DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260324006
引用格式: 李荣杏, 姜绍通, 林琳, 等. 磷酸三丁酯联合超声制备罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(17): 216–227.
Li Rongxing, Jiang Shaotong, Lin Lin, et al. Process optimization for the preparation of acellular dermal matrix from *Oreochromis niloticus* skin using tributyl phosphate combined with ultrasound [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(17): 216–227. (in Chinese with English abstract).

磷酸三丁酯联合超声制备罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质工艺优化

李荣杏[1], 姜绍通[1,2], 林　琳[1,2,3*], 陆剑锋[1,2,3]

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥　230601; 2. 农产品现代加工安徽省重点实验室, 合肥　230601; 3. 农产品生物化工教育部工程研究中心, 合肥　230601)

摘　要: 目的　提升罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)的制备效率及性能, 优化其制备工艺。**方法**　通过物理(超声)和化学[磷酸三丁酯(tributyl phosphate, TBP)]方法相结合的方式, 对罗非鱼鱼皮进行脱细胞处理, 制备鱼皮脱细胞真皮基质, 以 DNA 含量和机械强度作为评价指标, 优化鱼皮脱细胞工艺参数。**结果**　当超声功率为 200 W, TBP 浓度为 1.60%时, 对罗非鱼鱼皮进行脱细胞处理 3.70 h, 获得的鱼皮脱细胞真皮基质符合脱细胞材料 DNA 含量低于 50 ng/mg 的标准, 并具有良好的机械强度。**结论**　利用超声联合 TBP 的方法制备鱼皮脱细胞真皮基质, 可显著缩短脱细胞时间, 改善脱细胞真皮基质的理化性质, 为罗非鱼加工副产物鱼皮的高值化利用及其在生物材料领域的应用提供参考。

关键词: 罗非鱼鱼皮; 超声; 磷酸三丁酯; 脱细胞真皮基质; 工艺优化
中图分类号: TS254.9　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)17–0216–12

Process optimization for the preparation of acellular dermal matrix from *Oreochromis niloticus* skin using tributyl phosphate combined with ultrasound

LI Rong-Xing[1], JIANG Shao-Tong[1,2], LIN Lin[1,2,3*], LU Jian-Feng[1,2,3]

(1. *College of Food and Biological Engineering*, *Hefei University of Technology*, *Hefei* 230601, *China*; 2. *Anhui Province Key Laboratory of Agricultural Products Modern Processing*, *Hefei* 230601, *China*; 3. *Engineering Research Center of Bio-process*, *Ministry of Education*, *Hefei* 230601, *China*)

ABSTRACT: Objective　To enhance the efficiency and performance of acellular dermal matrix (ADM) derived from the skin of *Oreochromis niloticus*, optimize the preparation process. **Methods**　A decellularization process for *Oreochromis niloticus* skin was developed by combining physical (ultrasound) and chemical (tributyl phosphate, TBP)

收稿日期: 2026-03-24
基金项目: 安徽现代农业产业技术体系项目(AARS-08)
第一作者: 李荣杏(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: 2673872230@qq.com
***通信作者:** 林琳(1978—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: linlin@hfut.edu.cn

methods to prepare a decellularized fish skin matrix. The process parameters were optimized using DNA content and mechanical strength as evaluation indices. **Results** Oreochromis niloticus skin was decellularized for 3.70 h at a TBP concentration of 1.6% and an ultrasonic power of 200 W. The resulting ADM demonstrated good mechanical strength and satisfied the requirement for decellularized materials, which was a DNA content of less than 50 ng/mg. **Conclusion** The ultrasonication-assisted TBP method for preparing decellularized fish skin matrix has been shown to significantly reduce the decellularization time whilst concomitantly improving the physicochemical properties of the resultant decellularized matrix. This provides a valuable reference point for the high-value utilization of the by-product fish skin from the processing of *Oreochromis niloticus*, and its potential application in the field of biomaterials.

KEY WORDS: *Oreochromis niloticus* skin; ultrasound; tributyl phosphate; acellular dermal matrix; process optimization

0　引　言

罗非鱼是我国及全球重要的养殖鱼类之一, 主要用于加工冷冻鱼片等产品。在罗非鱼加工过程中, 会产生大量鱼皮、鱼鳞和鱼骨等副产物, 这些副产物通常被低值化利用或直接废弃, 不仅造成蛋白质资源浪费, 也增加了加工企业的环境负担。因此, 对水产品副产物加工的高值化利用, 已成为水产加工领域关注的重要方向。鱼皮富含胶原蛋白, 是一种具有开发潜力的水产加工副产物。近年来, 利用鱼皮胶原及其衍生材料制备高附加值生物材料, 为水产品副产物资源化利用提供了新的途径。

脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)主要以动物的皮肤组织为原料, 通过物理、化学及生物手段对其中的细胞成分进行脱除, 得到含有天然活性成分及完整三维结构的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)[1], 因具有良好的生物相容性和低免疫原性而受到广泛关注。ADM 不仅可作为嵌入细胞的物理支架, 还参与调节许多细胞过程, 如细胞增殖、迁移、分化等[2], 在临床应用中也具备十分广泛的前景, 如用于烧伤、创面愈合、器官移植及模拟病理环境等多项领域。ADM 的主要成分是胶原蛋白, 胶原蛋白广泛存在于动物结缔组织当中, 是人体含量最丰富的蛋白质(约占总蛋白质含量的 30%), 同时也是 ECM 的重要组成部分, 可维持人体多项组织与器官的结构和功能[3]。由于哺乳动物来源的蛋白质存在宗教限制及人畜共患病风险, 水生生物来源已然成为更优选择[4]。罗非鱼鱼皮胶原蛋白中的脯氨酸和羟脯氨酸含量(20%~25%)高于冷水鱼, 具有较高的变性温度(35 ℃), 且在热稳定性和刚性方面都与哺乳动物的胶原蛋白(如猪和牛)相似, 因此在组织工程领域具有良好的应用潜力[5−6]。

脱细胞作为一种重要的生物工程技术, 在实现保留完整的基质结构和完全去细胞化的平衡上一直存在挑战, 且脱细胞方案往往需要根据组织的特异性进行定制[7]。在现有脱细胞技术当中, 化学方法处理是获得 ADM 材料的重要方法之一, 但过度的刺激性化学试剂处理会对 ADM 的性能产生不利影响, 如引起胶原纤维水解, 降低基质机械性能等[8], 且多数方案依赖于长久的浸泡和搅拌, 需要耗费更多的时间洗涤去除脱细胞过程中残留的有毒物质[9]。同时, 长时间的接触可能导致试剂与基质成分发生强结合, 这部分结合将导致形成无法通过洗涤去除的化学残留, 产生细胞毒性[7]。研究表明, 将超声与化学试剂相结合进行脱细胞处理可有效降低化学残留, 并显著提高脱细胞效率[10−12]。例如, 通过超声辅助可显著提高脱细胞肾支架的生产效率[13], 十二烷基硫酸钠联合超声对人脐动脉进行脱细胞处理后, 细胞脱除率高达 90%以上, 并可保持良好的机械性能[14]。相较于传统依赖去污剂长时间处理的方法, 超声辅助脱细胞可显著提升处理效率, 使过程更为迅速便捷[15]。磷酸三丁酯(tributyl phosphate, TBP)作为一种强效的细胞膜破坏剂, 能够通过其亲脂性特性与细胞膜中的磷脂双分子层发生相互作用, 使细胞膜通透性显著增加, 细胞内物质外流并最终导致细胞溶解[16]。

