

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.20.009  
文章编号: 1005-8982 (2021) 20-0048-05

实验研究·论著

## 氯化钠贮存大鼠皮肤抗原性的表达及活力研究

刘军, 王涛涛, 侯明奎

(甘肃省人民医院 烧伤科, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** **目的** 观察经液氮贮存、氯化钠处理的新鲜大鼠皮肤抗原性的表达及组织活力。**方法** 选取SD大鼠30只, 随机分为3组, 每组10只; 制备大鼠全层皮肤, 分别应用液氮、氯化钠进行贮存, 于3个月时与新鲜大鼠皮肤分别通过免疫组织化学染色、SYTO/EB活力测定法进行MHC-DR、CD86抗原表达及活力检测。**结果** 新鲜皮肤组MHC-DR、CD86抗原表达水平较液氮冷冻组、氯化钠组高( $P < 0.05$ ), 液氮冷冻组与氯化钠组的MHC-DR、CD86抗原表达水平比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 液氮冷冻组与氯化钠组皮肤组织活力均超过半数, 但两者之间比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 新鲜皮肤组皮肤组织活力较液氮冷冻组、氯化钠组高( $P < 0.05$ )。**结论** 液氮及氯化钠处理的大鼠皮肤均可减弱皮片的抗原性, 氯化钠和液氮贮存大鼠皮肤的组织活力相近。

**关键词:** 皮肤抗原; MHC-DR; CD86; 组织活力; 大鼠

**中图分类号:** R392.1

**文献标识码:** A

## The antigenicity and viability of rat skin stored in sodium chloride

Jun Liu, Tao-tao Wang, Ming-kui Hou

(Department of Burns, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the antigenicity and viability of rat skin after being stored in liquid nitrogen or sodium chloride. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into 3 groups with 10 rats in each group. The full-thickness rat skin was prepared and stored in liquid nitrogen or sodium chloride. After 3 months, MHC-DR and CD86 expression and viability of the treated and fresh rat skins were detected via immunohistochemistry and SYTO/EB dyes, respectively. **Results** The fresh skin group exhibited the highest expression levels of MHC-DR and CD86 compared with the liquid nitrogen group and sodium chloride group ( $P < 0.05$ ), yet the expressions of MHC-DR and CD86 were similar in the liquid nitrogen group and sodium chloride group ( $P > 0.05$ ). More than 50% of the tissues were viable in both liquid nitrogen group and sodium chloride group, and the viability was comparable between the two groups ( $P > 0.05$ ). In contrast, the tissue viability in the fresh skin group was the highest compared with the liquid nitrogen group and sodium chloride group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Treatment with liquid nitrogen and sodium chloride can weaken the antigenicity of the rat skin. Besides, the tissue viability is similar after being treated with sodium chloride or liquid nitrogen.

**Keywords:** rat skin; MHC-DR; CD86; tissue viability

异体皮移植一直是抢救大面积烧伤患者的重  
要手段, 但因其抗原性导致的免疫排斥反应, 只

能用作暂时性创面覆盖物。为此, 许多学者不断  
寻找降低异体皮抗原性的方法, 以增加或延长异

收稿日期: 2021-06-22

体皮创面存活时间,为大面积烧伤患者的救治赢得更多机会。

低温保存异体皮已成为烧伤外科对异体皮贮存常用方法。既往研究发现,低温处理的异体皮移植成活时间明显长于新鲜异体皮,但要求贮存的条件及成本较高<sup>[1]</sup>。2004年波兰学者 OLSZEWSKI 等<sup>[2]</sup>首先将人体皮肤用氯化钠处理后成功移植于裸鼠体表,在移植成功后的第3~4周对裸鼠进行组织学观察,发现移植的人体皮肤可长期存在于裸鼠体表而不被裸鼠皮肤取代。笔者也采用氯化钠贮存异体皮并进行临床小型创面的成功移植及修复,收到了与低温保存异体皮进行移植的相似效果<sup>[3]</sup>。

