



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108273136 B

(45)授权公告日 2019.08.16

(21)申请号 201810337490.2

审查员 张凌

(22)申请日 2018.04.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108273136 A

(43)申请公布日 2018.07.13

(73)专利权人 南通大学附属医院

地址 226001 江苏省南通市西寺路20号

(72)发明人 薛万江 冯亮 郭益冰 毛勤生

胡懿林 冯盈 肖明兵

(74)专利代理机构 南通市永通专利事务所(普

通合伙) 32100

代理人 葛雷

(51)Int.Cl.

A61L 27/36(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

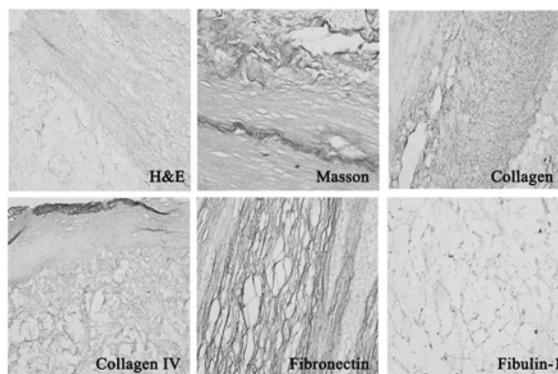
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种水合胃脱细胞生物补片及制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种水合胃脱细胞生物补片及制备方法和应用,该异种胃脱细胞基质补片(Hydrated xenogeneic decellularized gastric matrix,HDGM)经由水合脱细胞法制备,通过HE染色、Masson染色、免疫组化、DNA含量和葡萄糖胺聚糖含量检测、CCK8法、扫描电镜、生物纳米压痕分析评价,结果表明主要细胞外基质组成相对稳定、微结构保留完好、生物力学性能稳定且组织相容无明显细胞毒性;进一步构建大鼠胃局部缺损模型,体内评价HDGM对于胃穿孔修补具有显著效果。本发明所述新型胃脱细胞生物补片制备方法简单、质量可控、生物相容无细胞毒性、无免疫原性,可作为理想的胃穿孔修补生物材料。



1. 一种水合胃脱细胞生物补片,其特征是:1) 在干重条件下HDGM 中DNA含量小于50 ng/mg,且经HE染色、DAPI染色后未见明显细胞核残留;2) HDGM保留多种主要细胞外基质成分:包括Collagen I、Collagen **IV**、Fibronectin、Fibulin-1、GAGs;3) 经钴⁶⁰辐照灭菌后生物力学、超微结构无明显改变且无明显细胞毒性。

2. 一种水合胃脱细胞生物补片的制备方法,其特征是:将已处死的健康成年大鼠正中切口打开腹腔,显露并依次结扎髂总动静脉、双侧肾动静脉;打开胸腔,降主动脉留置针刺,结扎上腔静脉、升主动脉弓;经降主动脉动脉推注肝素,灌注 PBS 缓冲液;迅速将已置管的大鼠-80℃冷冻至脱细胞时间,4℃条件下解冻,采用洗脱剂混合溶液洗脱;ddH₂O在4℃条件下继续灌注冲洗24 h;流速1.5 ml/min,分离胃壁组织,得到胃生物补片。

3. 根据权利要求2所述的水合胃脱细胞生物补片的制备方法,其特征是:经降主动脉推注肝素含量为20-100U。

4. 根据权利要求2所述的水合胃脱细胞生物补片的制备方法,其特征是:灌注 PBS 缓冲液时间为20 min - 2 h。

5. 根据权利要求2所述的水合胃脱细胞生物补片的制备方法,其特征是:洗脱剂混合溶液为Triton X-100、十二烷基硫酸钠、氨水、DNA酶、RNA酶、脱氧胆酸钠中的二种或二种以上。

