



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101272815 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 26

(21) 申请号 200680030925. 4

页第 30 行至第 11 页第 32 行 .

(22) 申请日 2006. 08. 28

US 20030087428 A1, 2003. 05. 08, 说明书第 60 段, 附图 1.

(30) 优先权数据

60/711, 501 2005. 08. 26 US

60/815, 242 2006. 06. 19 US

US 20010049138 A1, 2001. 12. 06, 说明书第 25-26 段 .

审查员 李晓静

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008. 02. 25

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2006/033415 2006. 08. 28

(87) PCT 申请的公布数据

W02007/025233 EN 2007. 03. 01

(73) 专利权人 明尼苏达大学董事会

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 H·奥特 D·泰勒

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

A61M 1/10 (2006. 01)

C12N 5/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03043674 A1, 2003. 05. 30, 说明书第 10

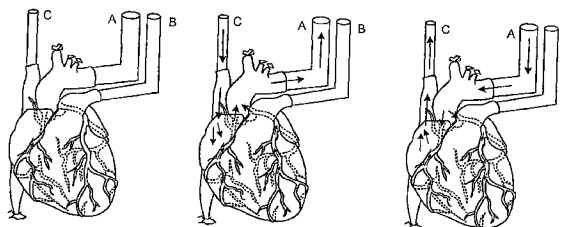
权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 2 页

(54) 发明名称

器官和组织的脱细胞化和再细胞化

(57) 摘要

本发明提供了使实体器官脱细胞化和使这类脱细胞器官再细胞化成实体器官的方法和材料。



1. 一种使非人哺乳动物尸体的实体器官脱细胞的体外方法,包括:
提供所述器官;
在一个或多个空腔、血管和 / 或导管处插管,从而产生插管器官;和
用第一细胞破裂介质经由所述一个或多个套管对所述插管器官进行灌注,得到灌注脱细胞化的非人哺乳动物器官,所述器官包含所述器官的脱细胞胞外基质,其中所述胞外基质包含外表面和血管网。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,基本上使整个血管网接触第一细胞破裂介质。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述器官是心脏、肾脏、肝脏、脾脏、胰脏或肺。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述灌注是从每个插管空腔、血管和 / 或导管进行的多方向灌注。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述细胞破裂介质含有至少一种去污剂。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述去污剂选自 SDS、PEG 或 TritonX。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,还包括用第二细胞破裂介质经由所述一个以上套管对所述插管器官进行灌注。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述第一细胞破裂介质是阴离子去污剂,所述第二细胞破裂介质是离子去污剂。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述阴离子去污剂是 SDS,所述离子去污剂是 Triton X。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述灌注持续约 2-12 小时 / 克器官组织。
11. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述灌注是在生理压力下进行的。
12. 一种用权利要求 1 所述的方法灌注脱细胞的非人哺乳动物器官,其包含所述器官的脱细胞胞外基质,其中所述胞外基质包含外表面,其中所述胞外基质包含血管网,基本上维持脱细胞前的所述胞外基质的形态,其中所述外表面基本上完整。
13. 如权利要求 12 所述的脱细胞器官,其特征在于,所述器官是心脏。
14. 如权利要求 13 所述的脱细胞器官,其特征在于,所述心脏是啮齿类的心脏、猪的心脏、家兔的心脏、牛的心脏、绵羊的心脏或狗的心脏。
15. 如权利要求 12 所述的脱细胞器官,其特征在于,所述器官是肝脏、肺、大脑、胰脏、脾脏、骨骼肌、子宫或膀胱。
16. 如权利要求 12 所述的脱细胞器官,其特征在于,所述器官是实体器官。
17. 如权利要求 12 所述的脱细胞器官,其特征在于,所述器官是肾。
18. 如权利要求 17 所述的脱细胞器官,其特征在于,所述肾包含基本上完整的肾小球结构。
19. 如权利要求 12 或 13 所述的灌注脱细胞的器官,所述器官是完整心脏的一部分,其为主动脉瓣、左房室瓣、肺动脉瓣、右房室瓣、右心房、左心房、右心室、左心室、心肌片层、隔膜、冠状动脉、肺动脉或肺静脉。

器官和组织的脱细胞化和再细胞化

技术领域

[0001] 本发明涉及器官和组织,更具体说,涉及使器官和组织脱细胞化和再细胞化的方法和材料。

背景技术

[0002] 组织工程和再生领域已经对生物来源的基质进行了研究。然而,目前为止,所研制的基质通常没有理想的基质结构和/或没有显示出能有效重建器官或组织的血管床。本发明描述了使器官和组织脱细胞化和再细胞化的方法。

[0003] 发明概述

[0004] 本发明提供了使器官或组织脱细胞化的方法和材料,以及使脱细胞的器官或组织再细胞化的方法和材料。

[0005] 一方面,本发明提供了脱细胞的哺乳动物心脏。脱细胞的哺乳动物心脏包括脱细胞心脏的具有外表面的胞外基质。脱细胞心脏的所述胞外基质基本上保留脱细胞前的胞外基质的形态,所述胞外基质的外表面基本完整。

[0006] 具有代表性的心脏包括但不限于:啮齿类的心脏、猪的心脏、家兔的心脏、牛的心脏、绵羊的心脏或狗的心脏。另一种具代表性的心脏是人的心脏。所述脱细胞心脏可以是尸体的心脏。一些实施方式中,所述脱细胞心脏是完整心脏的一部分。例如,完整心脏的一部分包括而限于:心肌片层(cardiac patch)、主动脉瓣、左房室瓣、肺动脉瓣、右房室瓣、右心房、左心房、右心室、左心室、隔膜、冠状动脉、肺动脉或肺静脉。

[0007] 在另一方面,本发明提供了一种实体器官。本文所述的实体器官包括上述脱细胞心脏和附于其上的再生细胞群。在一些实施方式中,所述再生细胞是多能细胞。一些实施方式中,所述再生细胞是胚胎干细胞、脐带细胞、成体干细胞或祖细胞、骨髓衍生的细胞、血衍生成细胞、间质干细胞(MSC)、骨骼肌衍生的细胞、多能成体祖细胞(MAPC)、心脏干细胞(CSC)或多能成体心脏干细胞。一些实施方式中,所述再生细胞是心脏成纤维细胞、心脏微血管细胞或主动脉内皮细胞。

[0008] 一般来讲,附于脱细胞心脏上的再生细胞的数量至少有约1,000。在一些实施方式中,附于脱细胞心脏上的再生细胞的数量约为1,000-10,000,000个细胞/毫克组织(湿重;即,脱细胞前的重量)。在一些实施方式中,所述再生细胞与所述脱细胞心脏是异源的。在另一些实施方式中,将要所述实体器官移植入患者体内,所述再生细胞与该患者自体同源。

[0009] 还有另一个方面,本发明提供了制备实体器官的方法。这种方法通常包括提供本文所述的脱细胞心脏,使所述脱细胞心脏在一定条件下接触再生细胞群,该条件下,所述再生细胞能植入所述脱细胞心脏,并在其上增殖和/或分化。在一个实施方式中,将所述再生细胞注射或灌注进所述脱细胞心脏中。

[0010] 还有另一个方面,本发明提供了使心脏脱细胞的方法。这种方法包括提供心脏,在一个或多个空腔、血管和/或管道处插管得到插管心脏,用第一细胞破裂介质通过一个或

多个套管对所述插管心脏进行灌注。例如,所述灌注可以从每个插管的空腔、血管和 / 或导管处多方向进行。一般来讲,所述细胞破裂介质含有至少一种去污剂,如 SDS、PEG 或 Triton X。

[0011] 这种方法还可以包括用第二细胞破裂介质通过多个套管对插管心脏进行灌注。一般来讲,所述第一细胞破裂介质可以是阴离子去污剂,如 SDS,所述第二细胞破裂介质可以是离子去污剂,如 Triton X。这种方法中,所述灌注可以持续约 2-12 小时 / 克 (湿重) 心脏组织。

[0012] 除非在其它地方另外限定,本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所述领域普通技术人员的通常理解相同的含义。尽管下面将描述合适的方法和材料,然而在本发明实践或试验中还可以采用与本文所述相似或等效的方法和材料。此外,所述材料、方法和实施例仅为说明性而非限制性的。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均以其全文纳入本文作为参考。在发生冲突的情况下,以本说明书,包括定义为准。

[0013] 下面结合附图和描述对本发明的一个或多个实施方式进行详细描述。本发明的其它特征、目的和益处可以从附图、详述部分和从权利要求书中显见。

[0014] 附图描述

[0015] 图 1 图示了心脏脱细胞化的初步准备。对主动脉、肺动脉和上腔静脉进行插管 (分别为 A、B 和 C), 结扎下腔静脉、头肱动脉、左颈总动脉和左锁骨下动脉。箭头表示顺行和逆行的灌注方向。

[0016] 图 2 图示了脱细胞化 / 再细胞化设备的一个实施方式。

[0017] 各幅图中相同的引用标记表示相同的元素。

[0018] 发明详述

[0019] 实体器官通常由 3 种主要组分组成,即胞外基质 (ECM)、包埋进所述胞外基质的细胞、和血管床。本文所述的使实体器官脱细胞是指除去大部分或全部细胞组分而基本上保留胞外基质 (ECM) 和血管床。然后将脱细胞实体器官用作再细胞化的支架。可以从中获得实体器官的哺乳动物包括但不限于:啮齿动物、猪、家兔、牛、绵羊、犬和人。用于本文所述的方法中的器官和组织可以来自尸体。

[0020] 本文所指的实体器官包括但不限于:心、肝、肺、骨骼肌、脑、胰、脾、肾、子宫和膀胱。本文所采用的“实体器官”指具有“基本上封闭”的血管系统的器官。器官的“基本上封闭”的血管系统是指,假设对主血管插管、结扎或用其它方式进行限制下,用液体进行灌注时,所述实体器官能够容纳大部分液体,液体不会漏到实体器官以外。尽管具有“基本上封闭”的血管系统,上面列出的许多实体器官仍然确定了“入口”和“出口”脉管,可以用来引入和除去在灌注期间通过器官的液体。