人表皮所携带的HLA-DR抗原及鼠类动物表皮存在的MHC-DR抗原均为重要的移植抗原,在激发同种皮肤移植发生免疫排斥反应方面起着关键作用<sup>[4]</sup>。调控免疫反应的 $I$ r基因亦位于MHC-D区,所以Ⅱ类抗原的基因亦具有相同的功能,可调控免疫反应的幅度<sup>[5-7]</sup>。其免疫病理现象是移植排斥反应、对疾病的反应过度或反应不足。临床最常见的急性排斥反应主要由细胞免疫介导,皮肤移植排斥反应也主要是细胞免疫反应,此过程需要第一信号分子与第二信号协同刺激分子共同完成<sup>[8-10]</sup>。

为研究不同贮存条件下皮肤的抗原性,笔者以大鼠为实验模型,选择第一信号分子MHC-DR和第二信号协同刺激分子CD86通过免疫组织化学染色对其抗原性进行对比,通过荧光染色法对大鼠皮肤活力进行对比,为氯化钠替代液氮冷冻方法处理异体皮降低皮肤抗原性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性SPF级SD大鼠30只[实验动物生产许可证:SCXK(甘)2011-0001,实验动物使用许可证:SYXK(甘)2013-0002],体重( $206 \pm 18$ )g,由兰州大学实验动物中心提供。

### 1.2 试剂及仪器

氯化钠(纯度99%)购自江苏盐城制药厂,MHC-DR单克隆抗体、CD86单克隆抗体、免疫组织化学SP试剂盒购自福州迈新生物工程公司,

SYTO 13核酸染料、GoldViewI核酸染料购自上海北诺生物科技有限公司。

TP1020脱水机购自德国莱卡公司,YABO BMJ-400组织包埋机购自常州中威电子有限公司,MICROM 315切片机购自德国莱卡公司,YABO 200漂烘片机购自常州中威电子有限公司,BX51显微镜、BX53荧光显微镜购自日本奥林巴斯株式会社。

### 1.3 动物分组及模型复制

将健康雄性SPF级SD大鼠随机分为氯化钠制备组、液氮制备组和新鲜皮肤组,每组10只。

氯化钠制备组:在大鼠背侧脊柱旁设计 $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 矩形创面进行脱毛,长轴与脊柱平行。在局部麻醉下注射体积分数1%普鲁卡因,在脱毛区域中间切取 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小全层皮肤,生理盐水漂洗后直接置入氯化钠(纯度99%)中贮存,室温贮存时间3个月。液氮制备组:其他同氯化钠制备组,切取皮肤经抗冻液处理后置于液氮中贮存3个月。新鲜皮肤组:在3个月时,同上述方法切取大鼠皮肤,各组分别进行MHC-DR、CD86检测及组织活力检测<sup>[11-14]</sup>。

### 1.4 免疫组织化学检测

氯化钠制备组和液氮制备组组织块进行复苏后与新鲜皮肤组组织块用10%甲醛固定,石蜡包埋,连续切片。按免疫组织化学试剂盒说明书进行MHC-DR、CD86检测,其中一抗1:100稀释,另用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。阳性判断标准:以胞膜或/和胞浆着棕色作为阳性染色。高倍镜下(400倍)随机选取5个视野,根据着色程度和阳性细胞率进行评分。每份标本进行3次检测,计算均值。着色程度评分:无色计0分,黄色计1分,棕色计2分,深棕色计3分;阳性细胞评分: $< 10\%$ 计0分, $10\% \sim < 30\%$ 计1分, $30\% \sim < 50\%$ 计2分, $\geq 50\%$ 计3分。两者之和作为大鼠评分<sup>[15-16]</sup>。

### 1.5 组织活力检测

采用SYTO/EB活力测定法检测,氯化钠制备组和液氮制备组组织块进行复苏后与新鲜皮肤组组织块进行冷冻切片,捞片后PBS洗3次,3 min/次,滴加SYTO 13工作液 $50\text{ }\mu\text{l}$ ( $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ ), $37^\circ\text{C}$ 避光孵育20 min,PBS洗3次,3 min/次。滴加GoldViewI

工作液 50  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ml) 在冰浴中避光 30 min, PBS 洗 3 次, 3 min/次。在 488 nm/ 520 nm 激发, 荧光显微镜观察。活细胞发绿色荧光, 死细胞发红色荧光。记数后计算出组织细胞活力程度<sup>[17-20]</sup>。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组皮肤 MHC-DR、CD86 抗原表达水平比较

