DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.011

真皮培养及覆盖创面的观察*

王 旭** 吴 军 路淑珍 赵雄飞 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038

提 要 目的: 重新认识真皮的重要性和可利用性,寻找符合生物效应的创面覆盖物。方法: 用断层真皮进行体外培养,通过玫瑰红染色、HE染色动态观察培养前后及移植动物创面后的组织形态学改变。结果: 真皮培养后,附件增殖活跃,表面逐渐表皮化,可形成复层。移植小鼠全层皮肤缺损创面效果满意。结论: 真皮在一定培养条件下可以重新生发表皮层,形成最接近皮肤结构的创面覆盖物。培养后的真皮抗原性、免疫原性降低,容易被创面接受并加速创面愈合。

关键词 皮肤移植;真皮培养;灼伤/外科手术
中图法分类号 R622.1

通常,浅II度烧伤创面表皮受损后,不进行植皮,依赖残存的皮岛及真皮内未损伤的皮肤附件,就可以重新生发表皮细胞,恢复皮肤的完整性。此现象提示断层真皮的再生性和可利用性。Ono等[1]曾对手术中获取的真皮进行体外培养,用于自体移植可达到完全上皮化的目的。作者利用断层真皮进行体外培养,对培养前后的形态学变化及创面移植进行了观察。

1 材料和方法

1.1 制备断层真皮

新鲜尸体皮,去除表皮层及皮下脂肪,保留 0.3 mm真皮。修剪成 3 cm× 4cm皮片,原表皮细胞侧向上放入培养皿。培养基 DMEM/F12(3∶1),含 10%灭活小牛血清,氢化考的松 0.5 μg/ml,胰岛素 5μg/ml,EGF 5 ng/ml,(SIGMA公司产品),培养条件: 37℃、5% CO_2培养箱,隔日换液。

1.2 动物移植

BALB/c纯系小鼠 (第三军医大学动物研究所提供) 8只,体重 (30± 5) g,室温单笼喂养 1周,随机分为 2组。

1.2.1 真皮培养后移植 0.25%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (50μg/kg)。分离全层皮肤至筋膜上,切除面积为 1.5 cm× 3 cm,以凡士林油纱为载体,将培养 20 d左右的真皮植入创面,4周略加固定,单笼喂养。

1.2.2 对照组 造成相同面积的全层皮肤缺损创面,不移植培养真皮,只覆盖凡士林油纱,略加固定,单笼喂养,任其自然愈合。

1.3 观察指标

分别留取培养前及培养后 6 d、10 d、15 d、20 d、30 d真皮标本,10%福尔马林溶液固定 48 h以上,石蜡包埋切片,HE染色。各时相标本经 10%福尔马林溶液固定,2%玫瑰红染色 30 min,将多余染液漂洗干净。解剖显微镜下观察真皮生长状况,每天观察 BALB/c小鼠移植创面。定期活检,HE染色,组织学观察。

2 结果

真皮培养前后的形态学的变化: 经 HE染色证实,断层真皮培养前缺乏表皮细胞结构,但有皮脂腺,毛囊及汗腺等皮肤附件。培养 6 d,可见皮脂腺肥大,汗腺及毛囊根部增殖活跃,表面逐渐表皮细胞化。培养 10 d,皮肤附件的表皮细胞向真皮表层延伸。随培养时间延长,断层真皮表面可被新生表皮细胞覆盖,见图 1。表皮细胞以 1~2层为主,并与真皮内皮肤附件上皮细胞相连,部分区域见有角质层,皮下胶原纤维呈网状,内部未见细胞成份。

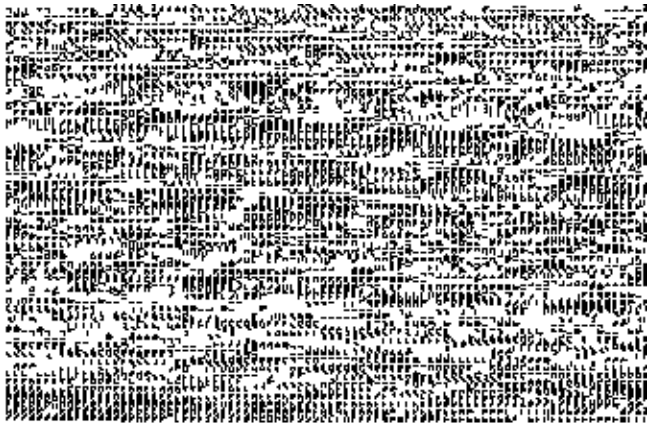


图 1 真皮培养后 15 d,表面被新生表皮细胞覆盖 (HE× 200)

Fig 1 Surface of the dermis covered by proliferated epidermal cells 15 day after culture (HE× 200)