鱼皮是罗非鱼加工副产物, 为提高其利用率和附加值, 本研究选择 TBP 作为脱细胞试剂, 通过超声联合 TBP 对鱼皮进行脱细胞处理, 制备鱼皮脱细胞真皮基质, 分析超声功率、TBP 浓度和脱细胞时间对罗非鱼鱼皮脱细胞作用及机械性能的影响, 优化超声联合 TBP 脱细胞工艺参数, 探索一种对细胞基质结构破坏性小且高效的脱细胞方法, 为罗非鱼皮在生物材料领域的应用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼皮由海南中渔水产有限公司提供, –20 ℃冻存。

乙酸(含量≥99.5%)、TBP(含量≥98.5%)(国药集团化学试剂有限公司); 100×青-链霉素溶液、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS) (1×pH 7.4, 武汉塞维尔生物科技有限公司); PBS (1×pH 6.0, 上海源叶生物科技有限公司); BeyoMag 基因组 DNA 小量抽提试剂盒(磁珠法)(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

FA2004 十万分之一电子分析天平(上海衡平仪器仪表有限公司); KQ-300VDE 三频数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); Plutton100+/200+超微量分光光度计(北京五洲东方科技有限公司); TA-XT PLUS 物性测试仪(英国 Stable 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质制备工艺流程

罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质(decellularized dermal matrix from tilapia skin, DTFS)制备工艺流程: 冷冻罗非鱼鱼皮→解冻→刮除表面杂质→PBS 浸泡→脱细胞处理→灭菌。

操作要点:

(1)冷冻鱼皮在室温下自然解冻后, 将其铺在浸泡过 0.3%乙酸溶液的滤纸上, 鳞片面朝下。鱼皮膨胀 5 min 后, 反转并轻轻刮去表面的黑色杂质。

(2)将鱼皮迅速转移到 PBS 中, 以恢复到肿胀前的状态。

(3)预处理的鱼皮采用 TBP 联合超声处理进行脱细胞, 鱼皮与 TBP 溶液保持 1:10 (*w*:*V*)的料液比, 制备 DTFS。

(4)将 DTFS 在含量 1%的青-链霉素中浸泡 30 min 进行灭菌后备用。

所有操作均在室温(25 ℃)下进行, 超声处理脱细胞过程中, 通过加冰保持体系温度为 25 ℃。

1.3.2 单因素实验

以 DNA 含量和机械强度(拉伸强度和断裂伸长率)为指标, 考察超声功率、TBP 浓度(*V*:*V*, 下同)及处理时间对 DTFS 性能的影响。

(1)超声功率对鱼皮脱细胞的影响。保持 TBP 浓度为 1.5% (*V*:*V*), 处理时间为 3 h, 超声功率分别为 50、100、150、200、250 W 对鱼皮进行脱细胞, 按流程 1.3.1 制备 DTFS, 测定其 DNA 含量和机械强度(拉伸强度和断裂伸长率)。

(2)TBP 浓度对鱼皮脱细胞的影响。保持超声功率为 150 W, 处理时间为 3 h, TBP 浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%对鱼皮进行脱细胞, 按流程 1.3.1 制备 DTFS, 测定其 DNA 含量和机械强度(拉伸强度和断裂伸长率)。

(3)处理时间对鱼皮脱细胞的影响。保持 TBP 浓度为 1.5%, 超声功率为 150 W, 处理时间分别为 1、2、3、4、5 h 对鱼皮进行脱细胞, 按流程 1.3.1 制备 DTFS, 测定其 DNA 含量和机械强度(拉伸强度和断裂伸长率)。

1.3.3 响应面优化实验

根据单因素实验结果, 以超声功率、TBP 浓度及处理时间为自变量, DNA 含量、拉伸强度和断裂伸长率为响应值进行 Box-Behnken 响应面优化, 通过回归模型的拟合预测最佳工艺条件, 响应面因素水平见表 1。

1.3.4 DNA 含量测定

DNA 提取及含量测定按照 BeyoMag 基因组 DNA 小量抽提试剂盒说明书进行。取 DTFS 10~25 mg 在 55 °C 下孵育, 同时加入蛋白酶 K 溶液振荡, 直到组织完全消化, 使用磁珠吸附法提取 DNA, 用超微量分光光度计进行光谱测量溶液浓度值, DNA 含量计算见公式(1)。

$$\text{DNA 含量/(ng/mg)}=\frac{c\times v}{m} \quad (1)$$

式中: c 为溶液质量浓度, ng/mL; v 为所提溶液总体积, mL; m 为组织总重量, mg。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface experiment

水平	因素		
	A: 超声功率/W	*B*: TBP 浓度/%	*C*: 处理时间/h
–1	150	1.5	3
0	200	2.0	4
1	250	2.5	5

1.3.5 机械强度的测定

参考 Lau 等[5]的方法并略做修改。将 DTFS 切为长 50 mm, 宽 5 mm 的细长条并准确记录其厚度, 用探头两端固定进行测试, 使用物性测试仪的 A/TGM 模式测定 DTFS 的机械强度。拉伸速率为 10 mm/s, 感应压力 5 *g*, 记录拉伸强度和断裂伸长率。

1.4 数据处理

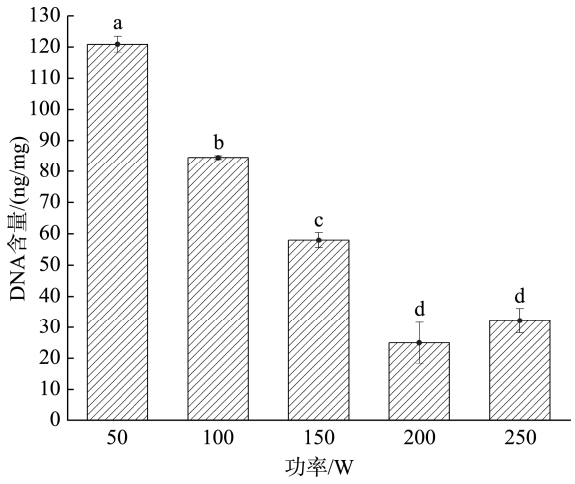
试验数据取 3 次实验结果平均值, 表示为平均值±标准偏差。使用 Origin 2018 软件处理实验数据及图表制作, 采用 SPSS statistic 24 软件对数据进行方差分析和显著性检验, $P<0.05$ 表示存在显著性差异。响应面的设计和分析使用 Design-Expert 8.0.6 软件。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 超声功率对 DTFS 性质的影响

保持 TBP 浓度为 1.5%, 处理时间为 3 h, 考察超声功率对 DTFS 的 DNA 含量和机械性能的影响, 结果见图 1 和图 2。从图 1 可以看出, DTFS 的 DNA 含量总体上随着超声功率增加呈现下降的趋势, 200 W 处理组 DNA 含量最低, 为(24.98±6.64) ng/mg, 符合脱细胞材料低于 50 ng/mg 的标准[17], 证明超声处理可以有效破坏细胞膜, 增加试剂渗透性, 从而达到良好的脱细胞效果。250 W 处理组的 DTFS DNA 含量略微上升, 但与 200 W 时无显著差异($P>0.05$)。超声空化效应会在组织表面剪切出更多微孔, 提高溶剂的渗透率, 使细胞核内的 DNA 流出[18]。同时, 也有研究表明小于 200 bp 的 DNA 片段可能更容易被生物环境降解[19]。



