



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106719599 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611063329.8

(22)申请日 2016.11.28

(71)申请人 济南万泉生物技术有限公司
地址 250000 山东省济南市高新区港兴三路
路北段药谷1号楼

(72)发明人 李安娜 李栋

(74)专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 张世静

(51) Int. Cl.
A01N 1/02(2006.01)

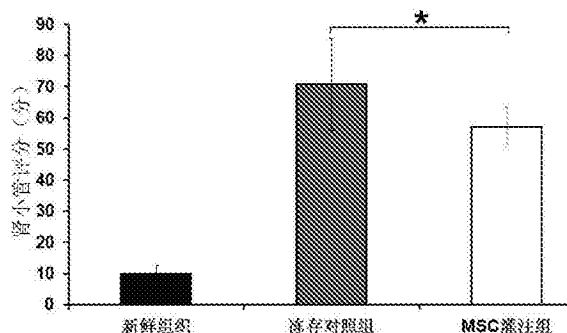
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

一种降低深低温冻存组织器官冰晶损伤的方法

(57)摘要

本发明提供了一种降低深低温冻存组织器官冰晶损伤的方法,本发明提供的这种低温冻存器官的处理方法,在器官待冷冻前使用干细胞条件培养基灌注,提高了组织细胞的生存状态,增加了抗凋亡能力,减少了细胞在离体后发生的氧化应激损伤;在复苏后立即使用含鲜活间充质干细胞的完全培养基进行后灌注处理,对冻存过程中受到冷冻保护剂毒性和渗透损伤的细胞进行主动修复,可有效减少细胞凋亡比率,减少组织结构的破坏。



1. 一种降低深低温冻存组织器官冰晶损伤的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待冷冻的器官连接预冷至4℃的梯度浓度混合程控降温器官灌注仪,灌注25℃恒温的间充质干细胞条件培养基,灌注时间为30-60 min;

所述间充质干细胞条件培养基为传代5代内脂肪、脐带、脐血或骨髓中的一种的间充质干细胞,在传代后24h后长到70~80%汇合,更换无血清间充质干细胞培养基,48h后收集的培养上清,经1000~3000g离心10~30min,取上清后使用0.1 μ m~0.22 μ m微孔滤膜过滤后所得;

2) 然后向器官灌注预冷至4℃的冷冻保护剂,灌注时长30min;

3) 将处理完毕的器官放入冷冻袋,封口后置于程控降温仪中,按照设定降温程序进行程序化降温,待其温度降至-80℃后投入液氮中存放;

所述程控降温仪降温程序设定为①4℃平衡,②以1℃/min的速度降至0℃,并保持10min,③以2℃/min的速度降至-18℃,保持15min,④以2℃/min速度降至-45℃,保持15min,⑤再以5℃/min的速度降至-90℃,保持5min;

4) 复苏器官时,将冻存器官自液氮取出后置于37℃水浴中,不断摇动;

5) 完全融化后再次进行灌注,灌注液为12-25℃的含间充质干细胞条件培养基,灌注时间为30min-60min;

处理完成的器官可直接进行移植。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述间充质干细胞条件培养基,细胞密度为 1×10^7 /L,灌注速度为1.5ml/min。

一种降低深低温冻存组织器官冰晶损伤的方法

技术领域

[0001] 本发明属于临床医学的器官组织深低温冻存领域,公开了在器官组织深低温冻存前后,使用间充质干细胞及其分泌产物灌注,从而达到减少细胞凋亡、降低冰晶对细胞膜损害的一种预处理和后处理的方法。

背景技术

[0002] 器官移植是治疗严重器官衰竭的最终手段,但是供体捐献和受体准备总是存在时间和空间的差异,因此,进一步开发更安全长效的器官冷冻保存——复苏方法成了亟待解决的问题。

