

Triton X-100 与 SDS 对 SD 大鼠皮下移植猪主动脉瓣巨噬细胞表型极化的作用比较

李芹 夏翠萍 吴昊 龚德军 刘晓红 陆方林

【摘要】 目的:比较非离子型去污剂聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)和离子型去污剂十二烷基硫酸钠(SDS)对 SD 大鼠皮下移植猪主动脉瓣巨噬细胞表型极化的作用。 方法:分别采用 Triton X-100 和 SDS 对猪主动脉瓣进行去细胞处理,将瓣膜分为 Triton X-100 处理组和 SDS 处理组,三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液处理组作为未处理组。将处理后的猪主动脉瓣埋入 SD 大鼠胸部左右两侧皮下,建立 SD 大鼠皮下移植猪主动脉瓣模型,分别在第 3、14、28 天时取出移植的猪主动脉瓣,免疫组织化学染色比较猪主动脉瓣中 CCR7(M1 型巨噬细胞标志物)和 CD163(M2 型巨噬细胞标志物)的表达情况,计算 M2 型巨噬细胞与 M1 型巨噬细胞的比值($M2 \text{ 型}/M1 \text{ 型巨噬细胞} = CD163^+ \text{ 细胞数}/CCR7^+ \text{ 细胞数}$)。 结果:未处理组猪主动脉瓣皮下移植 28 d 时, $M2 \text{ 型}/M1 \text{ 型巨噬细胞比值} < 1$,巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞极化,发挥促炎作用;SDS 处理组、Triton X-100 处理组瓣膜在皮下移植 14 d 和 28 d 时, $M2 \text{ 型}/M1 \text{ 型巨噬细胞比值} > 1$,巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化,发挥促进组织修复的作用。瓣膜皮下包埋 14 d 时,SDS 处理组猪主动脉瓣 $M2 \text{ 型}/M1 \text{ 型巨噬细胞比值}$ 明显高于 Triton X-100 处理组和未处理组(P 均 < 0.05)。 结论:去细胞处理可促进移植瓣膜中巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化,采用 SDS 进行去细胞处理对巨噬细胞极化的作用优于 Triton X-100。

【关键词】 十二烷基硫酸钠;聚乙二醇辛基苯基醚;猪主动脉瓣膜;去细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.01.009

Effects of Triton X-100 and SDS on phenotypic polarization of macrophages in SD rats subcutaneous transplanted porcine aortic valve LI Qin, XIA Cuiping, WU Hao, GONG Dejun, LIU Xiaohong, LU Fanglin. Department of Cardiovascular Surgery, Changhai Hospital, 200433 Shanghai, China

【Abstract】 Objective: To compare the effects of non-ionic detergent polyethylene glycol octylphenyl ether (Triton X-100) and ionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) on phenotypic polarization of macrophages in SD rats subcutaneous transplanted porcine aortic valve. **Methods:** The porcine aortic valve was decellularised by Triton X-100 and SDS separately and divided into Triton X-100 treatment group and SDS treatment group, while Tris buffer treatment group was used as blank control. After the porcine aortic valve was implanted into the left and right sides of SD rat's chest to establish a subcutaneous transplantation of porcine aortic valve model in SD rats, the transplanted porcine aortic valve was removed at the 3 d, 14 d and 28 d respectively. Then the expression of CCR7 (M1 macrophage marker) and CD163 (M2 macrophage marker) in the porcine aortic valve were compared by immunohistochemical staining and the ratio of $CD163^+ \text{ cells}/CCR7^+ \text{ cells}$ (M2/M1 macrophage ratio) was calculated. **Results:** The results of immunohistochemistry showed that the M2/M1 macrophage ratio < 1 in the blank control group at the 28th day of subcutaneous transplantation, indicating that non-cellular porcine valve tissue promoted polarization of macrophages into M1 macrophages in vivo and

项目基金:科技部国家重点研发计划(2016YFC1100900)

作者单位:200433 上海,长海医院心血管外科

通信作者:陆方林,Email:FangLL_xxwk@126.com

played an important role in promoting inflammatory response. M2/M1 macrophage ratio >1 in SDS and Triton X-100 treating valves at 14 d and 28 d after subcutaneous transplantation, suggesting that non-cellular porcine valve tissue promoted polarization of macrophages into M2 macrophages in vivo and played an important role in promoting tissue repair. The M2/M1 macrophage ratio of SDS group was significantly higher than those of Triton X-100 group and blank control group (both $P < 0.05$).

Conclusions: Decellularization can promote the polarization of macrophages into M2 macrophages in transplanted valves and SDS is superior to Triton X-100.