[0021] 除了上述实体器官外,其它类型的有血管的器官或组织,例如,所有或部分关节 (如,膝、肩或髋)、气管或脊髓也可以用本文所公开的方法进行脱细胞。而且,本文公开的方法还可用来使无血管组织,例如,软骨或角膜脱细胞。

[0022] 可以将本文所述的有或没有再细胞化的脱细胞器官或组织 (如,心或肝) 或其任何部分 (如,主动脉瓣、左房室瓣、肺动脉瓣、右房室瓣、肺静脉、肺动脉、冠状动脉、隔膜、右心房、左心房、右心室或左心室) 移植进患者体内。或者,可以用本文所述的再细胞化器官或组织来检测,例如,经历分化的细胞和 / 或器官或组织的细胞学组成。

[0023] 器官或组织的脱细胞化

[0024] 本发明提供了对哺乳动物器官或组织进行脱细胞的方法和材料。如果可能的话,对器官或组织脱细胞的第一步是对器官或组织插管。可以采用本领域已知的方法和材料对器官或组织的血管、导管和 / 或空腔进行插管。对器官或组织脱细胞的下一步是用细胞破裂介质对插管器官或组织进行灌注。器官灌注可以是多方向的 (如,顺行和逆行)。

[0025] 本领域对心脏常规采用兰道夫 (Langendorff) 灌注,即生理学灌注 (也称为四腔工作模式灌注)。参见例如,《实验生理学和药理学方法:生物检测技术 (Methods in Experimental Physiology and Pharmacology:Biological Measurement Techniques) 第 V 版》中的 Dehnert, The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff, Bionomietechnik-Verlag March GmbH, 西德, 1988。简单来讲,兰道夫灌注,就是对主动脉插管,与含有细胞破裂介质的贮液器相连。认为是例如通过输注或滚子泵,或通过恒定的流体静压以恒定的递送流速将细胞破裂介质沿主动脉逆行向下进行递送的。在两种方式下,主动脉瓣都被硬性关闭,灌注液直接进入冠状动脉口 (从而灌满心脏的整个心室),然后通过冠状窦排入右心房。为了进行工作模式灌注,第二套管与左心房相连,可以将灌注从逆行变为顺行。

[0026] 灌注其它器官或组织的方法为本领域已知。例如,以下参考文献描述了对肺、肝、肾、脑和四肢进行灌注的方法。Van Putte 等, 2002, Ann. Thorac. Surg., 74 (3) :893-8 ;den Butter 等, 1995, Transpl. Int., 8 :466-71 ;Firth 等, 1989, Clin. Sci. (Lond.), 77 (6) :657-61 ;Mazzetti 等, 2004, Brain Res., 999 (1) :81-90 ;Wagner 等, 2003, J. Artif. Organs, 6 (3) :183-91。

[0027] 可以使用一种或多种细胞破裂介质来对器官或组织脱细胞。细胞破裂介质通常包括至少一种去污剂,如 SDS、PEG 或 Triton X。细胞破裂介质可以包括水,使该介质与细胞渗透性相容。或者,细胞破裂介质可以包括缓冲液 (如, PBS) 以使之与细胞渗透性相容。细胞破裂介质还可以包括但不限于酶,如:一种或多种胶原酶、一种或多种分散酶、一种或多种 DNA 酶,或蛋白酶如胰蛋白酶。一些方式中,细胞破裂介质还 (或者可以) 包括一种或多种酶的抑制剂 (如,蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂和 / 或胶原酶抑制剂)。

[0028] 在某些实施方式中,可以用两种不同的细胞破裂介质对插管器官或组织连续灌注。例如,所述第一细胞破裂介质可以包括阴离子去污剂,如 SDS,所述第二细胞破裂就二酯可以包括离子去污剂,如 Triton X。用至少一种细胞破裂介质进行灌注后,可以例如用洗液和 / 或含有如本文所公开的一种或多种酶的溶液对插管器官或组织进行灌注。

[0029] 改变灌注方向 (如,顺行和逆行) 可以有助于有效地对整个器官或组织脱细胞。本文所述的脱细胞基本上是从里到外对器官脱细胞,对 ECM 损伤非常小。可以在 4-40℃ 的合适温度对器官或组织脱细胞。根据器官或组织的大小和重量,和细胞破裂介质中的具体去污剂和去污剂浓度,一般用细胞破裂介质对器官或组织灌注约 2-12 小时 / 克实体器官或组织。包括洗涤在内,可以对器官灌注高达约 12-72 小时 / 克组织。通常将灌注调整到与生理条件,包括搏动血流、流速和压力下一致。

[0030] 如本文所述,脱细胞器官或组织主要由全部或大部分器官或组织的胞外基质 (ECM) 组分组成,包括血管网络的 ECM 组分。ECM 组分可以包括以下任何或所有:纤连蛋白、原纤维蛋白、层粘连蛋白,弹性蛋白、胶原家族成员 (如,胶原 I、III 和 IV)、氨基葡聚糖、基

质、网状纤维和血小板反应蛋白,它们可以组织成规定的结构如基底层。成功脱细胞的定义是不存在可检测的肌丝、内皮细胞、平滑肌细胞,和采用标准的组织学染色方法在组织学切片中看不到胞核。优选但不是必须地,还要从脱细胞器官或组织中除去残留的细胞碎片。

[0031] 在脱细胞过程中和之后维持 ECM 的形态和构造(即,基本上保持完整)对有效再细胞化和产生器官或组织而言非常重要。本文所采用的“形态”指器官或组织或 ECM 的整体形状,而本文采用的“构造”指外表面、内表面和它们之间的 ECM。

[0032] 可以目测和/或用组织学方法检测 ECM 的形态和构造。例如,脱细胞时不宜去除或严重破坏实体器官外表面上或器官或组织血管内的基底层。此外,ECM 的原纤维应该与未脱细胞的器官或组织的类似或没有显著改变。

[0033] 可以将一种或多种化合物用于脱细胞器官或组织内部或表面,以例如保存脱细胞器官、或为脱细胞器官或组织的再细胞化作准备和/或在再细胞化过程中帮助或刺激细胞。这类化合物包括但不限于:一种或多种生长因子(如,VEGF、DKK-1、FGF、BMP-1、BMP-4、SDF-1、IGF 和 HGF)、免疫调节剂(如,细胞因子、糖皮质激素类、IL2R 拮抗剂、白细胞三烯拮抗剂)和/或调节凝血级联反应的因子(如,阿斯匹林、肝素结合蛋白和肝素)。此外,还可以进一步用例如辐照(如,UV、 γ)处理脱细胞器官或组织来减少或消除残留在脱细胞器官或组织内部或表面上的任何类型的微生物。

[0034] 器官或组织的再细胞化

[0035] 本发明提供了产生器官或组织的材料和方法。可以通过如本文所述使脱细胞器官或组织接触再生细胞群来产生器官或组织。本文采用的再生细胞是用来使脱细胞器官或组织再细胞化的任何细胞。再生细胞可以是全能细胞(totipotent cells)、多潜能性细胞(pluripotent cells)或多能细胞(multipotent cells),可以是未定型或定型的。再生细胞还可以是单谱系细胞。此外,再生细胞可以是未分化细胞、部分分化细胞或完全分化细胞。本文采用的再生细胞包括胚胎干细胞(据美国国立卫生研究院(NIH)所定义;参见例如,<http://www.stemcells.nih.gov>上的术语表)。再生细胞还包括祖细胞、前体细胞,和包括脐带细胞和胎儿干细胞的“成体”干细胞。

[0036] 可用于使器官或组织再细胞化的再生细胞包括但不限于:胚胎干细胞、脐带血细胞、组织干细胞或祖细胞、骨髓干细胞或祖细胞、血液干细胞或祖细胞、间质干细胞(MSC)、骨髓肌细胞或多能成体祖细胞(MAPC)。可以采用的其它再生细胞有心脏干细胞(CSC)、多能成体心脏干细胞、心脏成纤维细胞、心脏微血管内皮细胞或主动脉内皮细胞。骨髓干细胞如骨髓单核细胞(BM-MNC)、内皮细胞或血管干细胞或祖细胞,和外周血干细胞如内皮祖细胞(EPC)也可以用作再生细胞。

[0037] 引入脱细胞器官内部和表面来产生器官或组织的再生细胞的数量取决于器官(如,哪种器官、器官的大小和重量)或组织和再生细胞的类型和发育阶段。不同的细胞类型可能倾向达到的群落密度也不同。类似地,不同的器官或组织可以不同的密度进行细胞化。举例来说,脱细胞器官或组织可以被“接种”上至少约 1,000(如,至少 10,000、100,000、1,000,000、10,000,000 或 100,000,000)个再生细胞;或者可以有约 1,000–10,000,000 个细胞/毫克组织(湿重,即,脱细胞前)附于其上。

[0038] 可以通过注射进一个或多个位置将再生细胞引入(“接种”)进脱细胞器官或组织内部。此外,可以将一种以上的细胞(即,混合细胞)引入脱细胞器官或组织内部。例如,

可以将混合细胞注射到脱细胞器官或组织的多个部位,或者可以将不同类型的细胞注射到脱细胞器官或组织的不同部位。或者,除了注射以外,可以将再生细胞或混合细胞灌注进插管的脱细胞器官或组织内部。例如,可以使用灌注介质将再生细胞灌注进脱细胞器官内部,然后换用扩增和 / 或分化介质诱导再生细胞的生长和 / 或分化。

