

临床新技术著作系列

Linchuang Xinjishu Zhuzuo Xilie

皮肤储存 基础与应用

PIFU CHUCUN
JICHU YU YINGYONG

■ 朱兆明 柴家科 贾晓明 编 著



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PUBLISHER

皮肤储存基础与应用

PIFU CHUCUN JICHU YU YINGYONG

朱兆明 柴家科 贾晓明 编 著



人民军医出版社

People's Military Medical Publisher

北 京

图书在版编目(CIP)数据

皮肤储存基础与应用/朱兆明,柴家科,贾晓明编. 北京:人民军医出版社,2002.10
ISBN 7-80157-604-7

I. 皮… II. ①朱… ②柴… ③贾… III. ①烧伤—创伤外科学—皮肤—低温贮藏 ②皮肤—移植术(医学) IV. R644

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 050983 号

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

潮河印刷厂印刷

春园装订厂装订

新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16·印张:12.5·彩页 12 面·字数:276 千字

2002 年 10 月第 1 版 (北京)第 1 次印刷

印数:0001~3000 定价:40.00 元

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

皮肤低温储存涉及低温物理、低温生物、临床医学、免疫学、生物化学和微生物学等学科。本书总结了著者自 1973 年以来从事皮肤低温储存工作的经验,内容涉及皮肤和低温的基础知识,包括皮肤的解剖、生理和生化组成,低温生物学的物理基础以及皮肤覆盖物的研究现状和展望等;有较高的学术水平和较强的实用价值,图文并茂;可供烧伤科、皮肤科、整形科临床医师,组织保存和低温生物研究人员参考。

责任编辑 姚 磊 张 峥

前 言

从 20 世纪 50 年代末开始,随着我国社会主义建设和工业化的发展,烧伤病人日益增多,我国的烧伤治疗水平也不断提高,尤其是大面积特重烧伤治疗效果已处于国际领先水平。

烧伤治疗的一个重要环节是创面处理,对大面积深度烧伤的创面必须应用创面覆盖物加以覆盖,才能使病人度过危险期。创面覆盖物中以具有活力的异体皮为首选。所以,建立一个能长期储存具有活力的异体皮肤的皮库,对烧伤治疗有重大的实际意义。

皮肤低温储存知识的内容涉及的学科范围甚广,其中有低温物理、低温生物、临床医学、免疫学、生物化学、细菌学等知识,它是一门边缘性学科。

本书将笔者自 1973 年起开展低温储存皮肤工作以来,近 30 年的研究成果加以总结、整理。这些成果曾荣获国家科技进步二等奖一次,全军科技进步二等奖三次。本书中尚加入了一部分有关皮肤和低温的基础知识,如皮肤的解剖、皮肤的生理、皮肤的生化组成、低温生物学的物理基础,以及皮肤覆盖物的研究展望等。

本书凝聚了作者多年的工作经验,既有较高的学术水平,又有较强的实用价值,图文并茂,可供从事烧伤专业工作者参考,也可从事低温生物储存的专业人员提供相关信息。

本书承军事医学科学院二所李元敏教授撰写“皮肤的解剖”,军事医学科学院五所李成文研究员撰写“皮肤的生化组成”,中科院低温中心周一欣副研究员撰写“低温生物储存的热物理学基础”等有关章节。本书中尚含有本科研究生纪晓峰博士论文的部分内容。本书部分研究内容曾获国家自然科学基金资助(59706009)。在此一并致以谢意。

朱兆明 柴家科 贾晓明

目 录

第一章 总论	(1)
第二章 皮肤的结构	(7)
第一节 概述	(7)
第二节 表皮	(8)
第三节 表皮的基底层——基底细胞	(9)
第四节 表皮的基底层——黑素细胞及麦克尔细胞	(13)
第五节 表皮的棘层——角朊细胞及郎格汉斯细胞	(15)
第六节 表皮的颗粒层、透明层及角质层	(17)
一、颗粒层	(17)
二、透明层	(18)
三、角质层	(18)
四、角朊细胞的角化	(18)
第七节 真皮的结缔组织	(19)
一、胶原纤维	(19)
二、弹力纤维	(19)
三、网状纤维	(20)
四、基质	(20)
五、细胞成分	(20)
第八节 真皮的血管、淋巴管、肌肉	(20)
一、血管	(20)
二、淋巴管	(21)
三、肌肉	(22)
第九节 真皮的神经及神经终器	(22)
一、神经	(22)
二、特殊的终器	(22)
第十节 皮肤附件——汗腺	(24)
一、分泌部	(24)
二、真皮内导管	(25)
三、表皮内导管	(25)
第十一节 皮肤附件——大汗腺	(26)
第十二节 皮肤附件——皮脂腺	(27)
第十三节 皮肤附件——毛发	(28)
第十四节 皮肤附件——指(趾)甲	(32)
第十五节 皮下组织	(33)