注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05), 图 3、5 同。

图 1　超声功率对 DTFS 的 DNA 含量的影响

Fig.1　Effects of ultrasound power on DNA content of DTFS

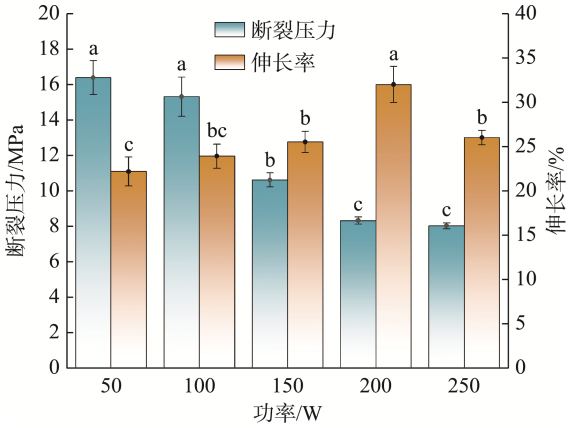
图 2 展示了超声功率对 DTFS 机械强度的影响, 从图中可以看出, 断裂压力随着超声功率增加呈下降趋势。随着超声功率增加, 罗非鱼鱼皮组织内部的间隙逐渐被打开, 同时 TBP 加速向深处扩散, 原本连接疏松的组织进一步被瓦解直至完全断裂, 导致断裂压力持续下降, 在 250 W 处理时达到最低值(8.02±0.16) MPa。超声功率超过 200 W 之后, 多数脆弱结构已被破坏, 因而后续超声功率增加所带来的力学性能破坏作用已微乎其微, DTFS 的断裂压力基本保持不变。本研究所得 DTFS 断裂压力高于多数其他研究, 如经 SDS 联合 Triton X-100 处理的比目鱼鱼皮在脱细胞后拉伸强度为(6.80±1.15) MPa, 同样经过这两种化学物质处理的鲢鱼皮拉伸强度则为(4.36±0.06) MPa[20–21]。

伸长率在很大程度上会直接影响脱细胞鱼皮在临床中的应用, 良好的延展性决定了后续材料在使用过程中能尽可能的拉伸包覆伤口[22]。DTFS 的伸长率随着超声功率增加逐渐上升, 在 200 W 时达到最大值(32.00±2.03)%, 随后开始下降。前期随着超声功率增加, 鱼皮的结构破坏程度也不断增加, 组织之间的连接逐渐疏松, 使得鱼皮的延展性升高, 超声功率 250 W 时, 功率过高使鱼皮内部纤维从疏松状态开始逐渐发生断裂, 导致 DTFS 的延展性下降。

综上, 适当提高超声功率有利于增强 TBP 对组织内部的渗透作用, 提高脱细胞效率; 但过高功率会造成鱼皮组织结构过度损伤, 从而削弱其力学性能。综合 DNA 含量、断裂压力及伸长率等指标分析, 200 W 处理条件下 DTFS 兼具较好的脱细胞效果和力学性能, 因此选取 150~250 W 作为后续响应面优化条件。

2.1.2　TBP 浓度对 DTFS 性质的影响

保持超声功率为 150 W, 处理时间为 3 h, 考察 TBP 浓度对 DTFS 的 DNA 含量和机械性能的影响。TBP 主要通过破坏蛋白质间的相互作用, 来达到脱细胞的效果。与 Triton X-100 等去污剂相比, TBP 能更有效地去除细胞核[10]。如图 3 所示, 随着 TBP 浓度增加, DNA 含量逐渐降低, TBP 浓度为 2.0%时 DNA 含量达最低(38.75 ng/mg), 随后无明显变化, 表明 2%的 TBP 处理可以有效溶解细胞膜, 破坏蛋白质与 DNA 之间的连接以脱除细胞核。



注: 同一指标的不同字母表示差异显著(P<0.05), 图 4、6 同。

图 2　超声功率对 DTFS 机械性能的影响

Fig.2　Effects of ultrasound power on mechanical properties of DTFS

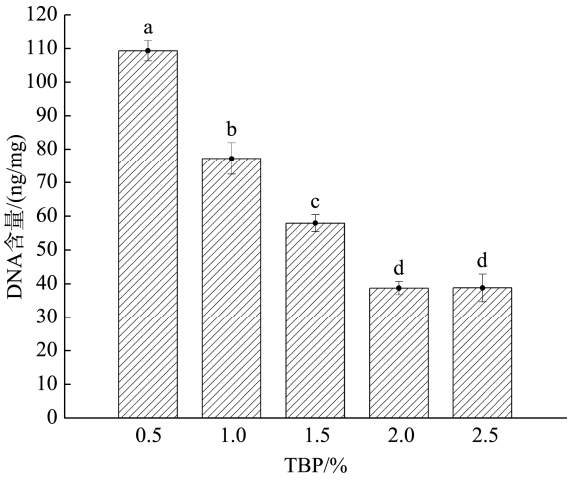


图 3　TBP 浓度对 DTFS 的 DNA 含量的影响

Fig.3　Effects of TBP concentration on DNA content of DTFS

由图 4 可知, TBP 浓度为 2.5%时, DTFS 的断裂压力最低, 为(8.10±0.35) MPa, TBP 浓度为 2.0%处理样品的断裂压力与 2.5% TBP 处理无显著差异(P>0.05)。相较于其他去污剂而言, TBP 不会显著影响组织结构和组成[23], 此外 Deeken 等[24]发现使用 2% TBP 时, 组织中只有少量内皮细胞被破坏, 而胶原蛋白没有出现降解的情况。从 DTFS 的伸长率来看, 2.0%的 TBP 处理制备 DTFS 伸长率最高为(29.21±0.50)%, 表明适当浓度的 TBP 处理可有效提升脱细胞鱼皮的延展性。

综上所述, TBP 浓度对 DTFS 的脱细胞效果和力学性能具有显著影响。随着 TBP 浓度的增加, DNA 残留量逐渐降低, 表明脱细胞效果不断增强; 但过高浓度的 TBP 会对

组织结构造成一定损伤，导致断裂压力下降。当 TBP 浓度为 2.0%时，DTFS 的 DNA 含量降至 38.75 ng/mg，达到脱细胞材料评价标准，同时伸长率达到最大值，表现出良好的延展性能。综合考虑脱细胞效率、机械强度及延展性等因素，确定 1.5%~2.5%的 TBP 浓度为后续优化实验的处理条件。

