



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104208751 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201410408131. 3

(22) 申请日 2014. 08. 19

(71) 申请人 温州医科大学

地址 325000 浙江省温州市瓯海区东方南路
38 号温州市国家大学科技园孵化器

(72) 发明人 梅劲 张建色 王志斌 陈纳
赵丽娜 余雅玲 江俊群

(74) 专利代理机构 温州金瓯专利事务所(普通
合伙) 33237

代理人 黄肇平

(51) Int. Cl.

A61L 27/36(2006. 01)

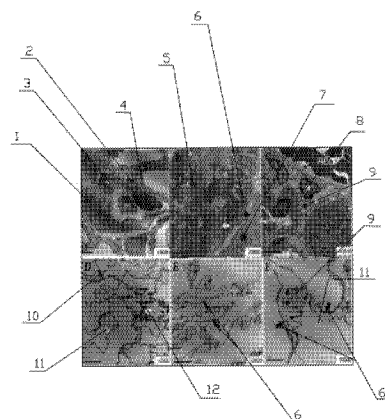
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法

(57) 摘要

一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法, 不使用现有的常规使用的对支架结构有破坏作用的离子型去垢剂 SDS, 而采用含有碳酸钠的 Triton-100 溶液作为去垢剂, 既不会产生离子型去垢剂 SDS 破坏支架结构的不良作用, 且碳酸钠作为碱性物质, 加入适量可增强去细胞的效果。



1. 一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括以下步骤:

(1) 在离体肾脏的动脉 22G 留置针插管,用肝素 PBS 冲洗肾内残留血液,至肾呈均一土黄色;

(2) 将整个肾脏组织在恒温 37℃ 下依次灌注 2000ml 0.1mol/L 碳酸钠和 1% 溶解于 PBS 的 Triton x-100 混合溶液,以及 500ml 的 4% 乙醇与 0.01% 过氧乙酸混合溶液,及含青、链霉素的 PBS 溶液,然后持续灌注,灌注的同时将肾组织浸泡于灌注液中,灌注速度均为 15ml / min,灌注过程中观察肾脏颜色及形态的变化,待肾脏颜色变浅,由原来的土黄色变为白色并透明化,即得肾脏去细胞支架,将制得的肾脏去细胞支架保存于 -80℃。

2. 根据权利要求 1 所述的一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,其特征在于,所述的步骤(2)中灌注时的灌注压为 3.6mmHg。

3. 根据权利要求 1 所述的一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,其特征在于,所述的步骤(2)中含青、链霉素的 PBS 溶液浓度为 105 IU / L。

4. 根据权利要求 1 所述的一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,其特征在于,所述的步骤(2)中灌注含青、链霉素的 PBS 溶液的灌注时间为 8—10 h。

一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及器官组织去细胞化领域,具体涉及一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法。

背景技术

[0002] 组织工程支架材料是构建组织工程器官或组织的重要基础,细胞外基质 (ECM) 不仅是一种良好的生物支架,而且也是细胞重要的信号调节分子,能调控细胞的生长、代谢与分化。它具有原组织的宏观及微观结构,并且富含胶原、弹力纤维、层黏连蛋白、纤维连接蛋白等经去细胞后留下的细胞外基质成分。从不同组织获得的细胞外基质,包括皮肤、血管、神经、骨骼、肌腱、小肠黏膜下层、膀胱、心脏瓣膜等,已经在可再生材料应用中做了广泛研究。近年来,以 ECM 为支架材料的产品及去细胞技术已经应用于临床,包括人体皮肤、肠黏膜下层 (SIS)、猪膀胱及猪心脏瓣膜等。随着组织工程的进展,对于整体脏器的去细胞技术也逐渐成为相关领域学者们研究的热点之一。Ott 等采用小鼠离体心脏,经去细胞技术处理后保留心脏 ECM,重新注入新生小鼠细胞,在体外培养后使心脏恢复了跳动,使体外再造具有生理活性的器官成为可能,这也给器官移植带来了新的希望。然而,由于肾脏的特殊结构及其复杂的功能,其细胞支架方面的研究还主要集中在人工合成支架上,鲜有关于全肾细胞外基质作为生物支架的报道。2009 年我国刘春晓等通过去垢剂灌注法成功制备了大鼠全肾脱细胞外基质;2010 年 Nakayama 等曾单纯用 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 或 1% 曲拉通 (Triton X-100) 浸泡法制备出猕猴肾细胞外基质。目前国内外 ECM 的制备方法日趋成熟,主要有两大类:一是酶学法:常用的酶有胰蛋白酶、脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶;二是化学方法:常用的去垢剂有 SDS、Triton X-100、Triton X-200、脱氧胆酸钠等。但是有研究报道,通常浓度 (0.25%) 的胰蛋白酶可水解胶原蛋白和弹力蛋白,破坏瓣膜支架结构。而去垢剂 SDS 则对支架结构有破坏作用。

