

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.02.0162

· 论 著 ·

5种脱细胞鱼皮基质的制备及体外毒性

祖丽皮也·阿不力克木¹, 古丽加玛丽·阿不力克木², 朱庆丰¹, 陈彤¹, 吴刚¹, 易杨华³, 王少海^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院口腔科, 上海 200433
2. 喀什地区第一人民医院心内科, 喀什 844000
3. 海军军医大学(第二军医大学)药学院海洋药物研究所, 上海 200433

[摘要] **目的** 探究5种脱细胞鱼皮基质的生物安全性及相容性, 筛选出符合生物相容性要求的材料。**方法** 以5种鱼皮(马面鱼、黑鱼、鳗鱼、鲤鱼、鲢鱼)为原料, 通过脱色、脱脂、脱细胞和交联等制备工艺, 制备脱细胞基质。依据国家标准(GB/T 16886.5-2017)将脱细胞鱼皮基质材料制备成稀释浓度10 g/L和标准浓度100 g/L的浸提液, 用CCK-8试剂盒检测脱细胞鱼皮基质材料浸提液对人骨髓间充质干细胞的毒性。采用扫描电镜观察脱细胞鱼皮基质材料的结构, 通过H-E染色和Masson染色检测制备的鱼皮基质材料是否完全脱细胞。用标准浓度100 g/L的脱细胞鱼皮基质材料浸提液与人骨髓间充质干细胞共同培养, 通过溶血实验检测材料的血液相容性, 采用Live/Dead染色法、TUNEL法和流式细胞术检测细胞的存活和凋亡情况。**结果** 在10 g/L浓度下, 马面鱼及黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中人骨髓间充质干细胞活性均>70%, 其余3种材料细胞活性均<70%; 在100 g/L浓度下, 马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中人骨髓间充质干细胞活性>70%, 而黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中细胞活性<70%。扫描电镜下马面鱼脱细胞鱼皮基质材料为多孔、致密结构, 黑鱼脱细胞鱼皮基质材料为平滑结构; H-E和Masson染色结果显示马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料均为脱细胞胶原纤维结构。马面鱼及黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液溶血率分别为(1.23±0.43)%和(6.35±0.47)% (医用材料溶血率国家标准为≤5%)。人骨髓间充质干细胞在马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中存活状况良好, 而在黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中多数发生死亡或凋亡。**结论** 马面鱼脱细胞鱼皮基质材料无细胞毒性、无溶血性, 具有成为组织工程支架材料的潜能。

[关键词] 绿鳍马面鲈; 脱细胞真皮基质; 间质干细胞; 组织工程; 支架**[中图分类号]** R 318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)02-0162-07

Preparation of five kinds of acellular fish skin matrices and *in vitro* toxicity analysis

Zulpiye Ablidikim¹, Guljamal Ablidikim², ZHU Qing-feng¹, CHEN Tong¹, WU Gang¹, YI Yang-hua³, WANG Shao-hai^{1*}

1. Department of Stomatology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. Department of Cardiology, First People's Hospital of Kashgar Prefecture, Kashgar 844000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
3. Institute of Marine Drugs, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the biological safety and compatibility of five kinds of acellular fish skin matrices, and to screen the materials meeting the criteria of biocompatibility. **Methods** Acellular fish skin matrices were prepared through decolorization, degreasing, decellularization and cross-linking using five kinds of fish skins leather jacket fish (*Thamnaconus septentrionalis*), black fish (*Channa argus*), eel (*Anguillidae*), carp (*Cyprinus carpio*) and silver crap (*Hypophthalmichthys molitrix*). According to the national standard (GB/T 16886.5-2017), different concentrations (10 g/L and 100 g/L) of extracts of acellular fish skin matrices were prepared, and the CCK-8 assay was used to detect the *in vitro* toxicity of extracts of acellular fish skin matrices to human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. The surface structures of different collagen membranes were observed under scanning electron microscopy. The H-E and Masson staining were used to observe whether the fish skin matrix materials were completely acellular. The human bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured with the medium containing standard concentration of 100 g/L acellular fish skin matrix material extracts. The blood compatibility of the material was tested by hemolysis

