

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

刘强 柴家科 杨红明 尹会男

【摘要】 目的 观察异种(猪)无细胞真皮支架与自体微粒皮加同种异体皮复合移植修复全层皮肤缺损的效果。**方法** 48 只 SD 大鼠背部全层皮肤缺损创面,分别行异种(猪)无细胞真皮支架与自体微粒皮移植(复合皮组)和单纯微粒皮移植(对照组),术后定期观察创面愈合情况并行创面愈合率和收缩率的计算,同时取创面组织进行组织学观察。**结果** 复合皮组的创面愈合情况良好,未见明显挛缩,皮肤弹性较好,两组异体皮成活情况及创面愈合情况相近,但是复合皮组创面收缩率显著低于对照组。组织学观察复合皮组上皮化良好,胶原纤维排列有序,基底膜结构完整。**结论** 异种(猪)无细胞真皮支架与自体微粒皮复合移植能修复全层皮肤缺损,改善创面愈合质量。

【关键词】 烧伤; 异种(猪)无细胞真皮; 自体微粒皮; 复合移植

中图分类号:R644;R622.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-0603(2004)02-0077-04

Experimental study on composite transplantation of acellular porcine dermal matrix and micro-autograft to repair deep burn wound LIU Qiang*, CHAI Jia-ke, YANG Hong-ming, YIN Hui-nan. * Institute of Burns, 304th Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of composite skin graft consisting of heterogeneous (swine) acellular dermal matrix and combined micro-autograft and allograft with the aim at overcoming shortcomings of repairing materials for burn wound. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats with full-thickness skin defect on the back were grafted with the composite skin (compound skin grafting group, G) and autologous particulate skin (control group, C), respectively. The area of wound healing and the rates of wound contraction were measured. Tissue specimens were harvested for histological examination. **Results** The composite skin graft resulted in less contracture and better elasticity. Compared with group C, the wound contraction rate was lower significantly. Histological examination revealed that there was full differentiation of epithelium, orderly collagen arrangement and intact basement membrane. **Conclusion** Coverage of wound with composite skin composing heterogeneous (swine) acellular dermal matrix and autologous particulate skin could promote wound healing and improve wound healing quality.

【Key words】 burns; heterogeneous (swine) acellular dermal matrix; particulate skin autograft; composite transplantation

CLC number:R644;R622.1 **Document code:**A **Article ID:**1003-0603(2004)02-0077-04

微粒皮技术是目前国内覆盖大面积深度烧伤患者创面常用的有效手段,该技术可有效地利用患者的残留皮肤,但是患者创面愈合后瘢痕挛缩严重,影响外观功能,究其原因与真皮成分的缺乏有关^[1]。因此,我们以异种(猪)无细胞真皮基质为支架,与自体微粒皮和异体皮复合移植于 SD 大鼠全层皮肤缺损,观察创面修复的效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器: TritonX-100(美国 Sigma 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),兔抗 Laminin

基金项目:首都医学发展科研基金重点项目(2002-2036);军队首批临床高新技术重大项目资助(2002-35)

作者单位:100037 北京,解放军第三〇四医院烧伤整形科,全军烧伤研究所

作者简介:刘强(1976-),男(汉族),山东省莱芜市人,医学硕士,医师,主要研究方向为烧伤创面替代物的研制与应用。

抗体(Sigma 公司),皮肤拉网机(美国 Zimmer),水浴恒温振荡器(上海医疗器械厂),鼓式取皮刀(上海医疗器械厂)。

1.2 无细胞异种(猪)真皮的制备:取 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,鼓式取皮机反削为 0.3~0.4 mm 厚度的断层皮片,用胰蛋白酶消化 30 min,再用 TritonX-100 浸泡并持续震荡 24 h 以进一步去除细胞成分,戊二醛浸泡 10 min,洗必泰溶液浸泡消毒 30 min 后,磷酸缓冲液(PBS)洗净,用皮肤拉网机按 1:3 比例拉网,含庆大霉素的 PBS 充分浸泡洗涤,4℃保存。

1.3 动物模型及分组:取健康 SD 大鼠 48 只,雌雄不限,体质量 205~250 g。质量分数为 3%的戊巴比妥钠按 50 mg/kg 浓度腹腔麻醉,背部去毛后,

