

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.006

脱细胞腮腺基质材料制备及生物相容性实验研究^{*}

甄恩明¹ 姜刚勇¹ 刘洪伟¹ 杨兆安² 马建军¹⁽¹济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011; ²温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要 目的 探讨新西兰大白兔脱细胞腮腺基质的生物相容性。**方法** 采用冻融联合酶消化—冷冻干燥法制备的脱细胞腮腺基质材料,通过体外毒性试验、全身急性毒性及亚毒性试验等评价其生物相容性。**结果** 脱细胞腮腺基质材料具有利于腮腺细胞生长的三维网状基质胶原结构。加入浓度为50%、100%的脱细胞腮腺基质浸提液的培养液培养腮腺细胞于3、5、7d时细胞数目与对照组无显著差异($P>0.05$)。浸提液注入兔腹腔未引起急性及亚急性毒性反应,心、肝、脾、肺、肾组织学检查未见组织和细胞变性。加入脱细胞腮腺基质浸提液的兔血溶血程度为1.86%。注射浸提液的兔的升高温度的最高值均小于0.6℃,体温升高总和小于1.4℃,符合致热原试验要求。**结论** 脱细胞腮腺基质材料具有很好的生物相容性。

关键词 脱细胞腮腺基质;生物相容性;组织工程;

中图分类号:R318.08 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)02-020-05

Study on preparation and biocompatibility of acellular parotid gland stroma

ZHEN En-ming, JIANG Gang-yong, LIU Hong-wei, et al

(Jining First People's Hospital & The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To prepare acellular rabbits parotid gland stroma and evaluate its biocompatibility in vitro. **Methods** The acellular rabbits parotid gland stroma was prepared by the means of enzymatic digestion, freezing and thawing and lyophilization. The biocompatibility of the material was evaluated by acute toxicity experiment and cytotoxicity test in vitro. **Results** Acellular rabbits parotid gland stroma had the characters of possessing the native structure of the parotid gland stroma, which facilitated the growth of the seed cells. There was no significant difference between the control group cells number and the concentration of 50%, 100% respectively of acellular rabbits parotid gland stroma leaching liquid nutrient solution culture of parotid gland cells in 3d, 5d, 7d cells number ($P>0.05$). Leaching liquid injection of rabbit celiac did not induce acute and subacute toxicity, heart, liver, spleen, lung, kidney biopsy did not see the tissue and cell degeneration. Hemolysis rate of acellular rabbits parotid gland stroma was 1.86%. Injection of the leaching solution of rabbit's body temperature peak was less than 0.6℃, and the sum of the values of the temperature rise was less than 1.4℃ conformed by the requirement to pyrogen test. **Conclusion** These indicated that acellular rabbits parotid gland stroma presented good biocompatibility in vitro, which could be used as a scaffold for tissue engineering artificial salivary gland.

Key words: Acellular parotid gland stroma; Biocompatibility; Tissue engineer

目前,利用组织工程原理构建人工涎腺组织为涎腺组织再生提供新的思路。生物材料的制备是组织工程一个重要组成部分,要求种子细胞能与制备的支架材料形成三维空间复合体,并且在该复合体中支架材料具有引导细胞生长的重要作用。目前还未找到一种理想的生物支架材料用于涎腺组织工程的研究。我们已对采取冻融联合酶消化—

冷冻干燥法制备的脱细胞腮腺基质进行组织学特征的观察^[1]。本文通过体外毒性试验、全身急性毒性及亚毒性试验、细胞相容性等评价脱细胞腮腺基质的生物相容性,证明采取冻融联合酶消化—冷冻干燥法制备的脱细胞腮腺基质是良好的涎腺组织工程支架材料。

1 材料和方法

^{*} [基金项目]温州市科技局重大项目科研基金项目(Y20080090)

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康成年新西兰大白兔, 雄性, 体重 2~3kg, 提供单位(温州医科大学附属第一医院龙湾实验室), 将动物饲养于动物房, 室温(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度(50 ± 10)%, 噪音 60Db, 正常进饮食。