[收稿日期] 2018-12-16 **[接受日期]** 2019-02-10**[基金项目]** 国家自然科学基金(81271177, 81870808). Supported by National Natural Science Foundation of China (81271177, 81870808).**[作者简介]** 祖丽皮也·阿不力克木, 硕士生. E-mail: zulpiyeablikim@smmu.edu.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162490, E-mail: shaohaiwang@smmu.edu.cn

test. Live/Dead, TUNEL and flow cytometry were used to detect the cell survival and apoptosis levels. **Results** CCK-8 assay showed that the viability indexes of the cells co-cultured with the leather jacket fish and black fish skin acellular matrix material extracts were both $>70\%$ at the concentration of 10 g/L, and the other three materials were all $<70\%$. At the concentration of 100 g/L, the viability index of the cells co-cultured with the leather jacket fish skin acellular matrix material extracts was $>70\%$, and that with the black fish was $<70\%$. Scanning electron microscopy showed that the leather jacket fish skin acellular matrix materials had porous and compact structure inside, and black fish skin acellular matrix materials had smooth structure inside. The H-E staining and Masson staining showed that leather jacket fish and black fish skin acellular matrix materials were both acellular collagen fibers. The hemolysis rates (the national standard $\leq 5\%$) of leather jacket fish and black fish skin acellular matrix material extracts were $(1.23 \pm 0.43)\%$ and $(6.35 \pm 0.47)\%$, respectively. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells survived well in the culture medium containing extracts of leather jacket fish skin acellular matrix material, but most cells died or apoptosed in the culture medium containing extracts of Black fish skin acellular matrix material. **Conclusion** The leather jacket fish decellularized skin matrix material has better biosafety and biocompatibility, and has the potential to be a scaffold material for tissue engineering.

[Key words] *Thamnaconus septentrionalis*; acellular dermal matrix; mesenchymal stem cells; tissue-engineering; stents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(2): 162-168]

脱细胞真皮基质是一种由动物或人类皮肤制成的无细胞组织薄片, 它保留了真皮的胶原成分和组织基本结构, 同时也保留了基底膜成分, 是目前最为理想的细胞微环境, 已成为仿生型再生医疗产品开发和成果转化热点^[1-2], 并在创伤和烧伤修复、口腔医学、组织缺损等领域得以应用^[3-6]。目前所用的脱细胞真皮基质材料主要来源于猪、牛等哺乳动物, 但由于存在疯牛病、蓝耳病、口蹄疫等疾病的传播风险和宗教信仰等问题, 探索开发鱼类来源的脱细胞基质材料作为新型真皮替代品变得越来越重要^[1,7]。鱼皮的蛋白质含量较鱼体的其他部位高, 其胶原含量最高可占其蛋白质总量的8%以上^[8-9]。本研究以5种鱼皮为原料制备脱细胞真皮基质, 并对其生物安全性评价, 以为筛选制备组织工程支架的鱼皮来源脱细胞真皮基质提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 脱细胞鱼皮基质材料制备与处理 马面鱼 (*Thamnaconus septentrionalis*)、黑鱼 (*Channa argus*)、鳗鱼 (*Anguillidae*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 5种鱼皮原料均购自上海江阳水产批发交易市场, 新鲜鱼皮刮除鱼肉、清洗干净后立即于 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。将速冻鱼皮在常温下解冻后洗净风干, 依次用0.1% NaOH溶液和3% H_2O_2 溶液浸泡, 脱色、脱脂并去除部分杂蛋白。首次浸泡5 h, 待 H_2O_2 全部还原, 取出鱼皮洗净, 换液继续浸泡24 h后取出。鱼皮取出后用自来水冲洗至中性并沥干, 用适量洗洁精揉搓后反复冲洗并沥干, 此过程重复5次。再次用自来水冲洗干净后, 用实验室配制的脱色液(甲醇:乙酸:水=25:8:67)浸泡

24 h进一步脱色、脱脂、去杂蛋白。鱼皮取出后冲洗至中性, 沥干水分, 用适量洗洁精清洗5次, 再用蒸馏水清洗3次, 清洗完毕后置于蒸馏水中浸泡12 h, 以去除鱼皮中残留的物质, 整个过程重复3次。最后将鱼皮取出, 沥干水分, 铺盘冷冻干燥成膜。将制备好的鱼皮材料放置于真空干燥箱中, 设置干燥箱温度为 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, 72 h后取出, 即可完成交联, 得到变性后的脱细胞鱼皮基质材料^[10]。

将5种脱细胞鱼皮基质材料进行 ^{60}Co 消毒, 依据国家标准 GB/T 16886.5-2017^[11]制备稀释浓度为10 g/L及标准浓度为100 g/L的浸提液(浸提液介质为含血清培养液), 保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 细胞提取、培养与鉴定 人骨髓间充质干细胞(human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, hBMSCs)提取自健康志愿者骨髓[实验方案经过医学研究伦理委员会批准(批准号: 2009LL004; 中国临床试验注册中心注册号: ChiCTR-ONRC-12002056)]。将提取的hBMSCs进行原代培养, 传代至第3代用于实验^[12]。在光学显微镜下观察hBMSCs的形态, 根据hBMSCs的表面标志物(阳性标志物为CD90、CD73、CD105, 阴性标志物为CD34、CD45)特点, 采用流式细胞术检测相应抗体表达。