【Key words】 Sodium dodecyl sulfate; Polyethylene glycol octylphenyl ether; Porcine aortic valve; Decellularization

去细胞处理的猪主动脉瓣是构建组织工程瓣膜的重要材料。去细胞处理能有效降低猪主动脉瓣的免疫性,增强瓣膜的体内生物相容性,提高瓣膜的耐久性^[1-2]。聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)与十二烷基硫酸钠(SDS)是猪主动脉瓣去细胞处理最常用的试剂。SDS 作为一种离子型去污剂,在低浓度下即可完全去除猪主动脉瓣中的细胞^[3-4],而 Triton X-100 属于非离子型去污剂,可以有效去除细胞的质膜和内膜系统,使抗体及大分子物质能够进入胞浆。

近年来,巨噬细胞极化在组织移植领域受到关注。研究证实,极化的巨噬细胞能够影响局部免疫反应,调控组织修复过程^[5]。但在对去细胞猪主动脉瓣支架材料的研究中,有关化学处理方法对巨噬细胞极化影响的研究较少。本研究分别采用 SDS 和 Triton X-100 对猪主动脉瓣进行去细胞处理,并通过体内实验分析两种去细胞方法对巨噬细胞极化的影响,以期为心脏瓣膜组织工程研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

Triton X-100 购自美国 Sigma 公司;SDS、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自国药化学试剂有限公司;CD163 抗体购自美国 Adcam 公司;CCR7 抗体购自巴傲得生物科技有限公司;S-P 超敏试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;二甲氨基偶氮苯(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Triton X-100 缓冲液的配制方法:配制 10 mmol/mL 的 Tris 缓冲液,加入 1% Triton X-100 试剂,调节 pH 值为 7.6。SDS 缓冲液的配制方法:配制 10 mmol/mL 的 Tris 缓冲液,加入 1% SDS 试剂,调节 pH 值为 7.6。Triton X-100 和 SDS 缓冲液中均加入青链霉素双抗。

1.2 猪主动脉瓣的获取

于上海五丰上食食品有限公司购买新鲜宰杀猪的心脏,清洁条件下在 30 min 内取出心脏瓣膜。将瓣膜置入 4 ℃ 无菌 PBS 中,运送回实验室,在无

菌操作台中用 PBS 反复清洗干净。

1.3 去细胞瓣膜的制备

将新鲜完整的猪主动脉瓣($n = 36$)随机分为 3 组。未处理组($n = 12$):置于无菌的 Tris 缓冲液中,40 ℃ 摇床振荡 48 h,每 8 h 换液 1 次。Triton X-100 处理组($n = 12$):置于 Triton X-100 缓冲液中,40 ℃ 摇床振荡 48 h,每 8 h 换液 1 次,然后在含有双抗的蒸馏水中 4 ℃ 浸泡 12 h。SDS 处理组($n = 12$):置于 SDS 缓冲液中,40 ℃ 摇床振荡 48 h,每 8 h 换液 1 次。3 组完成上述操作后,换含有双抗的 PBS,4 ℃ 浸泡 72 h,每 8 h 换液 1 次。

1.4 建立 SD 大鼠皮下移植猪主动脉瓣模型

18 只 4 周龄雌性 SD 大鼠购于第二军医大学实验动物中心,将其随机平均分配给未处理组、Triton X-100 处理组和 SDS 处理组以备皮下植入瓣膜。大鼠经异氟烷吸入麻醉后仰卧位固定于操作台,于大鼠胸部左右两侧各做长约 2 cm 的切口,每侧埋入 1 片经上述方法处理后的瓣膜,随后缝合切口并于动物中心正常饲养。分别于瓣膜组织植入皮下后第 3、14、28 天时将各组中 2 只 SD 大鼠皮下移植的瓣膜组织取出,以便进一步分析。

1.5 免疫组织化学染色

将瓣膜标本置于 10% 福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡入水,梯度酒精脱水,柠檬酸钠缓冲液抗原修复。过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min, PBS 冲洗后非免疫性动物血清室温孵育 10 min。加入 CCR7 一抗(1:200)、CD163 一抗(1:500),4 ℃ 孵育过夜,加入生物素标记的二抗,室温孵育 10 min。加入链霉菌-过氧化物酶溶液室温孵育后,DAB 显色,苏木素复染细胞核,1% 盐酸乙醇分化,碳酸锂返蓝,无水乙醇脱水,中性树胶封片观察。免疫组织化学染色结果判定方法:CD163、CCR7 主要定位于细胞膜和(或)细胞浆,以胞膜和(或)胞浆出现棕黄色颗粒为阳性。随机选定 10 个高倍镜视野,计数阳性细胞数,取平均值。

