

## • 论著 •

## 不同方法制备猪脱细胞真皮基质及创面移植的实验研究

马忠锋 柴家科 杨红明 刘强 许明火 尹会男

**【摘要】 目的** 比较两种方法制备的猪脱细胞真皮基质分别与自体刃厚皮复合移植修复大鼠全层皮肤缺损的效果。**方法** 使用 Dispase II /TritonX - 100(中性蛋白酶/曲拉通)和高渗盐水/十二烷基硫酸钠(SDS)两种方法去除猪表皮及真皮中的细胞成分,分别得到猪脱细胞真皮基质 I 和 II。63 只 SD 大鼠背部全层皮肤缺损分别使用猪脱细胞真皮基质 I + 自体刃厚皮及猪脱细胞真皮基质 II + 自体刃厚皮覆盖,术后观察移植成活率和植皮区收缩率,同时取移植体进行组织学观察,并与单纯自体刃厚皮移植相比较。**结果** 两种方法制备的猪脱细胞真皮基质分别与自体刃厚皮复合移植的移植体成活率和植皮区收缩率差异无显著性,组织学观察显示复合皮上皮化良好,胶原纤维排列有序,基底膜结构完整。两复合皮组术后第 6 周移植体成活率与自体刃厚皮组比较差异均无显著性,术后第 4 周开始两复合皮组移植体收缩率明显降低。**结论** 两种方法制备的异种脱细胞真皮基质与自体皮复合移植都能很好地修复全层皮肤缺损,改善创面愈合质量。

**【关键词】** 猪脱细胞真皮基质; 自体刃厚皮; 皮肤移植; 复合移植

**Acellular porcine dermal matrix produced with different methods and an experimental study on its transplantation to skin wounds** MA Zhong - feng, CHAI Jia - ke, YANG Hong - ming, LIU Qiang, XU Ming - huo, YIN Hui - nan. Department of Burns and Plastic Surgery, Burns Institute, 304 th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

**【Abstract】 Objective** To observed the effect of healing quality of composite skin grafting consisting of acellular porcine dermal matrix combined with autologous split - thickness skin graft. **Methods** Porcine skin was treated with dispase II /triton X - 100 or hyperosmotic saline/sodium - dodecyl - sulfate (SDS) respectively, and acellular porcine dermal matrix I (APDM I) and APDM II were obtained. Sixty - three Sprague - Dawley rats with full - thickness skin defects on the back were separately covered with APDM I + split - thickness autologous skin, or APDM II + split - thickness autologous skin. The quality of wound healing was observed, the rates of survival and contraction of the grafts were calculated, the tissue samples were harvested for histological examination, and compared with that of autologous split - thickness skin graft. **Results** The wound healing quality of composite skin I, and II was good. There was no significant difference in the rate of survival and contraction of the grafts between the two composite skin grafting groups. It was indicated by histological examination intact basal membrane. There was no significant difference in the survival rate between composite skin grafting groups and autologous split - thickness skin at the 6 th week after operation, but the contraction rates of the grafts in the composite skin groups were lower. **Conclusion** Full - thickness skin defect can be healed by covering with acellular porcine dermal matrix produced by two methods combined with split - thickness autograft, and it can help improve the quality of wound healing.

**【Key words】** acellular porcine dermal matrix; autologous split - thickness skin; skin transplantation; composite skin transplantation

对创面覆盖物的研究表明,如果缺乏真皮成分的支持和调控,来自创面基底的成纤维细胞将合成不成熟的基质,最终成为瘢痕而取代缺失的真皮,造成创面愈合质量较差<sup>[1]</sup>。为此我们采用 Dispase II / Triton X - 100(中性蛋白酶/曲拉通)和高渗盐水/十二烷基硫酸钠(SDS)两种方法制备猪脱细胞真皮基质,并以此为支架与自体刃厚皮复合移植到大鼠

基金项目:首都医学发展科研基金重点项目(2002 - 2036);全军临床高新技术重大项目(2002 - 35)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部全军烧伤研究所