6. 根据权利要求5所述的水合胃脱细胞生物补片的制备方法,其特征是:洗脱剂混合溶液为1% Triton X-100/0.1%氨水及DNA酶组合;灌注时间为6 - 24 h;灌注流速为0.2 - 2 ml/min。

一种水合胃脱细胞生物补片及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可用于近胃窦幽门或是贲门处较大穿孔、胃肿瘤晚期穿孔患者的异种来源新型胃脱细胞生物补片的制备方法与其应用。

背景技术

[0002] 胃穿孔是临床最常见的急腹症,多见于胃十二指肠溃疡、胃晚期肿瘤破溃。胃穿孔发生时,胃内容物、胆汁及胃酸易漏入腹腔造成腹腔污染,引起腹膜炎、腹腔脓肿等,严重时可发生中毒性休克,引发多器官功能衰竭,手术治疗为首选方法。对于胃体较大穿孔,单纯修补术常受阻于组织血供和水肿组织的张力;而对于近胃窦幽门或是贲门处较大穿孔,采用单纯修补术常引起幽门或贲门狭窄,若改用胃大部切除术,术后患者极易出现反流性胃炎、胃食道反流病以及倾倒综合征等后遗症,严重影响患者生活质量;胃晚期肿瘤发生穿孔,穿孔处水肿极易出血,单纯修补术后易再发生穿孔漏。运用生物材料进行组织缺损修补取得了一定进展,目前已有用于穿孔修补的材料有:聚乙醇酸生物膜、纤维蛋白胶。

[0003] 理想的胃穿孔修补生物补片材料应具有良好的生物力学性能、组织相容性、无明显细胞毒性。水合胃脱细胞支架包含物种间保守的,如胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等多种结构和功能蛋白,具有良好的3D空间网络结构,可为组织再生提供理想的生长修复空间。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种可用于对胃壁缺损进行修补,操作简易、质量可控的水合胃脱细胞生物补片的制备方法和应用。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种水合胃脱细胞生物补片,其特征是:1)在干重条件下HDGM 中DNA含量小于50 ng/mg,且经HE染色、DAPI染色后未见明显细胞核残留;2)HDGM保留多种主要细胞外基质成分:包括Collagen I、Collagen **IV**、Fibronectin、Fibulin-1、GAGs等;3)经钴⁶⁰辐照灭菌后生物力学、超微结构无明显改变且无明显细胞毒性。钴⁶⁰辐照灭菌。进行HE染色、Masson染色、免疫组化、DNA含量和葡萄糖胺聚糖含量检测、CCK8法、透射电镜、生物纳米压痕分析评价及体内修补效果评价。

[0007] 一种水合胃脱细胞生物补片的制备方法,其特征是:将已处死的健康成年大鼠正中切口打开腹腔,显露并依次结扎髂总动静脉、双侧肾动静脉;打开胸腔,降主动脉留置针刺,结扎上腔静脉、升主动脉弓;经降主动脉动脉推注肝素,灌注 PBS 缓冲液;迅速将已置管的大鼠-80℃冷冻至脱细胞时间,4℃条件下解冻,采用洗脱剂混合溶液洗脱;ddH₂O在4℃条件下继续灌注冲洗24 h;流速1.5 ml/min,分离胃壁组织,得到胃生物补片。

[0008] 经降主动脉推注肝素含量为20-100U,最佳为30 U。

[0009] 灌注 PBS 缓冲液时间为20 min - 2 h,最佳时间为约 0.5 h。

[0010] 洗脱剂混合溶液为Triton X-100、十二烷基硫酸钠、氨水、DNA酶、RNA酶、脱氧胆酸

钠中的二种或二种以上。

[0011] 洗脱剂混合溶液为1% Triton X-100/0.1%氨水及DNA酶组合;灌注时间为6 - 24 h,最佳灌注时间为8 h;灌注流速为0.2 - 2 ml/min,最佳灌注流速为1.5 ml/min。

