

DMSO 浓度及降温速率对组织工程化真皮超低温保存效果的影响

王欣* 华泽钊*,*** 杨光辉** 崔磊** 刘伟** 曹谊林** 程启康*

(*上海理工大学低温生物医学与技术研究所, 上海 200093

**上海市组织工程研究与开发中心, 上海 200235)

摘要 组织工程化真皮的超低温保存技术是皮肤组织工程的重要组成部分,对皮肤组织库的建立有重要意义。低温保存与低温保护剂的种类、浓度、降温复温程序及低温保护剂的添加与去除方式有着密切的关系。实验目的:研究 DMSO 浓度及降温速率对组织工程化真皮超低温保存效果的影响。实验方法:以培养一定时间的组织工程化真皮为试材,以不同浓度的 DMSO 溶液为低温保护液,以不同的降温速率降温保存,以四唑盐(MTT)比色法检测细胞存活率,辅以光学显微镜和扫描电镜观察分析。实验表明:降温速率为 1℃/min, DMSO 浓度为 1.4mol/L 时可获得在实验范围内较高的细胞存活率,为 75%,超低温保存后的扫描电镜照片表明其细胞形态最为接近新鲜状态,细胞与支架材料的黏附也很紧密,这与细胞存活率的研究结果有很好的相关性。

关键词: 组织工程 真皮 超低温保存

大面积严重烧伤者必须采取及时的创面覆盖措施,以防止早期并发症对病人生命造成威胁^[1]。传统方法是采用异种皮或同种尸体皮作为覆盖创面的暂时手段,但由于新鲜供体不足,来源有限,且有可能发生排异反应或传染疾病。因此,为了拓宽材料来源,提高供体质量,皮肤的超低温保存及组织工程化皮肤的研究和开发成为近年来研究的重要课题。

组织工程化人工皮肤,是将组织工程这一新兴技术应用于皮肤创面的修复重建领域,而研制成功的类人工复合皮肤等同物或人工真皮等同物^[2]。在皮肤组织病损创面的愈合方面,组织工程化皮肤既可以作为异种皮、同种尸体皮以外的新一类创面暂时覆盖物,也可以像自体植皮那样成为新的一类创面永久覆盖物,在特定情况下,成为治疗各类皮肤病损的,同传统手段全然不同的一种重要选择。研究表明,成纤维细胞-支架材料复合培养所产生的类真皮组织对位于其表层的角质细胞的生长与进一步分化有极为重要的支持作用。通过实际培养表皮细胞膜片移植实验也进一步印证了此点^[3]。

尽管皮肤的超低温保存和临床应用研究已进行了 20 余年^[4-7],但组织工程化真皮的超低温或低温保存的研究报告仍很少^[8,9]。且不同的支架材料、不同的组织工程化真皮培养时间、其超低温保存特性也会有很大的区别。因此,虽然真皮成纤维细胞

悬液低温保存的存活率高达 95% 以上,但组织工程化真皮低温保存的细胞存活率却相当低,很少能满足临床应用的要求(存活率 $\geq 60\%$)^[10]。

本研究对以聚羟基乙酸(PGA)纤维(编织)为支架的组织工程化真皮,以二甲基亚砷(DMSO)为低温保护剂进行了程序降温的超低温保存实验,探讨了低温保护剂浓度及降温速率对组织工程化真皮超低温保存效果的影响。

材料与方法

1. 实验材料

培养 14 天的组织工程化真皮(PGA+成纤维细胞)由上海组织工程研究与开发中心提供。

2. 仪器设备

程序降温仪(上海理工大学低温生物工程研究室研制)^[11],手压式塑料封口机(上海),医用深低温保存袋(购于上海市血液中心),酶联免疫检测仪(ELX800 澳大利亚),光

本文 2003 年 5 月 15 日收到,7 月 11 日接受。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(59836240),973 项目(G1999054309,863 项目(2002AA205041),上海市重大科技攻关项目(00DJ14001-6),上海市教委重点学科建设项目

*** 通讯联系人。E-mail: tchua@sh163.net

致谢:感谢中科院上海生科院生化与细胞所电镜室在扫描电镜实验方面的大力协助。

学显微镜(Nikon eclipse TS100 日本),扫描电镜(HITACHI S-450)。

3. 主要试剂

DMEM(Dulbecco-modified Eagle's medium)培养液(含10%小牛血清),二甲基亚砷(DMSO)进口分装(Sigma,美国),四唑盐(MTT)进口分装(FLUKA,美国)。

