

研究论文

小鼠心室肌脱细胞化细胞外基质薄片的制备和评价

姜煜东, 李文思, 余翀, 王璐, 孙小夕, 席姣娅*

华中科技大学同济医学院基础医学院生理学系, 中德干细胞中心, 湖北省药物靶向研究评价重点实验室, 武汉 430030

摘要: 心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可由心肌经脱细胞处理制得, 被广泛认为是一种理想的制备工程心肌的生物支架材料。然而目前的脱细胞方法尚存在不足, 本研究拟联合使用经典去垢剂改良脱细胞方法, 制备性能更为优良的心肌ECM薄片, 以用于构建工程心肌片。用振荡切片机将包埋于低熔点琼脂糖中的成年昆明小白鼠心室肌组织沿心脏横轴切成300 μm 厚的薄片, 随机分为正常对照组、SDS脱细胞组(0.1% SDS处理)和改良脱细胞组(0.1% SDS和0.5% Triton X-100联合处理)。通过总RNA和总蛋白质含量分析、HE染色和免疫荧光染色等方法评估各组的脱细胞程度和ECM成分保留状态; 将改良脱细胞组ECM与小鼠胚胎干细胞源心肌细胞(murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, mES-CMs)和小鼠胚胎成纤维细胞(murine embryonic fibroblasts, MEFs)共培养以检测其生物相容性。结果显示: SDS脱细胞组和改良脱细胞组ECM中残留的总RNA及蛋白质含量均低于对照组。HE染色结果显示改良脱细胞组核质去除较SDS脱细胞组更彻底。改良脱细胞组可见胶原蛋白IV和层粘连蛋白两种ECM关键成分表达量和分布接近正常心肌组织, 而SDS脱细胞组中这两种蛋白明显减少且分布紊乱。mES-CMs和MEFs能存活于改良脱细胞组ECM表面12天以上并向内迁移。综上, SDS和Triton X-100联合脱细胞法制备ECM薄片效果明显, 能更好地保留天然ECM成分和结构, 具有良好的生物相容性。

关键词: 心肌片; 组织工程; 脱细胞化; 细胞外基质

中图分类号: R329.3; Q813.1

Acquirement and evaluation of murine ventricular extracellular matrix

JIANG Yu-Dong, LI Wen-Si, YU Chong, WANG Lu, SUN Xiao-Xi, XI Jiao-Ya*

Department of Physiology and Chinese-German Stem Cell Center, School of Basic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, the Key Laboratory for Drug Target Researches and Pharmacodynamic Evaluation of Hubei Province, Wuhan 430030, China

Abstract: Cardiac extracellular matrix (ECM), generated from the process of decellularization, has been widely considered as an ideal source of biological scaffolds. However, current ECM preparations are generally difficult to be applied to generate cardiac tissue. Our research was aimed to improve decellularization protocols to prepare cardiac ECM slices. Adult murine ventricular tissues were embedded in low melting agarose and cut into 300 μm slices, and then were divided randomly into three groups: normal cardiac tissue, SDS treated group (0.1% SDS) and SDS+Triton X-100 treated group (0.1% SDS+0.5% Triton X-100). Total RNA content and protein content quantification, HE staining and immunostaining were used to evaluate the removal of cell components and preservation of vital ECM components. Furthermore, murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (mES-CMs) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were co-cultured with ECM slices to evaluate biocompatibility. The relative residual RNA and protein contents of

Received 2014-05-11 Accepted 2014-07-09

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31100828), the Natural Science Foundation of Hubei Province, China (No. 2011CDB363), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, China, the Fundamental Research Funds (No. 2013TS145)/the Fundamental Research Funds for the Undergraduates (No. HUST: 2011B142, 2012B366) in Huazhong University of Science and Technology, the National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (No. HUST: 2012175), and the Science and Technology Innovation Funds for the University or College Students, China (No. 9).

*Corresponding author. Tel: +86-27-83692622; Fax: +86-27-83692608; E-mail: zhengyall@hotmail.com

ECM slices significantly decreased after decellularization. HE staining showed that SDS+Triton X-100 treatment better destroyed cellular structure and removed nuclei of ECM slices, compared with SDS treatment. Immunostaining showed that collagen IV and laminin were better preserved and presented better similarity to original cardiac tissue in ECM slices acquired by SDS+Triton X-100 treatment. However, collagen IV and laminin were significantly decreased and arranged disorderly in SDS treated group. We observed effective survival (≥ 12 days) of MEFs and mES-CMs on ECM slices acquired by SDS+Triton X-100 treatment, and signs of integration, whereas those signs were not found in SDS treated group. We concluded that, compared with traditional SDS method, new combined protocol (SDS+Triton X-100) generated ECM slices with better component and structural preservation, as well as better biocompatibility.