[0012] 一种水合胃脱细胞生物补片在制备胃穿孔修补材料中的应用。

[0013] 所述胃穿孔为近胃窦幽门或贲门处穿孔或胃肿瘤晚期穿孔。

[0014] 本发明以水合氧化胃脱细胞支架补片(HDGM)作为新型生物补片材料,可对胃壁缺损进行修补。该生物补片是通过大鼠胃壁进行水合氧化脱细胞制备而成,补片的生物组成成分和空间结构是保守的,并且补片的生物力学足以承受胃腔内外生理压力。对水合氧化补片(HDGM)进行钴60灭菌处理,其空间结构和生物力学并未破坏;利用HDGM补片进行大鼠胃穿孔模型进行修补,大鼠未见排斥反应,并且术后消化道造影检查未见造影剂外泄;3周后对修补处HDGM补片进行组织学鉴定,补片处有大量粘膜上皮细胞覆盖,肌纤维逐渐修复。HDGM补片有望成为一种理想的生物材料用于临床治疗。

附图说明

[0015] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0016] 图1是大鼠胃脱细胞生物补片组织形态示意图;

[0017] H&E显示未见明显细胞残留;Masson三色染显示未见肌纤维残留;免疫组化显示Collagen I、Collagen IV、Fibronectin、Fibulin-1较好保留。

[0018] 图2是DNA和GAG含量分析示意图;

[0019] 干重条件下HDGM和未脱细胞组(Native)分别为 39 ± 4.02 ng/mg和 3689 ± 422.9 ng/mg; GAG分别为 89 ± 5.2 ng/mg 和 127 ± 7.9 ng/mg。

[0020] 图3是超微结构、生物力学与细胞毒性评价示意图;脱细胞处理后未见明显破坏;生物力学指标脱细胞前后分别为 1962 ± 261 kPa、 856 ± 47 kPa;生物补片浸提液无明显细胞毒性。

[0021] 图4是组织相容性评价示意图;

[0022] 术后3、7、14、21 d分别将支架样品取出固定后行HE染色,结果显示移植3-7天后,移植区的炎症细胞开始浸润,7-14天左右到达高峰,14-21天后炎症逐渐消退。

[0023] 图5是体内修补评价示意图;

[0024] 术后24 h上消化道造影(UGI)显示无造影剂外渗,胃形态良好;30 min后造影剂顺利进入小肠,消化道通畅;术后3 d、7 d、14 d、21 d实施空气栓塞处死后获取缺损修补创面样本,行HE染色观察。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0026] 本实验例所用动物为SD大鼠,利用本实施例制备水合生物补片的方法及修补评价如下:

[0027] (1)动物术前准备

[0028] 健康成年SD大鼠,250 - 300 g,雌雄不限,术前第三天减量饮食,术前第二天予以葡萄糖溶液多次少量喂养,术前1天禁食,术前4 h禁水,术后24 h禁食。手术器械常规高压

蒸汽灭菌,术前实验场地空气净化消毒;手术人员操作遵守无菌术原则,手术以标准外科无菌方式进行。以10%水合氯醛以1 ml/100 g 行腹腔注射麻醉,聚维碘酮消毒,铺无菌巾。

[0029] (2) 水合生物补片制备

[0030] SD大鼠正中切口打开腹腔,显露并依次结扎髂总动静脉、双侧肾动静脉;打开胸腔,降主动脉留置针穿刺,结扎上腔静脉、升主动脉弓。经降主动脉动脉推注肝素30 U,PBS缓冲液灌注 0.5 h。迅速将已置管的大鼠-80℃冷冻至脱细胞时间,4℃条件下解冻,1% Triton X-100/0.1%氨水经降主动脉灌注8 h、DNA酶灌注2 h;ddH₂O 于4℃继续灌注24 h,流速1.5 ml/min,分离胃壁组织备用。

