DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.026
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0933-04

论著

人羊膜负载猪角朊细胞重建表皮的形态学研究

闫国和[1],粟永萍[1],艾国平[1],林 远[1],程天民[1],可金星[2],黄文琪[2] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 采用细胞组织工程技术,将人羊膜(Human amniotic membrane, HAM)负载培养猪角朊细胞构建皮肤表皮替代物,并观察猪角朊细胞在HAM上生长增殖的形态特点。方法 将贵州小香猪的角朊细胞原代培养,传代扩增后,接种于HAM基质面,逐日于倒置显微镜下观察角朊细胞的生长增殖变化情况,并于培养3~15 d进行光镜、电镜观察,检测角朊细胞在HAM上的生长情况。结果 接种后30 min内就明显见到角朊细胞在HAM上贴附,24 h内大部分贴附生长,3 d形成单层完全覆盖HAM。结论 HAM是角朊细胞在体外培养的良好载体,对角朊细胞有明显的促增殖作用。

关键词:人羊膜;角朊细胞;形态特点
中图法分类号:R322.991;R329.24 文献标识码:A

Morphological study on human amniotic membrane loading porcine keratinocytes for reconstructing epidermis

YAN Guo-he, SU Yong-ping, AI Guo-ping, LIN Yuan, CHENG Tian-min, KE Jin-xing, HUANG Wen-qi (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the morphological characteristics of human amniotic membrane(HAM) loading keratinocytes for reconstructing epidermis equivalent. Methods The primary cultures of Keratinocytes of Guizhou piglet, were primary cultured subcultured, expanded and bred on the stroma surface of HAM. The growth and proliferation of keratinocytes were observed under invert microscope each day. From the 3rd day to 8th day after culture, the growth of keratinocytes on HAM were examined under light microscope and electron microscope. Results Keratinocytes evidently adhered to the stroma surface of HAM after cultured for about 30 min. Most of keratinocytes were adhered to the stroma surface of HAM within 24 h. Keratinocytes formed monolayer and covered HAM completely within 3 d. Conclusion HAM is a good carrier of keratinocytes cultured on it *in vitro*, and able to promote the proliferation of keratinocytes significantly.

Key words: human amniotic membrane; keratinocytes; morphological characteristics

如何进一步提高对严重创伤的救治水平仍然是临床医学的重要研究课题之一。用组织工程的原理构建或预制皮肤组织是解决大面积软组织及皮肤损伤患者皮源缺乏的一个重要途径。人羊膜(Human amniotic membrane, HAM)为半透明的薄膜,它含有多种促进细胞增殖的营养成分。本研究利用细胞组织工程技术将小香猪的角朊细胞种植在HAM的基质面,观察角朊细胞在HAM上的生长情况,对采用HAM负载角朊细胞构建皮肤表皮替代物修复严重创伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 HAM的处理和制备

HAM取自人HIV, HCV, HBV,以及梅毒等血清反应阴性供者的选择性剖腹产分娩产妇的胎盘。无菌条件下,用无菌生理盐水洗去血凝块,钝性解剖器械分离HAM与绒毛膜,0.25 mol/L NH_4OH反复洗涤,尽量洗去HAM上皮细胞,以消除HAM的免疫源性,再用含抗生素的0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)反复洗涤后,将HAM捆扎于塑料聚酯环(Φ38 mm)上,基膜面朝向环内,用无菌干棉球擦除残余HAM上皮面细胞(以HAM卷膜切片镜检无细胞为准),浸泡于α-MEM培养基中,于4 ℃保存备用[1]。

1.2 角朊细胞的分离、培养

切取贵州小香猪(第三军医大学实验动物中心提供)背部皮肤,分离去真皮,留取表皮,放于含青霉素(200 U/ml)、链霉素(200 U/ml)和两性霉素B(250 μg/ml)的抗生水中浸泡2~3 h,剪碎后用胰蛋白酶(含0.02% EDTA)37 ℃消化1 h,0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)离心(1 200 r/min)洗涤3次,37 ℃,5% CO_2,饱和湿度条件下,采用α-MEM(内含9%的胎牛血清)培养扩增,传代时和生长过程中分别采用反复贴壁法与胶原酶抑制法[2],去除成纤维细胞,留取角朊细胞。