4. 实验方法

1) 样品处理 将培养14天细胞生长均匀的组织工程化真皮(1 cm²)在超净台内用手术剪剪为(10×3×1.5) mm的组织条,置入无菌培养箱中待用。

2) 低温保护液的配制 以DMEM培养液为溶剂,配制DMSO浓度分别为1.4、2.1、2.8 mol/L的低温保护液,置于4℃下保存备用。

3) 低温保护剂处理 将组织工程化真皮置入超低温保存袋中,加入低温保护剂,迅速热封口,再置于4℃下处理15 min。

4) 程序降温 采用“两步法”降温保存。分别以0.5℃/min、1℃/min和2℃/min的降温速率从室温降至-60℃,然后快速投入液氮保存。

5) 复温及低温保护剂的去除 在液氮中存放24 h后取出,于37℃水浴中振荡复温。在无菌条件下剪开低温保存袋,除去低温保护液,将组织条转至培养皿中,用DMEM清洗3次。

6) 检测 从组织条上剪取少量光镜及扫描电镜样品并进行检查,将其余部分等分为6等份,置于96孔培养板中,于无菌培养箱中培养。培养24 h后用四唑盐(MTT)比色法^[10,12]进行细胞存活率检验。并做新鲜对照。

细胞存活率(%)=(样品复温后 MTT 检测值/新鲜对照 MTT 检测值)

结果与分析

1. 光学显微镜检查

在预实验中,当将组织工程化真皮快速投入液氮中时,组织会发生断裂,细胞脱落很多。光镜检查表明:对于本实验中所采用的超低温保存方案,组织工程化真皮经程序降温保存后组织均未发生断裂,复温后仍为条状;大部分细胞及其分泌的基质仍黏附于聚羟基乙酸(PGA)支架上,培养皿中可见少量细胞及基质。

2. 细胞存活率

1) 降温速率为0.5℃/min时,DMSO浓度对细胞存活率的影响 以0.5℃/min对组织工程化真皮进行程序降温保存后,不同浓度的DMSO溶液对细胞存活率的影响如图1所示。

图1表明:在此降温速率下,DMSO浓度对组织工程化真皮冻存后的细胞存活率有明显影响。当

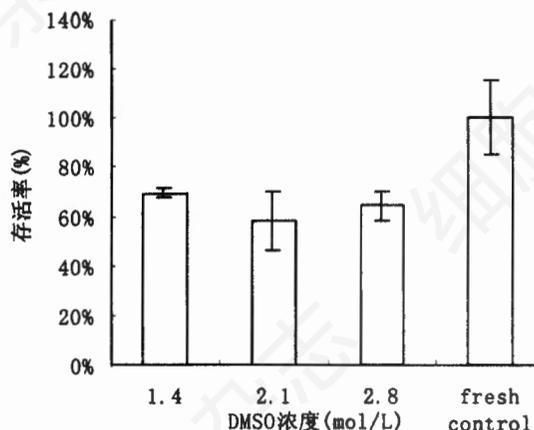


图1 DMSO浓度对组织工程化真皮低温保存效果的影响

降温速率:0.5℃/min

DMSO浓度为1.4mol/L时,组织工程化真皮复温并继续培养24h后,细胞存活率可达新鲜对照的70%;而DMSO浓度为2.1mol/L或2.8mol/L时,超低温保存后,组织工程化真皮的细胞存活率相对较低,分别为58%和64%;因此,当降温速率为0.5℃/min时,1.4mol/L的DMSO有利于组织工程化真皮超低温保存细胞存活率的提高。

2) 降温速率为1℃/min时,DMSO浓度对细胞存活率的影响 图2为降温速率为1℃/min时,以MTT法测得的组织工程化真皮以不同浓度的DMSO溶液为低温保护液,经超低温保存后的细胞存活率。

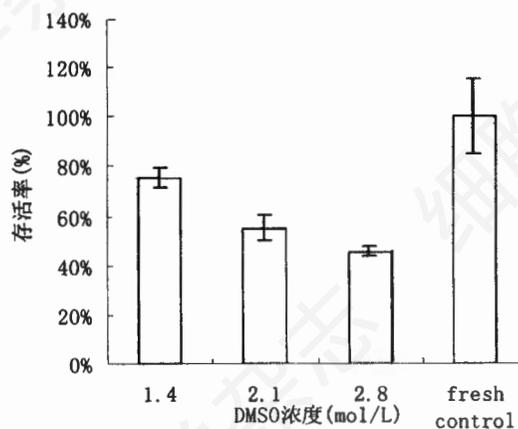


图2 DMSO浓度对组织工程化真皮低温保存效果的影响

降温速率:1℃/min

图2表明:当降温速率为1℃/min时,在试验范围内,随DMSO浓度增加,细胞存活率降低。其中,

1.4mol/L可获得较高的细胞存活率(75%),而当DMSO浓度增至2.8mol/L时,细胞存活率仅为45%,难以满足临床应用的要求。

3) 降温速率为2℃/min时,DMSO浓度对细胞存活率的影响 图3为降温速率为2℃/min时,以MTT法测得的组织工程化真皮以不同浓度的DMSO溶液为低温保护液,经超低温保存后的细胞存活率。

