

不同方法深低温保存兔肢体再植后血管组织的病理学变化

李波^{1,2}, 何建平³, 张树明², 朱泽兴², 乔林², 乔雅楠^{1,2} (¹辽宁医学院研究生学院, 辽宁省锦州市 121000; ²解放军第二炮兵总医院骨科, 北京市 100088; ³北京市平谷区人民医院, 北京市 101200)

文章亮点:

实验针对兔肢体深低温冷冻处理再植后血管进行研究, 经慢速冷冻-慢速复温处理的兔肢体再植后血管能保持通畅 6 h 而不发生血栓, 并且末梢血运良好, 大体观察结果优于慢速冷冻-快速复温组, 且再植成活率高, 证实了深低温处理过程中, 慢速冷冻-慢速复温较慢速冷冻-快速复温组对血管组织的影响小, 保存效果好。

关键词:

组织构建; 组织工程; 深低温处理; 断肢再植; 血管; 内皮细胞; 组织学

主题词:

低温保存; 后肢; 移植; 关节离断术; 血管; 内皮细胞

摘要

背景: 虽然对于单一组织的冷冻保存获得了空前的成果, 并且已逐渐应用于临床, 但是对于复合组织的冷冻保存及应用还鲜有研究。

目的: 通过实验研究深低温冷冻不同复温方法下兔肢体再植后血管形态学变化, 找出一种对复合组织中血管损伤最小的复温方法, 从而为深低温处理后断肢再植可行性提供理论依据。

方法: 30 只健康新西兰大白兔随机数字表法均分为对照组、慢速冷冻-慢速复温组、慢速冷冻-快速复温组, 均给予大白兔右后肢自膝上 1 cm 处离断。慢速冷冻两组复温后均行断肢再植, 再植肢体成活 6 h 后给予再次离断右后下肢。3 组兔断肢均取股血管组织采用染色光镜及电镜进行形态学观察及大体观察, 光镜病理计分结果用显著性分析。

结果与结论: 慢速冷冻-慢速复温组、慢速冷冻-快速复温组兔肢体再植 6 h 后的病理变化(大体标本、光镜、电镜)均较对照组差, 但慢速冷冻-慢速复温组与慢速冷冻-快速复温组相比血管内皮细胞完整性较好, 细胞器破坏较少。证实, 经过深低温冷冻-复温处理后兔断肢再植 6 h, 离断肢体血管组织能保持一定的结构完整性, 再植后 6 h 兔肢体获得成活, 且慢速冷冻-慢速复温组更为适合离断肢体的保存, 为深低温处理后离断肢体行断肢再植远期成活可行性提供了依据。

李波, 何建平, 张树明, 朱泽兴, 乔林, 乔雅楠. 不同方法深低温保存兔肢体再植后血管组织的病理学变化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15):2357-2362.

Pathological changes of vascular tissue after rabbit limb replantation with different methods of cryopreservation

Li Bo^{1,2}, He Jian-ping³, Zhang Shu-ming², Zhu Ze-xing², Qiao Lin², Qiao Ya-nan^{1,2} (¹Graduate School, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Orthopedics, the Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing 100088, China; ³Pinggu District People's Hospital, Beijing 101200, China)

Abstract

BACKGROUND: The cryopreservation of single tissue has achieved great advancement and is gradually applied in clinics. However, the cryopreservation of complex tissue is rarely reported.

OBJECTIVE: To investigate the morphological change in rabbit limb tissue after replantation through different rewarming methods, find the best rewarming methods of compound textured blood vessels, and provide theoretical basis for the feasibility of limb replantation after long-term cryopreservation.

METHODS: Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into control group, slow freezing-slow thawing group, and slow freezing-rapid thawing group. The right posterior limbs of all the rabbits were cut off 1 cm above the knee joint. Except control group, the latter two groups were given limb replantation after thawing, and then the right posterior limb was again cut off after the replanted limbs were survived for 6 hours. For all groups, the histological changes and gross observation in aorta tissue were observed by light microscopy and transmission electron microscope, and the results were analyzed with statistical methods.

