

# Effect of Decellularized Extracellular Matrix Material on Mouse Macrophage Activity

Juwen Ma<sup>1</sup> Hongru Song<sup>2\*</sup>

1. Teaching and Research Department of Immunology, Basic Medical College, Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China

2. Immunology Department, School of Medical Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China

## Abstract

**Objective:** To study the effect of extracellular matrix material (ECM) on the activity of mouse macrophages after being decellularized by physical and chemical binding. **Methods:** Mouse macrophages were identified by flow cytometry. The effect of extracellular matrix extracts on the activity of macrophages was detected by Live/Dead staining. The effect of acellular extracellular matrix materials on apoptosis of macrophages was examined by Annexin-V and PI double staining flow cytometry. **Results:** Live/Dead staining showed that macrophages cultured with extracellular matrix material had good activity. Flow cytometry showed that the apoptotic cells of macrophages cultured with extracellular matrix extract were not different from those in complete medium. **Conclusion:** Acellular extracellular matrix material extract has no cytotoxicity to macrophages.

## Keywords

decellularized extracellular matrix materials; cell activity; mouse

# 脱细胞化细胞外基质材料对小鼠巨噬细胞活性的影响

马炬文<sup>1</sup> 宋鸿儒<sup>2\*</sup>

1. 承德医学院基础医学院免疫学教研室, 中国·河北承德 067000

2. 河北北方学院医学检验学院免疫学教研室, 中国·河北张家口 075000

## 摘要

**目的:** 研究脱细胞化的细胞外基质材料对于小鼠巨噬细胞活性的影响; **方法:** 通过流式细胞术鉴定巨噬细胞特异性表面标记物; 通过Live/Dead染色方法检测脱细胞化细胞外基质材料提取物对于巨噬细胞活性的影响; 通过Annexin-V和PI双染流式检测凋亡方法检测脱细胞化细胞外基质材料对于巨噬细胞凋亡的影响。 **结果:** Live/Dead染色结果显示脱细胞化细胞外基质材料提取物培养中的巨噬细胞具有良好的活性; 流式细胞术结果显示脱细胞化细胞外基质提取物培养的巨噬细胞凋亡细胞与完全培养基没有区别; **结论:** 脱细胞化细胞外基质材料提取物对于巨噬细胞没有细胞毒性。

## 关键词

脱细胞化细胞外基质材料 (dECM); 细胞活性; 小鼠

## 1 引言

目前由人类或动物组织器官通过脱细胞去除免疫成分而制备的脱细胞化细胞外基质材料 (dECM) 发展迅速, 因其独特的天然结构和良好的生物相容性、为组织再生修复提供模板被认为是最有应用前景的生物材料<sup>[1]</sup>。细胞外基质是包含有胶原蛋白、弹性蛋白, 层粘连蛋白等诸多大分子蛋白所构成的一个三维结构, 也是细胞赖以生存的微环境,

在经过脱细胞以后, 将保留原来的天然结构和生物活性分子<sup>[2]</sup>, 为以后的细胞迁入提供了良好的载体。脱细胞的方法多样, 并且不同的组织或者器官脱细胞需要不同的方法或者多种方法联合, 常用的物理脱细胞方法包括循环冻融、搅拌、超声处理等, 化学方法包括离子型去污剂、高、低渗透压、有机溶剂、酸、碱化学浴等<sup>[3]</sup>。主要目的是破坏细胞的磷脂双分子细胞膜, 使细胞破裂其内容物被释放和清除<sup>[4]</sup>。但是, 不恰当的脱细胞化方法将会影响后续迁入到材料内的细胞活性, 尤其是细胞膜的结构。有研究表明, 基于十二烷基硫酸钠进行脱细胞化制备的 dECM 再接种细胞将会对细胞产生毒性<sup>[5]</sup>, 电穿孔后残余的试剂会降低细胞的活性<sup>[6]</sup>。由于巨噬细胞是首先与材料发生接触的细胞之一, 并且高度参与材料与机体的相互反应, 同时还协调上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞增殖与迁移, 促进组织损伤的修复<sup>[7]</sup>, 如果制备的