1.1.2 主要试剂和仪器 磷酸盐缓冲液(Gbico, 美国); 脱氧胆酸钠盐(奥博星, 中国); DNase I (MBI, 立陶宛); RNaseA (MBI, 立陶宛); DMEM/F12(1:1)(Gbico, 美国)。722 型分光光度计(天翔, 中国); 扫描电镜(HITACHI S-3000N, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 脱细胞腮腺基质材料制备 通过冻融联合酶消化—冷冻干燥法制备脱细胞腮腺基质^[1]: 无菌条件下, 取兔的新鲜腮腺, 磷酸盐缓冲液充分冲洗, 三蒸水充分漂洗, 放置于 -80°C 深低温冰箱中冷冻 1h, 在室温下解冻; 将解冻的腮腺组织放置于蒸馏水内, 在室温下浸泡 6h, 2h 换液 1 次; 将组织置于 3% 的脱氧胆酸钠盐蒸馏水溶液中(加适量 1mol/L NaOH 调节溶液 pH 值至 8~9)震荡 4h(恒温回旋振荡器内持续振荡, 25°C 100r/min); 继续蒸馏水中振荡 3h, 每小时更换液体 1 次; 放置于 1ku/ml DNase I 及 RNaseA 混合液中振荡 30min; 然后放置于蒸馏水中浸泡 3h, 每小时换液 1 次; 最后将处理后的腮腺组织放置在冷冻干燥机中冷冻干燥, ^{60}Co 照射消毒, 照射剂量 215 Gy, 消毒后放在 -80°C 冰箱保存。

1.2.2 腮腺腺细胞分离和培养 腮腺细胞的体外分离、培养和生物学特征鉴定参见 Fujita-Yoshigaki J 的文章^[2]具体操作如下: 无菌条件下取健康的新西兰大白兔(体重 2~3kg)腮腺组织。Hank's 液清洗数次, 去除包膜、脂肪、血管及结缔组织。剪碎, 胶原酶消化, 过滤, 离心, 细胞悬浮于 2ml 完全培养液: DMEM/F12(1:1), 含 10% FBS, 5g/ml 胰岛素和转铁蛋白, 10ng/ml 表皮生长因子, 100ng/ml 氢化可的松, 1% 抗生素, 细胞悬液缓慢移至另一装有 10ml 完全培养液的 15ml 离心管中液面上层。 37°C 放置 10min, 收集下层 2ml 细胞进行计数, 以 2×10^4 /ml 密度接种于 24 孔培养板, 置于 5% CO_2 , 37°C , 培养箱中进行原代培养。当原代细胞培养 3d 后进行第 1 次换液, 原代细胞继续培养至 6d 后见细胞大量生长铺满培养瓶底壁, 胰蛋白酶消化后传代培养。

1.2.3 材料浸提液的制备 依据标准: ISO10993:12(GB/T16886.12), 将脱细胞腮腺基

质材料与 DMEM/F12 培养液按照 0.2g/ml 比例将材料放入 DMEM/F12 培养液(含 10% FBS)中, 37°C 下放置 72h 来制备浸提液用于细胞毒性试验; 按 0.2g:1ml 的脱细胞腮腺基质材料与生理盐水的比例进行萃取, 条件为 37°C , 时间为 72h 用于动物体内试验。萃取液应在 2h 内使用完毕。