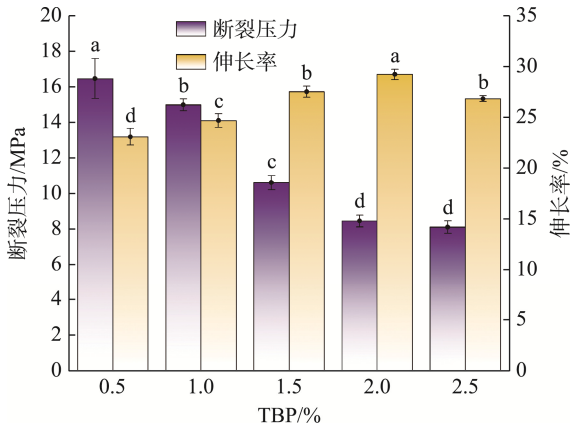


图 4 TBP 浓度对 DTFS 机械性能的影响

Fig.4 Effects of TBP concentration on mechanical properties of DTFS

2.1.3 处理时间对 DTFS 性质的影响

保持超声功率为 150 W，TBP 浓度为 1.5%，考察处理时间对 DTFS 的 DNA 含量和机械性能的影响。如图 5 所示，DTFS 的 DNA 含量随着处理时间延长逐渐降低，在 4 h 后达到最低为(46.50±2.22) ng/mg。超声空化效应产生的剪切力迅速破坏细胞膜，TBP 溶解脂质双分子层，协同释放胞内 DNA。此时 DNA 大量溶解释放到溶液中，可通过离心或冲洗去除，因此 DNA 含量呈下降趋势。而处理时间 5 h 时，整个脱细胞过程趋于稳定，DNA 含量无明显变化。

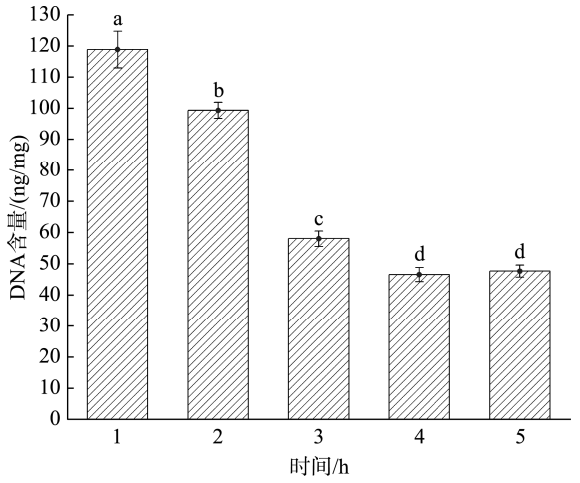


图 5 时间对 DTFS 的 DNA 含量的影响

Fig.5 Effects of time on DNA content of DTFS

图 6 展示了处理时间对 DTFS 的机械性能的影响。从图 6 中可以看出，随着处理时间延长，鱼皮组织结构在物理作用与化学破坏的协同作用下逐渐松散化，断裂压力下降，伸长率则逐渐上升。在时间的累积作用下，TBP 通过超声辅助作用持续渗透至鱼皮结构当中，4 h 后达到临界点，断裂压力趋于稳定。这一临界转变(4 h)的机制可能归因于 TBP 渗透动力学的饱和效应：超声辅助加速 TBP 向鱼皮深部扩散，在 4 h 达到渗透-溶解平衡。

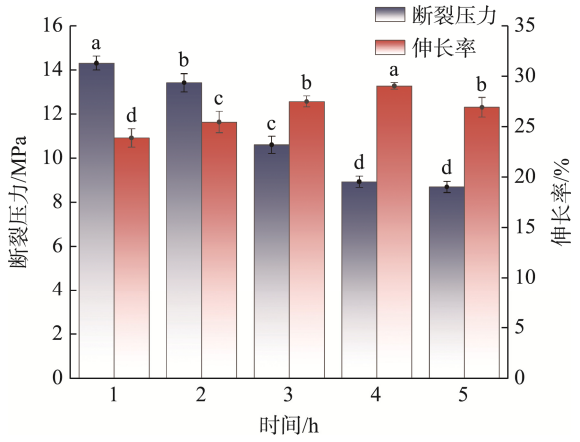


图 6 时间对 DTFS 机械性能的影响

Fig.6 Effects of time on mechanical properties of DTFS

综上所述，处理时间对 DTFS 的脱细胞效果及机械性能均具有显著影响。随着处理时间延长，DNA 残留量逐渐降低，表明脱细胞程度不断提高；同时，鱼皮组织结构逐渐松散，断裂压力下降而伸长率升高。当处理时间达到 4 h 时，DTFS 的 DNA 含量降至 46.50 ng/mg，满足脱细胞材料评价标准，且机械性能变化趋于稳定。继续延长处理时间并未进一步改善脱细胞效果，反而可能增加组织结构损伤风险。因此，综合考虑选取 3~5 h 作为后续优化实验的处理条件。

2.2 响应面优化实验结果分析

2.2.1 实验设计与结果

基于单因素实验结果，取超声功率(*A*)、TBP 浓度(*B*)及处理时间(*C*) 3 因素为自变量，每个变量保持 3 组平行。以 DNA 含量、断裂压力和伸长率作为响应值，采用 Box-Behnken 法设计响应面优化实验，实验设计及结果见表 2。

2.2.2 响应面二次交互作用对 DNA 含量影响的结果分析

使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行多元回归拟合，构建 DNA 含量与超声功率(*A*)、TBP 浓度(*B*)及处理时间(*C*)的三元二次回归方程如下：$Y_1=15.046-5.43619A-1.20292B-1.22656C+0.91943AB+0.8205AC-0.286383BC+12.4031A^2+4.54889B^2+3.84412C^2$。

表 3 为显著性和方差分析结果，由表 3 可知回归模型的 $P<0.0001$，失拟项 P 为 0.1778，不显著($P>0.05$)，证明该模型可客观反映实验条件对 DNA 含量的影响，且变异系

数较低(2.49%), 表明实验数据可靠。决定系数 R^2=0.9976, 证明模型拟合良好[25]。通过 F 比较可知, 影响 DNA 含量的因素顺序为: A>C>B, 且 3 种因素的影响作用均为极显著(P<0.01), 二次项 A^2、B^2、C^2 显著性差异与之相同。在两个因素的交互作用中, 除 BC 之外, AB 和 AC 之间均表现为显著差异(P<0.05)。

表 2　响应面实验设计及结果

Table 2　Design and results of response surface experiment

序号	A/W	B/%	C/h	DNA 含量/(ng/mg)	断裂压力/MPa	伸长率/%
1	150	1.5	4	39.99	8.67	28.82
2	250	1.5	4	27.35	8.16	27.23
3	150	2.5	4	34.81	8.17	27.77
4	250	2.5	4	25.84	8.09	26.64
5	150	2.0	3	38.85	8.45	29.14
6	250	2.0	3	26.27	8.14	28.27
7	150	2.0	5	34.67	8.38	28.65
8	250	2.0	5	25.37	7.96	26.76
9	200	1.5	3	25.07	8.32	30.36
10	200	2.5	3	24.18	8.03	29.38
11	200	1.5	5	23.28	8.20	28.72
12	200	2.5	5	21.24	7.94	28.20
13	200	2.0	4	14.80	7.95	32.74
14	200	2.0	4	14.47	7.97	33.27
15	200	2.0	4	15.57	7.91	32.91
16	200	2.0	4	14.92	7.91	33.19
17	200	2.0	4	15.48	7.99	32.82

3 种因素相互作用对 DNA 含量的影响如图 7 所示, 其中 3D 图的陡峭程度代表了 DNA 含量的变化幅度, 变化幅度则可直接展现实验条件对 DNA 含量影响作用的大小, 同时等高线图的内圈形状越接近椭圆则说明两因素交互作用越强。如图所示, 其中图 7(a)与图 7(b)对应的 3D 图最为陡峭, 且等高线图内圈接近椭圆, 说明功率与处理时间和 TBP 浓度之间的相互作用都较强, 对 DNA 含量的影响效果十分显著, 和方差分析结果相一致。