[0039] 再细胞化期间,使器官或组织维持在至少有些再生细胞能在脱细胞器官或组织内部或表面增殖和 / 或分化的条件下。这些条件包括但不限于:合适的温度和 / 或压力、电和 / 或机械作用、外力、合适的 O_2 和 / 或 CO_2 量、合适的湿度、和无菌或接近无菌的条件。再细胞化期间,使脱细胞器官或组织和附于其上的再生细胞维持在合适的环境中。例如,再生细胞可能需要营养补充剂(如,营养物和 / 或碳源,如葡萄糖)、外源性激素或生长因子,和 / 或特定 pH。

[0040] 再生细胞可以与脱细胞器官或组织(如,用人的再生细胞接种的人脱细胞器官或组织)同种,或者再生细胞可以与脱细胞器官或组织(如,接种人的再生细胞的猪脱细胞器官或组织)异种。本文采用的“同种”是指来自与器官或组织来源相同的物种的细胞(如,相关或不相关的个体),而本文采用的“异种”是指来自与器官或组织来源不同的物种的细胞。

[0041] 一些情况下,需要将通过本文所述方法产生的器官或组织移植进患者体内。那些情况下,用于使脱细胞器官或组织再细胞化的再生细胞可以来自该患者,此时所述再生细胞与患者“自体同源”。患者的再生细胞可以采用本领域已知方法获自,例如,不同生命阶段的血液、骨髓、组织或器官(如,初生前、新生期或围产期、青春期或成年期)。或者,用于使脱细胞器官或组织再细胞化的再生细胞可以是与患者同基因型的(即,来自同卵双胞胎),再生细胞可以是来自例如,患者亲属或与患者无亲属关系的 HLA 匹配个体的人淋巴细胞抗原 (HLA) 匹配细胞,或者再生细胞可以来自例如,非 HLA 匹配的与患者同种的供体。

[0042] 不考虑再生细胞的来源(如,自体或非自体),脱细胞实体器官可以是患者的自体、同种或异种器官。

[0043] 某些情况下,脱细胞器官可以在体内用细胞进行再细胞化(如,将器官或组织移植入个体之后)。可以如上所述(如,注射和 / 或灌注)用例如,本文所述的任何再生细胞进行体内再细胞化。另外,用内源细胞对脱细胞器官或组织进行体内接种可能天然发生或者受递送到再细胞化组织中的因子所介导。

[0044] 再细胞化期间可以监控再生细胞的发展。例如,可以通过在再细胞化期间的一个或多个时间点进行生物活检来评估器官或组织表面或内部的细胞数量。此外,可以通过确定细胞或细胞群中是否存在各种标记物来监控再生细胞所经历的分化次数。本领域已知与不同类型的细胞和这些类型细胞的不同分化阶段有关的标记物,并可采用抗体和标准免疫试验轻易地进行检测。参见例如,《最新免疫试验方法 (Current Protocols in Immunology)》,2005,Coligan 等人编,John Wiley & Sons,第 3 和 11 章。核酸试验以及形态学和 / 或组织学评估可用来监控再细胞化过程。

[0045] 器官或组织脱细胞化和 / 或再细胞化的控制系统

[0046] 本发明还提供一种对器官或组织进行脱细胞化和 / 或再细胞化的系统(如,生物反应器)。这类系统通常包括至少一插管装置用于对器官或组织插管,一灌注设备用于通过套管对器官或组织进行灌注,和使器官或组织维持在无菌环境中的工具(如,密封系统)。

插管和灌注均为本领域熟知的技术。插管装置通常包括大小合适的中空管,用来插进器官或组织的血管、导管和 / 或空腔内。通常,要在器官内的一个或多个血管、导管和 / 或空腔内插管。灌注设备可以包括手持液体(如,细胞破裂介质)容器和将液体通过一个或多个套管灌进器官的机械装置(如,泵、气压、重力)。可以采用本领域已知的各种技术使器官或组织在脱细胞化和 / 或再细胞化期间维持无菌状态,如控制和过滤气流和 / 或一同灌注进例如,抗生素、抗真菌药或其它抗微生物药来阻止有害微生物的生长。

[0047] 本文所述使器官或组织脱细胞化和再细胞化的系统具有监控某些灌注性质(如,压力、体积、气流型态、温度、气体、pH)、机械力(如,室壁运动和压力)和电刺激(如,起搏)的能力。由于冠状血管床会随脱细胞化和再细胞化的进程而改变(如,血管阻力、体积),可调节压力的灌注设备能够有利地避免大压力波动。可以用流出物和组织学切片来评估灌注效果。可以用标准方法监控灌注体积、气流型态、温度、局部 O₂ 和 CO₂ 压力和 pH。

[0048] 可以使用传感器(如,生物反应器)来监控该系统和 / 或器官或组织。可以使用超声测微法、微量测压法和 / 或电导测量法来获得压力 - 体积或与心肌壁运动和表现有关的前负荷可恢复搏出功信息。例如,可以使用传感器来监控液体流经插管器官或组织时的压力;系统的环境温度和 / 或器官或组织的温度;液体流经插管器官或组织时的 pH 和 / 或流速;和 / 或再细胞化的器官或组织的生物学活性。除了具有能监控这类特性的传感器外,使器官或组织脱细胞化和 / 或再细胞化的系统还可以包括维持或调节这类特性的工具。维持或调节这类特性的工具可以包括以下部件,如温度计、恒温器、电极、压力传感器、溢流阀、改变液体流速的阀门、打开和关闭流体与溶液的连接来改变溶液 pH 的阀门、气室、体外起搏器和 / 或柔软的空腔。为了有助于确保稳定的条件(如温度),所述空腔,储液器和管道可以具有水套。

[0049] 再细胞化期间对器官和附于其上的细胞施加机械负荷是有益的。例如,可以使用经由左心房插入左心室的气室来对心脏施加机械压力。可以将能够调节体积和速率的活塞泵与气室相连来刺激左心室壁运动和压力。为了监测壁运动和压力,可以采用微量测压法和 / 或超声测微法来测量左心室壁运动和压力。在一些实施方式中,可以将外部起搏器与活塞泵相连来提供与每次心室气室放气(与收缩期等效)同步化的刺激。可以从心脏表面记录外周 ECG 来调节起搏电压,监测去和复极化,和提供简化的再细胞化时和再细胞后的心脏的表面图。

[0050] 还可以通过将蠕动泵与经由左心房插入左心室内的套管连接,而实现机械性心室扩张。与上述有关气室的方法类似,通过流经套管的周期性液体运动(如,搏动血流)实现的心室扩张可以与电刺激同步化。

[0051] 采用本文所公开的方法和材料,可以对哺乳动物心脏进行脱细胞化和再细胞化,当维持于合适条件时,可以产生具有收缩功能和对起搏刺激和 / 或药剂作出反应的有功能的的心脏。可以将该再细胞化的有功能心脏移植入哺乳动物体内在一段时间内起作用。

[0052] 图 2 显示了使器官或组织脱细胞化和 / 或再细胞化的系统的一实施方式(如,生物反应器)。所示实施方式是使心脏脱细胞化和再细胞化的生物反应器。该实施方式具有可调节速率和体积的蠕动泵(A);与心室内气室相连的可调节速率和体积的活塞泵(B);可调节电压、频率和振幅的体外起搏器(C);ECG 记录仪(D);‘动脉管路’中的压力传感器(其等于冠状动脉压)(E);‘静脉’管路中的压力传感器(其等于冠状窦压)(F);和起搏器和活

塞泵间的同步仪 (G)。

[0053] 计算机可读的存储介质结合可编程处理器 (如, 本文采用的计算机可读存储介质具有存储于其上的指令, 能使可编程处理器执行具体的步骤) 可以控制产生器官或组织的系统。例如, 这类存储介质, 结合可变成处理器, 可以接收和处理来自一个或多个传感器的信息。这类存储介质结合可编程处理器还可以将信息和指令传回生物反应器和 / 或所述器官或组织。

[0054] 可以监控经历再细胞化的器官或组织的生物学活性。所述生物学活性可以是器官或组织本身的生物学活性, 如器官或组织的电学活性、机械活性、机械压、收缩性和 / 或壁压。此外, 还可以监控附于器官或组织上的细胞的生物学活性, 例如, 离子运输 / 交换活性、细胞分裂和 / 或细胞存活率。参见例如, 《解剖和生理学实验室手册 (Laboratory Textbook of Anatomy and Physiology)》(2001, Wood, Prentice Hall) 和《细胞生物学的最新实验方法 (Current Protocols in Cell Biology)》(2001, Bonifacino 等编, John Wiley & Sons)。如上所述, 在再细胞化期间在器官上模拟活性负荷是有用的。本发明的计算机可读存储介质, 结合可编程处理器, 可用于协调监控和维持对器官或组织所加的活性负荷所需的部件。

[0055] 在一个实施方式中, 可以将器官或组织的重量输入本文所述的计算机可读存储介质内, 它与可编程处理器结合, 可以计算针对具体器官或组织的接触次数和灌注压。这类存储介质可以记录前负荷和后负荷 (分别是灌注前和后的压力) 和流速。在此实施方式中, 例如, 计算机可读存储介质结合可编程处理器通过一个或多个泵和 / 或控制阀门, 可以调节灌注压、灌注方向和 / 或灌注液种类。

[0056] 根据本发明, 可以采用本领域技术范围内的常规分子生物学、微生物学、生物化学和细胞生物学技术。这类技术已由文献全部揭示。还将在以下并不限制权利要求书所述的本发明范围的实施例中对本发明作进一步描述。

[0057] 实施例

[0058] A 组: 脱细胞化 (I 部分)

[0059] 实施例 1- 制备用于脱细胞化的实体器官

[0060] 为了避免形成死后血栓, 用 400U 的肝素 / 千克供体的剂量对供体大鼠进行全身肝素化。肝素化后, 仔细摘下心脏和邻近的大血管。

[0061] 将心脏置于含有肝素 (2000U/ml) 的生理盐水溶液 (0.9%) 中, 保存于 5℃ 直到下一步处理。在无菌条件下, 将结缔组织与心脏和大血管分离。用不可吸收的单丝结扎线结扎右和左心房远端的下腔静脉和左和右肺静脉。