1.2.4 体外细胞毒性试验 取同体积的浸提液与 DMEM/F12 培养液(含 10% FBS)混合稀释成浓度 50% 的浸提液。取第 3 代生长及细胞形态良好的腮腺细胞, 以 1×10^7 /L 密度接种于 3 块 96 孔板上, 5 孔/组, 100 μl /孔, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24h, 吸出原培养液。对照组(A 组)加入新配制的 DMEM/F12(10% FBS)100 μl , 实验组分别在 96 孔板中加入浓度为 50%(B 组)和 100%(C 组)浸提液, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 分别在第 3 天、第 5 天、第 7 天取出 96 孔培养板, 将 5g/L 的 MTT 20 μl /孔加到每个孔中继续培养 4h, 然后倒出培养液, 将 DMSO 100 μl /孔加到每个孔中震荡 10min, 利用酶联免疫检测仪以 490nm 波长测 A 值。评估脱细胞基质材料的毒性通过计算相对增值率(relative growth rate, RGR)来评估: $\text{RGR} = (\text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.2.5 急性毒性试验 随机选取健康的新西兰大白兔 10 只, 体重 2~3kg, 随机分成 2 组, 5 只每组, 饲养在相同环境和条件下。实验组按照 15ml/kg 将脱细胞腮腺基质材料浸提液(按 0.2g:1ml 生理盐水的比例进行萃取, 37°C 72h 制备浸提液)注入兔的腹腔, 将等量生理盐水注入对照组兔的腹腔, 注射后 24、48、72h 分别观察兔的神志、精神、呼吸等一般状况及可能发生的不良反应。

1.2.6 亚急性毒性试验 随机选取新西兰大白兔 10 只, 体重 2~3kg, 称重, 在相同环境和条件下饲养, 并随机分成 2 组, 5 只/组。实验组将脱细胞腮腺基质材料浸提液(按 0.2g:1ml 生理盐水的比例进行萃取, 37°C 72h 制备浸提液)注入兔的腹腔, 每周 5 次, 对照组将等量生理盐水注入兔的腹腔, 1 个月后称重后取心、肝、肺、肾组织做病理学检查。

1.2.7 溶血试验 将 2% 草酸钾添加到新鲜采集兔血液 40ml 中制成抗凝兔血, 然后取新鲜抗凝兔血 10ml 与 0.9% NaCl 10ml 混合稀释。脱细胞腮腺基质材料浸提液(按 0.2g:1ml 生理盐水的比例进行萃取, 37°C 72h 制备浸提液)10ml/管的为实验组, 蒸馏水 10ml/管作为阳性对照组及生理盐

水组 10ml/管作为阴性对照组,放入 37℃ 水浴温箱 1h 后在上述 3 组中分别加入抗凝兔血 0.2ml,每组 10 管,用 722 型分光光度计于 545nm 处检测 A 值(取平均值),计算溶血程度(用%表示):溶血程度=(实验组 A 值-阴性对照组 A 值)/(阳性对照组 A 值-阴性对照组 A 值)×100%。口腔生物材料对溶血试验的要求为溶血程度<5%。

1.2.8 热原试验 随机选择至少 3 周内未使用过脱细胞腮腺基质材料浸提液的新西兰大白兔 3 只,体重 2~3kg,在预测体温前 7 日用同一饲料饲养,在此期间,体重不减轻,精神、食欲、排泄等无异常现象,每隔 30min 测量体温 1 次,共测量 8 次,每次体温均在 38.0~39.6℃ 的范围内,且最高与最低体温相差不超过 0.4℃,供热原检查用。试验用试管采用干热灭菌法置烘箱中用 250℃ 加热 30min 去除热原。取置于 38℃ 恒温水浴箱加热 1h 的脱细胞腮腺基质生理盐水浸提液(按 0.2g:1ml 生理盐水的比例进行萃取,37℃ 72h 制备浸提液)缓慢注入处于安静状态下兔的耳缘静脉,剂量为 10ml/kg,30min 测量兔体温 1 次,共测量 6 次,取

6 次体温中最高的一次减去正常体温,为该兔体温的升高温度。以升高 0.6℃ 以内且 3 只兔体温升高总和小于 1.4℃ 为正常(当家兔体温升高为负值时,均以 0℃ 计)。

1.2.9 扫描电镜观察 取接种腮腺细胞与脱细胞腮腺基质材料复合培养 7d 后,固定于 25g/L 戊二醛溶液中,0.1mol/L 磷酸缓冲液反复冲洗,然后用 10g/L 锇酸固定,按照 50%→70%→95%→无水乙醇→绝对乙醇的顺序进行乙醇梯度脱水,液态 CO₂ 临界点干燥,离子喷镀机镀膜,在扫描电镜下观察超微结构并照相。