Key words: myocardium slice; tissue engineering; decellularization; extracellular matrix

心肌梗死引发心肌细胞衰竭和死亡,造成心脏泵血功能下降,心肌代偿性增生肥大乃至最后的心力衰竭。心脏移植被认为是拯救晚期心力衰竭的最佳方法,但供体来源缺乏和排斥反应导致只有少数患者可以受益^[1]。近年来研究表明,用组织工程技术在体外构建工程心肌(engineered cardiac tissue, ECT)并移植给患者,有望明显修复心泵功能^[2]。该技术需要将合适的种子细胞种植在合适的支架材料上,离体构建具有收缩功能的ECT。尽管如此,ECT在移植后仅能紧紧地附着于宿主心肌表面,而不是有效地从结构上整合于宿主心肌,梗死区内可见ECT和宿主心肌的明显界限^[3],这将大大限制ECT对梗死区微环境的调节作用,明显制约移植ECT对宿主心功能的修复效果和对患者的治疗效果。ECT难以和宿主心肌达到结构和功能高效整合的原因之一是:构建三维ECT所用支架的理化特性、超微结构和三维构架与天然心肌差异较大^[4]。人们一直致力于制备各种接近细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构的仿生可降解多孔支架用于心肌组织工程,如人工合成的多孔聚合物支架^[4,5]、纳米材料模拟支架^[5,6]或各种水凝胶(如胶原蛋白、纤维蛋白等)等^[7]。然而这些人工合成的支架,无论是超微结构还是功能,仍和天然的心肌ECM相差甚远,基于这些支架构建的ECT和天然心肌都有不同程度的差别。

将心肌脱细胞处理可制备出保留天然成分、超微结构和三维结构的心肌ECM,能有效支持细胞的存活和生长,并影响其迁移和分化,是一种构建ECT的理想支架^[8]。脱细胞化获取心肌ECM组织片的方法多种多样,最常用到的脱细胞试剂是去垢剂和酶类^[9];物理方法例如超声波和射线等已被尝试用于进一步提升脱细胞化效率^[10]。理想的脱细胞化方法是在保留ECM超微结构和生物

活性的基础上,尽可能去除组织中的所有细胞成分,从而基本排除免疫原性^[11]。不同脱细胞试剂或方法对各种细胞成分的去除不尽相同,所制得的ECM中各种成分的含量也存在明显差异^[12]。越来越多的研究表明,采用单一脱细胞化试剂的脱细胞效率有限,单纯提高试剂浓度和反应时间不仅不能显著提升脱细胞化效率,反而可能过度消化ECM中关键成分^[13],对支架结构造成进一步损伤,影响种子细胞的粘附生长和重组心肌力学功能的发挥,不利于仿生ECT的构建^[14]。如何改进脱细胞方法以尽可能去除细胞成分,同时使制备的ECM能最大程度地保留原有基质成分和结构,是目前亟待解决的关键问题。

本研究拟联合使用经典脱细胞试剂SDS和Triton X-100,改良脱细胞方法,制备性能更为优良的心肌ECM薄片,为构建仿生ECT片提供理想的生物支架。

1 材料和方法

1.1 伦理学声明 所有动物实验均遵守国际实验动物学伦理规范,并获得湖北省科学技术院批准(2005-50)。

1.2 小鼠心肌薄片的制备^[15,16] 取6周龄成年昆明小白鼠(华中科技大学实验动物中心)麻醉后立即取出心脏,剪除心房及大血管,将余下心室肌组织包埋于37℃、4%低熔点琼脂糖中,立即置于冰上冷却成型。用振荡切片机(Leica VT1000S,德国Leica公司)沿横断面切成300 μm心室肌薄片,置于4℃无钙台氏液中保存。

1.3 脱细胞化制备心肌ECM薄片 将心室肌薄片随机分为正常对照组、SDS脱细胞组和改良脱细胞组。改良脱细胞组心肌片置于0.1% SDS中,37℃振荡反应11.5 h,去除SDS,加入PBS漂洗

三次, 再加入 0.5% Triton X-100, 37 °C 振荡反应 0.5 h。SDS 脱细胞组心室肌薄片按相同反应条件用 0.1% SDS 处理 12 h。两组反应结束后, 均加入 PBS 振荡漂洗三次, 时间分别为 10 min、30 min 和 1 h, 以去除残余脱细胞试剂, 避免对 ECM 的进一步损伤^[17]。正常对照组心室肌薄片置于含双抗的 PBS 中, 37 °C 振荡反应 12 h。

1.4 总 RNA 定量和总蛋白定量分析 随机选取正常对照组、SDS 脱细胞组和改良脱细胞组处理后组织片, 分别称重后, 使用 Trizol 提取总 RNA, 经氯仿和异丙醇萃取得到 RNA 纯水溶液, 并在 260 nm 波长处测定吸光度, 计算总 RNA 相对含量(单位 $\mu\text{g/g}$); 用 RIPA 试剂抽提得到总蛋白质溶液。取部分蛋白样品, 与 BCA 蛋白定量试剂盒反应, 在 562 nm 波长处测定吸光度, 计算蛋白质相对含量(单位 $\mu\text{g/mg}$)。

1.5 HE 染色 随机选取正常对照组、SDS 脱细胞组和改良脱细胞组处理后组织片, 用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 室温下固定 2 h, OCT 包埋, 用冰冻切片机 (德国 Leica 公司) 切成 8 μm 厚度冰冻切片。冰冻切片经水洗、苏木素染色、盐酸酒精脱色、伊红染色、梯度酒精及二甲苯脱水处理, 制得 HE 染色切片。在光镜 (TE2000-S, 日本 Nikon 公司) 下观察。

