

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.008

三种猪源性细胞外基质体内降解规律的实验研究*

姜岩¹ 张剑² 王强^{1△}

(1 第二军医大学附属长征医院闸北分院(上海市闸北区中心医院) 上海 200072; 2 第二军医大学附属长征医院普外一科 上海 200003)

摘要 目的: 研究本实验以小鼠腹壁缺损为模型,通过对三种猪源性细胞外基质(ECM)—猪脱细胞小肠粘膜下层(P-SIS)、猪脱细胞心包(P-PC)以及猪脱细胞真皮(P-ADM),进行体内弹性纤维和葡糖氨基聚糖类(GAGs)的含量测定,然后通过三组材料中弹性纤维和 GAGs 在术后第 4 周、第 8 周时再生或降解的数量,来对比研究三种生物材料植入体内后的降解规律,从而为寻找性能优良的生物补片提供理论依据,为生物补片的临床应用以及避免术后并发症方面提供指导方向。**方法:** BALB/c 小鼠 60 只,体重 18~20 g,手术造成 1 cm×1 cm 的腹壁全层缺损,随机分为 3 组(n=20),分别以等面积的 P-ADM、P-PC 以及 P-SIS 进行修复,于术后 4 周、8 周进行取材评估。**结果:** 术后 P-SIS 组的腹腔内粘连评分均低于同时期内的其余两组。术后 4、8 周比较:P-ADM 组, GAGs 含量减少(P<0.01);P-PC 组,弹性纤维(P<0.01)、GAGs(P<0.05)含量均有所增加;P-SIS 组,弹性纤维(P<0.001)、GAGs(P<0.05)含量均增加。**结论:** P-SIS 材料中,弹性纤维和 GAGs 的再生状况优于其他两组,且 P-SIS 材料不易引起腹腔内粘连,故 P-SIS 能够更好的应用于组织缺损的治疗,P-SIS 在组织工程学领域相对而言是更加理想的修复材料。

关键词: 细胞外基质;降解;弹性纤维;葡糖氨基聚糖类

中图分类号: Q95-3, R318 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)23-4430-04

An in Vivo Study of the Degradative Regularity about Three Porcine-derived Extracellular Matrix.*

JIANG Yan¹, ZHANG Jian², WANG Qiang^{1△}

(1 Zhabei District Central Hospital, Zhabei Branch Hospital, Shanghai Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200072, China; 2 Department of General Surgery, Shanghai Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of this study is to research the degradative regularity about three porcine-derived extracellular matrix (ECM): small intestine submucosa (P-SIS), pericardium (P-PC) and acellular dermal matrix (P-ADM), by quantitating the change of elastin, glycosaminoglycans (GAGs) in mouse model at 4 weeks and 8 weeks after surgery. Therefore, our study can provide the theory for searching an excellent biological mesh, and point the way for clinical application and avoiding postoperative complications of biological mesh. **Methods:** 60 BALB/c mouse, weighting 18~20 g, Abdominal wall defects (1 cm × 1 cm) were created by surgery and were repaired with the same area of P-SIS, P-ADM and P-PC, randomly divided into three groups (n=20). The animals were sacrificed at 4 and 8 weeks after surgery. **Results:** The scores of abdominal adhesion in P-SIS group were lower than in the other two groups. In comparison between 4 weeks and 8 weeks after surgery, GAGs in P-ADM groups were decreased (P<0.01); elastin (P<0.01), GAGs (P<0.05) in P-PC groups were increased; elastin (P<0.001), GAGs (P<0.05) in P-SIS groups were all increased. **Conclusion:** The regeneration of elastin and GAGs in P-SIS groups was better than in the other two groups, and P-SIS was good for anti-adhesion, relatively, so P-SIS could be applied in the treatment of tissue defect preferably, and it was an ideal material for tissue engineering application.