1.6 统计学分析

统计学分析采用 GraphPad 软件,数据以均数 ± 标准差表示,两组间比较采用独立样本的 *t* 检验或 Wilcoxon 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瓣膜移植中 CCR7 免疫组织化学染色结果

CCR7 免疫组织化学染色结果见图 1、表 1。经

处理的猪主动脉瓣膜于皮下移植 3 d、14 d 和 28 d 后,未处理组、Triton X-100 处理组与 SDS 处理组瓣膜中均可见 CCR7 表达,其中 SDS 处理组 CCR7⁺ 细胞数显著少于 Triton X-100 处理组与未处理组(*P* 均 < 0.05)。但 Triton X-100 处理组与未处理组的差异无统计学意义。

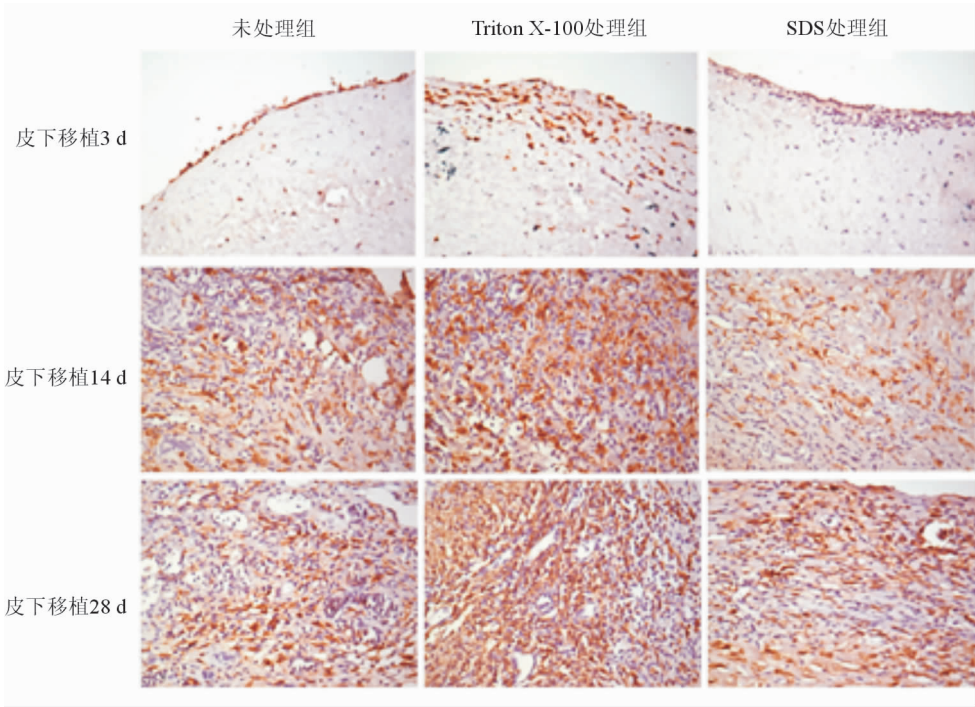


图 1 免疫组织化学染色法检测瓣膜移植中 CCR7 表达情况 (×400)

表 1 高倍镜视野下各组瓣膜 CCR7⁺ 细胞数比较/个

组别	皮下移植 3 d	皮下移植 14 d	皮下移植 28 d
未处理组	62.00 ± 13.29	115.30 ± 32.37	118.30 ± 35.86
Triton X-100 处理组	79.00 ± 28.75	123.80 ± 34.48	110.80 ± 43.35
SDS 处理组	25.75 ± 17.40 ⁽¹⁾⁽²⁾	37.00 ± 13.29 ⁽¹⁾⁽²⁾	48.50 ± 25.65 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与未处理组相比,⁽¹⁾*P* < 0.05;与 Triton X-100 组相比,⁽²⁾*P* < 0.05

2.2 瓣膜移植中 CD163 免疫组织化学染色结果

CD163 免疫组织化学染色结果见图 2、表 2。经处理的猪主动脉瓣膜于皮下移植 3 d、14 d 后,未处理组、Triton X-100 处理组和 SDS 处理组瓣膜中均可观察到 CD163 表达,其中 SDS 处理组 CD163⁺ 细胞数显著少于未处理组及 Triton X-100 处理组(*P* 均 < 0.05)。Triton X-100 处理组与未处理的差异无统计学意义。皮下移植 28 d 后,上述 3 组瓣膜 CD163⁺ 细胞数无明显统计学差异。