1.6 免疫荧光染色^[16] 用 0.5% Triton X-100 在室温下对 8 μm 冰冻切片破膜, 漂洗后用 5% 的牛血清白蛋白 4 °C 封闭 1 h。用抗小鼠胶原蛋白 IV (1:800, Abcam) 或抗小鼠层粘连蛋白 (1:200, Abcam) 作为一抗 4 °C 孵育过夜。漂洗后加入抗鼠 IgG-Alexa Flour 647 或 IgM-Alexa Flour 647 荧光抗体 (Molecular Probes) 作为二抗, 室温避光孵育 1 h。Hoechst 33342 室温下染核后, 用无荧光甘油封片。在荧光显微镜 (TE2000-S, 日本 Nikon 公司) 下观察胶原蛋白 IV 和层粘连蛋白表达状态。

1.7 小鼠胚胎干细胞源心肌细胞 (murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, mES-CMs) 和小鼠胚胎成纤维细胞 (murine embryonic fibroblasts, MEFs) 的制备 如本研究组前期文献报道^[16,18,19]诱导小鼠转基因 ES 细胞 (D3 系, α -PIG44 克隆)^[20]向心肌分化。概括地说, 用含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基悬浮 mES 细胞制成细胞密度为 10^6 个/mL 的细胞悬液, 置于摇床上 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 2 天形成胚体, 按 10^3 胚体/皿稀释后继

续置于摇床上 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养至第 9 天出现跳动胚体。加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素筛选纯化 mES-CMs^[20], 第 14 天可获得纯化的表达 GFP 的 mES-CMs, 用于后续实验。

如本研究组前期文献报道^[16]制备 MEFs。概括地说, 断颈处死怀孕 14.5 天的母鼠 (昆明小白鼠, 华中科技大学实验动物中心), 无菌条件下取出胚胎, 去除头尾、四肢及内脏, 保留躯干部分, 剪碎并用胰酶消化成单细胞悬液。在含 15% 胎牛血清的 IMDM 培养基中进行原代培养 (培养条件 37.5 °C, 5% CO_2), 每 2 天更换培养基, 培养至第 4 代时, 可用于后续实验。

1.8 ECM 重细胞化 如本研究组前期文献报道^[16], 将 SDS 脱细胞组和改良脱细胞组 1 片 ECM 薄片分别置于特制底部带漏斗形凹槽的共培养皿^[15]中, 微干燥后加入 10 μL 含 1×10^5 MEFs 的细胞悬液, 混匀后静置 10 min, 再加入 1 mL 含 20% 胎牛血清的 IMEM 培养基 37 °C 培养 30 min 后, 加入 (10 ± 1) 个纯化的 mES-CMs 团块, 小心移至 37 °C、5% CO_2 培养箱中静置培养。共培养过程中每 24 h 在荧光显微镜 (TE2000-S, 日本 Nikon 公司) 下观察生长状况, 每 2 天更换培养基。共培养后在荧光显微镜下观察 GFP 阳性的 mES-CMs 的数量和分布变化。共培养第 12 天时, 将组织固定并制成 8 μm 冰冻切片, 进行 HE 染色观察。

1.9 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件对数据进行分析, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用非配对 t 检验分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 脱细胞处理能有效去除ECM中残留细胞成分

总 RNA 定量显示, 正常对照组心肌片总 RNA 相对含量为 $(1\,026.20 \pm 212.12) \mu\text{g/g}$, SDS 脱细胞组和改良脱细胞组 ECM 薄片总 RNA 相对含量均明显低于正常对照组心肌片 (图 1A), 分别为 $(420.19 \pm 58.66) \mu\text{g/g}$ ($n = 6, P < 0.001$) 和 $(417.68 \pm 80.90) \mu\text{g/g}$ ($n = 6, P < 0.001$), 两个脱细胞组间无明显差异 ($P = 0.96$)。

总蛋白质定量检测显示相似结果, 正常对照组心肌片总蛋白质相对含量为 $(195.58 \pm 23.21) \mu\text{g/mg}$, SDS 脱细胞组和改良脱细胞组 ECM 薄片总蛋白质相对含量均明显低于正常对照组心肌片 (图 1B), 分别为 $(42.04 \pm 13.49) \mu\text{g/mg}$ ($n = 6, P < 0.001$) 和 $(44.22 \pm$

24.39) $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($n = 6$, $P < 0.001$), 两个脱细胞组间无明显差异 ($P = 0.88$)。

