



胎盘脱细胞基质作为组织修复材料的初步研究

刘 琇* 臧传宝 林彦超 程 龙 付晓萌

(银丰低温医学科技有限公司, 济南 250102)

摘要 目的 制备胎盘脱细胞基质并评价其生物相容性, 探讨其作为组织修复材料的可行性。方法 利用分娩废弃物胎盘组织, 进行病毒灭活、脱细胞处理、冷冻干燥得到胎盘脱细胞海绵状基质材料, HE染色观察脱细胞效果及扫描电镜观察材料微观结构。同时, 选取健康雄性SD大鼠39只, 体质量120~150 g, 随机分为实验1组、实验2组及对照组。对构建的基质材料进行大鼠皮下植入实验, 实验1组植入基质材料, 实验2组植入基质材料及脐带间充质干细胞, 对照组为假手术组。于手术后第3、5、7天进行动物血常规检测, 分析淋巴细胞、粒细胞等炎性细胞数量; 于手术后第1、2、4、8、9周取材料植入处及周围组织样本进行HE染色分析。结果 构建的胎盘脱细胞基质肉眼观呈乳白色海绵状, HE染色未见细胞残留, 电镜观察材料内部空隙比较明显, 材料交联度较好, 总孔隙率为(77.54±2.53)%。皮下植入之后, 切口处愈合良好, 血常规结果未见明显的炎性细胞增多; 术后7 d植入材料切片HE染色即可见血管形成, 且脐带间充质干细胞的加入能够加快材料与机体的融合, 促进细胞的深入生长及血管化。结论 胎盘脱细胞海绵基质材料具有良好的生物相容性, 可作为组织工程材料的理想来源。

关键词 胎盘, 脱细胞基质, 生物材料, 脐带间充质干细胞
中图分类号 Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0343

组织工程产品是近年来组织修复领域的热门话题, 已逐渐成为目前临床手术治疗及意外等导致的人体组织器官缺失和各种损伤的重要治疗措施, 目前组织工程产品面临的关键问题之一是寻求理想的生物支架材料^[1-3]。随着生物材料技术的发展, 脱细胞组织基质 (acellular tissue matrix, ACTM) 因其具有天然的三维支架、含有多种细胞活性因子备受关注, ACTM经过各种脱细胞技术等处理后获得, 主要由胶原蛋白组成, 且去除细胞和抗原成分, 故较少引起宿主免疫排异反应^[4-6]。ACTM既可单独应用, 也可以负载种子细胞、细胞因子及药物等, 在组织工程再生修复方面发挥重要作用。

胎盘、脐带作为分娩废弃物, 在胎儿出生之后, 大都作为医疗废物而遗弃, 造成极大的浪费。胎盘为母体及胎儿之间物质交换的器官, 是胚胎与母体组织的结合体, 含有大量的胶原及纤维成分, 同时具有多种生长因子促进细胞的生长与代谢。脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 来源于新生儿脐带组织, 目前

分离、培养技术比较成熟, 为应用比较广泛的多功能干细胞之一, 它能分化成许多种组织细胞, 具有成脂、成骨、成软骨、成肌分化潜能, 具有广阔的临床应用前景^[7-11]。

本研究采用脱细胞方法制备胎盘脱细胞基质, 单独或负载UC-MSCs进行大鼠皮下植入实验, 评价其生物相容性并探讨其作为组织修复材料的可行性, 为组织工程研究寻找合适的支架材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本研究为随机对照动物实验, 于2018年11月在济南市药监局动物实验中心完成。

* 通讯联系人。

Tel: 0531-88897323, E-mail: 394995535@qq.com

收稿日期: 2021-11-12, 接受日期: 2022-02-16

1.2 材料

1.2.1 实验动物

健康SD大鼠, 普通级, 6周龄, 体质量120~150 g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供。本研究所采用的实验动物及操作程序符合动物实验相关伦理学要求。

1.2.2 主要试剂和仪器

胎牛血清 (Gibco, USA), α -MEM细胞培养基 (Gibco, USA), EDTA (Sigma, USA), 脱氧胆酸钠 (索莱宝, 中国), 磷酸盐缓冲液 (索莱宝, 中国), HEPES (Sigma, USA), DNase I (索莱宝, 中国); XFA6130全自动血液细胞分析仪 (普朗, 中国); 石蜡切片机 (Leica, GER); 倒置相差显微镜 (Olympus, JPN); GM300刀式混合研磨仪 (Retsch, GER); 低速离心机 (Thermo, USA); 超净工作台 (苏州净化, 中国); CO₂培养箱 (Heal Force, 中国上海); 戊巴比妥钠 (上海榕柏生物技术有限公司), 常规手术器械等。