RESULTS AND CONCLUSION: In the slow freezing-slow thawing, slow freezing-rapid thawing groups, the pathological changes (gross specimen, light microscope, electron microscope) of rabbit limbs 6 hours after replantation were worse than those in control group. Compared with slow freezing-rapid thawing group, better integrity of endothelial cells and less damage of the organelles were found in slow freezing-slow thawing group. Through deep cryogenic freezing-thawing process, rabbit limb blood vessels can maintain the structural integrity

李波, 男, 1986 年生, 内蒙古自治区包头市人, 汉族, 辽宁医学院在读硕士。

通讯作者: 张树明, 男, 汉族, 教授、硕士生导师, 解放军第二炮兵总医院骨科, 北京市 100088

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.15.011
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)15-02357-06
稿件接受: 2014-02-06

Li Bo, Studying for master's degree, Graduate School, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; Department of Orthopedics, the Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing 100088, China

Corresponding author: Zhang Shu-ming, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, the Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing 100088, China

Accepted: 2014-02-06

after replantation and survived at 6 hours. Slow freezing-slow thawing is better than slow freezing-rapid thawing for the preservation of severed limbs, providing evidences for the long-term survival following a deep cryogenic treatment after the severed limb replantation.

Subject headings: cryopreservation; hindlimb; transplantation; disarticulation; blood vessels; endothelial cells

Li B, He JP, Zhang SM, Zhu ZX, Qiao L, Qiao YN. Pathological changes of vascular tissue after rabbit limb replantation with different methods of cryopreservation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(15):2357-2362.

0 引言 Introduction

近年来, 低温医学已成为组织再生研究的热点, 低温可以有效降低细胞代谢, 减少细胞能量需求, 从而保证保存组织细胞的活性, 使得组织保存完整, 在给予一定条件复温后组织可以迅速恢复到冻存前状态, 以便应用于临床^[1]。人们采用的低温保存方法已经得到了广泛地应用。如: 保存哺乳动物的细胞, 包括血液细胞、动物胚胎和人的胚胎等, 低温保存技术与普通的保存方法不同, 其技术的关键是^[2-3]: ①降温迅速, 待升温后, 组织仍能恢复活性。②采用低温而不是冷冻, 这样可以防止组织细胞内形成冰冻结晶。为了克服低温保存技术中所存在的溶液浓度高及压力过大问题, 研究人员正在力求寻找一种在工作大气压力下使用的低温保存剂, 或争取找到最为理想的, 不需要使用压力的保存剂。

自上世纪开始国内外许多学者经过大量动物细胞和组织的基础实验研究, 不断探索各科细胞组织的冻存方法, 采用了多种多样的冻存技术^[4-5]。范学敏等^[6]分别采用玻璃化冻存法、程序性降温法及梯度降温法对兔关节软骨细胞进行低温保存, 通过流式细胞仪计数及阿尔新蓝染色等方法了解复苏后软骨细胞的存活率、凋亡率及生物活性。结果表明玻璃化冻存法较传统的保存方法能显著提高冷冻保存后兔关节软骨细胞的存活率, 并能维持细胞的生物活性, 是一种理想的软骨细胞低温保存方法。尹叶锋等^[7]将离段肢体置于体外模拟体内生理环境分别于4, 10, 18 °C低温下体外培养断肢, 探讨不同温度对体外模拟体内生理环境培养断肢系统的影响, 结果认为在体外模拟体内生理环境培养断肢系统中, 温度对断肢的保存具有重要作用, 其中10 °C保存离断肢体可显著抑制再灌注致骨骼肌细胞损伤。马亚红等^[8]以SD大鼠的肾、皮肤、肝脏、大脑皮质、心脏和肌肉为研究对象, 在对其进行慢速冻结的过程中施加外电场, 研究了电场对生物组织低温保存介电特性的影响。结果表明不同条件下6种离体生物组织的阻抗均随着频率的升高而减小, 介质损耗因数随着频率的升高先增大后减小; 在相同频率下, 电冷冻保存的阻抗和介质损耗因数介于刚离体新鲜组织与直接冷冻保存的阻抗和介质损耗因数之间。阻抗越大, 损耗越低, 组织新鲜度和完整性越高, 说明电冷冻保存离体组织的新鲜度和完整性比直接冷冻有不同程度的提高。

虽然对于单一组织的冷冻保存获得了空前的成果,

并且已逐渐应用于临床, 但是对于复合组织的冷冻保存及应用还鲜有研究^[9]。实验通过对兔离断后肢经不同的冷冻-复温方法处理后进行再植, 观察肢体成活情况及血管病理变化, 从而评估肢体保存活性, 寻找最优保存方法, 为断肢经深低温保存后再植提供理论依据, 并且既往研究发现深低温处理亦可降低组织免疫活性, 为建立肢体库提供理论依据, 最终将异体移植应用于临床, 解决病患痛苦。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物实验, 病理学观察。

时间及地点: 于2012年9月至2013年10月在北京农学会会员动物实验室、第二炮兵总医院骨科中心及病理科实验室完成。

材料:

实验动物: 健康新西兰大白兔30只, 雌雄不限, 体质量为2.5-3.0 kg, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(京)2011-0006, 饲养环境清洁, 实验中对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[10]。

方法:

