

## 超冷器官保存技术及应用

卢强 张炜 杨丽斐 吕毅

**【摘要】** 在器官移植手术中,器官保存的主要目的是保持离体器官内部组织细胞的活性,为器官转运及分配、受者术前评估以及手术团队准备赢得时间。器官保存的主要方法可分为常温机械灌注保存和低温保存。其中低温保存是目前临床上最为常用的器官保存方法,但在低温保存状态下,组织细胞内部仍存在代谢活动,这导致器官的长时间保存极为困难。超冷器官保存技术是一种新型的低温器官保存技术,极大地延长了器官的保存时间,未来有望成为器官保存的重要手段,为“器官库”的建立提供技术支持。

**【关键词】** 器官移植;器官保存;超冷器官保存;静态冷保存;细胞代谢;常温机械灌注;亚低温机械灌注;低温机械灌注

**【中图分类号】** R617 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2020)05-0002-04

**Supercooling organ preservation technology and its application** Lu Qiang\*, Zhang Wei, Yang Lifei, Lyu Yi. \*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Lyu Yi, Email: luyi169@126.com

**【Abstract】** The main purpose of organ preservation in organ transplantation is to maintain tissue and cell activity of donor organs so as to gain time for allocation and transportation of the organ, preparation of the recipient and organization of staff and facilities. The main principles of organ preservation can be divided into normothermic mechanical perfusion and cryopreservation. Cryopreservation is the favourite organ preservation method in clinical practice currently. However, the metabolic activity still exists in donor organs preserved with current cryopreservation technique, which makes the long-term preservation of organs extremely difficult. The supercooling organ preservation is a new type of cryopreservation technology, which greatly prolongs the preservation time of organs. It is expected to become an important organ preservation technique in the future, and it will provide technical support for the establishment of "organ bank".

**【Key words】** Organ transplantation; Organ preservation; Supercooling organ preservation; Static cold storage; Cell metabolism; Normothermic machine perfusion; Subnormothermic machine perfusion; Hypothermic machine perfusion



**作者简介:** 吕毅,主任医师、教授、博士研究生导师,教育部创新团队学科带头人,享受国务院特殊津贴。现任西安交通大学校长助理、医学部副主任、先进外科技术与工程研究所所长,西安交通大学第一附属医院肝胆病院副院长、精准外科与再生医学国家地方联合工程研究中心主任、陕西省再生医学与外科工程研究中心主任。兼任中华医学会外科学分会委员、外科手术学组副组长,中国研究型医院学会肝胆胰外科专业委员会副主任委员,中国医师协会外科医师分会常务委员、器官移植医师分会常务委员,中国抗癌协会理事、全国医学考试专家指导委员会临床医学专业副主任委员,中国康复技术转化及发展促进会智能康复技术专业常务委员等。兼任《临床医学研究与实践》主编,《中华肝脏外科手术学电子杂志》、《中华肝胆外科杂志》副总编辑,

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2020.05.002

基金项目: 教育部创新团队发展计划(IRT\_16R57)

作者单位: 710061 西安交通大学第一附属医院肝胆外科(卢强、吕毅); 精准外科与再生医学国家地方联合工程研究中心(卢强、张炜、杨丽斐、吕毅); 陕西省再生医学与外科工程研究中心(卢强、张炜、杨丽斐、吕毅)

作者简介: 卢强,男,1990年生,博士研究生,研究方向为肝移植,Email: thesurgeon@163.com

通信作者: 吕毅,Email: luyi169@126.com

《器官移植》杂志常务编委,《中华消化外科杂志》等杂志编委。作为第一完成人获国家科技进步二等奖 1 项,中华医学科技奖一等奖 1 项,陕西省科技技术一等奖 2 项,教育部技术发明一等奖 1 项,中国抗癌协会科技二等奖 1 项,陕西省教学成果一等奖 1 项,西安交通大学教学成果特等奖 1 项。主持教育部创新团队发展计划、国家自然科学基金重点项目等省部级项目 20 余项。主编或参编教材、专著 12 部,主译专著 3 部。发表学术论文 350 篇,其中 SCI 收录 85 篇。获得国家发明专利 30 项。主持、指导开展新医疗新技术 20 项。完成临床肝移植 500 例。获得全国五一劳动奖章、陕西省五四青年奖章,获得国家卫生部特殊贡献中青年专家、陕西省“三秦学者”、陕西省道德模范、西安市十佳创新人物等称号。