以上结果提示两种脱细胞方法均能有效去除ECM中残留细胞成分, 从理论上降低免疫原性。

2.2 SDS+Triton X-100改良脱细胞法能有效去除心肌细胞核, 并更好地保留ECM原有结构

如图2所示, HE染色后正常对照组心肌薄片肌纤维清晰可见, 可见清晰的核仁、心肌纤维及闰

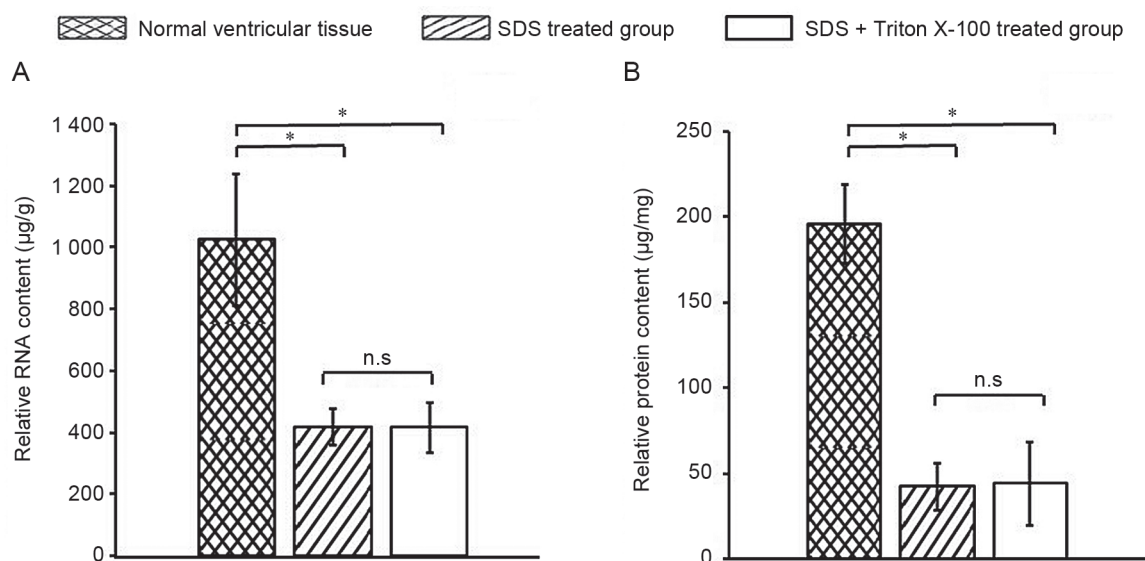


图 1. 脱细胞处理能有效去除ECM中残留细胞成分

Fig. 1. Decellularization can effectively reduce residual cell components in ECM. The relative residual total RNA (A) and total protein (B) contents in SDS treated group and SDS+Triton X-100 treated group were significantly lower than those in normal ventricular slices. Data were presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.001$. n.s., no significant difference. $n = 6$.

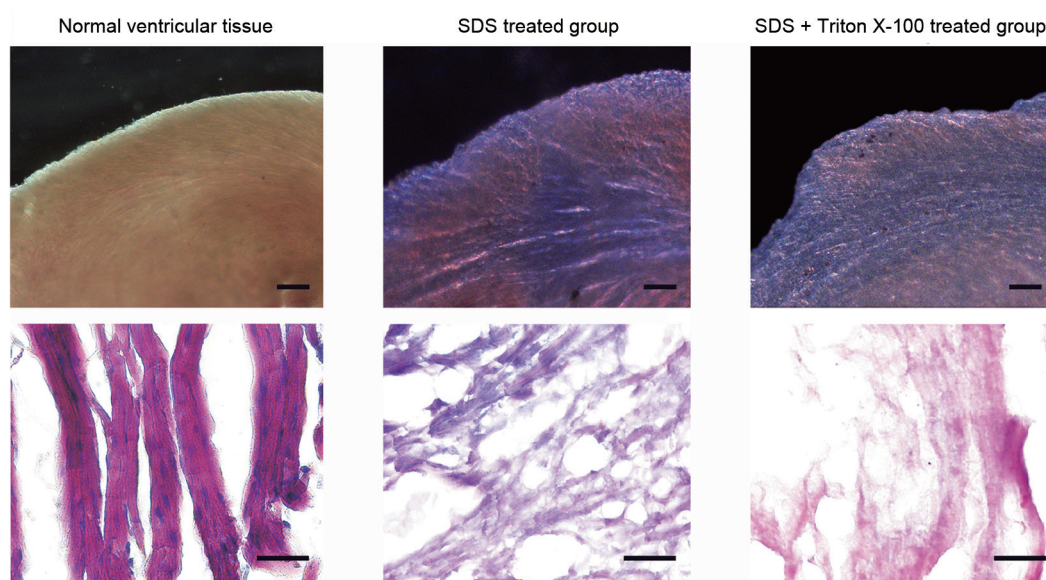


图 2. SDS+Triton X-100改良脱细胞法能有效去除心肌细胞核, 并更好地保留ECM原有结构

Fig. 2. SDS+Triton X-100 decellularization can effectively remove nuclei and better preserve original structure of ECM. Representative images of light microscopy (upper) and HE staining (lower) of normal ventricular tissue, SDS treated group and SDS+Triton X-100 treated group. A few granular nuclei can be observed in SDS treated group, while no sign of nuclei was observed in SDS+Triton X-100 treated group. Scale bar, 100 μm .