动物分组及干预: 健康新西兰大白兔30只, 随机数字表法均分为对照组、慢速冷冻-慢速复温组、慢速冷冻-快速复温组。对照组兔肢体离断后迅速切取股血管组织块, 制作切片行形态学观察; 慢速冷冻两组用二甲亚砷灌注, 洗脱液洗脱, 经过梯度化慢速冷冻处理后, 慢速冷冻-慢速复温组行慢速复温、慢速冷冻-快速复温组行快速复温后再植, 再植通血6 h后离断肢体, 再依照对照组断肢处理方法进行相应指标检测并与之对比。对照组大白兔截取右后断肢后给予行残端修整, 所有实验组截取右后断肢后行简单止血处理, 待再植成活6 h后取材并处死实验动物。

冷冻复温的过程: ①慢速冷冻-慢速复温方法: 将处理后的断肢放入-20 °C冰箱冷冻60 min, 然后将其缓慢放入液氮罐液-气交界部位30 min, 再将其完全没入液氮冷冻30 min。复温时先将离断肢体取出置入-20 °C冰箱60 min, 然后将其置入空气中(室温20 °C)30 min, 再将其置入电热恒温水浴箱(37 °C)10 min。②慢速冷冻快速复温方法: 将处理后的断肢放入-20 °C冰箱冷冻60 min, 然后将其缓慢放入液氮罐液-气交界部位30 min, 再将其完全没入

液氮冷冻30 min。复温时将断肢体取出迅速置入电热恒温水箱(37℃)10 min。

苏木精-伊红染色病理切片的制作: 将留取标本(新西兰大白兔右后侧离断肢体)进行甲醛溶液固定24 h, 切取股血管(长约1 cm), 常规乙醇脱水, 经二甲苯透明, 浸蜡、包埋, 制作蜡块、切片、贴片、脱蜡备用。经苏木精-伊红相继染色后, 再经脱水、透明, 中性树胶封固, 晾干后标记并保存切片。

透射电镜切片制作: 将留取标本, 新西兰大白兔右后侧离断肢体切取股血管(长约1 mm), 3%戊二醛和1%四氧化锇固定, 送电镜室脱水、包埋、染色、切片、透射电镜观察血管超微结构和内皮细胞变化, 制作完成后标记切片。

观察指标及标准: 苏木精-伊红染色病理切片由病理科医师采用盲法观察, 结果以病理计分评价: 无病理改变记为0分: 内皮细胞连续, 排列规则有序, 内皮下层、内弹力膜及平滑肌细胞结构基本正常, 轻度病理改变记为1分: 可见内皮细胞存在点状脱落, 结构排列尚可, 内皮下层、内弹力膜及平滑肌细胞结构良好, 血管整体结构良好; 中度病理改变记为2分: 可见内皮细胞存在片状脱落, 内皮细胞与弹力内膜间较多空隙, 部分内皮细胞排列欠规则, 内弹力膜偶见断裂, 血管整体结构尚可; 重度病理改变记为3分: 内皮细胞大量剥脱, 结构紊乱, 可见弹力内膜断裂, 平滑肌细胞损伤, 血管结构欠佳, 偶见断裂。电镜切片制作完成后在透射电镜下观察内皮结构的完整性, 血管内弹力膜、平滑肌的病理改变及细胞内线粒体变化情况, 并进行3组形态学变化进行对比。

统计学分析: 苏木精-伊红染色切片病理计分分级数据, 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析, 应用Kruskal-Wallis H秩和检验方法进行多组独立样本比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 进一步行独立样本间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验兔30只, 断肢标本数为30个, 实验过程中无脱落, 均纳入结果分析。

2.2 大体观察 慢速冷冻-慢速复温组: 血管较冷冻-复温处理前管径略增粗, 管壁结构完整, 无分层及血栓形成, 通血后肢体轻度水肿, 末梢血运良好; 慢速冷冻-快速复温组: 2例血管结构紊乱, 管腔塌陷, 修剪外膜后管壁结构欠佳, 未能完成再植, 3例出现管腔分层现象, 余血管均较冷冻-复温处理前管径增粗, 管壁结构尚完整, 无分层及血栓形成, 通血后肢体水肿明显, 末梢血运尚可。

2.3 苏木精-伊红染色病理切片组织学变化(表1) 对照组: 内皮细胞连续性好, 排列规则有序, 内皮下层内弹力膜结构正常, 中层平滑肌细胞核清晰, 结构正常, 个别出现内皮细胞点状脱落, 余结构正常(图1A); 慢速冷冻-慢速复温组: 内皮细胞存在少量脱落, 部分内皮细胞排列欠规则, 偶见内弹力膜断裂, 平滑肌细胞结构良好, 血管整体结构良好(图1B); 慢速冷冻-快速复温组: 内皮细胞片状脱落, 内皮层与内皮下层可见多处空隙, 内弹力膜、中层平滑肌偶见断裂, 管壁结构欠佳(图1C)。

