

# 曲拉通 X-100 对制备脱细胞真皮基质影响的实验研究\*

左金华 徐慧英 杨佑成 李武修 吕增华 吴淑华 马云

**【摘要】 目的** 探讨由曲拉通 X-100 制备脱细胞真皮基质(ADM)的最佳浓度及作用时间,为表皮细胞种植于 ADM 形成组织工程化口腔黏膜提供实验依据。**方法** 取大鼠 2cm×2cm 大小的皮肤 56 块,置于 0.25% Dispase 试剂中 4℃ 下孵育 48 小时,轻轻去掉表皮,随机分成 7 组,分别浸入 0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、1%、3%、10% 的曲拉通 X-100 中作用 36~80 小时。取标本制作组织切片,HE 染色,大体、光镜观察。**结果** 光镜检查结果显示,制备出的脱细胞真皮基质主要由胶原纤维网架构成;曲拉通 X-100 浓度较低(0.1%~0.5%)时,皮肤脱净细胞成分的时间随浓度升高而逐渐缩短,各浓度间有明显差异( $P < 0.01$ ),而当浓度  $> 0.5%$  时,皮肤脱净细胞时间与浓度无关,组间无显著差异( $P > 0.05$ )。**结论** 曲拉通 X-100 制备大鼠 ADM 的最佳浓度为 0.5%,时间为  $(45 \pm 2.82)$  小时。

**【关键词】** 曲拉通 X-100 脱细胞真皮基质

**【Abstract】 Objective** To investigate the method of preparing rat acellular dermal matrix (ADM) by Dispase and Triton X-100 and to find the best concentration of Triton X-100. **Methods** A total of 56 pieces of fresh rat skin, 2cm×2cm in size, were divided randomly into 7 groups. Each piece of skin was put into a solution of 0.25% Dispase for 48 hours at 4℃. Then, epidermis of each piece of skin was removed. After that, the skin was separately immersed into a solution of 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 1%, 3%, 10% Triton X-100 for 36~80 hours. Samples were taken every 4 hours. Sections were stained with haematoxylin-eosin and observed under the light microscopy. **Results** Light microscopy revealed that ADM was mainly composed of collagen network. The best concentration of Triton X-100 is 0.5% and the time is  $(45 \pm 2.82)$  hours. **Conclusions** Triton X-100 is a good reagent for preparing ADM.

**【Key words】** Triton X-100 Acellular dermal matrix

**【中图分类号】** R318 **【文献标识码】** A

近年来,脱细胞真皮基质(ADM)作为一种新兴真皮替代物逐渐受到人们重视。曲拉通 X-100 原是一种非离子去污剂,已被应用于 ADM 的制备中,但关于曲拉通 X-100 的最佳浓度及作用机制尚未见报道。2003 年~2004 年,我们对曲拉通 X-100 制备 ADM 的最佳浓度及时间进行了研究,以期将为表皮细胞种植于 ADM 上形成组织工程化口腔黏膜并用于临床提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 无菌条件下切取 0.65mm 厚的大鼠皮肤 56 块,每块 2cm×2cm 大小。曲拉通 X-100 为 Sigma 公司生产;离散酶(Dispase)及磷酸盐缓冲液(PBS)为 Gibco 公司生产。

1.2 ADM 的制备及观察方法 将 56 块皮肤置于

0.25% 的 Dispase 中 4℃ 下孵育 48 小时后,轻轻揭掉表皮;然后随机分成 7 组, PBS 冲洗 3 遍,去除皮肤表面的 Dispase;再置于直径 10cm 培养皿中,分别加入含 0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、1%、3%、10% 的曲拉通 X-100(PBS 为溶质)溶液中,在 25℃ 左右摇荡(80 次/min)36~80 小时。皮肤体积与作用溶液比均为 2:5。每隔 4 小时取 1 次标本。以上操作均在无菌条件下进行。对标本行肉眼观察,并对组织切片行 HE 染色光镜检查。经上述处理后,以 HE 染色 10×20 光镜下皮肤全层看不到蓝染核物质及细胞碎片的时间为脱净细胞的时间。制备的 ADM 放入 PBS 中保存。

1.3 统计学处理 每组脱净细胞时间以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间的两两比较用 SNK- $q$  检验。

## 2 结果

2.1 肉眼观察 经 Dispase 作用 48 小时后,可见皮肤边缘表皮与真皮分离,用牙科镊可较容易地将表

\* 山东省卫生厅青年科学研究基金项目(No. 2003CA2CFAB1)

作者单位:滨州医学院附属医院,山东滨州 256003

皮连同毛根从真皮上揭掉;再经曲拉通 X-100 作用,所得 ADM 呈乳白色,形成基底膜和真皮两个面,基底膜面较真皮面光滑,有弹性,弯曲不断裂。

2.2 光镜观察 经 Dispase 作用 48 小时后,基底膜破坏,表皮与真皮分离,附属器上皮与结缔组织亦分离;附属器上皮细胞变性明显,部分细胞核固缩,细胞界限不清;间质内纤维细胞减少,但胶原纤维网架结构仍清晰。再经曲拉通 X-100 作用 36~80 小时后,HE 染色见 ADM 中原真皮内蓝染核物质及细胞碎片已不可见,胶原纤维网架结构清晰,纤维间空隙较大。

