

# 基于 CT 测定冷冻保护剂在大鼠肾脏中的渗透特性

柳珂<sup>①</sup>, 郭宁<sup>①</sup>, 胥义<sup>①\*</sup>

①上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093

\*通讯作者: E-mail: [xuyi@usst.edu.cn](mailto:xuyi@usst.edu.cn)

**摘要:** 低温保存被广泛应用于生物组织工程和再生医学等重要领域。然而, CPA 在生物组织中加载的均匀性是生物组织冷冻保存的主要困难之一。计算机断层扫描(CT)作为一种无损的成像方法被用于确定 Vs55 在大鼠肾脏中的有效扩散系数( $D_{\text{eff}}$ )。大鼠肾脏长度为 15mm, 孔隙率为 11.34%。使用肝素钠灌注后将其直接转移到 8.4M 的 Vs55 中, 获得 CT 图像。因此, 可以对 Vs55 加载过程进行实时测量和可视化。通过扩散方程及实验参数获得了不同温度下 Vs55 在大鼠肾脏中有效扩散系数: 0℃时,  $D_{\text{eff}}=2.32 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ ; 25℃时,  $D_{\text{eff}}=3.47 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ 。

**关键词:** 计算机断层扫描(CT), 可视化, Vs55, 有效扩散系数( $D_{\text{eff}}$ )。

## Diffusion of cryoprotectant permeability in rat kidneys visualized by computer tomography

Liu Ke<sup>①</sup>, Guo Ning<sup>①</sup>, Xu Yi<sup>①\*</sup>

① University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093

**Abstract** Cryopreservation is a convenient method for long-term preservation of natural and engineered tissues in regenerative medicine. Homogeneous loading of tissues with CPAs, however, forms one of the major hurdles in tissue cryopreservation. In this study, computer tomography (CT) as a non-invasive imaging method was used to determine the effective diffusion of Vs55 in tissue-engineered collagen scaffolds. The length of the rat kidney was 15mm and a porosity of 11.34%. CT images were acquired after effusing heparin sodium and transferring them directly in 8.4M Vs55. The Vs55 loading process of the scaffold could thus be measured and visualized in real time. The experimental data were fitted using a diffusion equation. The calculated effective diffusion constant for Vs55 in the rat kidney was determined from experimental diffusion studies to be  $2.32 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$  at 0 °C,  $3.47 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$  at 25 °C.

**Keywords** CT, Visualization, Vs55, Effective diffusion

## 0 前言

低温保存对于细胞、组织、器官等生物材料的长期储存是一种不可或缺的方法, 被广泛应用于干细胞治疗、生物组织工程、再生医学等生物医学领域。目前, 虽然对于细胞、小体积组织的冷冻保存已有很大的进展, 但组织和器官的冷冻保存仍然是一个亟待解决的关键问题<sup>[1]</sup>。器官及大尺寸生物样本的低温保存很复杂, 其中冷冻保护剂在生物组织中加载的均匀性是大尺寸生物样本冷冻保存的关键问题之一。低温保护剂加载不均匀会使不同位置的细胞经历不同的冷冻条件, 导致组织中细胞存活的不均匀性<sup>[2]</sup>。在以往的研究中发现, 组织冷冻保存工程中, CPA 分布不均匀导致解冻后细胞凋亡<sup>[3]</sup>。因此, 精确控制 CPA 在组织中扩散及分布, 保证细胞及细胞外基质在冷冻保存工程中的完整性, 是组织成功保存的关键因素。

现如今, 医疗和工业 CT 系统的空间分辨率可以小到 0.3mm。Micro CT 的空间分辨率已达到 10 $\mu\text{m}$ 。然而, 分辨率增加意味着可测量的样本体积减小<sup>[4]</sup>。无创无损的 CT 检测已被应用于确定相态、溶质浓度以及幻影冷冻外科。已有文献表明, 使用 CT 可以测量解冻后组织切片中甘油的浓度<sup>[5]</sup>。基于 HU 随甘油浓度的线性变化, 甘油在生物样本的加载过程中可以达到可视化及量化标准。