发明内容

[0003] 为了解决现有技术的缺点,本发明的提供了设计并合成一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,通过含有碳酸钠的 Triton-100 溶液作为去垢剂,制备肾脏去细胞生物支架。

[0004] 一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,所述的制备方法包括以下步骤:

(1) 在离体肾脏的动脉 22G 留置针插管,用肝素 PBS 冲洗肾内残留血液,至肾呈均一土黄色;

(2) 将整个肾脏组织在恒温 37℃ 下依次灌注 2000ml 0.1mol/L 碳酸钠和 1% 溶解于 PBS 的 Triton x-100 混合溶液,以及 500ml 的 4% 乙醇与 0.01% 过氧乙酸混合溶液,及含青、链霉素的 PBS 溶液,然后持续灌注,灌注的同时将肾组织浸泡于灌注液中,灌注速度均为 15ml / min,灌注过程中观察肾脏颜色及形态的变化,待肾脏颜色变浅,由原来的土黄色变为白色并透明化。即得肾脏去细胞支架,将制得的肾脏去细胞支架保存于 -80℃。

[0005] 所述的一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,所述的步骤(2)中灌注时的灌注压为 3.6mmHg。

[0006] 所述的一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,所述的步骤(2)中含青、链霉素的 PBS 溶液浓度为 105 IU / L。

[0007] 所述的一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,所述的步骤(2)中灌注含青、链霉素的 PBS 溶液的灌注时间为 8—10 h

本发明的有益效果是:本发明提供了一种新型肾脏去细胞生物支架的制备方法,不使用现有的常规使用的对支架结构有破坏作用的离子型去垢剂 SDS,而采用含有碳酸钠的 Triton-100 溶液作为去垢剂,既不会产生离子型去垢剂 SDS 破坏支架结构的不良作用,且碳酸钠作为碱性物质,加入适量可增强去细胞的效果。

附图说明

[0008] 图 1 为本发明全肾的颜色及形态的变化图。

[0009] 图 2 为肾去细胞支架与对照组肾的透射电镜观察。

[0010] 图 3 为肾去细胞支架与对照组肾的 HE、PAS 及 Masson 观察图。

[0011] 图 4 为肾去细胞支架与对照组肾的蛋白免疫荧光分析图。

[0012] 图 5 为体视显微镜下肾内血管的形态及分布图。

[0013] 图 2 中 1- 足细胞,2- 足突,3- 基膜,4- 血管内皮细胞,5- 微绒毛,6- 肾小管膜,7- 线粒体,8- 间质细胞,9- 胶原纤维,10- 肾小球囊,11- 毛细血管膜,12- 血管系膜。

[0014]

具体实施方式

[0015] 制备获取离体大鼠肾脏

取健康成年 SD 大鼠,称重,按 0.3—0.4ml / 100g 10%水合氯醛行腹腔注射麻醉,起效后固定,打开腹腔,分离出下腔静脉,注射肝素钠溶液行全身肝素化处理。钝性分离双侧肾脏,可见肾呈棕红色,剥除肾的 3 层被膜,找到肾蒂,分离肾动、静脉和输尿管,离断输尿管,结扎肾动、静脉的起始处并离断,取肾,一侧肾进行灌注去细胞化处理,另一侧肾保存于 -80℃作为对照组。