1.3 角朊细胞在HAM上的接种

1.3.1 HAM基质对不同种植密度角朊细胞生长的影响 将不同种植密度(0.93×10^6个细胞/cm^2, 1.63×10^5个细胞/cm^2, 2.85×10^5个细胞/cm^2)的角朊细胞悬液分别添加到由聚酯环支撑的HAM的基质面后,放入培养皿(Φ60 mm)中进行培养,分别进行活细胞观察,卷膜切片光镜观察,扫描电镜观察,比较HAM基质对不同种植密度角朊细胞生长的影响(方法见下)。

1.3.2 合适种植密度的角朊细胞在HAM上的接种 将第2、3代角朊细胞以1.63×10^5个细胞/cm^2的密度接种到由聚酯环支撑的HAM的基质面,放入培养皿(Φ60 mm)中,每个培养皿加入

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
作者简介:闫国和(1968-),男,四川省古蔺县人,硕士研究生,实验师,主要从事组织工程学方面的研究。电话(023)68752278
收稿日期:2002-01-14;修回日期:2002-04-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

15 ml α-MEM(内含 9%的胎牛血清),在 37 ℃, 8% CO_2, 饱和湿度条件下培养。2 d 后用 0.01 mol/L PBS(pH7.2~7.4)洗涤,去除非粘附细胞,尔后每 2~3 d 更换 1 次培养液, 最长培养 15 d。

1.4 HAM 负载角朊细胞的形态学观察

1.4.1 倒置显微镜下观察 HAM 负载角朊细胞的生长情况。

1.4.2 HE 染色观察 取培养 3 d 与 15 d 的角朊细胞 HAM 基质,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)洗涤 2 次,卷膜后,10%的中性甲醛固定 30 min,80%乙醇固定 5~10 min,常规 HE 染色,二甲苯透明,中性树胶封固,光镜下观察。

1.4.3 透射电镜观察 取培养 3 d 与 15 d 的角朊细胞 HAM 基质,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)洗涤 2 次后,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,再以 1%锇酸后固定,逐级丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,LKB 超薄切片机切片,JEM-2000EX 型透射电镜 60 kV 观察、照相。

1.4.4 扫描电镜观察 取培养 3 d 与 15 d 的角朊细胞 HAM 基质,用 0.01 mol/L PBS(pH7.2~7.4)洗涤 2 次后,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,0.1 mol/L PBS 浸洗 2 次,每次 5 min,梯度酒精脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥,镀膜扫描电镜 15 kV 下观察、照相。

2 结果

2.1 HAM 处理后的情况

HAM 经低浓度的氨水处理后经卷膜切片镜检已无细胞成分,处理后的 HAM 能负载角朊细胞良好地生长。

2.2 倒置显微镜下 HAM 促进角朊细胞生长的观察

角朊细胞接种在 HAM 的基质面后,30 min 即见细胞贴附,24 h 内大部分角朊细胞贴附,细胞活力好,3 d 后细胞在 HAM 的基质面呈单层生长,并全部覆盖 HAM 表面,细胞形态为圆形或多角形,见图 1。

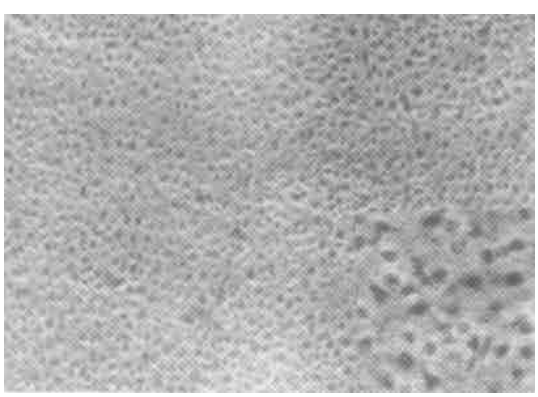


图 1 倒置显微镜下,**HAM** 负载角朊细胞生长 **2 d**,角朊细胞已全部覆盖 **HAM**(× **33**)插图为高倍像(× **66**)