2.2.3　响应面二次交互作用对断裂压力影响的结果分析

断裂压力与超声功率(A)、TBP 浓度(B)及处理时间(C)的三元二次回归方程如下: Y_2=7.942–0.16375A–0.1405B–0.056C+0.1105AB–0.029AC+0.008BC+0.22A^2+0.111B^2+0.071C^2。

表 4 为显著性和方差分析结果, 由表可知回归模型的 P<0.0001, 失拟项 P 为 0.5423 不显著(P>0.05), 证明该模型可客观反映实验条件对断裂压力的影响, 且变异系数较低(0.39%), 表明实验数据可靠。决定系数 R^2=0.9908, 证明模型拟合良好。在对断裂压力作用的方差分析中发现 A、B、C 3 因素作用均表现为极显著(P<0.01), 作用顺序为 A>B>C, 二次项 A^2、B^2、C^2 显著性差异同样都表现为极显著。在两因素交互作用中, 仅 AB 之间表现为差异极显著(P<0.01)。

结合 3D 图及等高线图观察发现, 图 8(a)中 3D 图的陡峭程度显然高于图 8(b)和图 8(c), 同时其等高线图的内圈形状呈椭圆型。表明在时间固定的情况下, 断裂压力随着超声功率和 TBP 浓度的变化而发生显著的变化, 说明两者的交互作用较强, 二者结合对断裂压力的影响作用较大。反之, 超声功率与时间及 TBP 浓度与时间之间的交互作用不显著, 对断裂压力的趋势转变不起决定性作用。

表 3　基于 DNA 含量为指标的回归模型方差分析

Table 3　Analysis of variance of regression model based on DNA content

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1125.4200	9	125.0500	326.86	<0.0001	**
A	236.4200	1	236.4200	617.98	<0.0001	**
B	11.5800	1	11.5800	30.26	0.0009	**
C	12.0400	1	12.0400	31.46	0.0008	**
AB	3.3800	1	3.3800	8.84	0.0207	*
AC	2.6900	1	2.6900	7.04	0.0328	*
BC	0.3281	1	0.3281	0.86	0.3852	
A^2	647.7400	1	647.7400	1693.14	<0.0001	**
B^2	87.1300	1	87.1300	227.74	<0.0001	**
C^2	62.2200	1	62.2200	162.64	<0.0001	**
残差	2.6800	7	0.3826			
失拟项	1.8000	3	0.6001	2.74	0.1778	不显著
误差项	0.8776	4	0.2194			
总和	1128.1000	16				
R^2	0.9976					
R_{Adj}^2	0.9946					

注: *表示差异显著 P<0.05; **表示差异极显著 P<0.01, 下同。

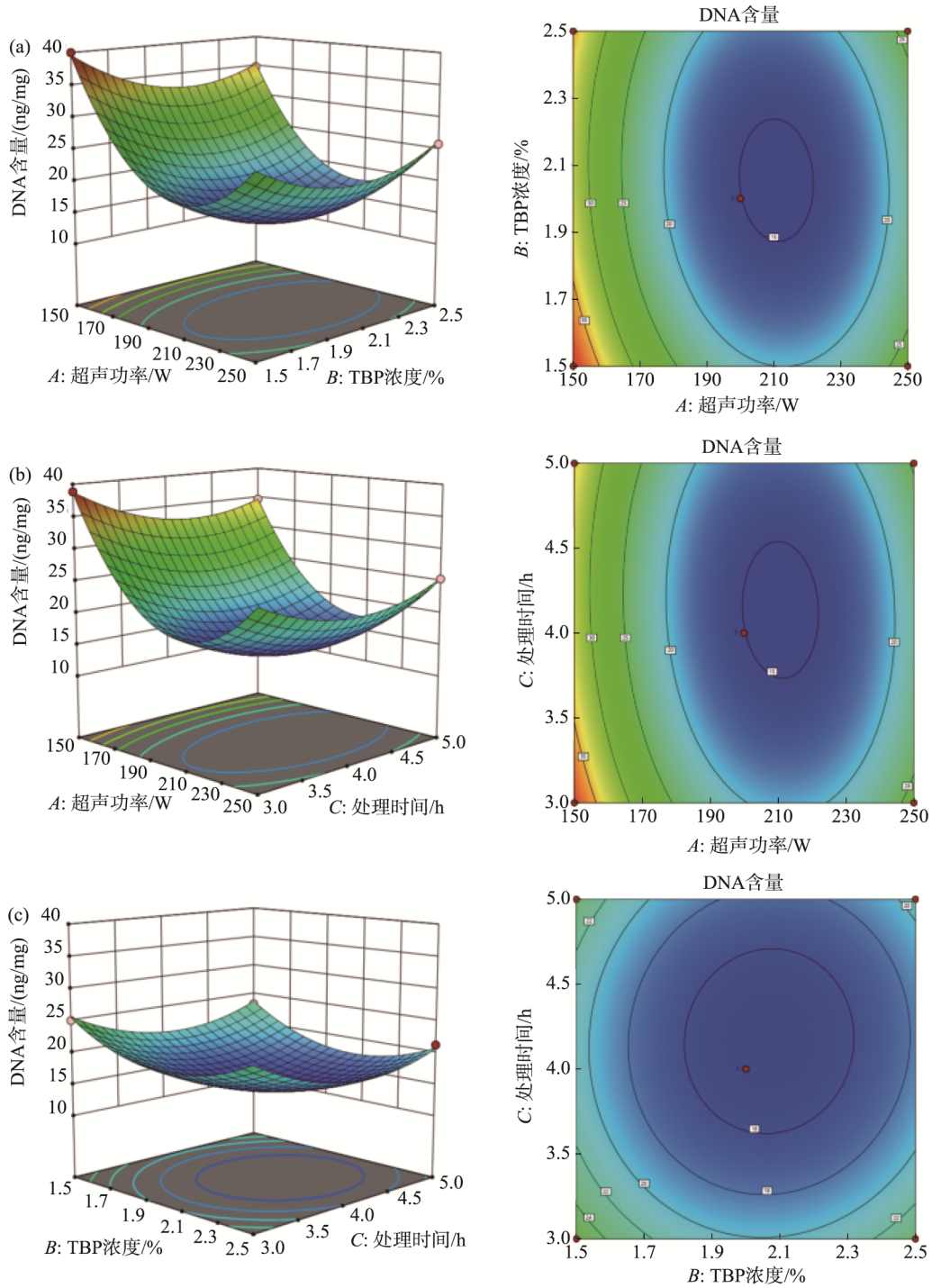


图 7 3 因素交互作用对 DNA 含量影响的 3D 图和等高线图

Fig.7 3D and contour plots of the effects of 3 factor interactions on DNA content

表 4 断裂压力指标的回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression model based on break stress

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	0.7511	9	0.0835	83.35	<0.0001	**
A	0.2145	1	0.2145	214.25	<0.0001	**
B	0.1579	1	0.1579	157.73	<0.0001	**

表 4(续)