1.3 CCK-8法初步检测脱细胞鱼皮基质的细胞增殖毒性 将hBMSCs以 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板, 用含血清的LG-DMEM培养液培养, 待细胞贴壁后, 实验组中加入100 μL /孔稀释浓度为10 g/L的脱细胞鱼皮基质材料浸提液继续培养, 对照组中加入100 μL /孔含血清LG-DMEM培养液。在1、3、6 d时加入10 μL /孔CCK-8试剂(日本同仁化学研究所)并培养2.5 h, 用酶标仪测定450 nm波长处的光密度(D)值, 计算细胞存活率[细胞存

活率(%) = (实验组 D 值 - 空白组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白组 D 值) $\times 100\%$], 筛选出符合毒性标准的脱细胞鱼皮基质浸提液材料。将初步筛选出的无毒脱细胞鱼皮基质材料再以标准浓度为 100 g/L 浸提液进行 CCK-8 检测, 步骤同上。

1.4 脱细胞鱼皮基质材料结构与成分观察 将初步筛选的样品经真空干燥、表面喷金处理后, 在扫描电镜(型号: MERLIN Compact, 德国 Carl Zeiss 公司)下随机取不同位置观察脱细胞鱼皮基质材料表面结构。

为了观察所研究的脱细胞鱼皮基质材料是否完全脱细胞, 对初步筛选出的脱细胞鱼皮基质材料进行 H-E 染色和 Masson 染色。H-E 染色实验中, 细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色, 软骨基质、钙盐颗粒呈深蓝色, 黏液呈灰蓝色, 细胞质呈深浅不同的粉红色至桃红色, 蛋白性液体呈粉红色。Masson 染色实验中, 胶原纤维、黏液呈蓝色。

1.5 血液相容性实验 参照国家标准 GB/T 16886.4-2003^[13]对初步筛选出的脱细胞鱼皮基质材料进行血液相容性实验。经志愿者同意后采集新鲜抗凝血, 将稀释的抗凝血 60 μ L 分别加入盛有 3 mL 脱细胞鱼皮基质材料浸提液、蒸馏水、生理盐水(即分别为实验组、阴性对照组、阳性对照组)的试管中, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中水浴 1 h。之后离心取上清液, 用 722s 型可见分光光度计于 545 nm 波长处测定各组的 D 值。溶血率计算公式: 溶血率(%) = (实验组 D 值 - 阴性对照组 D 值) / (阳性对照组 D 值 - 阴性对照组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.6 细胞 Live/Dead 存活分析 将 hBMSCs 以 2×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板, 用含血清培养液培养, 待细胞贴壁后, 实验组中加入 0.5 mL 标准浓度为 100 g/L 的脱细胞鱼皮基质材料浸提液, 对照组中加入含血清培养液, 培养 48 h 后加入 Live/

Dead 试剂(美国艾美捷公司)在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15 min 对细胞进行染色, 荧光显微镜下观察细胞存活情况。绿色标记为健康正常的活细胞, 红色标记为死细胞, 死细胞和活细胞所得结果图整合后显示为黄红色。

1.7 细胞凋亡实验 将 hBMSCs 以 2×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板, 用含血清培养液培养, 待细胞贴壁后, 实验组中加入 0.5 mL 标准浓度为 100 g/L 的脱细胞鱼皮基质材料浸提液, 对照组中加入含血清培养液, 培养 48 h 后用磷酸盐缓冲液冲洗 2 次, 再用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min。采用 TUNEL 法标记凋亡细胞 DNA 片段, 用标准荧光滤光片直接在荧光显微镜下观察, 凋亡细胞在 520 nm 波长处显示绿色荧光、在 460 nm 波长处显示蓝色 DAPI 染色的细胞核。

将 hBMSCs 以约 5×10^4 /孔的密度接种于 6 孔板, 用含血清培养液隔夜培养, 待细胞贴壁后, 将初步筛选的脱细胞鱼皮基质材料浸提液加入 6 孔板, 2.5 mL/孔, 培养 24 h 后收集所有细胞进行 Annexin V-FITC/PI 染色, 用流式细胞仪分析结果。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett- t 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细胞提取、鉴定结果 提取的 hBMSCs 在显微镜下呈梭形, 细胞核居中, 细胞呈旋涡状排列(图 1)。细胞表面标志物 CD90 阳性率为 97.70%, CD73 阳性率为 99.98%, CD105 阳性率为 99.02%, CD34 阳性率为 0.41%, CD45 阳性率为 0.33%(图 2)。由此可确认提取的细胞为纯度较高的 hBMSCs。

