

# 异种脱细胞真皮基质制备方法的改进\*

温春泉, 张国安, 宁方刚

## An improved method for heterogenous acellular dermal matrix fabrication

Wen Chun-quan, Zhang Guo-an, Ning Fang-gang

### Abstract

**BACKGROUND:** It is difficult to prepare complete and large piece of goat acellular dermal matrix using liquid nitrogen method due to breakability of dermal matrix during rewarming period.

**OBJECTIVE:** To explore a better method for goat acellular dermal matrix fabrication.

**METHODS:** In the course of freezing goat skin, a  $-80^{\circ}\text{C}$  refrigerator was used as a substitute for liquid nitrogen. Cell components of goat skin were removed by freezing and thawing repeatedly, and then cell fragments were washed off using a zwitterionic with ultrasonic machine. The cell fragments and structure were tested.

**RESULTS AND CONCLUSION:** By strict tests, collagen structure of the heterogeneous dermal matrix fabricated here was integrity and no cell fragment was found. The biomechanical characteristics were similar with acellular dermal matrix fabricated by routine repeated frozen method. Compared with routine repeated frozen method, the acellular degree and biological properties of goat acellular dermal matrix prepared by improved method had no significant differences, but the integrity of latter was eminent.

Wen CQ, Zhang GA, Ning FG. An improved method for heterogenous acellular dermal matrix fabrication. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41): 7635-7638. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

Department of Burn and Plastic Surgery, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Wen Chun-quan\*, Master, Physician, Department of Burn and Plastic Surgery, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China  
siquan1760@sina.com

Correspondence to: Zhang Guo-an, Doctor, Chief physician, Professor, Department of Burn and Plastic Surgery, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China  
zhangga777@126.com

Received: 2010-04-26  
Accepted: 2010-05-04

### 摘要

**背景:** 应用液氮进行大张羊脱细胞真皮基质制作时, 复温过程中真皮基质易破碎, 不易制出大张完整的脱细胞羊真皮基质。

**目的:** 探索更好的羊脱细胞真皮基质的制作方法。

**方法:** 改变低温条件, 变液氮降温为应用 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱进行异种皮肤的冷冻处理, 破坏细胞成分, 利用洗脱液振荡洗涤, 去除细胞碎片, 制备出完整的大张羊脱细胞真皮基质, 并对其脱细胞程度和胶原三维支架结构的完整性进行测定。

**结果与结论:** 通过 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱进行反复冻融制备的大张羊脱细胞真皮基质, 较为完整, 常规病理检查无明显细胞碎片残留; 免疫组化检测无明显细胞碎片; 电子显微镜检查胶原结构完整。应用改良 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱和液氮进行反复冻融制作的大张羊脱细胞真皮基质对比, 脱细胞程度和其他生物学性能无明显差异, 但完整性前者明显优于后者, 适合临床应用。

**关键词:** 脱细胞真皮; 制备; 改进; 反复冻融; 胶原结构; 组织构建; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.009

温春泉, 张国安, 宁方刚. 异种脱细胞真皮基质制备方法的改进[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7635-7638. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

通过皮肤移植及时覆盖创面是治疗严重烧伤患者的重要方法。大张异体皮结合自体微粒皮移植在大面积烧伤患者治疗中起到了至关重要的作用, 但是作为自体微粒皮移植载体的大张异体皮来源有限, 不能广泛采用。异种皮肤相对于异体皮肤来源广泛, 价格低廉, 但机体对于异种皮肤的排斥反应要显著强于异体皮肤<sup>[1-4]</sup>。

近年来, 北京积水潭医院烧伤科对脱细胞的方法进行了不断的尝试, 应用液氮反复冻融法, 配合超声振荡洗涤, 制备脱细胞羊皮及脱细胞猪皮取得了较好效果, 使异种皮肤初步达到可代替异体皮肤的临床应用效果<sup>[5-6]</sup>。但是在应用液氮进行大张羊脱细胞真皮基质制作中, 发现复温时, 真皮基质易破碎, 不易制出大张完整的脱细胞羊真皮基质。

大张完整的脱细胞真皮基质, 在大面积烧伤治疗中, 对于保证覆盖效果, 提高手术速度, 缩短手术时间, 具有明显的意义<sup>[7-8]</sup>。因此, 本次实验尝试改进脱细胞羊真皮基质的制作方法, 采用 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱代替液氮降温进行异种皮肤的反复冻融, 延长超声振荡洗涤时间方法进行实验。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照, 体外观察。