2.3 瓣膜移植中巨噬细胞表型极化分析

CCR7 为经典活化的 M1 型巨噬细胞的标志物,CD163 为选择性活化的 M2 型巨噬细胞的标志

物。在本研究中,我们通过计算 M2 型巨噬细胞与 M1 型巨噬细胞的比值来分析巨噬细胞表型极化的情况,M2 型/M1 型巨噬细胞 = CD163⁺ 细胞数/CCR7⁺ 细胞数。

未处理组、Triton X-100 处理组与 SDS 处理组 SD 大鼠皮下移植 3 d、14 d 和 28 d 时猪主动脉瓣中 M2 型/M1 型巨噬细胞比值见表 3。第 3、14、28 天时,空白对照组 M2 型/M1 型巨噬细胞比值 < 1;SDS 处理组与 Triton X-100 处理组在第 14、28 天时,M2 型/M1 型巨噬细胞比值 > 1。在第 14 天时,SDS 处理组猪主动脉瓣 M2 型/M1 型巨噬细胞比值明显高于其他两组(*P* 均 < 0.05)。

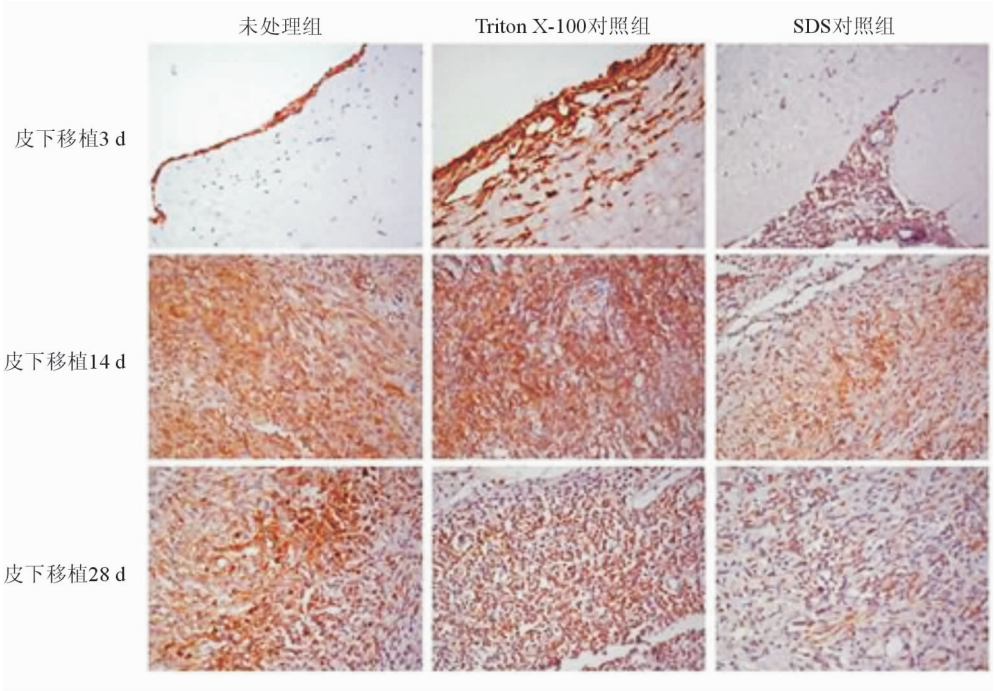


图 2 免疫组织化学染色法检测瓣膜移植中 CD163 表达情况 (×400)

表 2 高倍镜视野下各组瓣膜 CD163⁺ 细胞数比较/个

组别	皮下移植 3 d	皮下移植 14 d	皮下移植 28 d
未处理组	27.00 ± 17.20	98.75 ± 22.60	78.25 ± 41.49
Triton X-100 处理组	30.00 ± 7.53	120.80 ± 25.42	111.80 ± 32.89
SDS 处理组	1.25 ± 2.50 ⁽¹⁾⁽²⁾	59.00 ± 14.90 ⁽¹⁾⁽²⁾	89.25 ± 17.39

注:与未处理组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与 Triton X-100 组相比,⁽²⁾*P*<0.05

表 3 各组瓣膜 M2 型/M1 型巨噬细胞比较

组别	皮下移植 3 d	皮下移植 14 d	皮下移植 28 d
未处理组	0.49 ± 0.367	0.87 ± 0.12	0.75 ± 0.58
Triton X-100 处理组	0.47 ± 0.34	1.05 ± 0.45	1.10 ± 0.49
SDS 处理组	0.75 ± 0.58	1.70 ± 0.58 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.20 ± 1.17