因此, 本文借助 Micro CT 研究了不同温度下 Vs55 在大鼠肾脏中的扩散及分布。在 0℃及 25℃下, 将

长度为 15mm 的大鼠肾脏浸泡在 8.4M 的 Vs55 中，并从 CT 图像中测定 Vs55 随时间变化的灰度值。结果表明，Vs55 需要三小时以上才能在大鼠肾脏中均匀分布。通过计算 Vs55 的有效扩散系数，可以确定 8.4MVs55 在大鼠肾脏中均匀分布所需的最小时间。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器

CT 扫描设备使用的 Nikon 公司的 X-TEK XTH225 型号计算机断层扫描系统，扫描参数可以通过 Inspect-X 3.0 软件设定：加速电压为 80kV，电流 90uA。CT 扫描结果通过 CT Agent 传输到服务器端，在服务器端可以通过 Nikon 公司提供的 VG studio 3D 软件进行 3D 重建和截面的截取等操作。导出图像通过软件 Fiji 和 image pro plus 进行分析。测得的灰度值可以通过式（1）转换为 HU 值，通过公式计算，可以进一步得到物体内部各个点的密度信息。

$$HU_{\text{sample}} = \frac{(GS_{\text{sample}} - GS_{\text{water}})}{(GS_{\text{water}} - GS_{\text{air}})} \times 1000 \quad (1)$$

其中  $GS_{\text{sample}}$ 、 $GS_{\text{water}}$ 、 $GS_{\text{air}}$  分别为样品、水、空气的灰度值。

### 1.2 实验材料

Vs55 是一种广泛使用的低温保护剂溶液，在冷冻过程中非常有利于形成玻璃态<sup>[6]</sup>。其浓度为 8.4M，由二甲基亚砜（3.1 M），甲酰胺（3.1 M），1,2-丙二醇（2.2 M）和 EuroCollins 溶液配制而成。实验鼠采用上海杰思捷有限公司提供的 220g~250g SD 公鼠，肝素钠冲洗肾脏，变白后取右肾加载 Vs55，左肾为参照。

### 1.3 实验方法

大鼠肾脏肝素钠冲洗，待两肾苍白后，取右肾放入 0℃ 和 25℃ 的 8.4MVs55 中，左肾作为对照组。检测不同温度下由 Vs55 浸泡过的大鼠肾脏，每 20min 扫描一次，直到 Vs55 在大鼠肾脏中达到平衡。实验重复三次。获得大鼠肾脏的灰度图像后，以大鼠肾脏纵切面为基准，见图 1，测定大鼠肾脏-7.5mm~7.5mm 区域的灰度值，每个区域的面积为 1mm<sup>2</sup>。

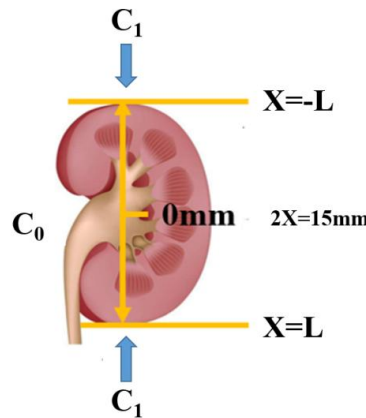


图 1 CT 灰度测量肾脏基准扩散路径

## 2 实验结果与分析

### 2.1 标准曲线的建立

建立 CT 图像与 Vs55 浓度对应的标准曲线，在 CT 中测量从 0M 到 8.4M 的 Vs55 的校准溶液，从图像中确定的灰度值通过公式（1）转换为 Hounsfield 单位（HU），图 2 表明 HU 和 Vs55 浓度之间存在线性关系（ $R^2=0.98$ ）。

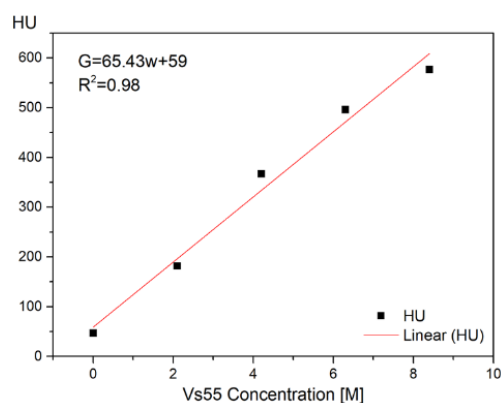
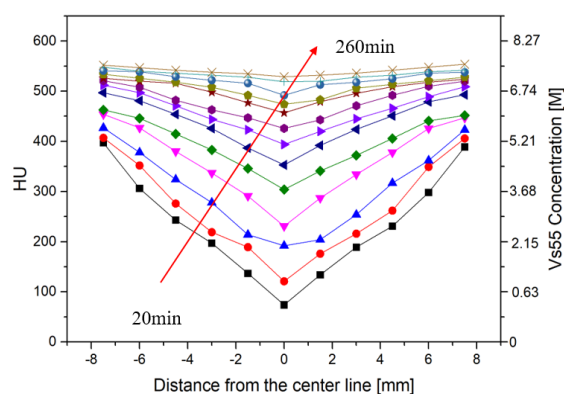