**时间及地点:** 实验于2006-06/2008-06在北京积水潭医院烧伤实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 实验室条件下培养的普通级25 kg左右健康白山羊6只, 雌雄不限, 由北京积水潭医院动物试验室提供。实验过程对动物的处置符合2006年中华人民共和国科学技术部颁布《关于善待实验动物的指导性意见》规定<sup>[9]</sup>。

北京积水潭医院  
烧伤科, 北京市  
100035

温春泉★, 男,  
1981年生, 河南  
省长垣县人, 汉  
族, 2007年北京  
大学毕业, 硕士  
医师, 主要从事烧  
伤整形方面的研  
究。  
siquan1760@  
sina.com

通讯作者: 张国  
安, 博士, 主任医  
师, 教授, 主要  
从事烧伤方面的  
研究。北京积水  
潭医院烧伤科, 北京市  
100035  
zhangga777@  
126.com

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:1673-8225  
(2010)41-07635-04

收稿日期: 2010-04-26  
修回日期: 2010-05-04  
(20100327006/YJ·Z)

## 试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
阴阳离子洗脱液, 0.1%新洁尔灭溶液	北京积水潭医院烧伤研究所
鼠抗人角蛋白单克隆抗体, 鼠抗波形蛋白抗体	北京中山公司
SGQ-200 鼓式取皮机	Shanghai Operating Instruments Factory
723A 紫外分光光度计	Cany Precision Instruments Co.,Ltd
光学显微镜, AX70 生物显微照相系统	日本 Olympus 公司
透射电镜	荷兰 Philips 公司

## 方法:

**脱细胞真皮基质的制备:** 健康白山羊经戊巴比妥钠麻醉处死去毛后取全层皮肤, 用取皮鼓去除脂肪, 切取0.3 mm薄中厚皮片, 剪成20 cm×30 cm大小, 标记留线, 备用。

**分组及处理:** 将皮片随机分成-80 °C组和液氮组。-80 °C组将皮片放入-80 °C低温冰箱冷冻6 h, 室温下自然复温约50 min, 应用同样方法反复冻融2次。液氮组将皮片放入液氮中浸泡15 min, 室温下自然复温约50 min, 同样方法反复冻融2次。

将2组皮片放入超声振荡清洗器中, 采用自行配制的阴阳离子液, 以超声振荡洗涤6 h后, 小心将表皮层剥去, 继续震荡洗涤, 总洗涤24 h, 期间每6 h更换1次洗脱液。之后改用蒸馏水继续振荡清洗皮片96 h左右, 每6 h左右换液1次, 水温控制在25~40 °C。直至洗脱液含量低于万分之一(分光光度计不能测出)。此皮片用紫外线正反面各照射1 h, 0.1%的新洁尔灭浸泡10 min, 无菌生理盐水冲洗三四遍。将制备好的皮片封口包装, 标记日期、规格, 放入低温冰箱备用。

**常规病理检测:** 将所有样品细胞清除彻底, 无明显细胞及细胞碎片残留。观察真皮基质纤维结构是否完整, 有无明显破坏。

**免疫组化:** 将皮片用100 g/L多聚甲醛固定12 h后, 脱水, 透明, 浸蜡后包埋, 用10%多聚赖氨酸浸泡, 置于80 °C恒温箱内烘烤60 min, 经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇固定后, 置于自来水中冲洗3 min, 蒸馏水浸泡3 min, 用pH 7.4的磷酸盐缓冲液冲洗3×3 min, 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 用微波炉加热至沸腾10 min, 进行抗原修复, 过氧化物酶阻断溶液室温下孵育10 min, 磷酸盐缓冲液冲洗3×4 min, 非免役动物血清室温下孵育10 min, 鼠抗人角蛋白单克隆抗体和

鼠抗波形蛋白抗体4 °C孵育过夜, 磷酸盐缓冲液冲洗3×4 min, 生物素标记的第二抗体室温孵育10 min, 磷酸盐缓冲液冲洗3×4 min, 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液室温孵育10 min, 磷酸盐缓冲液冲洗3×4 min, DAB溶液显色, 显微镜下观察3~10 min, 自来水冲洗, 苏木精轻度复染2 min, 0.1%盐酸乙醇分化, 0.1%氨水冲洗返蓝, 梯度乙醇脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固

