DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.050
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0225-02

技术方法

-20 ℃不结冰抗冻液保存人体皮的实验研究

An experimental study on preservation of human split thickness skin samples with -20 ℃ non-freezing composite cryoprotective solution

王锡华,吴 军,张 宁,陈希炜,周立新,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 对研制的-20 ℃不结冰的抗冻液-20 ℃保存人体皮的效果进行探讨。方法 测定皮肤琥珀酸脱氢酶(SDH)、皮肤组织块培养生长年、人-鼠皮肤移植成活率及成活期、表皮细胞与淋巴细胞混合培养、HLA-DR及CD86抗原测定等方法,对该抗冻液保存人体皮的保存效果、抗原性变化进行研究。结果 该抗冻液保存人体皮(-20 ℃条件下)2月内皮肤质量仍较好。冷冻皮肤免疫原性下降,但HLA-DR表达没有显著变化,而CD86表达显著降低。结论 ①该方法可保存人体皮2月。②冻存皮肤的抗原性下降的原因与CD86抗原分子减少有关。

低温保存活体皮肤延迟应用已成为大面积深度烧伤治疗的有效手段之一。虽然用液氮保存皮肤取得了比较好的效果,但因其要求有液氮容器及定期补充液氮,费时费力,且成本高,又不便于运输,而不利于皮肤保存的普及。冰晶是冷冻损伤的关键因素[1]。若能设计一种简便易行、在较低温度不结冰的低温保护剂来保存皮肤,则可能避免冰晶所致的损伤。根据这种设想,我们用多种抗冻剂相互组合,经大量的筛选,提出了一种-20 ℃条件下不结冰的抗冻液(-20 ℃NFCS),并观察该抗冻液对人体皮的保存效果及抗原性的变化。

1 材料与方法

1.1 人体皮的保存及复温

0.3~0.4 mm的断层人体皮在4 ℃经-20 ℃NFCS渗透10 min后,置于-20 ℃保存(BCD203A,三洋冰箱,日本)。对照组为传统液氮保存。使用前用大量37 ℃的0.01 mol/L PBS快速复温。

1.2 人体皮的保存效果检测

人体皮保存1周,1、2、3月,复温后,测定皮肤的活力。包括皮肤的琥珀酸脱氢酶(SDH)活性(按改良Hershey法[2])、皮肤组织培养的生长率、人-鼠皮肤移植第7天的成活率。

1.2.1 皮肤组织块培养

0.3 cm×0.3 cm的皮块的真皮面贴于培养平皿上,加DMEM/F_{12}完全培养基,1周后观察皮块周围有无上皮细胞生长。计算能生长上皮细胞的皮块占接种贴壁皮块的百分率。

1.2.2 人-鼠皮肤移植实验

250~300 g Wistar大鼠,麻醉后于背部造成3×4 cm创面,-20 ℃及液氮储存皮肤移植于创面上。第7天观察移植皮肤存活率。以移植物发红、起水疱、结痂、变硬视为排斥,记录皮片80%以上被排斥时的时间。

1.3 -20 ℃及液氮保存皮肤的抗原性测定

体外用表皮细胞与异体淋巴细胞混合培养实验,在体用人-鼠皮肤移植实验,并用免疫组织化学及图像分析测定表皮细胞膜表面的HLA-DR与CD86的表达。以新鲜皮肤为对照。

1.3.1 表皮细胞与人外周血淋巴细胞混合培养(MSLR)

参照文献[3]。用^{3}H-TdR掺入,收获细胞,用液体闪烁计数仪测定cpm值。

1.3.2 细胞涂片及免疫组化

用涂片离心机将表皮细胞制成细胞量为2×10^5/张的细胞涂片,HLA-DR和CD86免疫组化按ABC法[4]进行。用图像分析仪测定每个高倍视野内的阳性细胞的光密度值。

2 结果

2.1 -20 ℃保存人体皮的效果,见表1

表1 保存时间与人体皮的活力

储存时间	-20 ℃保存组			液氮保存组		
	SDH(%)	皮块培养生长率(%)	移植成活率(%)	SDH(%)	皮块培养生长率(%)	移植成活率(%)
0 d(正常皮)	100	100	78.5±4.12	100	100	78.5±4.12
1周	87.14±3.83*	81.13±7.04	72.5±5.89*#	80.64±7.50	79.44±7.82	62.0±11.11#
1月	61.24±6.73*	77.34±7.94	58.5±10.29*#	78.23±13.39	76.55±8.76	63.5±10.02#
2月	50.71±5.40*	69.22±8.49	52.0±8.23*#	71.94±7.22	76.72±6.61	61.0±11.25#
3月	37.63±7.66*	0	0	74.93±6.97	74.61±8.63	62.0±12.51#

*:$P<0.05$ 组间比较;#:$P<0.05$ 与正常皮比较

-20 ℃保存组SDH活力随时间延长而下降,保存1周SDH活力比液氮组高,而1周后各时相点SDH均较液氮组低;-20 ℃保存2月内及液氮保存3月内皮肤均可生长出上皮细胞。-20 ℃保存1周移植成活率与新鲜皮相差不显著,但随时间延长移植成活率下降。

作者简介:王锡华(1966-),男,浙江省金华市人,硕士,主治医师,主要从事皮肤低温生物学和创面愈合方面的研究,发表论文12篇,现在兰州军区乌鲁木齐总医院烧伤整形科,乌鲁木齐 830000。电话:(0991)4992101-347

