

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.17.006

改良皮片 4℃低温保存方法在创面二次植皮治疗中的应用研究*

何志¹ 李学拥¹ 雷战军¹ 李靖¹ 黄辞^{2Δ}

(1 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院烧伤整形科 陕西 西安 710038;

2 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院教科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨改良皮片 4℃低温保存方法在创面二次植皮治疗中的应用效果。**方法:**① 动物实验:健康成年豚鼠 3 只,处死后,取背部皮肤做成 32 个 1 cm× 1 cm 小皮样,随机分为新鲜皮组、庆大盐水保存组、RPMI 保存组、改良 RPMI 保存组进行 4℃保存;1 周后测定皮肤活力;② 临床实验:观察自 2018 年 10 月至 2018 年 12 月,二期植皮患者 33 例,应用改良 RPMI 4℃低温保存皮肤二期回植的患者 16 例,与重新取皮植皮患者 17 例比较其皮片成活率。**结果:**动物实验证实:改良 RPMI 保存组 4℃保存组在皮肤储存 1 周时皮肤平均活力较庆大盐水保存组、RPMI 保存组高($P<0.05$);临床实验证实:改良 RPMI 保存组与重新植皮的皮片平均成活率没有显著性差别($P>0.05$)。**结论:**改良 4℃断层皮片低温保存方法可短期内保存皮肤较高的活力,是皮片再利用的一种有效方法。

关键词:低温皮肤保存;4℃;皮肤活力

中图分类号:R-33;R62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)17-3230-04

A Study on the Application of Improved Skin Cryopreservation Technique at 4 °C for the Wounds Needing Secondary Skin-grafting*

HE Zhi¹, LI Xue-yong¹, LEI Zhan-jun¹, LI Jing¹, HUANG Ci^{2Δ}

(1 Department of Burns and Plastics Surgery, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 Department of Academic studies, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To study the application value of modified 4℃ skin cryopreservation technique for the wound needing second skin grafting. **Methods:** ① Animal experiment: 3 healthy adult guinea pigs were sacrificed. 32 1 cm× 1 cm pieces of skin taken from the back were randomly divided into 4 groups: the fresh skin group, Gentamicin-brine group, RPMI group, improved RPMI group. After 1 week, the viability of skins were measured. ② Clinical experiment: 16 cases of patients needing secondary skin-grafting from October 2018 to December 2018 were selected, 16 cases were given improved RPMI 4℃ cryopreservation and the other 17 cases were given needing skin-grafting. The skin-grafting survival rates were evaluated. **Results:** Animal experiment: the average viability of skins in improved RPMI 4℃ cryopreservation group were higher than the Gentamicin-brine group and RPMI group after 1 week ($P<0.05$). Clinical experiment: there was no significant difference in the skin-grafting survival rate between the improved RPMI cryopreservation group and the new skin-grafting group ($P>0.05$). **Conclusion:** Improved RPMI 4℃ cryopreservation technique is an effective method to reuse the skins by keeping the high viability for a short time.

Key words: Skin Cryopreservation Technique; 4℃; The Skin Viability

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)17-3230-04

前言

皮片移植是烧创伤等创面修复的常用手段^[1],但往往由于创基条件不佳、患者全身营养差、包扎固定不牢等原因造成一次植皮后皮片无法完全成活,临床上往往会手术时多取一点皮片,并保存下来,二期剩余创面进行补充植皮^[2];还有一些皮肤完全撕脱的患者^[3,4],创面条件差或病情不稳定,无法一期将皮

片回植,必须待创基良好且病情稳定后才可实施撕脱皮肤回植^[5],这就要求需将撕脱皮肤修成皮片后保存下来,二期再回植。这就要求保持皮片较高的活力,才能保证二期植皮的成活。如何储存皮片并保持其良好的活力是临床中的常见难题,临床上往往将皮片用庆大盐水纱布包裹,普通冰箱 4℃保存^[6],但杨宗城等^[7]认为 4℃冷藏的皮肤仅能保存 3 天的活力,超过 3 天就无法保证皮片的成活。我科将胎牛血清和庆大霉素加入

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272134)

作者简介:何志(1985-),硕士研究生,中级职称,主要研究方向:创面修复, E-mail: modernhuatuo@163.com

Δ 通讯作者:黄辞(1987-),硕士研究生,中级职称,主要研究方向:组织工程, E-mail: 522383418@qq.com

(收稿日期:2019-04-12 接受日期:2019-05-15)