图2 线性 CT 校准曲线: Hu 值与不同浓度 Vs55 校准溶液

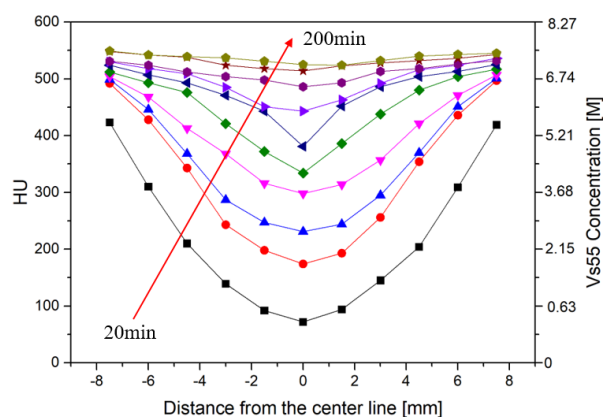
肾脏中 Vs55 的浓度测量是基于上述校准曲线中的数据。通过 CT 图像中的灰度值经公式(1)转化成 HU 可以通过标准曲线, 获得此位置处的 Vs55 浓度。

## 2.2 对大鼠肾脏中 Vs55 溶液加载的影响因素

通过测量的灰度值计算肾脏不同位置的 HU, 由图 1 线性拟合得到此位置处的 Vs55 浓度。图 3 为不同温度下, Vs55 随时间在肾脏扩散路径上的浓度分布。时间间隔为 20min, Vs55 浓度沿肾脏两侧扩散路径变化(顶部=左侧, 底部=右侧; 扩散路径长度为 7.5mm)直到肾脏中心位置。0℃下, 肾脏在 260min 后达到平衡, 而 25℃下 200min 即达到平衡。肾脏的顶端(图 3,左侧)及底端(图 3,右侧) Vs55 浓度增加迅速, 肾脏中心位置(图 3,0mm 处) Vs55 浓度增加趋势缓慢。



(a)



(b)

图3 Vs55 沿扩散路径的浓度变化 (a) 0℃加载; (b) 25℃加载

通过计算不同时间下 Vs55 在肾脏中的加载浓度（图 4）发现，Vs55 加载浓度与时间呈指数变化，符合式（2）。其中，C 为 Vs55 扩散浓度，t 为加载时间，a 为 Vs55 的最大加载浓度，b 为浓度变化常数。经计算，0℃下 Vs55 在肾脏中的扩散浓度可达到 88.08%，25℃下为 94.52%。说明，温度升高后肾脏中加载的 Vs55 含量更高。