**【作者简介】** 马炬文 (1995-), 男, 中国四川巴中人, 在读硕士, 从事中药免疫研究。

**【通讯作者】** 宋鸿儒 (1961-), 男, 满族, 中国河北青龙人, 硕士, 教授, 从事中药免疫研究。

dECM 材料影响巨噬细胞的正常活性, 可能导致这些细胞间的联系中断, 从而导致 dECM 材料的植入产生修复失败的结局。因此, 在经过脱细胞化制备的 dECM 材料对巨噬细胞活性的维持至关重要。

论文所研究的 dECM 材料, 是由人脐带沃顿胶提取的间充质干细胞衍生, 脱细胞化包括物理、化学方法联合进行, 具体方法由国家卫生健康委科学技术研究所国家人类遗传中心研发。为了研究制备的 dECM 材料对于小鼠巨噬细胞活性的影响。所以利用了完全培养基制备了 dECM 材料的提取物, 通过 Live/Dead 染色和 Annexin V、PI 双染流式检测凋亡方法来检测 dECM 材料提取物对巨噬细胞活性的影响。

## 2 材料与方法 Materials and methods

### 2.1 细胞株

鼠巨噬细胞系 RAW264.7 (购自广东赛库生物公司), 采用高糖 DMEM (gibco) +10%FBS (四季青) 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 细胞生长约 80% 左右密度后吹打传代。

### 2.2 材料与试剂

dECM (脱细胞化细胞外基质材料) 由国家卫生健康委科学技术研究所国家人类遗传资源中心赠送。提取物制备, 根据 GB/T 16886.12 样本浸提液制备标准进行材料浸提液的制备, 提取介质为 RAW264.7 细胞 DMEM 完全培养基。Live/Dead 染色试剂盒 (invitrogen, 美国, 货号: R37601); Annexin V-FITC/PI 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒 (普诺赛, 武汉, 货号: P-CA-201); 直标抗体 647-CD68 (CST); PBS 配置的 5%BSA。

### 2.3 主要仪器设备

BD FACS Canto II 流式细胞仪; (美国 BD 公司); 荧光显微镜; (德国 Leica 公司)。

### 2.4 流式细胞术鉴定巨噬细胞表面标记物实验

培养 RAW264.7 细胞至融合度到 80% 后, 吸弃上清, PBS 清洗 3 次后离心收集细胞; 使用含有 3%BSA (1 : 400) 稀释的 CD68 抗体重悬细胞 4℃避光孵育 30 分钟后离心弃上清, 3%BSA 重悬细胞上机检测, 以正常培养细胞为对照。

### 2.5 Live/Dead 染色实验

RAW264.7 细胞达到培养密度后收集细胞采用 100%dECM 材料提取物和完全培养基重悬细胞调整密度至  $1 \times 10^5$  个/mL, 分别加入六孔板内 2mL, 培养时间为 24h, 48h, 72h。到达培养时间后, 加入配置好 Live/Dead 工作溶液 500ul, CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 1h 后荧光显微镜下拍照。

### 2.6 Annexin V、PI 双染流式检测凋亡实验

RAW264.7 细胞达到培养密度后收集细胞采用 100%dECM 材料提取物和完全培养基重悬细胞调整密度至  $1 \times 10^5$  个/mL, 分别加入六孔板内 2mL, 培养时间为 24h。到达培养时间后, 收集采集细胞, 普通板底细胞和上清液一起收集, 800rpm 离心 5 分钟, 用 PBS 洗涤细胞一次, 离心后弃上清, 加入 100uL 稀释的 1xAnnexin V Binding

Buffer 重悬细胞。细胞悬液中加入 2.5uL 的 Annexin V-FITC 染色液和 2.5uL 的 PI 染色液。重悬细胞轻柔吹打。轻柔涡旋混匀后, 室温避光孵育 15~20min。加入 400uL 稀释的 1X Annexin V Binding Buffer 轻柔吹打混匀样本, 立即上机检测。

