

· 快速通道 ·

自体筋膜作为骨骼肌再生支架的实验研究

汪道新 朱志祥 张力勇 黄志斌 关弘

【摘要】 目的 探讨自体筋膜作为支架材料在体内重建肌肉的可行性。方法 采用 28 只新西兰兔的双后腿建立胫骨前肌中段缺损模型。随机选取一侧,植入用自体阔筋膜制成的支架和肌肉微粒(肌肉支架组);另一侧分为 3 部分:10 只腿缺损处植入筋膜支架(支架组),10 只腿缺损处植入肌肉微粒(肌肉组),8 只腿缺损不作处理(缺陷组)。术后 2、3、4、6、9 周分别解剖观察移植成活率,并切取标本行组织学及超微结构观察和结蛋白免疫组织化学鉴定。各时相点切取肌肉支架组和支架组移植中段标本,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术进行 α 肌动蛋白 DNA 相对定量分析。结果 (1) 术后第 4 周肌肉支架组缺损愈合处形态接近正常,移植成活率达 93.33%,其他组相对较差。(2) 肌肉支架组术后 2—3 周细胞增生活跃,结蛋白阳性率较高, α 肌动蛋白 DNA 相对丰度较大,与支架组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 以自体筋膜为支架促使肌肉组织再生具有可行性。

【关键词】 筋膜; 肌,骨骼; 支架

Experimental study on the skeletal muscle reconstruction with autologous fascia as a scaffold WANG Daoxin, ZHU Zhi-xiang, ZHANG Li-yong, HUANG Zhi-bin, GUAN Hong. Department of Burns & Plastic Surgery, The Second Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, P. R. China
Corresponding author: ZHU Zhi-xiang, Email: Zly6321@yahoo.com.cn, Tel: 13809894696

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of autologous fascia as a scaffold for the reconstruction of skeletal muscle in vivo. **Methods** Twenty-eight healthy New Zealand rabbits were employed in the study. The anterior tibial muscle in both legs were divided to create a gap of 10 mm in each muscle. One leg was used in the experiment (E, n = 28), while the contralateral as self-control (C). The legs in C group were further divided into 3 groups (C1, C2 and C3). While defects in the midportion of anterior tibial muscle in the hind legs were created in all rabbits. In E group, each defect was filled with a tubule made of autologous fascia lata, and the fascial tubule was filled with tiny muscular granules (< 1 mm × 1 mm × 1 mm). In C1 group (n = 10), the defect was also filled with fascial tubule but with no muscle filling. The defect in C2 group (n = 10) was only filled with muscle granules without fascial tubule. The defect in C3 group (n = 8) received no treatment. The survival rate of the transplantation was grossly observed, and the tissue samples were harvested for histological and ultra-structural examination and immunohistochemical identification of desmin at 2, 3, 4, 6 and 9 post-operation weeks. The expression level of α -actin DNA in the tissue samples from the midportion of grafted fascia was assessed by RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) in E and C1 groups. **Results** ① Survival rate of the transplantation: In E group, it was 93.33% with near normal tissue contour in the grafting area. The muscle defects were not completely repaired in C1, C2 and C3 groups. ② Under light and electronic microscopy, marked proliferation of muscular cells surrounding fibrous tissue could be discerned at 2 and 3 post-operation weeks in E group, while only necrotic tissue and fibrosis were observed in C1 and C2 groups, and no definite tissue could be discernible in C3 group. ③ Immunohistochemical staining revealed that over 85% of the cells were positive for desmin in E group, while only less than 25% in C1 group. ④ The expression level of α -actin DNA was significantly higher in E group than that in C2 group ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggested that autologous fascia as a scaffold is beneficial for skeletal muscle reconstruction in vivo.

【Key words】 Fascia; Muscle, skeletal; Stents

以电烧伤为主的深度烧伤和其他创伤引起的肌肉坏死、缺损、萎缩性变是临床常见的肌肉病变或缺损^[1,2]。动力性肌肉修复一直是整形创伤界较为棘手的问题,尽管游离肌肉移植以其显著的疗效为外

科医生所青睐,但它对供区的损害及术后受区欠佳的外形和肌力分布又限制其广泛应用。近年来随着细胞生物学的迅猛发展和组织工程技术的兴起,骨骼肌再生这一古老话题又重新回到烧伤整形等外科的研究日程上来,为动力修复肌肉的缺损开创新的前景^[3]。本研究利用自体筋膜作支架在体内培育肌肉组织雏形,现将具体情况报道如下。

作者单位:518035 深圳市第二人民医院烧伤整形科(汪道新、朱志祥、张力勇、黄志斌),病理科(关弘)