第三章 皮肤的生理和功能	(35)
第一节 皮肤的主要功能	(35)
一、保护作用	(35)
二、感觉功能	(36)
三、调节体温功能	(36)
四、皮肤的通透性	(37)
五、合成维生素的场所	(39)
六、表皮基底膜带和真皮的功能	(39)
七、皮肤附件的功能	(41)
第二节 皮肤的主要生化成分和代谢	(44)
一、水分	(44)
二、电解质	(44)
三、葡萄糖	(44)
四、蛋白质	(45)
五、脂类	(45)
六、酶	(46)
七、皮肤的能量供应	(46)
第三节 皮肤细胞的增殖和角化	(47)
第四节 皮肤的衰老	(47)
第五节 皮肤的愈合	(48)
一、创面内血小板凝聚,形成血块,止血	(48)
二、中性粒细胞和单核细胞浸润	(48)
三、再上皮化	(49)
四、细胞外间质重组	(49)
第四章 皮肤成分的生命化学	(51)
第一节 皮肤的物质成分	(51)
一、概述	(51)
二、皮肤的水分和无机分子	(51)
三、皮肤的生物大分子物质	(51)
第二节 皮肤中生物大分子的生物化学	(52)
一、脂质	(52)
二、皮肤中的酶类及作用	(52)
三、胶原蛋白	(53)
四、弹性蛋白	(64)
五、角蛋白	(65)
六、纤连蛋白	(65)
七、蛋白聚糖	(67)
八、皮肤组织中的神经肽	(69)
九、细胞因子	(71)

十、皮肤组织中的抗原与抗体	(73)
第五章 皮肤低温储存中的热物理学基础	(75)
第一节 概述	(75)
第二节 水和水溶液相变过程的机制	(76)
第三节 传热学基础和热物性	(77)
第四节 生物材料低温储存中的相变过程	(81)
第五节 皮肤低温储存过程中的传热及其强化	(83)
第六章 异体皮的采取和加工	(86)
第一节 异体皮的采取	(86)
一、皮源的寻求和准备工作	(86)
二、取皮器材	(86)
三、供体来源的选择	(86)
四、取皮	(86)
五、运输	(87)
第二节 异体皮的加工及步骤	(87)
第三节 异体皮的消毒	(87)
第七章 皮肤在 4℃ 的储存	(92)
第一节 一般概况	(92)
第二节 皮肤在 0℃ 以上储存时损伤的机制	(93)
第三节 生理盐水储存法	(93)
第四节 保养液储存法	(95)
一、保养液量和储存皮肤面积关系的研究	(95)
二、自制 4℃ 保养液的研究	(96)
第五节 4℃ 皮肤储存过程中氧自由基的作用	(97)
第八章 组织和细胞在 0℃ 以下损伤的机制和防治对策	(102)
第一节 冷冻对组织和细胞的直接影响和损伤	(102)
一、低温休克	(102)
二、冷冻对细胞代谢的影响	(102)
三、冷冻对细胞膜功能和结构的影响	(102)
四、冷冻对细胞其他功能的影响	(103)
五、冰晶的直接损伤	(103)
六、高渗性损伤	(103)
七、缓冲系统受到破坏,有害物堆积	(103)
八、复温过程对细胞和组织的损伤	(104)
第二节 减少冷冻过程中对皮肤损伤的方法	(104)
一、应用抗冻剂	(104)
二、控制降温速率	(106)
三、控制复温速率	(108)
第九章 皮肤在 -20℃ 的储存	(109)