[0003] 生物组织的冷冻冻存过程包括冷冻保护剂的灌注、程控降温,深低温储存,复苏解冻及冷冻保护剂的置换清洗。每个步骤都影响着冷冻后器官中细胞的存活率及组织结构功能的保持。1972年,Mazur等首先从中国仓鼠组织培养细胞低温冻存的实验中,提出冷冻损伤的两因素假说。一是溶质损伤效应,是指冷却速度过慢,导致细胞外溶质浓度升高。二是机械损伤效应,是指冷却速度过快,细胞内形成冰晶直接损伤细胞的膜结构。

[0004] 为了降低冻存对细胞的破坏,现在多使用玻璃化冻存,使液体粘稠度提高,在冷冻固化过程中减少内部晶体形成。溶液实现玻璃化主要靠提高冷却速率和增加溶液浓度,这就需要使用冷冻保护剂。但是,冷冻保护剂本身也会对细胞造成损伤,高浓度保护剂会对细胞和组织形成毒性作用,而在复温后洗脱的过程中还会造成细胞膜内外的渗透压差,形成渗透损伤。因此,当今深低温研究的重点就在于减少玻璃化过程中冷冻保护剂的损害。现有实验的方向主要有改善导入和洗脱方式,使用“连续导入法”;加快保护剂渗透的“负压浸渍技术”;使用不同种类冷冻保护剂使其相互稀释的复配技术。但是,冷冻保护剂除了自身特性外,在不同细胞组织中的保护和毒性作用也不尽相同。而器官并不是多种细胞的简单集合,作为结构复杂的复合组织,其降温过程中各部分温度分布不均匀导致的冷却速率的差异和各种细胞对冷冻保护剂的敏感性不同使其低温冻存的难度大为增加。因此,寻找新的组织细胞冷冻保护方法及修复损伤的方法极为重要。

发明内容

[0005] 为了解决以上技术问题,本发明提供了一种在冷冻冻存器官过程中,应用脐带间充质干细胞及其条件培养基进行组织内预灌注和后灌注的方法,可有效的提高组织的自我修复能力,有效提高复苏后组织内活细胞的比例,使组织器官在复温后更好的恢复功能。

[0006] 本发明涉及的器官深低温冻存方法,包括以下步骤:

1) 将待冷冻的器官连接预冷至4℃的梯度浓度混合程控降温器官灌注仪,灌注25℃恒温的间充质干细胞条件培养基,灌注时间为30-60 min;

所述间充质干细胞条件培养基为传代5代内脂肪、脐带、脐血或骨髓中的一种的间充质干细胞,在传代后24h后长到70~80%汇合,更换无血清间充质干细胞培养基,48h后收集的培养上清,经1000~3000g离心10~30min,取上清后使用0.1 μ m~0.22 μ m微孔滤膜过滤后所得;

2) 然后向器官灌注预冷至4℃的冷冻保护剂,灌注时长30min;

3) 将处理完毕的器官放入冷冻袋,封口后置于程控降温仪中,按照设定降温程序进行程序化降温,待其温度降至-80℃后投入液氮中存放;

所述程控降温仪降温程序设定为①4℃平衡,②以1℃/min的速度降至0℃,并保持10min,③以2℃/min的速度降至-18℃,保持15min,④以2℃/min速度降至-45℃,保持15min,⑤再以5℃/min的速度降至-90℃,保持5min;

4) 复苏器官时,将冻存器官自液氮取出后置于37℃水浴中,不断摇动;

5) 完全融化后再次进行灌注,灌注液为12-25℃的含间充质干细胞条件培养基,灌注时间为30min-60min;

处理完成的器官可直接进行移植。

[0007] 所述间充质干细胞条件培养基,细胞密度为 $1 \times 10^7/L$,灌注速度为1.5ml/min。

[0008] 本发明提供的这种低温冻存器官的处理方法,在器官待冷冻前使用干细胞条件培养基灌注,提高了组织细胞的生存状态,增加了抗凋亡能力,减少了细胞在离体后发生的氧化应激损伤;在复苏后立即使用含鲜活间充质干细胞的完全培养基进行后灌注处理,对冻存过程中受到冷冻保护剂毒性和渗透损伤的细胞进行主动修复,可有效减少细胞凋亡比率,减少组织结构的破坏。