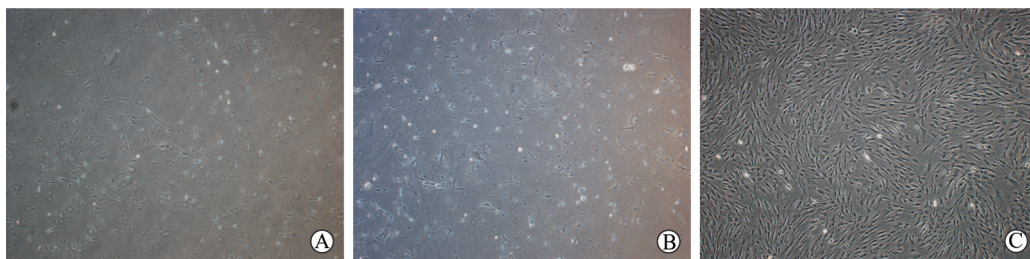


图 1 hBMSCs 生长形态观察

Fig 1 Morphological observation of hBMSCs

The third generation of hBMSCs under the microscope. A: First day; B: Third day; C: Fifth day. hBMSCs: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Original magnification: $\times 100$

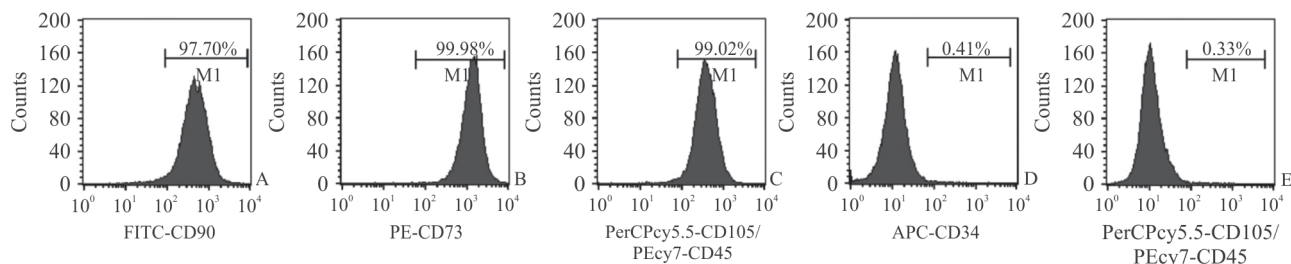


图2 流式细胞术检测 hBMSCs 表面标志物

Fig 2 Determination of hBMSCs surface markers by flow cytometry

A: CD90; B: CD73; C: CD105; D: CD34; E: CD45. hBMSCs: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

2.2 脱细胞鱼皮基质材料细胞增殖毒性初步实验结果 CCK-8 法检测结果显示, 加入马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液培养 1、3、6 d, hBMSCs 活力与对照组相比差异无统计学意义

($P>0.05$), 提示材料对细胞生长无抑制或促进作用。而其余 3 种材料均对 hBMSCs 有一定的抑制作用, 培养 6 d 时其细胞活力与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 5 种脱细胞鱼皮基质材料浸提液 (10 g/L) 培养的 hBMSCs 增殖活力

Tab 1 Cell viability of hBMSCs in extracts of 5 kinds of acellular fish skin materials (10 g/L)

Group	% , $n=3, \bar{x} \pm s$		
	1 d	3 d	6 d
Leather jacket fish	86.36 \pm 0.08	95.24 \pm 0.02	80.93 \pm 0.03
Black fish	86.10 \pm 0.02	101.68 \pm 0.02	88.61 \pm 0.02
Eel fish	92.79 \pm 0.09	81.09 \pm 0.05	69.84 \pm 0.03*
Carp fish	92.66 \pm 0.07	80.53 \pm 0.03	65.52 \pm 0.02*
Silver carp fish	75.03 \pm 0.04	78.08 \pm 0.17	48.66 \pm 0.03*
Control	100	100	100

hBMSCs: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. * $P<0.05$ vs control group

依据国家标准 GB/T 16886.5-2017^[11], 在稀释浓度 10 g/L 下马面鱼及黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中细胞活性均 $>70\%$, 而其他 3 种材料中细胞活性均 $<70\%$, 表明只有马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料对细胞无毒, 因此初步筛选出这两种材料用于后续研究。进一步检测结果显示, 在标准浓度 100 g/L 下, 加入马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液培养 1、3、6 d, hBMSCs 活力分别为 (93.77 \pm 0.04)%、(96.05 \pm 0.01)% 和 (84.70 \pm 0.06)%, 均 $>70\%$; 加入黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液培养 1、3、6 d, hBMSCs 活力分别为 (28.57 \pm 0.01)%、(14.18 \pm 0.01)% 和 (1.49 \pm 0.01)%, 均 $<70\%$ 。结果表明只有马面鱼脱细胞鱼皮基质材料对细胞无毒。