玫瑰红染色显示,培养 6 d,显微镜下见断层真皮内着色部

* 全军"九五"医药卫生科研基金项目, No. 96L043
** 王 旭,女,42岁,主管技师

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

分为表皮细胞,呈红点状。随培养时间延长,表皮细胞逐渐扩展,直至肉眼可辨的红色集落。

移植创面观察:试验组移植物与创面贴附紧密,无渗出。移植后 3 d,断层真皮呈现粉红色,略有光泽,触之柔软有弹性。5 d时移植物与创周正常皮肤相吻合,麻醉下分离移植真皮,可见新建立的毛细血管网分布于上。15 d左右活检时发现新生鼠皮在创面与移植物间移行生长,且与培养真皮贴附紧密,剪之可见出血。此现象持续到创面全部愈合,移植的异种真皮自然脱落。

培养真皮移植 10 d后组织活检,见新生表皮细胞沿真皮与肉芽组织间生长。20 d时新生表皮细胞部分基底层由平坦逐渐呈现皱折状,并向真皮组织延伸,同时可见毛囊断面及核分裂相,见图 2 随时间延长,新生表皮细胞可达 6~7层,纤维排列呈现旋窝状,方向不一。至 50 d时,表皮细胞基底层皱折增多,并有加深的趋势。残留移植真皮的创面,从切片上仍可见到移植物及其下的肉芽组织,真皮内有大量坏死的炎细胞。

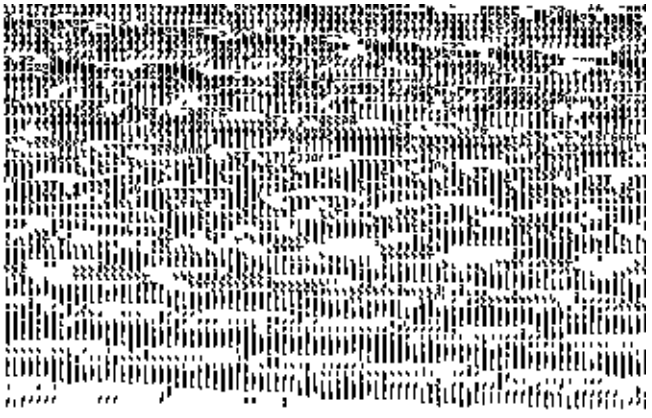


图 2 培养真皮移植后 **20 d**,部分基底层呈现皱折,可见毛囊断面及核分裂相 (HE× 200)

Fig 2 On the 20th day after transplantation, extension of part of the matrix to the dermis, cross sections of the follicles and mitosis were seen in the cultured dermis (HE× 200)

对照组全层皮肤切除后,创面在一定时间内可自然愈合,但鼠毛覆盖新生皮肤时间要晚于试验组 15 d左右。

组织切片显示,新生表皮细胞由创缘向创面延伸,匍行于表层坏死组织及肉芽组织之间。20 d时切片未见到皮肤附件或附件样结构,基底层平滑,纤维结缔组织较少(新生上皮与肌层间结缔组织层薄)。

3 讨论

长期以来,如何解决大面积烧伤患者的创面覆盖,颇为人们所重视。从单纯培养表皮细胞膜片,到各种形式的人工皮制作,不断的实践使人们逐步认识到真皮的重要性和可利用性。Ono[1]曾对手术中获取的真皮进行体外培养,发现在适当的条件下,2周左右真皮表面可被表皮细胞全部覆盖。用于自体移植可达到完全上皮化的目的,并有效地防止疤痕形成。目前更多的人是将异体真皮甚至异种真皮作先行处理,去除皮肤附件后,与培养的自体表皮细胞共同移植,或以此为底物进行表皮细胞培养[2,3]。我们将细胞培养技术与表皮细胞培养后异体移植的经验结合起来,观察了真皮培养前后的变化,并移植于小鼠全层皮肤缺损创面。

真皮经过培养,毛囊及汗腺根部增殖活跃,上皮细胞不断延伸直达真皮表层,15 d左右即可形成较为完整的,具有皮肤样结构的培养物。

在动物身上进行异种皮肤移植,一般于 2周左右即被排斥。而将培养后的真皮移植在小鼠创面,能在短时间内建立血运并与周围正常皮肤衔接,至 50 d创面完全愈合,移植物自然脱落。这与真皮的免疫原性及体外培养后抗原性逐渐降低有关[4,5]。进一步从组织学观察证实,移植培养真皮,创面新生表皮基底部由平坦渐呈现曲折,同时见到毛囊面及核分裂相,而对照组在同期仅表现为处于增殖状态的复层表皮细胞,基底部平坦未见到毛囊;从动物外观看,试验组表皮细胞边贴附培养的真皮生长,边有鼠毛将其顶开,是边愈合边取代的方式,而对照组创面愈合同鼠毛生长时间并不相对一致,要晚 15 d左右才看到创面被短小的新生鼠毛所覆盖。因此,有理由认为培养后的断层真皮具有帮助恢复创面的血液供给,避免感染和再暴露,促进新生表皮细胞生长,促使创面良好修复的作用。