1.3 方法

1.3.1 脐带间充质干细胞分离、培养、传代

取健康足月新生儿脐带组织 (由健康产妇分娩后自愿捐赠), 于超净工作台中采用无菌PBS反复冲洗脐带表面, 洗净表面血液及体液, 将脐带剪成3~5 cm小段, 剥除脐动、静脉血管, 保留华通胶部分, 用组织剪剪碎至1 mm³组织块, 采用组织块贴壁培养法将剪碎的组织块离心清洗2遍后, 加入含体积分数10% FBS的 α -MEM细胞培养基, 将其转移至培养瓶中, 于37°C、含5% CO₂培养箱中进行全贴壁培养。待细胞出现集落生长并融合至80%以上时去除组织块, 用0.25%胰蛋白酶消化传代, 之后按照1:4的比例传至第3代, 收集细胞用作后续实验。

1.3.2 胎盘脱细胞海绵基质材料制备及检测

胎盘脱细胞海绵基质材料制备方法为本课题组开发且拥有自主知识产权的发明专利 (中国专利号CN201911162947.1)^[12]。合法取得临床实验用胎盘 (由健康产妇分娩后自愿捐赠), 采集前产妇HBV、HCV、HIV、梅毒标志物等病毒检测均为阴性。用生理盐水清洗3遍, 剪成约2 cm³小块, 生理盐水反复清洗3遍至基本无血色; GM300刀式混合研磨仪打碎 (3 500 r/min, 12 s, 4次), 1 500×g离心10 min, 加入脱细胞溶液 (含10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) +10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) +1.0% (w/v) 脱氧胆酸钠, pH 8.0)

过夜处理16 h; 次日1 500×g离心10 min后加入生理盐水清洗3遍去除洗涤剂; 0.1%过氧乙酸处理2 h进行病毒灭活, 然后加入2 000 U/L DNase I酶的缓冲液, 摇床过夜处理去除DNA; 次日生理盐水反复清洗后将胎盘脱细胞基质平铺于不锈钢器皿中, 进行真空冷冻干燥处理, 得到海绵基质材料 (以下简称“材料”)。采用电子束灭菌, 剂量为18 kGy。

1.3.3 大体观察及苏木精-伊红(HE)染色

观察胎盘脱细胞海绵基质的颜色及形态, 另取脱细胞前胎盘组织及基质材料4%多聚甲醛固定24 h, 石蜡包埋, 切片进行HE染色, 光镜下观察组织结构。

1.3.4 扫描电镜观察

取基质材料2.5%戊二醛固定, 喷金进行扫描电镜观察微结构, 应用Image J软件分析材料孔隙率。

1.3.5 实验动物分组及实验方法

选取健康雄性SD大鼠39只, 体质量120~150 g, 随机分为实验1组、实验2组及对照组 (表1)。具体操作步骤: 实验大鼠于术前12 h禁饮食, 分别称重后以2%戊巴比妥钠2 ml/kg麻醉大鼠后背部备皮, 选取背部肌肉丰厚的脊柱旁肌为植入位点, 消毒后以手术刀逐层切开皮肤、浅筋膜、深筋膜, 分离深筋膜形成一皮囊。实验1组植入胎盘脱细胞海绵基质材料 (1 cm×1 cm×4 mm), 逐层缝合; 实验2组植入胎盘脱细胞海绵基质材料 (1 cm×1 cm×4 mm) 后, 用注射器注入脐带间充质干细胞1 ml (细胞数为1×10⁵个), 逐层缝合; 对照组只进行皮下皮囊制备, 不植入任何材料, 逐层缝合。手术后每天观察术口炎症反应及切口愈合情况, 分别于第3、5、7天大鼠颈静脉取血进行血常规检测, 检测白细胞 (WBC) 总数、淋巴细胞 (LY) 总数、单核细胞 (MO) 总数、粒细胞 (GR) 总数。于术后第1、2、4、8、9周各处死3只实验动物, 取植入材料及周围组织, 观察材料降解情况, 并进行脱水, 石蜡包埋, HE染色观察炎性细胞浸润及新生血管情况。