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
C	0.0251	1	0.0251	25.06	0.0016	**
AB	0.0488	1	0.0488	48.78	0.0002	**
AC	0.0034	1	0.0034	3.36	0.1095	
BC	0.0003	1	0.0003	0.26	0.6286	
A^2	0.2038	1	0.2038	203.54	<0.0001	**
B^2	0.0519	1	0.0519	51.81	0.0002	**
C^2	0.0212	1	0.0212	21.20	0.0025	**
残差	0.0070	7	0.0010			
失拟项	0.0027	3	0.0009	0.83	0.5423	不显著
误差项	0.0043	4	0.0011			
总和	0.7581	16				
R^2	0.9908					
R_{Adj}^2	0.9789					

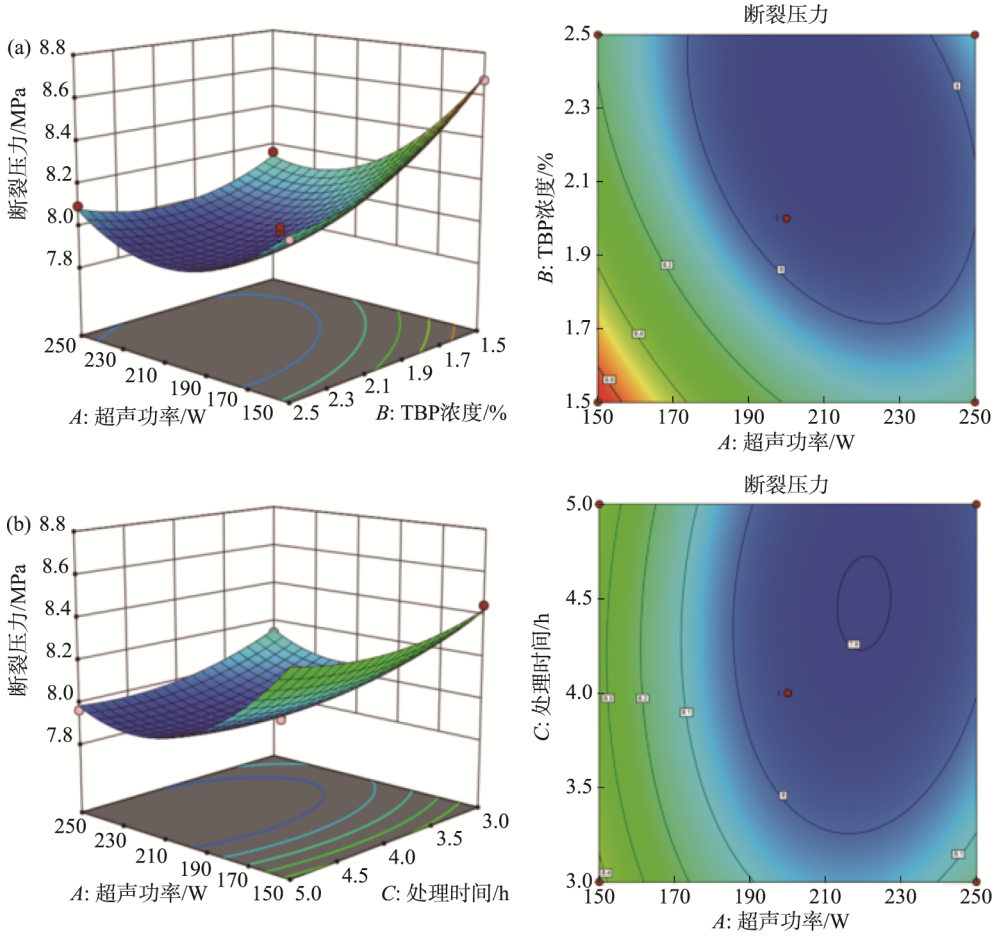


图 8　三因素交互作用对断裂压力影响的 3D 图和等高线图

Fig. 8　3D and contour plots of the effects of 3 factor interactions on break stress

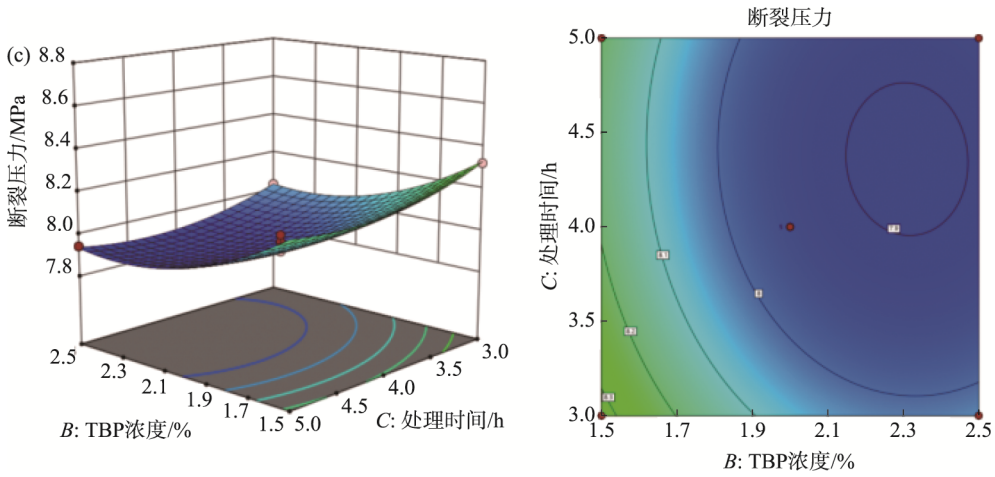


图 8(续) 三因素交互作用对断裂压力影响的 3D 图和等高线图

Fig.8 3D and contour plots of the effects of 3 factor interactions on break stress

2.2.4 响应面二次交互作用对伸长率影响的结果分析

伸长率与超声功率(A)、TBP 浓度(B)及处理时间(C)的三元二次回归方程如下：$Y_3=32.9862-0.685375A-0.393875B-0.6035C+0.11425AB-0.2555AC+0.1165BC-3.16448A^2-2.20448B^2-1.61822C^2$。

表 5 为显著性和方差分析结果，由表可知回归模型的 $P<0.0001$，失拟项不显著($P=0.6852$)，证明该模型可客观反映实验条件对伸长率的影响，且变异系数较低(0.70%)，表明实验数据可靠。决定系数 $R^2=0.9966$，证明模型拟合良好。通过 F 比较可知，影响伸长率显著性的顺序为：$A>C>B$，且 3 因素的影响作用均为极显著($P<0.01$)，二次项 A^2、B^2、C^2 显著性差异与之相同。在两因素交互作用中，仅 AC 之间表现为差异显著($P<0.05$)。

根据图 9 的 3D 图及等高线图可以看出，图 9(b)的 3D 图的陡峭程度最大，且其等高线图的内圈形状呈最接近椭圆，此结果与方差分析结果一致，说明超声功率与时间的交互作用对伸长率的影响作用最显著。

