用^[1-2]。目前应用的组织工程支架材料在物理性能、生物性能及形态结构上与正常脊髓相比仍具有较大的差距,目前尚无与脊髓结构高度相似且在理化性能也与脊髓相似的支架材料。本研究采用郭树章等^[3]的冻融+化学萃取法对大鼠脊髓进行脱细胞处理,观察脱细胞脊髓的形态特征,探讨不同节段的脱细胞脊髓材料能否作为脊髓组织工程的支架。

1 材料与方法

1.1 实验动物和器材

SD 大鼠(温州医学院动物实验中心),丽春红 2R、亮绿 SF、脱氧胆酸钠(温州金山化学试剂有限公司),脱氧核糖核酸酶(DNase)、核糖核酸酶(RNase)(北京索莱宝科技有限公司),-80℃深低温冰箱、恒温回旋振荡器及冷冻干燥机(温州医学院附属第二医院中心实验室),扫描电镜、透射电镜(温州医学院基础学院实验室)。

1.2 脊髓脱细胞处理

11 只 2 月龄雄性 SD 大鼠,重约 200~250g,每只用 1.0~1.5ml 水合氯醛腹腔注射麻醉,背部去毛,取后正中切口,打开椎板,显露并小心取出脊髓。用 PBS 清洗去除表面血迹,参照郭树章等^[3]方法对脊髓进行脱细胞处理:将脊髓置于-80℃深低温冰箱中冻存 1h,室温下解冻后置于蒸馏水内,在室温下浸泡 6h,每 2h 换液 1 次,然后置于 3%的脱氧胆酸钠盐蒸馏水溶液(加入适量 1mol/L NaOH 至溶液 pH 值为 8~9),连续震荡 4h(恒温回旋振荡器内持续振荡,25℃,100r/min),再于蒸馏水中浸泡振荡 3h(震荡条件同前),1h 换液 1 次,置于 1KU/ml DNase 和 RNase 混合液中持续振荡 30min,在蒸馏水中浸泡 3h,1h 换液 1 次,自置于脱氧胆酸钠盐蒸馏水溶液开始按上述操作再萃取 1 遍,将萃取后的脊髓组织置于冷冻干燥机冻干,环氧乙烷彻底消毒,-80℃冰箱保存。

1.3 脱细胞脊髓的观察

1.3.1 大体观察 观察脊髓的形状、大小、颜色,表面情况,有无异味,韧性及硬度等。

1.3.2 组织学检查 随机选取 2 条脊髓,用 10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋。其中 1 条随机选取一部位行连续组织化学横切片,于另 1 条相应部位行连续组织化学纵切片,片厚 5 μ m。每隔 5 张切片取 1 张,共取 5 张切片。取横切片和纵切片进行 HE 染色,光镜下观察脊髓脱细胞情况,细胞核和胞质应分别呈蓝色和红色。

立春红 2R-亮绿 SF 染色:每隔 5 张切片取 1 张,共取 5 张切片。取横切片和纵切片,用丽春红 2R 染液(丽春红 2R 1.0g,冰醋酸 2.5ml,蒸馏水 97.5ml)染色 3~5min。蒸馏水洗。1%磷钨酸水溶液处理 1min 后,亮绿 SF 染液(亮绿 SF 1.0g,冰醋酸 1ml,蒸馏水 99ml)进行复染 4min,用 1%冰醋酸水溶液分化 10s,蒸馏水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。光镜下观察脊髓脱神经鞘情况,脊髓白质中神经纤维束轴索和髓鞘呈橙红色,而灰质背景则呈淡绿色,神经元呈绿色。

