

· 基础研究 ·

人脱细胞半月板的制备

周预¹, 刘玉杰², 黄靖香², 王瑞¹, 臧磊¹, 海涌¹

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院骨科, 北京 100043; 2. 解放军总医院骨科, 北京 100853)

【摘要】 目的: 研究人脱细胞半月板的制备及其形态结构和生物力学性能。方法: 切取人半月板制备人脱细胞半月板, 用 HE、甲苯胺蓝、天狼星红、番红花 O、AB 染色和 Hoechst-33258 染色等方法进行定性检测, 扫描电镜进行形态学观察, 用生物力学机测定其在不同压缩比率下的瞬时形变恢复率, 最大形变恢复率及最大受压强度。结果: 各种染色均显示细胞陷窝内已无细胞结构, Hoechst-33258 染色显示无细胞残留, 天狼星红染色为阳性, 电镜观察示半月板表面及内部不规则存在空虚的陷窝。人脱细胞半月板的孔隙较大, 孔隙直径为 80~760 μm , 孔隙率在 67% 以上。生物力学测定其压缩 30% 时, 最大瞬时形变恢复率为 (89.62 \pm 1.04)%, 最大形变恢复率为 100%, 最大强度是 (3.04 \pm 0.13)N。结论: 人半月板经去污剂等处理后, 去除了细胞成分, 保留了三维立体结构的细胞外基质, 具有一定的生物力学性能; 成功制备的人脱细胞半月板可作为半月板组织工程的支架载体。

【关键词】 人类; 半月板, 胫骨; 脱细胞基质

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.03.016

Preparation of human meniscus acellular matrix ZHOU Yu*, LIU Yu-jie, HUANG Jing-xiang, WANG Rui, ZANG Lei, and HAI Yong. Department of Orthopaedics, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100043, China

ABSTRACT Objective: To investigate development of a cell extraction process for preparing human meniscus acellular matrix, and morphology and biomechanical properties. **Methods:** Human meniscus were subjected to modified eight-step detergent, then, the specimens were assessed by staining with haematoxylin-eosin, toluidine blue, sirius red, saffron O, alcian blue and hoechst-33258, et al. The ultrastructure of the specimens was observed with scanning electron microscope. Transient recovery rate of deformation, maximal recovery rate of deformation and maximal compressive strength were tested to determine the biomechanical properties of the scaffold. **Results:** Every stain confirmed that the cellular constituents of the specimens were removed. The specimens stained positively by staining with sirius red. Lacuna were found irregularly not only on the surface of the meniscus, but also in the meniscus with scanning electron microscope. Pores in the specimens were large, the diameter of pores was 80 to 760 μm , porosity was over 67%. The transient recovery rate of deformation was (89.62 \pm 1.04)%, the maximal recovery rate of deformation was 100% and the maximal compressive strength was (3.04 \pm 0.13)N, when the specimens were compressed 30%. **Conclusion:** The modified eight-step detergent can remove the immunogenic cell components from human meniscus, in addition, 3D extracellular matrix can be retained. The scaffold has good biomechanical properties. This scaffold stands a good chance to be an implant for future tissue engineering of the human meniscus.

KEYWORDS Humans; Menisci, tibia; Decellularization matrix

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(3):237-239 www.zggszz.com

随着人们生活改善、体育运动增加及老龄化社会的到来, 半月板损伤及退变的发病率逐渐增高; 当半月板严重损伤或退变后, 膝关节骨关节炎就会随之而来^[1-2]。动物脱细胞半月板移植治疗半月板损伤已有报道^[3]。但能否制备出人脱细胞半月板仍未知。本研究成功制备人脱细胞半月板, 为进一步研究人脱细胞半月板修复半月板损伤打下了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料、主要试剂和设备

通讯作者: 周预 E-mail: zhoyu9711@126.com

Corresponding author: ZHOU Yu E-mail: zhoyu9711@126.com

32 岁 2 名男性创伤性截肢患者残肢中, 完整切取 8 个半月板。Triton X-100、脱氧胆酸钠、Hoechst-33258 染色剂由 Sigma 公司生产。日立 S-3500N 扫描电子显微镜由日本日立公司生产。

1.2 实验方法 切取半月板, 并去除其周围的滑膜组织。然后采用以下方法处理半月板: ①酸性氧化电位水 (PH 值为 2) 漂洗半月板。②1% 双氧水浸泡 2 h 至半月板呈白色。③蒸馏水再冲洗 3 次至气泡和红细胞去除后, 加蒸馏水-10 $^{\circ}\text{C}$ 低渗冻融 72 h, 去除蒸馏水。④将半月板放入 3% Triton X-100 液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 持续振摇 48 h。⑤蒸馏水冲洗 3 次, 每次 10 min 至洗净半月板。⑥将半月板再放入 6% 脱氧胆酸钠液中

4℃持续振摇 48 h。⑦再将半月板放入 3%Triton X-100 液中,4℃持续振摇 24 h。⑧蒸馏水彻底冲洗半月板,至冲洗液 PH 值为 7。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 组织学检测 把半月板标本在 10%甲醛固定 48 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片 5 μm,进行 HE、甲苯胺蓝、番红花 O、天狼星红、AB 染色和 Hoechst-33258^[4]染色,光镜下观察。