[0062] 实施例 2- 对实体器官进行插管和灌注

[0063] 将所述心脏固定在脱细胞设备上 (图 1) 进行灌注 (图 1)。对下行胸腔动脉插管以便进行逆行冠状 (动脉) 灌注 (图 1, 插管 A)。结扎胸腔动脉的分支 (如, 头臂干、左颈总动脉、左锁骨下动脉)。在肺动脉分成左和右肺动脉之前对其插管 (图 1, 插管 B)。对上腔静脉插管 (图 1, 插管 C)。该配置下能够进行逆行和顺行冠状 (动脉) 灌注。

[0064] 当对主动脉插管 (A) 施加正压时, 发生从冠状动脉经过毛细血管床到达冠状静脉系统再到达右心房和上腔静脉 (C) 的灌注。当对上腔静脉插管 (C) 施加正压时, 发生从右心房、冠状窦和冠状静脉经过毛细血管床到达冠状动脉和主动脉插管 (A) 的灌注。

[0065] 实施例 3- 脱细胞化

[0066] 将心脏固定于脱细胞设备后,用含有 1-5 毫摩尔腺苷 / 升输注液的冷的肝素化的脱钙磷酸缓冲液开始顺行灌注,来重建持续的冠状(动脉)流。通过测定冠状(动脉)灌注压和流量来评估冠状(动脉)流,并计算冠状阻力。15 分钟的稳定冠状流之后,开始进行基于去污剂的脱细胞处理。

[0067] 具体的处理方法如下所述。然而,简单来讲,就是用去污剂对心脏进行顺行灌注。灌注后,用缓冲液(如,PBS)逆行冲洗心脏。然后,用含有抗生素的 PBS 灌注心脏,再然后用含有 DNA 酶 I 的 PBS 灌注。然后,用 1% 苯扎氯铵灌注心脏来减少微生物污染和预防将来的微生物污染,然后用 PBS 灌注洗涤器官,以除去任何残留细胞组分、酶或去污剂。

[0068] 实施例 4- 对已死亡大鼠心脏脱细胞

[0069] 取下 8 只雄性裸鼠的心脏(250-300g)。取下后立即对主动脉弓插管,用所示去污剂进行逆行灌注。比较 4 种不同的基于去污剂的脱细胞方法(如下)的可行性和(a)除去细胞组分和(b)保留血管结构的效力。

[0070] 脱细胞化通常包括以下步骤:稳定实体器官、对实体器官脱细胞、复性和/或中和实体器官,洗涤实体器官、降解留在器官上的任何 DNA、对器官消毒和建立器官稳态。

[0071] A) 脱细胞方法 #1 (PEG)

[0072] 用含有 100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B 的 200ml PBS 不回流地洗涤心脏。然后用 35ml 聚乙二醇(PEG;1g/ml)进行长达 30 分钟的手动回流脱细胞。然后在用泵进行回流的情况下,用 500ml PBS 洗涤器官长达 24 小时。重复所述洗涤步骤至少两次,每次至少 24 小时。使心脏在手动回流下接触 35ml DNA 酶 I(70U/ml)至少 1 小时。再次用 500ml PBS 洗涤器官至少 24 小时。

[0073] B) 脱细胞方法 #2(Triton X 和胰蛋白酶)

[0074] 用含有 100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B 的 200ml PBS 不回流地洗涤心脏至少约 20 分钟。然后用 0.05%胰蛋白酶对心脏进行 30 分钟脱细胞,接着用含有 5% Triton-X 和 0.1%氢氧化铵的 500ml PBS 灌注约 6 小时。用去离子水灌注心脏约 1 小时,然后用 PBS 灌注 12 小时。然后在用泵进行回流下,用 500ml PBS 洗涤心脏 3 次,每次 24 小时。在手动回流下,用 35ml DNA 酶 I(70U/ml)灌注心脏 1 小时,在用泵进行回流下,用 500ml PBS 洗涤心脏 2 次,每次至少约 24 小时。

[0075] C) 脱细胞方法 #3(1% SDS)

[0076] 用含有 100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B 的 200ml PBS 不回流地洗涤心脏至少约 20 分钟。在用泵进行回流下,用含有 1% SDS 的 500ml 水对心脏进行至少约 6 小时的脱细胞。然后用去离子水灌注心脏约 1 小时,然后用 PBS 洗涤 12 小时。然后在用泵进行回流下,用 500ml PBS 洗涤心脏 3 次,每次至少约 24 小时。在手动回流下,用 35ml DNA 酶 I(70U/ml)灌注心脏约 1 小时,在用泵进行回流下,用 500ml PBS 洗涤心脏 3 次,每次至少约 24 小时。

[0077] D) 脱细胞方法 #4(Triton X)

[0078] 用含有 100U/ml 青霉素、0.1mg/ml 链霉素和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B 的 200ml PBS 不回流地洗涤心脏至少约 20 分钟。然后,在用泵进行回流下,用含有 5% Triton X 和 0.1% 氨水的 500ml 水对心脏进行至少 6 小时的脱细胞。然后用去离子水灌注心脏约 1 小时,然后用 PBS 灌注约 12 小时。在用泵进行回流下,用 500ml PBS 洗涤心脏 3 次,每次至少约 24

小时。然后,在手动回流下,用 35ml DNA 酶 I (70U/ml) 灌注心脏约 1 小时,在用泵进行回流下,用 500ml PBS 洗涤心脏 3 次,每次至少约 24 小时。

[0079] 对首次实验而言,将脱细胞设备设在层流净化罩内。以 60cm H₂O 的冠状动脉灌注压对心脏进行灌注。尽管不是必须的,可以将上述实验中所述的心脏固定于脱细胞室内,完全浸没于含有抗生素的 PBS 中,并在回流模式下以 5 毫升 / 分钟的持续流量用其灌注 72 小时,尽可能多地洗去细胞组分和去污剂。

[0080] 将在组织学切片中没有肌丝和胞核定义为脱细胞成功。通过在包埋组织学切片前用 2% 的伊文思蓝进行灌注来评估是否成功保留了血管结构。

[0081] 当首先用溶于去离子水中的离子去污剂 (1% 十二烷基磺酸钠 (SDS), 约 0.03M) 以持续冠状动脉灌注压顺行灌注,然后用非离子去污剂 (1% Triton X-100) 顺行灌注心脏来除去 SDS,和大概使胞外基质 (ECM) 蛋白复性时,脱细胞效力极高。间歇地,用磷酸缓冲液逆行灌注心脏来疏通梗阻的毛细管和小血管。

[0082] 实施例 5- 评估脱细胞器官

[0083] 为了证明在脱细胞后血管结构完整,采用兰道夫灌注法使用伊文思蓝对脱细胞心脏染色,以染色血管基底膜和定量大血管和微血管密度。另外,可以将聚苯乙烯颗粒灌注进入和通过心脏来定量冠状动脉的容积、容器泄漏水平和通过分析冠状动脉流出物和组织学切片来评估灌注分布。组合评估 3 个标准,与分离的非脱细胞心脏进行比较:1) 聚苯乙烯颗粒的平均分布,2) 某些水平的泄漏显著变化,3) 微血管密度。

[0084] 用可实时运用于单轴或双轴应力下的样品的 Tower 等人 (2002, Fiber alignment imaging during mechanical testing of soft tissues, Ann Biomed Eng., 30(10):1221-33) 的偏振光镜检技术来评估纤维定向。兰道夫灌注期间,记录下脱细胞 ECM 的基本机械属性 (柔度、弹性、爆裂压力),与新鲜分离的心脏作比较。

[0085] B 组. 脱细胞 (II 部分)

[0086] 实施例 1- 对大鼠心脏脱细胞

[0087] 腹腔注射 100mg/kg 氯胺酮 (菲尼克斯制药有限公司 (Phoenix Pharmaceutical, Inc.), 密苏里州圣约瑟市) 和 10mg/kg 赛拉嗪 (菲尼克斯制药有限公司, 密苏里州圣约瑟市), 麻醉 12 周大的雄性 F344 费歇尔大鼠 (印第安纳州 46229, 印第安纳波利斯, 第 29176 邮箱, 哈伦实验室 (Harlan Labs))。通过左侧股静脉全身施用肝素 (美国制药股份有限公司 (American Pharmaceutical Partners, Inc.), 伊利诺斯州司康博格市) 后,进行正中胸骨切开术打开围心膜。去除胸骨后脂肪体,切开上行胸主动脉,将其分支结扎。横切腔静脉和肺静脉、肺动脉和胸主动脉,从胸腔中取出心脏。将预装填的 1.8mm 主动脉套管 (赖诺提玻璃制品公司 (Radnoti Glass), 加利福尼亚州蒙罗维亚) 插入上行主动脉以便进行逆行冠状动脉灌注 (兰道夫)。用含有 10 μ M 腺苷的肝素化的 PBS (哈龙公司 (Hyclone), 犹他州洛根市) 以 75cm H₂O 的冠状动脉灌注压灌注心脏 15 分钟,接着用含有 1% 十二烷基磺酸钠 (SDS) 或 1% 聚乙二醇 1000 (PEG1000) (EMD 生物科学公司 (EMD Biosciences), 德国, 拉霍亚) 或 1% Triton-X 100 (西格玛公司 (Sigma), 密苏里州圣路易斯市) 的去离子水溶液灌注 2-15 小时。接着用去离子水灌注 15 分钟和用含有 1% Triton-X (西格玛, 密苏里州圣路易斯市) 的去离子水灌注 30 分钟。然后继续用含抗生素的 PBS (100U/ml 青霉素 -G (几柯公司 (Gibco), 加利福尼亚州卡尔斯巴德), 100U/ml 链霉素 (几柯公司, 加利福尼亚州卡