器官移植是目前治疗终末期器官衰竭的唯一有效手段<sup>[1-4]</sup>,而器官保存为器官转运和分配、受者术前评估、手术团队准备以及术中血管重建赢得了时间。器官保存的关键在于保持器官离体后内部组织细胞的活性,保证器官植入受者体内后可发挥正常功能。目前器官保存的方法可分为两大类:一种是将离体器官保存于常温状态下,通过机械灌注为器官内部组织细胞提供代谢所需氧气和部分营养成分<sup>[5]</sup>,如常温机械灌注(normothermic machine perfusion, NMP)和亚低温机械灌注(subnormothermic machine perfusion, SNMP),但该方法不能完全模拟体内环境,限制了器官的长时间保存;另一种保存方式是将离体器官保存于低温状态(4℃)中,降低了细胞的代谢水平并保持了细胞内部多种酶的活性<sup>[6]</sup>,如静态冷保存(static cold storage, SCS)和低温机械灌注(hypothermic machine perfusion, HMP)。但是,器官组织在 4℃下仍存在部分代谢活动,使器官的长期保存变得十分困难,如肝脏的低温保存时间一般≤12 h,肾脏≤24 h。超冷器官保存技术是新近出现的一种新型器官保存技术,其通过技术手段将器官的保存温度降低至冰点以下,延长了器官保存时间,有望成为器官保存的重要手段,将为“器官库”的建立提供技术保障。

## 1 超冷器官保存技术

超冷器官保存技术在本质上是一种低温保存技术,依据范特霍夫规则(vant Hoff rule),即温度每下降 10℃,组织细胞内酶的活性下降 1.5~2.0 倍<sup>[7]</sup>。目前临床上常用的低温保存技术所采用的保存温度为 4℃,此时组织细胞内酶的活性只有正常水平的 1/10,而假如能将器官温度下降至-4℃,此时酶的活性则只有正常水平的 1/17。已有团队尝试将器官在冰点以下保存,但未取得成功。其主要原因为当器官处于冰点的环境中时,组织细胞内外将发生结冰现象,细胞基本结构发生改变,细胞膜通透性改变致细胞内外渗透压改变,导致细胞死亡<sup>[8-9]</sup>。此外,细胞内外结冰还将导致细胞

对氧自由基敏感性增加,尤其是血管内皮细胞<sup>[10]</sup>。

超冷器官保存技术是指通过各种方法使器官组织细胞内外环境在冰点(0℃)以下保持不结冰状态(又称超冷状态)的一种器官保存方法。目前可实现器官保存超冷状态的方法包括以下几种:(1)高压,在一定气压范围内,器官保存液的冰点会随着气压的升高而逐渐下降。因此,当对器官保存液施加一定气压后,器官保存液可在冰点以下保持不结冰状态<sup>[11]</sup>。

(2)在保存液中施加电场,当对保存液施加 3 000 V 电压后,可使得保存液在冰点以下(-5℃)也可保持不结冰状态<sup>[12]</sup>,但具体机制仍不清楚。(3)在保存液中施加磁场,当保存液处于稳态磁场中后,内部水分子开始振动,导致水分子在冰点以下不能形成结晶,使得保存液可以保持不结冰状态<sup>[13]</sup>。(4)改变细胞内外的液体环境,主要是在细胞内外液中添加防冻剂。针对细胞外环境,所用的防冻剂为相对分子质量为 35 的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG);而针对细胞内液,则是通过在细胞内液中创造高渗环境,所采用的物质为不被细胞所代谢的 3-O-甲基-D-葡萄糖(3-O-methyl-D-glucopyranose, 3-OMG)<sup>[14-16]</sup>。