通信(讯)作者:朱志祥,Email: Zly6321@yahoo.com.cn,电话:

13809894696

材 料 与 方 法

1. 动物来源与主要试剂、仪器:普通级健康成年新西兰兔 28 只(南方医科大学实验动物中心),体重(1.7 ± 0.5) kg,雌雄不拘。数码相机(Cyber-shot DSC-F717,日本索尼公司),透射电镜(JEM-1200EX,日本 JEOL 电子公司),结蛋白试剂(美国 LAB VISION 公司),定量用 Taq 酶(dNTP,美国 ABI 应用生物系统有限公司),PCR 扩增仪、定量 PCR 仪(美国 GENE 公司),Trizol、MMLV 逆转录酶、Rnasin 核酸酶抑制剂、离心机、电泳仪、电泳槽(日本东洋纺生物科技有限公司)。

2. 骨骼肌缺损模型制备:兔的双后腿均在实验前 24 h 脱毛。参照文献[4]使兔仰卧并固定,用氯胺酮(50 mg/kg) + 氯丙嗪(0.2 mg/kg)腹腔注射麻醉。用碘伏溶液消毒后,于胫前外侧切开皮肤、筋膜,小心分离胫骨前肌并切除中段肌肉,造成 10 mm 长的缺损区(图 1a)。

3. 自体筋膜支架制作:取兔大腿处 40 mm × 10 mm 的阔筋膜,间隔 3 mm 纵向划口,两端对叠成 20 mm × 10 mm 的双层结构,两侧用 0 号手术线间断缝合,做成圆筒状。用复合磷酸盐缓冲液冲洗后,浸泡于等渗盐水中备用。

4. 实验分组:采用自体对照法,随机将兔的一侧后腿作为肌肉支架组(28 只),用筋膜支架连接缺损肌肉的两断端,取 1 g 切除的肌肉剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的微粒,种植于支架上下及两层之间,原位缝合皮下组织和皮肤。另一侧后腿分为 3 组:支架组 10 只,仅植入筋膜支架;肌肉组 10 只,仅植入肌肉微粒;缺陷组 8 只,不处理缺损部位。各组创口缝合常规包扎,分笼饲养。每日换药。

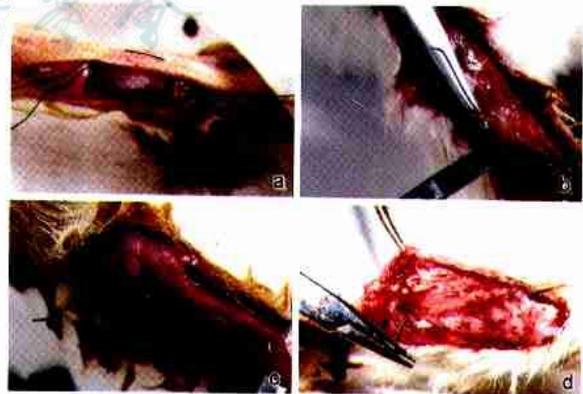
5. 观察指标:术后 2、3、4、6、9 周支架、肌肉、缺陷组各取 2 只兔腿,肌肉支架组取 6 只兔腿(第 9 周时无缺陷组,肌肉支架组为 4 只兔腿),分别解剖观察缺损处愈合情况。(1)用数码相机照相,若移植物生长良好,无断裂和凹陷萎缩等现象视为成活,计算各组移植成活率。(2)切取肌肉支架、支架组用筋膜支架连接的中段组织,部分以体积分数 10% 甲醛溶液固定,制成石蜡切片,分别行 HE、二氨基联苯胺(DAB)染色,用结蛋白试剂进行免疫组织化学鉴定,置光学显微镜下观察。部分组织用体积分数 2.5% 戊二醛固定,制成厚度为 60 nm 的切片,经铀、铅双重染色后于透射电镜下观察。(3)剩余组织于液氮中冻存,以备行 α 肌动蛋白相对定量分析。引

物设计:内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(G3PDH)上游引物为 5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAG-3',下游引物为 3'-TAGTGACCGTGAGTCTTCTG-5',目的条带长度为 288 bp。α 肌动蛋白上游引物为 5'-GATCCTCACTGAGCGTGGCTAC-3',下游引物为 5'-ATGTTGTAGGTGGTCTCATGGATG-3',目的条带长度为 271 bp。取出肌肉支架、支架组冻存组织各 100 mg,以 Trizol 试剂提取总 RNA。采用相对定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对逆转录产物进行扩增,扩增条件:95 °C 变性 10 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,共 35 次循环,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物凝胶电泳后定量分析各条带吸光度值并测算相对丰度。