尔斯巴德) 和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B(西格玛, 密苏里州圣路易斯市)) 灌注 124 小时。

[0088] 用 1% PEG、1% Triton-X 100 或 1% SDS、PEG 和 Triton-X 100 灌注液逆行灌注 420 分钟后, 外观呈现水肿和不透明, 而 SDS 灌注获得更剧烈的改变, 随着不透明物质被慢慢洗去, 得到半透明的移植物。进行所有 3 种处理方法的心脏均能保持十分完整而不会在灌注过程中(在 77.4mmHg 的持续冠状动脉灌注压时) 发生冠状动脉破裂或主动脉瓣机能不全。在所有 3 种方法中的首个 60 分钟灌注期内均会发生冠脉血流量减少, 然后在 SDS 灌注期恢复正常, 而在 Triton-X 100 和 PEG 灌注期间保持增加。SDS 灌注使计算出的冠状动脉阻力首次增加最多(高达 250mmHg. s. ml⁻¹), 接着是 Triton-X(高达 200mmHg. s. ml⁻¹) 和 PEG(高达 150mmHg. s. ml⁻¹)。

[0089] 用经去污剂灌注的心脏组织的组织学切片, 确定了在所观察时间间隔内, PEG 和 Triton-X 100 处理心脏的脱细胞均不完全; 苏木精-伊红(H&E) 染色显示出胞核和交叉条纹状的细丝。相反, 在 SDS-灌注心脏的切片中未观察到胞核或收缩性细丝。然而, SDS-处理心脏中保留了血管结构和 ECM 纤维方向。

[0090] 为了在首次脱细胞后从 ECM 上除去离子性 SDS, 用 Triton-X 100 灌注器官 30 分钟。此外, 为了保证完全洗去所有去污剂和重建生理学 pH, 用去离子水和 PBS 大范围灌注脱细胞器官 124 小时。

[0091] 实施例 2- 对大鼠肾脏脱细胞

[0092] 为了分离肾脏, 将整个腹腔内含物包裹在湿纱布中, 小心移到边上, 使腹膜后间隙露出。结扎并截断肠系膜血管。在肾动脉出发点(take off) 下方结扎并截断腹主动脉。在隔膜正上方切断胸主动脉和用 1.8mm 主动脉套管(赖诺提玻璃制品公司, 加利福尼亚州蒙罗维亚) 插管。将肾脏从腹膜后腔中仔细地取出, 浸入无菌 PBS(哈龙公司, 犹他州洛根市) 使肾动脉上的牵引力减到最小。用肝素化 PBS 灌注 15 分钟, 接着用含 1% SDS(伊维创公司(Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 的去离子水灌注 2-16 小时, 和用含 1% Triton-X(西格玛, 密苏里州圣路易斯市) 的去离子水灌注 30 分钟。然后继续用含抗生素的 PBS(100U/ml 青霉素-G(几柯公司(Gibco), 加利福尼亚州卡尔斯巴德), 100U/ml 链霉素(几柯公司, 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 和 0.25

[0093] μ g/ml 两性霉素 B(西格玛, 密苏里州圣路易斯市)) 灌注肝脏 124 小时。

[0094] SDS 灌注 420 分钟, 接着用 Triton-X 100 灌注得到具有完整血管和器官结构的完全脱细胞的肾脏 ECM 支架。伊文思蓝灌注证实了其完整血管系统与脱细胞心脏 ECM 类似。对脱细胞肾脏皮质进行莫法(Movat) 五色染色显示出没有任何完整细胞或胞核的完整的肾小球以及近端和远端肾曲小管基底膜。对脱细胞肾髓质染色显示出完整的小管和集合管基底膜。脱细胞肾皮质的 SEM 证实了完整的肾血管球和管基底膜。保留了特征结构, 如从周围近端和远端小管和肾血管球勾画出肾小球的鲍氏囊和肾小球内的肾小球毛细血管基底膜。脱细胞肾髓质的 SEM 图像显示出直达肾盂的具有通向乳头的完整收集管基底膜的完整延髓锥体。因此, 脱细胞后肾脏的所有主要超微结构均完整。

[0095] 实施例 3- 对大鼠肺脱细胞

[0096] 将肺(带有气管) 仔细地从胸腔中取出, 浸入无菌 PBS(哈龙公司, 犹他州洛根市) 使肺动脉上的牵引力减到最小。用肝素化 PBS 灌注 15 分钟, 接着用含 1% SDS(伊维创公司(Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 的去离子水灌注 2-12 小时, 和用含 1%

Triton-X(西格玛,密苏里州圣路易斯市)的去离子水灌注 15 分钟。然后继续用含抗生素的 PBS(100U/ml 青霉素 -G(几柯公司(Gibco),加利福尼亚州卡尔斯巴德),100U/ml 链霉素(几柯公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B(西格玛,密苏里州圣路易斯市))灌注肺 124 小时。

[0097] SDS 灌注 180 分钟,接着用 Triton-X 100 灌注得到具有完整气道和血管的完全脱细胞的肺 ECM 支架。对组织切片进行莫法五色染色显示肺部存在 ECM 组分,包括主要结构蛋白如胶原和弹性蛋白,还有可溶性成分如蛋白聚糖。然而,没有留下胞核或完整细胞。保留有从主要支气管到终末细支气管到呼吸性细支气管、肺泡小管和肺泡的气道。从肺动脉往下到达毛细血管水平和肺静脉的血管床保持完整。脱细胞肺的 SEM 显微照片显示保留有支气管、肺泡和血管基底膜,而没有证据表明保留有细胞。为肺泡隔提供主要结构支撑的弹性和网状纤维的网状组织以及中隔基底膜(包括肺间质内的毛细血管致密网络)保持完整。

[0098] 脱细胞气管的 SEM 显微照片显示出具有脱细胞透明软骨环和粗糙腔基底膜的完整 ECM 结构,而没有呼吸内皮细胞。

[0099] 实施例 4- 对大鼠肝脏脱细胞

[0100] 为了分离肝脏,进行正中剖开术使腔静脉露出,切开并用小鼠主动脉套管(赖诺提玻璃制品公司,加利福尼亚州蒙罗维亚)进行插管。切断肝动脉和静脉和胆管,将肝脏从腹部小心取出,浸入无菌 PBS(哈龙公司,犹他州洛根市)使门静脉上的牵引力减到最小。用肝素化 PBS 灌注 15 分钟,接着用含 1% SDS(伊维创公司(Invitrogen),加利福尼亚州卡尔斯巴德)的去离子水灌注 2-12 小时,和用含 1% Triton-X(西格玛,密苏里州圣路易斯市)的去离子水灌注 15 分钟。然后继续用含抗生素的 PBS(100U/ml 青霉素 -G(基博公司(Gibco),加利福尼亚州卡尔斯巴德),100U/ml 链霉素(几柯公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)和 0.25 μ g/ml 两性霉素 B(西格玛,密苏里州圣路易斯市))灌注肝 124 小时。

[0101] SDS 灌注 120 分钟,接着用 Triton-X 100 灌注足以得到完全脱细胞的肝脏。对脱细胞肝脏进行莫法五色染色证实保留了具有中央静脉和含有肝动脉、胆管和门静脉的门腔的特征性肝脏组织。

[0102] 实施例 5- 用于评估脱细胞器官的方法和材料

[0103] 组织学和免疫荧光方法。按照厂商说明书(美国马斯特技术科学公司(American Mastertech Scientific),加利福尼亚州洛代市)对包埋入石蜡中的脱细胞组织进行莫法五色染色。简单来讲,采用凡霍夫(Verhoeff)弹性染料对脱石蜡载玻片进行染色,冲洗,用 2%三氯化铁分辨,冲洗,置于 5%硫代硫酸钠中,冲洗,用 3%冰醋酸封闭,用 1%阿辛蓝溶液染色,冲洗,用藏花猩红-酸性品红染色,冲洗,浸没于 1%冰醋酸中,用 5%磷钨酸脱色,浸没于 1%冰醋酸中,脱色,置于醇制藏红花溶液中,脱水,固定和盖上盖玻片。

[0104] 对脱细胞组织进行免疫荧光染色。对石蜡包埋组织(再细胞化组织)但不对冷冻切片(脱细胞组织)进行以下抗原回收:通过将石蜡切片两次浸于二甲苯中,每次浸 5 分钟,接着浸于连续的醇梯度中,用冷的流动自来水冲洗来脱蜡和重新水化。然后,将该载玻片置于抗原回收溶液(2.94g 柠檬酸三钠、22ml 的 0.2M 盐酸溶液、978ml 超纯水和 pH 调节到 6.0)中煮沸 30 分钟。用流动的冷自来水冲洗 10 分钟后,开始进行免疫染色。染色前,用含 4%低聚甲醛(电子显微科学公司(Electron Microscopy Sciences),宾夕法尼亚州海特弗(Hatfield)市)的 1X PBS(介质技术公司(Mediatech),弗吉尼亚州赫恩登市)在室