[0016] 肾组织去细胞化

(1) 将一侧肾组织保存于 -80℃不做进一步处理作为对照组保存。

[0017] (2) 肾去细胞组:将离体肾脏的动脉 22G 留置针插管,用肝素 PBS 冲洗肾内残留血液,至肾呈均一土黄色。将整个肾脏组织在恒温 37℃下依次灌注 2000ml 0.1mol/L 碳酸钠和 1%溶解于 PBS 的 Triton x-100 混合溶液,以及 500ml 的 4%乙醇与 0.01%过氧乙酸混合溶液,及含青、链霉素的 PBS 溶液,灌注含青、链霉素的 PBS 溶液的灌注时间为 8—10 h,含青、链霉素的 PBS 溶液浓度为 105 IU / L,然后持续灌注,灌注的同时将肾组织浸泡于灌注液中,灌注时的灌注压为 3.6mmHg,灌注速度均为 15ml / min,灌注过程中观察肾脏颜色及形态的变化,待肾脏颜色变浅,由原来的土黄色变为白色并透明化。即得肾脏去细胞支架,将制得的肾脏去细胞支架保存于 -80℃。

[0018] 肾组织去细胞化数据分析处理

1、大体观察：

观察新鲜肾及灌注加浸泡全过程中全肾的颜色及形态的变化,如图 1 所示:肾组织呈现由棕红色变为均一土黄色,在逐渐变为白色直至完全透明化为止。

[0019] 2、基因组 DNA 含量分析：

对照组的肾与去细胞组肾分别取皮质、髓质各 50—80mg,经匀浆、细胞裂解,除蛋白,纯化后,提取基因组 DNA(按照 DNA 试剂盒说明操作),紫外分光光度计测定其浓度后,并行琼脂糖凝胶电泳对其进行定性测定。

[0020] 结果如下表 1 所示：

表 1 各组肾内 DNA 含量测定(ng/L)
Table 1 Quantitative of DNA within the scaffolds and native kidneys(ng/L)

样本编号 sample id	核酸浓度(ng/L) nucleic acid conc.	260nm 吸光度值 A260	280nm 吸光度值 A280
对照组皮质(P) control-cortex (P)	4.95×10^{-4}	21.832	11.694
对照组髓质(S) control-medulla (S)	3.48×10^{-4}	18.523	9.985
去细胞组皮质(1P) decellularized-cortex (1P)	4.67×10^{-6}	0.136	0.067
去细胞组髓质(1S) decellularized-medulla (1S)	9.81×10^{-6}	0.207	0.111

由表 1 可以看出

对照组及去细胞组肾支架,行 DNA 检测,结果显示,对照组肾皮质内 DNA 平均含量为 4.95×10^{-4} ng / L,髓质内 DNA 平均含量为 3.48×10^{-4} ng / L;去细胞组 1 肾皮质 DNA 平均含量为 4.67×10^{-6} ng / L,髓质内 DNA 平均含量为 9.81×10^{-6} ng / L,去细胞的比例均可高达 97% 以上。表明去细胞组 DNA 含量已大大降低。

[0021] 3、透射电镜观察：

对照组及去细胞组肾,分别切成 1.0mm³ 大小的组织块,在 4℃ 2.5% 戊二醛中固定 12 小时。经 PBS 冲洗后,锇酸固定,醋酸铀染色后,丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋剂浸透,包埋,制作超薄切片,透射电镜下观察。

[0022] 如图 2 所示：

图 2 中 肾去细胞支架与对照组的透射电镜观察

A-C 正常肾脏;D-F 去细胞肾脏;图 2 中 A 中 1 为足细胞,2 为足突,3 为基膜,4 为血管内皮细胞;图 2 中 B 中 5 为微绒毛,6 为肾小管膜,7 为线粒体;图 2 中 C 中 8 为间质细胞,9 为胶原纤维;图 2D 中 10 为肾小球囊,11 为毛细血管膜,12 为血管系膜;图 2 中 E 中 6 为肾小管膜;图 2 中 F 中 9 为胶原纤维,6 为肾小管膜,11 为毛细血管膜。