表1 苏木精-伊红染色组织病理变化计分

病理标本编号	对照组	慢速冷冻-慢速复温组	速冷冻-快速复温组
1	0	1	2
2	0	2	c
3	0	1	2
4	0	0	3
5	0	2	2
6	1	2	3
7	0	2	2
8	0	1	-
9	1	2	2
10	0	1	2

表注: -表示再植失败。

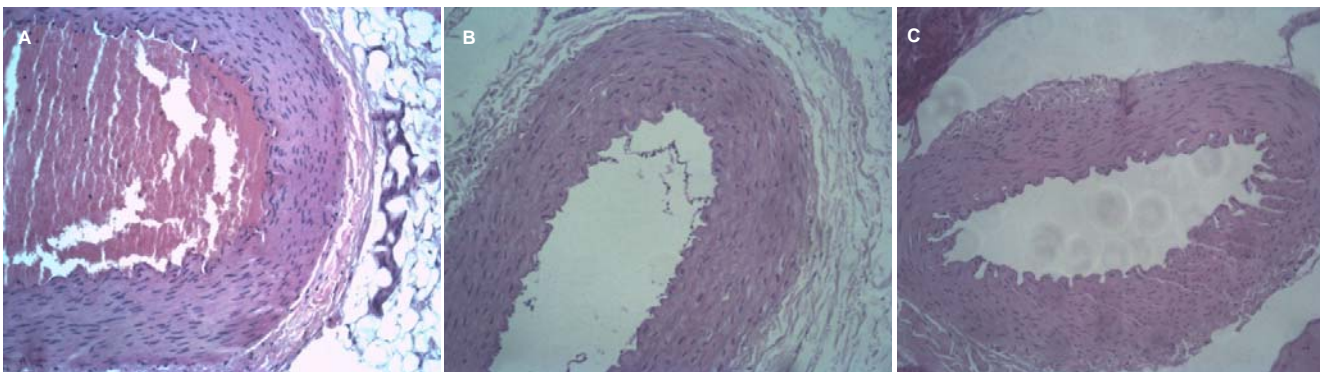


图1 经深低温保存后兔肢体再植后血管组织病理切片组织光镜观察(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 1 Light microscope observation of blood pathological sections in three groups after rabbit limb replantation (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注: 图中A为对照组: 内皮细胞、内弹力膜及平滑肌层均结构完整; B为慢速冷冻-慢速复温组: 内皮细胞部分脱落, 排列欠规则, 内皮下层、内弹力膜及平滑肌细胞结构良好; C为慢速冷冻-快速复温组: 内皮细胞完全脱落, 内弹力膜及中膜可见断裂, 平滑肌细胞结构排列欠佳。

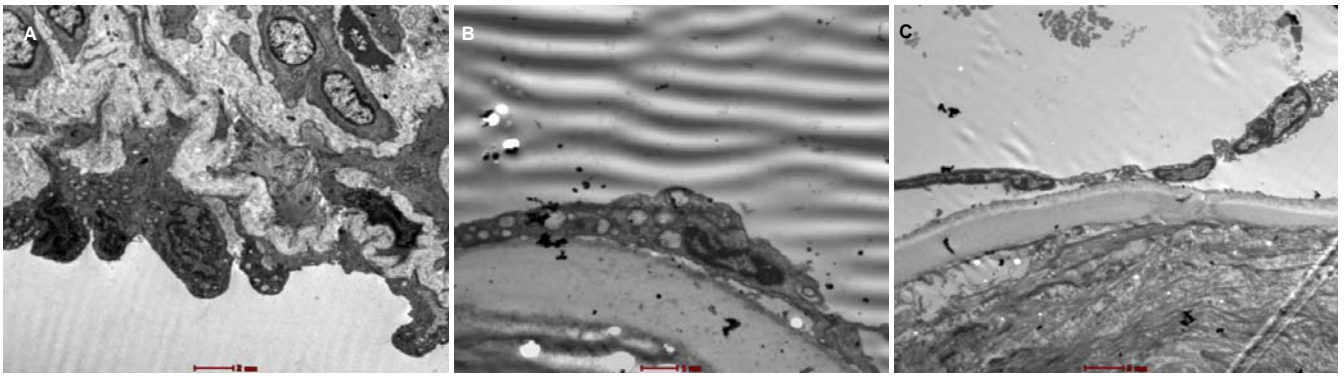


图2 经深低温保存后兔肢体再植后血管组织病理切片组织学电镜观察(苏木精-伊红染色, $\times 4\ 200$)