## 3 结果

### 3.1 流式细胞术鉴定巨噬细胞表面标记物

为了检测 RAW264.7 细胞表面表达巨噬细胞特异性的表面标记物, 本研究进行流式细胞术检测 CD68 实验, 如图 1 所示, RAW264.7 细胞表面表达 CD68 比例为 99.6%。结果表明 RAW264.7 细胞符合巨噬细胞表面标志物特征。

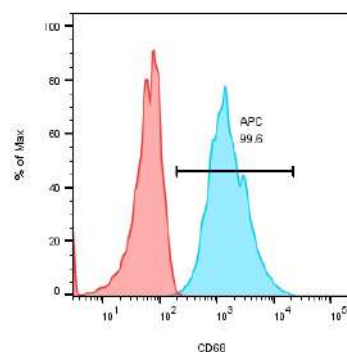


图 1 流式细胞术鉴定巨噬细胞表面标记物结果

### 3.2 Live/Dead 染色检测 dECM 材料提取物对巨噬细胞活性的影响

为了明确制备的 dECM 材料中可溶性物质对于巨噬细胞没有细胞毒性, 本研究进行了 Live/Dead 染色在显微镜下观察结果。如图 2 所示, 100% 浸提液培养的巨噬细胞早期活细胞发出绿色荧光呈单细胞均匀分布生长, 可见极少的发出红色荧光的死细胞, 随着培养时间延长, 细胞发生明显增殖, 呈集落式生长, 与 DMEM 培养基培养的巨噬细胞生长状态与速度一致。证明 dECM 材料浸提液具有良好的生物相容性, 无细胞毒性。

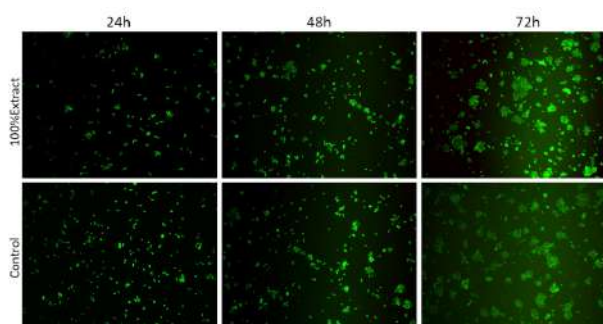


图 2 dECM 材料提取物培养巨噬细胞和正常培养 Live/Dead 染色结果

### 3.3 Annexin V、PI 双染流式细胞术检测 dECM 材料提取物对巨噬细胞凋亡情况的影响

为了研究制备的 dECM 材料对巨噬细胞细胞膜完整

性的影响,本研究通过 Annexin V、PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡。如图 3 所示,正常培养中,活细胞比例为 93.9%,早期凋亡的细胞比例为 4.19%,完全凋亡的细胞为 1.08%,坏死细胞比例为 0.86%。dECM 材料提取物中活细胞比例为 95.8%,早期凋亡的细胞比例为 1.04%,晚期凋亡的细胞比例为 3.12%,坏死比例为 0.064%。两组之间活细胞的比例没有差异 ( $P > 0.05$ )。表明 dECM 材料提取物不影响巨噬细胞的细胞膜结构。

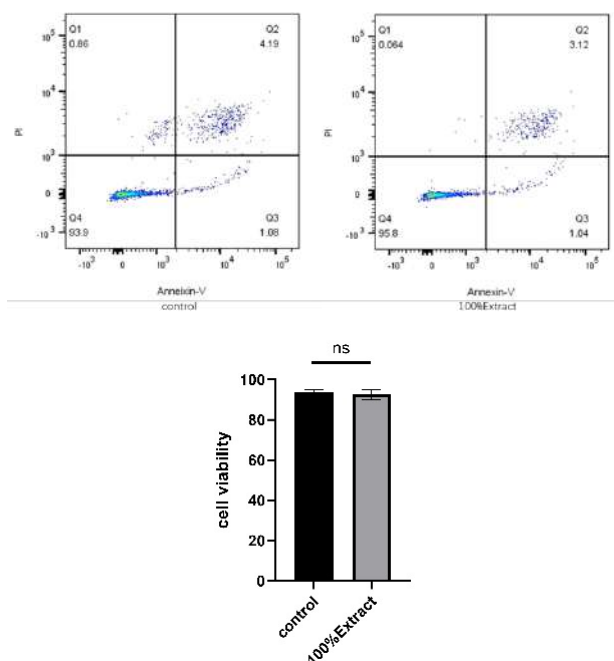


图 3 Annexin-V、PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡结果;