作者简介:马忠锋(1973 -),男(汉族),河北省秦皇岛市人,医学博士,医师,主要研究方向为创面修复材料的研制与应用。

背部全层皮肤缺损处进行修复,比较两种移植方法新生皮肤的情况、创面愈合质量及组织学变化,旨在为创面修复提供一种既可早期覆盖又可改善后期愈合质量的真皮替代物制作方法。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:**Dispase II、TritonX - 100、SDS、氯化钠、皮肤拉网机(美国 Zimmer),兔抗层粘连蛋白(laminin)抗体(美国 Sigma 公司),水浴恒温振荡器、鼓式取皮刀(上海医疗器械厂),真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司),超声波清洗机(瑞典 Branson)。

**1.2 猪脱细胞真皮基质的制备:**取体重 50 kg 左右无皮肤疾病的健康白色家猪,活杀后剃毛洗净皮肤,

剥下大张全厚皮,鼓式取皮刀反削为 0.3~0.4 mm 厚的断层皮片,洗必泰溶液浸泡消毒 30 min。一部分皮片用质量分数为 0.5% 的 Dispase I 37 °C 下消化 30 min,再用体积分数为 0.5% 的 TritonX-100 浸泡并持续震荡 24 h,以进一步去除真皮细胞成分(脱细胞真皮基质 I);另一部分皮片用 1 mmol/L 氯化钠溶液 37 °C 作用 36 h,去除表皮后再加质量分数为 0.5% 的 SDS,室温下震荡 2 h(脱细胞真皮基质 II)。两种方法制备的猪脱细胞真皮基质皮肤均用超声波清洗机震荡洗涤,按 1:3 拉网,磷酸盐缓冲液(PBS)振荡充分漂洗,真空冷冻干燥机中冷冻干燥,袋装后用<sup>60</sup>Co 照射消毒,4 °C 保存备用。

**1.3 动物模型及分组:**取健康 SD 大鼠 63 只,雌雄不限,体重为 205~250 g。用质量分数为 3% 的戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔麻醉,背部去毛,切除背部约 4 cm×3 cm 全层皮肤至深筋膜。大鼠随机分为 3 组(n=21):复合皮 I 组为猪脱细胞真皮基质 I + 自体刃厚皮移植;复合皮 II 组为猪脱细胞真皮基质 II + 自体刃厚皮移植;对照组为单纯自体刃厚皮移植。创面移植后用凡士林纱布及无菌敷料覆盖,打包固定。术后单笼饲养,2 周后换药。

#### 1.4 创面愈合情况观察

**1.4.1 大体观察:**术后动态观察各组大鼠的创面愈合情况,计算术后 2、4 和 6 周大鼠移植成活率和植皮区收缩率。移植成活率=移植成活面积/移植总面积×100%,植皮区收缩率=(移植面积-检测时面积)/移植面积×100%。

**1.4.2 组织学观察:**各组于术后 2、4 和 6 周各处死 7 只大鼠,取活检组织,常规制成石蜡切片,分别行苏木素-伊红(HE)染色和兔抗人层粘连蛋白抗体免疫组化染色,光镜下观察组织学变化。

**1.5 统计学处理:**结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 STATA 7.0 软件进行 *t* 检验和单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 猪脱细胞真皮基质的物理特性及组织学特点:

两种方法制备的猪脱细胞真皮在形态学上无明显差别,均呈瓷白色,表皮面有光泽,柔软有弹性,易于塑形,便于手术操作;HE 染色证实无表皮,真皮内无任何细胞成分、皮肤附件及血管,可见去除细胞后留下的许多空隙,胶原纤维排列规则(彩色插页图 1,图 2)。免疫组化染色证实有完整的基底膜结构。

**2.2 创面大体观察:**除复合皮 I 组有 1 只大鼠因自己啃噬创面而影响创面成活外,其余各创面移植均成活良好。术后 2 周对照组创面移植的刃厚皮大部分成活,创缘有少许散在创面;术后 4 周创面基本愈合,可见植皮区收缩;术后 6 周皮片有脱屑,无毛发生长,创面柔韧性较差,植皮区收缩明显。术后 2 周,两复合皮组创面复合皮移植后外观无差别,除创面边缘部分有少许裸露外,大部分移植复合皮柔软红润,创面收缩不明显,深层脱细胞真皮已与肌肉组织建立血运且连接紧密,呈红白相间;术后 4 周两复合皮组猪脱细胞真皮基质与深层组织结合紧密,植皮区收缩不明显,愈合不佳处可见肉芽组织;术后 6 周两复合皮组创面均基本愈合,皮片有脱屑,无毛发生长,柔韧性较好,创面较平整。3 组移植成活率和植皮区收缩率见表 1。各时间点复合皮 I、II 组的移植成活率和植皮区收缩率差异无显著性。与单纯自体刃厚皮对照组比较,两复合皮组至术后 6 周时移植成活率差异已无显著性,而术后 4 周时植皮区收缩率均明显减少。