Key words: ECM; Degradation; Elastin; GAGs

Chinese Library Classification: Q95-3, R318 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4430-04

前言

细胞外基质(ECM)是一类性质优良的生物衍生材料,因其具有低抗原性、良好的生物相容性、可细胞化及血管化、降解时

间可根据需要进行调节等优势,而被广泛应用于再生医学领域,用于治疗多种临床疾病,已获得较好的临床效果^[1-4],在美国每年有约 25 万患者接受 ECM 的手术治疗,临床上常常需要根据不同的缺损部位选择不同的补片,以维持相应的张力和外

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170338);全军医药卫生基金科技攻关项目(08G070);

军队临床高新技术重大专项(2010gxjs060);上海市自然科学基金项目(12ZR1449800)

作者简介:姜岩,男,硕士研究生, E-mail:jiangyan117@126.com

△ 通讯作者:王强,电话:021-56628584, E-mail:wang2929@hotmail.com

(收稿日期:2013-09-13 接受日期:2013-10-29)

形。ECM 的成份主要是蛋白质,包括形成三维网状支架结构的胶原纤维、弹性纤维以及糖蛋白、粘蛋白等,其它成份有 GAGs 和一些脂质,部分材料还含有生长因子,这些成份含量和特性相对稳定,但随着材料植入体内后的降解和组织重塑,便迅速发生改变^[5-9],因此,为了探讨 ECM 作为组织缺损替代材料的降解规律,我们利用 P-ADM、P-PC 及 P-SIS 三种常用材料,凭借特殊染色技术,检测 ECM 植入体内后不同时期弹性纤维、GAGs 的含量变化,对 ECM 体内降解规律进行探索,为寻求控制降解的方法提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

1.1.1 实验动物 BALB/c 小鼠 60 只,体重 18~20 g,雌雄各半,由第二军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验试剂 0.1% 过氧乙酸,十二烷基硫酸钠(SDS)溶液,PBS 溶液等。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 生物腹壁修复材料的制备 先采用物理方法剔除原始材料附带的筋膜、脂肪、上皮等组织,后应用 Abraham 法^[9]制备 ECM-P-ADM、P-PC 及 P-SIS,经 PBS 溶液多次冲洗后,利用过氧乙酸、 γ 射线照射消毒,后经冻干处理,保存于无菌袋中。

1.2.2 动物手术 动物单笼喂养,常规麻醉消毒处理后,沿腹正中切开皮肤全层、肌层及腹膜层,建立小鼠腹壁全层缺损模型,缺损处大小为 1 cm $\times$ 1 cm,随机分为 3 组(n=20),分别以同样大小的 P-ADM、P-PC 以及 P-SIS 进行修复,彻底止血后关闭腹腔,于术后 4 周、8 周进行取材评估。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 术后一般情况 记录修复区基本形态变化、观察有无感染、皮下水肿形成及疝等发生。

1.2.3.2 腹腔内粘连评分 根据文献报道的方法对补片修复后腹腔内粘连情况进行评分^[10]。

1.2.3.3 材料植入后组织病理学评估 完整切除修复区组织,以 10% 的中性福尔马林溶液固定,石蜡包埋,切片厚度为 5 微米,针对弹性纤维和 GAGs 两种成份的检测则分别进行 VVG (Verhoeff Van Gieson) 染色及阿尔辛蓝(Alcian Blue)染色,需定量的图片采用 IMS 图象分析系统(IHC-Image analysis steps)进行分析处理,计算阳性表达的区域大小。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行处理数据,实验数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,两组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

动物手术过程中,死亡 1 条,考虑为麻醉药吸收慢,效果不好,后又追加麻醉,麻醉过量所致。其余小鼠复苏后即可自由活动,食欲、精神如常。术后 10 日,切口对位、愈合良好,切口周围皮肤无明显红肿及炎症反应,无皮肤裂开,无脓肿、脓液或皮下水肿形成;至术后 8 周时,动物无死亡,进食、体重、精神状态、活动情况无异常,手术区恢复良好,无感染、瘘及膨出等并发症。