## 2 超冷器官保存技术的应用

Rudolf 等<sup>[17]</sup>于 1967 年最早开始研究将器官保存在冰点以下,采用含 10% 二甲基砷和 5% 葡聚糖的平衡盐溶液在-5℃对犬肾脏进行灌注,此过程中犬肾脏未发生结冰现象。1984 年,美国学者 Wicomb 等<sup>[18]</sup>将兔肾脏在-4℃结冰状态中保存 1 h,再次检测发现肾功能严重受损,提示器官即使经结冰状态保存极短时间也可能损伤功能。1999 年, Ishine 等<sup>[9]</sup>对经过冰冻保存后的大鼠肝组织进行组织学分析发现肝细胞在经历冰冻保存后可以保持结构完整,而血管内皮细胞则会受到严重损害。紧接着,该研究团队尝试将冰冻后的大鼠肝脏复温后作为供肝进行移植,结果显示移植肝可产生胆汁,但大鼠无法长期生存,提示血管内皮细胞的连续性缺失是导致移植后不良结局的主要原因

因<sup>[8]</sup>。因此,保持器官组织细胞内外环境处于不结冰状态是实现超冷器官保存的关键。

Matsukawa等<sup>[19]</sup>于2000年最早开始探索超冷器官保存技术,利用改进的威斯康星大学保存液(University of Wisconsin solution, UW液)[UW液+抗核蛋白(anti-nuclear protein, ANP)20 μg/mL+抗坏血酸2-葡萄糖苷(ascorbic acid 2-glucoside, AA-2G)100 μg/mL]在-3℃下保存大鼠肝脏后成功行移植手术,移植肝可发挥正常功能,血管内皮细胞结构完整。在该研究中,ANP是一种防冻剂,AA-2G的主要作用是保护血管内皮细胞,但是该研究并未观察大鼠肝移植术后长期生存情况。2001年,Takahashi等<sup>[11]</sup>将大鼠肝脏在-2℃和5 mPa静水压的条件下保存5 h后再行肝移植,移植术后肝功能良好,大鼠可长期生存,但是当保存压力>10 mPa时,大鼠生存率显著降低。

Monzen等<sup>[12]</sup>采用在保存液中施加电场来实现器官超冷保存,结果发现经超冷保存(-4℃)24 h后的大鼠心脏、肝脏及肾脏损伤均小于常规低温保存方法,但是该研究只在体外评估了经超冷保存后器官损伤,而未进一步评估器官功能状态。此外,Abe等<sup>[20]</sup>采用相似的技术在超冷状态下保存了人肺组织,结果表明人肺组织经超冷保存(-5℃)5 d后肺泡、支气管和血管结构完好,支气管上皮细胞形态正常,纤毛明显完整,肺血管中的内皮细胞也保持正常形态,但该研究仍然只评估了经超冷保存后器官结构的变化而未评估功能的变化。Okamoto等<sup>[21]</sup>利用同样的技术将大鼠肺脏在-2℃保存17 h,并评估了保存结束后部分肺功能变化,结果显示大鼠肺脏经超冷保存后肺动脉压、潮气量以及动脉氧气压力与正常肺脏相当,提示肺脏经超冷保存后仍可以保持良好的功能。除了利用超冷器官保存技术保存肝脏、肺脏以及肾脏之外,Kato等<sup>[13]</sup>通过在保存液环境中施加磁场来进行大鼠心脏的体外超冷保存,结果显示大鼠心脏经超冷保存(-3℃)后血液动力学和代谢指标均优于相同时间的常规低温保存方法(4℃)。在此基础上,该团队利用相同的技术将猪心脏在-3℃下保存12 h后检测心脏组织无氧代谢量及组织超微结构变化情况,结果显示超冷保存可显著抑制心脏无氧代谢,从而保护心肌功能<sup>[22]</sup>。