100℃、12 s 造成背部约 4 cm×3 cm Ⅲ 度烫伤,生理盐水 100 ml/kg 皮下注射。切除全层皮肤至深筋膜,然后随机分为两组:实验组(即复合皮组)移植异种(猪)无细胞真皮+自体微粒皮+异体皮;对照组(即微粒皮组)移植自体微粒皮+异体皮。创面移植后用凡士林纱布及无菌敷料覆盖,打包固定。实验鼠术后单笼饲养,2 周后换药。

1.4 创面愈合情况的大体观察:手术后 2、4 和 6 周动态观察创面愈合情况,并计算创面愈合率和创面收缩率。另外观察创面的质地、弹性及抗摩擦性。

创面愈合率 = 创面愈合面积 / 原移植总面积 × 100%

创面收缩率 = (原移植面积 - 检测时面积) / 原移植面积 × 100% (皮片的面积使用透明胶片网格法测定)

1.5 组织学观察:每个时间点处死 6 只动物做以下检查:①活检组织常规制成石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色及胶原纤维、网状纤维、弹力纤维染色。②兔抗人 Laminin 抗体免疫组织化学(组化)染色(Sigma 公司)。③透射电镜观察。

1.6 统计学处理:检测数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 STATA 4.0 软件进行组间比较 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 无细胞异种真皮的物理特性及组织学特点:制备好的无细胞异种真皮呈瓷白色,表皮面有光泽,柔软而有弹性,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,胶原纤维排列规则(图 1)。免疫组化抗 Laminin 染色证实有完整的基底膜结构(图 2)。

2.2 创面大体观察:移植后 2 周,复合皮组创面除边缘部分有少许裸露外,外层的异体皮大部分完整柔软,尚未排斥,创面收缩不明显,深层的去细胞猪皮已与肌肉组织之间建立血运且连接紧密,微粒皮已经生长扩展,网状的去细胞异种真皮上分散着大小不一的白色皮岛。微粒皮组外层的异体皮较完整。术后 4 周复合皮组外层的异体皮干燥,部分开始脱痂,脱痂的下层可见较薄的表皮,无毛发生长;部分愈合不佳处可见肉芽组织;未脱痂部分与深层仍结合较紧密。微粒皮组外层的异体皮干燥并开始脱痂,部分脱痂处有残留创面,收缩明显。术后 6 周两组创面都基本愈合,皮片有脱屑,无毛发生长,复合皮组柔韧性较好,创面较平整,有少许残存创面(图 3);微粒皮组残存创面较多,创面收缩明显。

2.3 两组创面愈合率和收缩率比较:各时间点创面愈合率和创面收缩率与微粒皮组比较见表 1 和表 2。各时间点创面愈合率无统计学差异。



图 1 去细胞真皮基质,胶原纤维排列规整,未见任何细胞成分(HE, ×100)

Fig. 1 Structure of the dermal fiber was regular and there were not any cells found in a cellular dermal matrix (HE, ×100)



图 2 免疫组化抗 Laminin 染色证实去细胞真皮基质有完整的基底膜结构,乳头结构明显(HE, ×100)

Fig. 2 Anti-Laminin antigen staining was positive in basal membrane and the structure of the dermal papillae was obvious (HE, ×100)



图 3 复合皮组 6 周后创面大体观

Fig. 3 Appearance of compound skin grafting group 6 weeks after graft

表 1 两组创面愈合率的比较($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Rate of wound healing
in two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周
复合皮组	78.13 $\pm$ 2.73(24)	87.74 $\pm$ 2.28(18)	91.08 $\pm$ 1.96(12)
微粒皮组	79.23 $\pm$ 2.15(24)	86.47 $\pm$ 1.80(18)	90.46 $\pm$ 2.96(12)

注:()内为动物数

表 2 两组创面收缩率的比较($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Rate of wound contraction
in two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周
复合皮组	8.58 $\pm$ 2.73(24)	15.63 $\pm$ 1.97(18)	21.04 $\pm$ 2.40(12)
微粒皮组	13.57 $\pm$ 3.85(24)*	28.52 $\pm$ 3.78(18)*	41.56 $\pm$ 2.70(12)*

