

# 眼部脱细胞修复材料的制备与鉴定

聂丹瑶<sup>1</sup>, 陈家祺<sup>2</sup>

基金项目: 中国卫生部临床学科重点资助项目(No. 2004-468); 中国国家自然科学基金资助项目(No. 30271388)

作者单位:<sup>1</sup>(518040) 中国广东省深圳市眼科医院角膜及眼表疾病科;<sup>2</sup>(510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心  
作者简介: 聂丹瑶, 毕业于中山大学中山眼科中心, 博士, 主治医师, 研究方向: 角膜及眼表疾病。

通讯作者: 陈家祺, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜及眼表疾病. gdeyeb@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2012-02-01 修回日期: 2012-02-22

## Changing duramater and sclera into acellular tissue matrix

Dan-Yao Nie<sup>1</sup>, Jia-Qi Chen<sup>2</sup>

**Foundation items:** Clinical Disciplines Key Projects of Ministry of Health, China (No. 2004-468); National Natural Science Foundation, China (No. 30271388)

<sup>1</sup>Department of Corneal and Ocular Surface Disease, Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Jia-Qi Chen. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. gdeyeb@mail.sysu.edu.cn

Received: 2012-02-01 Accepted: 2012-02-22

### Abstract

• **AIM:** To find best methods to prepare acellular dura and sclera, and compare the effects of different methods including processes, concentrations and time.

• **METHODS:** The duramater and sclera which came from 8 New Zealand rabbits were divided into 8 groups. Each group had dura and sclera. 5, 10, 20, and 50mL/L Triton X-100 were used in 4 groups. Other 4 groups were treated with 2.5g/L trypsin and 1g/L SDS, and the treated time was 12h + 12h, 12h + 24h, 24h + 12h and 24h + 24h. After these procedures, the appearances of those tissues were observed, residual cell number was counted after HE staining, and electron microscope was used to observe the ultrastructures of dura and sclera.

• **RESULTS:** The appearances of acellular tissues treated by Triton X-100 had no obvious differences with tissues that hadn't been treated. Two groups treated by 20mL/L and 50mL/L Triton X-100 and three groups treated by 2.5g/L trypsin and 1g/L SDS with treated time  $\geq 36$  hours had the least residual cells. After acellular procedures, dura and sclera had the same ultrastructure as pretreatment in electron microscope.

• **CONCLUSION:** The collagen fibres of dura and sclera

treated by Triton X-100 were well conserved. The residual cells are less in tissues treated by 20mL/L Triton X-100. 20mL/L Triton X-100 is fit for treating dura and sclera.

• **KEYWORDS:** acellular tissue matrix; acellular sclera; acellular dura

Nie DY, Chen JQ. Changing duramater and sclera into acellular tissue matrix. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(4):612-614

### 摘要

**目的:** 以不同方法制备脱细胞硬脑膜和巩膜, 比较不同方法、浓度、作用时间对硬脑膜和巩膜脱细胞效果的差异, 找到适合硬脑膜和巩膜的脱细胞方法。

**方法:** 将取自 8 只新西兰大白兔的硬脑膜和巩膜组织剪成小块, 每种组织块均分为 8 组, 每组含有硬脑膜和巩膜两种组织, 4 组用以 5, 10, 20, 50mL/L Triton X-100 为主, 辅以 DNase、RNase 的方法处理, 另外 4 组用 2.5g/L 胰蛋白酶和 1g/L SDS 分别处理 12h + 12h, 12h + 24h, 24h + 12h, 24h + 24h。完成后分别从大体观察 8 组的外观, HE 染色比较脱细胞后的细胞残留数, 透射电镜观察胶原纤维的超微结构。

**结果:** 以 Triton X-100 处理后的组织外观与处理前相似, 2.5g/L 胰蛋白酶处理后的组织肿胀增厚。20, 50mL/L Triton X-100 两组和 2.5g/L 胰蛋白酶 + 1g/L SDS 处理时间  $\geq 36$ h 的三组组织内的细胞残留平均数都小于 2 个/高倍镜视野。电镜结果证实, 硬脑膜和巩膜经过脱细胞处理后, 胶原纤维结构同处理前相同, 未受到破坏。

