技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1854-02

家兔体内用硅胶囊构建自体复合皮肤的研究

杨任欢,牙祖蒙,吴继东,艾剑雄,何丽霞,田 怡
(重庆医科大学附属第二医院整形美容科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察在体内构建类似于皮肤结构的复合皮的可行性。方法:大耳白兔 10 只,于其背部左右侧皮下各埋植一球形的医用硅胶扩张囊,手术 1 周后,在扩张囊周围形成纤维包囊,此时将原代培养的皮肤上皮细胞悬液经皮下埋置的管道注入扩张囊和纤维包囊腔隙之间。设对照组。2 周后取出扩张囊,肉眼及光镜观察纤维包囊表面是否有上皮形成。结果:肉眼观实验组包囊透明度稍低于对照组之外,未见明显区别;光镜下对照组未见有上皮组织覆盖,而实验组可见类似于假复层鳞状上皮细胞层。结论:用上述方法体内构建类似于皮肤结构的复合皮有可行性,有望将纤维包囊连同其表面生长的上皮细胞层用于创面覆盖。

【关键词】硅胶囊;纤维包囊;上皮细胞;自体复合皮;体内
【中国图书分类法分类号】R622+.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-28

Construction of composite by silicone capsule in vivo

YANG Ren-huan, et al
(*Department of Plastic Surgery, the Second Affiliatde Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the feasibility of constructing the composite skin in vivo whose structure is similar to the skin. *Methods*: A medical silicone expander was implanted subcutaneously in the back, on both sides symmetrically in each of 10 rabbits.1 w after surgery, fibrous cyst formed around the expander and cultured isogeneic rabbit keratinocytes suspension was injected subcutaneously by the pipeline into the room between fibrous cyst and expander. A control group was set up and the expander was removed after 2 w to see whether the epithelialization could be found on the surface of fibrous cyst by macroscopic and microscopic observation. *Results*: Transparency of cyst in the experimental group was slightly lower than that of the control group by macroscopic observation, and no other significant difference was found. There was no epithelialization on the surface of fibrous cyst in the control group by microscopic observation whereas structure similar to the epithelializatified on the surface of fibrous cyst in the experiment group could be observed. *Conclusion*: The composite skin in vivo whose structure is similar to the skin can be constructed with the above, epithelium with the fibrous cyst is feasible for wound coverage.

【Key words】Tissue expander; Laminating; Epithelial cell; Composite skin; Vivo

如何解决皮源奇缺的大面积烧伤、严重创伤患者创面的覆盖问题?如何用最简单的方式形成双面有皮肤的皮瓣修复洞穿型缺损?这一直是整形烧伤外科面临的重大难题。异体、异种皮因免疫排异反应问题无法解决而只能作为临时的创面覆盖材料。组织工程(人工)皮肤是现今的热点。可是,经过近 20 多年的研究和开发,至今仍无法获取理想的组织工程皮肤。在理想的组织工程皮肤问世之前,利用现有的技术在体内构建自体皮肤有望成为一种现实可行的选择。

作者介绍:杨任欢(1984-),男,硕士,
研究方向:整形美容。
通讯作者:牙祖蒙,男,教授,E-mail:yazumeng163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(编号:CSCT,2007BB5351)。

1 材料与方法

1.1 材料

10 只 4 周龄大耳白兔(由本校实验动物中心提供),雌雄不限,体重 0.5~0.51 kg;速眠新Ⅱ(沈阳兽用制药厂);特殊定制扩张器(上海威宁医疗器材公司):在普通硅胶扩张器上改造,增加 1 个通入纤维包囊和扩张器之间的注射管道和注射壶,扩张容量为 10 ml(图 1);DMEM/F12、胎牛血清、胰酶、鼠抗人角细胞广谱角蛋白单克隆(AE1/AE3)抗体、中性蛋白酶Ⅱ(Dispase Ⅱ)、FBS 均为 Gibco 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 兔上皮细胞培养 速眠新Ⅱ 0.2 ml/kg 肌肉注射,全身麻醉后置于超净工作台,10%碘伏溶液消毒,铺消毒洞巾,取大小约 2 cm × 3 cm 皮条放入 PBS 清洗。加入 0.25%中性蛋

白酶Ⅱ（Dispase Ⅱ）分离表皮，EDTA/胰蛋白酶消化。将制成的单细胞悬液 200 目滤网过滤后接种于培养瓶中，加入含有 10%GIBICO 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液。置于恒温孵育箱。3 d 换液 1 次，4 d 后，细胞生长、增殖至 70%~80%融合时予以 1:2 传代继续培养。在培养过程中采用差异酶消化法纯化培养出上皮细胞。