2.2 腹腔内粘连评分

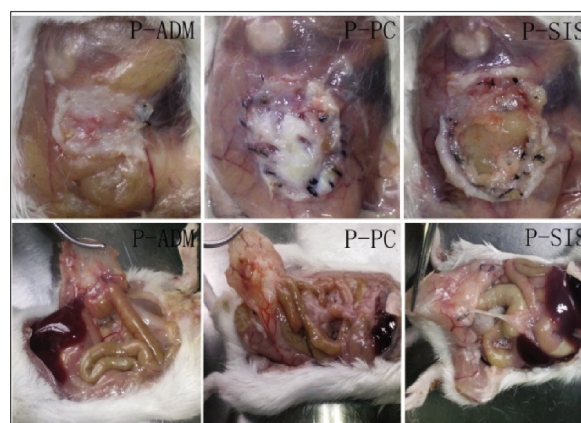


图 1 分别以 P-ADM、P-PC 和 P-SIS 修复小鼠腹壁缺损,术后 8 周代表图片

Fig. 1 Abdominal wall defects were repaired with P-ADM, P-PC and P-SIS, 8 weeks after surgery

如图 1 所示,观察每只小鼠手术区域的变化,根据以下评分标准:0.无粘连;1.稀疏较薄的粘连;2.明确的局部粘连;3.明确的多发内脏粘连;4.腹腔广泛的致密粘连;进行统计分析,统计结果显示(表 1),P-SIS 组粘连得分明显低于其他两组,结果有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 腹腔内粘连评分($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Evaluation of abdominal adhesion($\bar{x} \pm s$)

Group	P-ADM	P-PC	P-SIS
4 weeks	1.40 $\pm$ 1.07 ^a	0.80 $\pm$ 0.79	0.40 $\pm$ 0.52 ^b
8 weeks	2.20 $\pm$ 1.40 ^c	1.40 $\pm$ 0.84	0.80 $\pm$ 0.42 ^d

Note: ^b compared with ^d, ^a compared with ^b $P<0.05$; ^c compared with ^d $P<0.001$.

2.3 材料植入后组织病理学评估

2.3.1 弹性纤维含量测定 术后 4 周,三组材料中弹性纤维均表现为点状或片状分布,分布区域无明显差异(图 2)。P-PC 组和 P-SIS 组中弹性纤维含量远高于 P-ADM 组($P<0.001$),P-PC 组略高于 P-SIS 组($P<0.05$)。术后 8 周,P-ADM 组和 P-SIS 组中的弹性纤维成份随材料在体内的降解,分布发生变化,脂肪组织聚集处检测不到弹性纤维的存在,P-PC 组中弹性纤维主要集中在材料的中央区域,两侧边缘处略少,故 P-ADM 组和 P-SIS 组中弹性纤维的含量远小于 P-PC 组($P<0.001$),P-ADM 组含量大于 P-SIS 组(无统计学意义);与术后 4 周比较,P-ADM 组和 P-SIS 组中弹性纤维含量有所减少,其中 P-ADM 组无统计学意义、P-SIS 组 $P<0.001$,P-PC 组中弹性纤维的总体含量和 4 周时比较略有增加($P<0.01$)。就三种材料中弹性纤维的变化趋势来讲,P-SIS 组弹性纤维含量变化较为明显,P-ADM 组和 P-PC 组变化幅度不显著(图 2、表 2)。

2.3.2 GAGs 含量测定 术后 4 周,三组材料中 GAGs 都均匀分布于细胞质内,分布区域无明显差异(图 3)。P-ADM 组和 P-SIS 组中 GAGs 含量远高于 P-PC 组($P<0.001$),P-ADM 组含

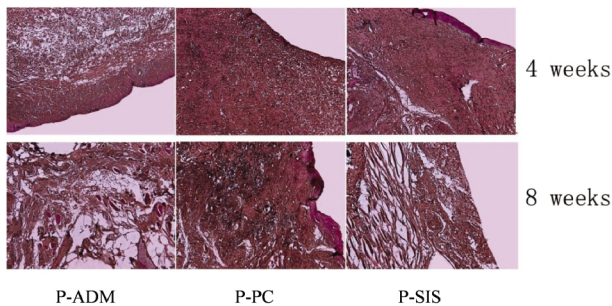


图2 三种材料的组织学检测,VVG染色法,黑染的结构为弹性纤维(40×)

