论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2072-03

胎猪皮肤前体组织异种移植模型的研究

黄正根[1],吴 军[1],罗高兴[1],甘成军[1],程文广[1],贾雄飞[1],葛良鹏[2],魏 泓[2] (第三军医大学:[1]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市器官移植基础研究所,重庆市疾病蛋白质组学重点实验室,[2]基础医学部实验动物学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨胎猪皮肤前体组织异种移植模型及移植后发育过程。**方法** 取精确胎龄为56 d的胎猪皮肤前体组织,分组进行移植,①背部创面模型组:制备成微粒皮后移植到BALB/c裸鼠背部创面,以人尸体皮覆盖;背部皮下模型组:制备成小张邮票皮,植入裸鼠背部皮下;耳廓皮下模型组:制备成微粒皮植入裸鼠耳廓皮下。各组于移植后观察其生长发育特性,并于移植后6周和12周取材行HE染色观察其组织结构形态。新生组织块大小采用双样本t检验。**结果** 各模型的胎猪皮肤前体组织移植后均能存活并继续生长,背部创面模型组生长能力显著大于耳廓皮下模型组,新生皮肤组织均具有真皮和表皮,耳廓皮下模型的真皮附属器仅见毛囊(毛发),偶见皮脂腺,未见汗腺,但是背部创面模型组及背部皮下模型组不仅能发育成毛囊(毛发)、还见大量皮脂腺和汗腺。**结论** 背部创面移植模型最适合于胎猪皮肤前体组织异种移植及移植后发育的研究。

关键词: 贵州香猪;BALB/c裸鼠;皮肤前体组织;异种移植;移植模型

中图法分类号: R-332;R73-352;R739.5 **文献标识码:** A

Xenotransplantation model of fetal pig skin precursor tissue

HUANG Zheng-gen[1], WU Jun[1], LUO Gao-xing[1], GAN Cheng-jun[1], CHENG Wen-guang[1], JIA Xiong-fei[1], GE Liang-peng[2], WEI Hong[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing Institute of Transplantation, Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, Institute of Burns, Southwest Hospital, [2]Department of Laboratory Animal, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the xenotransplantation model of fetal pig skin precursor tissue and its development after transplantaion. **Methods** Porcine skin precursor tissue was obtained from the embryo of gestation day 56 (E56), and made into microskin or stamp skin graft. The microskin was transplanted to the dorsal wound in BALB/c nude mice, then covered with human corpse skin. The stamp skin graft was imbedded subcutaneously into the back of nude mice, and microskin was injected subcutaneously into the auricles of nude mice. Their growth and development were observed and they were examined by HE staining at 6^{th} and 12^{th} week after transplantation respectively. Two-sample t test was used to analyze the size of newly grown skin tissue. **Results** Porcine skin precursor tissue graft in three models above survived and continued growth after transplantation, and growth ability of the dorsal wound transplantation model was significantly stronger than that of the auricle model. Epidermis and hypodermis were detected in newly grown skin tissues. Hair follicles, a few of sebaceous glands, but no sweat glands were observed in auricle model, while many sebaceous glands and sweat glands were observed in the dorsal wound model. **Conclusion** Transplantation of microskin to dorsal wound is the optimal model of investigating the xenotransplantation of fetal pig skin precursor tissue and its development after transplantion.

Key words: Guizhou mini-pig; BALB/c nude mice; skin precursor tissue; xenotransplantation; transplantation model

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02A121)

Supported by the National High Technology Research and Development Project of China (863 Project) (2006AA02A121)

作者简介: 黄正根,男,四川省宜宾市人,博士研究生,医师,主要从事异种移植及移植免疫方面的研究。电话:(023)68752688,E-mail:9876543210-hzg@sohu.com

通信作者: 吴 军,E-mail:junwupro@126.com

收稿日期: 2008-01-15;**修回日期:** 2008-02-28

胎猪的肾、胰、肝、肺等前体组织异种移植后在适当的环境下可生长发育成为相应的成熟组织或器官,且具有一定的生理功能[1-3]。猪胚胎皮肤前体组织也应具有这种移植后发育的能力,但其位于胚胎表面,质脆,无成熟皮肤的机械保护作用,且皮肤组织的生长具有一定的方向性,与实体器官的移植模型理应不同。本研究旨在建立胎猪皮肤前体组织的异种移植模型,以适合研究其异种移植后的发育过程。