Table 1 Grouping of experimental animals

Group	Samples	n
Group 1	Material	15
Group 2	Materia+MSCs	15
Control	Control	9

2 结 果

2.1 胎盘脱细胞基质材料外观特征及结构特征

按照所示方法构建的胎盘脱细胞基质材料呈乳

白色，海绵状，置于生理盐水中复水后不散落（图 1a、b）。HE 染色显微镜下观察脱细胞的胎盘组织未见明显蓝染的细胞核（图 1d）。

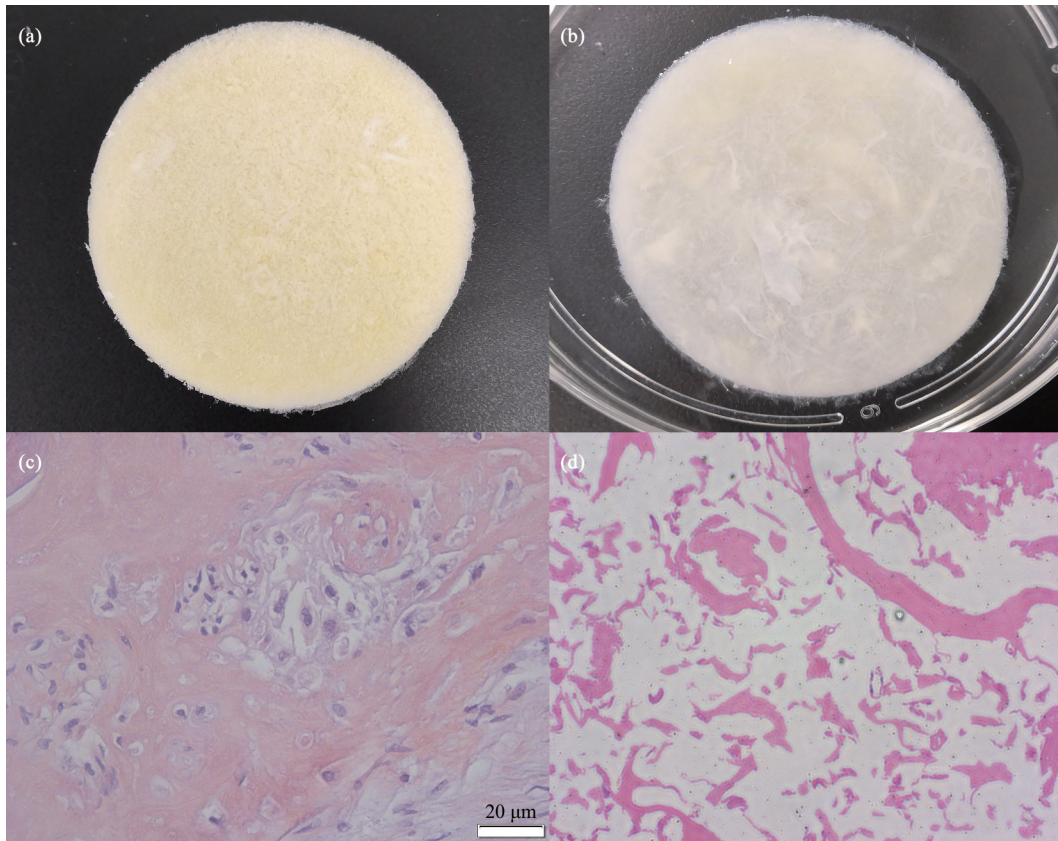


Fig. 1 Appearance characteristics of acellular matrix material of placenta and placental tissue sections observed by HE staining

(a) Before rehydration. (b) Not scattered after rehydration. (c) Normal placental tissue. (d) Placenta acellular spongy matrix.