Figure 2 Electron microscope observation of blood pathological sections in three groups after rabbit limb replantation (hematoxylin-eosin staining, $\times 4\ 200$)

图注: 图中 A 为对照组: 内皮结构完整, 细胞间连接完好, 内弹力膜连续, 细器形态良好, 细胞核结构清晰, 无皱缩; B 为慢速冷冻-慢速复温组: 内皮细胞结构欠佳, 细胞皱缩, 细胞器结构紊乱, 少部分空泡化, 细胞间连接消失, 与内弹力膜间产生空隙, 部分脱离, 甚至脱落于管腔内; C 为慢速冷冻-快速复温组: 内皮细胞大量脱落, 结构欠完整, 内弹力膜连续欠完整, 线粒体肿胀, 嵴消失, 部分空泡化。

光镜结果进行统计学分析, 应用Kruskal-Wallis *H*秩和检验方法进行多组独立样本的比较, 差异有显著性意义 ($P=0.000$), 3组血管组织结构存在差异, 进一步行独立样本之间的多重比较, 对照组与慢速冷冻-慢速复温组比较, 差异有显著性意义 ($P=0.001$), 对照组与慢速冷冻-快速复温组比较, 差异有显著性意义 ($P=0.000$), 两慢性冷冻组比较, 差异有显著性意义 ($P=0.011$)。

2.4 电镜切片组织学变化 对照组: 内皮细胞结构完好, 细胞器形态良好, 细胞核结构清晰, 无皱缩, 细胞连接完好, 与弹力内膜附着紧密(图2A); 慢速冷冻-慢速复温组: 内皮细胞部分脱落, 结构欠完整, 细胞轻度肿胀, 内弹力膜连续性欠完整, 部分线粒体肿胀, 嵴紊乱, 少部分空泡化(图2B); 慢速冷冻-快速复温组: 内皮细胞大量脱落, 结构欠完整, 内弹力膜连续性部分中断, 线粒体肿胀, 嵴消失, 空泡化(图2C)。

3 讨论 Discussion

随着医学的发展, 很多时候患者各种原因导致肢(指)体离断后被迫截肢不是由于医疗技术的原因, 而是由于种种客观原因导致暂时不具备再植条件, 例如患者身体状况不具备断肢再植条件、心理原因(自残患者不接受暂时的心理波动因素)、经济原因。但当患者克服种种因素后想要再获得手术的机会时, 离断肢(指)体已经坏死, 不具备生物活性, 因为离开生物体的组织细胞, 由于营养物质、代谢底物及氧供应减少, 导致细胞结构损伤, 从而引起细胞的功能障碍^[11]。因此如何长期保存离断肢体不受损坏并保持其生物活性, 在给予一定条件后可以重新恢复原有活性成为需要攻克的一个问题。

随着上世纪50年代初, 英国学者Smith和Polge首次成功进行了牛精液的冷冻保存, 从而显著推动了低温医学的发展, 经过半个多世纪的研究, 学者们通过反复实验, 不断摸索, 目前对于单一组织的冷冻保存已经有了较成熟的技

术, 如精子、卵巢、胚胎、皮肤、血管、骨、软骨、肌腱等, 在生物医学方面, 随着深低温冻存技术不断提高, 低温保存技术的应用越来越广泛, 如生殖医学, 干细胞研究, 外周血和脐血库及其他组织库等^[12]。

因此, 深低温保存已经广泛被学术界所认同可以长期保存生物组织。深低温能够长期保存组织生物活性的机制在于, 细胞所进行的一切新陈代谢均被低温所抑制, 使细胞的生长处于时间停止状态, 此时的细胞既不会凋亡, 也不会坏死, 使得组织的生命活性得以保存^[13]。