**电子显微镜检测:** 20 000倍电子显微镜下, 2组脱细胞羊真皮基质各取4个视野, 观察胶原结构及有无细胞碎片。

**主要观察指标:** 免疫组化测定脱细胞基质中有无碱性角蛋白和波形蛋白, 电子显微镜检测脱细胞是否彻底, 有无细胞及细胞碎片残留, 胶原纤维的排列情况及胶原纤维的完整性。

**设计、实施、评估者:** 实验设计、实施、评估为全体作者。

## 2 结果

**2.1 脱细胞羊真皮基质形态** 应用-80 °C低温冰箱及液氮制备的脱细胞羊真皮基质色白, 手感柔韧, 弹性好, -80 °C组皮片完整性好, 无明显碎裂, 见图1a。液氮组皮片出现较多裂口, 完整性明显不如-80 °C组, 见图1b。

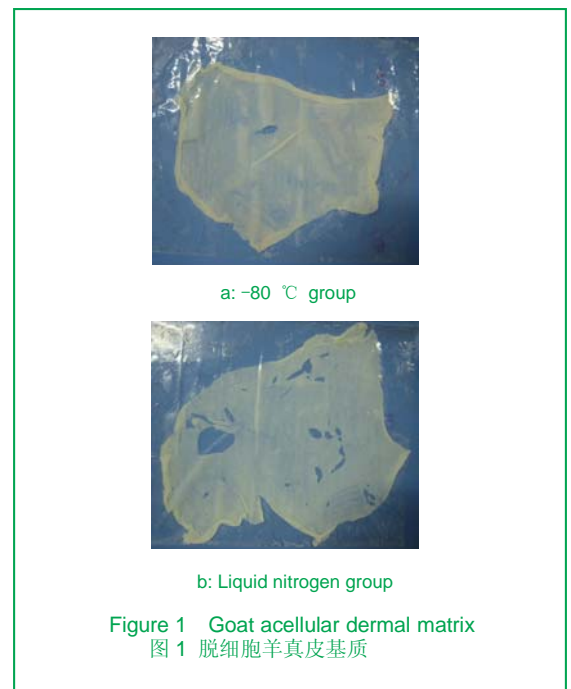
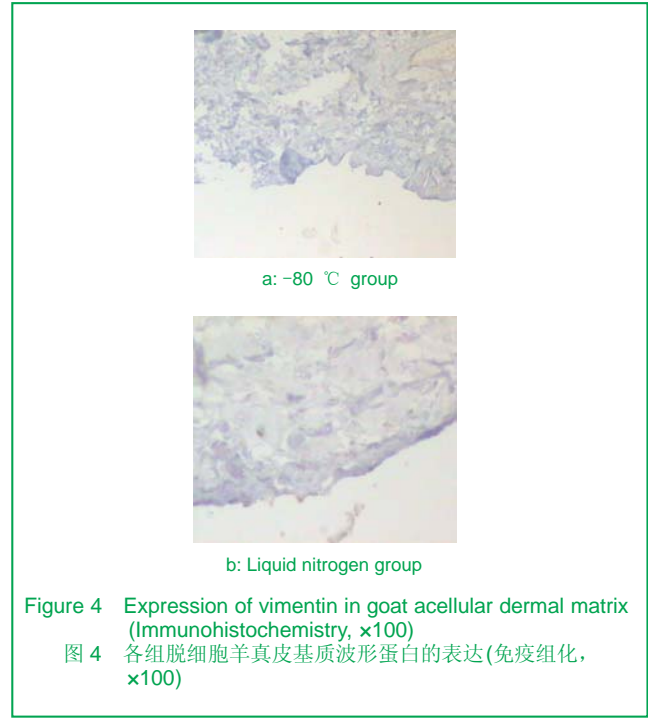
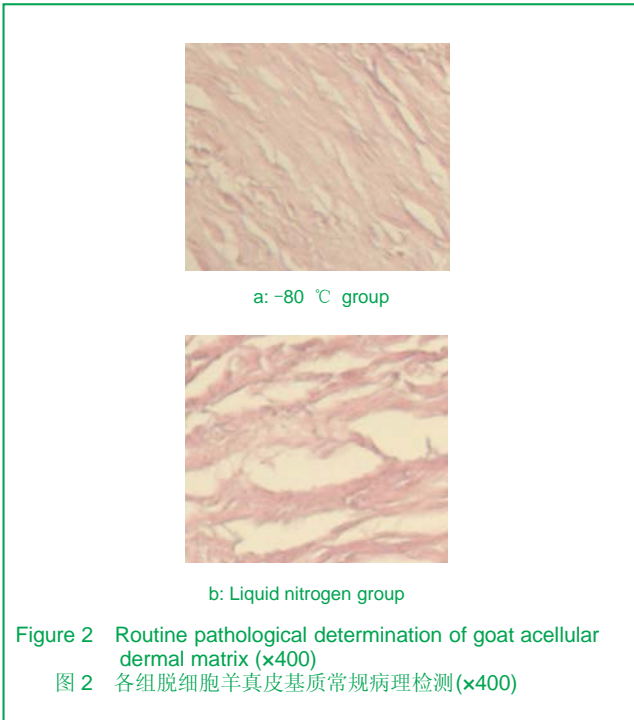