注:与未处理组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与 Triton X-100 组相比,⁽²⁾*P*<0.05

3 讨论

手术植入人工心脏瓣膜是目前治疗心脏瓣膜病的唯一有效方法^[6-7]。患者植入机械瓣后需终身抗凝,同源性生物瓣由于伦理学限制,来源较少。猪心脏瓣膜的解剖结构与人类极为相似且来源丰富,因而更具吸引力。去细胞猪主动脉瓣因其适当的空隙率、良好的细胞黏附性和机械性能、天然的构型等优点成为心脏瓣膜组织工程较为理想的材料^[8-9]。目前已成功建立了多种去细胞方法,但不同方法处理的瓣膜在体内组织修复过程中的作用还需进一步探索。

移植材料被植入宿主体内后常常伴随着炎症

反应和组织修复,巨噬细胞是调控两者平衡的主要细胞。在不同条件下,巨噬细胞会出现形态和功能变化,发生极化。根据免疫表型和细胞功能不同,巨噬细胞可分为经典活化的 M1 型巨噬细胞和选择性活化的 M2 型巨噬细胞。在本研究中,我们建立了 SD 大鼠皮下移植模型,以 CCR7⁺ 细胞为 M1 型巨噬细胞,CD163⁺ 细胞为 M2 型巨噬细胞。瓣膜在小鼠皮下包埋 28 d 后,未处理瓣膜中 M2 型/M1 型巨噬细胞比值<1,提示巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞极化,M1 型巨噬细胞主要功能为分泌促炎性因子,在炎症反应时期发挥重要作用,因此未去细胞猪瓣膜在宿主体内可能促进巨噬细胞介导的炎症反应。

SDS、Triton X-100 处理的瓣膜在小鼠皮下包埋 14 d 后, M2 型/ M1 型巨噬细胞比值 >1 , 提示巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化, M2 型巨噬细胞激活后可发挥促进组织修复的作用, 因此去细胞能促进异种瓣膜在宿主体内的组织修复过程。猪主动脉瓣在 SD 大鼠皮下移植第 14 天时, SDS 促进瓣膜组织修复的作用较 Triton X-100 更为明显, 提示 SDS 去细胞处理方法是促进猪心脏瓣膜组织体内修复更为有效的方法。

本研究探索不同去细胞方法制备的猪心脏瓣膜对巨噬细胞向 M1 型或 M2 型巨噬细胞表型极化的调控作用, 证实去细胞能促进巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化, SDS 去细胞方法在促进巨噬细胞极化时优于 Triton X-100 去细胞方法。由于人造瓣膜仍有较多缺陷, 利用组织工程技术制造瓣膜成为研究的热点^[10]。组织工程瓣膜能很好地解决抗凝、抗感染、耐久性差等问题, 有良好的应用前景^[11-12]。该研究可为组织工程瓣膜支架的构建提供新的研究依据。

参 考 文 献

- [1] Simon A, Wilhelmi M, Steinhoff G, et al. Cardiac valve endothelial cells: relevance in the long-term function of biologic valve prostheses[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(4):609-616
- [2] 董念国, 史嘉玮, 胡平. 组织工程心脏瓣膜支架的研究现状和发展趋势[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(3):261-262.

- [3] Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix[J]. Nat Med, 2010, 16(7):814-820.
- [4] 王鹏, 张刚, 李毅, 等. 去细胞组织工程异种瓣膜支架制备方法的比较研究[J]. 国际心血管病杂志, 2007, 13(5):374-377.
- [5] 许倩, 李顺, 陈善泽. 巨噬细胞极化与炎症性疾病[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2018, 39(1):80-85.
- [6] 李潇, 朱平. 心脏瓣膜罕见疾病研究进展[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(20):3128-3130.
- [7] 刘天起, 王东, 李培杰, 等. 原位心脏移植治疗终末期心脏病 25 例临床分析[J]. 中华移植杂志, 2013, 7(1):10-13.
- [8] Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves[J]. J Struct Biol, 2003, 143(3):201-208.
- [9] Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix[J]. Circulation, 2002, 106(13S):I63-I68.
- [10] Rahimtoola SH. The year in valvular heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(12):1290-1301.
- [11] Neuenschwander S, Hoerstrup SP. Heart valve tissue engineering[J]. Transpl Immunol, 2004, 12(3/4):359-365.
- [12] Flanagan TC, Pandit A. Living artificial heart valve alternatives: a review[J]. Eur Cell Mater, 2003, 6:28-45.

(收稿:2018-05-23 修回:2018-11-28)

(本文编辑:胡晓静)