温下固定冰冻切片 15 分钟。用含 4% 胎牛血清 (FBS ; 哈龙公司, 犹他州洛根市) 的 1X PBS 在室温下封闭载玻片 30 分钟。将样品在室温下与稀释的一和二抗 (Ab) 分别连续培育各 1 小时。每步之间, 用 1X PBS 洗涤载玻片 3 次 (每次 5-10 分钟)。使用用封闭缓冲液 1 : 40 稀释的抗胶原 I (山羊多克隆 IgG (分类号 : sc-8788), 圣克鲁斯生物技术有限公司 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), 加利福尼亚州圣克鲁斯市)、胶原 III (山羊多克隆 IgG (分类号 : sc-2405), 圣克鲁斯生物技术有限公司, 加利福尼亚州圣克鲁斯市)、纤连蛋白 (山羊多克隆 IgG (分类号 : sc-6953), 圣克鲁斯生物技术有限公司, 加利福尼亚州圣克鲁斯市) 和层粘连蛋白 (家兔多克隆 IgG (分类号 : sc-20142), 圣克鲁斯生物技术有限公司, 加利福尼亚州圣克鲁斯市) 的一抗。使用用封闭缓冲液 1 : 80 稀释的牛抗 - 山羊 IgG 藻红蛋白 (分类号 : sc-3747, 圣克鲁斯生物技术有限公司, 加利福尼亚州圣克鲁斯市) 和牛抗 - 家兔 IgG 藻红蛋白 (分类号 : sc-3750, 圣克鲁斯生物技术有限公司, 加利福尼亚州圣克鲁斯市) 二抗。对载玻片加盖盖玻片 (费歇尔布兰德 (Fisherbrand) 22×60, 宾夕法尼亚州匹兹堡市), 滴入含有 4', 6- 二脒基 -2- 苯基吡啶 (DAPI) (载体实验室有限公司 (Vectashield, Vector Laboratories, Inc.), 加利福尼亚州伯林格姆市) 的硬化封固介质。用 ImagePro+4.5.1 软件 (媒体控制公司 (Mediacybernetics), 马里兰州西尔弗斯普林市) 在尼康 Eclipse TE200 倒置显微镜 (弗来尔有限公司 (Fryer Co. Inc.), 伊利诺斯州亨特来市 (Huntley)) 上记录图像。

[0105] 扫描电子显微术。用含 2.5% 戊二醛 (电子显微科学公司, 宾夕法尼亚州海特弗市) 的 0.1M 卡可酸盐缓冲液 (电子显微科学公司, 宾夕法尼亚州亨特来市) 灌注固定正常和脱细胞组织 15 分钟。然后用 0.1M 卡可酸盐缓冲液冲洗组织两次, 每次 15 分钟。用 1% 四氧化钬 (电子显微科学公司, 宾夕法尼亚州海特弗市) 后固定 60 分钟。然后用浓度递增的 EtOH (50% 10 分钟、70% 10 分钟两次、80% 10 分钟、95% 10 分钟两次、100% 10 分钟两次) 对组织样品脱水。然后使组织样品在托斯米斯 (Tousimis) Samdri-780A (托斯米斯公司 (Tousimis), 马里兰州罗克维尔市) 中进行临界点干燥。在登顿 (Denton) DV-502A 真空蒸发器 (登顿真空 (Denton Vacuum), 新泽西州穆尔镇) 进行 30 秒金 / 钨溅射镀膜。使用日立公司的 S4700 场致发射电子显微镜 (日立高技术美国公司, 加利福尼亚州普莱森顿市) 摄制扫描电子显微图像。

[0106] 机械测试。从大鼠左心室切下十字形的心肌组织, 中心区域约 5mm×5mm, 十字的轴与心脏的周向和纵向对齐。用测微计测量得到十字形组织中央的原始厚度是 3.59 ± 0.14 mm。还以相同的方向从脱细胞大鼠左心室组织中切下中心区域大小相同的十字形心肌。该脱细胞样品的原始厚度是 238.5 ± 38.9 μ m。此外, 还检测了另一种构造血管和心脏组织的组织工程学支架, 纤维蛋白凝胶的机械性能。将纤维蛋白凝胶制成十字交叉型, 其终浓度是 6.6 毫克纤维蛋白 / 毫升。所述纤维蛋白凝胶的平均厚度是 165.2 ± 67.3 μ m。用镊子将所有样品贴到二轴机械测试机 (英创公司 (Instron Corporation), 马萨诸塞州诺伍德镇) 上, 浸没于 PBS 中, 在二轴向上相等拉伸到应变 40%。为了精确探究静压机械性能, 拉伸样品使其增加 4% 的应变, 每个应变值时休息至少 60 秒。通过将力值对特定轴向的截面积 (5mm× 原始厚度) 定标, 将力转换为工程应力。工程应力计算成根据原始长度标准化的位移。为了比较两个轴之间和样品组之间的数据, 根据以下公式计算切线模量:

[0107] $[T(\epsilon = 40\% \text{ 应变}) - T(\epsilon = 36\% \text{ 应变})] / 4\% \text{ 应变}$

[0108] 其中 T 是工程应力, ε 是工程应变。将切线模量的值进行平均, 比较两轴 (周向和纵向) 和组间的差异。

[0109] 实施例 6- 评估脱细胞器官的生物相容性

[0110] 为了评估生物相容性, 将 100,000 小鼠的胚胎干细胞 (mESC) 悬于 1cc 的标准扩增培养液 (IMDM 细胞培养基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (基博 (Gibco), 加利福尼亚州卡尔斯巴德), 10% 胎牛血清 (哈龙公司, 犹他州洛根市)、100U/ml 青霉素-G (基博, 加利福尼亚州卡尔斯巴德)、100U/ml 链霉素 (基博, 加利福尼亚州卡尔斯巴德)、2mmol/L L-谷氨酰胺 (伊维创公司, 加利福尼亚州卡尔斯巴德)、0.1mmol/L 2-巯基乙醇 (基博, 加利福尼亚州卡尔斯巴德)) 中, 接种到 ECM 切片上和不含特殊生长因子刺激物或饲养细胞支持物的对照板上。将浓度为 10 μ g/ml 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 加入细胞培养液中标记细胞核, 以便定量附着和扩增的细胞。利用 ImagePro+4.5.1 (媒体控制公司, 马里兰州西尔弗斯普林市) 在尼康 Eclipse TE200 倒置显微镜 (弗来尔有限公司, 伊利诺斯州亨特来市) 上记录 UV 光下的图像和在基线、24、48 和 72 小时之后的相差。

[0111] 所述脱细胞 ECM 与细胞存活、附着和增殖相容。将接种后的 mESC 移植到 ECM 支架上, 在细胞接种 72 小时内即开始侵入该基质。

[0112] 实施例 7- 对脱细胞器官进行评估

[0113] 通过用 2% 伊文思蓝染料进行兰道夫灌注来评估 SDS 脱细胞大鼠心脏的动脉血管床的主动脉瓣的反应性和完整性。未观察到染料进入左心室, 表明主动脉瓣完整。肉眼观察, 确定了染料填充到冠状动脉高达第四分支点处却未发生染料泄漏。然后, 在组织切片中根据被伊文思蓝染色的血管基底膜的红色荧光确定了灌注到达大 (150 μ m) 和小 (20 μ m) 动脉和静脉。

[0114] 为了确定保留了主要的心脏 ECM 组分, 对 SDS 脱细胞 ECM 支架进行免疫荧光染色。以此确定了存在主要的心脏 ECM 组分, 如胶原 I 和 III、纤连蛋白和层粘连蛋白, 但没有证据表明保留有完整细胞核或收缩成分, 包括心肌球蛋白重链或肌原纤维的 α 肌动蛋白。

[0115] SDS 脱细胞心脏 ECM 的扫描电子显微照片 (SEM) 证明了主动脉壁和主动脉瓣小叶中保留了纤维取向和组成, 而整个组织厚度内均未发现细胞。脱细胞左和右心室壁保留了 ECM 纤维构造 (交织、支柱、螺旋) 和取向, 而完全除去了肌原纤维。两心室保留的 ECM 内, 可观察到直径不同的完整血管基底膜而未观察到内皮或平滑肌细胞。而且, 在完整的心外膜基底层下还保留了薄层致密的心外膜纤维。

[0116] 为了评估脱细胞心脏组织的机械特性, 进行了二轴测试并与在心脏组织工程学中常用作人工 ECM 支架的纤维蛋白凝胶进行了比较。正常大鼠心室和脱细胞样品的应力-应变行为表现出各向异性。相反, 纤维蛋白凝胶样品中, 两个主要方向上的应力-应变特性极其相似。正常大鼠心室和脱细胞组中的所有样品中均出现方向依赖性应力-应变行为, 纤维蛋白凝胶组中的所有样品的典型特性是应力-应变的各向同性。

[0117] 为了比较这两组间以及心脏主轴间的应力-应变特性, 计算周向和纵向在 40% 应变下的切线模量 (参见实施例 5 的等式)。注意到在两个方向上, 所述脱细胞样品组的模量显著高于正常大鼠心室和纤维蛋白凝胶样品组。然而, 正常大鼠心室和脱细胞基质的两个方向上的模量间的差异显著, 而纤维蛋白凝胶则不是这样。

[0118] 就完整左心室组织而言, 40% 应变下的应力在纵向上是 5-14kPa, 在周向上是

15-24kPa,与之前公开的数据吻合。在大鼠心室组织和脱细胞大鼠心室组织中,周向均比纵向僵硬,这极有可能是由心脏的肌肉纤维取向所决定的。尽管随心脏组织的厚度纤维朝向会有所改变,然而,大多数纤维均呈周向,因此,可以料想,在该方向上会较为僵硬。脱细胞组织较完整组织显著更僵硬。这也可以想到,因为胞外基质比细胞本身更加僵硬,ECM和细胞的组合可能不像单单 ECM 如此僵硬。尽管看起来脱细胞组织的切线模量值相当大,它们也只是略大于纯化弹性蛋白的杨氏模量(约 600kPa)和小于单胶原纤维的杨氏模量(5Mpa),从而本文所确定的值处于合理的范围内。

[0119] 实施例 8- 对其它器官或组织脱细胞

[0120] 除了大鼠心脏、肺、肾脏和肝脏外,将本文所述的灌注脱细胞方法应用于骨骼肌、胰腺、小和大肠、食管、胃、脾脏、脑、脊髓和骨骼中都可以获得类似的结果。

[0121] 实施例 9- 对猪肾脏脱细胞

[0122] 从施用肝素雄性动物分离猪肾脏。为了对分离器官进行灌注,对肾动脉插管,用 PBS 灌注 15 分钟以上洗掉血液。在 50-100mmHg 压力下,用 27L 含 1% SDS 的去离子水灌注 35.5 小时。用含 1% Triton-X 的去离子水开始灌注来除去 ECM 支架上的 SDS。然后用含有抗生素的 PBS 灌注脱细胞肾 120 小时进行洗涤和缓冲,以除去去污剂,使 pH 具有生物相容性。

