

综述

脱细胞脊髓基质支架的研究进展

蒋涛,任先军

(第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.07.20

中图分类号: R318.5, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-07-0782-04

应用组织工程技术进行脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的修复已成为神经医学领域的研究热点。支架构建作为组织工程学研究的基本要素,在进行组织水平的脊髓重构研究中具有极其重要的意义。如何构建符合脊髓组织解剖和生理需要的组织工程脊髓支架,学者们进行了广泛探索。近年来,采用天然的脱细胞基质材料构建组织工程支架,即用同种异体来源的组织标本经过去细胞、部分或完全去除有机质或无机质处理、保留细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分及其三维构架形成生物衍生材料(bio-derived material)用于组织工程支架构建。这一方法为脊髓组织工程支架的研制提供了新的思路,脱细胞脊髓基质支架应运而生。笔者就脱细胞脊髓基质支架的制备方法、组织学与生物特性及可行的改性优化方法的研究进展综述如下。

第一作者简介:男(1977-),主治医师,讲师,博士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68774608 E-mail:fromcq2000@sina.com

通讯作者:任先军

1 常用的脱细胞技术

常用的脱细胞技术包括:化学萃取法、冻融法、酶消化法、溶液渗透法及机械或超声振荡法等,已广泛应用于皮肤、心肌、心瓣膜、血管、肌肉、膀胱等组织的脱细胞基质材料的制备。

1.1 化学萃取法

选择合适浓度的化学除垢剂可有效去除组织内的细胞成分,并完整地保留细胞外基质,从而达到“化学萃取”的目的。TritonX-100 是一种相当柔和的除垢剂,在水中不解离,稳定性高,不易受强电解质无机盐类的影响,并且不改变组织的天然结构^[1]。TritonX-100 结构上的亲水基团能够溶解细胞膜及细胞器表面膜结构的蛋白质,并能清除磷脂类物质;而其疏水端能与膜蛋白的疏水区结合形成复合物,溶解于 TritonX-100 溶液中。因此, TritonX-100 能彻底破坏生物膜,使细胞和细胞器溶解破坏,从而达到清除组织中细胞成分的目的。脱氧胆酸钠溶液能溶解细胞中的脂类、蛋白质等,通过 PBS 反复漂洗,可将破坏的细胞成分彻底洗脱出来,并能有效去除神经组织内髓鞘成分和其他细胞内容物^[2]。此外脱氧胆酸钠可使蛋白以单体形式被分离,

2000, 13(1):50-57.

27. Frankel BM, Jones T, Wang C, et al. Segmental polymethylmethacrylate-augmented pedicle screw fixation in patients with bone softening caused by osteoporosis and metastatic tumor involvement; a clinical evaluation[J]. Neurosurgery, 2007, 61(3):531-538.
28. Chang MC, Liu CL, Chen TH, et al. Polymethylmethacrylate augmentation of pedicle screw for osteoporotic spinal surgery: a novel technique[J]. Spine, 2008, 33(10):317-324.
29. Waits C, Burton D, McIff T, et al. Cement augmentation of pedicle screw fixation using novel cannulated cement insertion device[J]. Spine, 2009, 34(14):478-483.
30. Taniwaki Y, Takemasa R, Tani T, et al. Enhancement of pedicle screw stability using calcium phosphate cement in osteoporotic vertebrae; in vivo biomechanical study [J]. J Orthop Sci, 2003, 8(3):408-414.
31. Roy-Camille R. Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating[J]. Clin Orthop, 1986, 203:7-17.

32. Roy-Camille R, Saillant G, Mazel C. Plating of thoracic, thoracolumbar, and lumbar injuries with pedicle screw plates[J]. Orthop Clin North Am, 1986, 17(1):147-159.
33. 杜心如, 叶启彬. 经椎弓根胸腰椎内固定应用解剖学研究的进展[J]. 中国矫形外科杂志, 1998, 5(5):446-448.
34. 杜心如, 赵玲秀, 张一莫, 等. 腰椎人字嵴顶点毗邻结构的观察及其临床意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2001, 11(2):89-92.
35. Kim KD, Patrick J, Bloch O, et al. Computer-assisted thoracic pedicle screw placement: an in vitro feasibility study [J]. Spine, 2001, 26(4):360-364.
36. Kim YJ, Lenke LG, Bridwell KH, et al. Free hand pedicle screw placement in the thoracic spine: is it safe [J]? Spine, 2004, 29(3):333-342.
37. Kosmopoulos V, Schizas C. Pedicle screw placement accuracy: a meta-analysis[J]. Spine, 2007, 32(3):111-120.