RPMI-1640 营养液中,发现对皮肤具有更好的保存效果,能够满足临床需要,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与材料

成年豚鼠,雄性,270 g $\pm$ 10 g,3 只。购于中国人民解放军空军军医大学实验动物中心。RPMI-1640 (R8758-500 mL, Sagma, with L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture), MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma, M2128-100 mg), 胎牛血清(特级,四季青 13011-8611), 硫酸庆大霉素注射液(2 mL, 8 万单位,河南鼎昌)。本实验实施前已通过中国人民解放军空军军医大学第二附属医院伦理委员会批准(批准编号 TDLL201704-20)。

1.2 方法

1.2.1 皮样制作和分组 根据杨宗城方法^[7]将豚鼠用过戊巴比妥钠腹腔注射处死后,取背部全层皮肤,剃毛,用 0.1% 苯扎溴铵浸泡 15 分钟消毒,无菌条件下去除皮肤下筋膜组织,平均切割分成 32 个 1 cm $\times$ 1 cm 小皮样,随机分为新鲜皮组、庆大盐水保存组、RPMI 保存组、改良 RPMI 保存组。新鲜皮组进行新鲜皮肤活力测定,作为对照。另外两组按照朱兆明^[8]方法,皮片与液体按照 2 cm²/mL 进行储存,将皮片放于无菌瓶内,皮片与液面距离为 0.5 cm,每 3 天更换储存液,4℃ 冰箱保存。1 周后检测皮肤活力。

1.2.2 改良 RPMI 4℃ 皮肤储存液配置 按照 RPMI-1640、10% 胎牛血清、庆大霉素 1600 U/mL 配置。

1.2.3 皮肤活力计算 按照谢卫国^[9]方法,首先测定吸光度 OD 新鲜和 OD 空白,从新鲜皮组随机选取 4 块测定新鲜皮吸光度值 OD,再将另 4 块皮在沸水中煮熟 30 min,再同法测定 OD 作为 OD 空白。新鲜皮肤活力 = OD 新鲜 - OD 空白,以此作为皮肤活力测定的基准,样本皮肤活力百分比 = (样本 OD - 煮熟皮肤 OD) / 新鲜皮活力 $\times$ 100%。为减少皮样大小误差,所有 OD

值测量完均需除以样本重量。

1.3 临床实验

1.3.1 一般资料 随机选取改良 RPMI 保存组二期回植皮患者与重新取皮植皮患者,年龄 18-40 岁,平均 30 岁。

1.3.2 纳入标准、分组 纳入标准:二期补充植皮患者,皮片厚度 0.3 mm,创面新鲜,没有合并骨、肌腱、神经、血管外露。

分组:本实验共纳入 33 例病例,根据一期保留皮片与否分为改良 RPMI 保存组 16 例和重新取皮组 17 例。

1.4 方法

1.4.1 改良 RPMI 4℃ 皮肤储存液配置 按照 RPMI-1640、10% 胎牛血清、庆大霉素 1600 U/mL 配置。

1.4.2 皮片储存方法 按照朱兆明^[8]方法,皮片与储存液 2 cm²/mL 比例,将皮片放于无菌瓶内,皮片与液面距离为 0.5 cm,每 3 天需更换储存液。

1.4.3 创面处理及取皮植皮 创面按时换药,待创基适宜植皮时,再进行皮肤回植或移植。所取皮片均为 0.3 mm。皮片打包或加压包扎、局部制动。

1.5 观察指标

两组皮片回植后,皮片成活效果^[11]:优:皮片色泽转红,无表皮脱落;良:皮片色泽转红,部分表皮脱落;中:表皮完全脱落;差:表皮发黑不转红。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20 软件分析数据,计量资料和计数资料的比较分别采用单因素方差分析和卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 1 各组动物皮肤 4℃ 冷藏 1 周后活力比较

庆大盐水保存组、RPMI 保存组、改良 RPMI 保存组皮肤冷藏一周后活力分别为 28.77% $\pm$ 15.62%、69.42% $\pm$ 9.12%、93.3% $\pm$ 8.24%,改良 RPMI 保存组 > RPMI 保存组 > 庆大盐水保存组,组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组皮肤 4℃ 冷藏 1 周后活力比较

Table 1 Comparison of skins vitality between different groups after 1 week of cold storage at 4℃

Groups	Mean	SD	Bonferroni's Multiple Comparison Test	t	P
RPMI+	93.30%	8.24%	RPMI+ vs RPMI	4.162	< 0.05
RPMI	69.42%	9.12%	RPMI+ vs NS	11.25	< 0.05
NS	28.77%	15.62%	RPMI vs NS	7.084	< 0.05

Note: RPMI+ (Improved RPMI Cryopreservation Group), RPMI (RPMI-1640 Cryopreservation Group), NS (Normal Saline Cryopreservation Group), $F = 64.66$, $P < 0.01$, RPMI+ vs RPMI, RPMI+ vs NS, RPMI vs NS, $P < 0.05$.