盘结构；脱细胞处理后，ECM 薄片颜色变为半透明。SDS 脱细胞组 ECM 中可见少量颗粒状核碎片分布 (图 2)；而改良脱细胞组 ECM 结构完整，未见明显核质分布 (图 2)，提示 SDS+Triton X-100 改良脱细胞法的去核质效果优于 SDS 法。

2.3 SDS+TritonX-100联合脱细胞法制备的ECM更好地保留了两种关键ECM成分：胶原蛋白IV和层粘连蛋白

正常对照组心肌薄片可见排列整齐的胶原蛋白 IV (如图 3) 和层粘连蛋白 (图 4) 分布，心肌细

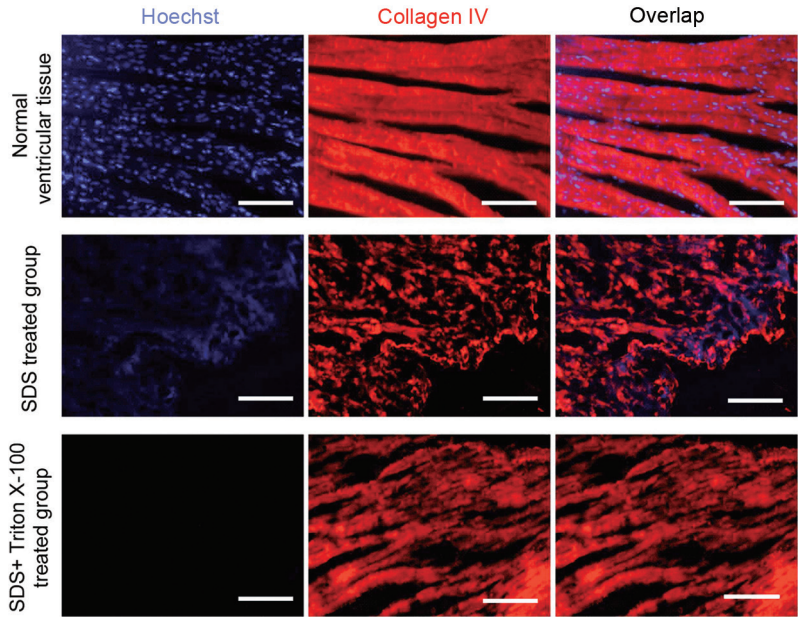


图 3. 胶原蛋白IV免疫荧光染色代表性照片

Fig. 3. Representative immunofluorescent staining images of collagen IV in normal ventricular tissue, SDS treated group and SDS Triton X-100 treated group. Red: collagen IV; Blue: nuclei (stained by Hoechst 33342). Scale bar, 100 μ m.

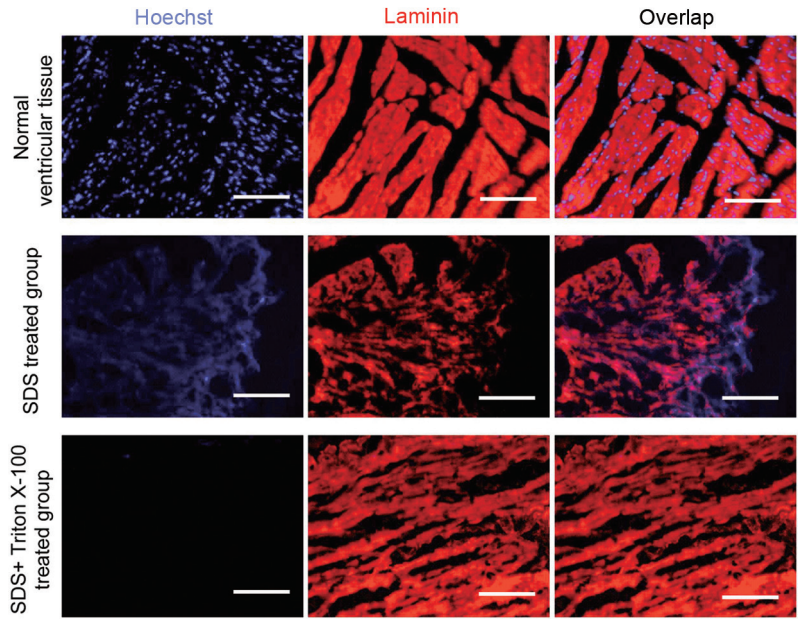


图 4. 层粘连蛋白免疫荧光染色代表性照片

Fig. 4. Representative immunofluorescent staining images of laminin in normal ventricular tissue, SDS treated group and SDS+Triton X-100 treated group. Red, laminin. Blue, nuclei (stained by Hoechst 33342). Scale bar, 100 μ m.

细胞核呈边缘锐利的蓝色点状荧光, 规则分布于心肌细胞中。SDS 脱细胞组中可见少量散在蓝色荧光点分布, 荧光点边缘模糊, 表明存在细胞核残留, 而胶原蛋白 IV (图 3) 和层粘连蛋白 (图 4) 排列疏松紊乱, 无明显方向性, 表明胶原纤维结构遭到破坏。改良脱细胞组中, 未见明显细胞核存在, 可见明显的胶原蛋白 IV (图 3) 和层粘连蛋白 (图 4) 规则有序分布, 分布特点与正常对照组心肌组织相似度高。

上述结果提示, SDS+Triton X-100 改良脱细胞效果好, 对于 ECM 关键成分及其超微结构的损伤明显低于 SDS 处理法, 是一种相对高效而温和的脱细胞方法。