1.3 统计学方法

采用 spss19.0 统计分析软件进行统计分析。

2 结果

2.1 体外细胞毒性试验

体外细胞毒性试验结果见表 1。结果显示 3、5、7d 的 B、C 组与 A 组比较,差异均无统计学意义(P>0.05),表明脱细胞腮腺基质材料对兔腮腺细胞增值无明显抑制。

表 1 体外细胞毒性试验结果

组别	3d A 值		5d A 值		7d A 值	
	$\bar{x} \pm s$	RGR	$\bar{x} \pm s$	RGR	$\bar{x} \pm s$	RGR
A 组	0.130±0.0059	1.000	0.252±0.0029	1.000	0.390±0.0118	1.000
B 组	0.134±0.0046	1.031	0.268±0.0123	1.063	0.402±0.0252	1.031
C 组	0.132±0.0038	1.015	0.262±0.0218	1.040	0.399±0.0114	1.023
F 值	0.85		1.54		0.65	
P	>0.05		>0.05		>0.05	

2.2 急性毒性试验

分别于 24、48、72h 观察实验组与对照组兔,可见所有兔子神志清,精神可,活动无异常,食欲正常,无呼吸加速及呼吸困难出现,大小便正常,未出现腹部刺激症状及死亡现象。

2.3 亚急性毒性试验

实验组兔喂养 1 个月,一般情况良好,精神状态可,食欲正常,大小便正常,体重均有增加,心、肝、脾、肺、肾组织学检查未见组织和细胞变性。

2.4 溶血试验

实验组与阴性对照组均无明显溶血现象,阳性对照组可见全部溶血。用分光光度计检测 A 值(取平均值)根据溶血程度公式计算出实验组溶血程度为 1.86%,符合口腔生物植入材料的溶血实

验要求。

2.5 热原试验

注射浸提液后每间隔 30min 测量 1 次兔的肛门温度,兔的升高温度的最高值均小于 0.6℃,体温升高总和小于 1.4℃,符合致热原试验要求(见表 2)。说明制备的脱细胞腮腺基质材料所含热原均符合生物体的要求,具有良好的生物相容性。

2.6 扫描电镜观察

镜下见材料呈现局部放大呈现毛毡样外观,有沟、嵴及三维网状结构,胶原未见明显断裂的三维网状结构;扫描电镜观察兔脱细胞腮腺基质材料表面培养的腮腺细胞呈类圆形或多角形,各个细胞的突触的长短、粗细以及数目各不相同,部分细胞表面可见颗粒状突起,偶见分泌颗粒(图 1)。

表 2 浸提液注射引起的体温变化(℃)

编号	体重(kg)	试验前体温		试验后体温					体温变化值
		$\bar{x}$	1	2	3	4	5	6	
1	2.5	38.47	38.64	38.63	38.73	38.78	38.72	38.32	0.31
2	2.3	38.32	38.31	38.43	38.45	38.51	38.57	38.45	0.25
3	2.6	38.57	38.63	38.69	38.73	38.77	38.65	38.79	0.22

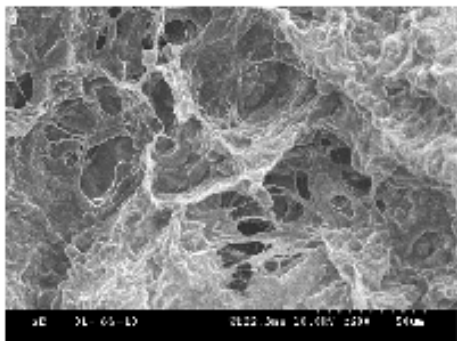


图 1 腮腺细胞接种到脱细胞腮腺基质材料 7d 后的扫描电镜表现(×600)