**2.3 组织学观察:**术后 2 周复合皮组织学可见炎性细胞浸润、成纤维细胞生长及毛细血管结构出现;术后 4 周复合皮表皮层分化良好,真皮内可见少许炎性细胞浸润,可见毛细血管垂直于创面生长;术后 6 周表皮、真皮结构基本正常,真皮层内可见到胶原纤维排列规整,毛细血管结构丰富,未见皮肤附件(彩色插页图 3,图 4)。免疫组化染色显示两组层粘连蛋白均在基底膜区及真皮血管束周围呈阳性反应,基底膜区染色较深,连续性好(彩色插页图 5,图 6)。术后 6 周对照组表皮层分层接近正常,但真皮内胶原纤维排列较紊乱,成纤维细胞多,免疫组化

表 1 3 组移植成活率和植皮区收缩率的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Wound healing rate and wound contraction rate in the three groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	移植成活率(%)			植皮区收缩率(%)		
	术后 2 周(n=21)	术后 4 周(n=14)	术后 6 周(n=7)	术后 2 周(n=21)	术后 4 周(n=14)	术后 6 周(n=7)
复合皮 I 组	76.23±2.73*	80.17±2.96*	92.66±2.87	8.84±1.43	10.77±2.40*	18.92±2.11*
复合皮 II 组	75.89±2.91*	81.64±2.78*	93.08±3.06	8.38±1.73	11.63±1.97*	19.04±2.40*
对照组	85.65±3.02	90.06±3.13	94.19±2.95	9.25±1.85	18.52±3.78	29.52±2.70

注:与对照组比较;\**P*<0.05

染色显示层粘连蛋白在基底膜区及真皮血管束周围也呈阳性反应。

### 3 讨论

患者自体皮源不足和愈后瘢痕挛缩一直是困扰烧伤整形医生的难题。将患者自体的刃厚皮片与各种真皮替代物构成的复合皮移植于创面,愈合后创面比较平整,皮肤弹性好,这一技术已在国内外得到应用<sup>[2]</sup>。Wainwright<sup>[1]</sup>首先报道了异体脱细胞真皮(alloderm)的临床应用,但存在价格昂贵、异体皮来源有限等缺点。猪与人的皮肤有较高的组织结构和免疫学相似性,且来源广泛、价格低廉,因此,猪脱细胞真皮基质的研制受到了关注<sup>[3]</sup>。

脱细胞真皮基质的制作目前主要有 3 类方法。第一类是酶消化法,在 4 ℃ 或 37 ℃ 条件下,利用外源性蛋白酶作用去除表皮结构,再辅以其他方法,如组织液浸泡和去污剂处理等,以达到真皮无细胞化<sup>[1,4]</sup>。这种方法是国内外报道应用最多的一种。第二类是高渗盐-去污剂处理法,利用高渗盐溶液使锚着细丝与表皮基底细胞的半桥粒分离,完整去除表皮,再用去污剂处理到真皮无细胞化<sup>[5]</sup>。第三类是平衡盐溶液法,将无菌皮片置于 37 ℃ PBS 中,使皮肤内源性蛋白酶激活,从而分离表皮和真皮,再用反复冻溶、γ 射线照射等方法,去除全部真皮内的存活细胞<sup>[6]</sup>。但这种方法处理时间过长,大约 2 周左右,操作时容易污染,整个过程比较复杂。