Fig 1 Keratinocytes completely covers HAM 3 d after loading Inverted microscope(×33). Iconograph reveals the magnified picture(×66)

2.3 光镜、电镜下 HAM 促进角朊细胞生长的观察

光镜下,HAM 负载角朊细胞生长 3 d 卷膜切片,HE 染色可见角朊细胞在 HAM 基质面粘附呈单层生长,细胞扁平排列紧密,核椭圆深染, 呈连珠状,见图 2。

扫描电镜下,HAM 负载角朊细胞生长 3 d,角朊细胞在 HAM 的基质面单层生长,细胞呈多边形,铺砖样排列,表面伸出许多突起相互接触,见图 3。



图 2 右:**HAM** 负载角朊细胞 **3 d** 卷膜切片, 角朊细胞在 **HAM** 上良好生长(↑)(**HE**× **33**) 左:去除上皮细胞的 **HAM**(**HE**× **33**)

Fig 2 Keratinocytes growing fine on HAM(↑)in section of breeding about 3 d (Right, HE× 33). Left iconograph reveals HAM without epithelial cells(HE×33)

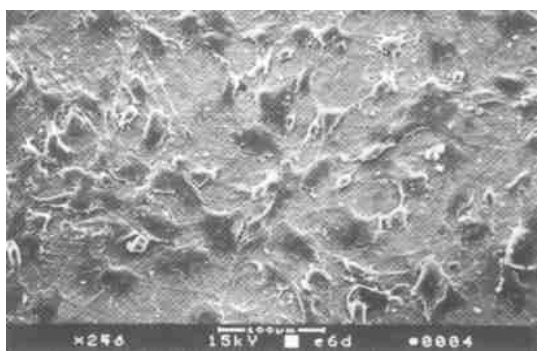


图 3 **HAM** 负载角朊细胞 **3 d**, 胞体呈多边形, 多见胞膜突起(**SEM** 标尺= **100** μm)

Fig 3 Polygon-shaped keratinocytes with many protuberances of membrane 3 d after HAM loading(SEM, Scale= 100 μm)

透射电镜下, HAM 负载角朊细胞生长 3 d, 角朊细胞切面呈扁平长梭形,胞核处较厚;核呈椭圆形,核膜不规则;常染色质比较丰富,异染色质成小团块;胞质非常丰富,内有大量的角质丝,有的角质丝呈束排列;另见少量扩张的粗面内质网和线粒体;细胞膜表面有许多长短不一的突起,尤其基面突起紧贴 HAM,并深入其中,见图 4、5。

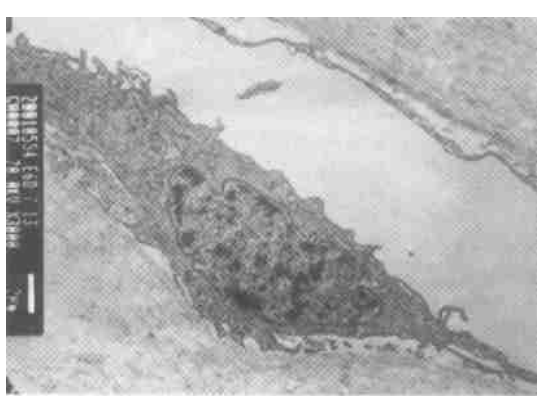


图 4 **HAM** 负载角朊细胞 **3 d**, 角朊细胞与 **HAM** 粘附良好(**TEM** 标尺= **1** μm)

Fig 4 Keratinocytes showing better adhesiveness 3 d after HAM loading(TEM, Scale= 1 μm)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