$$C = a(1 - b^t) \quad (2)$$

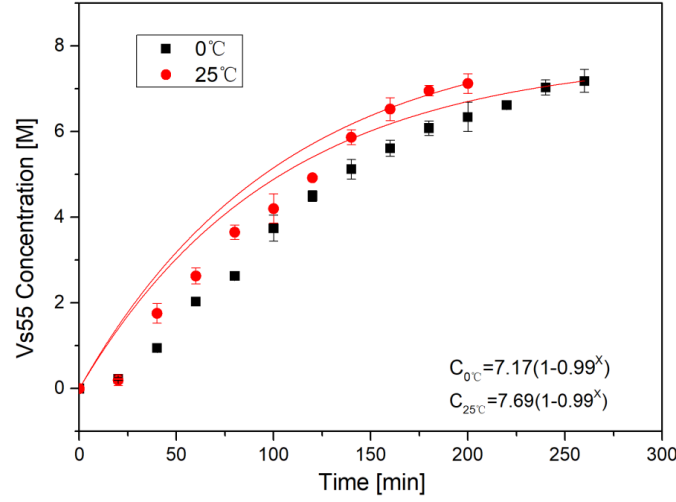


图 4 Vs55 浓度随时间变化曲线

### 2.3 Vs55 在大鼠肾中扩散系数计算

为获得不同条件下的扩散系数  $D_{eff}$ ，建立肾脏内 Vs55 一维瞬态扩散模型。依据 Fick 第二定律<sup>[7]</sup>进行求解，见公式（3）。读取 CT 图像灰度值并使用校准曲线转换为 Vs55 浓度值（图 2）。初始条件为 8.4M Vs55 的图像灰度值，而边界条件为在 Vs55 浓度值与肾脏位置的函数。通过设置扩散方程（3）中的边界条件和初始条件，求解不同的微分方程的偏微分方程，得到模型浓度分布。

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{eff} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (3)$$

$$\text{边界条件: } \frac{\partial C_i}{\partial x} = 0 \quad x = 0, t \geq 0;$$

$$C_i = C_1 \quad x = \pm L, t \geq 0;$$

$$C_i = C_0 \quad -L \leq x \leq L, t \leq 0$$

$$\text{求解得: } \frac{C_i - C_0}{C_1 - C_0} = 1 - 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(n+0.5)\pi} \cos[(n+0.5)\pi \frac{x}{L}] \exp[-(n+0.5)^2 \pi^2 \frac{D_{eff} t}{L^2}] \quad (4)$$

其中， $C_i$  为肾脏区域内 Vs55 瞬态变化浓度； $C_1$  为溶液内 Vs55 浓度； $C_0$  为初始状态肾脏 0mm 处浓度；t 为时间；x 为肾脏测量区域位置。

通过一维瞬态扩散模型，从实验数据中确定了足够的初始和边界条件。采用最小二乘拟合方法计算了 Vs55 在大鼠肾脏中的有效扩散常数：0℃时， $D_{\text{eff}}=2.32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ；25℃时， $D_{\text{eff}}=3.47 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

### 3 结论

本文将 CT 作为一种成像技术来可视化 Vs55 在大鼠肾脏中的渗透过程。基于 CT 图像的灰度值可以确定肾脏局部的 Vs55 浓度。实验发现，需要三小时以上，Vs55 才可在肾脏中达到均匀分布。同时以实验数据建立了描述 Vs55 在肾脏中扩散的渗透模型，由此计算了 Vs55 在肾脏中的有效扩散系数。CT 成像的方法不仅可以检测 CPA 在组织中达到平衡的最短时间，也可判断 CPA 扩散的均匀性，是一种可视化及量化的便捷手段，为后续冷冻保存提供精准的前期准备。

### 参考文献

- [1] Zhang Y. Approaches to optimizing animal cell culture process: substrate metabolism regulation and protein expression improvement.[M]// Biotechnology in China I. Springer Berlin Heidelberg, 2009:177.
- [2] Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells.[J]. Experimental Cell Research, 1972, 71(2):345-355.
- [3] Hofmann N, Bernemann I, Glasmacher B. CRYOPRESERVATION OF TISSUE AND TISSUE ENGINEERED PRODUCTS[J]. International Journal of Artificial Organs, 2008, 31(7):583-583.
- [4] Hofmann N, Bernemann I & Glasmacher B. Micro-CT scanners for biomedical applications: An overview (2007) DKV-Jahresbericht 34(1), (I3), ISBN-3932715-41-1.
- [5] Bischof J C, Mahr B, Choi J H, et al. Use of X-ray tomography to map crystalline and amorphous phases in frozen biomaterials.[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2007, 35(2):292-304.
- [6] 于红梅, 胥义, 柳珂,等. 磁纳米粒子对 Vs55 溶液反玻璃化等温结晶行为的影响[J]. 化工学报, 2017, 68(3):1262-1268.
- Yu HM, Xu Y, Liu K, et. Effect of magnetic nanoparticles on isothermal crystallization behaviors of devitrified Vs55[J]. Journal of chemical industry and engineering, 2017, 68(3):1262-1268.
- [7] Truskey GA, Transport phenomena in biological systems (2nd Edition). Prentice Hall, 2009.