6. 统计学处理:部分数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析和 *t* 检验。

结 果

1. 大体观察:术后第 4 周,肌肉支架组兔腿共有 27 条肌肉移植成功,1 条近端连接处断裂。随着观察时间的延长,缺损处逐渐愈合,外观圆润、有光泽、弹性好(图 1b)。第 4 周,支架组兔腿移植的筋膜支架有 4 条断裂,余下 6 条缺损处仍旧凹陷,表面仅被 1 层纤维膜覆盖(图 1c);肌肉组均呈豆腐渣样改变;缺陷组创面仍旧缺损(图 1d)。肌肉支架组移植成活率达 96.4%,其他组相对较差。

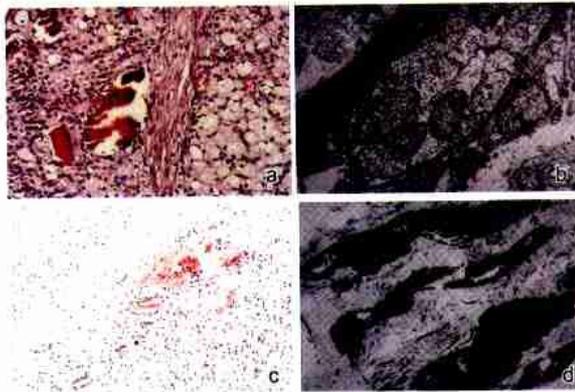


注: a. 兔腿缺损模型; b. 肌肉支架组缺损愈合,外观接近正常; c. 支架组缺损外仅被一层纤维膜覆盖; d. 缺陷组创面仍旧缺损
图 1 兔胫骨前肌中段缺损模型及各组术后第 4 周创面的生长情况

Fig 1 The growth of the grafts in rabbit model with defects in midportion of anterior tibial muscle and in each group on 4 POW

2. 组织学及超微结构观察:肌肉支架组在光镜下可见大量骨骼肌细胞卫星样增生,术后 2—3 周时细胞增生最活跃,增生细胞附于纤维结缔组织两侧(图 2a)。透射电镜观察到肌肉支架组术后 2—3 周时细胞内线粒体代谢最旺盛,6—9 周时有细胞融

合,并逐渐趋向成熟(图 2b);而支架组仅见纤维结缔组织,其中有少量中性粒细胞浸润(图 2c,d)。



注:肌肉支架组有大量骨骼肌细胞增生(a, HE × 200),出现细胞融合现象(b,透射电镜 80.0 kV × 3 000);支架组仅见纤维结缔组织(c, HE × 100;d,透射电镜 80.0 kV × 3 000)

图 2 术后第 3 周肌肉支架组和支架组移植植物形态学观察结果
Fig 2 The morphology of the grafts in C₁ and C₂ groups on 3 POW