**结论:** 以 Triton X-100 处理的硬脑膜和巩膜结构紧凑, 胶原纤维保存完好, 其中 20mL/L Triton X-100 浓度处理过的组织残留细胞少, 处理前后外观改变少, 是适合硬脑膜和巩膜进行脱细胞处理的方法。

**关键词:** 脱细胞组织基质; 脱细胞巩膜; 脱细胞硬脑膜

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.04.04

聂丹瑶, 陈家祺. 眼部脱细胞修复材料的制备与鉴定. 国际眼科杂志 2012;12(4):612-614

### 0 引言

随着社会工业化程度的不断提高, 眼部的各种外伤, 尤其是酸碱化学伤、热烧伤和机械伤所引起的眼睑、角结膜、巩膜创伤日渐增多, 角结膜的损伤可以通过角膜移植、羊膜移植和口唇黏膜移植来修复, 而眼睑及巩膜的创伤通常需要组织工程学作为组织替代物来填补或加固缺损的部分<sup>[1,2]</sup>。同种异体组织如异体巩膜、异体硬脑膜等是临床常用的修复组织, 但因移植物与机体的组织抗原性不同, 异体组织植入后几乎不可避免会发生免疫排斥反应, 同时局部炎症反应强, 材料易被降解吸收<sup>[3]</sup>。因此, 经脱细胞处理后的异体组织成为既能够保留所需组织形态, 又

能够降低抗原性的理想材料。目前对组织进行脱细胞处理的方法主要有两种<sup>[4,5]</sup>,分别是 Triton X-100 为主,辅以 DNA 酶、RNA 酶的方法和胰蛋白酶-SDS 方法。对于不同组织,各个方法都没有统一的作用浓度和时间,因而,需要通过实验确定不同的方法对硬脑膜和巩膜进行脱细胞处理的效果,检测其对组织性状的变化,从而找到既能除去细胞,又能最大限度保留其物理性状的方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年雄性新西兰大白兔 8 只,体质量约 2kg,由中山大学动物实验中心提供。于耳缘静脉注射空气 20mL 处死。取出硬脑膜及巩膜,剪成 10mm × 3mm 大小的组织块置于含庆大霉素和链霉素溶液中备用<sup>[6]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 Triton X-100 方法** 将剪切好的兔巩膜和硬脑膜置于 0.05mol/L pH = 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液中,振荡,4℃ 条件下处理 24h。随后将巩膜和硬脑膜从上述缓冲液中取出,分别置于浓度为 5, 10, 20, 50mL/L Triton X-100 溶液中,4℃ 条件下振荡 24h。随后浸入 Hank's 液中洗涤 15min × 3 次。再将其依次放于 200μg/mL DNase I 和 20μg/mL Rnase A 溶液中,于 37℃ 条件下分别振荡 1h。随后再分别置于浓度为 5, 10, 20, 50mL/L Triton X-100 溶液中,4℃ 条件下处理 24h。处理完成后用 Hank's 液洗涤 48h。浸入含有 PBS 的无菌管中备用<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 胰蛋白酶-SDS 方法** 将兔硬脑膜和巩膜分为 4 组,分别于 2.5g/L 胰蛋白酶溶液中在 37℃ 振荡 12 或 24h,随后经 PBS 洗 15min × 3 次,将组织置于 1g/L SDS 溶液中于 37℃ 振荡 12 或 24h, PBS 洗 15min × 3 次,4℃ 保存备用。

**1.2.3 组织交联** 将脱细胞处理后的硬脑膜和巩膜取出,无菌滤纸吸干水份后浸入 0.5g/L Genipin(京尼平)溶液,于常温下振荡处理 72h,随后将组织于 200, 400, 500, 750mL/L 乙醇中梯度各处理 1h, 4h 后于含抗生素的生理盐水中漂洗 24h 备用<sup>[8,9]</sup>。

**1.2.4 不同脱细胞方法处理后的观察** 将脱细胞后的巩膜及硬脑膜进行石蜡包埋和 HE 染色,对不同组间的细胞残留情况进行对比,取高倍镜视野下的细胞数进行比较;将不同组的脱细胞巩膜和硬脑膜进行透射电镜观察,观察其胶原纤维排列情况。

## 2 结果

**2.1 大体观察结果** Triton X-100 方法处理后的组织厚度略有增加,不同浓度组间没有明显差别;胰蛋白酶-SDS 方法处理后组织肿胀明显,纤维粗大疏松,厚度增加明显,可以达到原来组织厚度的 5 ~ 10 倍,不同处理时间组间没有明显差异。