Mazur等^[14-15]首先从中国仓鼠组织培养细胞的低温保存实验数据分析中, 提出冷冻损伤的两因素假说, 即“冰晶损伤”和“溶液损伤”。研究表明, 细胞深低温保存过程中主要损伤为“冰晶损伤”, 在细胞进行低温冷冻时, 若降温速率过快, 则细胞内的水分没有足够的时间向细胞外转移, 低温使细胞内外水同时结冰从而形成冰晶, 冰晶的形成会对细胞产生机械性破坏作用从而导致细胞的损伤, 这就是冷冻保存过程中的冰晶损伤机制^[16]。参考物理学上的成核概念, 冰晶生长和溶质从冰格内的排出必须是协调的, 才能保证细胞或组织不发生致命的损伤, 提高复温后细胞存活率, 这在许多类型细胞和组织的深低温保存中已经得到证实^[17-19]。贾晓明等^[20]采用速冻玻璃化保存的皮肤复温后其活性程度达到了新鲜皮肤的70%左右。Decherchi等^[21]用玻璃化低温保存周围神经, 玻璃化后神经内的Schwann细胞保留了生物活性, 并且玻璃化保存的神经经过移植后有诱导轴突再生的作用。Song等^[22]研究显示, 玻璃化法保存的血管可以保留血管平滑肌细胞及血管内皮细胞的生物活性, 这种方法保存的血管拥有新鲜血管的80%以上的收缩功能, 并且对血管活性药物的敏感性与正常血管类似。Meltendorf等^[23]采用特制的冻存容器, 用玻璃化法保存角膜组织, 并且成功实现了玻璃化, 冷冻后的角膜组织内没有明显的冰晶产生, 较好的保存了组织形态没有发生裂纹的现象。然而肢(指)体作为复合组织具有较单一组织更复

杂的结构, 复合组织由多种细胞和组织类型, 如皮肤、结缔组织、脂肪和血管, 其中每一成分可能有不同的最佳冷冻参数甚至是相反参数, 如热胀系数、比热容、弹性模量、泊松比和屈服力等的差别, 也是引起组织损伤的不可忽视的因素^[24]。既往研究发现, 慢速冷冻-慢速复温对复合组织血管损伤最小^[25-26], 考虑可能由于冷冻-复温温度的梯度变化, 从而减少了细胞发生的微断裂。Bellón等^[27]发现快速复温较慢速复温更容易出现血管表面及内膜的断裂现象。王沛涛等^[28]通过对兔颈总动脉采用不同方法复温, 结果认为缓慢复温能够改善深低温保存血管的力学特性。

并且临床中早有个案报道, 离断指体冰冻保存15 h后再植成活^[29], 另外2004年王增涛等^[30]报道了将1例离断手指在-196℃液氮中保存81 d后再植成功, 并且Cui等^[21]对路易鼠腹部皮瓣进行深低温冷冻后再植获得成活, 种种迹象表明即使复合组织冷冻损伤机制复杂, 只要继续孜孜不倦的研究下去, 必然会找到一个深低温处理的参数契合点, 从而使组织内各种细胞达到最优保存状态, 使组织能够保持活性, 从而完成最终完美的修复。

血管作为断肢再植关键所在, 因此也是研究的重点, 实验针对兔肢体深低温冷冻处理再植后血管进行研究, 经慢速冷冻-慢速复温处理的兔肢体再植后血管能保持通畅6 h而不发生血栓, 并且末梢血运良好, 大体观察结果优于慢速冷冻-快速复温组, 且再植成活率高, 证实了深低温处理过程中, 慢速冷冻-慢速复温较慢速冷冻-快速复温组对血管组织的影响小, 保存效果好, 张保等^[32]实验研究显示慢速降温速率为-1℃/min时的血管活性最大, 降温速率为-0.5℃/min时血管活性反而下降。王利红等^[33]通过程序化慢速冷冻法较好地保存了人卵巢皮质中的原始卵泡, 且在卵巢组织移植后激素分泌没有受到影响。然而两组肢体再植后远端均发生不同程度肿胀, 考虑远端微循环均有损伤可能, 但随着时间推移两组肿胀逐渐消除, 说明损伤具有可逆性可能, 在给予一定条件下, 有望获得修复。实验中慢速冷冻-慢速复温组、慢速冷冻-快速复温组经深低温处理后血管内皮细胞存在不同程度的损伤, 但是经统计分析发现慢速冷冻-慢速复温组内皮细胞、内弹力膜及平滑肌细胞结构保存明显较慢速冷冻-快速复温组好 ($P < 0.05$), 说明经慢速冷冻-慢速复温后血管内皮虽然存在损伤, 但较慢速冷冻-快速复温组保存效果好。电镜观察亦发现慢速冷冻-慢速复温组较慢速冷冻-快速复温组保存好。顾玉东等^[34]研究发现, 内皮细胞损伤血管吻合后1 h易导致血小板血栓形成, 移植后24 h内形成混合血栓可能性大。实验过程中, 慢速冷冻-慢速复温组4号白兔经深低温冷冻再植后肢体病理切片显示血管保存良好, 无明显的内皮脱落且内弹力膜及平滑肌细胞保存好, 考虑4号白兔血管条件好, 再植手术时间短, 肢体热缺血时间短相关, 余肢体经冷冻复温再植后均存在不同程度损伤, 因此亦不能