第一节	-20℃储存皮肤的基础研究	(109)
一、	抗冻液成分的组成	(109)
二、	异种、异体皮的储存	(109)
第二节	-20℃储存皮肤的临床应用与研究	(111)
第三节	-20℃储存皮肤的主要目的	(111)
第十章	-196℃皮肤的储存(含-60℃~-80℃储存)	(113)
第一节	概况	(113)
第二节	-196℃皮肤储存的历史	(113)
第三节	-196℃储存中几个问题的研究	(114)
一、	皮肤的消毒问题	(114)
二、	如何扩大每块储存皮肤的面积和皮肤的包装问题	(115)
三、	抗冻液的制备和改进	(116)
四、	降温速率的调控	(117)
五、	简易液氮容器和皮块在液氮容器内放置的方法	(118)
六、	复温速率的调控	(119)
第四节	低温储存皮肤的操作步骤	(119)
一、	皮肤的采集	(119)
二、	皮肤的消毒	(119)
三、	修去脂肪和多余的皮下组织	(119)
四、	应用抗冻液处理	(120)
五、	包装标记	(120)
六、	降温和储存	(120)
七、	复温	(120)
第五节	液氮容器应用时的注意点	(121)
一、	应将皮片经常保持在液氮面以下	(121)
二、	预防液氮对人体的损伤	(121)
三、	对液氮容器的维护	(121)
第六节	几种不同温度皮肤储存方法优缺点的比较	(121)
一、	普通冰箱储存	(121)
二、	-20℃储存	(121)
三、	深低温冰箱储存	(122)
四、	液氮容器储存	(122)
第十一章	皮肤的玻璃化储存	(124)
第一节	历史	(124)
第二节	玻璃化的概念	(125)
第三节	实现玻璃化的途径	(126)
一、	强化传热即加快降温速率	(126)
二、	抗冻剂的种类和浓度的筛选	(129)
三、	储存皮肤的复温即反玻璃化问题	(133)

第四节 玻璃化对皮肤细胞功能和结构的影响	(135)
一、玻璃化能减低冷冻对细胞膜流动性的影响	(135)
二、玻璃化对细胞骨架的影响	(136)
三、玻璃化对皮肤基底膜和表皮细胞黏附的影响	(137)
第五节 玻璃化储存皮肤的临床应用	(141)
一、玻璃化储存皮肤的方法	(141)
二、玻璃化储存皮肤的临床效果	(142)
第六节 对玻璃化储存皮肤方法的评价	(142)
第十二章 其他方法和猪皮的储存	(145)
第一节 无活力皮肤的储存	(145)
一、戊二醛储皮法	(145)
二、甘油储皮法	(146)
三、甲醛储皮法	(147)
四、低温真空干燥储皮法	(147)
第二节 猪皮的保存	(147)
第十三章 皮肤的活力鉴定方法	(150)
第一节 概述	(150)
第二节 琥珀酸脱氢酶测定法	(150)
第三节 台盼蓝染色法	(151)
第四节 测定放射同位素标记掺入检测法	(151)
第五节 皮肤氧耗量测定法	(152)
第六节 皮块培养法	(152)
第七节 皮片生物移植法	(152)
第八节 四氮唑盐 WST-1 法	(152)
第九节 SYTO/EB 双重染色法	(154)
第十四章 皮肤氧耗量活力的测定	(156)
第一节 概述	(156)
第二节 皮肤氧耗量的测量原理	(156)
第三节 皮肤氧耗量的直接测量	(157)
一、氧电极和测定仪器	(157)
二、实验皮肤	(157)
三、氧耗量测定	(158)
第四节 皮肤氧耗量的间接测量	(159)
一、测定装置	(159)
二、测定方法	(159)
三、测定结果	(159)
第五节 不同形式皮肤组织氧耗量的测量	(161)
一、测量原理	(161)
二、结构特点	(161)