各组 MHC-DR、CD86 抗原表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 液氮制备组与氯化钠制备组 MHC-DR 抗原表达水平处于中等水平, 且氯化钠制备组较液氮制备组低 ( $P > 0.05$ ), 新鲜皮肤组 MHC-DR 抗原表达水平处于高水平表达, 且较液氮制备组与氯化钠制备组高 ( $P < 0.05$ ), 氯化钠制备组与液氮制备组 CD86 抗原表达水平均处于低水平表达, 且氯化钠制备组较液氮制备组低

( $P > 0.05$ ), 新鲜皮肤组 CD86 抗原表达水平处于高水平表达, 且较液氮制备组与氯化钠制备组高 ( $P < 0.05$ )。见表 1 和图 1 ~ 3。

表 1 各组皮肤的 MHC-DR、CD86 抗原表达水平比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

| 组别     | CD86            | MHC-DR          |
|--------|-----------------|-----------------|
| 液氮制备组  | 2.47 $\pm$ 0.71 | 2.71 $\pm$ 0.44 |
| 氯化钠制备组 | 2.26 $\pm$ 0.49 | 2.58 $\pm$ 0.56 |
| 新鲜皮肤组  | 4.41 $\pm$ 0.55 | 4.70 $\pm$ 0.40 |
| F 值    | 36.668          | 62.834          |
| P 值    | 0.000           | 0.000           |

2.2 各组皮肤活力值比较

液氮制备组、氯化钠制备组和新鲜皮肤组的皮肤活力值分别为 (67.2  $\pm$  5.5)%、(65.4  $\pm$  3.2)% 和 (95.4  $\pm$  4.5)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=98.361, P=0.000$ ), 液氮制备组与氯化钠制备组在 3 个月时其组织活力均超过半数, 但两者比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 新鲜皮肤组较液氮制备组与氯化钠制备组高 ( $P < 0.05$ )。

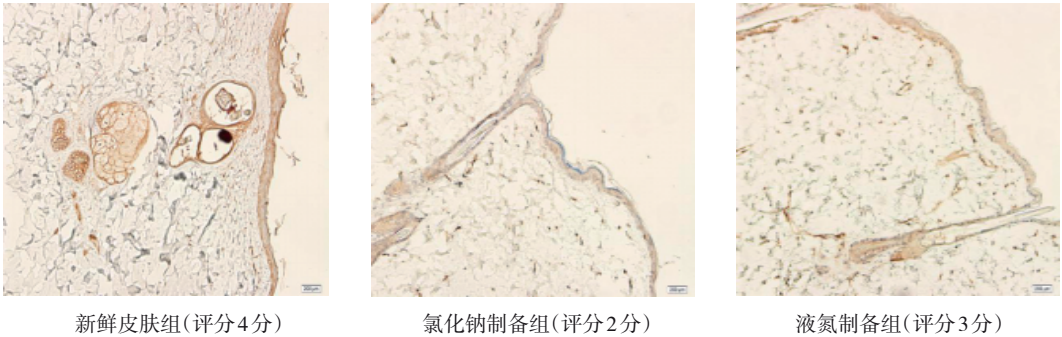


图 1 CD86 免疫组织化学染色 (  $\times 400$  )

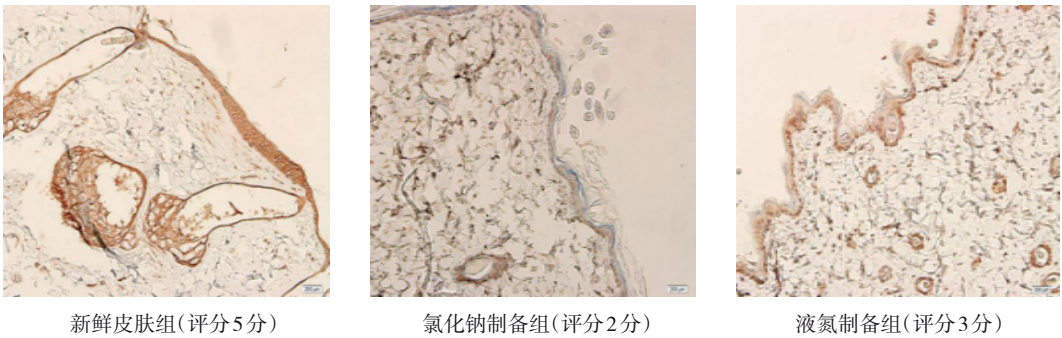


图 2 MHC-DR 免疫组织化学染色 (  $\times 400$  )