2.3 脱细胞鱼皮基质材料的结构与成分 扫描电镜下可见马面鱼脱细胞鱼皮基质材料为双层结构, 一面光滑、一面疏松多孔 (图 3A、3C); 黑鱼脱细胞鱼皮基质材料双层皆为平滑结构, 几乎没有孔隙结构 (图 3B、3D)。H-E 染色结果显示马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料均为粉红色条状分布的胶原纤维, 无蓝色标记出现 (图 3E~3H), 说明鱼皮中的细胞已去净, 只

剩脱细胞基质。Masson 染色结果显示马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料均被染成蓝色, 胶原纤维沿一定方向整齐排列, 无紊乱和中断现象 (图 3I~3L), 说明材料经过脱细胞后胶原纤维结构保留完整。

2.4 脱细胞鱼皮基质材料的血液相容性 溶血实验检测结果显示, 马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液溶血率分别为 (1.23 \pm 0.43)% 和 (6.35 \pm 0.47)%。马面鱼脱细胞鱼皮基质材料的溶血率远低于医用材料的国家标准 ($\leq 5\%$)^[13], 在国家生物材料的溶血性安全评价范围内; 黑鱼脱细胞鱼皮基质材料溶血率 $>5\%$, 对红细胞有破坏作用。

2.5 脱细胞鱼皮基质材料对细胞存活的影响 荧光显微镜下可见经 Live/Dead 染色后, 加入马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液培养的 hBMSCs 全部为绿色标记, 几乎没有红色标记的细胞, 且较对照组的密、多; 加入黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液培养的细胞基本都被染成了黄红色, 表明多数为死细胞 (图 4)。说明马面鱼脱细胞鱼皮基质材料能够促进细胞生长且适合细胞生长, 而黑鱼脱细胞鱼皮基质材料不适合细胞生长, 易致细胞死亡。

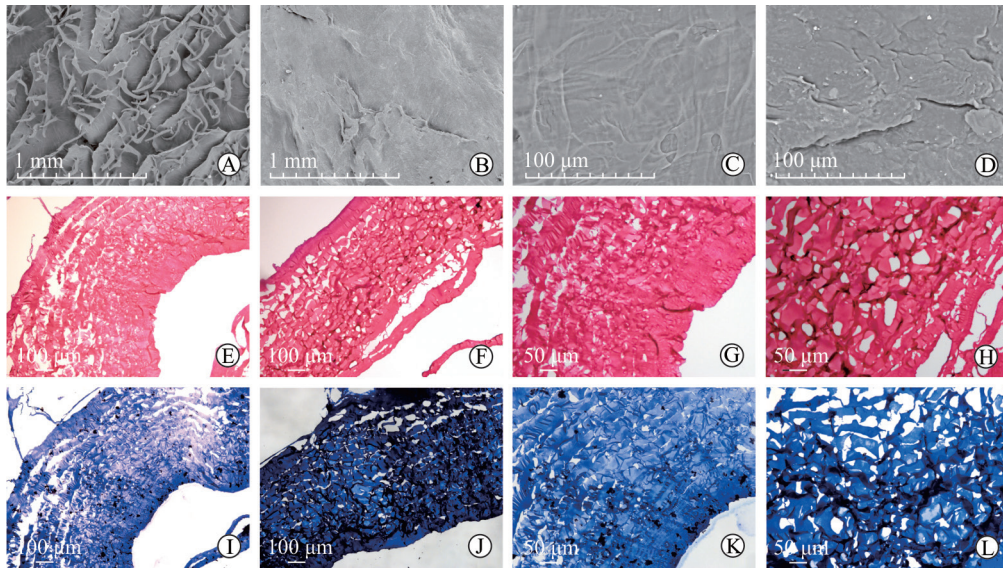


图3 脱细胞鱼皮基质材料结构和成分观察

Fig 3 Structure and constituents of acellular fish skin matrix materials

A-D: Scanning electron microscope graphs (A: Rough surface of leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; B: Rough surface of black fish skin acellular dermal matrix material; C: Smooth surface of leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; D: Smooth surface of black fish skin acellular dermal matrix material); E-H: H-E staining (E, G: Leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; F, H: Black fish skin acellular dermal matrix material); I-L: Masson staining (I, K: Leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; J, L: Black fish skin acellular dermal matrix material)