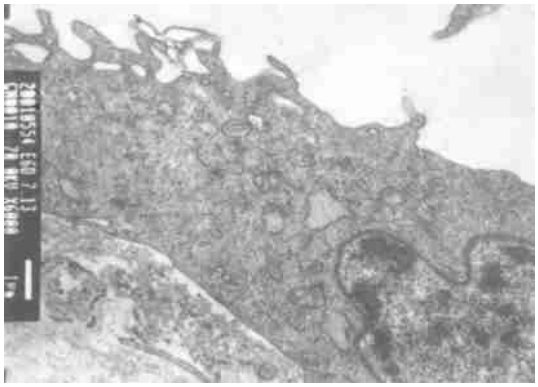


图 5　HAM 负载角朊细胞 3 d. 可见生长在 HAM 上的角朊细胞内有许多角质丝(标尺=2μm)

Fig 5　Many keratinofilaments in keratinocytes 3 d after HAM loading (Scale=2 μm)

2.4　HAM 负载不同种植密度的角朊细胞生长的比较性观察

将细胞以不同的密度接种在由聚酯环(Φ38 mm)支撑的 HAM 的基质面进行观察, 观察 0～15 d, 结果发现。

倒置显微镜下, 以 0.93×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞排列不规则、稀疏, 间距大。以 1.63×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞生长排列规则, 密度适中, 轮廓清楚。以 2.86×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞拥挤生长, 多见非贴附细胞, 随时间的推移, 细胞老化较快, 细胞碎屑多见。

卷膜切片 HE 染色可见, 以 0.93×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞在 HAM 的基质面稀疏散在, 间距较大, 核深染。以 1.63×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞在 HAM 的基质面排列间距适度, 核深染, 呈连珠状。以 2.86×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞在 HAM 的基质面排列拥挤, 紊乱, 核深染, 呈密集的连珠状。

扫描电镜下, 以 0.93×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞在 HAM 的基质面分散单个, 间距较大呈多边形。以 1.63×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞在 HAM 的基质面呈多边形, 铺砖样排列, 表面伸出许多突起相互接触。以 2.86×10^5 个细胞/ cm^2 的密度接种的角朊细胞, 细胞在 HAM 的基质面因拥挤而隆起生长, 多见细胞碎屑。

羊膜负载角朊细胞生长至 15 d, 在倒置显微镜和扫描电镜下均可见, 细胞因过于拥挤而隆起, 因老化而形成较多碎片, 部分细胞有空洞形成。

3　讨论

随着组织工程技术的发展, 将体外培养的功能细胞与适当的细胞外基质(Extra cellular matrix, ECM)相结合, 然后将其移植到体内病损部位, 在 ECM 逐步降解过程中, 种植的细胞通过增殖分化可形成具有特殊功能的活性组织[3], 其中采用组织工程学(Tissue engineering, TE)的方法构建皮肤组织是其典型的代表之一。构建皮肤需要选择合适的生物材料作 ECM, 它既要有效地促进所负载细胞的功能, 又要能诱导创面基底的纤维血管组织长入, 而且要在新生皮肤成熟后自动降解, 无免疫原性, 整个过程中无炎性反应, 并确保不携带任何致病原[4]。

目前在组织工程中用作细胞外基质的生物材料主要是一些天然高分子、天然无机物和合成高分子。天然高分子及天然无机物一般都具有无毒、亲水性、生物相容性及细胞亲和性好的特点。合成高分子的生物相容性及细胞亲和性一般不如天然高分子[5]。HAM 是一种天然高分子生物材料, 含胶原、糖蛋白、蛋白多糖、整合素和版层体等多种成分, 它表达多种生长因子及其 mRNA 的相关蛋白, 能为细胞的增殖、分化提供丰富的营养成分, 有利于细胞的生长繁殖[6,7]。为此, 本研究选取 HAM 作负载角朊细胞的 ECM。

HAM 经低浓度的氨水处理后其细胞成分已不复存在, 如此处理的 HAM 能消除 HAM 上皮细胞成分的免疫源性, 有利于角朊细胞在其上良好生长, HAM 是角朊细胞的良好载体。HAM 经处理后异体移植不诱导排斥反应, 是一种易得的天然生物材料, 也易于加工处理和运输, 它拟将在 TE 中发挥积极的作用。