1.3.2 扫描电镜观察 从体部剖开人脱细胞半月板,取材后用蒸馏水漂洗;2.5%戊二醛固定,再次用蒸馏水浸洗 2 次;采用 50%、70%、80%、90%、100% 乙二醇逐级脱水、每种浓度脱水 15 min;75%、100% 叔丁醇共漂洗 2 次;置 4℃冰箱冷藏 30 min;真空干燥器干燥;离子镀膜仪镀金;电子显微镜扫描、照相,观察孔隙大小及孔隙率。

1.3.3 生物力学测定 将脱细胞半月板在 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液中浸泡 12 h,控干后将体部修剪成约 5 mm×5 mm×2 mm 大小的试件,置于自制的卡具中。实验加载速度为 0.1 mm/min,通过配套软件控制压缩形变分别达到 10%、20%和 30%,并记录达到相应形变的最大强度。释放载荷,观察脱细胞基质的瞬时形变恢复率及最大形变恢复率。

2 结果

2.1 大体观察 肉眼见正常人半月板呈白色或淡黄色,脱细胞后其变白,表面皱缩、可见多个陷窝,人脱细胞半月板前后角变薄,但其外形仍呈半月板立

体三维结构。

2.2 组织学观察 脱细胞后行 HE、甲苯胺蓝、番红花 O、AB 染色和 Hoechst-33258 染色均显示人脱细胞半月板内无细胞结构成分残留,细胞陷窝空虚呈空泡状(图 1-2)。天狼星红染色呈阳性(图 3),胶原连续且排列规则,结构疏松。

2.3 扫描电镜检查 扫描电镜检查示人脱细胞半月板表面存在多个陷窝,陷窝边缘毛糙(图 4),切开扫描显示人脱细胞半月板内部不规则分布大量陷窝(图 5)。人脱细胞半月板的孔隙大,孔隙壁欠光滑,孔隙直径为 80~760 μm,孔隙率在 67%以上,孔隙之间相互连通,形成三维立体网架结构。

2.4 生物力学测定 随着压缩力的增大,人脱细胞半月板的压缩率也相应增加。在变形 10%时,可以完全瞬时恢复。随着形变率的增大,瞬时形变恢复率下降。在发生 30%形变的情况下,其形变也可以完全恢复,最大形变恢复率为 100%(表 1)。

3 讨论

兔脱细胞半月板一种理想的半月板组织工程的支架载体^[5]。人脱细胞半月板与兔脱细胞半月板相比,其来源于人同种半月板,与被修复的人半月板具有最相近的组织结构,是修复人半月板损伤的理想材料。但人半月板体积更大,细胞数量更多。如对人半月板进行脱细胞操作,那么脱细胞试剂需要穿透的距离更远且作用的细胞更多,脱除细胞更为困难。笔者在以往研究的基础上^[5],通过改进脱细胞方法,

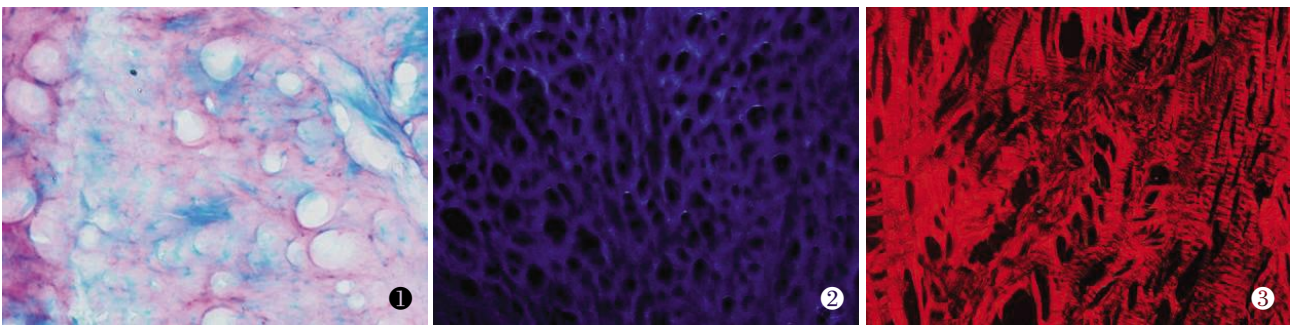


图 1 AB 染色未见细胞残留(×200) 图 2 Hoechst-33258 染色见无细胞残留(×400) 图 3 天狼星红染色呈阳性(×400)
Fig.1 Alcain blue stain showed no cell components remain(×200) Fig.2 Hoechst-33258 stain showed no cell components remain(×400)
Fig.3 The specimens stained positively by staining with sirius red (×400)