3 讨论

口腔中的唾液来自涎腺,具有保护和润滑、清洁口腔、抗菌等作用。各种原因导致唾液分泌量减少致使唾液的自我清洁能力和抗菌能力减弱,患者可能会出现龋齿、牙周炎、咀嚼吞咽困难、咽喉部感染等疾病,严重影响患者的生活质量^[3]。目前治疗唾液减少可以用药物刺激具有分泌功能的残余腺体分泌唾液,或者利用人工唾液,前者使用的药物有副作用,而人工唾液只是暂时的替代治疗。组织工程利用种子细胞附着具有生物相容性的三维支架材料来构建具有功能的器官^[4]。支架材料是组织工程研究的重要组成部分,生物支架材料作为种子细胞生长的支架,种子细胞黏附于其表面,并且生物支架材料自身对培养的种子细胞的活性及增殖能力有影响^[5-6]。

脱细胞基质材料是一种通过人工的方法将其细胞以及可溶性蛋白质去除的天然生物支架材料,具有无抗原、生物相容性好、不易引起感染或排斥反应的优点,并且能为种子细胞的生长营造接近体内的培养生长环境^[7]。通过冻融联合酶消化—冷冻干燥法制备的脱细胞腮腺基质在以往的研究中^[1]表明细胞成分能有效去除,具有低免疫原性保留了利于腮腺细胞生长的具有有序排列的基质胶原,有一定的强度和韧性。

本文通过脱细胞腮腺基质材料的体外细胞毒

性试验可见浸提液组与对照组之间 A 值无显著差异性,表明通过冻融联合酶消化法制备的脱细胞腮腺基质材料对体外培养的腮腺细胞的生长没有毒性;全身急性毒性试验显示脱细胞腮腺基质材料对新西兰大白兔机体无毒性及刺激作用;通过溶血实验结果表明脱细胞腮腺基质材料具有良好的化学稳定性,无释放对红细胞产生破坏溶解作用的有害物质,没有引起急性溶血反应;热原试验表明制备的脱细胞腮腺基质材料所含热原均符合生物体的要求,具有良好的生物相容性;通过扫描电镜的观察可见腮腺细胞附着于脱细胞腮腺基质材料的三维结构上,并有外分泌颗粒生成,证明复合于脱细胞腮腺基质材料上的腮腺细胞是有分泌功能存在的。

本文证明脱细胞腮腺基质材料可以提供为腮腺细胞附着的具有生物相容性的三维结构,对实验动物无毒性刺激,具有良好的化学稳定性,没有释放能引起急性溶血的有害物质,是一种良好的生物支架材料。脱细胞腮腺基质材料的三维网状结构以及胞外基质的对复合在脱细胞处理的基质材料表面的腮腺细胞功能的发挥是否存在密切关系,仍需与其他高分子材料以及其他生物衍生材料相比较,并对是否具有形成外分泌腺分泌涎腺的流出管道的能力,需要进行进一步的研究才能得出结论。

参考文献:

[1] 张林,甄思明,李宏波,等. 脱细胞腮腺基质的制备及组织学特征初步观察[J]. 口腔颌面外科杂志,2009,19(2):90-93.
[2] Fujita-Yoshigaki J. Analysis of changes in the expression pattern of claudins using salivary acinar cells in primary culture [M]//Claudins. Humana Press,2011:245-258.
[3] Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact[J]. Supportive Care Cancer, 2010, 18(8): 1061-1079.
[4] Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation[J]. Journal of oral rehabilitation, 2009, 36(5): 368-389.

(下转第 26 页)

表 2 脂联素的表达与甲状腺乳头状癌的临床病理联系(n,%)

	脂联素的表达		t/ χ^2	P
	阳性(+) (n=72)	阴性(-) (n=6)		
浸润侵袭				
是	23(31.9)	5(83.3)	6.356	0.12
否	49(68.1)	1(16.7)		
淋巴结转移				
转移	17(23.6)	3(50)	2.023	0.155
未转移	55(76.4)	3(50)		
年龄(岁)	44.58±12.58	43.50±16.91	0.198	0.844
术前体重(kg)	63.44±10.35	52.83±11.02	2.4	0.019*
绝经情况				
绝经	21(29.2)	3(50)	0.441	0.664
未绝经	37(70.8)	3(50)		
肿块大小(cm)	9.12±29.17	6.12±4.89	0.25	0.803
多发性				
单发	24(82.8)	5(17.2)	5.928	0.025*
多发	48(98.0%)	1(2.0%)		