理想的皮肤代用品应该含有真皮与表皮替代成分。有研究表明[8,9], 虽然自体角朊细胞膜片治疗皮肤缺损成活尚好, 但其质地及组织学结构欠佳, 创面愈合后瘢痕增生严重, 抗感染能力差, 且太薄易磨损和破溃, 因此, 自体角朊细胞膜片不适用于全层皮肤缺损创面。我们在采用 TE 技术将 HAM 负载骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)成功构建皮肤真皮替代物的基础上[10], 又选用角朊细胞作 TE 的种子细胞, 将 HAM 负载角朊细胞, 探讨构建皮肤表皮替代物的方法, 以期所构建的表皮替代物能克服角朊细胞膜片薄、不耐磨、易破损等缺点。

从皮肤中分离出的角朊细胞, 原代培养扩增, 传至第 2 代或 3 代获得足够量的细胞后, 就可种植于 HAM 基质面。但角朊细胞要在羊膜上良好生长, 需要合适的接种密度, 接种密度过大, 角朊细胞缺乏应有的生存空间, 非贴附和死亡细胞增多; 接种密度过小, 细胞间间隙过大, 细胞因缺乏应有的相互接触而不能良好生长。本研究找到其合适的接种密度为 1.63×10^5 个细胞/ cm^2。

角朊细胞接种在羊膜的基质面后很快贴附。24 h 内几乎全部角朊细胞贴附生长, 细胞活力好, 48 h 融合为单层, 第 3～12 天可见角朊细胞在羊膜的基质面良好生长。羊膜负载角朊细胞生长 3～8 d, 细胞形态结构良好; 而羊膜负载角朊细胞生长至 15 d, 细胞因过于拥挤而隆起, 因老化而形成较多碎片, 部分细胞有空洞形成。因此提示将羊膜负载角朊细胞构建表皮替代物移植到创面局部的时间大约在 2～4 d。移植时间过早, 因细胞未在羊膜上牢固粘附, 在进行移植手术时, 细胞会脱落; 移植时间过晚, 细胞虽在羊膜上牢固粘附, 但细胞会因老化而使修复组织的能力大大降低。

本研究将小香猪的角朊细胞种植在 HAM 的基质面, 观察了角朊细胞在 HAM 上的生长情况, 以此对采用 HAM 负载角朊细胞构建皮肤表皮替代物进行了探

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨。将进一步研究把运用 HAM 负载角朊细胞所构建的表皮替代物与已运用 HAM 负载 MSCs 所构建的真皮替代物[10] 共同移植到难愈性创面局部，以期此替代物能有效促进该创面的愈合。

参考文献：

[1] Goto Y, Noguchi Y, Nomura A, *et al*. *In vitro* reconstitution of the tracheal epithelium[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(2): 312－318.

[2] 鄂 征 主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：出版社, 1999. 135－136.

[3] 汪滋民，焦向阳，邢 新. 皮肤组织工程[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(4): 241－244.

[4] 杨国忠，池 慧. 组织工程及其在医学中的应用研究进展[J]. 世界医疗器械, 1997, 3(2): 41－54.

[5] 王身国. 可生物降解高分子的类型、合成和应用[J]. 化学通报, 1997, 2: 45－47.

[6] Koizumi N J, Inatomi T J, Sotozono C J, *et al*. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(3): 173－177.

[7] 闫国和，艾国平，粟永萍. 羊膜促进间质干细胞表皮细胞生长的形态特点[J]. 中国临床康复杂志, 2002, 6(6): 814－815.

[8] Madden M R. Grafting of cultured allogeneic epidermis on second and third degree burn wounds on 26 patients[J]. J Trauma, 1986, 26(1): 955.

[9] 崔正军，陈 璧，汤朝武，等. 培养的自体角朊细胞膜片与异体真皮重组复合皮移植的实验研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 15(2): 109－114.