[0023] 对照组肾皮质可见肾小体结构完整、清晰,肾小体旁小管较致密,不易分辨;髓质部分可见大量管状样结构,管壁较厚者为近曲小管,管壁较薄者为远曲小管及集合管。去细胞组均可见肾小球、肾小管轮廓结构基本完整,基膜及纤维蛋白等细胞外基质组成的散在。“地图样”结构,管腔塌陷,中空而无细胞残留。

[0024] 4、染色观察：

图 3 为肾去细胞支架与对照组的 HE、PAS 及 Masson 观察

图 3 中上为正常肾脏；下为去细胞肾支架；正常肾脏内可见大量细胞存在；去细胞肾内无明显细胞残留，肾小球及肾小管结构完整，糖元成分及纤维充分保留。

[0025] 5、免疫荧光检测：

对照组及去细胞组肾随机抽取各 9 张石蜡切片，免疫荧光检测胶原 IV、LN 及 FN 的表达，荧光显微镜下观察，胞核呈蓝色荧光，基膜上出现绿色荧光即为阳性表达。

[0026] 图 4 为 肾去细胞支架与对照组肾的蛋白免疫荧光分析

上：正常肾脏；下：去细胞肾支架；图中正常肾脏大量蓝染细胞核；去细胞肾基质内未见明显细胞核残留，胶原蛋白等充分保留。

[0027] 6、肾动脉血管铸型观察：

肾动脉灌注 10% 丙烯腈-丁二烯-苯乙烯树脂 (ABS) 苏丹红溶剂 2 ~ 4ml，灌注时保持一定压力，流水冲洗冷却，50% 盐酸腐蚀 1 - 3d，清水冲洗干净，体视显微镜下观察肾内血管的形态及分布。