三、仪器安装	(161)
四、测量准备	(162)
五、氧耗量测量	(163)
六、微机分析系统	(163)
第六节 氧耗量测量的有关问题	(165)
一、氧耗量的计算	(165)
二、影响皮肤氧耗量测定的因素	(165)
三、氧耗量测定需要注意的几个问题	(165)
第十五章 皮肤低温储存后抗原性的变化	(167)
第一节 皮肤的免疫学基础	(167)
一、皮肤内与免疫有关的细胞	(167)
二、皮肤在免疫调节中的作用	(170)
第二节 皮肤低温储存后抗原性的变化	(171)
一、皮肤经不同温度低温储存后异体移植的比较	(171)
二、低温储存后皮肤蛋白质的变化	(172)
三、低温储存后皮肤抗原性的变化	(172)
四、低温储存后皮肤郎格汉斯细胞(LC)的变化	(173)
第十六章 储存皮肤应用方法及移植后的变化	(175)
第一节 大张异体皮嵌植小块自体皮	(175)
一、手术方法和步骤	(175)
二、创面愈合过程	(176)
三、保证植皮成活的条件	(176)
第二节 大张异体皮自体微粒皮移植术	(176)
一、手术方法	(176)
二、微粒皮外层覆盖	(177)
三、微粒植皮操作中的注意事项	(177)
四、影响植皮成活的因素及防治措施	(177)
第三节 玻璃化储存皮肤和自体微粒皮覆盖创面后的转归	(178)
一、玻璃化储存异体皮和自体微粒皮移植后创面修复过程	(178)
二、玻璃化储存异体皮和自体微粒皮移植后的结果	(179)
三、玻璃化储存皮肤和自体微粒皮覆盖创面的临床意义	(180)
四、玻璃化法储存皮肤和自体微粒皮移植的组织学变化	(180)
第十七章 烧伤创面修复的皮肤替代物	(181)
第一节 概述	(181)
第二节 永久性皮肤替代物	(181)
一、培养的表皮细胞膜片	(181)
二、复合皮移植	(182)
第三节 暂时性皮肤替代物	(183)
一、猪皮	(183)

二、异体皮	(184)
第四节 展望.....	(184)

第一章

总 论

皮肤是人体最大最重的器官,其生理作用是维护机体内外环境的稳定性;防止体内水分、电解质、蛋白质等的丢失;防止外来有毒有害物质如细菌和其他病原体侵入体内;防止有害的光线如紫外线进入体内;可对外来的机械性损伤和冲击起到缓冲作用;具有一定的细胞免疫和体液免疫功能,并对体温调节起到重要作用。

当因深度大面积烧伤、外伤(如皮肤撕脱伤或切割伤),或因局部感染引起的大面积皮肤缺损时,必须行植皮术来覆盖创面,将没有正常皮肤覆盖的裸露创面缩小到最小限度。如果裸露创面过大,细菌极易入侵繁殖,体内水、电解质、蛋白质等极易渗出,引起水、电解质平衡失调、热量丢失、贫血、低蛋白血症、高热、毒血症或败血症,多脏器衰竭,严重的导致死亡。在手术过程中,首先应将失活的皮肤、焦痂或其他坏死组织削除或切除,或将不健康的肉芽或瘢痕组织清除,然后将裸露出来的血运良好的创面,用从病人自身未烧伤部位采取的新鲜自体皮予以覆盖。这样处理后,可以永久地消灭皮肤缺损创面,病人可以很快地脱离危险期,缩短住院日期,并保持满意的功能和形态效果。但当皮肤缺损超过总体表面积 30% 时,自体供皮就显得不足,没有足够自体皮可用来覆盖裸露的创面。在手术中必须加用其他覆盖物来补充覆盖创面,否则达不到消灭创面和改善病人全身情况的目的。常用的创面覆盖物有:①具有活力的

异体皮、异种皮以及应用细胞培养方法取得的具有活力的自体或异体皮片;②应用化学方法如戊二醛、甘油、碘制剂、苯扎溴铵(新洁尔灭)、乙醇等处理过的,或用加速器、⁶⁰钴等辐照过的,或应用冷冻干燥方法处理过的无活力的异体皮、异种皮,主要是猪皮,或应用上述方法处理过的无活力的猪或牛的羊膜、腹膜等;③各种人工皮,有应用猪或牛胶原制成的胶原膜或胶原纤维,或用人工合成材料制成的膜片或纤维织物,或内层为胶原、外层为合成材料的复合物等等。按目前国内治疗大面积烧伤的经验来看,创面覆盖物中,仍以具有活力的同种异体皮为首选。因为具有活力的异体皮柔软度好,与创面贴附良好,移植后成活率高,当与基底建立血运后皮肤颜色就转红,在移植后 3~4 周内其覆盖创面的功能基本上与自体皮相同。只要在异体植皮时,采用自体微粒植皮或打洞自体皮嵌入术,或自体皮与异体皮、异种皮邮票状、条状混合移植;只要所移植的皮肤在创面上成活,创面就可以暂时消灭。而当异体皮、异种皮在排斥的过程时,自体皮就会逐步生长扩大,异体皮、异种皮被自体皮爬行替代,整个过程可以不再出现创面,病人就可以平稳度过危险期。