[0123] 在开始灌注 2 小时内观察器官清晰度。灌注 12 小时内变为显著的清晰白色。当器官变成白色半透明状时终止脱细胞。

[0124] 实施例 10- 对脱细胞心脏进行移植

[0125] 准备工作是对 F344 大鼠心脏主动脉瓣远端的主动脉进行插管,除肺动脉干左支(其分支的远端)和下腔静脉(IVC)外结扎其它所有大血管和肺血管。采用兰道夫逆行动脉灌注方法,用 2 升 1% SDS 灌注 12-16 小时以上完成脱细胞。然后用 35mL 1% Triton-X 灌注 30-40 分钟使心脏复性,然后用含有抗生素和抗真菌剂的 PBS 洗涤 72 小时。移植前结扎 IVC。

[0126] 准备一只大(380-400 克)RNU 大鼠用来移植入该脱细胞心脏。用钝角蚊式夹夹住宿主动物的 IVC 和腹主动脉来隔离吻合区。用 8-0 缝合丝线将脱细胞心脏的主动脉与宿主肾支近端和下方的腹主动脉吻合。将脱细胞心脏的肺干左支与宿主 IVC 最接近的部分吻合,使肺干的物理压力最小化。

[0127] 当两血管均以缝合进宿主动物后,松开夹子,宿主动物的血液充盈到脱细胞心脏内。在脱细胞心脏和主动脉中目测观察受体动物的腹主动脉压。脱细胞心脏由于充入血液而变得膨胀和鲜红。吻合位点出血最少。松开夹子后 3 分钟(开始灌注)施用肝素,对心脏拍照和将其置于腹部以减小吻合部位的壓力。以无菌方式闭合腹部,监控该动物直至其康复。移植后 55 小时,使动物安乐死,外植出脱细胞心脏进行观察。进行解剖和评估后发现在 LV 中未接受肝素的动物形成巨大的血栓。在心脏右侧和左侧的冠状动脉中也观察到血块。

[0128] 在其它移植实验中,在两血管均缝合进宿主动物后松开夹子,宿主动物的血液充盈到脱细胞心脏中。在脱细胞心脏和主动脉中目测观察受体动物的腹主动脉压。脱细胞心脏变得膨胀和鲜红,吻合位点出血最少。松开夹子后 3 分钟(开始灌注)经腹膜内施用肝素(3000U),对心脏拍照和将其置于腹部以减小吻合部位的壓力。以无菌方式闭合腹部,监

控该动物直至其康复。约移植 48 小时后时发现动物死于出血。目前移植时间是 55-70 分钟。

[0129] C 组：再细胞化

[0130] 实施例 1- 心脏 ECM 切片再细胞化

[0131] 为了评估脱细胞 ECM 的生物相容性, 将 1mm 厚的脱细胞心脏切片与肌原性和内皮细胞系一起培养。将 2×10^5 个大鼠的骨骼成肌细胞、C2C12 小鼠的成肌细胞、人脐带内皮细胞 (HUVEC) 和牛肺内皮细胞 (BPEC) 接种到组织切片上, 在标准条件下共培养 7 天。肌原性细胞在 ECM 内迁移和扩增, 按照原始纤维取向排列。这些肌原性细胞表现为增殖增加和 ECM 切片中的大部分完全再生。内皮细胞系呈现出较少侵入性的生长模式, 在移植物表面形成单层。在这些条件下未发现抗增殖作用。

[0132] 实施例 2- 通过冠状动脉灌注使心脏 ECM 再细胞化

[0133] 为了确定通过冠状动脉灌注将再生细胞接种到脱细胞心脏 ECM 表面或内部的效力, 将脱细胞心脏转移到器官室内, 在细胞培养条件下 (5% CO_2 , 60% 湿度, 37°C), 持续不断地用充氧的细胞培养液进行灌注。在 40cm H_2O 冠状动脉灌注压下, 灌注进 120×10^6 个 PKH 标记的 HUVEC (悬于 50ml 内皮细胞生长培养液中)。收集冠状动脉流出物对细胞计数。然后将流出物回流, 再次灌注使细胞数量最大化。重复两次回流。第三次传代后, 心脏中留有约 90×10^6 个细胞。用 500ml 回流的充氧内皮细胞培养液持续灌注 120 小时。然后取出心脏, 将其放入低温保持箱。使 HUVEC 仅限存在于心脏范围内残留的动脉和静脉中, 而不完全弥散到血管外 ECM 中。

[0134] 实施例 3- 用新生大鼠心脏细胞使脱细胞大鼠心脏再细胞化

[0135] 分离和准备大鼠新生心肌细胞。第一天, 通过使 8-10 只 1-3 天大的 SPF Fisher-344 初生小狗 (哈伦实验室, 印第安纳州印第安纳波利斯) 吸入 5% 异氟烷 (艾博特实验室 (Abbott Laboratories), 伊利诺斯州北芝加哥市) 而对其进行麻醉, 无菌情况下对其喷射 70% EtOH, 快速行胸骨切开术。摘下心脏, 将其立即置于冰上的含 HBSS (新生心肌细胞分离系统中的试剂 #1 (华盛顿生物化学公司 (Worthington Biochemical Corporation)), 新泽西州雷克伍德镇) 的 50ml 锥形管内。除去上清液, 通过剧烈搅拌用冷 HSS 将整个心脏洗涤一次。将心脏转移到含有 5ml 冷 HBSS 的 100mm 培养盘中, 去除结缔组织, 将余下组织切成小于 1mm^2 的碎片。另外加入 HBSS 使总的板内体积达到 9ml, 加入 1ml 胰蛋白酶 (试剂 #2, 华盛顿公司试剂盒) 使终浓度达到 $50 \mu\text{g/ml}$ 。在 5°C 冷却器中将平板培育过夜。

[0136] 第二天, 从冷却器中取出平板, 置于冰上的无菌盖上。用广口移液管将含有组织和胰蛋白酶的缓冲液转移到冰上的 50ml 锥形管内。将胰蛋白酶抑制剂 (试剂 #3) 和 1ml HBSS (试剂 #1) 重新组合, 加入到 50ml 锥形管内, 轻柔混合。通过在液体表面上方通过空气而使组织充氧 60-90 秒。然后将组织温热到 37°C , 缓慢加入用 5ml 莱博维茨 (Leibovitz) L-15 重建的胶原酶 (300 单位 / 毫升)。将该组织置于热 (37°C) 振荡浴中 45 分钟。接着, 用 10ml 移液管滴定组织 10 次以释放细胞 (3ml / 秒), 然后滤过 $0.22 \mu\text{m}$ 的过滤器。另外用 5ml L-15 培养液洗涤组织, 第二次滴定, 收集于相同的 50ml 锥形管中。然后将细胞溶液在室温下培育 20 分钟, $50\times\text{g}$ 离心 5 分钟沉淀细胞。轻柔地除去上清液, 用新生心肌细胞培养液使细胞再悬于所需体积。

[0137] 培养液和溶液。所有培养液均经无菌过滤并避光保存于 5°C 冷却器中。华盛顿公

司的分离试剂盒 (Worthington Isolation Kit) 含有用于培养的所建议培养液:莱博维茨 L-15。该培养液仅用于第二天的组织处理。平板接种时采用本文所述另选的含钙培养液。华盛顿公司 (Worthington) 的莱博维茨 L-15 培养液:用 1L 养细胞级水重建莱博维茨培养液粉末而成。莱博维茨 L-15 培养液含有 140mg/ml CaCl_2 、93.68mg/ml MgCl_2 和 97.67mg/ml MgSO_4 。新生心肌细胞培养液:补充有 10% 胎牛血清 (哈伦)、100U/ml 青霉素-G (基博)、100U/ml 链霉素 (基博)、2mmol/L L- 谷氨酰胺 (伊维创) 和 0.1mmol/L 2- 巯基乙醇 (基博, 分类号:21985-023) 的 IMDM 细胞培养基 (基博, 分类号:12440-053), 使用前进行无菌过滤。按需加入两性霉素-B (终浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。该培养液可以用 1.2mM CaCl_2 (费歇尔科学, 分类号:C614-500) 和 0.8mM MgCl_2 (西格玛, 分类号:M-0250) 来增强。

[0138] 体外分析再细胞化培养物。作为朝创建生物人工心脏一个进步, 将分离的 ECM 用新生心脏细胞再细胞化。将 50×10^6 个新鲜分离的大鼠新生心肌细胞、纤维细胞、内皮和平滑肌细胞的组合注射进完全脱细胞化的心脏 (如本文所述构建) 中。然后将心脏组织切片, 体外培养所述切片来测试所述脱细胞 ECM 的生物相容性和所得到的构建物发育成心肌膜环的能力。

[0139] 24 小时后, 在显微镜下观察到得到的环内发生最低限度收缩, 证明了移植的细胞能够附着和嫁接到脱细胞 ECM 上。显微镜下, 细胞沿着 ECM 纤维方向生长。免疫荧光染色证实了表达心肌球蛋白重链的心肌细胞已经存活和成功嫁接。4 天内, 在脱细胞基质上观察到收缩性细胞膜片群落, 到第 8 日它们将发育成同步收缩组织环。

[0140] 第 10 天时, 将这些环固定在两个测量棒之间, 测量其在不同的预载荷条件下的收缩力。所述环可以被电起搏到频率为 4Hz, 在预载荷高达 0.65g 时能产生高达 3mN 的收缩力。因此, 采用所述体外组织培养方法进行再细胞化, 能获得收缩组织, 它能产生与用人造 ECM 构建物制成的优化工程化心脏组织环所产生的等效的力。