[0028] 图 5 为体视显微镜下肾内血管的形态及分布图

其中 A 是对照组肾，B 是去细胞的肾，从图 5 可以看出去细胞组肾内血管呈“树枝样”分布，较稀疏，血管分支仍清晰可见，形态完整。

[0029] 本实施例的肾脏去细胞生物支架的制备方法还可用于制备人或动物的肾脏去细胞生物支架，如尸肾，猪肾，猴肾等。

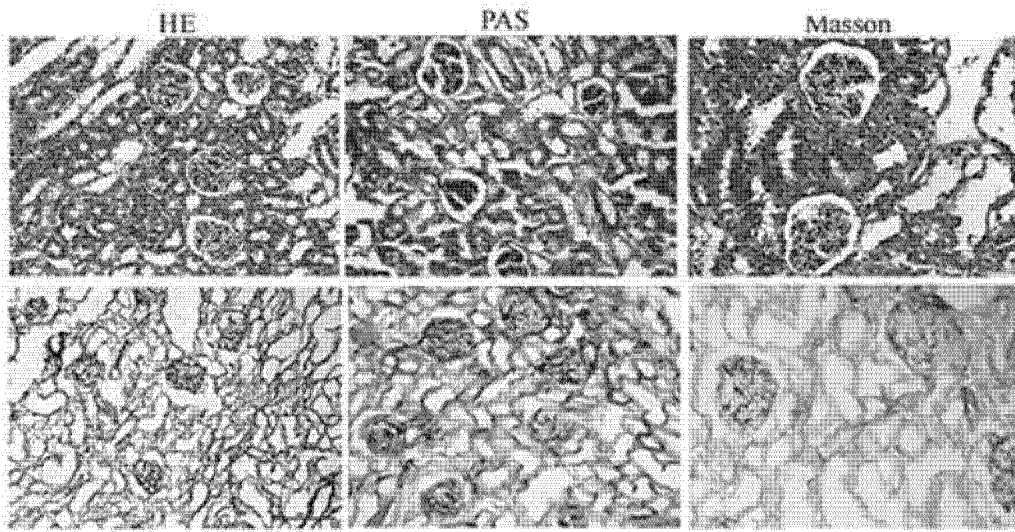


图 3

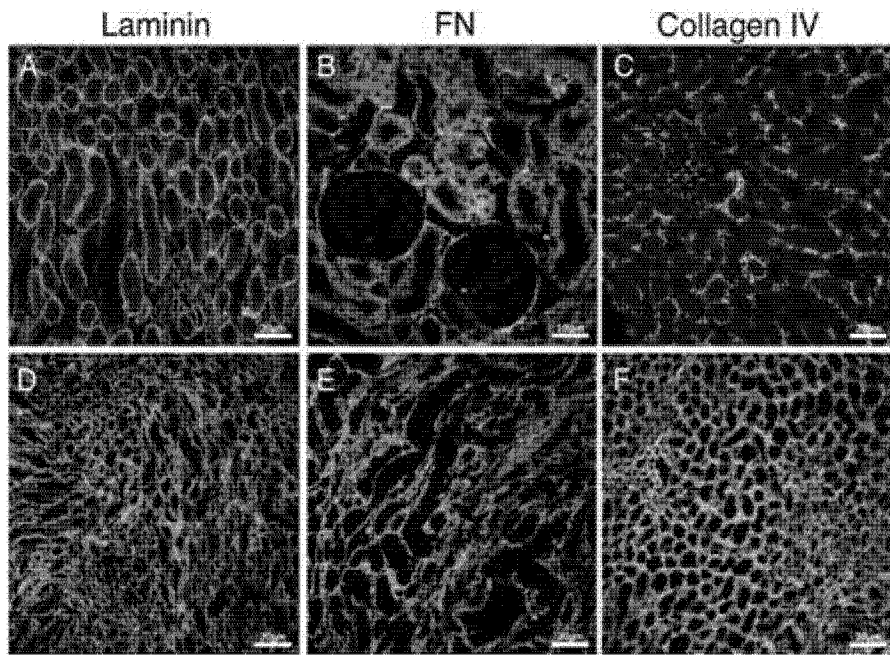


图 4

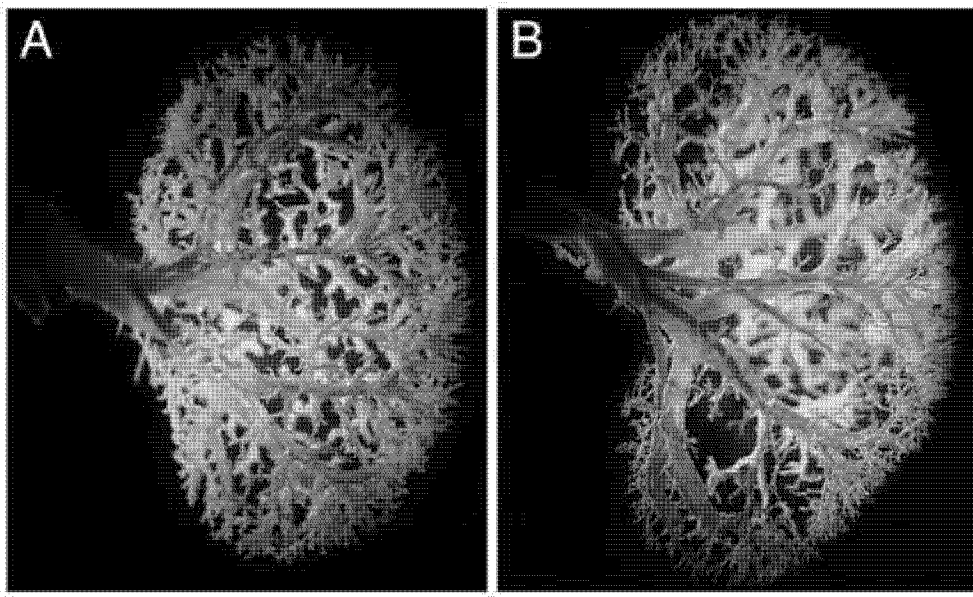


图 5