注:与复合皮组相同时间点比较;* $P < 0.05$;()内为动物数

2.4 组织学检查:术后 4 周于创面愈合处取标本,复合皮表皮层成活且有分层但层次较少,真皮层内可见胶原纤维排列稍混乱,间质可见慢性炎性细胞浸润,可见丰富的毛细血管结构垂直于创面生长,有较多的成纤维细胞增生,表皮真皮连接区的乳头结构明显。术后 6 周,复合皮组表皮、真皮结构基本正常,胶原纤维排列比较规则,小血管周围慢性炎细胞浸润,未见皮肤附件(图 4)。微粒皮组上皮层较薄,细胞分化差,真皮内胶原排列紊乱,乳头结构不明显(图 5)。透射电镜可见桥粒、半桥粒结构,基底膜完整连续。而微粒皮组上皮层较薄,细胞分化较差,真皮内胶原纤维排列紊乱,乳头结构不明显。电镜下桥粒、半桥粒结构较少,基底膜结构不清晰。免疫组化抗 Laminin 染色显示两组均在基底膜区及真皮血管束周围呈阳性反应,但复合皮组基底膜区染色较深,连续性好(图 6),而微粒皮组与其相比染色较淡,连续性较差(图 7)。

图 4 复合皮组 6 周后组织相,真皮层内可见胶原纤维排列较规整,间质可见慢性炎性细胞浸润,有较多的成纤维细胞增生(HE, $\times 100$)

Fig. 4 There were orderly collagen arrange and a few inflammatory cells and more fibroblasts after 6 weeks in compound skin grafting group(HE, $\times 100$)

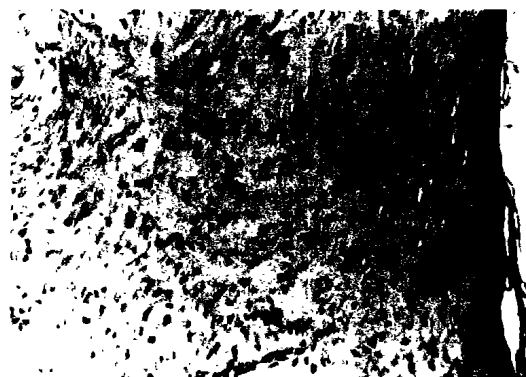
图 5 微粒皮组 6 周后上皮层较薄,细胞分化较差,真皮内胶原纤维排列紊乱,乳头结构不明显(HE, $\times 100$)

Fig. 5 Epiderm in autologous particulate skin group was thinner and the structure of papillae was not obvious(HE, $\times 100$)

图 6 免疫组化抗 Laminin 染色证实复合皮组有完整的基底膜结构,乳头结构明显(HE, $\times 200$)

Fig. 6 Anti-Laminin antigen staining showed the intact basal membrane and obvious papillae structure in compound skin grafting group(HE, $\times 200$)

图 7 微粒皮组免疫组化抗 Laminin 染色(HE, $\times 200$)

Fig. 7 Anti-Laminin antigen staining in autologous particulate skin group(HE, $\times 200$)

3 讨论

表皮培养技术^[2]以及我国首创的“微粒皮”技术^[3-5]可有效利用患者的残留皮肤,解决患者皮源不足的问题,但愈后外观功能较差,究其原因是因为缺

乏真皮基质的支持,因此,各种真皮替代物应运而生^[6-8]。目前临床应用较广泛的是异体无细胞真皮(Alloderm),它是一种永久性真皮支架,其特点是:经过处理,去除了表皮及真皮内可诱发免疫排斥反应的细胞成分;保留了完整的纤维组织和基底膜;具有调节诱导宿主细胞长入的作用^[9];吸收率较低。该真皮替代物具有的基底膜结构是其它真皮替代物无法替代的,而且其包含的各种真皮基质成分的组成和结构比其它真皮替代物更加合理,因此,该替代物自问世以来在烧伤整形界得到了广泛的应用,但是其价格比较昂贵,且异体皮来源有限。由于猪与人有较高的组织同源性,且来源广泛、价格低廉,因此异种(猪)无细胞真皮基质成为研究的热点。尽管有文献报道^[10],异种(猪)无细胞真皮的免疫原性要强于异体无细胞真皮,但我单位先前的临床实验证明,虽然异种(猪)无细胞真皮植皮存活率和收缩率方面略逊于异体无细胞真皮,但效果非常接近,无显著性差异^[11]。因此,异种(猪)无细胞真皮还是有着广泛的应用前景,但是还需要进一步深入研究其免疫原性对创面局部及人体全身的影响以及在体内的转归。