2.3 脱净细胞时间 7 组脱净细胞的时间分别为(73±3.19)、(63±2.83)、(52±3.02)、(45±2.82)、(44±3.02)、(46±1.80)、(45±2.54)小时。曲拉通 X-100 浓度较低(0.1%~0.5%)时,皮肤脱净细胞成分的时间随曲拉通 X-100 的浓度升高而逐渐缩短,各浓度之间差异均有非常显著性( $q$  值范围 9.42~19.54,  $P$  均 $<0.01$ ),而当浓度升高到 0.5%以上时,皮肤脱净细胞的时间与曲拉通 X-100 的浓度无明显关系,即 4~7 组之间的差异无显著性( $q$  值范围 0.92~1.84,  $P$  均 $>0.05$ )。

### 3 讨论

曲拉通 X-100 是一种非离子表面活性剂,在水中不解离,在溶液中稳定性高,不易受强电解质无机盐类的影响,能与生物膜中的磷脂等脂质结合形成可溶性复合物;疏水端也能与膜蛋白的疏水区结合形成复合物,溶解于溶液中。因此,能彻底破坏生物膜,使细胞及其内的细胞器溶解破坏。本文结果证实,曲拉通 X-100 制备 ADM 的最佳浓度为 0.5%,

最适作用时间为(45±2.82)小时。浓度升高到 0.5%以上时,其脱净细胞时间不随浓度升高而改变,可能是其结合位点已达到饱和。

Dispase 可分解 IV 型胶原和纤维粘连蛋白,能裂解基底膜中的致密层(富含 IV 型胶原)。纤维粘连蛋白含有细胞结合区,广泛存在于许多组织中,特别是成纤维细胞的表面和结缔组织中,皮肤经 Dispase 处理后,表皮与真皮之间的基底膜以及皮肤附属器与周围结缔组织间的基底膜成分、纤维细胞与结缔组织间的连接均被破坏,有利于曲拉通 X-100 的浸透。

皮肤经脱细胞处理后,可溶性蛋白及细胞成分被去除,仅保留了非细胞成分,主要包括真皮中不溶性细胞外基质蛋白和胶原,而这两种成分已被证实无明显免疫原性。故 ADM 移植后无明显炎症及排斥反应发生,且降解速度慢,可诱导自体成纤维细胞、血管内皮细胞向内生长<sup>[1]</sup>。

作为最近几年才兴起的一种真皮替代物,ADM 制备方法尚未统一,已有学者在神经外科<sup>[2]</sup>、头颈外科、烧伤整形<sup>[3]</sup>等多个学科领域进行研究,因其无明显免疫原性,而显示出很好的应用前景。

### 4 参考文献

1. 左金华,杨佑成,李武修,等. 脱细胞异体真皮基质生物学特性的实验研究. 临床口腔医学杂志, 2004, 20(5): 276~278.
2. Chaplin JM, Costantino PD, Wolpoe ME, et al. Use of an acellular dermal allograft for dural replacement: an experimental study. Neurosurgery, 1999, 45(2): 320~327.
3. 肖仕初,夏照帆,杨措,等. 含表皮细胞和成纤维细胞的复合皮构建及移植实验. 中华外科杂志, 2002, 40(7): 531~533.

(2005-03-11 收稿)

## · 临床札记 ·

### 酚妥拉明致呼吸困难 12 例治疗体会

慈淑华 刘淑萍

2002~2004 年,我们采用酚妥拉明治疗毛细支气管炎患儿,其中 12 例出现呼吸困难。现报告如下。

临床资料:本组 12 例呼吸困难患儿中,男 9 例,女 3 例;年龄 2~6 个月。均于静滴酚妥拉明过程中出现鼻塞、烦躁哭闹、发绀和呼吸困难。将 12 例患儿随机分为两组:滴鼻组(7 例)予 1% 麻黄素滴鼻,各鼻孔每次滴 2 滴;滴口组(5 例)予

1% 麻黄素滴口,每次滴 4 滴。治疗后 2~4 分钟,烦躁哭闹、呼吸困难、鼻塞消失者为有效,未消失者为无效。

结果:滴鼻组有效 6 例,无效 1 例;滴口组有效 4 例,无效 1 例。两组疗效相似,无显著性差异( $P>0.05$ )。

讨论:婴儿因喉部及声门狭小,喉部黏膜血管丰富,使用酚妥拉明后可因鼻黏膜充血、肿胀致鼻塞、呼吸困难,严重时喉黏膜充血、肿胀导致喉梗阻。麻黄素为肾上腺素受体激动剂,能拮抗酚妥拉明的不良作用。滴鼻后药物通过鼻腔、后鼻孔到喉部,滴口后通过吸气作用药物迅速到达喉部。本文结果证实,两种方法都能收缩喉黏膜血管减轻充血、水肿,解除梗阻、缓解呼吸困难。酚妥拉明致呼吸困难与喉梗阻有关,临床医师用其治疗毛细支气管炎时应慎用。

作者单位:荣成市人民医院,山东荣成 264300