排除缺血再灌注等二次损伤可能, 在手术过程中, 实验应尽可能缩短手术时间, 并在通血前保持肢体处于低温状态, 减少组织细胞无氧耗能, 降低细胞内钙的积聚, 最终降低缺血再灌注等二次损伤。

综上所述, 深低温冷冻保存复合组织进行再植将成为可能, 在对血管组织损伤程度进行研究的同时也将进一步研究深低温冷冻后神经、肌肉、皮肤等组织的病理变化情况, 对肢体整体成活提供理论依据。另外Wingenfeld等^[35]认为深低温保存亦可选择性的抑制同种异体抗原提呈细胞, 从而显著降低组织的抗原性, 并且血管、肌腱、骨经深低温保存已应用于临床^[36-38], 证实经深低温冷冻处理后组织的免疫原性较前明显减低, 神经、皮肤虽未在临床上广泛应用, 但亦证实了深低温冷冻可有效的选择性杀灭抗原提呈细胞, 降低组织免疫原性^[39-40]。组织、器官深低温保存成功或肢体库的建立具有很重要的意义: ①可以大量库存细胞和组织, 便于对供者和受者的组织相关性抗原进行鉴定, 完成组织配型。②便于各个保存部门或机构之间进行各种用途的细胞及组织的长途调配。③在移植之前, 有足够的时间对供者进行传染性病原体的检测, 保证细胞及组织应用的安全性, 避免医源性传播(例如HIV)。④临床上肢(指)体离断如伴有重要脏器损伤时, 为抢救生命而暂时放弃再植, 以及因心理、经济或社会等原因而暂时不能再植等, 肢体深低温保存成功, 将会挽救很多患者离断肢体^[41]。并且深低温处理亦可有效降低复合组织免疫源性^[42], 为肢体异体移植开创新的途径, 建立肢体库, 解决肢体缺损患者的痛苦, 这将成为最终的研究目标。

致谢: 感谢解放军第二炮兵总医院病理科在本次试验病理标本及切片的制作方面给予的帮助, 还有北京农学院动物实验室给予的大力支持。

作者贡献: 李波和何建平负责整个实验的设计、实施和数据统计。张树明和乔林为本实验的设计及技术指导。经通讯作者张树明修改审校, 李波对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 深低温保存-指将生物、生命组织、或细胞或其他物质在零度以下的低温保存的一种科技。一般来说, 深低温保存是指指在低于-196℃/77 K(即液态氮的熔点)的低温下保存生物材料或物质。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] De Santis L, Cino I, Rabellotti E, et al. Oocyte cryopreservation: clinical outcome of slow-cooling protocols differing in sucrose concentration. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(1):57-63.