(收稿日期: 2010-06-23 修回日期: 2010-08-03)

(本文编辑 彭向峰)

但对蛋白质的变性作用较弱,对细胞基质结构影响不大。

1.2 冻融法

冻融法是常用的物理脱细胞技术。在冻融过程中要发生 3 个主要的物理变化,即液体溶液的固化、固化溶液的融化和水分通过细胞膜的渗透,由此产生的溶液冰晶形成和增长,冰晶的再结晶,高渗透压应力和溶液的高浓度毒性等因素可破坏细胞膜和细胞器结构,导致细胞死亡崩解,经洗脱后去除细胞成分^[3]。通过控制温度变化率可以防止细胞内形成的冰晶结构破坏细胞外基质。冻融法可有效破坏组织内的细胞结构,并能较好保存细胞外基质结构,但其脱细胞效果较差,组织内可残留大量细胞成分,增加支架材料的免疫原性^[3]。

1.3 酶消化法

通过生物酶的化学消化作用可以较彻底地去除组织内的细胞成分^[4]。DNA 酶和 RNA 酶常用于组织的脱细胞处理,它们能分解组织细胞中的核酸物质,使组织内核酸含量平均下降 91%,但细胞破坏作用较为强烈,故脱细胞时间宜短,需严格控制脱细胞时间^[5]。胰蛋白酶是贴壁细胞培养中常用的消化酶,可以通过切断赖氨酸、精氨酸的肽键,破坏细胞间连接、细胞外衣和 ECM 的某些成分使细胞游离而起到脱细胞的作用。胰蛋白酶的脱细胞效果较为理想^[6],但其对细胞基质中的胶原纤维破坏较为明显,常出现胶原断裂现象,从而影响脱细胞基质材料的生物力学性能,使其应用受到一定限制。

1.4 其他方法

溶液渗透法是通过高渗溶液或低渗溶液产生的渗透压冲击,使组织和器官中的细胞破裂,经过反复洗脱,从而达到脱细胞目的^[7]。由于该法脱细胞效率较低,较少单独使用。机械或超声振荡法作为一种物理方法,常用于辅助脱细胞处理。通过机械振荡或超声波所产生的能量可以破坏细胞结构,提高脱细胞效率。但机械及超声能量亦可对细胞外基质结构产生影响,故对其条件的控制应非常严格^[8]。

2 脱细胞脊髓基质支架的制备

神经组织的脱细胞基质支架研究起步稍晚,而脱细胞脊髓基质支架的制备仍处于探索阶段,希望通过较为理想的脱细胞技术尽可能去除脊髓内的细胞、轴突和髓鞘等异物免疫原性物质,并最大限度地保留脊髓内天然的细胞外基质成分及其三维结构。

1998 年, Sondell 等^[9]应用脱氧胆酸钠和 Triton X-100 成功制备了大鼠坐骨神经去细胞支架,清除了雪旺细胞等所有细胞成分,保留了雪旺细胞基底层层的管状结构,并且获得了比较满意的外周神经修复效果。2003 年, Ribatti 等^[2]采用脱氧胆酸钠和 DNase 制备了 SD 大鼠脑组织的去细胞支架,支架内细胞被完全清除,仅留下均一网状脑胶原基质结构,该支架能明显促进血管新生,并且没有发现炎细胞浸润。

由于脊髓组织结构特殊,成分复杂,单一的脱细胞技

术难以达到理想的脱细胞效果,因而通过多种脱细胞技术的联合应用有望取得较为理想的效果。郭树章等^[10-13]系列研究首先报道了脱细胞脊髓基质支架,将大鼠脊髓组织经冻融处理后再分别采用改良的 Sondell 方法和 Ribatti 方法成功构建了脱细胞脊髓基质支架。该支架对脊髓内的细胞和髓鞘成分去除较为彻底,较完整地保留了细胞外基质及其三维结构,为脱细胞脊髓支架的进一步研究奠定了基础。2008 年尹文化等^[14]报道采用 Triton X-100 和脱氧胆酸钠进行化学萃取并结合机械振荡构建的脱细胞脊髓支架具有相似的特点。