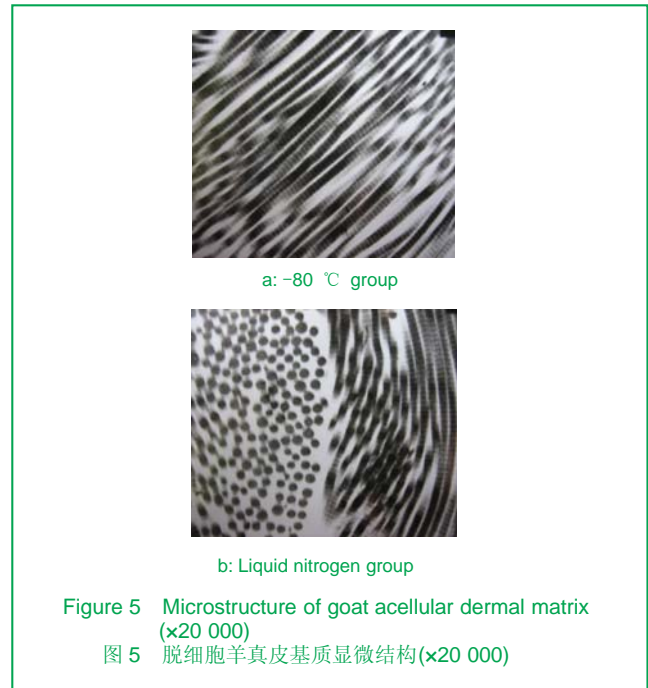
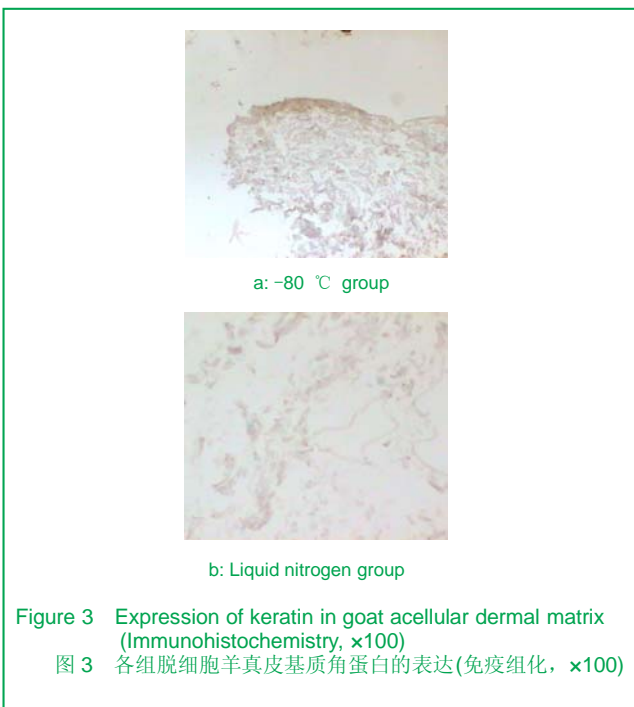
Figure 1 Goat acellular dermal matrix  
图1 脱细胞羊真皮基质