2.2 电镜观察及孔隙率测定

对材料进行扫描电镜观察，可见材料内部空隙比较明显，材料交联度较好，且进一步验证脱细胞效果明显，无细胞残留（图 2）。应用 Image J 软件分析材料平均孔隙率为 $(77.54 \pm 2.53)\%$ 。

2.3 炎症反应观察及血常规检测结果分析

术后每天观察切口处无红肿、渗液等炎症反应，手术区域毛发正常生长，切口处愈合良好（图 3）。

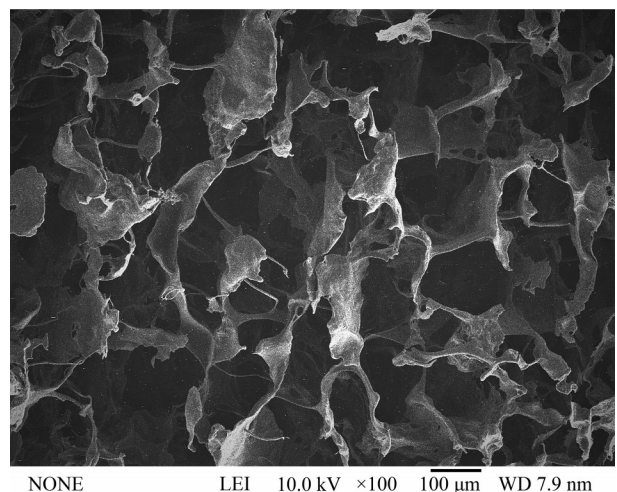


Fig. 2 Observation of acellular matrix material of placenta by SEM



Fig. 3 Observation photos of the operative orifice and surrounding area

(a) The day after subcutaneous implantation. (b) Subcutaneous implantation for 3 d. (c) Subcutaneous implantation for 7 d.

为了进一步验证材料是否引起炎性反应, 分别于皮下植入后第3、5、7天取静脉血进行血常规检测, 检测WBC总数、LY总数、MO总数、GR总

数。实验结果如图4所示, 实验1组, 实验2组相比于对照组未见明显的炎性细胞数增高, 未出现明显的炎性反应, 植入材料存在一定的安全性。

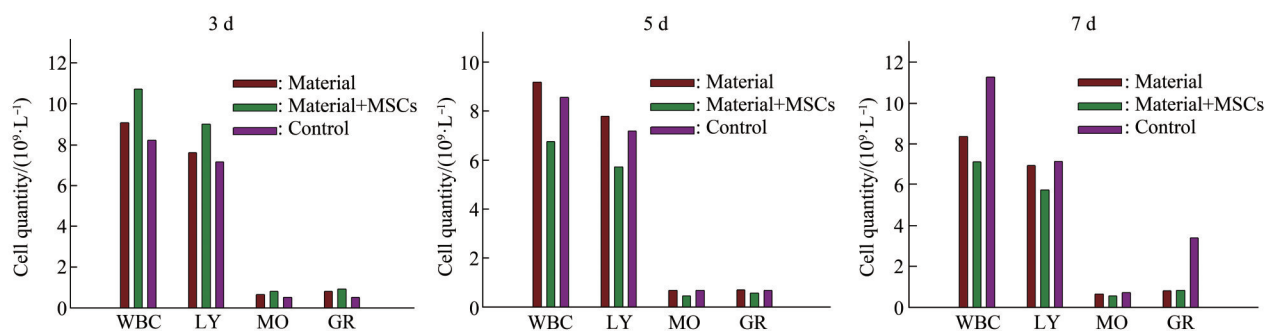


Fig. 4 Inflammatory cells were detected at 3, 5 and 7 d after subcutaneous implantation (WBC: 4×10^9 – 12×10^9 /L; LY: 3×10^9 – 8.5×10^9 /L; MO: 0 – 2.0×10^9 /L; GR: 0.7×10^9 – 5.0×10^9 /L)

2.4 组织学观察

胎盘脱细胞海绵基质材料HE染色结果未见细胞结构, 材料呈现网状多孔结构(图5a)。于手术后第7天对植入材料部位进行取材, 进行HE染色分析, 可见机体细胞逐渐嵌入材料内部生长, 实验

2组(图5c)可见血管深入, 初步血管化现象, 相对于实验1组(图5b), 材料靠近中间位置形成较多细胞网状结构, 可见间充质干细胞的加入能够促进机体细胞的迁入生长及血管化。