附图说明

[0009] 图1. 为本发明提供的器官深低温冻存方法流程图;

图2. 肾动脉插管及结扎固定;

图3. 各组标本HE染色结果;

A为新鲜大鼠肾脏石蜡切片HE染色(40×);

B为新鲜大鼠肾脏石蜡切片HE染色(200×);

C为冻存对照组大鼠肾脏石蜡切片HE染色(40×);

D为冻存对照组大鼠肾脏石蜡切片HE染色(200×);

E为MSC灌注组大鼠肾脏石蜡切片HE染色(40×);

F为MSC灌注组大鼠肾脏石蜡切片HE染色(200×);

图4. 各实验组大鼠肾脏肾小管paller氏评分;

图5. 各组标本TUNEL染色结果;

A,B. 新鲜大鼠肾脏石蜡切片TUNEL染色(200×);

C,D. 冻存对照组大鼠肾脏石蜡切片TUNEL染色(200×);

E,F. MSC灌注组大鼠肾脏石蜡切片TUNEL染色(200×)。

具体实施方式

[0010] 为明确本发明的目的、技术方案和优点,下面以大鼠肾脏为例,对本发明的技术方案进行清楚、完整的描述。

[0011] 实施例1

大鼠肾脏的冻存及复苏

取培养至第4-6代的脂肪间充质干细胞,传代后换新鲜培养基,48h后收集培养上清待

用。

[0012] 选取8-12周龄SD大鼠,腹腔注射水合氯醛麻醉。打开腹腔,取其肾脏,注意保持肾动脉及静脉结构完整。

[0013] 将取出肾脏置于4℃生理盐水中冲洗,后置于同样预冷的干细胞条件培养基。

[0014] 通过肾动脉插管并行丝线固定,结扎肾动脉分支后与预冷至4℃的程控降温器官灌注仪相连,启动定量进液泵,以1.5ml/min的速率向肾脏灌注干细胞条件培养基,时间60min(图2)。

[0015] 灌注液换为冷冻保护剂,以同样方式进行灌注。

[0016] 将灌注完毕的肾脏装入冷冻袋,置于程序降温仪中,程序设定为①4℃平衡,②以1℃/min的速度降至0℃,并保持10min,③以2℃/min的速度降至-18℃,保持15min,④以2℃/min速度降至-45℃,保持15min,⑤再以5℃/min的速度降至-90℃,保持5min。随后将冻存袋投入液氮。

[0017] 冻存一周后,将冻存肾脏取出,置于37℃水浴融化,时刻摇动使温度分布均匀。

[0018] 将培养至第4-6代的脂肪间充质干细胞使用胰酶消化,使用预冷至4℃的条件培养基重悬调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/L$ 。

[0019] 器官在水浴中完全融化后移入干细胞条件培养基,再次将肾动脉插管与灌注仪连接,使用步骤8所述干细胞悬液进行灌注,以1.5ml/min的速率进行30min。

[0020] 实施例2

冻存器官复苏后活性的测定

在冻存实验中将大鼠肾脏分为三组,分别为:

新鲜组:取大鼠肾脏后立即固定于4%多聚甲醛,不经冻存。

[0021] 对照组:按照一般冻存方法不经干细胞处理冻存。

[0022] 实验组:按照本发明所述方法进行冻存。

[0023] 在冻存一周后复苏各组器官,对其结构的完整性和细胞活性进行测定。

[0024] 形态学分析

组织石蜡切片的制作

石蜡包埋及切片:将各组肾脏通过肾动脉沿冠状面切开,将其中一半组织置于4%多聚甲醛中进行固定。另一半组织用于分子生物学检测。固定组织经脱水、透明、浸蜡、包埋制作石蜡组织块,在石蜡切片机上进行冠状连续切片,厚度为4um。