但在临床治疗过程中,常遇到需要异体皮时找不到合适的皮源,以致延误了病人的治疗。有时找到了质量良好的异体皮皮源时,又没有合适的需要植皮的病人,致使宝贵的异体皮白白浪费了。所以建立一个能储存

具有活力皮肤的装置,对一个经常治疗大面积烧伤病人和皮肤缺损的单位是很有必要的。近年来随着低温生物学的深入研究,在理论实践和设备上日益完善,这些都促进了皮肤储存工作的开展。304 医院烧伤科早在 1972 年(当时在 301 医院)就开展了这方面的研究工作,并首先成功地建立了能应用于临床的皮库。现在全国各治疗烧伤的大单位,大都相继建立了皮库,这样就可及时处理深度创面,提高大面积深度烧伤的治愈率。

有了皮肤储存的装置以后,可将病人手术中剩余的自体皮,以及因外伤或其他原因截肢后,从截下肢体剥取下的正常自体皮进行储存,供以后手术之用。

此外异体皮经过低温储存后,其抗原性减低了,这样可以推迟移植后异体排斥时间。

皮肤的储存工作,牵涉的知识面和学科较广,是一门边缘性的学科。如果仅单纯地进行皮肤储存的具体操作,只要熟悉和遵循操作常规即可。但如要对该领域进行较深入的研究和有所创新,则必须具有医学、生物学、低温生物学、物理学、细菌和免疫学等方面的基础知识。而低温储存的方法和原则,不仅限于皮肤的储存,而且广泛应用于动物、植物、细菌、胚胎及其他医学领域中的各种细胞、组织和器官的储存。现技术已成熟并已广泛应用于储存的有诸如菌种、种子、各种细胞株、各种血液细胞、骨髓细胞、精子、卵子、胚胎、角膜、内分泌腺(胰岛、甲状旁腺等)、血管、骨、软骨、关节等。由于低温技术的应用,有了随时可供应所需要的具有活力的菌种、细胞、组织甚至器官,因而在医疗领域中创建了新的诊断治疗方法,也提高了某些疾病的治愈率。

基于低温生物学基础上建立起来的如良种动物猪、牛、羊和稀有濒危动物的精子、卵子和胚胎的储存和移植,细胞库、基因库的建立,植物良种种子库的建立,可以用较小的代价繁殖出良种的动植物,并可长期储存需要

保存的植物的种子、动物的生殖细胞和胚胎,虽然动植物的母体已死亡了,但种子和生殖细胞理论上可以无限期储存,需要时随时可以进行移植、繁殖,得到与原来动植物的形态、生理和遗传特征相似的动、植物。使稀有濒危的,或具有优良遗传特征的动、植物不致种属灭绝,也可以低廉价格取得优良品种的动、植物。所以低温储存的方法在生物、农业、畜牧、遗传、生态和环境保护,以及医学等各领域广泛推广应用后,已经取得了巨大的社会效益和经济效益。

关于在 0°C 以上储存皮肤的工作,国外在 100 年前早已有人报道过,德国的 Ljunggren 于 1898 年描述将人体上皮储存在无菌的腹水中 2d 到 3 个月,其目的是准备供临床之需。正式应用于临床是 1903 年 Wentscher 报道将自体皮肤浸在盐水内或用盐水纱布包裹后置于 0°C 冰盒内,1 例于储存后 3d 行自体移植,3 例于储存后 14d 行自体移植,均取得成功。1912 年 Carrel 首次对 0°C 储存皮肤和其他组织做了较详细的研究,将皮肤储存在密闭的有湿度的瓶子或浸于盐水、全血、血浆或凡士林中,储存 2 周后仍可成功地进行皮肤移植,储存数月后仍维持正常的形态和结构。以后在第一次世界大战和第二次世界大战初期,储存方法仍未见改进,也未见有大量临床应用的报道。直到第二次世界大战后期,英国皇家空军的 Matthews 于 1944 年报道,将皮片用盐水纱布包裹后置于密闭的瓶子内,将储存 3~8 周的皮片进行 50 次移植,均取得良好的植皮成活率。