收稿日期:2001-01-06;修回日期:2001-07-10

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

2.2 冷冻保存皮肤的抗原性变化，见表 2

表 2 冻存人体皮抗原性变化

	正常皮	－20 ℃保存组	液氮保存组
MSLR(cpm)	30 912±2 805	23 775±2 660 #	23 608±2 069 #
移植成活期(d)	12.4±1.8	14.6±1.1 #	15.2±0.8 #
HLA-DR(D_k)	14 207±3 254	14 404±1 423	14 482±2 782
CD86(D_k)	9 228±824	8 101±1 980 #	8 428±1 513 #

#: $P<0.05$ 与正常皮比较

－20 ℃和液氮保存皮肤的表皮细胞刺激异体淋巴细胞增殖反应明显比新鲜皮组弱，而前两组之间没有显著性差异；表皮细胞涂片免疫组化经图像分析仪测定，HLA-DR 在正常组、－20 ℃及液氮保存组的表达没有显著性差异。而 CD86 在－20 ℃组、液氮组的表达比正常组显著低，而前两组没有显著性差异；－20 ℃组及液氮组比新鲜皮移植成活期延长，而前两者没有显著性差异。

3 讨论

3.1 －20 ℃NFCS 保存皮肤的优、缺点

该抗冻液对人体皮－20 ℃保存 2 月内的皮肤质量较好，皮块培养能生长，移植成功率高，是一种简便易行的皮肤保存方法。传统液氮保存，要求有液氮容器及液氮来源，要定期补充液氮，费时费力，且成本高，不利于皮肤保存的普及。而该方法只需普通冰箱，设备简单，方法简便、省时省力，成本低廉。适用于一些基层单位短时间内储皮，或保存手术中剩余的自体皮，短期内使用。其缺点是－20 ℃保存人体皮活力随保存时间的延长而下降。原因有待于进一步研究。

3.2 冷冻保存皮肤抗原性下降与 CD86 分子减少有关

文献[5]研究已表明，冻存皮肤移植排斥显著推迟，皮肤中引起移植排斥反应的 Langerhans 细胞(LC)数目并没有改变，其机制不清。HLA-DR 在皮肤中主要分布于 LC 与内皮细胞[6]。本实验的免疫组化显示，－20 ℃、液氮保存的皮肤与正常的新鲜皮之间 HLA-DR 抗原表达均没有显著性差异。而－20 ℃及液氮保存皮肤的 CD86 抗原显著低于正常皮，提示了冷冻保存后皮肤的免疫原下降可能与冷冻后皮肤 LC 膜表面 CD86 抗原的丢失有关。文献[7]研究发现，T-细胞与 APC 细胞相互作用，需要 T-细胞表面的 TCR 与 APC 表面的 MHC-抗原多肽的识别作为第一信号，T-细胞表面的 CD28 与 APC 的 CD86 相结合作为第二信号，如缺乏 CD86-CD28 的共刺激途径将导致 T-细胞克隆无能。

关键词：皮肤保存；低温保护剂；组织培养；HLA-DR 抗原；CD86 抗原

中图法分类号：R318.52；R322.99 文献标识码：B

参考文献：

[1] Zieger M A, Tredget E E, McGann L E. Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection in split-thickness skin[J]. Cryobiology, 1996, 33(3): 376－389.

[2] 朱兆明，王淑英，孟庆珍. 低温储存皮肤研究(二)：人体皮肤内琥珀酸脱氢酶的定量测定[J]. 中国人民解放军军医进修学院学报，1980，增刊 2：55－57.

[3] 杨景山 主编. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1990. 7－8.

[4] 蔡文琴，王伯弢 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1995. 121－124.

[5] Ingham E, Matthews J B, Kearney J N, *et al*. The effects of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogeneic skin grafts[J]. Cryobiology, 1993, 30(5): 443－458.

[6] Rico M J, Streilein J W. Comparison of alloimmunogenicity of Langerhans cells and keratinocytes from mouse epidermis[J]. J Invest Dermatol, 1987, 89(6): 607－610.

[7] 范祖森. 共刺激信号与免疫耐受[J]. 国外医学：免疫学分册，1997，20(5)：224－227.

(编辑 冯崇英)

技术方法

文章编号：1000-5404(2002)02-0226-01

金属冠桥铸造技术的部分改进

Modification of techniques for casting crown and bridge

温秀杰，练 兴，刘鲁川 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所口腔科，重庆 400042)

提 要：目的 通过对传统的铸造技术进行部分改进，以提高铸件组织面的光洁度、减少桥体的变形。方法 选择需冠、桥修复的病人 40 例，为实验组；用琼脂复制上述 30 例桥体模型，作为对照组。结果 实验组的铸件组织面光洁程度明显高于对照组，而实验组的桥体变形程度显著低于对照组。结论 本实验对传统铸造技术所作的部分改进方法能在一定程度上改善铸件组织面的光洁程度和降低桥体的变形。

桥体变形、组织面不光滑一直是影响铸件就位的主要因素之一[1,2]。本实验针对这一因素，介绍了对传统的铸造技术所作的部分改进方法。

1 材料和方法

1.1 材料

选择需冠、桥修复的病人 40 例(年龄 15～41 岁，男 22 例，

作者简介：温秀杰(1973－)，男，辽宁省桓仁县人，医师，主要从事口腔修复方面的研究。电话：(023)68000525

收稿日期：2000-10-18；修回日期：2001-01-05

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