[0025] 苏木素-伊红染色(HE染色)

脱蜡水化:将石蜡切片60℃烤片30min后依次投入二甲苯20min×2,无水乙醇10min×2,95%乙醇5min×2,90%乙醇5min,80%乙醇5min,70%乙醇5min,PBS 5min×3。

染色分化:将切片浸入苏木素染液染色10min,滴1%盐酸酒精溶液5s,自来水冲洗反蓝10min。

[0026] 复染:浸入0.5%伊红染液2-5min,PBS冲洗10min。

[0027] 脱水封片:常规梯度乙醇脱水,将染色完成的切片浸入80%乙醇5min,90%乙醇5min,95%乙醇10min×2,无水乙醇10min×2,二甲苯10min×2,中性树胶封片。

[0028] 光镜下观察拍照。

[0029] 形态学分析:

I. 冻存复苏后对照及MSC灌注组肾脏可见肾皮质区出现近端肾小管急性变性、坏死为主要特征的病理改变;肾小管上皮细胞刷状缘脱落,细胞扁平,肾小管管腔扩张,部分细胞空泡变性及肿胀破裂,胞核浓缩、破裂甚至消失,部分基底膜裸露或不完整,管腔内可见脱落的上皮细胞,多处小管管腔内充满细胞碎屑,管腔狭窄或阻塞,弥漫间质水肿。肾小球无明显病理变化(图3)。

[0030] II. 对肾小管损伤进行paller氏评分:每个标本选择10个高倍镜视野,对病变最严重的10个肾小管进行评分,共计数100个有病变的肾小管,评分标准:肾小管明显扩张、肾小管上皮细胞扁平1分;刷状缘脱落分;肾小管上皮细胞空泡变性1-2分;间质水肿1分;管腔梗阻或管型1-2分;肾小管上皮细胞坏死1-2分;肾小管上皮细胞膜囊泡形成1-2分。

[0031] 肾小管损伤Paller氏评分结果,对照组和实验组显示冻存过程中肾小管有损伤,但是本发明方法处理实验组评分低于冻存对照组(图4)。

[0032] 检测

① 脱蜡水化过程如前所述

② 将切片浸入3%双氧水室温孵育10min。PBS冲洗2min×3;

③ 将切片浸入含10 μ g/L蛋白酶K的100mM Tris/HCl中,37 $^{\circ}$ C消化20min,PBS冲洗5min×3;

④ 甩去切片上多余液体,滴加100 μ lTUNEL反应溶液。阴性对照使用蒸馏水替代TdT酶。37 $^{\circ}$ C避光孵育60min;

⑤ PBS冲洗5min×3,将DAPI染色液与水性封片剂混合后封片;

⑥ 镜下观察,每张切片随机取5个视野拍照并对凋亡细胞数进行评价。

[0033] 细胞凋亡过程中细胞核染色质的形态学改变分为三期:I期的细胞核呈波纹状或呈折缝样,部分染色质出现浓缩状态;IIa期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化;IIb期的细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。凋亡细胞经TUNEL染色后在激光显微镜下观察呈绿色。