1　材料与方法

1.1　实验动物

实验用 5 ~ 6 周龄 BALB/c 裸鼠 12 只,体质量 15 ~ 18 g,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,由本校实验动物中心 SPF 级饲养;实验用贵州小型香猪(皮、毛均为黑色)孕猪 1 只,约 9 月龄,来自封闭种群,由本校实验用小型猪培育基地培育。

1.2　胎猪皮肤前体组织

E(embryonic day)56 的胎猪皮肤前体组织由精确孕龄为 56 d 的孕贵州小型香猪剖宫产取得。剖宫后用 4 ~ 6 ℃的生理盐水清洗胎猪,热缺血时间小于 10 min,然后用组织剪及组织镊剥取全层胎猪皮肤前体组织,浸入 4 ~ 6 ℃的 0.01 mol/L PBS(磷酸盐缓冲液,pH 值为 7.2 ~ 7.4)中,再将其制备成为 1 ~ 2 mm^2的胎猪皮肤微粒或者约 0.5 cm × 1.0 cm 的邮票皮。于 2 h 内完成后续移植手术。

1.3　裸鼠移植模型

移植手术在 SPF 级手术间严格按无菌操作规程进行。BALB/c 裸鼠以 1% 戊巴比妥钠 5 ~ 8 μl/g 麻醉(先以 5 μl/g 腹腔注射,视情况酌情追加,但总量不超过 8 μl/g)。按以下方案分组进行,背部创面模型组(6 只):碘伏消毒后于裸鼠背部正中开创至肌膜上,约 1.0 cm × 1.5 cm 皮肤全层缺损,用人尸体皮覆盖(尸体皮由西南医院烧伤科皮库提供,厚度约为 0.6 mm)。用丝线连续或间断缝合,缝合完毕前将上述胎猪皮肤前体组织微粒悬液 0.1 ml[含微粒皮 10% ~ 20%(体积分数)的 PBS 悬液]植入创面上;背部皮下模型组(6 只):碘伏消毒后于裸鼠背部正中横向切口至肌筋膜上,用小组织镊游离出一皮下空腔(隧道),植入小块邮票皮,间断缝合切口;耳廓皮下模型组(12 只):上述两组实验鼠(共 12 只)行双耳廓皮下微粒皮移植,碘伏消毒后用 12 号腰椎穿刺针于双耳廓内面或者背面中上 1/3 处行皮下穿刺,入皮后平行穿刺的深度约 0.5 cm,将胎猪皮肤前体组织微粒放置于穿刺针前端,植入皮下。实验鼠苏醒后腹腔注射青霉素、链霉素各 500 U 的生理盐水 0.25 ml,SPF 级环境分笼(单只)饲养。

1.4　移植后生长特性观察及评价

术后观察创面及移植物的生长变化情况,分别于 6 周和 12 周处死裸鼠,记录新生组织大小(L × W,组织块最大长径和与之垂直的最大横径的积),标本用 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,组织切片常规 HE 染色观察组织结构形态;标准 Fontana 法染新生表皮层中的黑色素颗粒。

1.5　统计学方法

背部创面组与耳廓皮下组术后 12 周的新生组织大小采用双样本 t 检验。

2　结果

2.1　胎猪皮肤前体组织的生长特性

2.1.1　背部创面模型组　移植后裸小鼠背部创面被异体皮覆盖,覆盖的异体皮在 1 周内会变黑,可伴水疱等,1 周后覆盖物相继坏死,部分脱落或形成干痂贴附于创面;2 ~ 3 周,覆盖物的干痂与正常皮肤交界处相继出现一些皮下隆起,数量少,不明显,表层正常皮肤结构完好,可随皮肤一起滑动;3 ~ 4 周,隆起进一步增长,数目增多,明显可见,隆起质实,呈类圆形,呈圆盘状突出于背部,透过表皮可见皮下黑影,由隐约到明显可见;4 ~ 5 周,隆起继续生长,皮下黑影部分穿透表层皮肤,形成棕黑或者黑色斑点(纹),并有少量黑色毛发自黑斑上长出。5 周以后,黑斑及黑毛继续增多,黑斑扩展,相互融合形成更大的斑块,黑毛数量增多,成撮或者散布生长,长度增加(图 1A)。