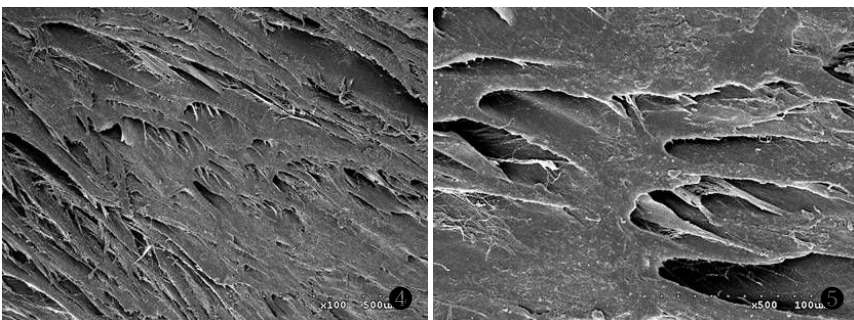


图 4 电镜下人脱细胞半月板表面有多个陷窝(×500) 图 5 电镜下人脱细胞半月板内部有大量陷窝(×100)
Fig.4 Many lacuna on the surface of the specimens by scanning electron(×500)
Fig.5 Many lacuna in the specimens by scanning electron microscope (×100)

表 1 人脱细胞半月板不同程度形变时的最大强度、瞬时形变恢复率和最大形变恢复率

Tab.1 The maximal intensity, the transient recovery rate of deformation and the maximal recovery rate of deformation of the human meniscus acellular matrix

形变发生率 (%)	瞬时形变恢复率 (%)	最大形变恢复率 (%)	最大强度 (N)
10	100.00	100.00	0.87±0.10
20	93.65±0.64	100.00	1.20±0.10
30	89.62±1.04	100.00	3.04±0.13

结果成功制备了人脱细胞半月板。

虽然半月板免疫原性相对较弱,但是人半月板内软骨细胞含有大量的抗原。脱除人半月板内的细胞将进一步减少免疫原性,从而减少使免疫排斥反应的发生,更有利于半月板的修复。但其移植到人体后的免疫过程还有待进一步研究。

有学者^[6]认为半月板组织工程的一个重要挑战是能否产生足够的细胞外基质,以恢复半月板内部框架结构,满足力学要求。本课题应用去污剂 Triton X-100 和脱氧胆酸钠,这些可以减少半月板胶原结构的破坏,使半月板脱细胞基质作为支架材料保有最接近天然半月板的优势。脱氧胆酸钠是胆盐中非常重要的一种,Almgen^[7]证明脱氧胆酸钠能使细胞膜稳定性下降,流动性增高,降低膜结构的有序性。使用脱氧胆酸钠后脱细胞将更为彻底。本课题采用新鲜人半月板进行脱细胞处理,不仅能彻底脱除细胞成分,而且保留了细胞外基质成分,保留了人半月板三维立体结构,又具有良好的生物力学性能。另外,扫描电镜显示人脱细胞半月板表面和内部不规则分布大量陷窝,可为宿主细胞附着提供良好基础。

总之,人脱细胞半月板具有了理想支架材料应

具有的一些特性:①呈三维立体结构,具有疏松的网状结构,有利于细胞的附着、增生;②具有良好的生物相容性;③具有一定的生物力学性能,其可作为半月板组织工程的支架载体。

参考文献

- [1] Ding C, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Meniscal tear as an osteoarthritis risk factor in a largely non-osteoarthritic cohort: a cross-sectional study[J]. J Rheumatol, 2007, 34(4): 776-784.
- [2] 卫小春. 膝关节损伤的诊断与治疗[J]. 中国骨伤, 2010, 23(6): 403-405.
Wei XC. Diagnosis and therapy of knee injuries[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(6): 403-405. Chinese.
- [3] 邵林, 魏劲松, 王新亮, 等. 脱细胞基质同种异体半月板移植的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(14): 1074-1076.
Shao L, Wei JS, Wang XL, et al. Experimental study on allograft transplantation of acellular matrix of meniscus[J]. Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi, 2004, 12(14): 1074-1076. Chinese.
- [4] Mackay DR, Elgort SW, Ullman KS. The nucleoporin Nup153 has separable roles in both early mitotic progression and the resolution of mitosis[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(6): 1652-1660.
- [5] 周预, 刘玉杰, 黄靖香, 等. 兔半月板脱细胞基质的制备[J]. 中国医学科学院学报, 2011, 33(1): 62-65.
Zhou Y, Liu YJ, Huang JX, et al. Development of rabbit meniscus acellular matrix[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2011, 33(1): 62-65. Chinese.
- [6] 何蔚, 刘明, 青祖宏, 等. 结缔组织生长因子促进半月板无血管区损伤愈合[J]. 中国骨伤, 2013, 26(8): 681-688.
He W, Liu M, Qing ZH, et al. Enhancement of meniscal tearing damage repairing in the avascular zone using connective tissue growth factor(CT-GF) in the rabbit model[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(8): 681-688. Chinese with abstract in English.
- [7] Almgen M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1508(1-2): 146-163.

(收稿日期: 2013-11-20 本文编辑: 王玉蔓)

·读者·作者·编者·

本刊关于“通讯作者”有关事宜的声明

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通讯作者的稿件,与该稿件相关的一切事宜均与通讯作者联系。如文内未注明通讯作者的文章,按国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明!

《中国骨伤》杂志社