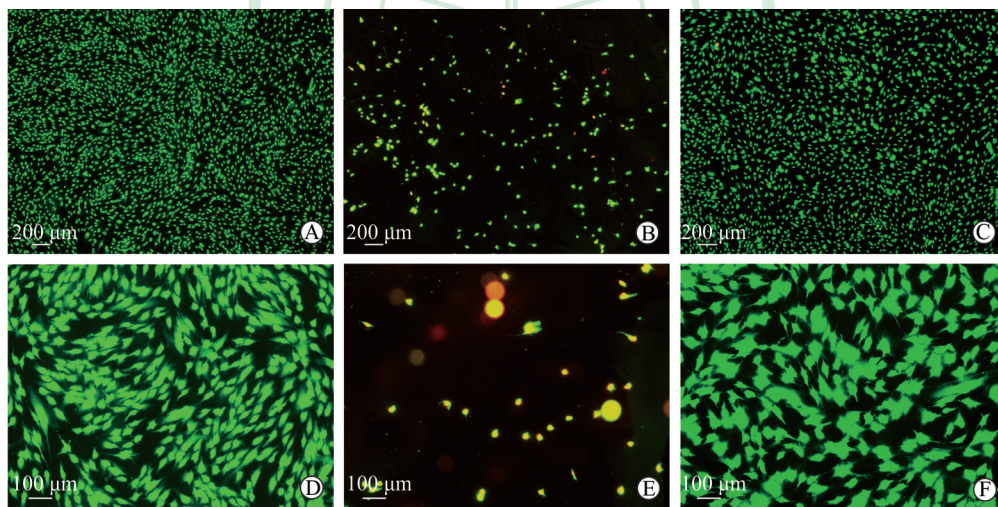


图4 Live/Dead 法检测脱细胞鱼皮基质材料浸提液对 hBMSCs 存活的影响

Fig 4 Effect of acellular fish skin matrix material extract on the survival of hBMSCs by Live/Dead assay

A, D: Leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; B, E: Black fish skin acellular dermal matrix material; C, F: Control group. hBMSCs: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

2.6 脱细胞鱼皮基质材料对细胞凋亡的影响 TUNEL法检测结果显示, 马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中的凋亡细胞数远少于黑鱼脱细胞鱼皮基质材料, 活细胞数与对照组差别不明显(图5)。流式细胞术检测结果显示, 马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液组、黑鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液组及对照组的细胞死亡率分别为(0.67±0.01)%、

(37.25±0.01)%、(0.89±0.01)%, 细胞凋亡率分别为(3.74±0.01)%、(1.04±0.61)%、(2.54±0.01)% (图6)。可见黑鱼鱼皮基质材料浸提液组细胞死亡率远超出正常范围(≤15%), 而马面鱼鱼皮基质材料浸提液组细胞死亡率低, 说明马面鱼鱼皮基质材料更适合细胞生长。

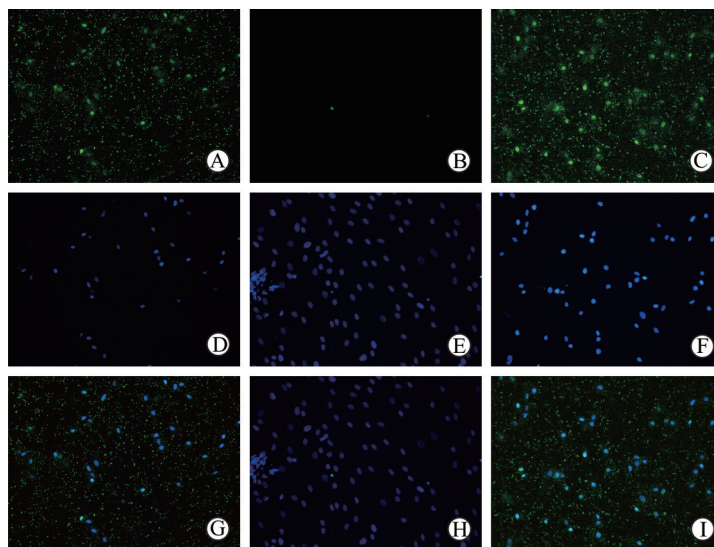


图5 TUNEL法检测脱细胞鱼皮基质材料浸提液对hBMSCs凋亡的影响

Fig 5 Effect of acellular fish skin matrix material extract on the apoptosis of hBMSCs by TUNEL assay

A, D, G: Leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; B, E, H: Black fish skin acellular dermal matrix material; C, F, I: Control group. A-C: TUNEL; D-F: DAPI; G-I: Merged. hBMSCs: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Original magnification: $\times 200$