Fig. 2 Histological examination of three ECM, Verhoeff Van Gieson, elastin stained black (40×)

表2 弹性纤维含量的检测(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Evaluation of elastin (%, $\bar{x} \pm s$)

Group	P-ADM	P-PC	P-SIS
4 weeks	3.11± 0.25 ^a	4.93± 0.13 ^b	4.63± 0.14 ^c
8 weeks	2.44± 0.26 ^d	5.37± 0.15 ^e	2.25± 0.09 ^f

Note: ^a compared with ^b, ^b compared with ^c, ^c compared with ^d, ^d compared with ^e, ^e compared with ^f, ^f compared with ^a P<0.001; ^b compared with ^e P<0.01; ^b compared with ^c P<0.05.

量大于 P-SIS 组(无统计学意义)。术后 8 周, P-PC 组中 GAGs 含量仍低于 P-ADM 组(P<0.001)和 P-SIS 组(P<0.001), P-SIS 组中的含量高于 P-ADM 组(P<0.001)。与术后 4 周比较, 三组材料中 GAGs 的分布区域变化不大, 数量上 P-PC 组和 P-SIS 组含量有所增加(P<0.05), P-ADM 组相对减少(P<0.001), 但三种材料中 GAGs 总体变化幅度不是很大(表 3、图 3)。

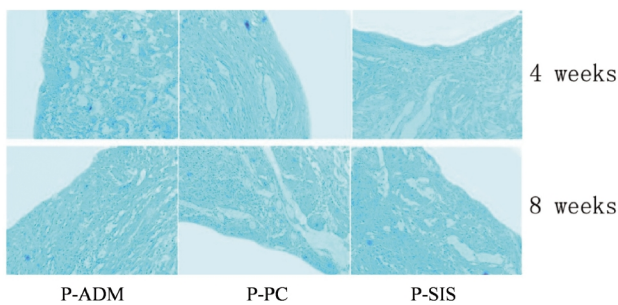


图3 三种材料的组织学检测,阿尔辛蓝染色法,蓝染的结构为弹性纤维(40×)

Fig. 3 Histological examination of three ECM, Alcian Blue, GAGs stained blue (40×)

表3 GAGs 含量的检测(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Evaluation of GAGs (%, $\bar{x} \pm s$)

Group	P-ADM	P-PC	P-SIS
4 weeks	4.80± 0.16 ^a	3.17± 0.16 ^b	4.64± 0.12 ^c
8 weeks	4.37± 0.13 ^d	3.67± 0.20 ^e	4.98± 0.12 ^f

Note: ^a compared with ^b; ^b compared with ^c; ^d compared with ^e; ^e compared with ^f; ^d compared with ^f P<0.001; ^a compared with ^d P<0.01; ^b compared with ^e; ^c compared with ^f; P<0.05.

3 讨论

ECM 在再生医学领域被广泛应用的同时, 一些难以避免的并发症也随之而来, 例如:感染、粘连、水肿、糜烂、慢性炎症, 甚至肠梗阻、肠瘘等时有发生^[11-14]。而这些并发症都是伴随着材料在体内的降解, 逐渐显露出来, 因此弄清 ECM 的降解规律对于防治并发症以及指导应用方面具有重要意义。

弹性纤维是 ECM 的重要组成成份, 在材料降解过程中发挥其独特的生物学性能以及机械性能, 研究证实, 将添加了弹性纤维成份的重组蛋白粘附于 ECM 的表面, ECM 的生物学性能和机械性能都会随之改变, 表现为材料本身硬度降低, 柔韧度增加, 抵抗张力的能力更强^[15]。本研究中, 术后 8 周三种材料都已基本完成降解, 和 4 周比较, P-SIS 组弹性纤维的含量变化较为显著, 8 周时数值降为 4 周时的 1/2, 而 P-ADM 组和 P-PC 组中弹性纤维虽有减少和增加的趋势, 但变化程度并不像 P-SIS 组那般显著; 这一结果的出现可能与 P-SIS 组中生物活性因子和弹性纤维相互作用效果有关, 弹性纤维受生物活性因子的影响越大, 其降解效率越高^[16]; 除此之外, 还可能与 ECM 内部新生的神经元细胞的分化过程有关, 有了神经的支配, ECM 的降解速度便会加快^[17]。