[0034] 结果显示本发明方法处理组器官凋亡细胞少于对照组(图5)。

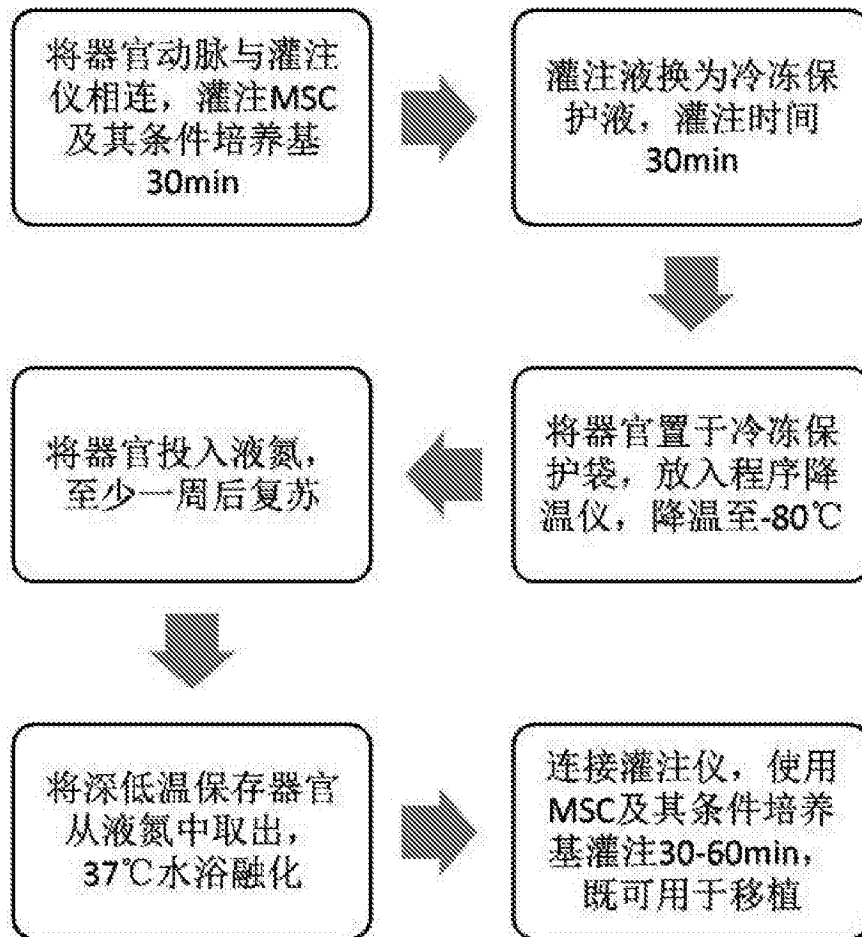