近年来,来自美国麻省总医院医学工程中心的研究团队介绍了一种将机械灌注和超冷保存技术结合的器官保存方法,并将该技术成功应用于大鼠及人肝脏

保存。在前期研究中,该研究团队首先通过体外实验发现-4℃为肝细胞超冷保存的最适温度<sup>[23]</sup>。紧接着该团队利用机械灌注和超冷保存相结合的保存技术将大鼠肝脏保存96 h后成功移植<sup>[14]</sup>。其采用的超冷保存方案为通过改变细胞内外液体环境来降低冰点,从而实现器官超冷保存。首先,在超冷保存之前,通过SNMP将3-OMG导入供肝细胞内部以提高细胞内渗透压进而降低冰点;然后,逐渐将器官温度降低至4℃(1℃/min),同时使用10 mL含有5% PEG的UW液对器官进行灌注,后将肝脏放入75 mL(4℃)的上述液体中;紧接着将肝脏放入冰箱并将温度降低至-6℃(0.1℃/min),保存72 h或96 h;最后,保存结束后将器官温度逐渐上升至4℃,SNMP(21℃)3 h后进行同种异体原位移植<sup>[15]</sup>。术后结果显示肝脏经超冷保存72 h后再次移植,受体大鼠全部存活;而肝脏超冷保存96 h后仍有60%的受体大鼠存活。进一步的研究表明,超冷保存后的SNMP保存期间供肝胆汁生成量以及血管阻力可以作为判断供肝保存质量的重要指标。在大鼠实验成功的基础上,该团队紧接着又采用该技术进行人肝脏超冷保存。该研究利用临床上废弃的供肝,由于人肝脏体积较大,利用大鼠肝脏超冷保存的技术可能会导致肝脏结冰。因此,该研究团队对保存方案进行了改进,包括将肝脏密封保存以消除气液平面、添加细胞保护剂(海藻糖和甘油)、采取“鸡尾酒保存方案”等。该研究采用的保存方案是在超冷保存前、后各增加了一段时间的HMP,其中超冷保存时间为20 h,总保存时间为33~39 h,保存结束后采用NMP模拟肝移植后状态进一步评估肝脏保存质量。结果显示,肝脏经超冷保存之后部分指标(胆汁pH值、碳酸氢根浓度、葡萄糖浓度以及肝细胞凋亡水平)已达到临床肝移植标准<sup>[16]</sup>。

### 3 小结与展望

超冷器官保存技术作为一种新型的器官保存技术,极大地延长了器官的保存时间,使器官远距离转运成为可能,有助于提高供体器官的利用率,缓解供体器官短缺的困境,也为未来“器官库”的建立提供了技术支持。但是,目前器官超冷保存技术仍处于临床前探索阶段,仍有诸多问题亟待解决:首先,目前超冷器官保存技术的保存温度大多为-6℃左右,但是在此温度下组织细胞仍存在一定代谢,因此,如何尽可能大地降低细胞内外环境冰点是降低细胞代谢并进一

步延长器官保存时间的关键；其次，在超冷保存技术中所用的某些添加剂（如丙三醇）仍存在一定细胞毒性，如何降低此类添加剂的毒性以及研发新的无毒性组织防冻剂也是需要探索的内容；除此之外，器官经超冷保存后需要逐渐复温，但是在此过程中容易诱发器官内部结冰，因此，如何将超冷保存的器官顺利复温也是需要解决的问题。