2.1.2　耳廓皮下模型组　耳廓皮下移植后 1 周,外观无明显变化;2 ~ 3 周,可见耳廓皮下出现淡红色皮下包块(囊状物);3 ~ 4 周,包块进一步增长,部分可见隐约棕色或者黑色小点嵌于淡红色皮下包块之中;4 ~ 5 周,耳廓皮下囊状物中几乎全被黑色斑取代,但此时未见明显黑斑透出耳廓皮肤表面。6 周后,部分有黑色斑穿透鼠耳廓表皮层,但仍未见黑色毛发。6 周至 8 周,此期间耳廓皮下囊状物大小变化不明显,黑色明显加深,肉眼未见黑毛发长出表皮(图 1B)。

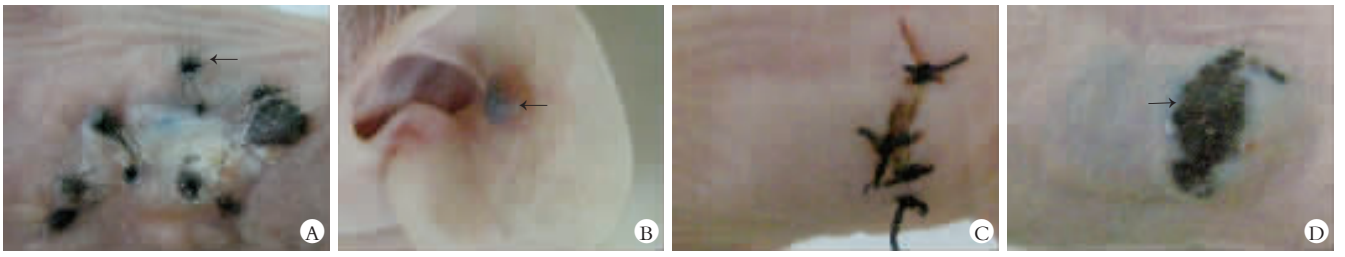
2.1.3　背部皮下模型组　移植物会在皮下空腔内有一定的位置变化,2 ~ 3 d 才会相对固定于背部某个位置(图 1C),伤口在 1 周内完全愈合,因植入组织块离缝合口的远近不同而生长各异。但均有体积增加,渐隆起于皮下,离愈合口近者 3 ~ 4 周可见沿此愈合口有散在黑斑出现,4 ~ 5 周有细小黑色毛发出现,且此黑斑及黑色毛发会以愈合口为中心向皮下隆起的远端蔓延(图 1D)。但是最终不能覆盖全部隆起区域(隆起区域的黑斑及黑色毛发不能全部透出受体鼠的背部表皮层)。而植入组织离缝合口较远者则只能看见渐大的皮下隆起及黑影,移植后 12 周仍不见表皮有黑斑及黑毛出现(隆起区的黑色斑及毛发均不能穿透受体鼠表皮)。

2.2　胎猪皮肤前体组织的发育能力

背部创面模型与背部皮下模型均能生长发育成为具有表皮和真皮结构的成熟皮肤组织,且具有毛发、汗腺(图 2A)及皮脂腺(图 2B)等附属器。但背部皮下模型组因为猪的表皮层及毛发大部分未透出受体鼠的表皮层,故表皮与真皮的形态结构与正常成年皮肤不同,与同期的背部创面模型组相比,表现为表皮变薄,细胞层数少,角质层薄,毛发生长方向紊乱。耳廓皮下模型组也能发育成为具表皮与真皮的结构(图 2C、D),可见毛囊(毛发),偶见皮脂腺,但未见汗腺。