3 讨论

脂联素为脂肪细胞分泌的一种细胞因子。Kitahara CM 等研究发现肥胖与甲状腺癌的发病风险有关^[5]。本文结果显示,脂联素在甲状腺乳头状癌中的表达与术前体重有关,本结果与 Kitahara CM 等研究结果一致。

Mitsiades N 等^[6]发现,循环脂联素与甲状腺癌的发生成负相关,其水平高患甲状腺癌的风险降低,被认为是一种保护因子。本实验采用免疫组化法测定脂联素在甲状腺乳头状癌的表达,结果显示甲状腺乳头状癌脂联素高表达,在甲状腺乳头状癌的发生发展中起一定作用。

Cheng 等^[3]发现脂联素受体 1 和脂联素受体 2 在甲状腺乳头状癌组织表达比癌旁组织高,脂联素受体表达与癌组织的侵袭、多中心性和肿瘤的分级有关,脂联素受体在甲状腺乳头状癌组织中的过度表达被认为与癌症好的预后有关。本实验采用免疫组化的方法检测 78 例甲状腺乳头状癌和 12 例甲状腺腺瘤组织标本,脂联素在甲状腺乳

头状癌中的阳性表达率 94.4%,在甲状腺腺瘤中的阳性表达率 66.74%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。对 78 例甲状腺乳头状癌患者的临床病理特征分析发现脂联素在癌组织中高表达,并且与患者的肿瘤多发性有关,与 Cheng 等的研究结果一致。

综上所述,甲状腺乳头状癌中脂联素表达与甲状腺乳头状癌有关,术前体重的增加可能是甲状腺乳头状癌发生发展的一个重要因素,肿瘤组织脂联素高表达可能与肿瘤多发性有关。甲状腺乳头状癌组织中脂联素分泌增多,降低甲状腺肿瘤组织中脂联素的表达,增加循环血液中脂联素水平可能降低组织恶变改善预后,为甲状腺乳头状癌的治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] 侯森,崔文.瘦素脂联素及其受体与甲状腺癌关系的研究进展[J]. 济宁医学院学报,2013,36(3):221-224.
- [2] 仲秀秀,张国安,崔文.脂联素及其受体与恶性肿瘤相关性研究进展[J]. 济宁医学院学报,2013,36(5):336-338.
- [3] Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence[J]. Endocr Rev, 2012, 33(4): 547-594.
- [4] Cheng SP, Liu CL, Hsu YC, et al. Expression and biologic significance of adiponectin receptors in papillary thyroid carcinoma[J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 65(2): 203-210.
- [5] Kitahara CM, Platz EA, Freeman LE, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U. S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(3): 464-472.
- [6] Mitsiades N, Pazaitou-Panayiotou K, Aronis KN, et al. Circulating adiponectin is inversely associated with risk of thyroid cancer: in vivo and in vitro studies[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(12): E2023-E2028.

(收稿日期 2013-12-15)

(上接第 19 页)

- [11] Habano W, Nakamura S, Sugai T, et al. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. Oncogene, 1998, 17(15): 1931-1937.

(上接第 23 页)

- [5] Baker OJ, Schulz DJ, Camden JM, et al. Rat parotid gland cell differentiation in three-dimensional culture[J]. Tissue Engineering Part C: Methods, 2010, 16(5): 1135-1144.
- [6] Jean-Gilles R, Soscia D, Sequeira S, et al. Novel modeling approach to generate a polymeric nanofiber scaffold for salivary

- [12] Burgart LJ, Zheng J, Shu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors[J]. Am J Pathol, 1995, 147(4): 1105-1111.

(收稿日期 2013-09-28)

gland cells[J]. Journal of nanotechnology in engineering and medicine, 2010, 1(3): 031008.

- [7] Kato N, Higuchi J, Ogata S, et al. Spherule-like acellular stroma in clear cell carcinoma of the ovary: its utility in frozen section diagnosis[J]. Histopathology, 2011, 59(4): 790-794.

(收稿日期 2013-12-31)