GAGs 是一类大量存在于 ECM 内的复合糖, 因其结构的多样性, 使它们能够与材料内部的多种生物活性因子相互作用, 从而调节修复区的生物学性能和机械性能^[18, 19]。本研究中, 术后 8 周与 4 周相比, 三种材料中 GAGs 的含量变化趋势都不十分显著, 总体表现为, P-ADM 组中 GAGs 略有减少, 而 P-PC 组和 P-SIS 组中 GAGs 稍有增加, 考虑与 GAGs 调节材料内部细胞的迁移、粘附, 诱发免疫应答反应有关, 但这一过程中 ECM 自身降解的 GAGs 和新生组织中包含的 GAGs, 形成了“此消彼长”的现象, 故至材料植入后 8 周时, GAGs 的含量变化不大^[20]; 另外, 还可能由于生长因子与 GAGs 的联合作用, 促进 ECM 内部胶原和弹性纤维的生成量增加, 从而对 ECM 的降解和组织再生起到正向调节作用, 使最终新生 GAGs 的数量弥补了降解过程的损失量^[20]。

4 结论

本文应用检测 ECM 内重要组成成份的方法, 从不同的角度较为明确地描述了 ECM 的降解规律。P-SIS 组腹腔内粘连程度低于 P-ADM 组和 P-PC 组, 而且 P-SIS 组中弹性纤维、GAGs 的再生状况也优于其他两组, 故在同样的处理条件下, P-SIS 降解效率更高, 更有利于应用于再生医学领域, 如目前临床应用较为成熟的利用 P-SIS 进行疝无张力修补, 以及血管损伤、尿道损伤等。

参考文献(References)

- [1] Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, et al. Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors [J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4513-4520
- [2] Cavallaro A, Lo Menzo E, Di Vita M, et al. Use of biological meshes for abdominal wall reconstruction in highly contaminated fields [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(15): 1928-1933
- [3] Xiao SC, Zhu SH, Li HY, et al. Repair of complex abdominal wall

- defects from high-voltage electric injury with two layers of acellular dermal matrix: a case report[J]. *J Burn Care Res*, 2009, 30(2): 352-354
- [4] Catena F, Ansaloni L, Gazzotti F, et al. Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields [J]. *Hernia*, 2007, 11(1): 57-60
- [5] Hodde J. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration[J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(2): 295-308
- [6] Hodde JP, Record RD, Liang HA, et al. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix [J]. *Endothelium*, 2001, 8(1): 11-24
- [7] Liang R, Woo SL, Takakura Y, et al. Long-term effects of porcine small intestine submucosa on the healing of medial collateral ligament: a functional tissue engineering study[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(4): 811-819
- [8] Ko R, Kazacos EA, Snyder S, et al. Tensile strength comparison of small intestinal submucosa body wall repair[J]. *J Surg Res*, 2006, 135(1):9-17
- [9] Abraham GA, Murray J, Billiar K, et al. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3): 442-452
- [10] Ersoy E, Ozturk V, Yazgan A, et al. Comparison of the two types of bioresorbable barriers to prevent intra-abdominal adhesions in rats [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13(2): 282-286
- [11] Diaz JJ Jr, Guy J, Berkes MB, et al. Acellular dermal allograft for ventral hernia repair in the compromised surgical field [J]. *Am Surg*, 2006, 72(12): 1181-1187
- [12] Robinson TN, Clarke JH, Schoen J, et al. Major mesh-related complications following hernia repair: events reported to the Food and Drug Administration [J]. *Surg Endosc*, 2005, 19(12): 1556-1560
- [13] Falagas ME, Kasiakou SK. Mesh-related infections after hernia repair surgery [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(1): 3-8
- [14] 肖毅频, 王冠宇, 王强, 等. 脱细胞小肠粘膜下层与脱细胞心包修复大鼠腹壁缺损的对比研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(8): 1443-1446
- [15] Grover CN, Cameron RE, Best SM. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012, 10: 62-74
- [16] Patel D, Menon R, Taite LJ. Self-assembly of elastin-based peptides into the ECM: the importance of integrins and the elastin binding protein in elastic fiber assembly [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(2): 432-440
- [17] Jeon WB, Park BH, Choi SK, et al. Functional enhancement of neuronal cell behaviors and differentiation by elastin-mimetic recombinant protein presenting Arg-Gly-Asp peptides [J]. *BMC Biotechnol*, 2012, 12(1): 61
- [18] Murphy CM, Matsiko A, Haugh MG, et al. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012, 11: 53-62
- [19] Aquino RS, Lee ES, Park PW. Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010, 93: 373-394
- [20] Divya P, Krishnan LK. Glycosaminoglycans restrained in a fibrin matrix improve ECM remodelling by endothelial cells grown for vascular tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3(5):377-388