3 脱细胞脊髓基质支架的特性

既往应用于脊髓的组织工程支架多采用可降解天然或合成高分子生物材料制备^[14-16],在生物相容性、细胞毒性、降解速度及力学性能方面各有优缺点。但面临的最大问题却是如何将上述生物材料制备成与脊髓组织结构相似的三维网状支架,即使目前最先进的 3D 打印技术(3D printing machine)也难以真正模仿脊髓复杂的三维网状结构。与之相比较,脱细胞脊髓基质支架具有许多优良的特性。

(1) 脱细胞脊髓基质支架大体形态与正常脊髓高度相似,呈乳白色半透明状,韧性与正常脊髓相似,有利于在脊髓损伤修复的体内移植中实现等位移植和解剖移植,即根据移植部位需要取材,并进行解剖对接^[10]。组织学观察证实^[10,13],脱细胞脊髓基质支架内细胞及髓鞘成分消失,细胞外基质成分呈交错的纵行管状排列结构,细胞和轴突洗脱后的孔隙得以保存,孔径 6~150 μm ,形成纵向平行或不规则排列的孔道系统,各通道间相互沟通,形成三维立体网状结构,具有高度的仿生性,能为轴突再生提供与伤前相似的通道,从而正确引导轴突生长。此外,脱细胞脊髓基质支架具有大于 90% 的高孔隙率,有利于细胞植入、生长、增殖以及细胞营养成分的输送和代谢产物的排除。

(2) 对脱细胞脊髓基质支架的分析结果显示^[14],脊髓组织的细胞外基质成分在脱细胞脊髓支架内得到较完整的保留,主要包括胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等。胶原为脱细胞脊髓基质支架的主要支架结构,具有一定的力学性能,通过化学交联改性,可显著提高细胞外基质支架材料的力学强度和抗酶解能力^[17]。此外,胶原对细胞的生长、分化、细胞黏附及迁移等生物学行为有重要影响。纤维连接蛋白和层粘连蛋白也是细胞外基质的重要组成部分,对细胞黏附、分化和增殖起重要作用。在神经系统中,纤维连接蛋白和层粘连蛋白是刺激轴突生长作用很强的物质,并且可通过与生长锥表面的整合素结合,引导轴突生长方向^[18]。多种细胞外基质成分具备细胞膜受体识别位点,有利于细胞黏附生长并发挥生理功能,具有良好的细胞亲和性。脱细胞脊髓基质支架所保留的细胞外基质成分将在脊髓损伤修复过程中发挥重要作用,但不同脱细胞方法对脱细胞脊髓基质支架材料内细胞外基质成分的影响尚不明

确,有待进一步研究。

(3)脱细胞脊髓基质支架具有良好的生物相容性。同种异体组织或器官移植所面临的主要问题是免疫排斥反应,而引发免疫排斥反应的主要组织相容性抗原复合物(MHC)存在于细胞膜表面,基质成分中无MHC表达。此外,髓鞘成分也是引起免疫反应的重要抗原之一。Gulati^[19]用免疫学方法证明了胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等细胞外基质大分子物质在同种异体间免疫原性极低。因而可以推测,通过脱细胞处理去除脊髓组织内的细胞和髓鞘成分后有望大大减轻免疫排斥反应的发生。实验证实^[12,13],同种异体移植脱细胞脊髓基质支架仅引起极轻微的免疫排斥反应,具有良好的生物相容性。

4 脱细胞脊髓基质支架的改性

和其他组织来源的脱细胞基质支架材料一样,脱细胞脊髓基质支架存在体内吸收速度较快的问题,与组织再生速度不相匹配,机械强度较弱,并具有微弱的免疫原性,在一定程度上影响脱细胞脊髓基质支架的应用。因而有必要对脱细胞脊髓基质支架进行改性优化,以满足组织工学的需要。虽然目前尚无脱细胞脊髓基质支架改性研究的报道,但其他组织来源的脱细胞基质支架材料的改性研究为此奠定了基础。