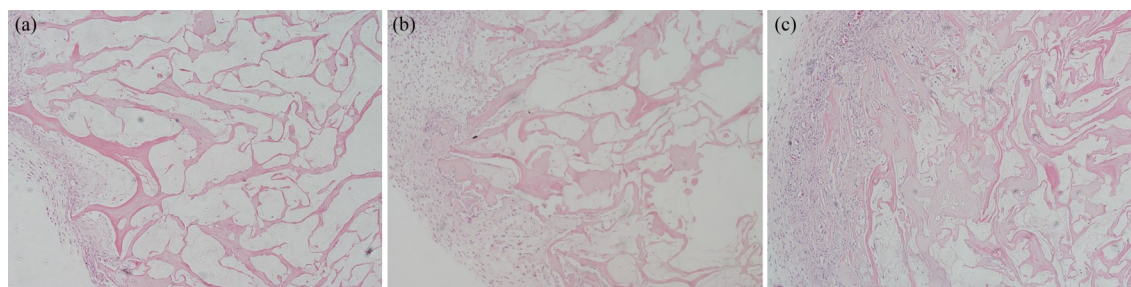


Fig. 5 HE staining of acellular matrix material was performed 7 d after subcutaneous implantation ($\times 100$)

之后分别于植入后2、4、8、9周取材进行HE染色分析(图6),植入材料与机体都有很好的组织相容性,实验2组间充质干细胞的加入能够促进机体细胞的嵌入生长。从第2周开始,植入材料内

部开始出现明显血管化(箭头所示)。实验1组第8周及第9周HE可以看出,植入材料只剩少量遗留,而实验2组细胞迁入生长较好,材料相容性好,降解率低。

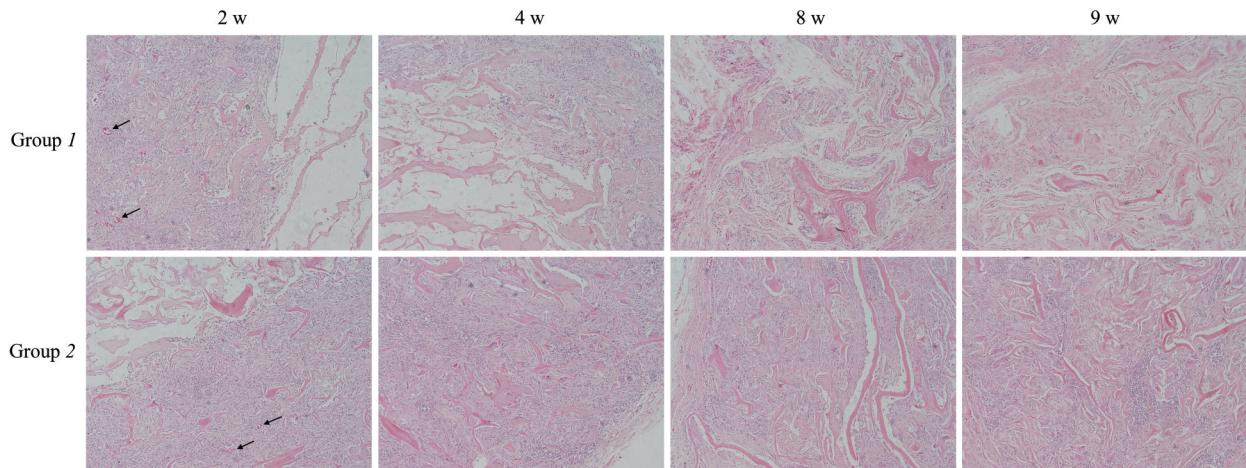


Fig. 6 HE staining was performed at 2, 4, 8 and 9 weeks after subcutaneous implantation ($\times 100$)

w: week. The arrows indicate neovascularization.

3 讨 论

中国的手术量居世界首位,对于组织器官缺损传统的修复方法是自体组织植入术,虽然可以取得满意疗效,但它是牺牲自体健康组织为代价,导致很多并发症及附加损伤;人的器官功能衰竭,采用药物治疗、暂时性替代疗法可挽救部分病人生命,但供体器官来源极为有限,因免疫排斥反应需长期使用免疫抑制剂,由此而带来的并发症有时是致命的^[13-15]。

自20世纪80年代科学家首次提出“组织工程学”概念以后,为众多的组织缺损、器官功能衰竭病人的治疗带来了曙光^[16-18]。随着技术的发展,组织工程产品逐渐成为临床上重要的手术修复和替代物,目前组织工程材料主要应用于心血管手术、烧伤、骨外科、手足外科、假体、整形等领域,需求量日益增大^[19-22]。

组织工程学核心技术是将活细胞与生物材料结合,修复、重建、维持、恢复或提高人体组织的功能。脱细胞基质(ECM)是种子细胞及再生相关分子复合良好支架,保留了细胞外基质的生理结构,为种子细胞的种植提供了良好的三维空间结构