[0031] (3) 组织学评价

[0032] HE染色:所制备待测组织经4%多聚甲醛固定1 h,乙醇梯度脱水,石蜡包埋切片(5 μm),于70℃烘烤1h。经脱蜡后,依次苏木素染色,1%盐酸酒精分化,伊红染色;免疫组化:石蜡切片脱蜡脱水后,滴加0.05%胰酶,37℃恒温孵育,滴加3%H₂O₂溶液孵育以阻断内源性过氧化物酶,10%羊血清封闭内源性抗原。滴加一抗兔抗大鼠Collagen I、CollagenIV、Fibronectin、Fibulin-1、CK、Actin、α-smooth、CD31、NF-200(1:100,Santa Cruz Biotechnology,USA),4℃孵育过夜,加入二抗室温孵育2 h, DAB液显色;Masson三色染色:石蜡切片脱蜡脱水后,经苏木素染色,1%盐酸酒精分化,再用丽春红酸性品红液染色,1%磷钼酸水溶液处理后,亮绿染液复染。所有切片均用中性树胶封片,Olympus 显微镜镜检摄片。

[0033] (4) DNA和GAGs含量检测评价

[0034] 正常胃组织、水合胃脱细胞组织样本各30 mg,按照 DNA 含量提取试剂盒(TIANGEN 公司)要求说明操作;取10 mg剪碎碾磨,加入蛋白酶K 1 ml 56℃过夜,90℃静置10 min,按照GAGs试剂盒(ASSAY 公司)要求说明处理。专利所述胃生物补片,干重条件下DNA含量为39 ± 4.02 ng/mg,GAGs含量为89 ± 5.2 ng/mg。

[0035] (5) 超微结构观察评价

[0036] 取样品约 5×5×5 mm³置于2.5%戊二醛固定过夜,PBS 缓冲液冲洗,1%锇酸避光处理,梯度酒精脱水、包埋、切片,电镜(JEM-1230,JEOL)观察组织超微结构。

[0037] (6) 支架细胞毒性评价

[0038] 根据说明书要求使用细胞计数试剂盒8(CCK-8, Beyotime Institute of Biotechnology)评价支架浸提液毒性。0.1 g/ml 样品加入DMEM培养基制备支架浸提液,胃上皮细胞(GES-1)重悬并接种于96 孔板上,对照组加入新鲜DMEM,实验组加入浸提液100 μl,分别于0、24 h、48 h、72 h、96 h检测450 nm OD值。

[0039] (7) 胃穿孔模型制备及体内修补评价

[0040] 术前准备及麻醉同前,碘伏消毒上腹部皮肤,采用腹正中切口长约5 cm,择胃窦前壁无血管扇形区,切除部分胃壁,形成1 cm × 1 cm 的缺损区。采用4-0非可吸收线连续缝合将无菌补片封补缺损区,3-0非可吸收线关闭腹腔。术后当天置于有暖气设备的饲养室,保持室温26.0℃ - 30.0℃,避免术后低体温。所有动物于术后皮下注射给予5%葡萄糖10 ml,生理盐水10 ml,术后8 h禁水,48 h禁食。大鼠胃穿孔修补术后24 h行碘化油消化道造影,水合氯醛麻醉,分别经胃管注入0.5 ml碘化油,在5 min、10 min、15 min、30 min后在X线摄片机(DR)透视读片。