**2.2 光镜下细胞计数结果** 不同方法对硬脑膜和巩膜的细胞脱去效率略有差异,以高倍镜下(×400)在每个样本中随机选取 10 个视野,记录每个视野中残留的细胞数作为标准,发现 5 和 10mL/L Triton X-100 的组织内残留细胞较多,巩膜平均为 3.1 和 1.1,硬脑膜平均为 9.3 和 2.7。胰蛋白酶-SDS 方法处理时间总量低于 36h 组平均残留数为 2.3 和 2.5 个,其余组的残留平均细胞数均小于 2 个/高倍镜视野,但是胰蛋白酶处理后光镜下见纤维结构较为疏松,每一束纤维亦膨胀变粗。而用浓度 > 20mL/L Triton X-100 处理后,残留的细胞数量少,胶原纤维也较为致密,对组织的结构改变相对较小(图 1)。

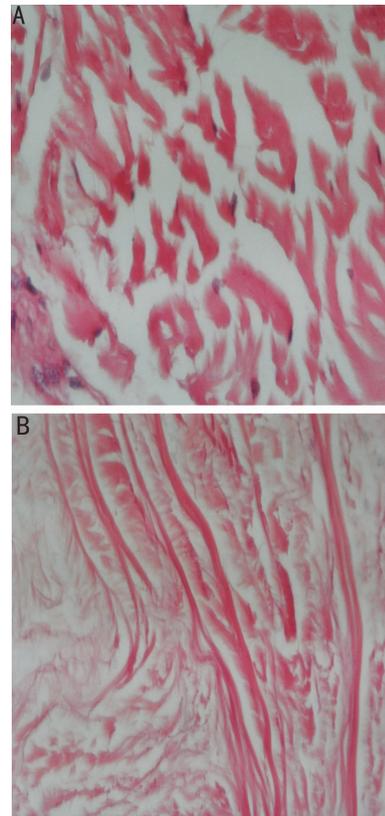


图 1 兔异体硬脑膜 HE 染色(×400) A:脱细胞前;B:20mL/L Triton X-100 脱细胞后。

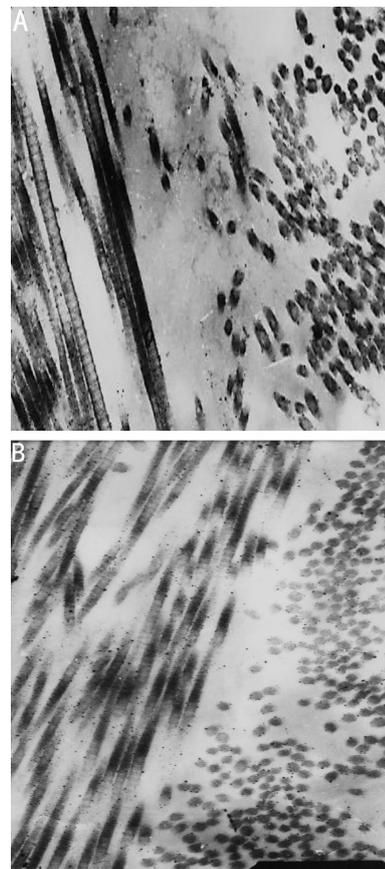


图 2 兔异体硬脑膜电镜观(×17000) A:脱细胞前;B:脱细胞后。

**2.3 电镜下胶原纤维变化** Triton X-100 方法和胰蛋白酶-SDS 方法处理后的组织胶原纤维的形态未见改变,不同浓度及时间组处理后胶原纤维形态亦未见差别(图 2)。

### 3 讨论

目前文献中对于异体组织进行脱细胞处理时常用的方法主要有两种:Triton X-100方法(化学去垢剂法)和胰蛋白酶-SDS方法(生物学酶消化法),但对于具体的浓度和作用时间,并没有统一的标准<sup>[5]</sup>。我们参考文献,将每个方法按照常用的浓度和作用时间各分为4组,分别处理硬脑膜和巩膜,并进行分组观察,结果发现:胰蛋白酶-SDS处理后的组织肿胀明显,厚度增至原来的5~10倍,韧性及弹性均显著下降,胶原纤维排列疏松,而Triton X-100处理后组织的物理性状得到了较为良好的保存,即厚度略有增加,韧性和弹性及胶原纤维的致密性均和处理前类似,因而从大体观察,Triton X-100方法比较适合对硬脑膜和巩膜进行脱细胞处理。