1.2.2 表皮细胞鉴定 10 d 后对培养瓶内的细胞进行 ABC 法免疫组化检测 AE1/AE3（1:150，GIBICO），4%多聚甲醛固定，PBS 漂洗，3%的双氧水孵育，加一抗 4℃过夜，加二抗 37℃，30 min，PBS 漂洗，加三抗 37℃，30 min。DAB 显色。阳性染色为棕黄色。

1.2.3 埋置扩张器（图 1） 在取皮时将 10 ml 特制的球形扩张器埋置于兔背部皮下，两个注射壶均埋置于皮下，埋置时通过注射壶 A 向扩张囊内注入生理盐水 10 ml 将之充盈，严密缝合伤口，保证扩张器囊周围无菌。以后若想扩大扩张囊则在伤口愈合后再注入生理盐水。

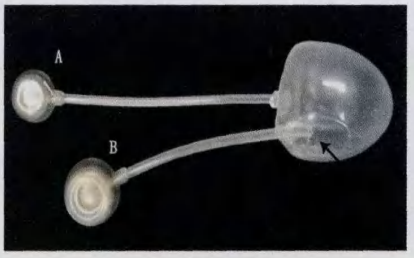


图 1 扩张器

1.2.4 上皮细胞接种 扩张器埋入后第 2 周，将培养的上皮细胞从培养瓶中分离，用生理盐水制成 1 ml 的 10×10^6 个/ml 细胞悬液，通过注射壶 B 口注入扩张器与纤维包囊间的腔隙。

1.3 自体复合皮形成的观察

1.3.1 肉眼观察

1.3.2 光镜观察 取纤维包囊组织块，用福尔马林固定 24 h 以上，石蜡包埋，切片后 HE 染色，光镜观察上皮细胞生长及其与纤维包囊之间的结合情况。

2 结 果

2.1 肉眼观

2 周后实验组包囊透明度稍低于对照组之外，其余未见明显区别。

2.2 镜下观（图 2、3）

对照组未见有上皮组织覆盖，而实验组可见类似于假复层鳞状上皮细胞层，上皮细胞层与纤维包囊结合紧密。实验组和对照组的纤维包囊层的组织结构无明显差别。

2.3 结论分析

通过实验我们还观察到注射细胞的量越大，培养时间越长形成的的类似于假复层鳞状上皮的自体复合皮上皮化越明显。

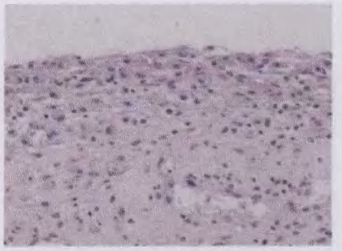


图 2 对照组纤维包囊



图 3 实验组纤维包囊

3 讨 论

创面覆盖是治疗大面积烧伤、严重创伤亟待解决的问题。异体、异种皮的应用弊端很多，在自体皮源奇缺的情况下，组织工程皮肤常常成为首选。然而，理想的组织工程皮肤尚未问世。组织工程皮解决了创面愈合的问题，在一定程度上也起了皮肤的屏障作用，但在形态结构和生理功能上仍然无法与自体皮肤相比。机械性能差，生物相容性差，抗感染能力差，可能传播疾病，构建时间长，价格昂贵等问题的彻底解决尚需要相当漫长的过程[1,2]。

在理想的组织工程皮肤问世之前，利用现有的技术在体内构建自体皮肤不失为一种现实可行的选择。

皮样囊肿、表皮样囊肿形成和生长的机理给作者在体内构建自体表皮以启示，而国内外的文献报道则给作者以可行的依据。Krimmel M 等[3]为预构以尺侧上动脉为营养血管的粘膜瓣，用于修复腭部大型洞穿缺损，将颊黏膜块移植到前臂皮下，黏膜面用硅胶片覆盖，11 周后切开前臂皮肤获取黏膜瓣时发现黏膜上皮在硅胶片周围蔓延生长，并与基底的组织紧密结合。Ahn K M 和 Schuringa M C 等[4,5]在预构皮瓣时也观察到皮肤上皮细胞向四周爬行生长，形成上皮层。焦向阳等[6]以大鼠做实验，在其腹壁埋置皮肤扩张器，2 周后切开皮肤，向扩张囊和纤维包囊之间隙注入培养的角质细胞，3 周后可见扩张器纤维包囊上皮化，可形成双面表皮的游离皮瓣，用于修复颊部洞穿型缺损。

作者首先对扩张器进行了改造，即在扩张囊壁外连接另外一个注射壶，上皮细胞悬液经此路径直接注入扩张囊和纤维包囊之间的间隙。如此既可反复注入细胞悬液，又可避免如焦向阳需切开皮肤注入细胞造成的创伤和感染的可能性。