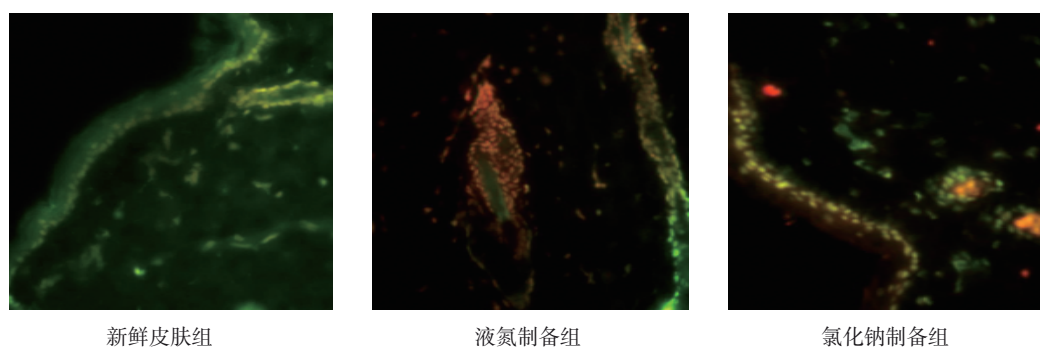


图3 SYTO/EB 荧光染色 (×400)

### 3 讨论

异体皮在大面积烧伤患者的救治中及小面积创面治疗中均起重要作用<sup>[20-23]</sup>,但异体皮的最佳贮存方式一直是使用液氮冷冻贮存,既往有研究显示,经过液氮贮存异体皮的组织活力较高<sup>[24]</sup>。且经过此方式处理的异体皮的抗原性明显减弱,有助于延长异体皮移植后的存活时间<sup>[25]</sup>,从而更好地起到对创面覆盖与修复作用。众所周知,液氮贮存异体皮临床应用成本较高,且过程相对繁琐,因此,笔者选用氯化钠贮存异种皮与液氮贮存异种皮进行抗原性及组织活力的对比研究,希望能寻找一种新的、简便易行的皮肤贮存方式,又能使保存的皮肤起到与液氮贮存的皮肤相似的作用,此项研究国内外尚无相关报道。

本研究中通过免疫组织化学法对氯化钠贮存异种皮、液氮贮存异种皮及新鲜异种皮抗原性进行检测,新鲜异种皮 MHC-DR、CD86 抗原表达最强,且与前两种贮存方式的异种皮在 MHC-DR、CD86 抗原表达在统计学上有显著差异,从而也证实了既往研究中发现低温处理的异体皮移植成活时间明显长于新鲜异体皮的观点。同时本研究中,氯化钠与液氮贮存异种皮 MHC-DR、CD86 抗原表达在统计学上无差异,两种不同的异种皮贮存方式均可以减弱皮片的抗原性,是否有利于延长异体皮移植后皮片的存活时间还需要进一步临床研究。本研究中应用荧光染色法对氯化钠、液氮贮存异种皮及新鲜异种皮的组织活力进行检测,新鲜异种皮的组织活力最高。氯化钠和液氮贮存异种皮的组织活力较低,与新鲜异种皮的组织活力有显著差异,但氯化钠和液氮贮存异种皮的组织活力相近,两者在统计学上无差异。

综上所述,氯化钠贮存异种皮简便、易行,可成为替代液氮贮存异种皮的一种新方法。今后研究中,笔者将进一步改进方法,进行氯化钠处理异体皮的临床研究,进一步降低异体皮的抗原性,更好地服务于临床。