图1

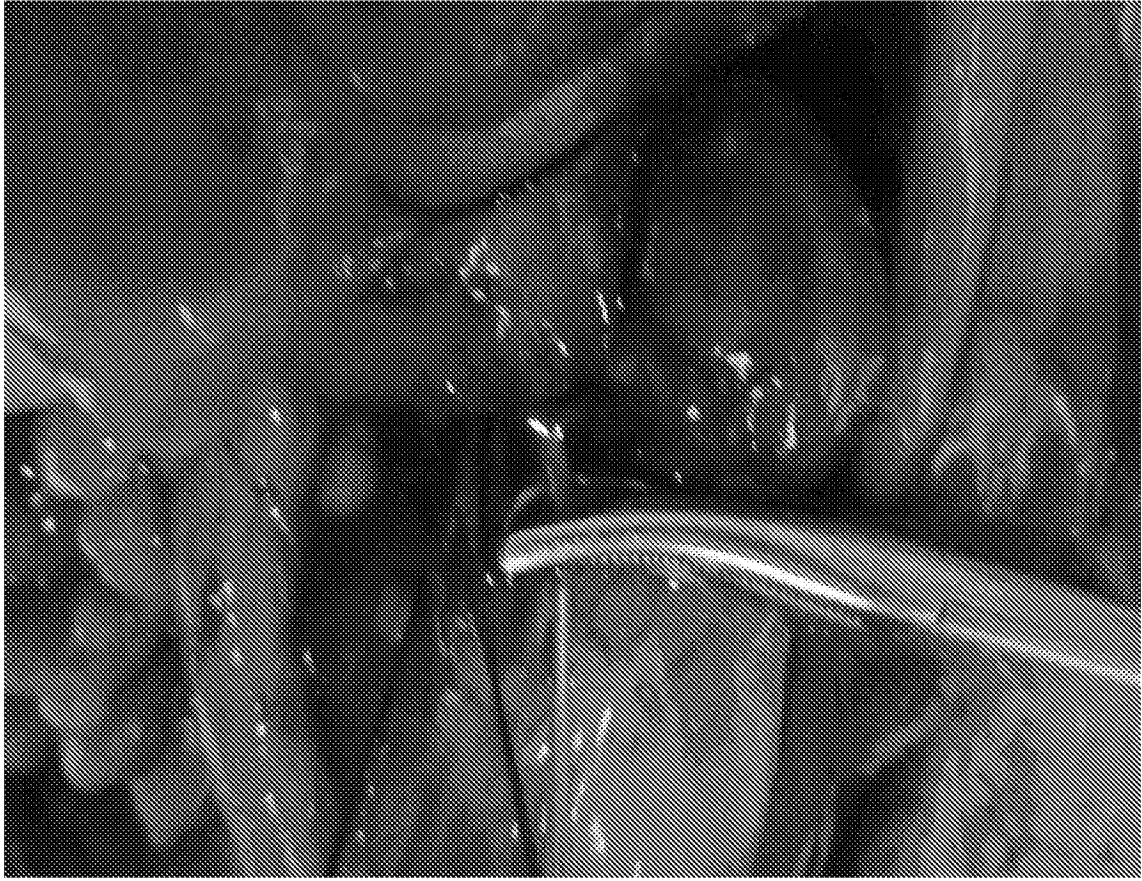


图2