1.3.3 脱细胞脊髓不同部位内部结构比较 剩余 9 条脊髓用 10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋。先取 3 条,分别在颈、胸及腰段行连续组织化学和透射电镜横切片,于另外 3 条材料相应 3 个部位分别行连续组织化学纵切片。组织化学切片片厚 5 μ m,透射电镜超薄切片片厚 50nm。每条脊髓每个部位每隔 5 张连续切片取 1 张,每种检测取 5 张切片。组织化学横切片和纵切片行 Mallory 三色胶原染色:于 0.5%酸性复红水溶液染色 1min,蒸馏水漂洗后,染色 1~2min(苯胺蓝 0.5g、桔黄 G 2.0g、磷钨酸 1.0g、蒸馏水 100ml)。蒸馏水漂洗后,95%酒精分色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,在光学显微镜下观察三段脊髓横断面和纵断面的胶原保存情况及形态。透射电镜横切片观察三段形态结构及测量网格孔径大小。网格孔径大小按图中标尺进行测量。再于剩余 3 条脊髓相应 3 个部位用冻干折断法分别获得脊髓标本的 5 个自然断面的贴片,每个部位取 5 个贴片,用扫描电镜观察其形态构成,按图中标尺测量纵断面平行管状结构间距。

1.4 统计学处理

颈、胸、腰三段数据用平均数 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析,不

同部位均数的两两比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

在脱细胞蒸馏水浸泡过程中可见大量白色絮状物自脊髓内析出。脱细胞处理的脊髓经冷冻干燥机冻干后呈乳白色扁长条状, 干燥, 体积较处理前变小, 韧性及强度略增加, 表面仍由脊膜包裹, 无异味(图 1)。在脱细胞处理后, 脊髓切片 HE 染色结果显示无细胞成分存在(图 2); 丽春红 2R-亮绿 SF 染色后, 脊髓横、纵断面均呈蓝绿色背景, 无橙红色髓鞘成分(图 3)。

Mallory 三色胶原染色结果显示, 脊髓颈、胸及腰段横断面均呈网格状结构(图 4), 纵断面均呈平行管状结构(图 5)。超薄切片透射电镜检查结果与 Mallory 三色胶原染色法基本相似, 三段横断面仍然为网格状结构(图 6), 扫描电镜结果显示三段纵断面为平行管状结构(图 7)。颈、胸和腰段的网孔长、短径和平行管状结构间距见表 1, 颈段网格长径与胸段比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 胸段网格短径与腰段比较有显著性差异 ($P = 0.05$), 颈段网格短径与胸段比较、胸段网格长径与腰段比较及颈段网格长、短径与腰段比较均无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明网格孔径颈、腰段较大, 胸段较小。颈、胸和腰段纵断面平行管状结构间距两两比较均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

SCI 的治疗是当今脊柱外科研究的难点和热点领域之一。SCI 分为原发性损伤和继发性损伤, 原发性损伤一旦发生不可避免, 而继发性损伤在一定干预下可减轻或者避免, 因此阻止或减少继发性损伤是治疗的关键。针对继发性损伤的发生机制, 目前治疗 SCI 的方法包括药物治疗、高压氧

治疗、传统手术治疗等, 虽然这些治疗方法均可取得一定疗效, 但却仍不令人满意。随着组织工程技术的不断发展, 采用组织工程方法治疗 SCI 显示出令人欣喜的前景。组织工程要素有二, 即支架和种子细胞。支架应该符合一定的要求。SCI 处植入的支架应该提供一定立体结构, 能为神经元及其轴突以及复合的种子细胞生长提供限定的空间, 防止外界其他活性成分的干扰, 指引神经元轴突延伸, 使新形成的组织接近于原有的解剖结构, 有利于功能性连接的建立。充填的支架材料还应该能防止胶质瘢痕的形成, 引导细胞及轴突生长形成类似于正常解剖结构的组织, 为中枢神经功能恢复建立基础。如果单纯进行细胞移植治疗而没有有效的支撑, 细胞生长缺乏攀爬的支架, 加之周围胶质瘢痕的长入阻碍, 神经轴突无法充分延伸与周围正常组织形成突触。而应用组织工程治疗能显著改善这一情况, 并且示踪显示其新生的组织与周围正常神经组织存在轴突连接^[9]。无毒、不引起细胞突变和不良组织反应, 与脊髓结构性质近似, 组织相容性好, 不引起排斥反应, 在体内较稳定, 一段时间内能保持好的外形, 是对组织工程学中应用材料的基本要求。目前常用的可用于修复 SCI 的材料主要有不可降解材料、可降解材料、二者复合材料、纳米高分子材料以及生物材料的结构形式等。虽然这些材料用于组织工程各有其可取之处, 由于脊髓组织本身在结构、功能上的特殊性、复杂性, 均未能很好地模仿脊髓组织, 修复效果也有限。组织工程研究表明细胞外基质不仅对组织细胞具有支持作用^[9], 而且细胞外基质中所含的胶原、蛋白多糖、黏附分子及细胞因子等成分还可影响细胞形态, 调控细胞的代谢、迁移、增殖、分化及信息传递^[6,7]。因此, 采用适当形式的细胞外支架材料有望改善细胞移植后的局部微环境状态, 从而对移植效果产生积极影响。脱细胞基质即具有细胞外基质的上述作用。作为组织工程支架具有与组织相似的结构, 从而找到了一个解决仿制脊髓组织结构困难的途径。脱细胞技术在周围神经、皮肤、心肌、心瓣膜、膀胱等方面已得到了广泛的应用并取得了较好的效果, 技术已经相对成熟。郭树章等在此基础上率先采用冻融+化学萃取的方法制备了脱细胞脊髓支架, 并经过验证证实脱细胞脊髓支架具有与脊髓相似的结构, 层黏连蛋白、纤维连接蛋白等细胞外基质成分得到