在体外培养扩增自体皮肤上皮细胞，10 d 后，细胞数量达到 10×10^6 个/ml，将此细胞种植于扩张器与纤维包囊间的腔隙内，2 周后可见上皮细胞在纤维包囊表面呈层状生长，

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1856-03

石蜡包埋与切片染色对大鼠脊髓腰膨大体积的影响

林菁艳[1],彭 彬[2],杨正伟[2],闵 苏[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016;2.川北医学院形态定量研究所,南充 637000)

【摘 要】目的:研究石蜡包埋和切片染色对大鼠脊髓腰膨大皱缩程度的影响。方法:4%多聚甲醛经心脏灌流固定后取大鼠脊髓腰膨大(L_{4-6}),称重、测量长度并以比重法测定其密度。重量除以密度即可得到固定后体积。将腰膨大均分为6段,随机抽取其中一段用石蜡包埋。垂直于脊髓长轴方向切取厚度为14 μm的连续切片。按等距随机原则每15张抽取一张切片,第一张切片在第1~15张中随机抽取。选中的切片HE染色,用VIS体视学设备测定切片面积(A)和染色后厚度(h)。A乘以切片厚度(H=14 μm)即可得到包埋后脊髓腰膨大的体积;A乘以h即可得到切片染色后腰膨大的体积。用包埋后和切片染色后腰膨大的体积除以其包埋前的体积,即为石蜡包埋和切片染色后组织的皱缩系数。结果:组织固定后体积为(96.80±13.85) mm^2,石蜡包埋后体积为(60.19±19.15) mm^2,切片染色后体积为(42.97±16.02) mm^2。石蜡包埋后和切片染色后脊髓的皱缩系数分别为62.9%±20.5%和44.8%±16.6%。结论:石蜡包埋和切片染色后脊髓组织明显皱缩。形态学定量研究必需考虑到组织皱缩对结果的影响。

【关键词】石蜡切片;染色;体视学

【中国图书分类法分类号】R322.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-11

Effects of paraffin embedding and section-staining on contractin coefficient of spinal cord in rats

LIN Jing-yan, et al

(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of paraffin embedding and section-staining on the contraction of rat spinal cord. *Methods*: After fixed by 4% paraformaldehyde through heart perfusion, the lumber intumescentia (L_{4-6}) of rats were separated and weighed. Afterwards, their length and density were also measured, thus the volume can be calculated. Then the lumbar intumescentias were divided into 6 sections equally, and one section was randomly selected and embedded by paraffin, and serially sectioned (14 μm). According to the systematic random sampling principles, sections were sampled per 15 sections, and the first section was chosen from the first 15 sections randomly. These sections were stained by hematoxylin and eosin. The area and thickness of each section was measured

作者介绍:林菁艳(1979-),女,讲师,博士,研究方向:疼痛诊疗与研究。现工作单位:川北医学院附属医院麻醉科。

通讯作者:闵 苏,女,教授,E-mail: minsu89011068@yahoo.com.cn。

光镜下类似于假复层鳞状上皮,与其基底的纤维包囊结合形成与正常皮肤类似的自体复合皮。实验结果显示,用该方法在体内构建自体复合皮是可行的,具有操作简单、费用低廉、耗时较短等优点。如果在细胞培养体系中加入表皮生长因子,细胞数量的扩增速度会加快,耗时将进一步缩短。

作者最近利用所形成的自体复合皮覆盖实验动物创面,结果显示创面的上皮化比对照组显著加速,创面愈合时间明显缩短(将作后续报道)。本研究结果为大面积烧创伤创面的覆盖和预构具有双侧上皮的皮瓣提供了新的治疗思路。

参 考 文 献

[1] Mansbridge J N.Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine[J]. Curr Opin Biotechnol, 2009, 20(5): 563-567.

[2] Theoret C.Tissue engineering in wound repair: the three "R"s-repair, replace, regenerate[J]. Vet Surg, 2009, 38(8): 905-913.

[3] Krimmel M, Hoffmann J, Reinert S.Cleft palate fistula closure with a mucosal prelaminated lateral upper arm flap[J].Plast Reconstr Surg, 2005, 116(7): 1870-1872.

[4] Ahn K M, Kim M J, Lee J H. Prelaminated fasciomucosal flap using tongue mucosa in a rat model[J].J Reconstr Microsurg, 2003, 19(3): 195-201.

[5] Schuringa M, Hartman E, Ruhé P, et al.Pedicled prelaminated capsular flaps for coverage of skin defect in a rat model[J].J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009, 62(2): 230-234.

[6] 焦向阳,刑 新,郭恩覃.利用组织工程的方法预制含双面表皮的游离皮瓣[J].中华显微外科杂志,1999,22(1):262-264.

(责任编辑:关蕴良)