表 5 基于伸长率指标的回归方程方差分析

Table 5 Analysis and variance of regression model based on elongation rate

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	89.7400	9	9.9700	230.12	<0.0001	**
A	3.7600	1	3.7600	86.73	<0.0001	**
B	1.2400	1	1.2400	28.64	0.0011	**
C	2.9100	1	2.9100	67.25	<0.0001	**
AB	0.0522	1	0.0522	1.21	0.3086	
AC	0.2611	1	0.2611	6.03	0.0438	*
BC	0.0543	1	0.0543	1.25	0.2999	
A^2	42.1600	1	42.1600	973.14	<0.0001	**
B^2	20.4600	1	20.4600	472.26	<0.0001	**
C^2	11.0300	1	11.0300	254.48	<0.0001	**
残差	0.3033	7	0.0433			
失拟项	0.0863	3	0.0288	0.53	0.6852	不显著
误差项	0.2170	4	0.0542			
总和	90.0400	16				
R^2	0.9966					
R_{Adj}^2	0.9923					

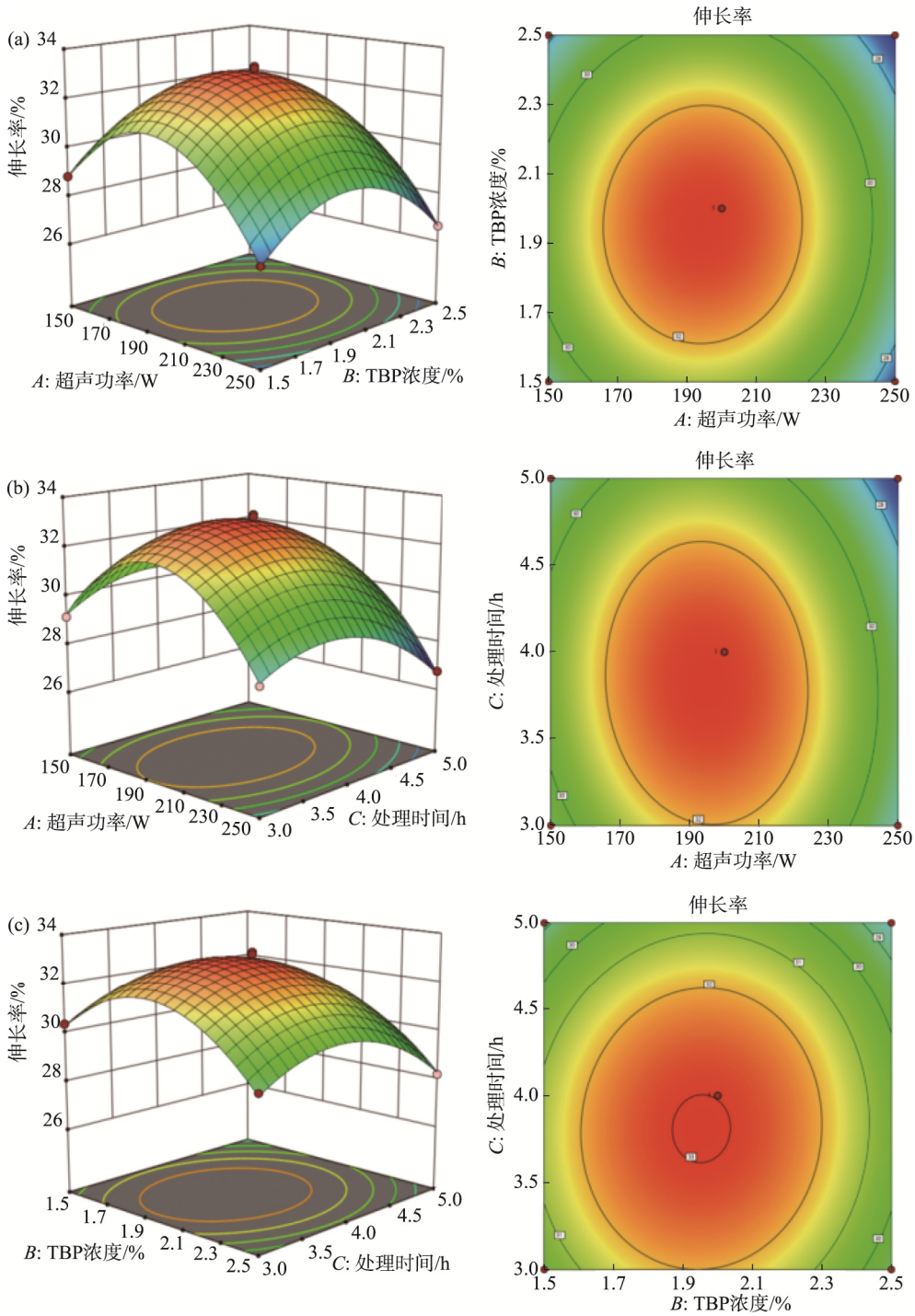


图 9　3 因素交互作用对伸长率影响的 3D 图和等高线图

Fig 9　3D and contour plots of the effects of the 3 factor interaction on elongation rate

2.3　响应面实验优化最佳工艺验证

基于响应面法优化结果(以 DNA 含量、断裂压力及伸长率最优为目标)，利用 Design-Expert 8.0.6 软件对超声功率、TBP 浓度及处理时间 3 因素进行综合优化，获得最佳工艺参数为：超声功率 182.75 W、TBP 浓度 1.62%、时间 3.70 h。模型预测在此条件下 DNA 含量为 22.91 ng/mg、断裂压力为 8.25 MPa、伸长率为 31.94%。考虑实际操作便利性，将工艺参数微调为超声功率 200 W、TBP 浓度 1.60%、时间 3.70 h。进行 3 次平行验证实验，测得 DNA 含量为 (22.99±0.52) ng/mg，断裂压力为(8.28±0.18) MPa，伸长率为(31.72±0.75)%。验证结果与模型预测值无显著差异(P>0.05)，表明该优化模型具有良好的预测能力与适用性。

3 讨论与结论

超声波作为一种典型的机械波已被广泛开发为多功能生物医学应用的物理工具, 尤其是在医学成像方面的应用已经十分成熟[26]。本研究通过超声与 TBP 协同作用对罗非鱼鱼皮进行脱细胞处理, 结果表明联合处理可显著提升脱细胞效率, 同时, 也可在一定程度上平衡脱细胞程度与基质结构完整性之间的关系。

超声波可以穿透表皮组织并实现松散结缔组织的作用, 该现象主要由超声诱导造成的空化效应引起, 同时空化气泡剧烈坍塌产生的压力可使细胞膜上出现可逆的微孔, 该效应有利于细胞外的药物流入[27]。利用超声的空化效应和声孔效应使鱼皮组织表面形成同样类似的可逆微孔结构, 该结构可有效提高 TBP 的渗透率, 使 TBP 快速渗入深层次的组织内部结构以实现对组织包裹紧密的细胞核的去除作用, 从而达到使用低浓度 TBP 即可完成高细胞脱除率的效果。在完成细胞脱除后, 表面可逆微孔结构逐渐消失, 部分脆弱组织结构被破坏, 而主要结构仍完整保留, 故在力学性能方面 DTFS 仍表现优异。超声在去细胞化过程中的有效性具有重要意义, 未来可将其应用于组织重塑[28]。

