



DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.022

<http://www.gjbl.net/gjblkx/fileup/PDF/201306563.pdf>

细胞外基质作为组织工程支架的最新进展

宋小琴, 刘敏, 梁芳, 胡平安 综述

(中南大学湘雅三医院内分泌科, 长沙 410013)

[摘要] 目前存在很多由于先天缺陷、创伤或肿瘤切除等导致人体完整性缺陷的现象, 故近年来组织工程成为研究热点。支架材料是组织工程的要素之一。人脂肪组织细胞外基质粉末呈三维空间结构, 能促进干细胞增殖、分化、新生血管形成及生长因子释放等, 已成为组织工程支架的新材料。

[关键词] 脂肪组织工程; 支架; 细胞外基质; 人脂肪组织细胞外基质粉末

Latest progress in the study of extracellular matrix as scaffolds in tissue engineering

SONG Xiaoqin, LIU Min, LIANG Fang, HU Ping'an

(Department of Endocrinology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Currently, defect in bodily integrity is a common phenomenon due to congenital faultiness, trauma or tumor excision. Thus, tissue engineering is attracting more and more research attention. Scaffold is an essential element of tissue engineering. Extracellular matrix powder of human adipose tissue has a three-dimensional structure and can promote stem cells proliferation, differentiation, newborn blood vessel formation and growth factors release, which is becoming new material for tissue engineering scaffold.

Key words adipose tissue engineering; scaffolds; extracellular matrix; extracellular matrix powder of human adipose tissue

因创伤、烧伤、肿瘤切除、先天缺陷等造成骨、皮肤、乳房、脂肪组织等的缺失, 可导致机体完整性缺陷及功能障碍, 组织工程技术为组织重建提供了可能。组织工程的组成三要素为细胞、支架及生长因子。众多研究表明组织工程支架材料必须具有三维空间结构, 三维空间结构影响干细胞的黏附、分化、细胞表型等^[1-2]。近年, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)支架因为其

独特的优点而成为目前应用最广的支架材料^[3-4]。本文就ECM成分、在组织工程中的应用及人脂肪组织ECM粉末作详细描述。

1 ECM的成分

ECM是由细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子, 它在组织细胞的分

收稿日期 (Date of reception): 2013-06-25

作者简介 (Biography): 宋小琴, 硕士研究生, 主要从事脂代谢及脂肪组织重建的相关研究。

通信作者 (Corresponding author): 胡平安, Email:hupagx@163.com

化、增殖发育、机体生长发育、维持细胞极性、炎症反应及伤口愈合等过程中都起着重要作用。ECM的主要成分包括蛋白多糖、弹性蛋白及糖蛋白等, 它们在不同组织ECM中的亚型或比例不同。

1.1 蛋白多糖

蛋白多糖又称黏多糖, 为ECM的主要成分, 是多糖分子与蛋白质结合而成的复合物。多糖部分为糖胺多糖, 又称氨基己糖多糖, 由成纤维细胞产生, 主要分硫酸化和非硫酸化两类。前一类主要有硫酸软骨素、硫酸角质素、硫酸肝素等; 后一类为透明质酸, 是曲折盘绕的长链大分子, 构成蛋白质多糖复合物的主干; 其他糖胺多糖则与蛋白质结合, 形成蛋白多糖亚单位, 后者再通过结合蛋白连接透明质酸长链分子形成蛋白多糖聚合物。大量蛋白多糖聚合物形成许多微小空隙的分子筛, 使ECM成为限制细菌、肿瘤细胞、寄生虫等有害大分子物质扩散的防御屏障。某些能产生透明质酸酶的细菌、癌细胞等, 可通过破坏ECM的防御屏障而得到扩散。有学者单独用透明质酸作为脂肪组织工程支架, 但其吸收过快、限制细胞分化为成熟脂肪细胞, 使其不能成为最好的组织工程支架。

1.2 弹性蛋白及糖蛋白

弹性蛋白是弹性纤维的主要组成成分, 富含甘氨酸、脯氨酸等疏水性氨基酸, 在肺、大动脉、韧带中含量丰富; 细胞有黏附弹性蛋白的受体, 并由此介导细胞移动。目前未发现单独将弹性蛋白作为支架用于组织工程的研究。