2.4 SDS+Triton X-100处理得到的ECM具有良好的生物相容性, 能更有效地支持种子细胞的生长

接下来我们将 mES-CMs 和 MEFs 两种种子细胞于 ECM 薄片上共培养以检测 ECM 的生物相容

性。图 5 中绿色荧光点即为移植心肌细胞团块所在位置。如图 5A 所示, SDS 组 GFP 阳性的心肌细胞团块数量及范围在 0~6 天内逐步减少, 提示心肌细胞存活数量随共培养时间延长而下降; 而改良脱细胞组 GFP 阳性的心肌细胞团块数量在 0~6 天内未见明显改变, 表明心肌细胞能在 ECM 薄片上有效存活和生长。培养 4~6 天内, 可见荧光点区域向 ECM 内部延伸, 第 6 天可见 ECM 接近中央区域出现荧光点, 表明心肌细胞可能在 ECM 上发生迁移。

培养第 12 天, HE 染色显示, 在 SDS 组 ECM 表面可见种子细胞形成的细胞层, 但 ECM 中心部未见细胞 (图 5B 左), 而改良脱细胞组 ECM 内部可见明显细胞层, 表明移植细胞能向改良脱细胞组 ECM 薄片内部迁移。

以上结果提示 SDS 法制得的 ECM 不能在 0~12 天内有效支持心肌细胞存活和迁移; 而 SDS+Triton

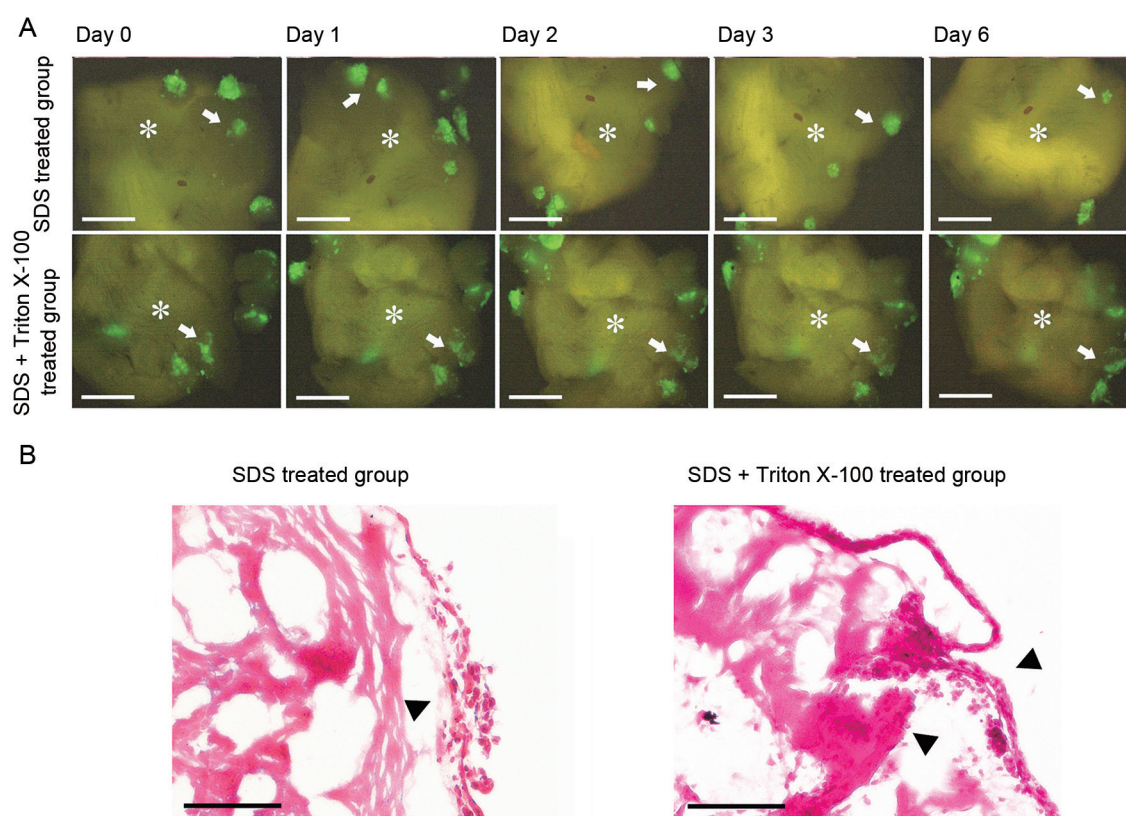


图 5. SDS+Triton X-100处理得到的ECM具有更良好的生物相容性, 能支持种子细胞的生长

Fig. 5. ECM acquired by SDS+Triton X-100 treatment has better biocompatibility and can support the growth of seeded cells. *A*: Representative fluorescent microscopy images of co-cultivation of ECM slices acquired by SDS treatment (upper) and SDS+Triton X-100 treatment (lower) with mES-CMs and MEFs. *, ECM slice. Arrow, mES-CMs clusters, green. *B*: Representative HE staining of ECM slices in SDS treated group (left) and SDS+Triton X-100 treated group (right) on day 12. ▲, cell clusters can be observed on the surface and internal of ECM slices. mES-CMs: murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes; MEFs: murine embryonic fibroblasts. Scale bar, 100 μ m.