(上接第 4419 页)

- Bi Zhen-hua, Guo Xiao-dong, Ren Bo, et al. Peripheral blood lymphocytes in patients with splenectomy and the study of immune function[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(06): 1100-1103
- [9] Maruoka R, Aoki N, Kido M, et al. Splenectomy prolongs the effects of corticosteroids in mouse models of autoimmune hepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(1): 209-220
- [10] Raval JS, Redner RL, Kiss JE. Plateletpheresis for post splenectomy rebound thrombocytosis in a patient with chronic immune thrombocytopenic purpura on romiplostim[J]. *J Clin Apher*, 2013, 28(4): 321-324
- [11] Murata K, Yoneda K, Shiraki K, et al. Splenectomy improves liver function in patients with liver cirrhosis [J]. *Hepato Gastroenterology*, 2008, 55(85): 1407-1411
- [12] Nakae H, Shimazu T, Miyauchi H, et al. Does splenic preservation treatment (embolization, splenorrhaphy, and partial splenectomy) improve immunologic function and long-term prognosis after splenic injury[J]. *J Trauma*, 2009, 67(3): 557-563
- [13] Iwamoto T, Terai S, Mizunaga Y, et al. Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients [J]. *J Gastroenterol*, 2012, 47(3): 300-312
- [14] Kröpil F, Schauer M, Krausch M, et al. Splenic artery switch for revascularization of the liver: a salvage procedure for inflammatory arterial hemorrhage[J]. *World J Surg*, 2013, 37(3): 591-596
- [15] Seijo S, Reverter E, Miquel R, et al. Role of hepatic vein catheterisation and transient elastography in the diagnosis of idiopathic portal hypertension[J]. *Dig Liver Dis*, 2012, 44(10): 855-860
- [16] Li X H, Du J B, Bu D F, et al. Sodium hydrosulfide alleviated pulmonary vascular structural remodeling induced by high pulmonary blood flow in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(8): 971-980
- [17] Ratti F, Cipriani F, Paganelli M, et al. Surgical approach to multifocal hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis and arteriportal shunt leading to portal hypertension and bleeding: a case report[J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 13, 10: 34
- [18] Tetsuro Sekiguchi, Takeaki Nagamine, Hitoshi Takagi, et al. Autoimmune thrombocytopenia in response to splenectomy in cirrhotic patients with accompanying hepatitis C[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 28, 12(8): 1205-1210
- [19] Tang G, Wu L, Liang W, et al. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68 (6): 1757-1764
- [20] Miniello S, Jirillo E, Cristallo G, et al. Correlations between splenectomy and allergic symptoms. Preliminary results of a study concerning IL-4 and IgE serum level[J]. *Ann Ital Chir*, 2007, 78(6): 499-502