3. 免疫组织化学鉴定:肌肉支架组增生细胞 85% 以上结蛋白染色呈阳性,细胞质为棕色,细胞核为蓝黑色。支架组呈弱阳性。见图 3。

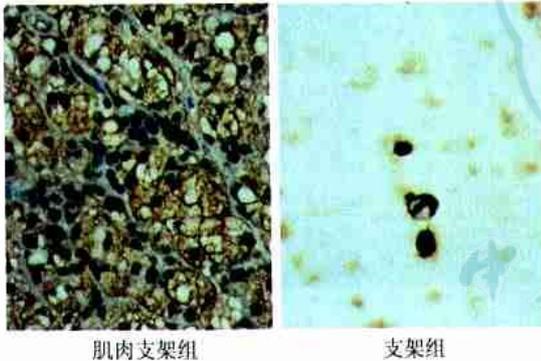


图 3 术后第 4 周肌肉支架、支架组移植植物结蛋白免疫组织化学染色结果 DAB × 200

Fig 3 Histological examination of Desmin in C₁ and C₂ group on 4 POW DAB × 200

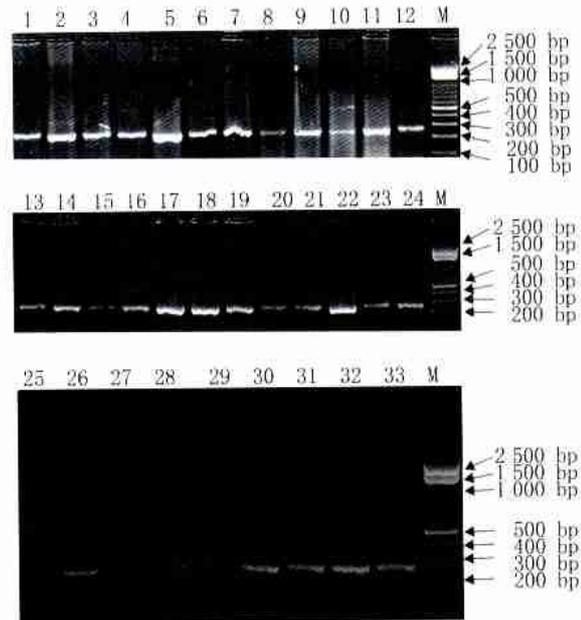
4. α 肌动蛋白 DNA 分析结果:肌肉支架、支架组移植 α 肌动蛋白 DNA 的表达随时间延长有逐渐增强趋势(图 4、表 1)。

表 1 肌肉支架、支架组移植 α 肌动蛋白 DNA 相对丰度比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the relative abundance of α-actin DNA in C₁ and C₂ groups($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间(周)				
	2	3	4	6	9
肌肉支架组	1.05 ±0.27*	2.95 ±0.34*	1.62 ±0.36*	1.85 ±0.36	1.87 ±0.50
支架组	0.59 ±0.30	1.00 ±0.25	0.83 ±0.35	1.10 ±0.53	1.03 ±0.58

注:肌肉支架组 28 只兔腿,支架组 10 只兔腿;与支架组比较, * P < 0.05;组内各时相点比较, t = 2.56, P < 0.05



注:M 为 marker,条带 1~24,31~33 样本取自肌肉支架组,条带 25~30 样本取自支架组

图 4 肌肉支架、支架组移植 α 肌动蛋白 DNA 凝胶电泳图
Fig 4 The electrophoresis results of the α-actin DNA extracted from the tissue samples in C₁ and C₂ groups

讨 论

支架材料是组织再生的关键之一。肌肉在受损、变性等条件下,卫星细胞被激活、增生,并与原肌纤维支架融合共同修复损伤。本实验人为造成肌肉缺损,在没有肌纤维存在的情况下,利用筋膜作支架,为卫星细胞融合创造了条件。

用筋膜组织修复面神经瘫痪、部分组织缺损已在临床应用多年。但利用筋膜具有一定强度且抗张力的特性,将之作为支架材料进行肌肉组织再生的研究尚鲜见报道。用自体筋膜作支架,其优势有:(1)无免疫排斥反应。(2)筋膜上残存的血管有利于和周围血管建立循环,为移植组织提供营养成分。(3)筋膜上残存的神经通路可与周围神经建立联络,利于神经分布^[5]。(4)筋膜上残存的成纤维细胞、血管内皮细胞等可分泌多种细胞因子,有利于肌肉组织再生。

根据组织块培养法的原理用组织块直接在体内培养细胞,有利于细胞生长、增殖、分化,省去了体外培养细胞的繁琐细节,可避免遭遇污染、生长分化不理想等风险。本实验肌肉支架组兔腿中肌肉组织微粒在体内释放出肌卫星细胞,沿筋膜支架组织爬生长。在体内有多种细胞因子参与,其增生速度比在体外培养环境中快,高密度的骨骼肌卫星细胞也有利于细胞融合成多核的肌管细胞,以分化相同的

极性方向,产生肌肉合力。本实验观察到术后第 2—4 周时肌肉支架组细胞大量增生并贴附于筋膜组织两侧,细胞内线粒体代谢旺盛,6—9 周时有细胞融合,外观圆润、有光泽、弹性好。而支架组虽已植入支架,但因无肌肉组织微粒生长,仍旧呈凹陷状。肌肉组因无筋膜支架,肌肉微粒最终无法附着生长,成为豆腐渣样。缺陷组仍旧缺损。

用免疫组织化学染色方法检测细胞有无结蛋白表达,是目前所知的鉴定骨骼肌卫星细胞的最佳方法^[6]。结蛋白是肌细胞内细胞骨架中间丝的构成成分之一,由单一的结蛋白基因编码合成,在心肌、骨骼肌及平滑肌细胞中都有表达,而成纤维细胞不表达这种蛋白。本实验结果显示,肌肉支架组移植部位结蛋白表达阳性率达 85%,提示该部位含有大量肌细胞成分,在支架组中结蛋白表达阳性率较低,可能是因为仅有部分血管平滑肌所致。

肌动蛋白是肌丝的主要成分,目前发现主要有 3 种类型,即 α 、 β 、 γ 型。其中 β 、 γ 型大部分存在于非肌肉细胞中,而 α 型存在于肌肉细胞中,约占骨骼肌总蛋白的 12%^[7]。本实验通过对 α 肌动蛋白进行定量分析获知,肌肉支架组与支架组比较, α 肌