参考文献

1 Ono I, Gunj H, Maruyama K. Studies of tissue cultured sliced dermis as a skin substitute. Burns, 1993; 19(4): 283

2 张余光,王文正,郭恩覃.混合表皮细胞培养及其组合皮移植研究.中华整形烧伤外科杂志,1993; 9(1): 37

3 方承辉, Ropp E C,于光曙等.纤维母细胞生长因子对复合皮移植成活和收缩的影响.中华整形烧伤外科杂志, 1993; 9(1): 41

4 Wu J, Barisoni D, Armato U. An investigation into the mechanisms by which the human dermis does not significantly partake to the rejection of allo-skin grafts. Burns, 1995; 21(1): 11

5 赵阳兵,王旭,路淑珍等.聚合酶链反应与培养表皮细胞异体移植结果的判定.中华外科杂志, 1995; 7(33): 387

(收稿: 1997-01-05;修回: 1997-12-15)

(编辑 冷怀明)

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

Observation on cultured dermal flaps used as wound coverage in mice*

Wang Xu, Wu Jun, Lu Shuzheng, Zhao Xiongfei (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To reexplore the importance and usefulness of the dermis to seek a wound coverage corresponding to proper biological effects. Methods: After the dermis was extracted from the mice and cultured *in vitro*, the histomorphological changes of the dermis after culture and its transplantation of surface of wound were dynamically observed with rose bengal and HE staining. Results: After the dermis was cultured, its appendages actively proliferated and its surface was gradually truned into epidermis. Satisfactory results were achieved after the dermis was transplanted onto the full-thickness skin defects in mice. Conclusion: Under the appropriate culturing condition, the dermis can regerminate the epidermis to provide wound coverage with similar structure to the skin. The antigenicity and immunogenicity of the cultured dermis were decreased so that the dermis is easily accepted by the surface of wound.

Key Words dermis; culture; transplantation; mouse

* This project was supported by the "Ninth Five" obligatory budget of PLA, No. 96L043

9160例患者 D抗原检测及配血分析

Analysis of antigen D detection and matching of blood in 9160 cases

吴 毅** 肖瑞卿 林武存 (第三军医大学附属西南医院输血科) 重庆, 400038

我们对9160例来我院治疗需输血的患者在鉴定 ABO血型同时,加作 Immucor盐水抗 D血清对其红细胞 D抗原进行检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗 D血清来源 美国 Immucor盐水抗 D血清由浙医宏康公司提供。

1.1.2 标本采集 均采自患者静脉血,用双草酸抗凝剂抗凝。

1.1.3 调查对象 随机检测第1次需输血的全国各地的患者。

1.1.4 对照组 健康献血员5226例[1]。

1.2 方法

1.2.1 D抗原检测 红细胞 1滴 (火柴头大小)加 Immucor盐水抗 D血清 1滴于玻板上,用玻棒混匀,放置 5 min观察结果。遇有疑问,吸出 1滴, 1000 r/min离心 1 min,观察结果,并加用其它型号试剂重复检测。

1.2.2 交叉配血试验 采用木瓜酶法,凡木瓜酶法凝集者,加做抗球蛋白试验。

2 结果

9160例患者中发现21例 D抗原阴性, Rh阴性表现型占0.23%,而 Rh(D)抗原阳性表现型占99.77%。对照组 Rh阴性表现型占0.19%,而阳性表现型为99.81%[1]。对 Rh阴性患者我们做了交叉配血试验,其中3例木瓜酶法发生凝集,占阴性中的14.29%,进一步检查抗体特异性,其性质均为抗 D抗体。

3 讨论

在我国汉族人中, Rh阴性表现型占0.4%[2],而我们检测占0.23%,故产生抗 D抗体的频率很低。即使患者是 Rh阴性有抗 D抗体,我们在做交叉配血试验时会出现凝集,就会进一步检查抗体的特异性,而不会将含有该抗原的血输给患者,因此,除盐水配血外,加用能检测不完全抗体的配血法,如木瓜酶,凝聚胺,抗球蛋白法等,在汉族地区输血前检查 Rh血型可免去[3]。既节省人力物力,也可减轻患者的经济负担。

在只用盐水交叉配血试验未做不完全抗体检测的地区,输血前最好做抗 D抗体检查,因为即使 Rh阴性表现型出现的频率很低,倘若患者血液中有抗 D抗体,也可引起严重的溶血性输血反应,达不到治疗目的,还可危及病员生命。为了加强输血的安全性,我们认为输血前应做抗 D检查。

关键词 抗原检测;配血

中图法分类号 R457.11

参考文献

1 郭永芳,林武存,肖瑞卿等.重庆市汉族5226人 Rh血型调查报告.第三军医大学学报, 1991; 13(6): 616

2 赵桐茂.人类血型遗传学.北京: 科学出版社, 1987. 103~105

3 林妈利.关于台湾免去产前检查和输血前配合试验中 Rh血型筛检报告.中国输血杂志, 1995; 8(2): 105

(收稿: 1997-10-08;修回: 1998-05-15)

(编辑 王 红)

** 吴 毅,女,36岁,主管技师,大专

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