本实验中以异种(猪)无细胞真皮基质为支架,与自体微粒皮结合构成复合皮用于烧伤创面修复,结果显示,未引发明显的急性局部排斥反应;同时因提供了近似于正常结构的真皮支架,有利于成纤维细胞对无细胞真皮基质的改建,创面愈合质量明显优于对照组,创面收缩率比较具有统计学差异,组织学检查实验组新生胶原排列更加规则有序。另外,我们的实验结果显示,在微粒皮下加用异种(猪)无细胞真皮基质后,表面的异体皮的成活情况及创面愈合情况相近,创面的愈合率无统计学差异,其原因可能是因为异种无细胞真皮具有良好的血管化性,可在短期内形成丰富的毛细血管并垂直于创面生长;而且我们将异种(猪)无细胞真皮基质拉成网状,增加了异体皮与创面的接触面积。

表皮培养技术虽然可以扩增表皮面积,但是该

技术条件要求较高,培养周期较长而且费用昂贵,目前尚未广泛应用^[12]。微粒皮技术不受时间限制,对创面条件要求较低,费用低廉,而且微粒皮本身具有部分自身的真皮成分,这也有利于创面的愈合以及后期的功能改善。因此我们认为,对于大面积深度烧伤患者来说,由异种无细胞真皮基质和自体微粒皮加异体皮的复合移植技术是值得推广的。

参考文献:

- 1 柴家科,盛志勇. 进一步重视大面积深度烧伤皮肤替代物的研究[J]. 中华烧伤杂志,2002,18:73-74.
- 2 Rheinwald J G, Green H. Serial cultivation of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells[J]. Cell, 1975, 6: 331-336.
- 3 Manimalha B, Ravi K T, Mary B. Skin substitutes: a review[J]. Burns, 2001, 27: 534-544.
- 4 张明良. 微粒皮植皮 15 年[J]. 中华外科杂志, 2001, 39: 708-710.
- 5 杨红明, 柴家科, 郭振荣, 等. 综合治疗手段进步促进烧伤创面愈合——近 20 年大面积烧伤治疗结果回顾[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(7): 436-437.
- 6 Dantzer E, Queruel P, Salinier L, et al. Integra, a new surgical alternative for the treatment of massive burns: clinical evaluation of acute and reconstructive surgery: 39 cases[J]. Ann Chir Plast Esthet, 2001, 46: 173-189.
- 7 Wainwright D J. Use of an acellular allograft dermal matrix (Alloderm) in the management of full-thickness burns[J]. Burns, 1995, 21: 243-248.
- 8 Kearney J N. Clinical evaluation of skin substitutes[J]. Burns, 2001, 27: 545-551.
- 9 Eppley B L. Experimental assessment of the revascularization of acellular human dermis for soft-tissue augmentation[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107: 757-762.
- 10 Srivasstava A, Desagun E Z, Jeeings L J, et al. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats[J]. Ann Surg, 2001, 233: 400-408.
- 11 柴家科, 杨红明, 李立根, 等. 去细胞异体真皮, 去细胞猪真皮和自体刃厚皮移植在临床的应用[J]. 中华外科杂志, 2000, 16: 790-793.
- 12 Guillot F L. Production of autologous keratinocytes for therapeutic purposes with in a pharmaceutical company[J]. J Soc Biol, 2001, 195: 75-77.

(收稿日期: 2003-10-26 修回日期: 2003-12-19)

(本文编辑: 李银平)

• 编者寄语 •

学术争鸣是促进学术进步的必要方法。本刊按照“百花齐放、百家争鸣”的原则办刊,从 2003 年第 6 期起开设了“CCCM 论坛”栏目,邀请国内外各学科的著名专家就当前危重病急救医学领域内的热点问题评述和讨论,各抒己见,以反映我国危重病急救医学的水平。CCCM 是《中国危重病急救医学》杂志英文刊名 Chinese Critical Care Medicine 的词头,我们以此作为栏目,希望能得到专家、学者的支持,并欢迎大家踊跃投稿,发表自己的学术观点。

(本刊编辑部)