[0141] 经灌注使脱细胞心脏再细胞化。无菌心脏组织培养条件下 (5% CO_2 , 60% H_2O , 37°C), 将再细胞化的 (50×10^6 新鲜分离的大鼠新生心肌细胞、纤维细胞、内皮和平滑肌细胞) 支架固定于可灌注生物反应器 ($n = 10$) 上, 模拟大鼠心脏生理状态, 包括具有梯度增加的预载荷和后载荷 (第 1 天: 预载荷 4-12mmHg, 后载荷 3-7mmHg) 的搏动的左心室扩张, 搏动的冠状血流 (第 1 天: 7ml/min) 和电刺激 (第 2 天: 1Hz)。经灌注的器官培养要持续 1-4 周。在整个培养期内, 每 15 分钟记录下 30 秒的压力、流量和 EKG 数据。细胞接种后第 4、6 和 10 天记录下新生生物人造心脏的视频。

[0142] 细胞接种后第 10 天, 进行更深入的功能评估包括将压力探针插入左心室记录左心室压 (LVP), 随着刺激频率从 0.1-10Hz 梯度增加而记录下室壁运动的视频, 和用苯肾上腺素 (PE) 进行药物刺激。再细胞化心脏对单次起搏呈现收缩反应, 该反应是在起搏收缩和相应的 LVP 增加之后自发性收缩。一次起搏后, 心脏表现出 3 次自发性收缩, 然后转换成原纤态。与受刺激收缩类似, 自发性去极化也会引起相应的 LVP 增加和可记录的 QRS 复合波, 这可能表示形成了发育中的稳定电导模式。

[0143] 一旦将刺激频率增加到 0.4Hz, 则在每次诱导的收缩后会平均发生两次自发性收缩; 当起搏频率高达 1Hz 时, 只发生 1 次自发性收缩; 起搏频率是 5Hz 时, 不发生自发性收缩。最大俘获频率是 5Hz, 与成熟心肌膜的 250ms 不应期相一致。用 100 μM MPE 灌注后, 当频率是 1.7Hz 时会发生规律的自发性去极化, 同时伴有相应的 LVP 增加。

[0144] 在第 10 天进行组织学分析揭示出细胞在左心室壁的整体厚度 (0.5-1.2mm) 内发生分散和植入。心肌细胞沿心室纤维取向排列,形成类似成熟心肌膜的致密的组织化移植物区域和类似于发育中的心肌膜的较低密度的未成熟移植物区域。对心肌球蛋白重链免疫荧光染色确定心肌细胞表型。在整个新发育的心肌膜内维持了高密度的毛细血管,毛细血管间的平均距离约为 20 μ m,这与报道的成熟大鼠心肌膜类似。通过免疫荧光染色血管假性血友病因子 (vWF) 确定了内皮细胞表型。整个移植物厚度内均保持了细胞存活,表明通过冠状动脉灌注可以提供足够的氧气和营养物质。

[0145] 其它实施方式

[0146] 可以理解,尽管已经结合本发明详述对本发明进行了描述,但前述描述的目的是说明而不是对由随附权利要求书的范围所限定的本发明范围进行限制。其它方面、优点和修改均属于权利要求书的范围内。

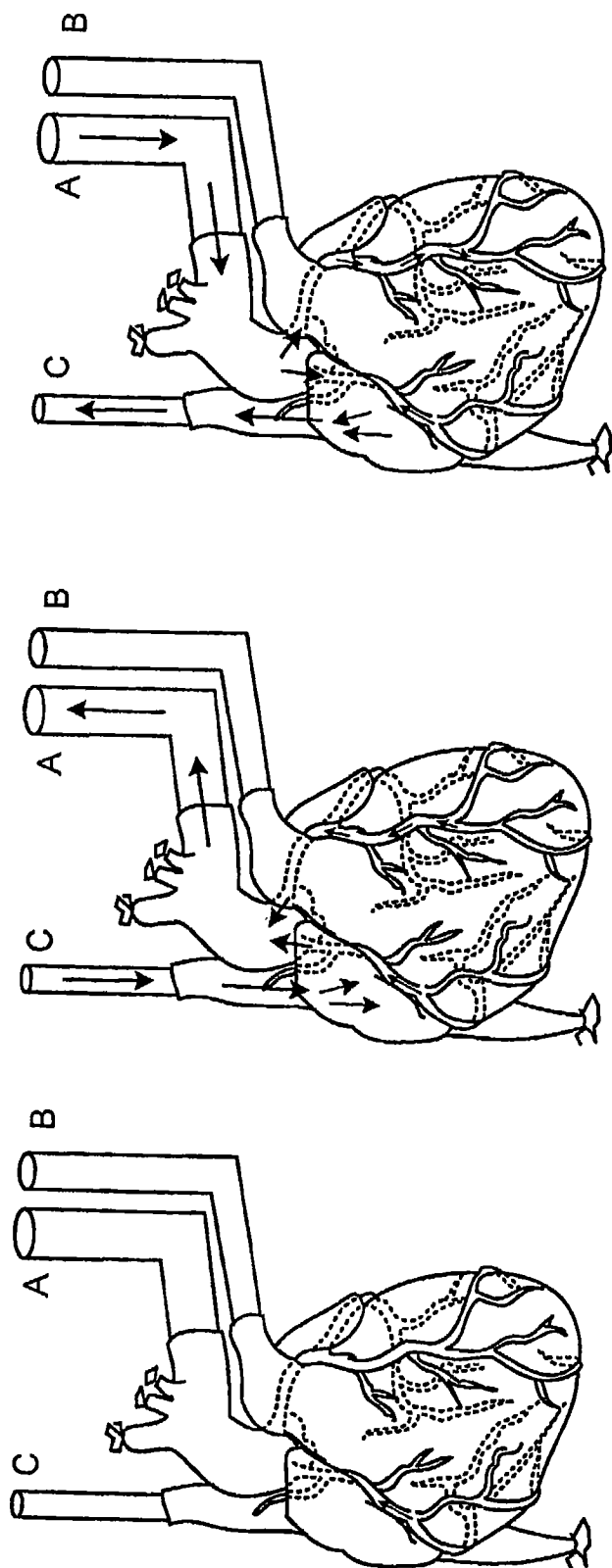


图 1

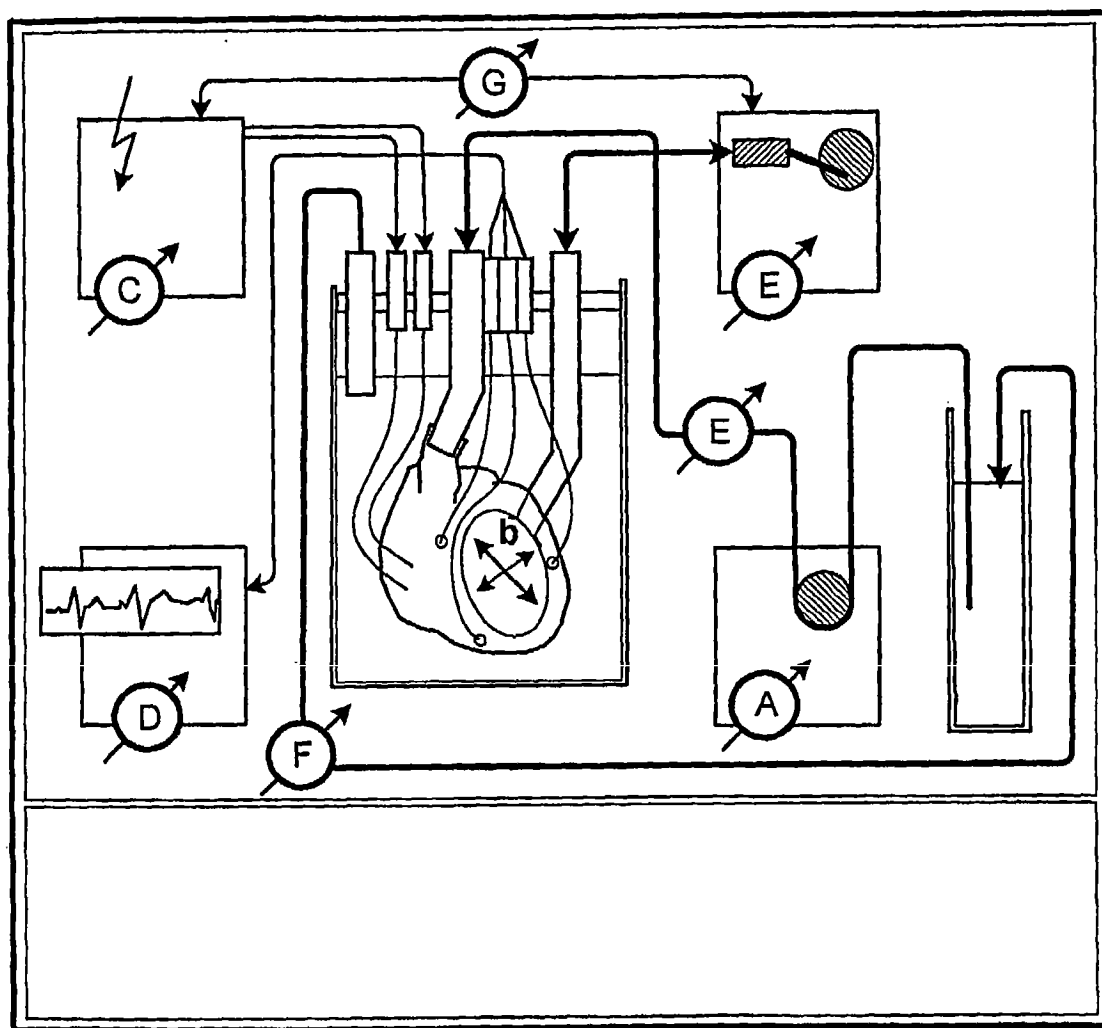


图 2