本实验中以 Dispase II / TritonX - 100 和高渗盐水/SDS 两种不同方法制备猪脱细胞真皮基质,大体观察及组织学观察都显示二者非常接近,虽然用高渗盐水/SDS 法制作脱细胞真皮基质的基础研究和临床应用国内外报道较少,但其方法简单、易操作、价格低廉,其制作方法值得推广。以上述两种方法制备的猪脱细胞真皮基质为支架与自体刃厚皮构成复合皮,一步法用于大鼠全层缺损创面修复,结果表明,猪脱细胞真皮基质免疫原性极低,均未引发明显的急性排斥反应,两组复合皮移植物成活率和植皮区收缩率差异无显著性。与单纯自体刃厚皮移植相比,至术后第 6 周时移植物成活率差异无显著性。

复合皮移植同时提供了近似于正常结构的真皮支架,尤其是基底膜结构,有利于成纤维细胞对脱细胞真皮基质的改建。组织学观察显示,两复合皮组术后 2 周开始猪脱细胞真皮基质就可引导形成丰富的毛细血管结构,复合皮表皮层形成且分化良好;至术后 6 周,有完整的皮肤结构,真皮层内可见胶原纤维排列规整,表皮与真皮连接区的乳头结构明显。有人

对异种脱细胞真皮基质和自体皮复合移植基底膜重建进行观察,发现基底膜中层粘连蛋白表达高于单纯自体皮移植<sup>[7]</sup>,说明异种脱细胞真皮基质可能有利于基底膜重建。

评价创面移植效果的指标除术后自体皮的成活率外,还应包括愈合后皮肤的外观、功能及结构重建程度等,后者主要涉及瘢痕形成、植皮区收缩率及基底膜复合物的重建。本研究中,两复合皮组术后第 4 周的植皮区收缩率明显低于单纯自体刃厚皮,单纯自体刃厚皮植皮区收缩率高,瘢痕形成明显。表明复合移植改善了后期创面修复质量。

本研究结果表明,应用猪脱细胞真皮基质和自体刃厚皮构成的复合皮移植修复深度创面效果良好,值得推广。对脱细胞真皮基质不同的制备方法还需要进一步改善和提高,其免疫原性对创面局部及人体全身的影响以及在体内转归的远期观察也需要进一步深入研究。

### 参考文献:

- 1 Wainwright D J. Use of an acellular allograft dermal matrix (alloderm) in the management of full - thickness burns [J]. Burns, 1995, 21: 243 - 248.
- 2 Bello Y M, Falabella A F, Eaglstein W H. Tissue - engineered skin: current status in wound healing [J]. Am J Clin Dermatol, 2001, 2: 305 - 313.
- 3 Srivastava A, De Sagun E Z, Jennings L J, et al. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats [J]. Ann Surg, 2001, 233: 400 - 408.
- 4 刘强,柴家科,杨红明,等.异种(猪)无细胞真皮基质与自体微粒皮复合移植修复深度烧伤创面的实验研究[J].中国危重病急救医学,2004,16:77-80.
- 5 Takami Y, Matsuda T, Yoshitake M, et al. Dipase detergent treated dermal matrix as a dermal substitute [J]. Burns, 1996, 22: 182 - 190.
- 6 Chosh M M, Boyce S G, Freedlander E, et al. A simple human dermal model for assessment of in vitro attachment efficiency of stored cultured epithelial autografts [J]. J Burn Care Rehabil, 1995, 16: 407 - 417.
- 7 吴秋合,姚敏,青春,等.异种脱细胞真皮基质与自体皮复合移植后基底膜重塑的实验观察[J].中华烧伤杂志,2002,18:162-164.

(收稿日期:2004-04-06 修回日期:2004-12-05)

(本文编辑:郭方)

### • 广告目次 •

- ①珠海丽珠:丽珠血液灌流器 ..... (封二)
- ②天津红日:血必净 ..... (插页)
- ③北京四环医药:苏诺 ..... (插页)
- ④廊坊爱尔:炭肾 ..... (插页)
- ⑤南京欣华恒:ICU 床头终端系统 ..... (封三)
- ⑥伟康医疗:ESPRIT™ 呼吸机 ..... (封底)

## 不同方法制备猪脱细胞真皮基质及创面移植的实验研究

(正文见92页)



图1 脱细胞真皮基质 I, 胶原纤维排列规整, 未见任何细胞成分(HE, ×100)  
Figure 1 Acellular porcine dermal matrix I, structure of collagen fiber was regular and there were not any cells (HE, ×100)



