

# 部分国家制备和储存异体皮的方法

伍淳操 魏泓

1869 年, Girdner 首次采用尸体皮覆盖大面积烧伤患者<sup>[1]</sup>, 为烧伤治疗开辟了一条新的道路。世界上首家皮肤保存中心是 1949 年成立的美国海军皮肤保存中心<sup>[2]</sup>, 此后很多国家陆续建立相关机构。随着用皮量的增加, 对供体、取皮、加工、储存的要求也越来越高, 皮肤保存中心逐渐发展成专业化的地区性或国家性组织。质量体系标准化、皮肤保存技术的发展和巨大的经济效益推动了这一进程<sup>[3]</sup>, 在实践中各中心都发展了一整套理论和方法, 着力控制皮肤质量, 为临床使用提供支持。

## 1 供体选择

供体状况是影响皮肤质量的首要因素。意大利皮肤保存中心遵循国际法规, 执行器官移植的质量标准。所有取皮、数据记录、加工、储存、分发等过程都必须按照标准技术规程操作。供体的起始选择必须精确, 以此降低皮肤移植过程中疾病传播的危险。供体选择须以医疗数据(临床记录和报告)为依据, 多数中心采用最低限度的血清学检测, 包括艾滋病毒(HIV)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒(HCV)、梅毒螺旋体检测等。另外还有随机检测, 如检测人 T 细胞病毒、巨细胞病毒(CMV)以及血型同族抗原和 Rh 血型<sup>[2]</sup>。

英国组织库协会起草了关于供体选择的文件, 规定供体不限性别、16~70 岁、临床死亡后 24~48 h 内取皮以保证其活力<sup>[4]</sup>。根据北伦敦组织库的建议, 供体的亲属需要填写调查问卷, 详细介绍供体病史。还要考虑血液稀释的影响, 如果供体在死亡前 48 h 滴注了很多含药物成分的液体, 任何样品用于血清学检测其结果都不能真实反映病情。

新加坡皮肤保存中心为了解决皮肤供体短缺的问题, 在卫生部的建议下与眼科中心合作, 说服在后方总医院死亡的所有患者同时捐赠角膜和皮肤<sup>[5]</sup>。

在前南斯拉夫皮肤保存中心, 90% 的皮肤来自

多组织供体。供体的筛选标准如下: 死亡后时间小于 12 h, 年龄大于 18 岁, 无癌症史、自身免疫性疾病史、静脉药物滥用史和酒精中毒史; 无 HIV 感染、慢性病毒感染、皮肤损伤、败血症等<sup>[6]</sup>。同时还要检测 HIV 1/2、乙型肝炎表面抗原、HCV、梅毒螺旋体、CMV、埃波拉病毒等。

## 2 取皮和加工

在取皮加工的过程中稍有不慎, 就有可能影响皮肤质量, 无法达到临床使用要求。这主要体现在无菌和活力 2 个方面。意大利皮肤保存中心由一组经授权的临床医师或者经过专门训练的非医学专业人员进行操作, 从而减少皮肤内固有菌丛量<sup>[2]</sup>。他们采用电动取皮刀从供者背部或下肢处获取厚度 0.4~0.8 mm 的皮片, 置于培养液中用无菌冷藏容器送至保存中心, 在那里进行处理并记录数据。

英国皮肤保存中心认为, 供体虽然处于死亡状态, 但不能将皮肤本身视为无菌, 仍然需要按照无菌要求进行操作。电动取皮刀能够保证皮片的厚度均匀, 将其控制在厚度 0.4 mm、长 10 cm、宽 7 cm 的范围, 用这种方法每个供体可取皮 2000 cm<sup>2</sup>。皮片先放入转运液, 再放入深低温保存液中[含体积分数 15% 甘油的磷酸盐缓冲液(PBS), 其中含青霉素 10 万 U/L、链霉素 100 mg/L、五氯硝基两性霉素 B 0.625 mg/L 等]。之后在每个供体上随机取 10 个皮肤样本和血液样本进行相关检测<sup>[4]</sup>。

在新加坡皮肤保存中心, 取皮小组一般由 2 名临床医师、1 名中心官员和 1 名护士组成。所有取皮过程严格执行外科手术标准。取皮区域主要限于背、臀和下肢, 取皮厚度控制在 0.38 mm, 平均 100 cm<sup>2</sup> (12.5 cm × 8.0 cm)<sup>[5]</sup>。取皮同时保留样本作需氧菌、厌氧菌和真菌检测, 并进行血液样品检测。皮肤放在冰盒中运回皮肤保存中心, 用含 250 mg/L 次氯酸钠的 PBS 洗去过量的润滑剂及皮肤死细胞, 再次进行皮肤样品的微生物检测。特殊情况下, 可以将检验结果阴性的新鲜皮肤直接用于烧伤患者的创面治疗。其他皮肤被切成 200 cm<sup>2</sup> 大小, 放入装满新鲜 DMEM 培养基(含两性霉素 B)的无菌容器

作者单位: 400054 重庆, 宗申医达生物技术研发有限公司(伍淳操); 第三军医大学基础部实验动物学教研室(魏泓)

通讯作者: 魏泓, Email: weihong63528@163.com, 电话: 023-68753882

中,4℃以下储存 10 d,培养基每 3 天更换 1 次。第 10 天在储存皮肤上压制网孔,修剪边缘,适当裁剪后在真皮面贴敷棉绷带,折叠放入双层包装冷藏保存。同时将供体基本情况、取皮日期和皮片尺寸等相关资料标注在每个容器外,随机抽取皮肤样品进行第 3 次检测。