目前关于 TBP 用于生物材料脱细胞的研究不多, 作为典型的两性离子有机溶剂, 与常用的脱细胞试剂 Triton-X 100 相比, TBP 的脱细胞效果更好, 与 SDS 相比, 二者脱细胞效果相当, 但 TBP 在维持 ECM 架构方面的效果更好[29]。有研究表明, 将 TBP 和 SDS 分别与 Triton-X 100 联合使用, Triton-SDS 或 Triton-TBP 处理均可实现 100%去除可见细胞核, 但 Triton-TBP 处理样品则具有更高的细胞骨架蛋白密度[30]。将 TBP 与超声进行联合使用并进行工艺优化, 一方面可缩短脱细胞时间, 提升脱细胞罗非鱼鱼皮制备效率, 另一方面可保证较高的细胞核脱除率。

本研究采用 TBP 联合超声处理制备罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质, 通过单因素实验和响应面设计优化罗非鱼鱼皮脱细胞工艺参数。结果表明, 通过工艺优化得到最佳参数条件为超声功率 200 W, TBP 体积浓度 1.60%, 时间 3.70 h。该条件下所制备的罗非鱼鱼皮脱细胞真皮基质具备较高细胞脱除率和良好的力学性能。相较于单一化学去污剂长时间处理的脱细胞方法, 超声联合 TBP 脱细胞处理可显著提升处理效率, 使脱细胞过程更为迅速、便捷。这一方法可进一步提升罗非鱼鱼皮的利用率和附加值, 为其在生物材料领域(如组织工程支架)的应用拓展更多可能。

参考文献

[1] 杨加敏, 胥义, 党航宇, 等. 组织器官脱细胞支架的制备及研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2169–2186.
Yang Jiamin, Xu Yi, Dang Hangyu, et al. Preparation of tissue and organ decellularized scaffolds: a review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2169–2186.

[2] Theocharis A D, Skandalis S S, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, 97: 4–27.

[3] 叶滔, 项琪, 杨艳, 等. 胶原蛋白的开发与应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 942–960.
Ye Tao, Xiang Qi, Yang Yan, et al. Research, development and application of collagen: a review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 942–960.

[4] Do L Linhares Rodrigues Menezes M, Ribeiro H L, De Oliveira M Da Silva Abreu F, et al. Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 189: 110852.

[5] Lau C S, Hassanbhai A, Wen Feng, et al. Evaluation of decellularized tilapia skin as a tissue engineering scaffold [J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2019, 13(10): 1779–1791.

[6] Huang J Y, Wong T Y, Tu Tingyuan, et al. Assessment of tilapia skin collagen for biomedical research applications in comparison with mammalian collagen [J]. Molecules, 2024, 29(2): 402.

[7] Jin Caijun, Zhang Xinrui, Jin Yongxun, et al. Acellular extracellular matrix scaffolds in regenerative medicine: advances in decellularization and clinical applications [J]. Journal of Functional Biomaterials, 2025, 16(10): 383.

[8] 王月坤, 侯虎, 张凯, 等. 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(4): 346–354.
Wang Yuekun, Hou Hu, Zhang Kai, et al. Preparation and evaluation of biocompatibility of acellular dermal matrix of *Basa* fish (*Pangasius bocourti*) [J]. Material Sciences, 2018, 8(4): 346–354.

[9] Porzionato A, Stocco E, Barbon S, et al. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 4117.

[10] 周建伟, 白玉龙, 李淼, 等. 常用组织材料脱细胞试剂残留量与细胞毒性相关性研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2021, 44(6): 442–446, 453.
Zhou Jianwei, Bai Yulong, Li Miao, et al. Correlation between the residual amount of decellularization reagents in common tissue materials and cytotoxicity [J]. International Journal of Biomedical Engineering, 2021, 44(6): 442–446, 453.

[11] Duarte M M, Ribeiro N, Silva I V, et al. Fast decellularization process using supercritical carbon dioxide for trabecular bone [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2021, 172: 105194.

[12] Han Yuqing, Zhang Bingyan, Li Jinjin, et al. Preparation of extracellular matrix of fish swim bladders by decellularization with supercritical carbon dioxide [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2023, 10(1): 14.

[13] Manalastas T M, Dugos N, Ramos G, et al. Effect of decellularization parameters on the efficient production of kidney bioscaffolds [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(5): 1239–1251.

[14] Lin C H, Hsia K, Su C K, et al. Sonication-assisted method for decellularization of human umbilical artery for small-caliber vascular tissue engineering [J]. Polymers, 2021, 13(11): 1699.

[15] Koo M A, Jeong H, Hong S H, et al. Preconditioning process for dermal tissue decellularization using electroporation with sonication [J]. Regenerative Biomaterials, 2022, 9: rbab071.

[16] 杨雄刚. 不同降低免疫原性的方法对同种异体肌腱生物学特性影响的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2020: 37.

Yang Xionggang. The effect of several methods to reduce immunogenicity on biological characteristics of allogenic tendons [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2020: 37.

[17] Zhang Jin, Xiang Yang, Yang Quyang, et al. Adipose-derived stem cells derived decellularized extracellular matrix enabled skin regeneration and remodeling [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 347995.

[18] Forouzesh F, Rabbani M, Bonakdar S. A comparison between ultrasonic bath and direct sonicator on osteochondral tissue decellularization [J]. Journal of Medical Signals and Sensors, 2019, 9(4): 227–233.

[19] Aron J, Bual R, Alimasag J, et al. Effects of various decellularization methods for the development of decellularized extracellular matrix from tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera [J]. International Journal of Biomaterials, 2024, 2024: 6148496.

[20] Wei Zeyu, Zhang Junjie, Guo Zhiwen, et al. Study on the preparation and properties of acellular matrix from the skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2023, 111(6): 1328–1335.

[21] Heo S Y, Kim T H, Kim S C, et al. Therapeutic effect of decellularized extracellular matrix from fish skin for accelerating skin regeneration [J]. Marine Drugs, 2024, 22(10): 437.

[22] Liu Zhe, Yu Mingzhao, Peng Hao, et al. Decellularized tilapia fish skin: a novel candidate for tendon tissue engineering [J]. Materials Today Bio, 2022, 17: 100488.

[23] Bottagisio M, Pellegata A F, Boschetti F, et al. A new strategy for the decellularisation of large equine tendons as biocompatible tendon substitutes [J]. European Cells & Materials, 2016, 32: 58–73.

[24] Deeken C R, White A K, Bachman S L, et al. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate [J]. Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials, 2011, 96(2): 199–206.

[25] Wang Shangta, Lin H V, Syu Y J, et al. Effect of drying time and frying conditions on the quality of pork rinds by response surface methodology [J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(12): 10194–10210.

[26] Huang Hui, Zheng Yi, Chang Meiqi, et al. Ultrasound-based micro-nanosystems for biomedical applications [J]. Chemical Reviews, 2024, 124(13): 8307–8472.

[27] Huang Danqing, Wang Jinglin, Song Chuanhui, et al. Ultrasound-responsive matters for biomedical applications [J]. The Innovation, 2023, 4(3): 100421.

[28] Mardhiyah A, Sha'ban M, Azhim A. Evaluation of histological and biomechanical properties on engineered *Meniscus* tissues using sonication decellularization [C]//2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). IEEE, 2017: 2064–2067.

[29] Demontis F, Loi G, Mazzotti E, et al. Uniaxial tensile tests and digital image correlation analysis for the mechanical characterization of human *Fascia* lata under different decellularization treatments [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2025, 113(11): e38012.

[30] Woods T, Gratzer P F. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft [J]. Biomaterials, 2005, 26(35): 7339–7349.

(责任编辑: 蔡世佳　曹岱琳)