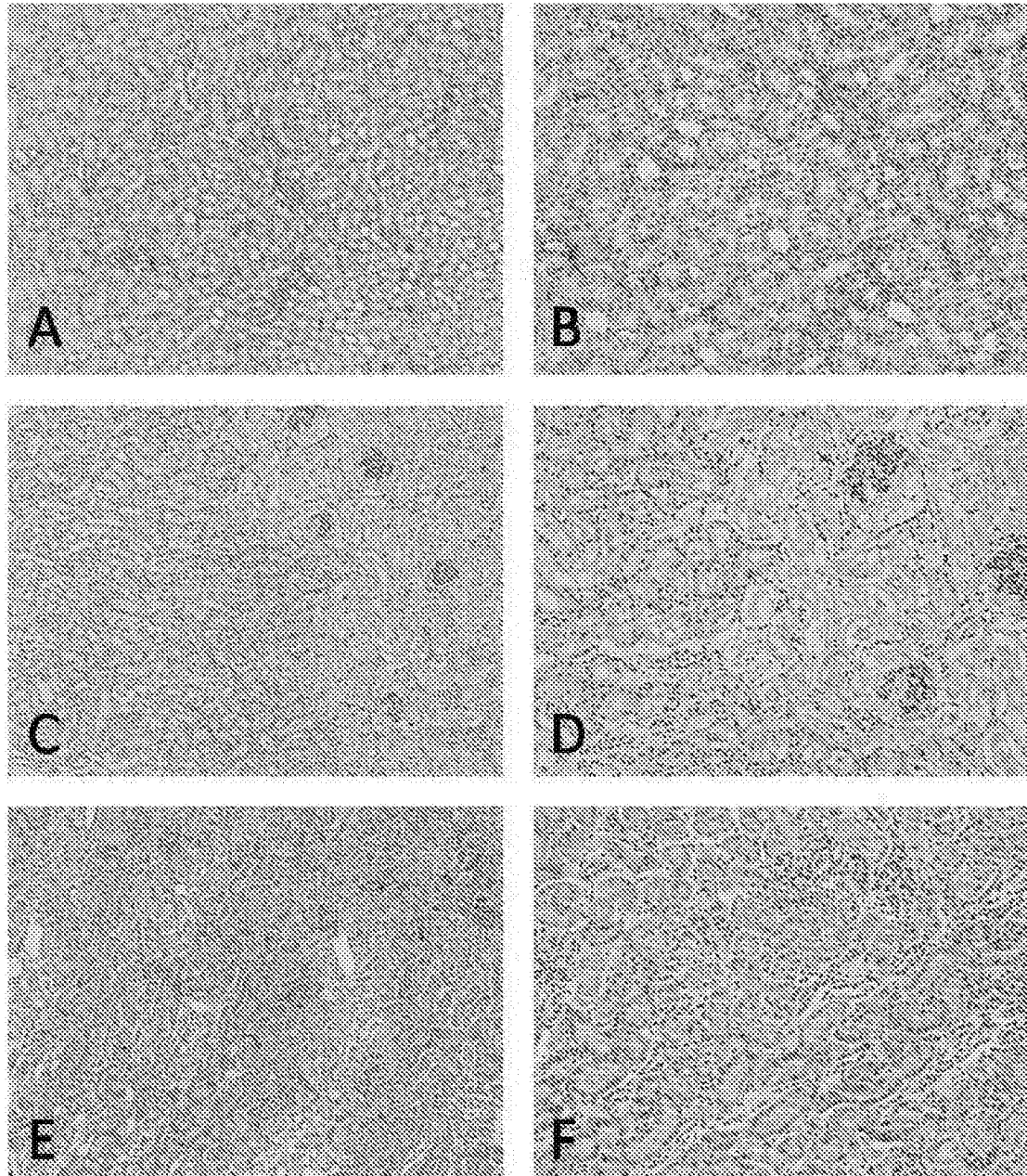


图3

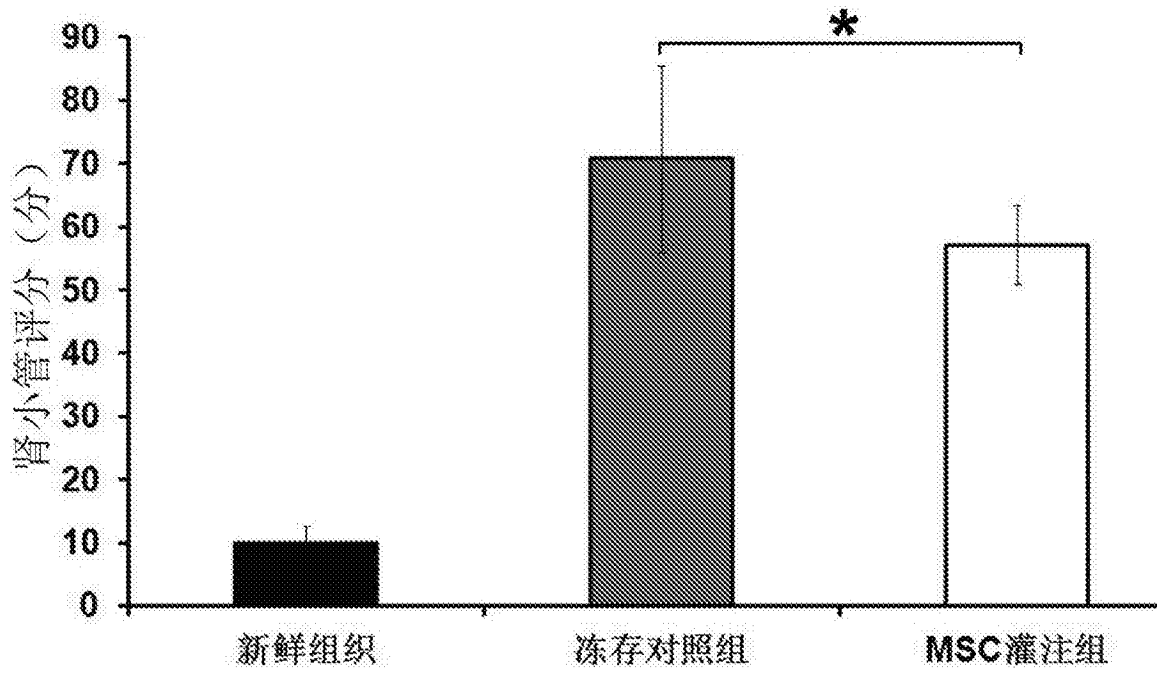