从 1973 年开始,前南斯拉夫皮肤保存中心采用聚维酮碘、醋酸氯己定和异丙醇联合消毒皮肤,取皮严格执行无菌操作。

以色列皮肤保存中心将取下的皮肤立即放入含抗生素(100 万 U/L 青霉素、1 g/L 链霉素)的等渗盐水中,于 4~8℃冷藏过夜。之后冲洗皮肤并反复浸泡 7 次,再放入含新霉素(5 g/L)的等渗盐水溶液中冲洗浸泡 10 min,反复 3 次<sup>[7]</sup>。

### 3 皮肤储存

由于取皮和用皮时间不一致,各国皮肤保存中心都采用了有效的保存方法,既能保证较长时间的储存,也能保证临床使用效果<sup>[8-9]</sup>。

在意大利皮肤保存中心,最普遍的保存技术有 2 种:(1)在 4~8℃条件下储存于浓缩甘油溶液中,皮肤没有活性但保留了结构和机械特性,是较好的生物敷料;(2)用深低温保存液储存于-196℃条件下<sup>[2]</sup>,能够保留一定的皮肤细胞活性。另外还有“新鲜皮”保存方式,但因为存在高度危险性,没有被广泛应用。其他还有“冷冻干燥”或称冻干法,使组织仅含少量水分,便于储存和运送。

在英国皮肤保存中心,有活力和无活力的皮肤都要入库。活力皮保存在-80℃、体积分数 15%的甘油抗冻液中<sup>[4]</sup>,无活力皮通过提高甘油浓度进行加工。美国组织库协会的条例指出,活力皮可以在-80℃下储存 6 个月,超过此期限都将被放入体积分数 98%的甘油中作为无活力皮备用。欧洲皮肤保存中心无活力皮的储存时间名义上为 2 年。

新加坡皮肤保存中心用含有体积分数 10%二甲亚砜的 DMEM 作为抗冻液处理皮片 20 min,皮片中间用塑料薄片相隔,外加双层密闭包装。之后皮片以 1~5℃/min 降温速度均匀冷冻,至-100℃时转入-150℃的超低温冰箱储存 5 年<sup>[5]</sup>。

1994 年,前南斯拉夫皮肤保存中心开始用浓度不断增加的甘油处理供体皮,最终储存在体积分数 85%的甘油中。甘油的杀菌作用降低了皮肤样本中细菌培养的阳性发生率,但皮肤本身亦没有活性。现在的质量标准要求中心每周检查冰箱的运行情

况,每 3 个月检测 1 次无菌情况,同时对储存间的环境也要进行必要的控制。

以色列皮肤保存中心也采用 2 种皮肤保存方式。(1)甘油化保存:取皮后立即放入含体积分数 50%甘油的等渗盐水中过夜,次日在含体积分数 85%甘油的等渗盐水中 37℃孵育 4 h,放入体积分数 98%的甘油中保存。(2)深低温保存:将处理后的皮条(40.00 cm×10.00 cm×0.03 cm)用无菌凡士林油纱包裹,放入 RPMI 1640 保存液(含青霉素 10 万 U/L、链霉素 100 mg/L、两性霉素 B 2.5 mg/L、庆大霉素 40 mg/L、甘油体积分数 15%)中 2 h 以上,以 1℃/min 的速度降温至-130℃后,放入液氮罐(-145~-180℃)中冷冻保存<sup>[7]</sup>。

### 4 其他

皮肤保存中心的标准化操作、环境控制和系统化管理,对提升烧伤治疗的效果非常重要。但皮肤保存中心也会遇到诸如皮源供应不足、资金匮乏、临床使用中感染等问题。解决的办法有:寻求政府支持,加大宣传力度使更多的人加入到皮肤捐赠队伍中,寻找其他合适的替代品等<sup>[9-10]</sup>。

### 参考文献

- [1] Pianigiani E, Risulo M, Ierardi F, et al. Prevalence of skin allograft discards as a result of serological and molecular microbiological screening in a regional skin bank in Italy. *Burns*, 2006,32(3):348-351.
- [2] Pianigiani E, Ierardi F, Di Simplicio FC, et al. Skin bank organization. *Clin Dermatol*,2005,23(4):353-356.
- [3] Kearney JN. Quality issues in skin banking: a review. *Burns*, 1998,24(4):299-305.
- [4] Freedlander E, Boyce S, Ghosh M, et al. Skin banking in the UK: the need for proper organization. *Burns*,1998,24(1):19-24.
- [5] Chua A, Song C, Chai A, et al. The impact of skin banking and the use of its cadaveric skin allografts for severe burn victims in Singapore. *Burns*,2004,30(7):696-700.
- [6] Tomaz F, Janezic W. Then and now 25 years at the Ljubljana burns unit skin bank. *Burns*,1999,25(7):599-602.
- [7] Ben-Bassat H, Chaouat M, Zumai E, et al. The Israel national skin bank: quality assurance and graft performance of stored tissues. *Cell and Tissue Banking*,2000,1(4):303-312.
- [8] Alotto D, Ariotti S, Graziano S, et al. The role of quality control in a skin bank: tissue viability determination. *Cell and Tissue Banking*,2002,3(1):3-10.
- [9] David P, Mackie H. The euro skin bank and glycerol-preserved allografts. *Burns*,2002,28 Suppl 1:S1.
- [10] Fimiani M, Pianigiani E, Di Simplicio FC, et al. Other uses of homologous skin grafts and skin bank bioproducts. *Clin Dermatol*,2005,23(4):396-402.

(收稿日期:2007-04-02)

(本文编辑:王旭)