2.2 改良 RPMI 组与重新取皮组皮片成活率比较

改良 RPMI 组 16 例,重新取皮组 17 例。皮肤成活率比较:改良 RPMI 组优 12 例(75%)、良 3 例(19%)、中 1 例(6%),重新取皮组优 14 例(82%)、良 2 例(12%)、中 1 例(6%),两组皮肤成活率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 典型病例

患者赵某某,男,54 岁,车祸致左手背皮肤完全撕脱,急诊

给予清创,由于创基差,一期将撕脱皮肤修成皮片后,放入改良 RPMI 冷藏液中保存,1 周后进行回植,尺侧剩余创面重新取中厚皮修复,术后 8 天,冷藏皮肤完全成活,除颜色与新取皮有差别外,无坏死发生。

3 讨论

3.1 4℃ 皮肤低温保存延期回植技术,可以解决一期剩余皮肤无法再利用的临床难题

表 2 改良 RPMI 组与重新取皮组皮片成活效果比较

Table 2 Comparison of skin graft survival rate between Improved RPMI Group and New Skin-grafting Group

Groups	A	B	C	D	Total	P
RPMI+	12(75%)	3(19%)	1(6%)	0	16	0.688
New	14(82%)	2(12%)	1(6%)	0	17	

Note: RPMI+(Improved RPMI Cryopreservation Group), New (New Skin-grafting Group), ABCD: best, good, moderate, worst).



图 1 皮肤储存典型病例

Fig.1 A typical case of skin cryopreservation

Note: ① the avulsion skin; ② The cryopreservation skin was replanted after 1 week; ③ The cryopreservation skin was alive 8 days after surgery.

皮片移植是临床上创面修复的常用手段,而由于创面条件或患者全身情况等不利于皮片成活,临床中经常需要将剩余皮肤进行保存,二期再回植。如何储存皮片并保持其良好的活力是临床中的常见难题^[12],临床中往往将皮片用庆大盐纱布包裹,普通冰箱 4℃ 保存,杨宗城^[7]认为 4℃ 冷藏的皮肤仅能保存活力 3 天,3 天后活力将迅速降低,回植后将造成皮片坏死。但在临床工作中,二期植皮一般需 5-7 天,而盐纱布储存法只能保存 3 天,无法满足临床需求。而如果将剩余皮片丢弃,二期从正常部位取皮,不仅浪费了患者的皮肤资源,又造成二次损伤。常规治疗方法已无法满足此类临床治疗的需要。针对以上问题,我们利用改良 RPMI 法 4℃ 低温皮肤储存的方法,可以有效保存皮肤活力,减少患者皮肤的浪费,减轻再次取皮带来的二次创伤。

3.2 4℃ 不同储皮液的选取与改进为延长皮肤冻存时间提供保障

4℃ 皮肤储存方法目前研究发现的有三类。一类是生理盐水储存法,朱兆明等^[10]用 8 万 u/500 mL 庆大霉素生理盐水纱布包裹,放入无菌袋内密封保存。储存 3 天后,皮片内琥珀酸脱氢酶和氧耗量已下降到储存前的 60%-70%,储存 1 周后,活力只有 33%-48% 左右,回植后将会坏死,所以应用盐纱布 4℃ 储存的方法,最好在 3 天内回植。另一类是营养液储存法^[8]。应用作细胞培养的液体进行皮肤储存,如 DMEM、MEM、RPMI-1640 等^[13],目前研究显示 RPMI-1640 营养液效果最佳,储存 6 天,皮片琥珀酸脱氢酶活力可维持在 48.4% 左右。第三类是原解放军总医院第一附属医院的 B 保养液法^[10],在 Krebs 林格磷酸缓冲液中加入甘露醇、谷胱甘肽、小红参醌等营养和抗氧化的药物,可提高皮片活力。据报道,其 4℃ 皮片储存 6 天的活力为 85.4%,高于 RPMI-1640 营养液储存组。但目前由于目前市场尚没有小红参醌的成品药物,且 Krebs 林格磷酸缓冲液等药物配置比较繁琐,容易沉淀等情况给临床应用带来不便。液氮可长期对皮片进行储存^[14],但由于皮片需经历冻存和复温

