

激光微孔猪脱细胞真皮基质的制备及生物相容性评价

林才 罗旭 王平 万丽 徐建军 曾逃方 毛葱 辛国华

近年来,国内外研究者寻求用异体(种)真皮或其他生物材料研发可植入式真皮替代物,其中取自猪皮的 ADM 因其完整的胶原三维结构且来源广泛尤受重视,但因不能早期充分血管化,影响临床效果及推广^[1-5]。提高植人性材料本身的快速血管化能力,是目前组织工程材料急需解决的关键技术难题之一。本研究中,笔者采用独特激光模板悬空打孔技术(国家发明专利申请号:2010101273690)研制激光微孔猪 ADM(LPADM)材料,研究其生物相容性和血管化能力。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂、仪器及动物来源

亲和素-生物素-复合物(ABC)试剂盒以及 IL-10、IL-6、TGF- β_1 、血管内皮生长因子(VEGF) quantikine ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司),层粘连蛋白(LN)ELISA 检测试剂盒(德国 antibodies-online GmbH 公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),FBS(奥地利 PAA 公司)。MK3 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司],电动取皮刀(美国 Zimmer 公司),紫外激光器(美国相干公司),H-600 型透射电镜(日本日立公司),FEI Quantan200 型扫描电镜(荷兰 FEI 公司),倒置相差显微镜及照相系统(日本 Olympus 公司)。

体质量 25 kg 左右健康雄性小白猪 1 只,购自温州医学院实验动物中心。体质量 250 g 左右雄性无特殊病原体级 SD 大鼠 44 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 LPADM 及无孔猪 ADM 的制备及检测指标

将小白猪处死,肥皂水洗刷、去毛后剥取全层皮肤,去脂后用体积分数 0.1% 苯扎溴铵浸泡 15 min,生理盐水冲洗干净,电动取皮刀取 0.2 mm 厚刃厚皮,去除表皮及基底膜层,在真皮组织上再切取约 0.3 mm 厚断层真皮片,分成 2 部分进行如下处理。(1)一部分猪真皮采用独特激光模板悬空打孔技术处理。将真皮片悬空固定在激光加工设备平台上,保持皮片上下表面平整且湿润,调节设备参数为出射功率密度最小 10 000 W/mm²,孔间隙 1 mm,孔径 0.1~0.8 mm(优选 135 μ m),经由相应大小孔径和孔间隙激光模板引导,在 1.0 cm \times 1.0 cm 区域形成 100 个微光区,快速击穿样品获得

激光微孔猪真皮基质。参照文献[4]方法脱除微孔化猪真皮细胞并交联,获得 LPADM,⁶⁰Co 照射灭菌后制成 5.0 cm \times 5.0 cm 大小,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。(2)另一部分猪真皮不打孔,同上脱细胞及交联制成同样规格无孔猪 ADM,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。对所制备的 LPADM 进行大体、组织学及扫描电镜观察。

1.3 体外实验

取 LPADM 与无孔猪 ADM 样本,制成 2.0 cm \times 2.0 cm \times 0.3 mm 大小,分别置于 6 孔培养皿中,用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液(Fb 培养液)培养。取 1 只 SD 大鼠,常规分离培养皮肤 Fb,取 1.8 mL 第 3 代 Fb(1×10^5 个/mL)接种于 2 种 ADM 表面,分别为 LPADM 组与无孔猪 ADM 组。另设仅用 Fb 培养液培养的 Fb 为对照组。

40 倍倒置相差显微镜下观察各组 Fb 生长情况。接种后第 1、3、5 天,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定各组 Fb 细胞活性因子 IL-10、IL-6、TGF- β_1 、LN、VEGF 在 492 nm 波长处的吸光度值,每组每时相点 6 个样本,具体操作按相应试剂盒说明书进行。

1.4 动物实验

1.4.1 皮下埋植及检测指标 取 18 只大鼠,去毛 24 h 后用 30 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射(50 mg/kg)麻醉,对称“U”形切开脊柱两侧背部全层皮肤至深筋膜,造成 2.0 cm \times 2.0 cm 大小创面,将 LPADM 与无孔猪 ADM 剪裁成与创面同样大小,分别移植于大鼠左右两侧筋膜层上,打包固定,单笼饲养。