目前,脱细胞基质支架材料多采用化学交联法改性,常用的交联剂有戊二醛、碳化二亚胺、1,4-二(3,4-羟基苯)-2,3-二甲基丁烷(NDGA)、京尼平等。戊二醛是最早且最常用的一种化学交联剂,与胶原中的自由氨基化合物形成化合物而形成交联,经戊二醛处理后,胶原的抗酶解能力和机械强度可明显增强^[7]。但戊二醛只能与氨基酸长链上-NH₂反应结合,而-NH₂在胶原基质的分布不均匀,这必然导致戊二醛交联键的空间分布不均匀,且交联后残存的醛基具有明显的细胞毒性作用。碳化二亚胺则与戊二醛不同,能使胶原相邻的分子之间形成异构肽键,却不作为联接的一部分滞留在交联物分子中,而是转变为具有极低细胞毒性的水溶性脲衍生物,避免解聚作用和残留有毒物质的释放。Cao等^[20]采用碳化二亚胺交联胶原/硫酸软骨素,改善了支架的力学性能,细胞亲和性良好,无明显毒性。NDGA也是一种较常用的交联剂,通过将邻苯二酚官能团氧化成醌来进行交联反应。Koob等^[21]利用NDGA交联胶原后发现比用戊二醛交联的胶原张力和弹性系数都有明显的提高。Lü等^[22]将脱细胞心脏瓣膜支架用NDGA交联后表现出更强的抗张强度、抗酶解性,细胞相容性明显优于戊二醛交联支架。京尼平是一种新型的交联剂,用于交联胶原材料毒性低,且可形成稳定、生物相容性好的交联产品。Bhrany等^[23]分别用京尼平和戊二醛对脱细胞食道基质支架进行交联后发现,二者均能增强基质支架的稳定性,但京尼平交联食道基质支架具有更好的细胞相容性,支持食道上皮细胞增殖。

化学交联对脱细胞基质支架材料特性的影响除与交

联剂类型相关外,还与基质材料自身特点、交联剂浓度、交联时间及温度等因素有关^[24,25]。

脱细胞基质支架材料也可采用物理交联技术进行改性,以减少或避免化学交联剂所带来的细胞毒性影响。但由于物理交联过程中的反应条件较难控制,因而在应用中仍存在较大限制。常用的方法有热脱氢法和光氧化法。热脱氢法是在高真空加热条件下使胶原分子间通过羧基和伯胺侧基形成酰胺键而交联,能降低自由氨基酸的含量并提高胶原的机械强度,由于是一种物理方法,不会产生细胞毒性物质,交联后的基质支架材料具有良好的生物相容性和细胞亲和力^[26]。Haugh等^[27]对胶原-氨基葡聚糖支架材料采用热脱氢法处理后,支架材料的机械力学特性得到明显增强。光氧化法是利用蛋白质中某些氨基酸(如色氨酸、组氨酸、酪氨酸及蛋氨酸)在光敏剂存在的情况下通过可见光照射而被特异地氧化的特性进一步引起材料本身发生交联的方法,期间没有任何化学试剂参与反应。其机制可能是光氧化处理改变了胶原蛋白中某些氨基酸的咪唑环,导致含有醛基或过氧化咪唑的侧链形成,此侧链再与组织中赖氨酸的自由氨基反应形成稳定的分子内和分子间交联^[1]。亚甲兰是最常用的光敏剂,因其通过洗涤可以很容易从组织中去掉。Kozma等^[28]采用光氧化法交联脱细胞心包胶原支架后,该支架材料力学性能得到提高,并保持了良好的生物相容性。

将脱细胞脊髓基质作为脊髓损伤修复的组织工程支架具有许多独特优势:脱细胞脊髓基质支架具有最接近脊髓组织的三维结构,能为轴突再生提供与伤前相似的通道,从而正确引导轴突生长;生物力学性能与正常脊髓相似;具有良好的生物相容性;支架基质表面具备细胞膜受体识别位点、部分活性因子,有利于细胞的黏附生长并发挥生理功能^[10-13]。如果能通过合理的交联改性,提高脱细胞脊髓基质支架的机械力学性能,增强抗酶解及水解能力,降低免疫原性,并保持良好的生物相容性,可望成为一种理想的组织工程脊髓支架,具有广阔的应用前景。

5 参考文献

1. Vavken P, Joshi S, Murray MM. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering [J]. J Orthop Res, 2009, 27(12): 1612-1618.
2. Ribatti D, Conconi MT, Nico B, et al. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane [J]. Brain Res, 2003, 989(1): 9-15.
3. 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.
4. Nishibe T, Kondo Y, Muto A, et al. Optimal prosthetic graft design for small diameter vascular grafts [J]. Vascular, 2007, 15(6): 356-360.
5. 郭树章, 蒋涛, 任先军. 2种去细胞方法制备大鼠脱细胞脊髓支