- [2] Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, et al. Local hypothermiaduring early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia reper-fusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(1):242-250.
- [3] Buchanan S, Gross SA, Acker JP, et al. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells Dev.* 2004;13(3): 295-305.
- [4] 梁琳琳,刘玉青,李杭生,等. 玻璃化冷冻胚胎出生小鼠卵巢发育情况及卵巢组织中生长分化因子9的表达[J]. *中华妇产科杂志*, 2012,47(9):676-680
- [5] 李正民,宫瑾瑾. 人脐带间充质干细胞不同冻存方法探讨[J]. *国际检验医学杂志*,2012,33(12):1414-1416.
- [6] 范学敏,李鹏翠,丁娟,等. 玻璃化冻存对兔关节软骨细胞存活率及代谢活性的影响[J]. *中国骨与关节损伤杂志*,2013,28(4): 336-338.
- [7] 尹叶锋,王江宁,高磊,等. 不同温度对外模拟体内生理环境寄养断肢系统的影响研究[J].*中国修复重建外科杂志*,2013,27(1): 72-76.
- [8] 马亚红,钟力生,胡慧玉. 电场对低温保存生物组织介电特性影响的研究[J].*绝缘材料*,2012,46(5):49-52.
- [9] 王江宁,尹叶锋,高磊,等.不同氧体积分数气体对外模拟体内生理环境寄养断肢系统血氧分压的影响[J].*中国组织工程研究*, 2012,16(5):855-858.
- [10] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.*2006-09-30.
- [11] 夏穗生. *临床移植医学*[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1999:95.
- [12] Axelsson S, Faresjö M, Hedman M, et al. Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells are suitable for the assessment of immunological markers in type 1 diabetic children. *Cryobiology.* 2008;57(3):201-208.
- [13] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984;247(3 Pt 1):C125-142.
- [14] Fuller B,Paynter S.Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(6): 680-691.
- [15] Hernandez M,Ekwall E,Roca J,et al.Cryo-scanning electron microscopy(Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology.* 2007;54(1):63-70.
- [16] Brien FJ, Harley, Yannas IV, et al. Influence of freezing rate on pore structure in freeze dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials.* 2004;25(6):1077-1086.
- [17] Fuller B,Paynter S.Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine.*Reprod Biomed Online.*2004; 9(6): 650-691.
- [18] Younis AI,Tover M,Albertini DF,et al.Cryobiology of non-human primate oocytes. *Hum Reprod.* 1996;11(1): 156-165.
- [19] Gao DY,Chang Q,Lin C,et al.Fundamental cryobiology of human hematopoietic progeuitor cells.Usmotic characteristicsand volume distribution. *Cryobiology.* 1998; 36(1):40-48.
- [20] 贾晓明,柴家科,纪晓峰,等.速冻玻璃化储存异体皮的临床应用[J].*军医进修学院学报*,2001,22(1)1-14.
- [21] Decherchi P, Lammari-Barreault N, Cochard P, et al. CNS axonal regeneration with peripheral nerve grafts cryopreserved by vitrification: cytological and functional aspects. *Cryobiology.* 1997;34(3):214-239.
- [22] Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot F, et al. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol.* 2000;18(3):296-299.
- [23] Meltendorf C, Hinch DK, Hoffmann F. Vitrification of posterior corneal lamellae. *Cryobiology.* 2002;44(2):170-178.
- [24] 徐红艳,华泽钊,鲁亚南,等.血管低温保存降温过程对裂纹产生影响的实验研究[J].*低温工程*,2000,21(1):22-26.
- [25] 刘元新,张树明,乔林,等.快速冷冻与慢速冷冻条件下复合组织血管内皮的生物活性[J].*中国组织工程研究*,2012,16(20): 3659-3662.
- [26] 霍海涛,张树明,朱泽兴,等.不同复温方法对深低温冷冻复合组织血管活性的影响[J].*中国医学工程*,2012,20(5):26-27.
- [27] Bellón JM, Gimeno MJ, Pascual G, et al. Arterial damage induced by cryopreservation is irreversible following organ culture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;17(2):136-143.
- [28] 王沛涛,刘海宁,舒志全,等.体外培养后深低温保存兔颈总动脉结构和力学性能[J].*齐鲁医学杂志*,2005,20(1):13.
- [29] 孙波,牟宇科.离断指体冰冻保存后再植成活1例[J].*中国实用手外科杂志*,2000,14(3):136.
- [30] 王增涛,王春霞,朱磊等.深低温保存81天断指再植1例[J].*山东医药*,2004,44(3):29.
- [31] Cui X, Gao DY, Fink BF, et al. Cryopreservation of composite tissues and transplantation: preliminary studies. *Cryobiology.* 2007;55(3):295-304.
- [32] 张保,卜海富,桂斌捷,等.降温速率对程序化降低温保存动脉的影响[J].*安徽医科大学学报*,2008,43(2):132-134.
- [33] 王利红,陈子江,高选.人卵巢组织冷冻保存的实验研究[J].*现代妇产科进展*,2005,14(1):16-19.
- [34] 顾玉东,李继峰,姜继福,等.血管内皮细胞愈合机制探讨[J].*中华显微外科杂志*,1989,12(4):220-222.
- [35] Wingenfeld C, Egli RJ, Hempfing A, et al. Cryopreservation ofost eochondralal lografts:dimethyl sulf oxide promot esan giogenesis and im munetol erance in mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(8):1420-1429.
- [36] 张友乐,王澍寰,尹大庆,等. 异体动脉移植临床应用的中远期随访[J]. *中华手外科杂志*,2003,19(3):184-185.
- [37] 战杰,田立杰,许杨,等.深低温冷冻同种异体肌腱移植的远期疗效观察[J].*实用手外科杂志*,2002,16(1):47-48.
- [38] 何波涌,王朝晖,成明华,等.深低温冷冻同种异体骨移植修复骨缺损45例[J].*中国骨与关节损伤杂志*,2009,24(2):185-186.
- [39] 瞿玉兴,董天花,张志霖,等.超低温冷冻保存后同种异体神经移植的实验研究[J].*中华手外科杂志*,2002,18(1):59-62.
- [40] 贾晓明,柴家科,纪晓峰,等.速冻玻璃化储存异体皮的临床应用[J].*军医进修学院学报*,2001,22(1):14-16.
- [41] 段永壮.深低温冷冻大鼠肢体缺血再灌注损伤及依达拉奉干预的实验研究[D].*南方医科大学*,2007.
- [42] 莫家栋,宋建榕,李建东,等.低温灌注、深低温冷冻对同种异体肢体移植排斥反应的影响[J].*福建医科大学学报*,2006,40(4):373-377.