[10] 闫国和，粟永萍，艾国平，等. 人羊膜负载猪骨髓间充质干细胞生长的形态学研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(7): 775－777.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)08-0936-01

38 例老年病人心脏不停跳手术体外循环管理

Management of cardiopulmonary bypass in beating heart for elder patients

胡 卫，肖颖彬，刘 梅，彭 莉 （第三军医大学附属新桥医院心血管外科，重庆 400037）

38 例患者中，男 17 例，女 21 例。年龄 60～65 岁，（平均 63±2.09），38 例患者中包括主动脉瓣和二尖瓣置换术 4 例，二尖瓣膜置换术 19 例，主动脉瓣置换术 11 例，主动脉瓣成形术 1 例，左房粘液瘤摘除术 1 例，瓦氏窦瘤破裂修补术 2 例。术前心功能Ⅲ级 32 例，Ⅳ级 6 例，心胸比 0.58～0.84。

全组均采用浅低温中度血液稀释体外循环，心脏不停跳下手术。预充液以林格氏液为主，按体重计算加入氯化钾，甘露醇，碳酸氢钠，地塞米松，清蛋白等。血球压积为 22%～25%，晶胶比为(0.4～0.5)∶1。行主动脉瓣置换术需阻断升主动脉，并用温血行冠状静脉窦逆行持续灌注。

38 例患者体外循环时间为(121±40) min，阻断上下腔时间(换主动脉瓣时阻断主动脉)(75±19.74)min。36 例在心脏空跳下进行手术，2 例术中发生心室纤颤，均电击复律。无 1 例死亡。

讨论

老年心脏的特点：①心肌细胞的退行性变，心肌细胞数量减少，体积增大；②心脏左心室顺应性降低，舒张末期充盈增加；③心脏瓣膜的退行性改变；冠状动脉扭曲和粥样硬化。故对老年心脏手术病人应首选浅低温不停跳的 CPB 方法。此术式减轻了低温心脏停跳 CPB 存在的心肌缺血缺氧性损害和再灌注性损伤，不需灌注心脏停搏液，对心脏损伤较轻[1]。手术时间较短，多不需要进行心脏复苏，对机体全身生理干扰少[2]，也不会影响大脑功能和造成脑损害。措施：①转流前加热预充液，使其温度达到 30～32 ℃，减少和避免因预充液温度太低造成心律失常甚至室颤；②建立 CPB 并行循环后先行上腔静脉引流，避免同时开放上下腔静脉引流引起的血容量骤减，造成血流动力学紊乱；③采用较高流量灌注，使平均动脉压维持在 8.0 kPa 以上，确保重要器官血供；④CPB 期间鼻咽温度维持在 30～32 ℃，这样既能降低组织氧耗，减少各重要器官的缺氧性损害，又能避免和减少低温所带来的不利影响；⑤严格控制晶体预充量，使晶胶比维持在(0.4～0.5)∶1。早期应用速尿改善肾血流量预防急性肾功能衰竭的发生。对出现灌注肺，少尿或无尿的患者在积极治疗的同时使用血液过滤器。对有糖尿病的患者术中检测血糖，酌情给予糖液和补充胰岛素，使血糖的水平控制在 120～200 mg/dl；⑥每 30 min 检测一次血气，同时注意呼吸道阻力以防止灌注肺的发生。对有肺功能不全的病人，可使用皮质激素类药物，抑制粒细胞向肺部转移，阻止炎症介质和补体参与炎症反应，此外，前列腺素(PGE_2)也可以选用。及时纠正转流中出现的酸中毒。

关键词：老年人；心脏不停跳手术
中图法分类号：R654.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 蒋宗滨，胡振快，林 辉 等. 心脏不停跳下心脏换瓣术的麻醉和灌注[J]. 中华麻醉学杂志, 1996, 16(11): 535－538.

[2] 韦世锋，郑陈光，周华富，等. 常温心脏不停跳心内手术 43 例报告[J]. 广西医科大学学报, 1994, 11(2): 179.

（编辑 陈聪连）

作者简介：胡 卫(1961－)，女，四川省乐山市人，主管技师，主要从事体外循环灌注方面的研究，发表论文 9 篇。电话：(023)68755000－74607

收稿日期：2001-05-08；修回日期：2002-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net