图2 脱细胞真皮基质 II, 胶原纤维排列规整, 未见任何细胞成分(HE, ×100)  
Figure 2 Acellular porcine dermal matrix II, structure of collagen fiber was regular and there were not any cells (HE, ×100)

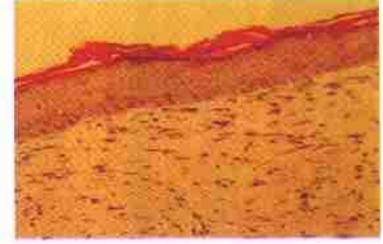


图3 复合皮 I 组6周后, 表皮层分层接近正常, 真皮层内可见胶原纤维排列规整(HE, ×100)  
Figure 3 Histological examination of compound skin grafting group I at the 6 th week after operation showed epiderm was nearly normal and the collagen fiber was regular(HE, ×100)

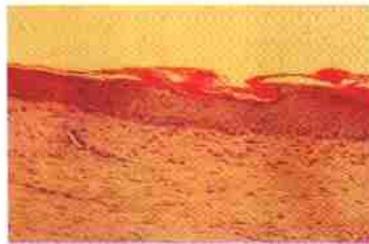


图4 复合皮 II 组6周后, 真皮层内可见胶原纤维排列较规整, 有完整的皮肤结构(HE, ×100)  
Figure 4 Histological examination of compound skin grafting group II at the 6 th week after operation showed collagen fiber was regular and the intact skin structure (HE, ×100)



图5 术后6周免疫组化抗层粘连蛋白染色证实复合皮 I 组有完整基底膜结构, 乳头结构明显(HE, ×100)  
Figure 5 Anti-laminin antigen staining at 6 th week after operation showed the intact basal membrane and obvious papillae structure in compound skin grafting group I (HE, ×100)



图6 术后6周免疫组化抗层粘连蛋白染色证实复合皮 II 组有完整基底膜结构, 乳头结构明显(HE, ×100)  
Figure 6 Anti-laminin antigen staining at 6 th week after operation showed the intact basal membrane and obvious papillae structure in compound skin grafting group II (HE, ×100)

## 动脉原位扩张即时延长的实验研究

(正文见105页)



图1 B组术后1 d光学显微镜下血管壁结构 (HE, ×200)  
Figure 1 Structure of blood vessel wall under light microscope at 1st day after operation in group B (HE, ×200)

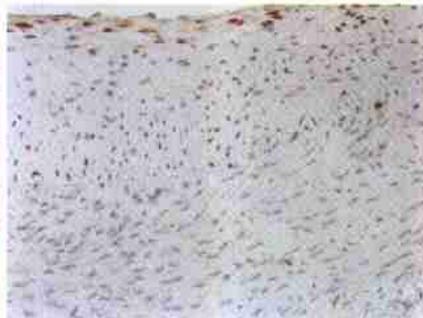


图2 C组术后1 d透射电子显微镜下血管壁结构 (TEM, ×3 500)  
Figure 2 Structure of blood vessel wall under transmission electron microscope at 1st day after operation in group C (TEM, ×3 500)

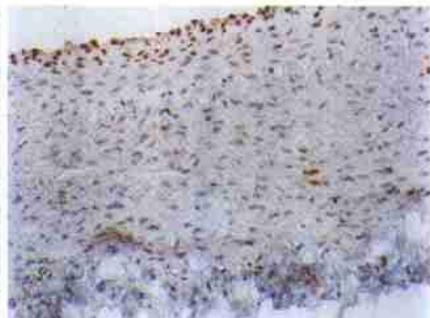


图3 A组术后7 d透射电子显微镜下血管壁结构 (TEM, ×10 000)  
Figure 3 Structure of blood vessel wall under transmission electron microscope at 7 th days after operation in group A (TEM, ×10 000)



图4 A组术后7 d PCNA在血管壁中的表达 (SP, ×200)  
Figure 4 Protein expression of PCNA in blood vessel wall at 7 th day after operation in group A (SP, ×200)



图5 C组术后7 d PCNA在血管壁中的表达 (SP, ×200)  
Figure 5 Protein expression of PCNA in blood vessel wall at 7 th day after operation in group C (SP, ×200)