### 参 考 文 献 :

- [1] 万里,廖旭峰,周雪,等. 同种异体皮的制备、贮存及临床应用[J]. 实用医学杂志, 2004, 20(10): 1171-1172.
- [2] OLSZEWSKI W L, MOSCICKA M, ZOLICH D. Human skin preserved in anhydric sodium chloride for months can be successfully transplanted[J]. Ann Transplant, 2004, 9(4): 37-39.
- [3] 刘军,刘建云,王辉,等. 经氯化钠处理的儿童中厚头皮在创面修复中的应用[J]. 转化医学电子杂志, 2016, 3(9): 27-29.
- [4] MASAKATSU H, NATSUKO K, NAOKI M, et al. Improved viability of murine skin flaps using a gelatin hydrogel sheet impregnated with BFGF[J]. J Artif Organs, 2020, 23(4): 348-357.
- [5] 刘军,邓津菊,薛晓东,等. 不同时期瘢痕组织中 VEGF 与 Bax、Bcl-2 的表达及相关性研究[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(6): 453-454.
- [6] 贾晓明,纪晓峰. SYTO/EB 双重染色法测定皮肤活力[J]. 感染、炎症、修复, 2001, 2(4): 209-210.
- [7] MUNDY L R, SERGESKETTER A R, PHILLIPS B T. Optimizing intraoperative evaluation of mastectomy skin flap viability[J]. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2020, 8(6): e2935.
- [8] OMER FARUK U, ATILLA C. Effects of microneedle length and duration of preconditioning on random pattern skin flaps in rats[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2020, 73(9): DOI: 10.1016/j.bjps.2020.03.022.
- [9] 贾晓明,柴家科,高建川,等. 大面积烧伤患者早期切痂冷冻异体皮移植效果评价[J]. 军医进修学院学报, 2003, 24(3): 186-187.
- [10] ALPER B U. Effect of dipyridamole on random pattern skin flap viability in rats[J]. J Plast Surg Hand Surg, 2020, 54(4): 240-247.
- [11] 赵英,廖立新,李国辉. 低温贮存皮肤异体移植的临床应用[J]. 江西医学院学报, 2004, 40(4): 68-69.
- [12] 杨维. 皮肤组织干燥保存的研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.

- [13] LEE H R, SUNG J H. Effect of culture condition on cell viability and gel contraction in a skin chip[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2020, 87: 60-67.
- [14] 杨正弦, 吴皓, 刘一鸣. XBP-1 活性对小鼠移植皮肤存活率的作用研究[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(9): 1160-1163.
- [15] 贺旭. 组织工程皮肤低温保存后的活性研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
- [16] 王德昌, 傅洪滨, 王明青. 异体皮在特重烧伤救治中的应用[J]. *山东医药*, 2002, 42(33): 3-4.
- [17] 姜福全, 王亚东. 新鲜异体皮治疗晚期残余创面体会[J]. *中国医药科学*, 2011, 1(6): 134-135.
- [18] 王锡华, 谷才之, 李惠杰, 等. 应用小块异体皮治疗烧伤残余创面 16 例[J]. *中华烧伤杂志*, 2000, 16(4): 254.
- [19] MORI N, MORIMOTO Y, TAKEUCHI S. Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip[J]. *Biomaterials*, 2017, 116: 48-56.
- [20] GOLASH A, HANSPAL S. Hair tug test: a simple clinical method to assess skin viability after degloving injury[J]. *Indian J Plast Surg*, 2020, 53(1): 164-165.
- [21] FARZANEH C, MOHAMMAD B, SUFAN C. Effect of mesenchymal stem cells and chicken embryo extract on flap viability and mast cells in rat skin flaps[J]. *J Invest Surg*, 2020, 33(2): 123-133.
- [22] 贾晓明, 柴家科, 纪晓峰, 等. 速冻玻璃化储存异体皮的临床应用[J]. *军医进修学院学报*, 2001, 22(1): 14-17.
- [23] BRUNA S, WELKER S, ANDRÉA M. Topical application of a commercially available formulation of vitamin C stabilized by vitamin E and ferulic acid reduces tissue viability and protein synthesis in ex vivo human normal skin[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19(11): DOI: 10.1111/jocd.13413.
- [24] 伍淳操, 魏泓. 部分国家制备和储存异体皮的方法[J]. *中华烧伤杂志*, 2008, 24(1): 77-78.
- [25] LIN Y T, LIN B, LIN D S. Effects of morroniside on the viability of random skin flaps in rats[J]. *J Invest Surg*, 2020, 33(2): 182-188.

(李科 编辑)

**本文引用格式:** 刘军, 王涛涛, 侯明奎. 氯化钠贮存大鼠皮肤抗原性的表达及活力研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(20): 48-52.

**Cite this article as:** LIU J, WANG T T, HOU M K. The antigenicity and viability of rat skin stored in sodium chloride[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(20): 48-52.