[0041] 需要指出的是,本实施例所述制备方法,还可用于制备新西兰大白兔、比格犬、小型猪等其他动物的胃脱细胞生物补片。

[0042] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

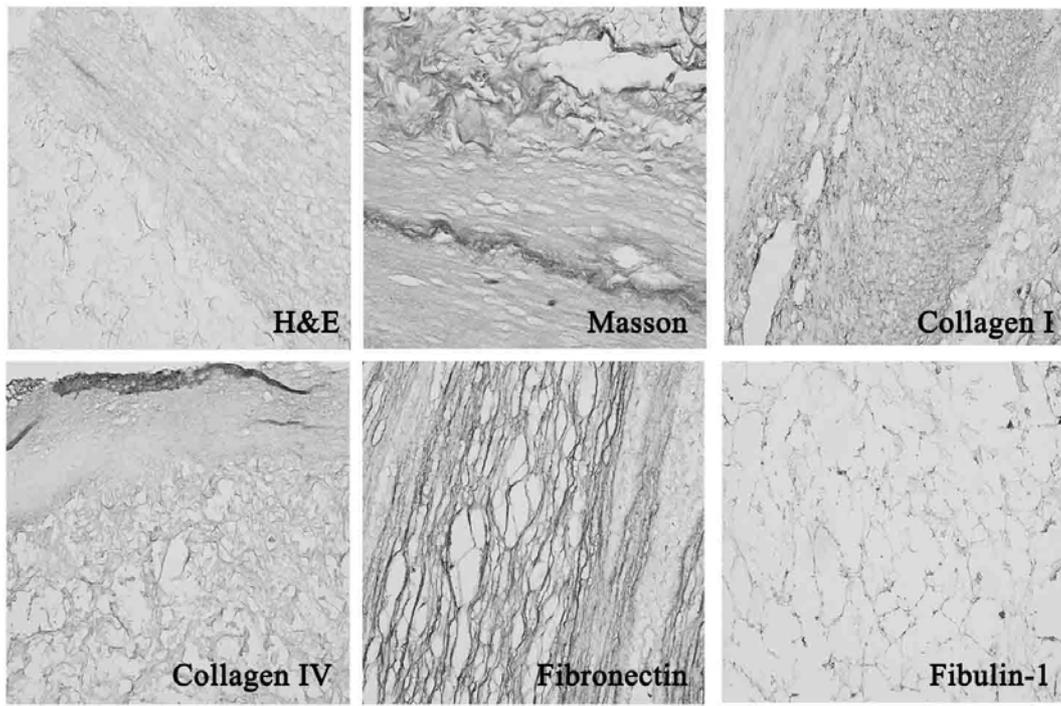


图1

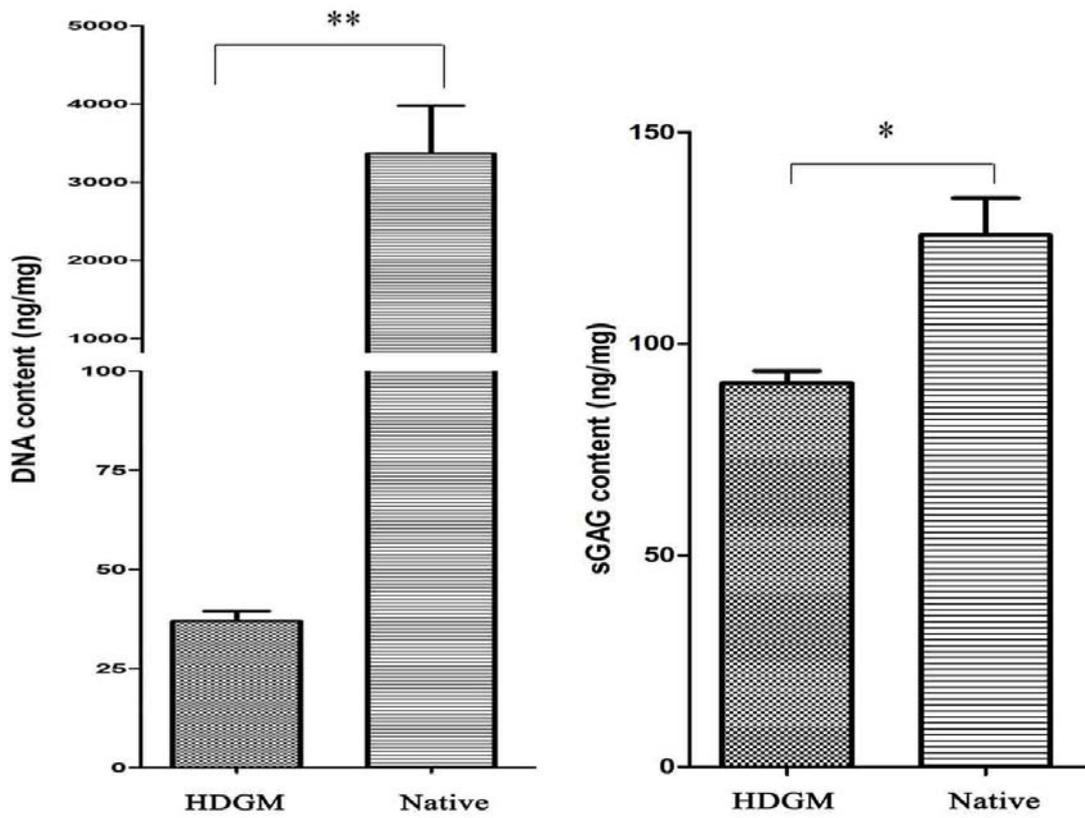


图2