于术后 1、3、10 d 观察大鼠的皮肤有无过敏、感染征象等,同时切取深筋膜下含有 LPADM 与无孔猪 ADM 的组织标本行组织学检查。

1.4.2 LPADM 复合自体中厚皮片移植及观测指标 取 25 只大鼠,采用步骤 1.4.1 中手术方式,在大鼠背部造成 1 个 2.0 cm \times 2.0 cm 大小的“口”形创面,深筋膜表面放置 LPADM,将创区全厚皮片修薄成中厚皮片同步移植于其上,缝合、打包固定,单笼饲养。

分别于移植术后 7、14、30、60、120 d,按照随机数字表法取 5 只大鼠,观察其体质量变化、死亡情况以及皮肤有无过敏、感染征象等,同时切取 LPADM 标本行组织学检查。移植皮片成活标准为早期皮片色泽红润、平坦,与受皮区基底贴附紧密。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行方差分析。

2 结果

2.1 LPADM 的大体、组织学及扫描电镜观察

LPADM 呈瓷白色,有光泽,柔软而富有弹性,未见明显

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.06.017

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(Z2080985);温州市科技计划项目(Y20080101)

作者单位:325000 浙江温州医学院附属第一医院烧伤科(林才、罗旭、徐建军),病理科(万丽);华南理工大学材料科学与工程学院(林才、毛葱);中国科学院上海技术物理研究所(王平);南昌大学第一附属医院烧伤科(曾逃方、辛国华)

通信作者:罗旭,Email:silwen2010@gmail.com,电话:0577-88069227

皱缩。微孔边缘真皮组织炭化程度轻,损伤未超过孔缘以外 0.25 μm 范围内组织。微孔规则呈圆形,大小均一,呈矩阵有序排列。组织学检查未见上皮细胞、内皮细胞残留,胶原排列整齐。见图 1。扫描电镜观察胶原纤维未见明显断裂,排列有序,结构完整。见图 2。



图 1 激光微孔猪 ADM 未见细胞残留,胶原排列整齐 HE ×100

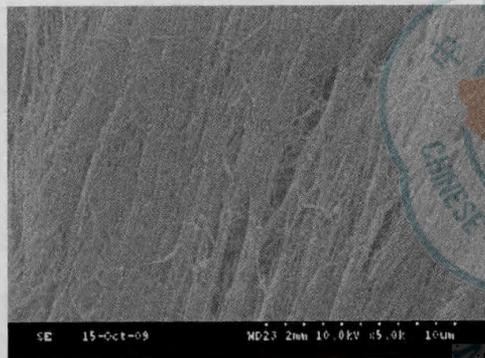


图 2 激光微孔猪 ADM 胶原纤维排列有序,结构完整 扫描电镜 ×5000

1 d,即可观察到材料周围胶原蛋白沉积,未见新生组织及新生血管;透射电镜下观察到新生的类血管内皮细胞。见图 3。术后 3 d,LPADM 材料明显泛红,与筋膜及周围组织黏附紧密,见图 4;LPADM 激光打孔处新生组织生长(图 5),其中新生血管清晰可见,内含多个红细胞征象,炎性细胞少见。术后 10 d,LPADM 中血管化呈网络状。术后无孔猪 ADM 透射电镜下未见新生的类血管内皮细胞;组织学观察可见创面中有炎性细胞,但未见血管形成。

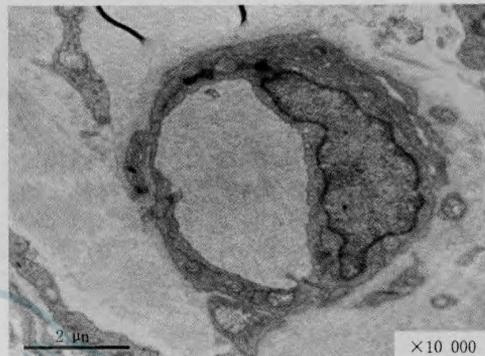


图 3 大鼠背部皮下埋植激光微孔猪 ADM 后 1 d,见单层血管内皮细胞围成新生血管腔样结构 透射电镜 ×10 000



图 4 大鼠背部皮下埋植激光微孔猪 ADM 后 3 d,埋植物明显泛红,与筋膜及周围组织黏附紧密

2.2 体外实验

2.2.1 Fb 生长情况 LPADM 组 Fb 接种 5~10 min 即表现出较好的黏附、贴壁情况,细胞基本呈长梭形在网孔内生长。与 LPADM 组相比,无孔猪 ADM 组和对照组 Fb 均能在 10~15 min 内贴壁生长,其余观察未见明显差异。