- 两次损伤,最终皮片活力保持在 60-70%,不利于皮片短期保存,并且需要对皮片进行较为复杂的包装等操作,不利于临床推广。

3.3 改良 RPMI-1640 可提高低温保存皮肤的活力

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) 培养基是 1966 年由 Moore 及其同事开发^[15]。在无血清条件下,RPMI-1640 也表现出可支持多种细胞系的生长,广泛用于细胞融合和杂交细胞的生长^[16,17]。Basaran O 等^[18]认为由于其富含细胞生存所需的各种氨基酸和电解质,利于上皮细胞生长。我们在 RPMI-1640 培养基中加入 10% 胎牛血清和庆大霉素 1600 U/ml,其中胎牛血清取自剖宫产的胎牛,是牛血清中品质中最好的,含有众多促进细胞生长的生长因子,并且所含抗体、补体等对细胞有害的成分最少^[19,23]。王美霞等研究发现胎牛血清和海藻糖对人乳腺细胞 HBL-100 具有低温保护作用^[24]。庆大霉素是临床常用的广谱抗生素,通过干扰细菌蛋白质合成而发挥抗菌作用。大量研究^[25,31]表明庆大霉素良好的抗菌性能,可缩短感染创面的愈合时间。我科配置的改良 RPMI 4℃ 皮肤冷藏液,7 天可保持皮片 93% 左右的活力,高于液氮法,并且在普通冰箱中就可保存,可以满足临床需要。

3.4 改良 RPMI-1640 皮肤低温储存的弊端和注意事项

应用改良 RPMI-1640 进行 4℃ 皮肤储存,需要按时更换液体,一旦发现储皮液颜色减淡,需要及时更换,以免储皮液内细胞代谢产物增多,营养成分减少,影响皮肤活力。尽管改良 RPMI 4℃ 皮肤存储液可以短期内保持皮肤活力,但如果超过一周,皮片活力会明显下降,影响植皮效果。如估计回植时间过长时,仍需进行深低温皮肤储存,才能保持其活力。

参考文献(References)

- [1] Greenwood JE. The evolution of acute burn care - retiring the split skin graft[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2017, 9(6): 432-438
- [2] Herskovitz I, Hughes OB, Macquhae F, et al. Epidermal skin grafting