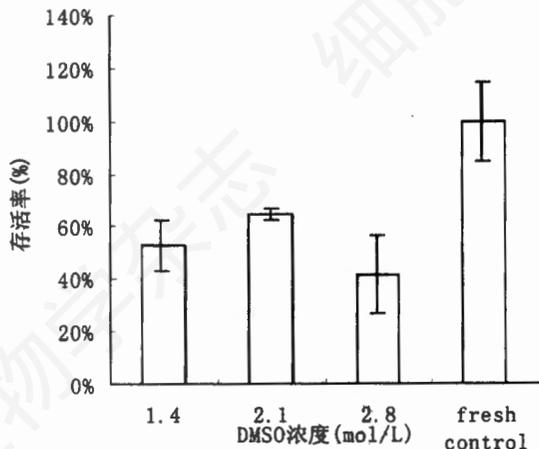


图3 DMSO浓度对组织工程化真皮低温保存效果的影响
降温速率:2℃/min

图3表明:当降温速率为2℃/min时,在试验范围内,当DMSO浓度为2.1mol/L时,可获得相对较高的细胞存活率,为65%。而1.4mol/L或2.8mol/L的DMSO溶液的低温保护效果都相对较差。

3. 扫描电镜分析

对以1.4mol/L DMSO溶液作为低温保护液,而采取不同降温速率超低温保存的组织工程化真皮进行扫描电镜分析(每个处理中观察3块样品,选择有代表性的区域拍照)。结果见图版(A、B、C、D)。由扫描电镜照片可以看出:新鲜的组织工程化真皮中的成纤维细胞在正常状态下呈长梭形和多角形,和聚羟基乙酸(PGA)纤维黏附紧密,并分泌大量基质(图版图A)。经超低温保存后,由于冰晶形成及溶液成分的改变使细胞的形态发生了一定的皱缩,且细胞与支架材料的黏附也有不同程度的变化。具体来讲,降温速率为1℃/min时,超低温保存后的扫描电镜照片(图版图C)表明其细胞形态最为接近新鲜状态,细胞与支架材料的黏附也很紧密,这与其细胞存活率的结果有很好的相关性。降温速率为2℃/min时,细胞的皱缩程度有所加大,但基质量的

减少不明显(图版图D)。降温速率为0.5℃/min时,细胞的皱缩程度最大,基质量减少明显,与支架材料的黏附也不很紧密(图版图B)。

4. 组织工程化真皮超低温保存中降温速率及DMSO浓度的优选

对各个降温速率下的DMSO的优化水平所获得的细胞存活率进行综合比较,如图4所示。

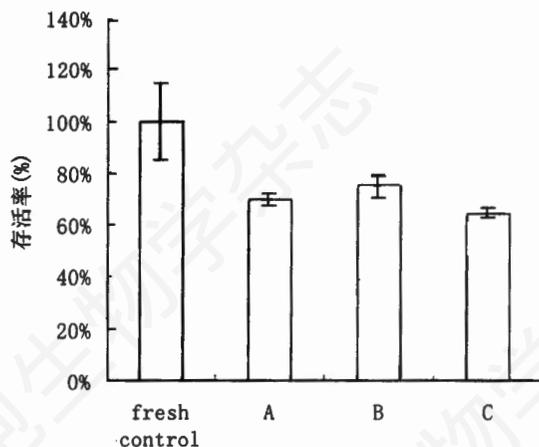


图4 组织工程化真皮低温保存中降温速率及DMSO浓度的优选

A. 0.5℃/min, 1.4mol/L DMSO; B. 1℃/min, 1.4mol/L DMSO; C. 2℃/min, 2.1mol/L DMSO。

结果表明,降温速率为1℃/min,DMSO浓度为1.4mol/L时可获得在实验范围内较高的细胞存活率,为75%,扫描电镜分析也证明了此点。

讨 论

皮肤保存的温度常用的有三种,即:4℃、-80℃、-196℃。因为低温能抑制生物体的生化活动,储存温度越低,可储存的时间越长,所以皮肤在-196℃保存最为理想^[4]。Dawn RA等考虑到保存及运输费用的减少,认为组织工程化真皮(Dermagraft)可在-70℃条件下保存^[9]。但由于组织中的生化及物理变化仍在缓慢进行,这会对细胞的结构,特别是细胞膜产生损伤,从而导致细胞死亡,所以,这种方法的保存期限是相对较短的。