2.2.2 IL-10、IL-6、TGF-β₁、LN、VEGF 表达水平 LPADM 组、无孔猪 ADM 组和对照组接种后各时相点各检测指标吸光度值比较,差异均无统计学意义(F 值为 0.050~1.763, P 值均大于 0.05)。见表 1。

2.3 动物实验

2.3.1 皮下埋植术后情况

LPADM 移植于大鼠背部创面后

表 1 3 组 Fb 各种细胞活性因子水平比较(̄x ± s)

组别	样本数	IL-10	IL-6	TGF-β ₁	LN	VEGF
激光微孔猪 ADM 组						
接种后第 1 天	6	0.23 ± 0.08	0.22 ± 0.03	0.34 ± 0.13	0.41 ± 0.11	0.26 ± 0.07
接种后第 3 天	6	0.21 ± 0.06	0.26 ± 0.06	0.40 ± 0.15	0.33 ± 0.12	0.24 ± 0.11
接种后第 5 天	6	0.22 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0.45 ± 0.20	0.30 ± 0.06	0.25 ± 0.07
无孔猪 ADM 组						
接种后第 1 天	6	0.23 ± 0.05	0.28 ± 0.09	0.47 ± 0.26	0.36 ± 0.20	0.28 ± 0.10
接种后第 3 天	6	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.07	0.34 ± 0.08	0.40 ± 0.11	0.23 ± 0.05
接种后第 5 天	6	0.20 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.07	0.32 ± 0.15	0.23 ± 0.05
对照组						
接种后第 1 天	6	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.08	0.33 ± 0.06	0.41 ± 0.22	0.28 ± 0.09
接种后第 3 天	6	0.22 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.39 ± 0.13	0.38 ± 0.16	0.21 ± 0.06
接种后第 5 天	6	0.22 ± 0.05	0.24 ± 0.07	0.36 ± 0.10	0.38 ± 0.12	0.24 ± 0.07

注:LN 为层粘连蛋白,VEGF 为血管内皮生长因子;表中数据为吸光度值

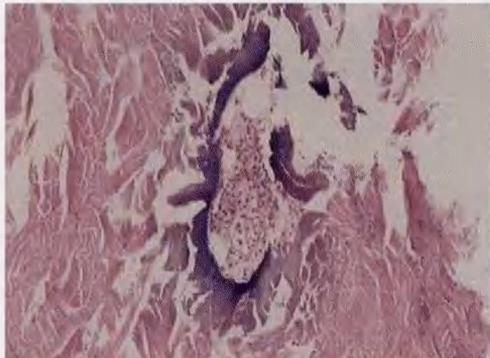


图 5 大鼠背部皮下埋植激光微孔猪 ADM 后 3 d, 激光打孔处新生组织生长 HE × 100

2.3.2 LPADM 复合自体中厚皮片移植后情况 移植后 14 d 自体中厚皮片成活。30 d 即可安全提捏术区皮肤, 皮肤愈合质量良好。组织学检查显示 LPADM 血管化充分, 各时相点均未见其明显溶解、吸收、缩小, 亦未见其被包裹。经复合移植的大鼠均存活, 未见明显局部和全身过敏反应, 其日常行为无异常, 体质量正常增加。

3 讨论

文献报道, 厚度为 0.18 ~ 0.19 mm 的 ADM, 其孔径必须大于 80 μm 才有利于结缔组织和新血管形成^[6] (如美国 Advanced Tissue Science 公司产品 Dermagraft), 但在给 ADM 打孔的同时也暴露其蛋白抗原位点, 理论上会增强宿主组织的包裹、分割和收缩作用^[7], 因而从抗原性角度考虑, 打孔的密度和分布应适宜。为此, 在研究中笔者设计制作了 0.3 mm 厚、孔间隙 1 mm、孔径 0.1 ~ 0.8 mm (优选 135 μm)、不同矩阵分布的激光微孔模板, 其中 0.1 ~ 0.2 mm 孔径已经申请专利保护。