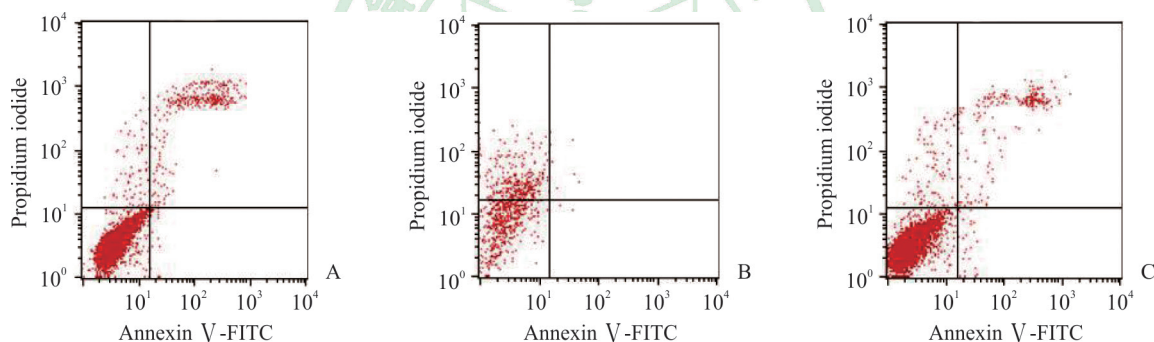


图6 流式细胞术检测脱细胞鱼皮基质材料浸提液对hBMSCs凋亡的影响

Fig 6 Effect of acellular fish skin matrix material extract on the apoptosis of hBMSCs by flow cytometry

A: Leather jacket fish skin acellular dermal matrix material; B: Black fish skin acellular dermal matrix material; C: Control group. hBMSCs: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

3 讨论

脱细胞真皮基质主要成分为胶原蛋白, 自身抗原性很低, 可在宿主体内长期存留并最终被降解, 其作为一种生物材料相比人工合成材料因优良的生物学特性、人体较强的适应性和较少的并发症等优势在多学科领域得到广泛应用^[14-15]。

本研究按照生物材料的生物学评价基本原则及国家标准^[11]制备了5种鱼皮脱细胞真皮基质, 以目前组织工程研究的热门种子细胞hBMSCs^[16-17]检测其生物相容性。本研究根据国家标准分别制备出稀释浓度为10 g/L和标准浓度为100 g/L的浸提液, 先用CCK-8法进行细胞毒性检测, 对稀释浓

度下脱细胞鱼皮基质材料进行初步筛选, 结果显示只有马面鱼和黑鱼脱细胞鱼皮基质材料无毒。之后将筛选出的两种材料在标准浓度(100 g/L)下进行细胞增殖毒性实验, 发现马面鱼脱细胞鱼皮基质材料对细胞无毒性, 而黑鱼脱细胞鱼皮基质材料对细胞有毒性。

国内外目前还没有制备脱细胞鱼皮基质材料的统一标准。有2篇文献报道了脱细胞鱼皮基质制备的方法^[18-19], 但这两种方法有很大的不同。本研究的制备方法与上述亦有不同之处, 因此在继续进行其他实验之前须对材料是否符合脱细胞基质材料的标准进行鉴定。从扫描电镜结果可以看出, 马面鱼脱细胞鱼皮基质材料具备多孔孔隙结构, 而黑鱼

脱细胞鱼皮基质材料几乎为平滑无孔隙结构,说明马面鱼脱细胞鱼皮基质材料结构更接近理想的组织工程支架材料特点。H-E 染色和 Masson 染色结果显示,制备的马面鱼和黑鱼鱼皮基质材料均无细胞核或其他细胞成分存在,说明所得材料确实是脱细胞鱼皮基质材料。材料内部疏松多孔结构有利于细胞的生长和黏附,本研究进行 Live/Dead 存活实验以及细胞凋亡实验的结果给予了进一步证实,即马面鱼脱细胞鱼皮基质材料浸提液中细胞存活率更高且具有促进细胞增长的趋势。这些结果也从一定程度上说明即使制备条件和交联条件相同,不同种类的脱细胞鱼皮基质材料结构也会影响材料对细胞的作用。

溶血率是血液相容性的一项重要指标。参照国家标准 GB/T 16886.4-2003,医用材料溶血率应 $\leq 5\%$,若溶血率 $> 5\%$ 则可认为该材料对红细胞有破坏作用^[13]。本研究结果中马面鱼脱细胞鱼皮基质材料的溶血率远低于医用材料的国家标准,而黑鱼脱细胞鱼皮基质材料溶血率超过国家标准值,表明马面鱼脱细胞鱼皮基质材料可考虑作为医用材料来使用。