和生长环境。种子细胞可以进入脱细胞后,与ECM成分相互作用,产生新生组织^[23-27]。植入体内后干细胞能在体内分化、增殖,理论上能丰富组织细胞和组织结构,解决组织修复不足的矛盾,提高远期效果^[28]。

本实验研究中采用胎盘等合法来源的同种异体组织经过脱细胞技术,构建成的支架材料,具有免疫原性低、组织相容性好等优点,在组织工程材料构建及应用过程中,细胞的黏附和生长是确定组织工程支架材料安全性及有效性的关键指标,按照本实验方法构建的胎盘脱细胞海绵基质材料呈海绵状多孔结构,平均孔隙率为 $(77.54 \pm 2.53)\%$,可以为机体细胞的迁入生长提供良好的三维空间结构,其支架结构还可以为细胞黏附提供支撑,促进创面愈合。

本实验将胎盘脱细胞海绵基质材料大鼠皮下植入后未产生明显的炎症反应,血常规检测也未见明显的炎症细胞量升高,在SD大鼠的正常范围内;大鼠皮下植入之后,材料可以很快的与皮下组织融合,细胞嵌入生长,表现出良好的生物相容性,且脐带间充质干细胞的添加能够短时间内促进机体细胞的嵌入生长及血管化。

4 结 论

胎盘脱细胞海绵基质材料具有良好的生物相容性, 可作为组织工程材料的理想来源。但由于皮下植入实验存在一定的局限性, 为了更进一步探究胎盘脱细胞海绵基质材料的生物安全性及有效性, 还需进行大量实验室验证及临床前研究, 这对今后组织工程材料开发及临床组织修复应用至关重要。

参 考 文 献

- [1] Shooter G K, Van Lonkhuyzen D R, Croll T I, *et al.* A preclinical functional assessment of an acellular scaffold intended for the treatment of hard-to-heal wounds. *Int Wound J*, 2015, **12**(2): 160-168
- [2] Varkey M, Ding J, Tredget E E. Advances in skin substitutes potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *J Funct Biomater*, 2015, **6**(3):547-563
- [3] Zhang Z, Lü L, Mamat M, *et al.* Xenogenic (porcine) acellular dermal matrix is useful for the wound healing of severely damaged extremities. *Exp Ther Med*, 2014, **7**(3):621-624
- [4] Faulk D M, Johnson S A, Zhang L, *et al.* Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. *J Cell Physiol*, 2014, **229**(8): 984-989
- [5] Nonaka P N, Campillo N, Uriarte J J, *et al.* Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *J Biomed Mater Res A*, 2014, **102**(2):413-419
- [6] Zhang X, Chen X, Hong H, *et al.* Decellularized extracellular matrix scaffolds: recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater*, 2021, **10**:15-31
- [7] Yu R N, Estrada C R. Stem cells: a review and implications for urology. *Urology*, 2010, **75**:664-670
- [8] Yu H, Fang D, Kumar S M, *et al.* Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol*, 2006, **168**:1879-1888
- [9] Kisiday J D, Kopesky P W, Evans C H, *et al.* Evaluation of adult equine bone marrow-and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res*, 2008, **26**(3): 322-331
- [10] Csaki C, Schneider P R, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. *Ann Anat*, 2008, **190**(5):395-412
- [11] Chen M Y, Lie P C, Li Z L, *et al.* Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 2009, **37**(5):629-640
- [12] 刘琇, 臧传宝, 刘峰, 等. 一种胎盘组织基质材料及其制备方法: 中国, CN201911162947.1. 2020-04-10
Liu X, Zang C B, Liu F, *et al.* The invention relates to placental tissue matrix material and a preparation method thereof: China, CN201911162947.1. 2020-04-10
- [13] Tschoeke B, Flanagan T C, Cornelissen A, *et al.* Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft. *Artif Organs*, 2008, **32**: 800-809
- [14] Torikai K, Ichikawa H, Hirakawa K, *et al.* A self-renewing, tissue-engineered vascular graft for arterial reconstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, **136**: 37-45
- [15] Rashid S T, Fuller B, Hamilton G, *et al.* Tissue engineering of a hybrid bypass graft for coronary and lower limb bypass surgery. *FASEB J*, 2008, **22**:2084-2089
- [16] Badylak S F, Freytes D O, Gilbert T W. Reprint of: extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomaterialia*, 2015, **23**:S17-S26
- [17] Wei W, Li J P, Chen S, *et al.* *In vitro* osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells with a decellularized matrix derived from human adipose stem cells and *in vivo* implantation for bone regeneration. *J Mater Chem B*, 2017, **5**(13):2468-2482
- [18] Chen W C W, Wang Z G, Missinato M A, *et al.* Decellularized zebrafish cardiac extracellular matrix induces mammalian heart regeneration. *Sci Adv*, 2016, **2**(11): e1600844
- [19] Lin Y Q, Wang L R, Wang J T, *et al.* New advances in liver decellularization and recellularization: innovative and critical technologies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, **9**(9):1183-1191
- [20] Xing Q, Yates K, Tahtinen M, *et al.* Decellularization of fibroblast cell sheet for natural extracellular matrix scaffold preparation. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015, **21**(1):77-87
- [21] Daley G Q, Goodell M A, Snyder E Y. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: 398-418
- [22] Ahmedbeyli C, Ipci S D, Cakar G, *et al.* Laterally positioned flap along with acellular dermal matrix graft in the management of maxillary localized recessions. *Clin Oral Investig*, 2019, **23**(2): 595-601
- [23] Badylak S F, Weiss D J, Caplan A, *et al.* Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*, 2012, **379**(9819):943-952
- [24] Struecker B, Raschzok N, Sauer IM, *et al.* Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, **11**(3):166-176
- [25] Schneider K H, Aigner P, Holthoner W, *et al.* Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. *Acta Biomaterialia*, 2016, **29**:125-134
- [26] Guyette J P, Gilpin S E, Charest J M, *et al.* Perfusion decellularization of whole organs. *Nat Protoc*, 2014, **9**(6): 1451-1468
- [27] Seifu D G, Pxirnama A, Mequanint K, *et al.* Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*, 2013, **10**(7):410-421
- [28] Naito Y, Shinoka T, Duncan D, *et al.* Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **63**(4-5):312-323