X-100 改良脱细胞组 ECM 能有效支持 0~12 天内心肌细胞存活和迁移, 因此改良脱细胞组 ECM 在生物相容性上具有优势。

3 讨论

本研究首次使用心肌薄片制备 ECM, 并改良了原有的脱细胞方法, 制得性能优良的 ECM 薄片。本研究的主要结果有: (1) SDS+Triton X-100 改良脱细胞法制取的 ECM 中细胞成分含量比正常组织显著降低; (2) 改良脱细胞法对核质去除较 SDS 脱细胞法更加彻底; (3) 改良脱细胞法更好地保留了胶原蛋白 VI 和层粘连蛋白两种 ECM 关键成分; (4) 改良脱细胞法制得的 ECM 能更有效地支持种子细胞生长和迁移。

ECM 的脱细胞程度可通过检测 ECM 中总 RNA 和总蛋白相对含量的方法进行评价。虽然多数文献报道中提取的是总 DNA^[21,22], 但总 RNA 的提取过程相对总 DNA 较为简单易行, 并且同样能反映出脱细胞化程度^[23,24], 而总蛋白测定也是反映脱细胞化前后细胞成分含量的重要指标^[23]。SDS 脱细胞组和改良脱细胞组制备的 ECM 中, 残留总 RNA 和总蛋白相对含量与对照组相比均明显降低, 残留量与相关文献^[23]报道相似。然而 HE 染色及免疫荧光染色均提示 SDS 处理组有较多有形核质残留, ECM 结构破坏较大, 相关文献也证实单独应用 SDS 不能有效去除核质^[21]。而改良脱细胞组中未见明显核质, 表明改良脱细胞法去除核质的效果优于 SDS 脱细胞法。然而, 我们也发现尽管两组总 RNA 和总蛋白含量测定未见差异, 但 HE 染色及 Hoechst 染色却有差异。由此推断现有测定方法的灵敏度虽然可以反映去细胞化前后残留细胞成分含量的差异, 但尚不足以反映两种脱细胞化方法的差异性。

天然心肌组织 ECM 中的主要成分包括胶原蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白、聚糖等, 不同脱细胞方法制得的 ECM 的主要成分不尽相同。其中胶原蛋白和层粘连蛋白是两项检测 ECM 成分保留的常用指标^[22,25]。本研究中, 免疫荧光染色表明 SDS 脱细胞组中胶原蛋白 IV 和层粘连蛋白含量较正常心肌明显减少, 纤维结构排列紊乱, 说明 SDS 脱细胞法对该两种 ECM 关键成分结构破坏较大。相关文献亦提示 SDS 对心肌等组织的破坏作用强烈^[26]。而改良脱细胞组中, 胶原蛋白 IV 和层粘连蛋白纤维排列整齐。与相关文献^[26]对比表明, 改良脱细

胞法制得的 ECM 比 SDS 脱细胞法制得的 ECM 与正常心肌 ECM 更为相似, 证实 SDS+Triton X-100 脱细胞法能在显著提高脱细胞效率的同时, 更好保留 ECM 关键成分。这可能与 Triton X-100 的使用有密切关系, 相关文献^[27,28]亦提示 Triton X-100 的脱细胞化作用相对温和, 更有利于 ECM 超微结构的保护。而 Triton X-100 温和脱细胞化的具体机制尚未见相关文献报道, 可能与其非离子型的化学结构有关。

为了检测 ECM 生物相容性, 许多研究组采用不同类型的种子细胞重细胞化 ECM, 种子细胞包括胚胎干细胞、心肌细胞、血管内皮细胞及成纤维细胞等^[22,29,30]。检测的指标主要为细胞的存活时间和生长状况。Wang 等报道骨髓间充质细胞能在猪心肌 ECM 上存活 2 周^[31]。Sarig 等报道血管内皮细胞可在 ECM 内形成血管样结构^[22], 而 Higuchi 等报道心肌 ECM 可支持小鼠胚胎干细胞存活 1 周以上并向心肌细胞分化^[29]。本研究首次采用 mES-CMs 和 MEFs 与改良脱细胞法制得的 ECM 共培养, 其中 mES-CMs 为胚胎干细胞来源的高纯度心肌细胞, 能够确切地模拟心肌 ECM 支持心肌细胞生长的过程。结果表明移植细胞能在 ECM 上有效存活 12 天以上, 移植细胞生长良好并向 ECM 内部迁移生成细胞团。而 SDS 脱细胞化制得的 ECM 则不具备有效支持移植细胞生长的能力。该结果表明 SDS+Triton X-100 脱细胞法制得的 ECM 不仅能支持 mES-CMs 和 MEFs 的存活和生长, 还能支持移植细胞向支架内部迁移, 相对 SDS 脱细胞法制得的 ECM 具有更好的生物相容性。

综上所述, SDS+Triton X-100 联合脱细胞法能更有效地去除细胞成分, 并保护 ECM 中关键成分及结构, 制得的心肌 ECM 薄片具有良好的生物相容性, 能支持移植细胞生长和迁移, 是一种性能优良的支架材料。