糖蛋白普遍存在于动物、植物及微生物中, 种类繁多, 功能广泛, 可按其存在方式分为三类: 1) 可溶性糖蛋白, 存在于细胞内液、各种体液及腔道腺体分泌的黏液中; 2) 膜结合糖蛋白; 3) 结构糖蛋白, 为不溶性大分子糖蛋白, 如胶原及各种非胶原糖蛋白(纤黏连蛋白、层黏连蛋白等)。它们的功能不仅仅是作为ECM的结构成分起支持、连接及缓冲作用, 更重要的是参与细胞的识别、黏附及迁移, 并调控细胞的增殖及分化。有研究表明胶原可单独作为支架应用于组织工程^[5], 但因其吸收过快、不能很好地促进组织新生血管形成而使其应用受到限制。另有研究表明纤维结合素既可促进组织细胞分化, 亦可抑制组织细胞分化, 其是否能单独作为组织工程支架需进一步研究。

2 ECM 作为组织工程支架的现状

传统组织工程支架材料存在力学性能差、降解速率慢、降解后产物吸收困难、抑制宿主细胞功能及对宿主产生不利影响等缺点。近年来发现一种新型的生物支架, 即ECM支架。ECM支架呈三维空间结构, 能促进干细胞增殖、分化、宿主组织新生血管形成及释放生长因子等; ECM支架的同源性使其具有很好的生物相容性^[6]。研究表明合成的ECM作为生物支架材料缺少生物活性、生物可变性及向目的组织结构分化的能力, 同种或异种ECM可以作为生物支架材料的首选。

ECM支架在组织重建中表现出以下优点: 1) ECM支架能促进移植物新生血管形成、宿主自身细胞渗透、细胞增殖及宿主组织自身ECM的再生、储存; 2) ECM支架降解过程中可释放VEGF, b-FGF和TGF- β 等生长因子及特殊肽类, 它们能在支架降解后继续促进新生组织分化、生长; 3) ECM能为细胞生长和细胞的信号转导通路提供支架, Brodie等^[7]发现ECM成分在体内存在受体(如整合素、多配体聚糖等横跨膜受体)可通过配体与受体之间的相互作用调控信号转导通路进而影响细胞分化、增殖等; 4) 许多研究指出ECM可被完全降解, 95%的降解产物通过尿液排泄, 几乎没有降解物被宿主组织吸收; 5) ECM支架用于组织工程很少出现重建组织坏疽、裂开、瘢痕等不良反应。

目前已有研究从心瓣膜、血管、皮肤、神经、骨骼肌、肌腱、韧带、小肠黏膜下皮、膀胱、肝脏和脂肪等组织中^[4, 8-9]制备ECM支架, 并用于重建脂肪、心、软骨、肝、尿道等组织^[8, 10-13]。应用最多的异种ECM支架为取自猪的小肠黏膜的ECM。

近年来用于组织工程的ECM支架多数取自异种动物, 它们因为免疫原性、对宿主的毒性等原因而使其应用受到限制。研究者们发现人脂肪组织来源的ECM作为支架取材方便、来源丰富、风险低、生物相容性好, 既具备ECM支架的优点, 还能分泌脂肪因子, 用于人类自身组织无免疫原性。

3 人脂肪组织 ECM 粉末的提取、特点及应用

3.1 人脂肪组织 ECM 粉末的来源和提取

人脂肪组织ECM来源于正常人脂肪吸脂术, 来源丰富、取材方法简单、对供体无损伤, 且人脂肪组织ECM粉末可通过注射器皮下注射, 创伤小。早在1984年就有学者研究ECM粉末与软骨分

化的关系; 2004年有学者采用2种不同的方法将来自动物膀胱的ECM制成粉末, 并比较了2种方法所得的ECM粉末的物理形态; 2007年有学者提出凝胶或粉末支架均可通过注射器行皮下注射, 减少了宿主损伤、感染的风险。但ECM凝胶支架因为缺乏稳定性、缺少营养和氧气的供应等使其使用受到限制, 而ECM粉末支架可克服上述缺点^[14]。2009年Choi等^[8]首先制备了人脂肪组织ECM粉末。