1949 年 Hanks 及 Wallace 报道在平衡盐水中加入 10% 血清储存兔皮,储存在 6°C ~ 8°C 的效果优于在 0°C 储存的效果。1957 年 Perry 报道应用含有 10% 同种血清的 Earle 平衡营养液,将皮肤浸入其中,然后在 4°C 储存。皮肤面积和营养液的比例为 $2\sim 4\text{ cm}^2$ 比 1ml。储存后 6~8 周,作皮块组织培养,仍有细胞从周边向外扩展生长,但认为储

存时间 $>84\text{d}$ 就无实际临床应用价值了。

近 20 年来,由于细胞培养方法的日趋完善和普及,研制出了许多含有供应细胞生长发育所需营养成分的含有各种氨基酸、葡萄糖、维生素、微量元素、电解质和缓冲系统的平衡保养液,如 MEM, DMEM, RPMI-1640 等。如在其中加入 10% 的同种血清或 10% 小牛血清用来储存皮肤,可以继续延长皮肤在 4°C 的储存时间和提高储存皮肤的活力。May 于 1984 年和笔者于 1991 年也均报道应用细胞培养液在 4°C 储存皮肤的研究和应用。细胞培养液中以 RPMI-1640 的储存效果为最好。培养液的量与皮片的比例为 1 ml 溶液可储存 $2\sim 4\text{cm}^2$ 皮肤。储存时间一般不要超过 2 周,如在培养液中加入 10% 同种或小牛血清,可维持良好的活力达 1 个月左右。

根据 304 医院和国内其他单位的实际应用的经验,在 4°C 的条件下,应用盐水储存的皮肤应在 3d 内使用完,最长不要超过 7d。应用营养液加血清储存的皮肤最好在 2 周内使用完毕。保存液与皮片的比例以 1ml 储存 $2\sim 4\text{cm}^2$ 皮肤为最合适。皮肤在 4°C 温度储存时,维持的时间太短,不能满足临床的需要,为了延长储存时间,有必要采用在 0°C 以下的储存方法。

从理论上说,储存的温度越低,储存物活力保持的时间越长。因为温度越低,细胞组织的代谢、氧的消耗越低,污染的细菌也不易繁殖。如果在 -196°C 的环境之下,细胞的代谢几乎等于零,细胞、生物组织处于所谓“生命悬持状态”,在理论上几乎可以无限期地储存。

皮肤或其他组织在 0°C 以下温度环境储存时,其损伤机制与在 0°C 以上完全不同。早在 1939 年起陆续有在 -3°C , -15°C , -25°C , -50°C , -79°C (干冰) 中储存皮肤成功的动物实验和个别临床应用成功的报道。在 1950 年以前,对低温引起细胞组织损伤的

机制和防治对策进行的研究不多。所报道的方法是将皮肤用盐水或经枸橼酸处理的血浆浸泡后放入准备储存的温度或直接于干冰 (-79°C) 中,所以在储存过程中皮肤的活力受到很大损伤,有个别报道储存后的皮肤经移植后,皮片全部均未能成活。直到 1949 年,英国女科学家 Polge 等偶然在显微镜下观察到滴入甘油后的鸡的精子,经 0°C 以下低温冷冻和复温后仍具有活动能力,而没有滴入甘油的则均为无活动能力的死亡精子。甘油和其他类型的抗冻剂的发现和推广应用,大大提高了皮肤和其他生物组织低温储存后的活力。另一方面,对降温速率和储存物活力的关系,也有了较深入的研究。提出了将皮肤或其他生物标本以每分钟 $1^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 的速度下降到 $-70^{\circ}\text{C}\sim -80^{\circ}\text{C}$ 左右,再放置到 -196°C 液氮的环境,这样储存的效果为最好。

1971 年 Graham 等及 Bondoc 等先后报道将经过低温储存的异体皮应用于临床成功的经验。他们应用 20% 的甘油盐水,或 15% 甘油乳酸林格液作为抗冻液将皮片处理后,皮片以每分钟 1°C 的速度下降到 -70°C 左右,再放入液氮容器内储存。使用时在 37°C 水浴中复温,复温的速率为每分钟 $50^{\circ}\text{C}\sim 70^{\circ}\text{C}$ 左右。这是皮肤储存的最基本的方法,以后所有的方法均是从这个方法演化改进而来的。