#### 4. 讨论

目前, dECM 材料在组织工程领域发挥着重要作用,为临床皮肤愈合、神经损伤等疾病提供具有极大价值的治疗手段。制备 dECM 材料过程中,脱细胞化是其中一个重要的阶段,适宜的脱细胞化方法,在去除免疫成分的同时极大保留了天然结构和活性成分,将对 dECM 材料再细胞化产生积极效应。巨噬细胞在组织损伤修复过程中,扮演着极其重要的角色,在组织修复的启动、维持和消退阶段发挥着关键的作用<sup>[8]</sup>。巨噬细胞作为清道夫细胞,早期组织损伤后吞噬细胞碎片、入侵的微生物、凋亡的中性粒细胞等,还通过释放趋化因子、基质金属蛋白酶和一些炎症细胞因子维持伤口的炎症反应,若巨噬细胞功能受损,早期炎症反应减弱<sup>[9]</sup>,将导致再生修复效率低下,使伤口愈合延迟。在晚期巨噬细胞将产生 VEGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  等细胞因子促进细胞增殖与血管的形成<sup>[10]</sup>。不仅如此,巨噬细胞还产生一些可溶性物质促进成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,促进伤口的收缩和细胞外基质成分的合成<sup>[11]</sup>。不同功能的巨噬细胞在伤口修复的每个阶段都发挥着独特和极其重要的作用,任何一个阶段巨噬细胞的功能受到了影响,将会导致伤口出现异常的修复

或者纤维化的发生。dECM 材料作为外来的植入物,不可避免的会与巨噬细胞发生相互作用,若制备不当,影响巨噬细胞活性,将会干扰整个修复过程。

本研究中,流式细胞术验证了 RAW264.7 细胞表面表达巨噬细胞特异性表面标记物<sup>[12]</sup>,并且 Live/Dead 染色和 Annexin V、PI 双染流式细胞术两种方法检测了 dECM 材料培养中的巨噬细胞活性。证明了 dECM 材料提取物不影响巨噬细胞正常活性。由于巨噬细胞是一种具有高度异质性的免疫细胞, dECM 材料提取物对于其免疫原性的影响还需要进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Hinderer S, Layland S L, Schenke-Layland K. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016,97:260-269.
- [2] Hoshiba T. Decellularized Extracellular Matrix for Cancer Research[J]. *Materials*, 2019,12(8): 1311.
- [3] Zhang X, Chen X, Hong H, et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering[J]. *Bioactive Materials*, 2021,10:15-31.
- [4] McInnes A D, Moser M A J, Chen X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering[J]. *Journal of Functional Biomaterials*, 2022,13(4):240.
- [5] Weng W, Zanetti F, Bovard D, et al. A simple method for decellularizing a cell-derived matrix for bone cell cultivation and differentiation[J]. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 2021,32(9):124.
- [6] Zager Y, Kain D, Landa N, et al. Optimization of Irreversible Electroporation Protocols for In-vivo Myocardial Decellularization[J]. *PLoS ONE*, 2016,11(11):e0165475.
- [7] Minutti C M, Knipper J A, Allen J E, et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017,61:3-11.
- [8] Wynn T A, Vannella K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. *Immunity*, 2016,44(3):450-462.
- [9] Duffield J S, Forbes S J, Constandinou C M, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2005,115(1):56-65.
- [10] Berse B, Brown L F, Van de Water L, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1992,3(2):211-220.
- [11] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Nature reviews. Immunology*, 2011,11(11):723-737.
- [12] Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells[J]. *Annual Review of Immunology*, 2006,24:287-320.