众多研究中提到人脂肪组织ECM粉末的提取过程^[8, 15-16]。经典的是Choi等^[8]通过脂肪吸脂术收集20~40岁健康人的脂肪组织, 洗涤后, 加入蒸馏水, 反复离心去除上层油脂样成分, 得凝胶样、黏稠的悬浮物, 再次洗涤后-70℃条件下冻干, 压碎后即得到人脂肪组织ECM粉末。

3.2 人脂肪组织 ECM 粉末的电镜下表现

许多学者^[8, 16-17]均制备出人脂肪组织ECM粉末, 其外观呈白色粉末状、颗粒均匀、质地疏松; 喷金后电镜下呈现三维空间结构, 具有多孔样结构、表面积大、颗粒体积和形状具有高度多样性; 支架的三维空间结构对组织工程有重要的意义, 有研究表明脂肪干细胞在具有三维空间结构的人脂肪组织ECM粉末支架中培养10 d, 出现10倍的扩增, 对比二维空间结构仅出现2.8倍的扩增^[18]。

3.3 人脂肪组织 ECM 粉末的灭菌

目前关于ECM支架灭菌方法未达成一致: Choi等^[8]用环氧乙烷灭菌; 蔡鹏飞等^[16]建议用钴-⁶⁰γ射线、环氧乙烷灭菌。然而有学者提出环氧乙烷、γ-射线或电子射线灭菌均能改变ECM超微结构及机械性能, 并引起宿主的免疫反应等。近年来提出超临界二氧化碳(SC-CO₂)可用于ECM的灭菌, 且不影响ECM成分, 但此种灭菌方法需要更进一步的研究。因此人脂肪组织ECM支架的灭菌方法有待进一步研究。

3.4 人脂肪组织 ECM 粉末与人脂肪干细胞黏附的测定

研究中多用某种试剂标记细胞, 如用苏木精和伊红^[8, 12]、脂溶性红色染料(adipo-red)^[8, 15]、红细胞膜红色荧光探针(DiI)^[16]等标记细胞, 在荧光显微镜下观察荧光间接反映人脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells, hASCs)与人脂肪组织ECM支架的黏附率; 此外细胞计数^[16]、

RT-PCR^[12]等方法通过测定脂肪细胞分化过程中基因或基因表达产物、测定活细胞光吸收值, 间接反映活细胞数量等来反映hASCs与人脂肪组织ECM支架的黏附率。

3.5 人脂肪组织 ECM 粉末作为支架的现状

2009年Choi等^[8]首次制备出人脂肪组织ECM粉末, 并在体外及裸鼠体内试验证明人脂肪组织ECM粉末-hASCs可促进hASCs及宿主细胞分化、宿主新生血管形成、新生脂肪组织的形成。其后Choi等^[6, 16-20]均用不同的方法制备出人脂肪组织ECM粉末, 并作为支架用于体外及体内脂肪组织再生, 证明了它是同种异体或自体脂肪组织再生的理想支架。有学者对人脂肪组织ECM粉末进行修饰来延缓支架移植后在体内的降解过程^[20]。然而值得一提的是2011年Choi等^[12]制备了人脂肪组织ECM和hASCs, 并提取、鉴定ECM中的生长因子, 然后在软骨分化介质中培养人脂肪组织ECM支架-hASCs-(TGF-β1), 试验表明在TGF-β1的诱导下, 人脂肪组织ECM可促进hASCs向软骨细胞分化, 实现软骨重建, 此研究^[12]提出一个新的观点: 人脂肪组织ECM粉末在未来的研究中可以用于实现自体多种组织的重建, 扩大了人脂肪组织ECM粉末的应用范围。

3.6 目前仍存在的问题

众多研究表明人脂肪组织ECM粉末是脂肪组织工程的理想支架, 但目前研究中仍存在以下问题: 1) 关于它的灭菌方法仍未达成一致, 需研究出一种对其本身特性及宿主组织影响较小的灭菌方法; 2) 它目前只能用于自体移植, 如何去除它的免疫原性, 使其能更好地用于组织工程也是目前限制人脂肪组织ECM粉末应用的一个因素。