虽然小鼠皮肤的超低温保存研究表明,降温速率为30℃/min,以15%(V/V)的DMSO为低温保护剂时可获得较好的保存效果(复温后细胞的活性可达新鲜皮肤活性的78%)^[6]。但对组织工程化的皮肤而言,这是不适用的。在组织工程化组织的低

温保存中, 支架材料的性质对该组织的低温保存特性有至关重要的影响。降温速率过高可能会引起支架材料的断裂。如: Teasdale B 等对成纤维细胞-胶原凝胶复合物的超低温保存实验表明, 降温速率为 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($20^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$) 时可获得较好的保存效果^[8]; 而对本实验中, 以聚羟基乙酸 (PGA) 为支架、培养 14 天的组织工程化真皮而言, 降温速率为 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ($4^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$), DMSO 浓度为 1.4mol/L 时可获得在实验范围内较高的细胞存活率, 为 75%, 超低温保存后的扫描电镜照片 (图版图 C) 也表明其细胞形态最为接近新鲜状态, 细胞与支架材料的黏附也很紧密, 这与其细胞存活率的测量结果有很好的相关性。

参 考 文 献

- [1] 杨之骏、许伟石、史济湘, 1985, 烧伤治疗, 科技出版社, 上海。
- [2] 杨光辉、商庆新、曹谊林, 2000, 组织工程化皮肤研究进展, 实用美容整形外科杂志, 6: 322 - 323。
- [3] Ojeh NO, Frame JD, and Navsaria HA., 2001, *In vitro* characterization of an artificial dermal scaffold., *Tissue Engineering*, 7: 457 - 472。
- [4] 华泽钊、任禾盛, 1994, 低温生物医学技术, 科学出版社, 北京。
- [5] 华泽钊、常兆华、忻雅雯等, 1991, 皮肤低温保存的方法和工艺研究, 中国生物医学工程学报, 10(2): 118 - 126。
- [6] Ingham E, Matthews JB, Kearney JN, et al., 1993, *The Effects of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogeneic skin grafts.*, *Cryobiology*, 30(5): 443 - 458。
- [7] Ben-Bassat H, Strauss N, Ron M, et al., 1996, *Transplantation performance of human skin cryopreserved by programmed or stepwise freezing and stored at -80 degrees C or -180 degrees C.*, *J Burn Care Rehabil*, 17(5): 421 - 428。
- [8] Teasdale B, Sieber VK, Riches DJ, et al., 1993, *Cryopreservation of cultured dermal fibroblast impregnated collagen gels.*, *Burns*, 19(5): 406 - 410。
- [9] Dawn RA, Kang L, Jonathan M., 1999, *Practical Considerations for Large-scale Cryopreservation of a Tissue Engineered Human Dermal Replacement.*, *Advances in Heat and Mass Transfer in Biotechnology*, 44: 71 - 91。
- [10] Jonathan M, Kang L, Patch R, et al., 1998, *Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range.*, *Tissue Eng*, 4(4): 403 - 414。
- [11] 陈儿同、赵林、华泽钊, 1989, 一种液氮耗量极少的微机控制降温仪, 低温工程, (2): 24 - 29。
- [12] 司徒镇强、吴军正, 1996, 细胞培养, 世界图书出版公司, 西安。

THE EFFECTS OF DMSO CONCENTRATION AND COOLING RATE ON THE CRYOPRESERVED TISSUE ENGINEERED HUMAN DERMAL REPLACEMENT

WANG Xin* HUA Ze Zhao***** YANG Guang Hui** CUI Lei** LIU Wei** CAO Yi Lin** CHENG Qi Kang*

(* Institute of Cryogenic Engineering, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093, China

**Shanghai Tissue Engineering Research & Development center, Shanghai 200235, China)

ABSTRACT Cryopreservation of tissue engineered human dermal replacement plays an important role in skin tissue engineering and skin banking. For a variety of cells, optimal cell recovery depends on the type of cryoprotectant, the concentration and exposure time to cryoprotectant, freezing and warming protocols, and even the adding and removing procedures of cryoprotectant solutions. With the inspection of microscope and electronic scanning microscope and viability evaluation by the tetrazolium salt, MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), this study investigates the effects of cryoprotectant concentration and the cooling rate on the dermal replacement. The results indicate that a combination of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and 1.4mol/L DMSO can get a higher viability(75%). And the micrograph confirmed this result.

Key words: Tissue engineering Dermis Cryopreservation

Funding: This work was supported by National Natural Science Foundation of China grant 59836240, National 973 project of China grant G1999054309, National 863 project of China grant 2002AA205041, Key Technologies R & D Project of Shanghai grant 00DJ14001-6, and Key Subject Construction Project of Shanghai Municipal Education Commission.

*** Corresponding author. E-Mail: tchua@sh163.net