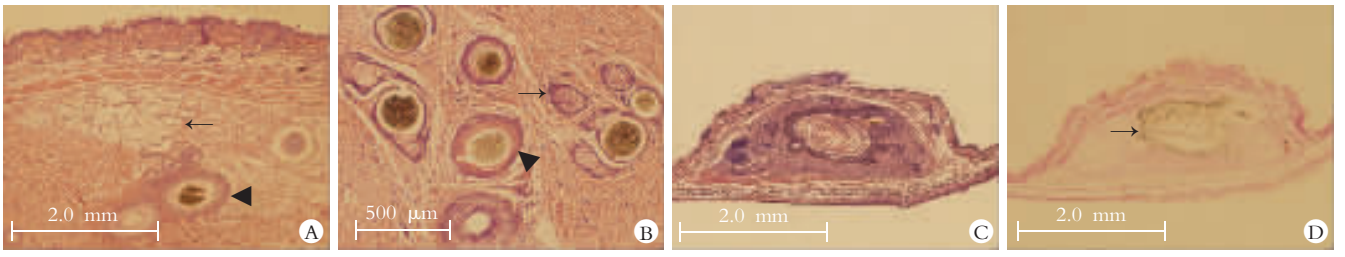
2.3　胎猪皮肤前体组织的生长潜能

背部创面组 12 周的新生皮肤组织块大小为(31.1 ± 12.2) mm^2,耳廓皮下的生长可达(6.0 ± 1.5) mm^2,背部皮下组因初始植入的是小块邮票皮,实际倍增为 5 ~ 8 倍,故背部创面微粒皮移植组的生长能力最强。



A:背部创面移植模型　↑:黑斑及黑毛; B:耳廓皮下模型　↑:皮下黑色隆起; C:背部皮下模型(缝合口,术后2 d); D: C图术后4周　↑:沿缝合口长出的黑斑及黑毛

图1　各移植模型术后生长情况



A:新生组织中的毛囊(▲)及汗腺(↑); B:新生组织中的毛囊(▲)及皮脂腺(↑); C:耳廓皮下模型　↑:猪表皮的黑色素颗粒; D:图C黑色素染色

图2　新生皮肤组织中的附件及黑色素染色

3　讨论

皮肤移植是挽救大面积烧、创伤患者的重要手段,但是由于自体及异体皮源的严重短缺,临床迫切需要寻求新的皮源。成年异种皮是较为理想的替代品,但因其免疫原性强,虽经免疫调节手段能延长其存活,但最终不能摆脱被排斥的命运,且遗留较多瘢痕影响患者的生活质量[4]。胚胎前体组织的免疫原性低,异种移植后在适当条件下能继续生长发育[5]。Eventov-Friedma[1,6]及Dekel等[3]研究发现猪胚胎的肝、肾、胰等前体组织异种移植后在适当的微环境下能够生长发育成为相应的成熟组织或器官,且具有一定生理功能。这提示我们胎猪皮肤前体组织移植后也理应具有这种生长发育能力。

但是皮肤的生长具有方向性,与内位器官不同,因此可能不适用内位器官的移植模型。本研究旨在寻求一种简单有效的移植模型,以期应用于胎猪皮肤前体组织异种移植后的发育研究。背部创面模型是最接近于临床实际应用的方法,但是在覆盖物脱落之前不易观察;背部皮下模型操作简便,但被宿主的全层皮肤覆盖;耳廓皮下模型便于观察,定位好,但是空间阻力大,血供不及前两者丰富;背部创面微粒皮模型较皮下及耳廓皮下更优的原因可能是它组织液丰富,较耳廓皮下更易供给营养及建立血运,故生长能力较耳廓皮下强。同时,由于创面愈合后残留的瘢痕使表皮层变薄,其下新生结缔组织疏松,更有利于新生和猪皮肤组织穿透体表。背部皮下移植组中离缝合口近者能见黑斑及黑色毛发透出宿主鼠体表也证明了这一点。背部创面的胎猪皮肤组织微粒有最大的生长潜能,且新生长成的皮肤组织结构完整。

综合各移植模型对胎猪皮肤前体组织的移植后结构形态及扩增能力,我们认为创面移植微粒皮加覆盖物的模型是研究胎猪皮肤前体组织发育的最适模型。

参考文献:

[1] Eventov-Friedman S, Katchman H, Shezen E, *et al*. Embryonic pig liver, pancreas, and lung as a source for transplantation: optimal organogenesis without teratoma depends on distinct time windows[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(8): 2928-2933.

[2] Hammerman M R. Growing new endocrine pancreas *in situ*[J]. Clin Exp Nephrol, 2006, 10(1): 1-7.

[3] Dekel B, Burakova T, Arditti F D, *et al*. Human and porcine early kidney precursors as a new source for transplantation[J]. Nat Med, 2003, 9(1): 53-60.

[4] Yang Y G, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(7): 519-531.

[5] Bjorklund L M, Sanchez-Pernaute R, Chung S, *et al*. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(4): 2344-2349.

[6] Eventov-Friedman S, Tchorsh D, Katchman H, *et al*. Embryonic pig pancreatic tissue transplantation for the treatment of diabetes[J]. PLoS Med, 2006, 3(7): e215.

(编辑　栾　嘉)