4 结 语

人脂肪组织ECM粉末来源广泛、取材方便、损伤性小、粉末制作过程简单, 具有稳定的三维、多孔样结构, 颗粒体积和形状具有高度多样性; 它包括多种脂肪因子、与hASCs黏附率高, 具有良好的生物相容性, 可克服传统组织工程支架材料吸收速度快、细胞毒性、免疫排斥反应、宿主新生血管生成障碍等缺点, 是人体组织工程技术新的支架来源。

参考文献

1. Chung E, Nam SY, Ricles LM, et al. Evaluation of gold nanotracers to track adipose-derived stem cells in a PEGylated fibrin gel for dermal tissue engineering applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 325-336.
2. Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21: 341-354.
3. 李舰, 许艳华. 鼻中隔软骨组织工程中细胞外基质的研究[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(2): 140-144.
LI Jian, XU Yanhua. Extracellular matrix in nasal septum cartilage tissue engineering[J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2013, 33(2): 140-144.
4. Wang L, Johnson JA, Chang DW, et al. Decellularized musculofascial extracellular matrix for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(11): 2641-2654.
5. Jurgens WJ, Lu Z, Zandieh-Doulabi B, et al. Hyperosmolarity and hypoxia induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells in a collagen Type 2 hydrogel[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(7): 570-578.
6. Choi JS, Kim BS, Kim JY, et al. Decellularized extracellular matrix derived from human adipose tissue as a potential scaffold for allograft tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 97(3): 292-299.
7. Broadie K, Baumgartner S, Prokop A. Extracellular matrix and its receptors in Drosophila neural development[J]. *Dev Neurobiol*, 2011, 71(11): 1102-1130.
8. Choi JS, Young HJ, Kim BS, et al. Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering[J]. *J Control Release*, 2009, 139(1): 2-7.
9. Cheng NC, Estes BT, Young TH, et al. Genipin-crosslinked cartilage-derived matrix as a scaffold for human adipose-derived stem cell chondrogenesis[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(3/4): 484-496.
10. Wainwright JM, Hashizume R, Fujimoto KL, et al. Right ventricular outflow tract repair with a cardiac biologic scaffold[J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195(1/2): 159-170.
11. Bao J, Shi Y, Sun H, et al. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats[J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(5): 753-766.
12. Choi JS, Kim BS, Kim JD, et al. In vitro cartilage tissue engineering using adipose-derived extracellular matrix scaffolds seeded with adipose-derived stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(1/2): 80-92.
13. Franck D, Gil ES, Adam RM, et al. Evaluation of silk biomaterials in combination with extracellular matrix coatings for bladder tissue engineering with primary and pluripotent cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56237.
14. Lee SJ, Atala A. Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering[J]. *Biomed Mater*, 2013, 8(1): 010201.
15. Brown BN, Freund JM, Han L, et al. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(4): 411-421.
16. 察鹏飞, 高建华, 陈阳, 等. 人脂肪组织细胞外基质支架的构建[J]. *中华整形外科杂志*, 2012, 28(1): 55-60.
CHA Pengfei, GAO Jianhua, CHEN Yang, et al. Construction of scaffold with human extracellular matrix from adipose tissue[J]. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 2012, 28(1): 55-60.
17. Choi JS, Yang HJ, Kim BS, et al. Fabrication of porous extracellular matrix scaffolds from human adipose tissue[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(3): 387-396.
18. Choi JS, Kim BS, Kim JD, et al. In vitro expansion of human adipose-derived stem cells in a spinner culture system using human extracellular matrix powders[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 345(3): 415-423.
19. Young DA, Ibrahim DO, Hu D, et al. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(3): 1040-1049.
20. Wu J, Nahas Z, Kimmerling KA, et al. An injectable adipose matrix for soft-tissue reconstruction[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 129(6): 1247-1257.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 宋小琴, 刘敏, 梁芳, 胡平安. 细胞外基质作为组织工程支架的最新进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(6): 563-566. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.022

Cite this article as: SONG Xiaoqin, LIU Min, LIANG Fang, HU Ping'an. Latest progress in the study of extracellular matrix as scaffolds in tissue engineering[J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2013, 33(6): 563-566. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.06.022