图4

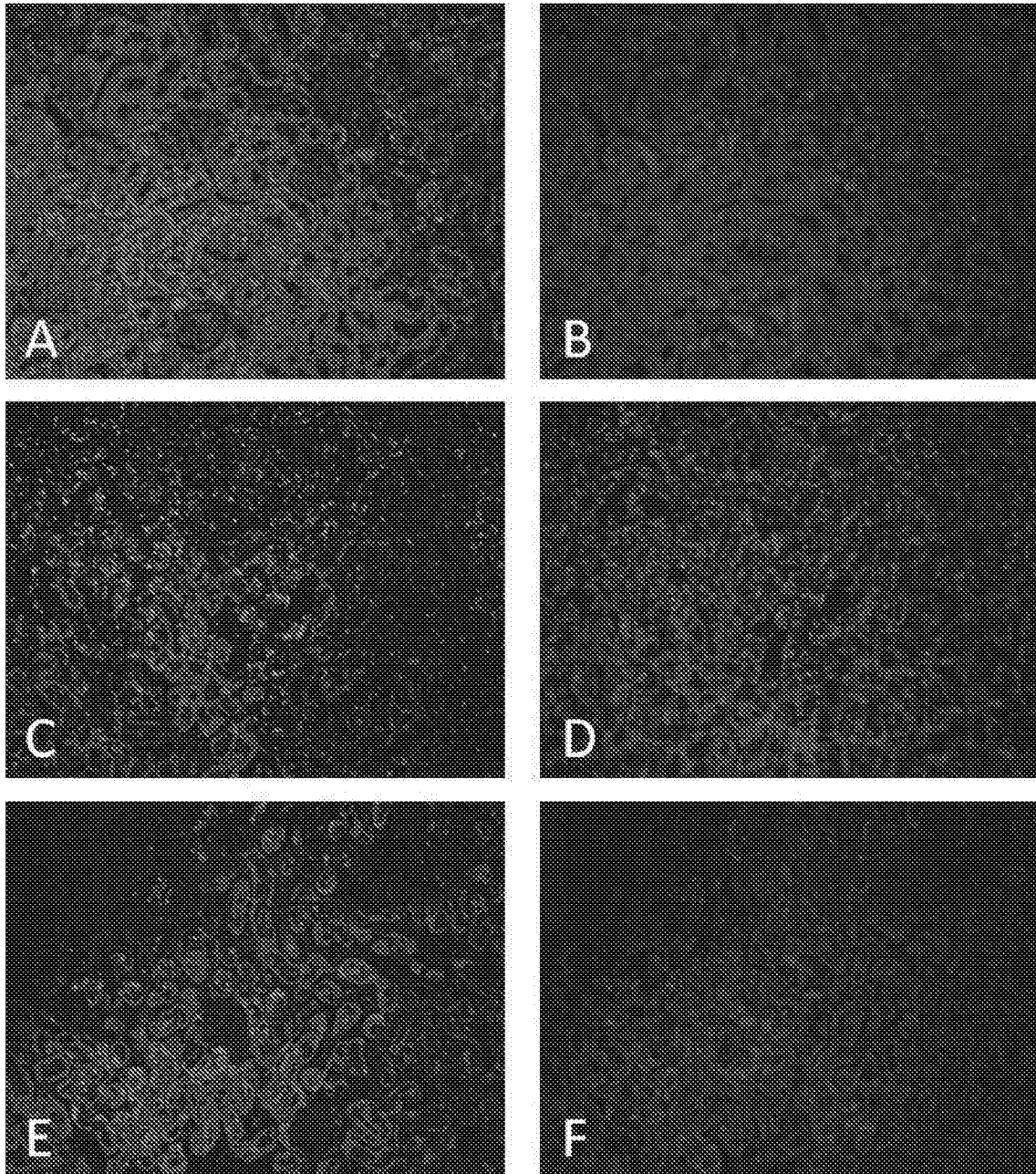


图5