**2.2 常规病理检测结果** 所有样品细胞清除彻底, 无明显细胞及细胞碎片残留。真皮基质纤维结构完整, 无明显破坏, 见图2。



2.3 免疫组化检测结果 鼠抗人角蛋白单克隆抗体用于识别碱性角蛋白, 可用于标记上皮组织<sup>[10]</sup>; 鼠抗波形蛋白抗体识别波形蛋白, 可用于标记间叶细胞<sup>[11]</sup>。对新鲜人皮, 新鲜羊皮进行免疫组化染色时, 相关组织均呈现明显强阳性染色, 说明羊和人的上皮细胞的角蛋白抗原及成纤维细胞的波形蛋白抗原有很强同源性, 该检测对异体及异种真皮均适用。2组真皮基质纤维均未发现角蛋白和波形蛋白, 说明2种方法进行脱细胞处理, 脱细胞程度均较彻底, 无上皮细胞及成纤维细胞碎片残留, 见图3, 4。

2.4 电镜观察 2种方法处理的皮片胶原结构完整, 未发现破坏痕迹, 无明显细胞及细胞碎片残留, 见图5。



### 3 讨论

异种真皮在移植后的排斥反应要强于异体真皮, 因此应对其进行更加彻底的脱细胞处理。近些年, 研究人员对异种脱细胞真皮支架作为永久真皮植入物的可行性进行了相关的实验, 并取得了一定成果<sup>[12-14]</sup>。现在各研究机构多采用几种方法组合对异种皮进行脱细胞处



理, 以期探索出最理想的方法。姜笃银等<sup>[15]</sup>采用胰蛋白酶和0.3% TritonX-100处理。谢举临等<sup>[16]</sup>则经0.5%安多福消化后, 取0.3~0.4 mm薄中厚皮片, 给予胰蛋白酶消化, 冷冻干燥。宁方刚等<sup>[17]</sup>利用液氮低温反复冻融破坏真皮内细胞成分, 洗脱液超声振荡洗涤, 去除细胞碎片, 此方法获得的脱细胞真皮基质, 其生物力学性能、亲水性和含水量与液氮方法接近, 且细胞毒性低、免疫原性低、组织相容性良好。但是羊皮应用液氮反复冻融脱细胞处理极易出现破碎, 无法满足临床应用。

通过对应用-80℃低温冰箱以及常规液氮进行反复冻融制备的大张羊脱细胞真皮基质进行对比, 可以看到前者大体较为完整, 无明显碎裂, 后者则出现较多裂口, 两者常规病理检查均无明显细胞碎片残留, 胶原支架结构完整; 免疫组化检测无明显细胞碎片; 电子显微镜检查胶原结构完整。考虑后者出现较多裂口的原因应为在应用液氮进行反复冻融脱细胞处理过程中, 由于温度变化剧烈, 皮片局部温度变化不均, 使其产生碎裂。而制作方法的改进也证明了这一点。

应用-80℃低温冰箱和液氮进行反复冻融制作的大张羊脱细胞真皮基质, 脱细胞程度和其他生物学性能无明显差异, 但完整性前者明显优于后者, 并在临床应用中取得了较好效果。