A Preliminary Study of Placental Acellular Matrix as Tissue Repair Material

LIU Xiu*, ZANG Chuan-Bao, LIN Yan-Chao, CHENG Long, FU Xiao-Meng

(Yinfeng Cryomedicine Technology CO., Ltd., Jinan 250102, China)

Abstract Objective To prepare and evaluate the biocompatibility of placental acellular matrix and to explore its feasibility as tissue repair material. **Methods** The waste placental tissue from delivery was handled by virus inactivation, acellular treatment and freeze-drying to obtain the acellular spongy matrix material of placenta. The effect of acellular was observed by HE staining and the microstructure of the materials was observed by scanning electron microscope. At the same time, 39 healthy male SD rats with body mass ranging from 120 g to 150 g were selected, randomly divided into experiment 1 group, experiment 2 group and control group. The subcutaneous implantation of the constructed matrix material was performed in rats, experimental group 1 implanted matrix materials, experimental group 2 implanted matrix materials and umbilical cord mesenchymal stem cells, the control group was the sham operation group. Routine blood tests were performed on the 3rd, 5th and 7th day after surgery to analyze the number of lymphocytes, granulocytes and other inflammatory cells. At 1, 2, 4, 8 and 9 week after the operation, the tissue samples of the implanted material and surrounding tissues were taken for HE staining analysis. **Results** The constructed acellular matrix of placenta appears milky white spongy in macroscopic view, HE staining indicated no cell residue. Under electron microscope, the internal void of the material was obvious, and the crosslinking degree of the material was good. The total porosity was $(77.54 \pm 2.53)\%$. After subcutaneous implantation, the incision healed well, and no obvious inflammatory cell increase was observed in blood routine examination. Seven days after the operation, blood vessel formation can be observed by HE staining in the sections of the implanted materials. Moreover, the addition of umbilical cord mesenchymal stem cells can accelerate the fusion of the materials with the body, promote the in-depth growth of cells and vascularization. **Conclusion** Placental acellular sponge matrix material has good biocompatibility and can be an ideal source of tissue engineering materials.

Key words placenta, acellular matrix, biomaterials, umbilical cord mesenchymal stem cells

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0343

* Corresponding author.

Tel: 86-531-88897323, E-mail: 394995535@qq.com

Received: November 12, 2021 Accepted: February 16, 2022