参考文献

- 1 Murry CE, Field LJ, Menasché P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 2005; 112(20): 3174-3183.
- 2 Karikkineth BC, Zimmermann WH. Myocardial tissue engineering and heart muscle repair. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14(1): 4-11.
- 3 Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis

- B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 2006; 12(4): 452–458.
- 4 Vu DT, Martinez EC, Kofidis T. Myocardial restoration: is it the cell or the architecture or both? *Cardiol Res Pract* 2012; 2012: 240497.
- 5 Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, Gepstein L, Levenberg S. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2007; 100(2): 263–272.
- 6 Dvir T, Timko BP, Brigham MD, Naik SR, Karajanagi SS, Levy O, Jin H, Parker KK, Langer R, Kohane DS. Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nat Nanotechnol* 2011; 6(11): 720–725.
- 7 Zhou J, Chen J, Sun H, Qiu X, Mou Y, Liu Z, Zhao Y, Li X, Han Y, Duan C, Tang R, Wang C, Zhong W, Liu J, Luo Y, Mengqiu Xing M, Wang C. Engineering the heart: evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function. *Sci Rep* 2014; 4: 3733.
- 8 Badyalak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011; 13: 27–53.
- 9 Hrebikova H, Diaz D, Mokry J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; doi: 10.5507/bp.2013.076.
- 10 Ota T, Taketani S, Iwai S, Miyagawa S, Furuta M, Hara M, Uchimura E, Okita Y, Sawa Y. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation. *Ann Thorac Surg* 2007; 83(4): 1501–1507.
- 11 Jiang YD (姜煜东), Li WS, Yin MM, Yu C, Hu XW, Xi JY. Progress on cardiac extracellular matrix (ECM): acquirement, evaluation and modification of cardiac ECM. *J Physiol Stud (生理学研究)* 2013; 1(1): 1–6 (Chinese, English abstract).
- 12 Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez JV, Jorge-Herrero E, Rojo FJ, Guinea GV, Mata-Mata JL. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater* 2011; 7(3): 1241–1248.
- 13 Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009; 30(22): 3749–3756.
- 14 Pagoulitou E, Triantaphyllidou IE, Vynios DH, Papachristou DJ, Koletsis E, Deligianni D, Mavrilas D. Biomechanical and structural changes following the decellularization of bovine pericardial tissues for use as a tissue engineering scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 6(23): 1387–1396.
- 15 Pillekamp F, Reppel M, Dinkelacker V, Duan Y, Jazmati N, Bloch W, Brockmeier K, Hescheler J, Fleischmann BK, Koehling R. Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16(1–3): 127–132.
- 16 Xi J, Khalil M, Spitkovsky D, Hannes T, Pfannkuche K, Bloch W, Sarić T, Brockmeier K, Hescheler J, Pillekamp F. Fibroblasts support functional integration of purified embryonic stem cell-derived cardiomyocytes into avital myocardial tissue. *Stem Cells Dev* 2011; 20(5): 821–830.
- 17 Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, Haverich A, Lichtenberg A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs* 2010; 34(3): 206–210.
- 18 Tang M, Yin M, Tang M, Liang H, Yu C, Hu X, Luo H, Baudis B, Haustein M, Khalil M, Sarić T, Hescheler J, Xi J. Baicalin maintains late-stage functional cardiomyocytes in embryoid bodies derived from murine embryonic stem cells. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(1): 86–99.
- 19 Cheng Y, Wang L, Tang M, Yin M, Cui Y, Liang H, Song Y, Hu X, Luo H, Gao Y, Wang J, Hescheler J, Xi J. Effects of puerarin on cardiac differentiation and ventricular specialization of murine embryonic stem cells. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(4): 789–800.
- 20 Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; 203(10): 2315–2327.
- 21 Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(2): 173–184.
- 22 Sarig U, Au-Yeung GC, Wang Y, Bronshtein T, Dahan N, Boey FY, Venkatraman SS, Machluf M. Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: a potential platform for myocardial tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(19–20): 2125–2137.
- 23 Hecker L, Khait L, Radnoti D, Birla R. Development of a microperfusion system for the culture of bioengineered heart muscle. *ASAIO J* 2008; 54(3): 284–294.
- 24 Khait L, Hecker L, Radnoti D, Birla RK. Micro-perfusion for cardiac tissue engineering: development of a bench-top

- system for the culture of primary cardiac cells. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(5): 713–725.
- 25 Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, Barth M, Hoffmann S, Huelsmann J, Preuss K, Lichtenberg A. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(9): 915–926.
- 26 Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, Simon P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003; 26(5): 421–427.
- 27 Wang KX (王克学), Zhang JF, Zhan QP, Jian XH. Effect of trypsin and Triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves. *J First Mil Med Univ (第一军医大学学报)* 2005; 25(1): 22–25 (Chinese, English abstract).
- 28 Vavken P, Joshi S, Murray MM. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res* 2009; 27(12): 1612–1618.
- 29 Higuchi S, Lin Q, Wang J, Lim TK, Joshi SB, Anand GS, Chung MC, Sheetz MP, Fujita H. Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2013; 115(3): 320–325.
- 30 Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5(1): 15.
- 31 Wang B, Borazjani A, Tahai M, Curry AL, Simionescu DT, Guan J, To F, Elder SH, Liao J. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94(4): 1100–1110.