#### 4 参考文献

- [1] Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*. 1995;21(4):243-248.
- [2] Li Z, Zhang BL, Jia CY. *Zhongguo Meirong Yixue*. 2009;18(6):817-819.  
李智, 张宝林, 贾赤宇. 脱细胞异体真皮与自体微粒皮复合移植治疗深度烧伤愈合后皮肤质量观察[J]. *中国美容医学*, 2009, 18(6):817-819.
- [3] Xiang XY, Zhou GF, Lv ZM, et al. *Sichuan Yixue*. 2009;30(6):918-919.  
向小燕, 周国富, 吕志敏, 等. 脱细胞异体真皮与自体刃厚皮移植修复功能部位深度烧伤的体会[J]. *四川医学*, 2009, 30(6):918-919.
- [4] Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, et al. Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. *Transplantation*. 1995;60(1):1-9.
- [5] Zhang GA, Ning FG, Zhong JM, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(41):8280-8284.  
张国安, 宁方刚, 钟京鸣, 等. 反复冻融配合超声振荡洗涤制备猪脱细胞真皮基质[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(41):8280-8284.
- [6] Du WL. Beijing: Peking University, 2008.  
杜伟力. 异种脱细胞真皮基质与微粒皮复合移植的临床应用观察[D]. 北京: 北京大学, 2008.
- [7] Zhang ML, Zhou GF, Zhang PZ, et al. *Zhonghua Waikexue*. 2001;39(9):708-710.  
张明良, 周光峰, 张普柱, 等. 大面积烧伤的微粒移植术[J]. *中华外科杂志*, 2001, 39(9):708-710.
- [8] Tian XD, He YD, Xiao XL, et al. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi*. 2005;15(15):2387-2389.  
田晓东, 何友德, 肖晓兰, 等. 新鲜猪皮覆盖自体微粒皮治疗大面积深度烧伤[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(15):2387, 2389.
- [9] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [10] Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31(1):11-24.
- [11] Gabbiani G, Kapanci Y, Barazzone P, et al. Immunohistochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol*. 1981;104(3):206-216.
- [12] Cai JK, Yang HM, Li LG, et al. *Zhonghua Waikexue*. 2000;38(10):69-72.  
柴家科, 杨红明, 李利根, 等. 去细胞异体真皮、去细胞猪真皮和自体刃厚皮移植在临床中的应用[J]. *中华外科杂志*, 2000, 38(10):69-72.
- [13] Jia SX, Xu HZ, Liao ZJ, et al. *Shanghai Di'er Yike Daxue Xuebao*. 1998;18(1):25-29.  
贾生贤, 徐惠贞, 廖镇江, 等. 无细胞真皮基质与自体皮复合移植的应用[J]. *上海第二医科大学学报*, 1998, 18(1):25-29.
- [14] Jiang DY, Chen B, Xu MD, et al. *Zhonghua Shaoshang Zazhi*. 2002;18(1):15-18.  
姜笃银, 陈璧, 徐明达, 等. 异种脱细胞真皮基质的制备和临床应用观察[J]. *中华烧伤杂志*, 2002, 18(1):15-18.
- [15] Jiang DY, Chen B, Su YJ, et al. *Disi Juyi Daxue Xuebao*. 1999;20(5):375-378.  
姜笃银, 陈璧, 苏映军, 等. 交联型异体脱细胞真皮基质的研制及动物复合移植实验[J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(5):375-378.
- [16] Xie JL, Li TZ, Qi SH, et al. *Zhonghua Shiyany Waikexue*. 2004;21(1):37-38.  
谢举临, 利天增, 祁少海, 等. 人工真皮替代物的构建及其生物相容性评价[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(1):37-38.
- [17] Ning FG, Zhang GA, JinPY. *Zhonghua Shaoshang Zazhi*. 2007;23(1):73.  
宁方刚, 张国安, 金培勇. 利用免疫学方法检测脱细胞真皮基质的细胞碎片残留[J]. *中华烧伤杂志*, 2007, 23(1):73.

#### 来自本文课题的更多信息一

**致谢:**衷心感谢北京积水潭医院骨科研究所徐小川所长的大力支持和给予的学术启发。衷心感谢北京积水潭医院烧伤科徐军主任医师、李迟主任医师、张普柱主任医师、沈余明副主任医师、周光峰副主任医师、陈欣副主任医师、陈辉副主任医师、于东宁副主任医师、周业平副主任医师、陈辉主治医师、王浩主治医师, 以及其他老师的指导和帮助。衷心感谢北京积水潭医院烧伤实验室钟京鸣等老师以及动物实验室的各位老师给予的大力支持和帮助。

**课题的意义:**改进后的脱细胞真皮基质制备方法简便可行且较为经济, 脱细胞较为彻底同时又保留了胶原支架结构完整性, 进一步满足了临床应用的要求。

**课题评估的“金标准”:**对于真皮基质有无碱性角蛋白和波形蛋白, 应用免疫组化方法可准确确定, 本次实验即采取这一方法。

**设计或课题的偏倚与不足:**课题设计中选取样本量偏小, 应增加实验山羊数量及脱细胞真皮制备数量, 并可进一步应用于临床观察。

**提供临床借鉴的价值:**改进后的脱细胞真皮基质制备方法可更加方便的制备大张完整的脱细胞真皮基质, 材料来源广泛, 获取方便, 其脱细胞彻底, 无细胞碎片残留, 真皮基质完整性好, 并保留了胶原支架结构的完整性。经免疫组化方法及电子显微镜检查, 进一步证实了其脱细胞彻底, 胶原结构完整, 可在临床治疗中解决异体皮源受限等问题, 并且不受宗教信仰等原因限制。