图 1 大鼠脱细胞脊髓长 3.0~4.0cm, 直径 2.0~2.5mm; 两侧可见断裂神经根, 尾部逐渐变细, 并可见马尾结构

保留^[8],脱细胞脊髓支架只引起轻微的免疫排斥反应和炎症反应^[9]。尹文化等^[10]亦证实机械振荡有利于清除脊髓内细胞、轴突和髓鞘,合适的机械振荡频率在去细胞的同时,还能较好地保存脊髓内天然的基质纤维和空间结构。

本研究按照郭树章等^[3]的方法,成功制成了脱细胞脊髓材料。通过 HE 染色、丽春红 2R-亮绿 SF 染色证实脊髓脱细胞、脱髓鞘彻底。选用颈、胸、腰三段脊髓分别制成横、纵两个断面,采用 Mallory 三色胶原染色、透射电镜及扫描电镜进行

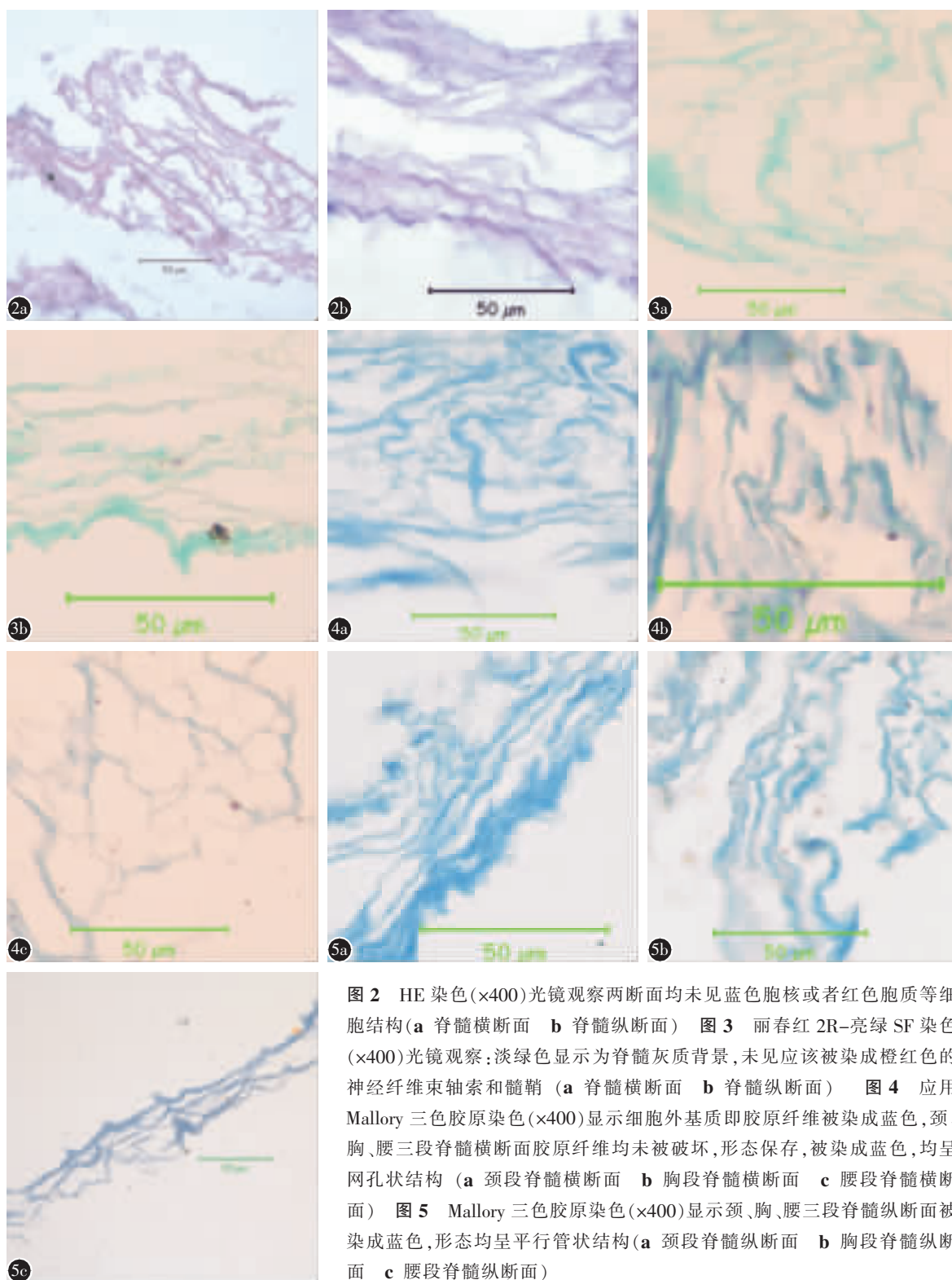


图 2 HE 染色($\times 400$)光镜观察两断面均未见蓝色胞核或者红色胞质等细胞结构(a 脊髓横断面 b 脊髓纵断面) 图 3 丽春红 2R-亮绿 SF 染色($\times 400$)光镜观察:淡绿色显示为脊髓灰质背景,未见应该被染成橙红色的神经纤维束轴索和髓鞘 (a 脊髓横断面 b 脊髓纵断面) 图 4 应用 Mallory 三色胶原染色($\times 400$)显示细胞外基质即胶原纤维被染成蓝色,颈、胸、腰三段脊髓横断面胶原纤维均未被破坏,形态保存,被染成蓝色,均呈网孔状结构 (a 颈段脊髓横断面 b 胸段脊髓横断面 c 腰段脊髓横断面) 图 5 Mallory 三色胶原染色($\times 400$)显示颈、胸、腰三段脊髓纵断面被染成蓝色,形态均呈平行管状结构(a 颈段脊髓纵断面 b 胸段脊髓纵断面 c 腰段脊髓纵断面)