笔者(当时在 301 医院)于 1973 年开始,就进行低温储存皮肤的研究工作,并于当年将低温储存的皮肤成功地应用于临床移植。以后对皮肤储存操作过程中的各个环节,结合我国的国情和现有的实际条件进行了研究,并建立了一套皮肤活力测定的方法,有正规的和简易的皮肤内琥珀酸脱氢酶定量测定、皮肤的氧耗量测定(应用自行制作的微电极法氧耗量测定仪)、皮块培养法活力测定、有应用 SYTO 和 WSTY 活体染料染色法皮肤活力测定、皮肤在电镜下的观察以判断其

活力程度等。应用上述方法,可以监测和判断储存皮肤的质量,保证具有良好活力的异体皮移植到病人创面,同时也为研究改进低温储存皮肤的科研工作提供了明确而可靠的指标。

在采集异体皮时,常常由于不可能在无菌条件下进行,所以笔者还对消毒问题进行了研究。对带有皮下组织的异体皮,特别强调剃除毛发及大量肥皂水刷洗,然后在 1:1 000 苯扎溴铵溶液内浸泡 15min,时间不能过长,>15min 皮肤活力即告减退。按上述方法处理后的皮肤的细菌量可以减少 90%,但达不到完全无菌,所以在进行手术前,尚需将储存皮肤用抗生素溶液浸泡,才可移植于病人的创面。

对抗冻液的成分和含量的研究后认为,如应用慢冻法储存皮肤以 10% 二甲基亚酚(DMSO)的平衡液(Kreb 林格液)效果为最佳。因为 DMSO 的穿透性强,抗冻作用好,只要浸泡 15min 即可,与应用 20% 甘油溶液作为抗冻剂,需要浸泡 2h 相比,可以节省操作时间。

关于降温速率的问题,在 1987 年以前,笔者均采用慢降温的方法,即以每分钟 $1^{\circ}\text{C} \sim 3^{\circ}\text{C}$ 的降温速度,将皮片的温度下降到 $-70^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ 左右,然后放入液氮容器内储存。从 1987 年以来,笔者在国内外首先研究出应用玻璃化法储存大张异体皮的方法。玻璃化法即将皮肤或其他生物标本,直接快速地放入液氮内,由于降温的速率很快,皮肤组织中细胞内外的水分来不及形成结晶就变成均匀的玻璃样状态,这样因为冰晶形成和高渗性脱水对皮肤组织和细胞引起的损伤可以减轻,从而可以提高储存皮肤的活力。进行玻璃化储存时须改变抗冻液的成分和浓度,但是抗冻液的浓度高了,其本身对组织和细胞就有毒性。经过反复试验,筛选出毒性小、抗冻效果好,以 20% 二甲基亚酚、6% 丙二醇为主的抗冻液。将皮片浸泡在此抗冻液

中 30min 后,直接快速放入液氮内储存。按照这种方法储存的皮肤,其平均活力要比以往慢降温法提高 20% 左右。从 1987 年以后,异体皮储存全部采用玻璃化法,每年要储存 40 万~50 万 cm^2 的异体皮。其移植后的临床效果明显优于慢冻法储存的皮肤。移植后的成活率有所提高,平均达 94% 左右,大部分皮于移植后 3~5 d 与基底建立良好血运,表面呈红色,按之发白,很少有水疱形成。应用玻璃化储存皮肤,不仅提高了储存皮肤的质量,而且节省了设备和费用,节省了操作时间。

皮肤在 0°C 以下,尤其在 -196°C 的环境储存时,整个呈冻结状态,所以一定要复温以后才能应用。从理论上讲,复温的速率越快越好,尤其在从 -50°C 到 0°C 的阶段,在这个温度阶段,细胞内外的水分,有融化后再结晶、结晶后再溶化的反复过程,引起再次对组织的损伤。文献上报道,在液氮内储存的皮肤,取出后应用 37°C 的水浴复温。笔者反复研究认为,将复温的温度提高到 45°C ,可以取得较好的活力。

最近笔者进一步研究了皮肤的玻璃化问题。应用差示量热扫描仪(DSC)测定玻璃化储存的皮肤,结果显示出有玻璃化的表现。应用在低温显微镜,将玻璃化抗冻液以 $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温,在镜下观察到为均匀细小的冰晶颗粒,而将慢冻法的抗冻液以 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温,观察到为巨大的树枝状冰晶。这从理论上阐明了玻璃化方法为什么能提高储存物活力的机制。应用预冷到 -196°C 的铜板将皮肤快速夹紧后放入液氮,与不用铜板组相比,可以加快降温速率和提高皮肤储存后的活力,这是减少了液氮和储存皮肤间的气膜的原因。玻璃化方法储存的皮肤和皮肤细胞与慢冻法储存的相比,前者可以减轻冷冻对表皮细胞膜的流动性、细胞膜的结构、细胞骨架、细胞的黏附性、基底膜完整性等的影响和损伤。这从理论上补充说