#### 参考文献：

- [1] IM GY, CAMERON AM, LUCEY MR. Liver transplantation for alcoholic hepatitis[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(2):328-334. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.11.007.
- [2] BODZIN AS, BAKER TB. Liver transplantation today: where we are now and where we are going[J]. *Liver Transpl*, 2018, 24(10):1470-1475. DOI: 10.1002/lt.25320.
- [3] VAIDYA SR, AEDDULA NR. Chronic renal failure[M]. Treasure Island(FL): StatPearls Publishing, 2020.
- [4] BINDROO S, CHALLA HJ. Renal failure[M]. Treasure Island(FL): StatPearls Publishing, 2020.
- [5] BELLINI MI, NOZDRIN M, YIU J, et al. Machine perfusion for abdominal organ preservation: a systematic review of kidney and liver human grafts[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(8):1221. DOI:10.3390/jcm8081221.
- [6] JING L, YAO L, ZHAO M, et al. Organ preservation: from the past to the future[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(5):845-857. DOI: 10.1038/aps.2017.182.
- [7] BELZER FO, SOUTHARD JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage[J]. *Transplantation*, 1988, 45(4):673-676. DOI: 10.1097/00007890-198804000-00001.
- [8] ISHINE N, RUBINSKY B, LEE CY. Transplantation of mammalian livers following freezing: vascular damage and functional recovery[J]. *Cryobiology*, 2000, 40(1):84-89. DOI: 10.1006/cryo.1999.2225.
- [9] ISHINE N, RUBINSKY B, LEE CY. A histological analysis of liver injury in freezing storage[J]. *Cryobiology*, 1999, 39(3):271-277. DOI: 10.1006/cryo.1999.2205.
- [10] BRUINSMA BG, UYGUN K. Subzero organ preservation: the dawn of a new ice age?[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2017, 22(3):281-286. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000403.
- [11] TAKAHASHI T, KAKITA A, TAKAHASHI Y, et al. Preservation of rat livers by supercooling under high pressure[J]. *Transplant Proc*, 2001, 33(1/2):916-919. DOI: 10.1016/s0041-1345(00)02268-5.
- [12] MONZEN K, HOSODA T, HAYASHI D, et al. The use of a supercooling refrigerator improves the preservation of organ grafts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(2):534-539. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.09.082.
- [13] KATO H, TOMITA S, YAMAGUCHI S, et al. Subzero 24-hr nonfreezing rat heart preservation: a novel preservation method in a variable magnetic field[J]. *Transplantation*, 2012, 94(5):473-477. DOI: 10.1097/TP.0b013e3182637054.
- [14] BERENDSEN TA, BRUINSMA BG, PUTS CF, et al. Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation[J]. *Nat Med*, 2014, 20(7):790-793. DOI: 10.1038/nm.3588.
- [15] BRUINSMA BG, BERENDSEN TA, IZAMIS ML, et al. Supercooling preservation and transplantation of the rat liver[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(3):484-494. DOI: 10.1038/nprot.2015.011.
- [16] DE VRIES RJ, TESSIER SN, BANIK PD, et al. Supercooling extends preservation time of human livers[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(10):1131-1136. DOI: 10.1038/s41587-019-0223-y.
- [17] RUDOLF LE, MANDEL S. Supercooling, intermittent perfusion, and high pressure oxygen in whole organ preservation[J]. *Transplantation*, 1967, 5(4):1159-1166. DOI: 10.1097/00007890-196707001-00053.
- [18] WICOMB WN, HALASZ NA, COLLINS GM. Damaging effect of subzero temperature (-4 degrees C) on rabbit renal function[J]. *Cryobiology*, 1984, 21(1):6-12. DOI: 10.1016/0011-2240(84)90016-6.
- [19] MATSUKAWA H, YAGI T, MATSUDA H, et al. Ascorbic acid 2-glucoside prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in supercooled preserved grafts in rat liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2000, 32(2):313-317. DOI: 10.1016/s0041-1345(99)00967-7.
- [20] ABE M, JIMI S, HAMA H, et al. A novel method for preserving human lungs using a super-cooling system[J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 82(3):1085-1088. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2006.03.016.
- [21] OKAMOTO T, NAKAMURA T, ZHANG J, et al. Successful sub-zero non-freezing preservation of rat lungs at -2 degrees C utilizing a new supercooling technology[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2008, 27(10):1150-1157. DOI: 10.1016/j.healun.2008.07.008.
- [22] SEGUCHI R, WATANABE G, KATO H, et al. Subzero 12-hour nonfreezing cryopreservation of porcine heart in a variable magnetic field[J]. *Transplant Direct*, 2015, 1(9):e33. DOI: 10.1097/TXD.0000000000000544.
- [23] USTA OB, KIM Y, OZER S, et al. Supercooling as a viable non-freezing cell preservation method of rat hepatocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69334. DOI: 10.1371/journal.pone.0069334.

(收稿日期：2020-05-15)

(本文编辑：方引超 邬加佳)