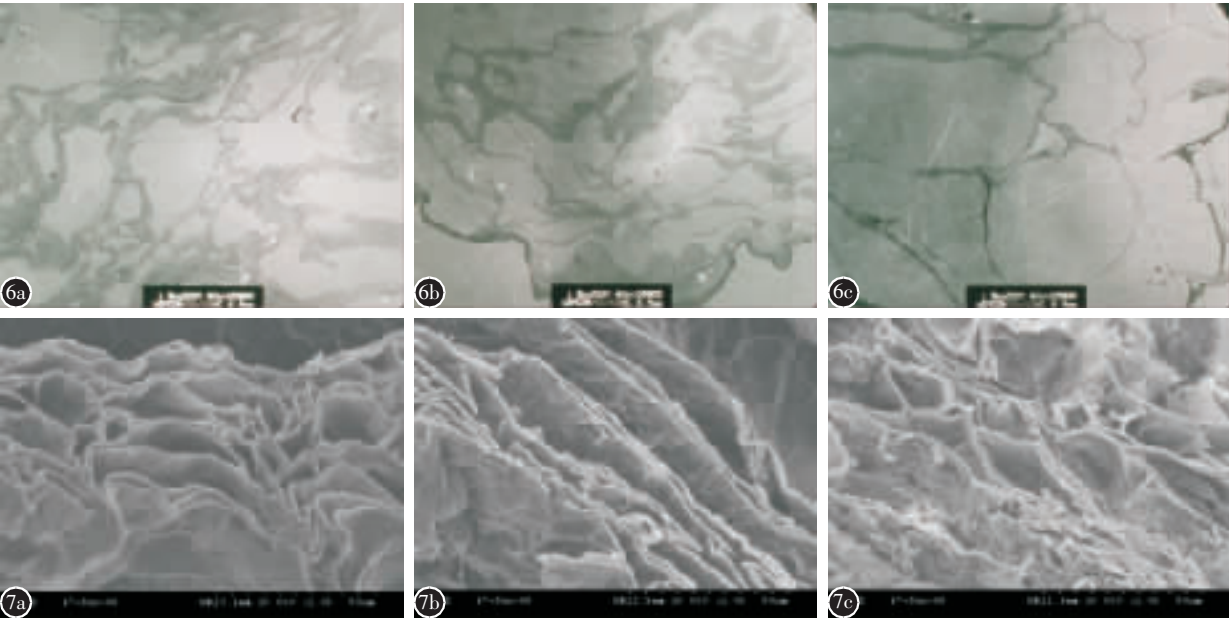


图 6 超薄切片透射电镜检查显示颈、胸、腰三段脊髓横断面均呈网孔状结构,未见细胞结构(a 颈段横断面 b 胸段横断面 c 腰段横断面)(×700) 图 7 扫描电镜显示颈、胸、腰三段脊髓纵断面形态均呈平行管状结构,未见细胞结构(a 颈段纵断面 b 胸段纵断面 c 腰段纵断面)(×1000)

表 1 脱细胞脊髓颈、胸、腰段横断面网孔与纵断面平行管状结构参数 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}, n=5$)

	颈段	胸段	腰段
网孔长径	24.5±9.7	16.6±3.3 ^①	23.1±8.8
网孔短径	15.0±5.6	9.7±3.7	15.8±9.3 ^②
平行管状结构间距	8.3±2.7	7.2±1.5	9.4±1.5

注:①与颈段比较 $P<0.05$,②与胸段比较 $P=0.05$

比较,结果证实三段脊髓横断面均呈网孔状结构,纵断面均呈平行管状结构。同时统计学处理结果显示颈、腰段脊髓孔径与胸段脊髓孔径有差别,颈、腰段脊髓孔径较大,而胸段脊髓孔径最小。在解剖上,正常脊髓有两个膨大,即颈膨大和腰骶膨大,呈现两端粗中间细的大体形态,这可能是脊髓孔径颈、腰段较大而胸段较小的一个解剖学原因。综上所述,颈、胸、腰三段脊髓均可用于 SCI 修复,但在脊髓组织工程中,材料孔径的大小是否对种子细胞的局部增殖、神经元及轴突的再生产生影响有待于进一步探讨。

4 参考文献

1. Sachlos E, Reis N, Ainsley C, et al. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication[J]. Biomaterials, 2003, 24(8): 1487-1497.

2. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials[J]. Science, 2002, 295(5557): 1014-1017.

3. 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): 225-228.

4. Cheng H, Huang YC, Chang PT, et al. Laminin-incorporated nerve conduits made by plasma treatment for repairing spinal cord injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(4): 938-944.

5. O'Connor SM, Stenger DA, Shaffer KM, et al. Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca^{2+} response in three-dimensional collagen gel [J]. J Neurosci Methods, 2000, 102(2): 187-195.

6. Ma W, Fitzgerald W, O'Shaughnessy TJ, et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels [J]. J Exp Neurol, 2004, 190(2): 276-288.

7. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair[J]. Brain Res, 2003, 974(1-2): 17-24.

8. 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.

9. 郭树章, 任先军, 蒋涛, 等. 大鼠脱细胞异体脊髓支架的免疫原性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(6): 444-446.

10. 尹文化, 金大地, 邓许勇, 等. 机械振荡对脊髓去细胞支架形态学的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(10): 1748-1751.

(收稿日期: 2010-05-24 修回日期: 2010-07-01)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 李伟霞)