动蛋白含量差异具有统计学意义,提示两组中肌细胞含量显著不同。

以上结果提示,自体筋膜作为肌肉组织再生的支架具有可行性。至于骨骼肌卫星细胞在体内如何分化和融合,最终能否形成肌肉组织,肌力如何,原肌组织碎块在体内如何转归,筋膜在体内如何降解等问题,笔者正在进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 朱志祥,许晓光,李伟萍,等. 急诊综合修复电损伤临床回顾分析. 中华烧伤杂志,2001,17:18-21.
- 2 李伟萍,朱志祥,许晓光,等. 生物氧耗量测定诊断高压电损伤的实验研究. 中华烧伤杂志,2001,17:111-113.
- 3 鄂江,钟世镇,徐达传,等. 肌组织工程的基础研究——卫星细胞培养及鉴定. 中国临床解剖学杂志,1999,17:351-352.
- 4 汪道新,朱志祥,张力勇,等. 自体筋膜支架的肌肉组织构建. 中华医药杂志,2004,3:4-7.
- 5 Borschel GH, Dennis RC, Kuzon WM. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. Plast Reconstr Surg, 2004,113:595-602.
- 6 张臻,朱洪生,钟斌,等. 犬骨骼肌卫星细胞的分离、培养及扩增方法探索. 上海实验动物学,2000,20:72-74.
- 7 胡柏平,赵咏梅. 运动对骨骼肌肌动蛋白及其基因表达影响的研究进展. 体育学刊,2004,11:48-50.

(收稿日期:2005-03-08)

(本文编辑:赵敏)

· 病例报告 ·

烧伤创面应用水胶体敷料导致接触性皮炎一例

严刚 李建伟 汤勇 唐宗联

患者女,25 岁。电热取暖器烫伤右前踝 2 cm × 1 cm,Ⅲ度,门诊换药治疗。患者平素体质弱,有对牛奶、鸡蛋、磺胺类药物过敏史。伤后 14 d 起使用丹麦康乐保公司的康惠尔溃疡贴水胶体敷料 5 cm × 4 cm 换药,1 次/2 d。16 d 后,患者创面周围皮肤与所贴溃疡贴大小一致的区域红肿、发痒、出现水疱、糜烂、渗出,诊断为接触性皮炎。停用康惠尔溃疡贴并换药。创面用体积分数 0.1% 苯扎溴铵清洗消毒,皮炎区域白天用 30 g/L 的硼酸溶液湿敷,夜间涂氧化锌糊剂。治疗 4 d 后局部皮肤炎症好转,烧伤创面用等渗盐水湿敷换药,创面逐渐缩小。8 d 后患者因走动过多,该区域的皮肤再次出现红肿、小水疱及渗液,除重复上述皮炎治疗外,加用醋酸氟氢松软膏外涂,口服维生素 C 及抗过敏药物,皮炎逐渐好转,烧伤创面愈合。10 d 后该区域皮肤再次红肿、渗液,疑为创面溃烂而就诊,仍按接触性皮炎治疗,同时辅以清热、凉血、解毒药物治疗,6 d 后治愈,未再复发。

讨论 康惠尔水胶体敷料的主要成分为羧甲基纤维素钠,基质为人工聚合物、黏弹剂,对创面具有自溶清创、促进

伤口愈合的作用。本病例属变态反应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD),为 T 淋巴细胞介导的迟发型超敏反应。当变应原作为刺激因子作用于少数特异性过敏体质者的皮肤和黏膜时,可诱发病。初次接触并不立即发病,经 4—20 d 的潜伏期,机体先致敏,当再次接触该物时可在 12 h 左右发生皮炎^[1]。患者应用康惠尔溃疡贴水胶体敷料后,引起 ACD,皮炎区域与接触物形状一致,因 ACD 残余的抗原在皮肤上至少可保留 2—3 周^[2],所以当患者劳累、体质差、机体免疫失衡及停止相关的治疗后,可再次诱发病。故治疗前应查明病因,避免再接触;去除刺激因子,避免搔抓、摩擦及其他刺激。可给予口服抗组织胺类药物及维生素 C,并局部合理用药,同时配合中医清热、凉血、解毒治疗。

参 考 文 献

- 1 刘辅仁,主编. 实用皮肤科学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996. 254.
- 2 张开明,王刚,尹国华,主编. 最新皮肤科学理论与实践. 北京:中国医药科技出版社,2000. 263.

(收稿日期:2004-11-08)

(本文编辑:张红)