这种经冷源激光气化成孔、脱细胞、交联制备而成的 LPADM, 组织损伤小、微孔分布均匀细密、不易皱缩、稳定性强, 克服了传统拉网机制备的真皮网眼较大、移植后易致皮片挛缩及网状瘢痕的弊端, 保证移植时创面基底渗液能够透过微孔更好地营养皮片, 促使血管再生, 提高皮片成活率。本研究所采用的脱细胞技术较传统方法更为快捷彻底, 制备成的 LPADM 因其天然的蛋白质结构, 可提供更多样的氨基酸位点, 为在体修复细胞 (如 Fb、血管内皮细胞等) 黏附、爬行、增殖创造更为有利的条件。本研究制备的 LPADM 胶原纤维排列整齐有序、结构完整。大鼠皮下埋植术后 3 d, LPADM 与筋膜及周围组织黏附紧密, 激光打孔处新生组织中新生血管清晰可见; 术后 10 d LPADM 中血管化呈网络状, 显示 LPADM 早期即可充分血管化, 具有良好的组织相容性。LPADM 复合自体中厚皮片移植后, 皮片成活良好, 未出现动物死亡、感染或体质量减轻等情况, 亦未见皮肤过敏反应, 验证了 LPADM 具有较高的生物安全性。以上检测也证实 LPADM 植入体内后, 多种细胞成分、ECM 成分、细胞因子等进入其多孔结构中, 短时间内形成以 LPADM 为中心的新生

ECM, 并进一步引导新生组织形成, 其中包括含大量红细胞的功能性血管, 表明 LPADM 材料能够有效启动内源性组织修复 (“LPADM-ECM” 复合体), 具备快速血管化 “发动机” 的作用和特点, 值得进一步关注。

研发植入性生物材料初期, 对其进行安全性评价是最重要的原则之一^[8]。本研究采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法对 LPADM 作进一步的生物安全性评价。Fb 接种到 LPADM 上 5 ~ 10 min 即较好地黏附, 细胞增殖活跃, 形态良好, 显示 LPADM 对细胞生长无毒性。检测结果显示, LPADM 组、无孔猪 ADM 组、对照组各时相点各细胞活性因子水平比较, 差异均无统计学意义 (P 值均大于 0.05), 说明 LPADM 与无孔 ADM 在影响细胞活性因子分泌、细胞增殖方面无明显差异, 提示 LPADM 和无孔猪 ADM 均具有较高的生物安全性。

本研究的创新点是激光模板悬空打孔专利技术, 它完全不同于既有的激光打孔方法, 可将打孔过程中热量对皮片的影响降至最小。组织学研究显示微孔周边组织受损范围极小, 而 ELISA 法检测显示 LPADM 组内各项因子吸光度值与无孔猪 ADM 组相近, 说明尽管激光打孔时产生的热量必然使微孔周围组织发生一些 “变化”, 但这种变化并没有明显改变 LPADM 的性质, 也未于细胞水平对细胞因子分泌和细胞增殖产生明显不利影响。

动物实验结果显示, LPADM、无孔猪 ADM 早期血管化程度存在明显差异性, 显然激光微孔处理是造成这种差异的关键。LPADM 特定的优化微孔结构是决定其早期较快血管化的主因, 预示 LPADM 结构和早期血管化之间存在一定的客观联系, 很可能在体内具有潜在的生物诱导作用, 比如 “LPADM-ECM”, 深层次机制值得进一步研究探讨。

参考文献

- [1] Burns NK, Jaffari MV, Rios CN, et al. Non-cross-linked porcine acellular dermal matrices for abdominal wall reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 2010, 125(1):167-176.
- [2] 姜育智, 丁桂甫, 陆树良. 真皮组织微化重建的探索性研究. *中华烧伤杂志*, 2009, 25(5): 343-351.
- [3] 梁黎明, 柴家科, 杨红明, 等. 激光微孔猪脱细胞真皮基质制备及创面移植的观察. *中华烧伤杂志*, 2007, 23(2):122-125.
- [4] 姜笃银, 陈璧, 徐明达, 等. 异种脱细胞真皮基质的制作和临床应用观察. *中华烧伤杂志*, 2002, 18(1):15-18.
- [5] 王志勇, 窦懿, 廖镇江, 等. 异种脱细胞真皮基质膜修复全层皮肤损伤的疗效和安全性分析——多中心、随机、对照试验. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(40):7837-7840.
- [6] Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*, 1995, 21(4):243-248.
- [7] Lull R. Immune considerations in tissue engineering. *Clin Plast Surg*, 1999, 26(4):549-568. vii-viii.
- [8] 杨晓芳, 奚廷斐. 生物材料生物相容性评价研究进展. *生物医学工程学报*, 2001, 18(1):123-128.

(收稿日期:2011-02-20)

(本文编辑:谢秋红)