明为什么玻璃法储存皮肤的方法优于慢冻法的原因。

关于低温储存后皮片内抗原性的变化,笔者进行了如下的研究观察,经过低温储存后,皮肤内郎格汉斯(朗罕、Langerhans)细胞数量减少,形态有变化,储存温度越低,变化越大。将低温储存的皮肤移植于小鼠,储存的温度越低,皮肤的排斥时间越推迟延后。又将新鲜异体皮肤匀浆接种到家兔,取得兔抗人皮肤血清,然后将此抗血清和新鲜及冷冻异体皮的匀浆作抗原抗体反应。经双向免疫扩散、对流免疫电泳、火箭免疫电泳、免疫火箭扩散电泳等监测,新鲜皮的反应均大于冷冻皮,这些均说明皮肤经冷冻后,其抗原性有所减低,这为临床应用低温储存皮肤的优越性增加了理论的依据。

从 20 世纪 70 年代中开始,我国在北京、上海、西安、重庆、南昌、广州、沈阳、天津、兰州、武汉等地的地方或部队治疗烧伤的大单位,以后在中等城市如驻马店、洛阳、包头、唐山、漳州、桂林等地相继建立了皮库。方法大部分是应用液氮容器(-196°C)来储存皮肤,但少数单位也用深低温冰箱($-70^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$)进行皮肤储存工作的。于是很多单位储存有具有活力的异体皮随时可供覆盖大面积深度烧伤创面之用,使医务人员可以及时有效地早期封闭消灭创面,这也是近年来我国大面积烧伤治愈率所以能提高的因素之一。

虽然我国在皮肤和其他组织储存的设备条件方面不如国外,但在临床应用的例数、推广的范围、使用的效果,及某些科研水平方面仍处于国际先进地位。

现将国内在皮肤储存研究和应用领域中存在的问题和以后努力的方向归纳如下。

一、应加强低温储存皮肤的基础理论研究工作

为了提高储存皮肤的质量,有必要加强

在低温生物学基础方面的研究。如冷冻对皮肤细胞损伤的机制,冷冻对各细胞器功能和结构的变化,对细胞内各种重要的酶、各种离子的变化,尤其是对钙离子的变化等等目前尚不完全清楚。对降温、复温过程中冰晶形成的规律及细胞体积的变化,组织和细胞水肿的规律性,玻璃化储存过程中对如何改进强化传热的问题应进行深入研究。对抗冻液的抗冻机制和对细胞的毒性,如何优化抗冻液的种类和浓度也应继续进行探讨。应寻找建立准确、可靠、简便的皮肤活力测定方法,进一步研究低温储存过程中抗原性变化的规律及降低抗原性的方法。以上研究的目的是力图通过冷冻对皮肤组织损伤机制规律性的研究,提出防治方法,以提高储存皮肤的质量。

二、扩大皮肤供应的来源,大力宣传捐献尸体皮的重要性

应加强宣传捐献尸体皮肤对抢救危重烧伤病人的重要性,争取病故家属的协作配合,以便争取到更多皮源。如果能建立一个全国范围内的异体皮肤采集、储存、供应的调度网络系统,以便将目前有限的异体皮肤资源互相调剂,合理应用,则可大大提高我国皮肤储存工作的效率,更有利于大面积烧伤病人抢救工作的顺利进行。

三、应加强对皮肤消毒工作的研究

由于正常人的皮肤表面和毛囊、皮脂腺、汗腺中均常驻有细菌,而取尸体皮时又常不可能在无菌条件下进行。切取下的皮片需要经剃毛、刷洗和消毒液浸泡等步骤处理。即使这样,按笔者的资料,可以将皮片内细菌的含量减少 90%,但不能将其完全消灭,所以储存的皮肤在使用前,需用抗生素浸泡,方可进行移植。如果要彻底消灭细菌,需加大消毒液的浓度或延长浸泡的时间,但皮肤的活力也随之消失,这样就失去了储存的意义。