脱细胞后残留的细胞数越少,则引起排斥反应的几率就越小。由于同一张切片不同视野中残留的细胞数亦不同,故随机取10个高倍镜视野,计数后取平均值进行比较,将平均值低于2个/高倍镜视野作为脱细胞处理成功标准,比较不同方法的脱细胞效果发现20和50mL/L Triton X-100处理组和胰蛋白酶-SDS作用时间大于36h组残留的细胞数均能够小于2个/高倍视野。因此可以认为,Triton X-100方法中浓度 $\geq 20$ mL/L组和胰蛋白酶-SDS方法中作用时间 $\geq 36$ h组脱除细胞的效果较好。而电镜检查的结果显示:脱细胞处理时所用的试剂并没有影响到胶原纤维的形态结构,无论是硬脑膜还是巩膜,脱细胞前后的胶原纤维结构均得到了良好的保存。

因此,综合大体观察以及光镜和电镜下的比较,20mL/L Triton X-100为主,辅以DNA酶、RNA酶的方法较为适合对硬脑膜和巩膜进行脱细胞处理。Triton X-100是一种非离子型表面活性剂,在免疫组织化学、病毒及细菌的蛋白提取方面均有广泛应用,其脱细胞的作用机制是通过其上的亲水基团与细胞膜及细胞器表面膜结构的蛋白质结合,并且清除磷脂类核物质,使细胞成分溶于Triton X-100溶液,从而达到清除细胞和细胞器的目的。浓度 $\geq 2\%$ 的Triton X-100脱除细胞的效果比较彻底,原因可能在于20mL/L Triton X-100的活性位点与细胞上受体的结合到

达平衡的缘故,所以即使增加Triton X-100的浓度,脱细胞的效果仍然与20 mL/L Triton X-100的效果近似。

为了进一步增加组织的机械强度,本实验用0.5g/L genipin对脱细胞后的组织进行交联,使胶原分子之间通过共价键结合,在减少抗原性的同时提高机械强度和抗降解能力。Genipin是传统中药杜仲的活性成分,在食品工业中常用做食物添加剂,作为一种天然的交联剂,其细胞毒性较常用的戊二醛小10000倍,对细胞增殖能力的促进却是戊二醛的5000倍<sup>[9]</sup>。因为genipin可以与多肽反应,形成蓝色无毒复合物,故交联后的组织呈淡蓝色。交联使得胶原纤维以共价键相结合,从而令脱细胞组织更加坚韧,强度更大。

#### 参考文献

- 1 陈家祺,顾建军,彭鸿钧,等.应用同种异体脱细胞真皮的眼睑原位重建术.中华眼科杂志 2005;41(5):409-413
- 2 陈家祺.眼表疾病与眼表重建.眼科 2002;11(2):68-74
- 3 Warren WL, Medary MB, Dureza CD, et al. Dural repair using acellular human dermis: experience with 200 cases; technique assessment. *Neurosurgery* 2000;46(6):1391-1396
- 4 Armour AD, Fish JS, Woodhouse KA, et al. A comparison of human and porcine acellularized dermis; interactions with human fibroblasts *in vitro*. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(3):845-856
- 5 Robert JW, Takayoshi M, Hernan MR, et al. Characterization of acellular dermal matrices prepared by two different methods. *Burns* 1998;24(2):104-113
- 6 Chen JQ, Wang Z, Gu JJ. Eyelid reconstruction with acellular human dermal allograft after chemical and thermal burns. *Burns* 2006;32(2):208-211
- 7 Bhrany AD, Beckstead BL, Lang TC, et al. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue Eng* 2006;12(2):319-330
- 8 Liang HC, Chang Y, Hsu CK, et al. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials* 2004;25(17):3541-3552
- 9 Chang Y, Tsai CC, Liang HC, et al. *In vivo* evaluation of cellular and acellular bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Biomaterials* 2002;23(12):2447-2457