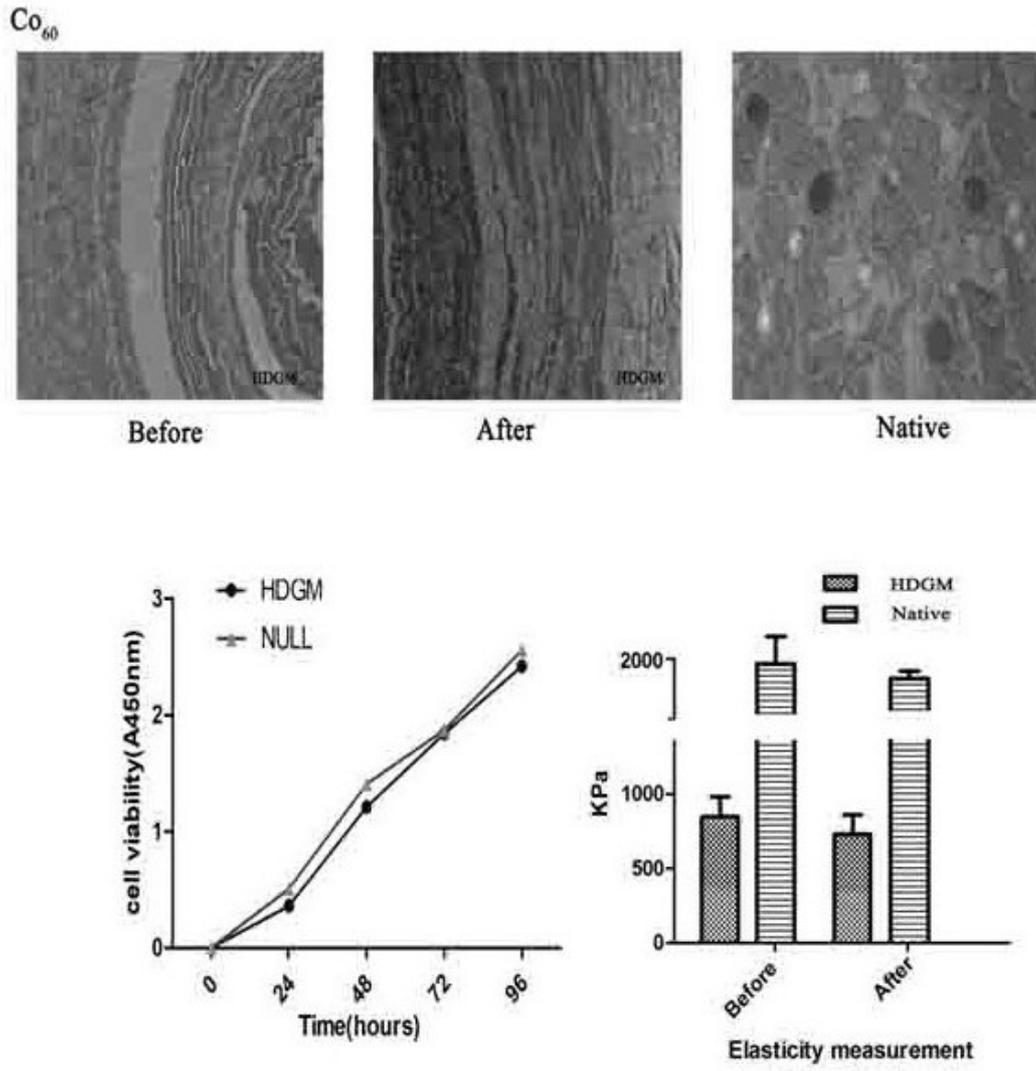


图3

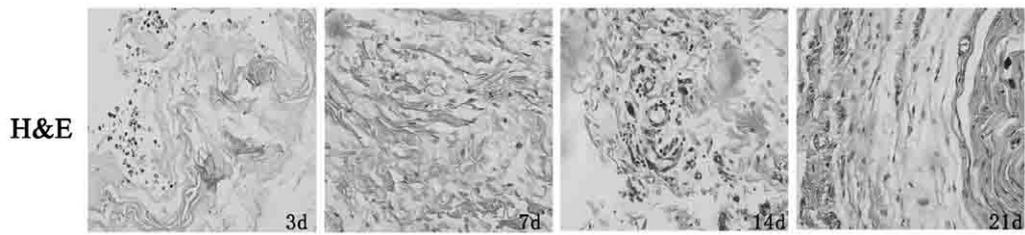


图4

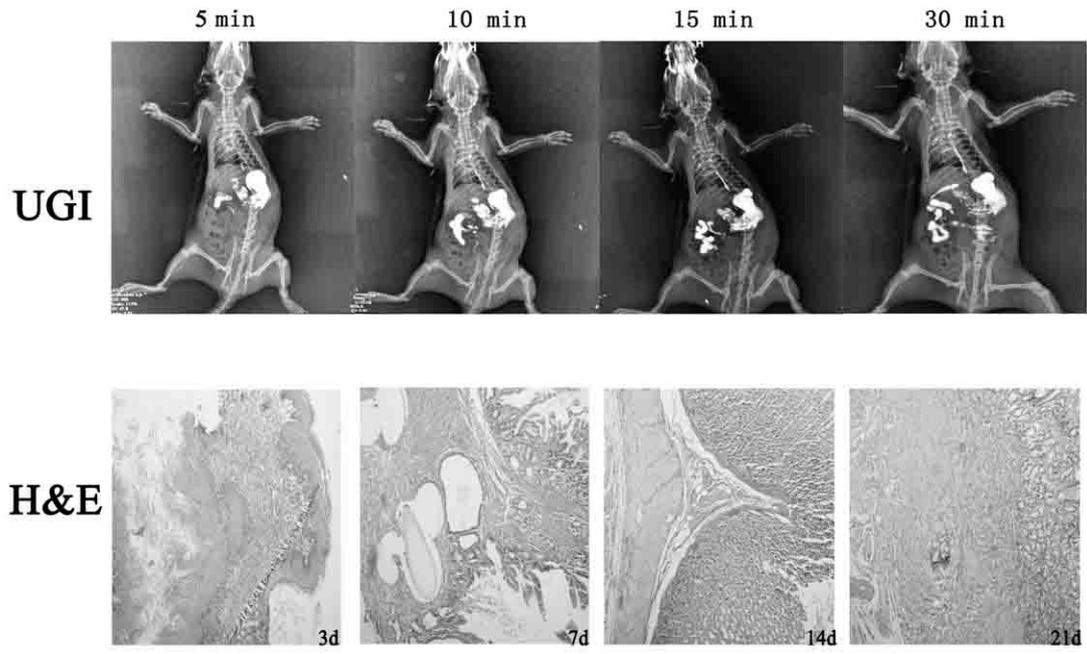


图5