- 架效果的对比研究[J].第三军医大学学报,2010,32(1):19-22.
6. 张建,吴英锋,陈亮.猪主动脉脱细胞基质的简化制备及生物学评价[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(3):364-369.
 7. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, et al. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation [J]. Cell Transplant, 2003, 12(): 659-666.
 8. 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.
 9. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction[J]. Brain Res, 1998, 795(1-2): 44-54.
 10. 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):226-228.
 11. 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):1246-1249.
 12. 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.
 13. Guo SZ, Ren XJ, Wu B, et al. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility [J]. Spinal Cord, 2010. [Epub ahead of print]
 14. Jain A, Kim YT, McKeon RJ, et al. In situ gelling hydrogels for conformational repair of spinal cord defects and local delivery of BDNF after spinal cord injury [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 497-504.
 15. Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, et al. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro [J]. Brain Res, 2008, 1187(2): 42-51.
 16. Moor MJ, Friedman JA, Lewellyn EB, et al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 419-429.
 17. Chen DC, Lai YL, Lee SY, et al. Osteoblastic response to collagen scaffolds varied in freezing temperature and glutaraldehyde crosslinking [J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 80(2): 399-409.
 18. Tom VJ, Doller CM, Malouf AT, et al. Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter [J]. J Neurosci, 2004, 24(42): 9282-9290.
 19. Gulati AK. Immunological fate of Schwann cell-populated acellular basal lamina nerve allografts [J]. Transplantation, 1995, 59(11): 1618-1622.
 20. Cao H, Xu SY. EDC/NHS-crosslinked type II collagen-chondroitin sulfate scaffold: characterization and in vitro evaluation [J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(2): 567-575.
 21. Koob TJ, Hernandez DJ. Material properties of polymerized NDGA-collagen composite fibers: development of biologically based tendon constructs [J]. Biomaterials, 2002, 23(1): 203-212.
 22. Lü 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.
 23. Bhrany AD, Lien CJ, Beckstead BL, et al. Crosslinking of an oesophagus acellular matrix tissue scaffold [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(6): 365-372.
 24. Billiar K, Murray J, Laude D, et al. Effects of carbodiimide crosslinking conditions on the physical properties of laminated intestinal submucosa [J]. J Biomed Mater Res, 2001, 56(1): 101-108.
 25. Liang HC, Chang Y, Hsu CK, et al. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern [J]. Biomaterials, 2004, 25(17): 3541-3552.
 26. A.阿塔拉, R.P.兰扎.组织工程方法[M].北京:化学工业出版社, 2006.450-452.
 27. Haugh MG, Jaasma MJ, O'Brien FJ. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 89(2): 363-369.
 28. Kozma EM, Wisowski G, Jura-Póltorak A, et al. The influence of physical and chemical agents on photooxidation of porcine pericardial collagen [J]. Biomed Mater Eng, 2005, 15(3): 137-144.

(收稿日期:2010-03-10)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

全国脊柱功能重建(融合与非融合技术)新进展研修班通知

由中华医学会骨科分会脊柱学组、《中华骨科杂志》编辑部与山西医科大学第二医院骨科联合主办的全国脊柱功能重建(融合与非融合技术)新进展研修班定于2010年10月29~31日在太原举行。为更好地总结及交流近年来脊柱融合与非融合技术临床应用的宝贵经验,特邀请国内著名脊柱外科专家进行讲授,研修班结束授予国家级继续教育Ⅰ类学分10分。会议时间:2010年10月29~31日,29日全天报到。报到地点:太原市御花园金悦酒店(三晋路九号)。交通方式:飞机场乘坐公交车201路到火车站改乘19路或602路在柳巷北口下车向北步行200米即到。会务费:人民币600元/人;食宿由会议统一安排,住宿费自理。欢迎踊跃参加或提供疑难病例进行现场讨论,有意参加者请通过来信、电话、传真或电子邮件方式报名。联系地址:(1)天津市解放南路406号天津医院内《中华骨科杂志》编辑部 万瑜;电话:(022)28334734 转 107, 13323350990;邮编:300211;E-mail:wanyu0990@126.com。(2)太原市五一路382号山西医科大学第二医院骨科田江华;电话:(0351)3365142, 13593162566, 13903468578;传真:(0351)3365919;邮编:030001;E-mail:sxguke@yahoo.com.cn。