综上所述,本研究采用相同制备方法和交联条件制备了5种不同鱼类的脱细胞鱼皮基质材料,通过一系列生物相容性实验发现,马面鱼脱细胞鱼皮基质材料具有良好的细胞相容性及促进细胞增殖的作用,在5种材料中各项性能最佳,为进一步探究鱼皮源脱细胞真皮基质的应用奠定了良好的实验基础。虽然马面鱼脱细胞鱼皮基质材料的生物相容性及促细胞增殖作用较其他材料好,但相比对照组仍有差异。如果要把马面鱼脱细胞鱼皮基质材料应用到医疗领域中,还需更高的组织相容性和细胞相容性,我们将在后续的研究中继续对马面鱼等淡水鱼来源的脱细胞基质材料进行改进。

致谢 感谢海军军医大学(第二军医大学)细胞与生物学平台王越教授对实验中细胞提取及细胞实验方案提供的宝贵意见;感谢海军军医大学(第二军医大学)长海医院中心实验室提供细胞实验平台,以及稽柏尧老师对细胞培养及实验用品用法的指导和帮助。

【参考文献】

- [1] TURNER N J, BADYLAK S F. The use of biologic scaffolds in the treatment of chronic nonhealing wounds[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4: 490-500.
- [2] 位晓娟,王南平,何兰,郭休玉,顾其胜. 脱细胞鱼皮基质作为新型组织工程支架的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30: 1437-1440.

- [3] NEMETH N L, BUTLER C E. Complex torso reconstruction with human acellular dermal matrix: long-term clinical follow-up[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 123: 192-196.
- [4] 池朝玲,王家盛,张洪杰,庞晓纲. 组织补片在腭裂修复术软组织缺损中的应用[J]. *临床口腔医学杂志*, 2007, 23: 34-35.
- [5] 殷艳丽,王倩婷,赵蕾. 脱细胞真皮基质用于牙周病学领域研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2014, 7: 434-439.
- [6] 赵利敏,张庆泉,孙岩,宋西城,张华,陈秀梅. 异种脱细胞真皮基质在鼻中隔缺损修复中的应用[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2009, 23: 31-32.
- [7] DUAN R, ZHANG J, DU X, YAO X, KONNO K. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112: 702-706.
- [8] 吴丹,康怀彬,肖枫. 鱼皮胶原蛋白研究进展[J]. *肉类研究*, 2007(6): 23-25.
- [9] 鸿巢章二,桥本周久. 水产利用化学[M]. 北京:中国农业出版社, 1994: 269.
- [10] 陈彤,夏凯,吴刚,祖丽皮也,阿不力克木,朱庆丰,王少海,等. 一种新型巴沙鱼皮胶原支架材料的理化性能及体外降解性[J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38: 41-47.
- [11] CHEN T, XIA K, WU G, ABLIKIM Z, ZHU Q F, WANG S H, et al. Physicochemical properties and *in vitro* degradation of a novel collagen scaffold material from Basa fish (*Pangasius haniltoa*) skin[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2017, 38: 41-47.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价:第5部分:体外细胞毒性试验: GB/T 16886.5-2017/ISO 10993-5:2009[S]. 北京:中国标准出版社, 2017.
- [13] 朱庆丰. 鱼骨来源 BCP 多孔陶瓷骨支架的制备及性能研究[D]. 上海:海军军医大学, 2018.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 医疗器械生物学评价:第4部分:与血液相互作用试验选择: GB/T 16886.4-2003[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [15] 史新立. 脱细胞真皮基质材料的研究及应用[J]. *透析与人工器官*, 2009, 20: 34-40.
- [16] 薛松,刘昶,纪艳超,万会魁,崔磊,姜龙. 骨髓间充质干细胞在脱细胞真皮基质再生过程中的初步研究[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15: 998-1000.
- [17] SULTANA N, SINGH M, NAWAL R R, CHAUDHRY S, YADAV S, MOHANTY S, et al. Evaluation of biocompatibility and osteogenic potential of tricalcium silicate-based cements using human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Endod*, 2018, 44: 446-451.
- [18] MCGRAIL D J, MCANDREWS K M, DAWSON M R. Biomechanical analysis predicts decreased human mesenchymal stem cell function before molecular differences[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319: 684-696.
- [19] 王月坤,侯虎,张凯,刘晗,司磊磊,李八方. 巴沙鱼皮脱细胞真皮基质的制备及生物相容性评价[J]. *材料科学*, 2018, 8: 346-354.
- [20] SIGURJONSSON G F, GISLADOTTIR D H, GUDMUNDSSON G. Scaffold material for wound care and/or other tissue healing applications: US8613957[P]. 2013-12-24.

【本文编辑】 孙 岩