- [J]. *Int Wound J*, 2016,13 (suppl. S3): 52-56
- [3] Yang J, Cai N, Zhai H, et al. Natural zwitterionic betaine enables cells to survive ultrarapid cryopreservation [J]. *Sci. Rep*, 2016, 6(1): 37458
- [4] Michele Maruccia, Maria G. Onesti, Valentina Sorvillo, et al. An Alternative Treatment Strategy for Complicated Chronic Wounds: Negative Pressure Therapy over Mesh Skin Graft[J]. *BioMed Research International*, 2017, 8395219
- [5] Yuan K, Zhao B, Cooper T, et al. The management of degloving injuries of the limb with full thickness skin grafting using vacuum sealing drainage or traditional compression dressing: A comparative cohort study[J]. *J Orthop Sci*, 2019, S0949-2658(19): 30010-7
- [6] Li Z, Overend C, Maitz P, et al. Quality evaluation of meshed split-thickness skin grafts stored at 4 °C in isotonic solutions and nutrient media by cell cultures[J]. *Burns*, 2012, 38(6): 899-907
- [7] 杨宗城 主编 [M]. 中华烧伤医学, 北京: 人民卫生出版社, 2008, 9: 333-365
- [8] 朱兆明, Ritchie DG, Herndon DN. 4℃储存皮肤的最佳条件[J]. 中华外科杂志, 1989, 27: 169-172
- [9] 谢卫国, 王德运, 赵超丽, 等. 用于离体皮肤活力测定的一种新方法[J]. 中华医学杂志, 1998, 22(4): 190-191
- [10] 朱兆明, 吴志谷, 周幼勤, 等. 4℃冰箱储存皮肤中的几个问题的研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1989, 5: 139-140
- [11] 赵均福, 于冬梅, 齐玉国, 等. 肢体皮肤剥脱伤术后高压氧治疗疗效观察[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(6): 503
- [12] Holzer PW, Leonard DA, Shanmugarajah K, et al. A Comparative Examination of the Clinical Outcome and Histological Appearance of Cryopreserved and Fresh Split-Thickness Skin Grafts [J]. *Burn Care Res*, 2017, 38(1): 55-61
- [13] Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE. Influence of Cryopreservation Solution on the In Vitro Culture of Skin Tissues Derived from Collared Peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) [J]. *Biopreserv Biobank*, 2018, 16(2): 77-81
- [14] Tian L, Ji X, Chen T, et al. Deep hypothermic preservation of autologous skin in the treatment of large-area circumferential multi-plane degloving trauma: a pilot study of 2 cases[J]. *Cell Tissue Bank*. 2019, 20(1): 109-115
- [15] Moore, G.E., Gerner, R.E., et al. Culture of Normal Human Leukocytes [J]. *JAMA*, 1967, 199: 519-524
- [16] Ikeda S, Sugimoto M, Kume S. The RPMI-1640 vitamin mixture promotes bovine blastocyst development in vitro and downregulates gene expression of TXNIP with epigenetic modification of associated histones[J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2018, 9(1): 87-94
- [17] Özbilgin A, Kaya T, Çavuş İ, et al. Comparison of Reproduction Densities in Different Liquid Media of *Trypanosoma cruzi* and Cryopreservation[J]. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2018, 42(4): 249-253
- [18] Basaran O, Ozdemir H, Kut A, et al. Effects of different preservation solutions on skin graft epidermal cell viability and graft performance in a rat model[J]. *Burns*, 2006, 32: 423-429
- [19] Mahler M, Fritzler MJ. Diagnostic Utility of Anticarbamylated Protein Antibodies as Measured Using Carbamylated Fetal Calf Serum [J]. *J Rheumatol*, 2018, 45(3): 438-439
- [20] Schwarz KRL, Botigelli RC, Del Collado M, et al. Effects of fetal calf serum on cGMP pathway and oocyte lipid metabolism in vitro[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2017, 29(8): 1593-1601
- [21] Karim A1, Hall AC. Chondrocyte Morphology in Stiff and Soft Agarose Gels and the Influence of Fetal Calf Serum [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5):1041-1052
- [22] Fernandez-Rebollo E, Mentrup B, Ebert R, et al. Human Platelet Lysate versus Fetal Calf Serum: These Supplements Do Not Select for Different Mesenchymal Stromal Cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5132
- [23] Driedonks TAP, Nijen Twilhaar MK, Nolte-t Hoen ENM. Technical approaches to reduce interference of Fetal calf serum derived RNA in the analysis of extracellular vesicle RNA from cultured cells[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 8(1): 1552059
- [24] 王美霞, 梁玮, 叶萍, 等. 海藻糖和胎牛血清对人乳腺细胞 HBL-100 低温保存的影响[J]. 制冷学报, 2017, 38(5): 107-113
- [25] Wang P, Long Z, Yu Z, et al. The efficacy of topical gentamycin application on prophylaxis and treatment of wound infection: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Clin Pract*, 2019, 27: e13334
- [26] Junka A, Bartoszewicz M, Dziadas M, et al. Application of bacterial cellulose experimental dressings saturated with gentamycin for management of bone biofilm in vitro and ex vivo[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2019, 18
- [27] Shcherbakov DA, Raemgulov RA, Bukharova KP, et al. The effectiveness of the intra-tympanic administration of methylprednisolone and gentamycin for the treatment of Meniere's disease[J]. *Vestn Otorinolaringol*, 2018, 83(5): 17-20
- [28] Yazdi H, Yousof Gomrokchi A, Nazarian A, et al. The Effect of Gentamycin in the Irrigating Solution to Prevent Joint Infection after Anterior Cruciate Ligament (ACL) Reconstruction [J]. *Arch Bone Jt Surg*, 2019, 7(1): 67-74
- [29] Zawadzki PJ, Perkowski K, Kotlarski M, et al. Comparative study on usefulness of gentamycin-containing collagen implants in the treatment of patients with osteitis and osteomyelitis of the craniofacial skeleton[J]. *Ann Agric Environ Med*, 2017, 24(2): 299-302
- [30] Zhuang Y, Chen W, Yao F, et al. Short-Term Pretreatment of Sub-Inhibitory Concentrations of Gentamycin Inhibits the Swarming Motility of *Escherichia Coli* by Down-Regulating the Succinate Dehydrogenase Gene[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(4): 1307-1316
- [31] Vlastarakos PV, Iacovou E, Nikolopoulos TP. Is gentamycin delivery via sustained-release vehicles a safe and effective treatment for refractory Meniere's disease? A critical analysis of published interventional studies[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2017, 274(3): 1309-1315