

羊膜移植物的制备及临床应用研究进展

郑仕清 陈甜胜 纪世召 罗鹏飞 肖仕初

Advances in preparation and clinical application of amniotic membrane graft Zheng Shiqing, Chen Tiansheng, Ji Shizhao, Luo pengfei, Xiao Shichu. Department of Burn Surgery, Institute of Burns, Changhai hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Xiao Shichu, Email: huangzhuoxiao4@hotmail.com

【Abstract】 Amniotic membrane has been used as wound dressing for more than 100 years. With the development of the preservation and preparation techniques, amniotic membrane is widely used in ophthalmology, burns, plastic surgery, dentistry, and neurosurgery. In recent years, as more and more amniotic membrane is used in chronic wounds, it will be a new treatment method for wounds. This paper is a brief review about advances in preparation and clinical application of amniotic membrane graft.

【Key words】 Burns; Amnion; Biological dressings; Wound healing; Preparation; Clinical application

【关键词】 烧伤; 羊膜; 生物敷料; 伤口愈合; 制备; 临床应用

羊膜是位于胎盘最内层的一层无血管膜,由上皮层、基底层、致密层、纤维层和海绵层构成。羊膜最内层的上皮层与羊水接触,最外层的海绵层与血管绒毛膜相连。上皮层由单层立方上皮细胞组成,其羊水侧富含囊泡,囊泡内含微绒毛和气泡,基底侧主要是足突状的细胞结构。基底层位于上皮层外侧,是羊膜能够应用于创面治疗最重要的结构。由 ECM 构成的基底层富含胶原蛋白、蛋白聚糖、葡糖氨基葡聚糖、层粘连蛋白、高分子透明质酸等多种可溶性大分子物质。此外,通过 RT-PCR 及 ELISA 技术还观察到基底层中含有 EGF、KC 生长因子、肝细胞生长因子、bFGF、TGF 等多种生长因子^[1]。

从 Davis 于 1910 年报道使用羊膜移植治疗肉芽性创面开始,羊膜作为创面覆盖物已有 100 多年的历史。在 20 世纪 40 年代,羊膜开始应用于眼外科^[2]。1950 年以后,羊膜作为一种天然生物覆盖物开始应用于不同类型的创面,并在以后的几十年里有报道。第 1 个用于外科手术的羊膜组织库在菲律宾建立^[3]。

随着人们对于治疗效果的要求越来越高,临床需要的创面覆盖物的种类也随之增加。近年来,羊膜越来越多地应用于慢性创面,使其成为一种新型的治疗手段。本文就羊膜移植物的制备、保存及临床应用进展进行综述。



1 羊膜的制备与保存

1.1 羊膜的制备

传染病一直是人体器官和组织移植的危险因素,将羊膜作为移植必须有着严格的安全防护和审查方法。捐献者在分娩前大概 2 周的时间抽血检测一系列传染病,包括人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎、丙型肝炎、人类嗜 T 淋巴细胞病毒、梅毒、巨细胞病毒以及结核等。为避免检测时处于窗口期,需在 6 个月复查。经过检测为阴性的胎盘组织,在无菌条件下应用生理盐水洗去血渍后从胎盘组织中分离羊膜,再用含抗生素和抗真菌药物的复合溶液多次浸润洗涤羊膜,最后用无菌生理盐水冲洗后得到整片羊膜^[4]。

目前尚无公认的方法用以制备微粒羊膜,但是许多学者进行了尝试。有研究者通过应用匀质器将液氮处理后的整片羊膜变为微粒,再用滤网过滤筛选出直径 300 ~ 600 μm 的微粒羊膜^[5]。在另外一项研究中,研究者将新鲜羊膜冻干后,再用液氮处理,然后应用磨粉机制作成微粒羊膜^[4]。已有的商品化的羊膜制品也有微粒羊膜^[6],但是由于多种原因,尚不能够大规模应用。

1.2 脱细胞羊膜基质的制备

Koizumi 等^[7]研究表明,脱细胞羊膜基质较完整羊膜在促进细胞生长方面的作用更为明显。较常用的脱细胞方法有中性酶法、乙二胺四乙酸(EDTA)法、胰蛋白酶-EDTA 法、尿素法等,还有些如乙醇法、嗜热蛋白酶法等。有学者应用反复冻融加 DNA 酶的方法脱细胞,达到比较好的效果^[5]。总体来说,使用酶的方法如中性酶法或胰蛋白酶-EDTA 法脱细胞,都有可能破坏羊膜基底层^[8]。目前较好的脱细胞方法是 EDTA 法或尿素法。

1.3 羊膜的保存

长期保存羊膜有微生物感染的隐患。一些研究表明在应用常规保存方法的同时,加用 γ 射线消毒可以降低微生物感染的可能^[9]。常用的羊膜保存方式有冻藏和脱水保存。应用范围最广的冻藏保存方法为 -80 °C 甘油保存^[7],脱水保存常用的为冻干后 γ 射线辐照消毒保存^[10]。上述 2 种方法均能够保存羊膜大部分物理、生物和形态学特点^[9]。冻干保存的优势是羊膜可以在室温下保存很长一段时间而不变质,可以简化运输和存储条件,同时降低生产成本。目前美国已有公司应用冷冻或者脱水保存的方式将羊膜制成商业化成品,并投入使用。

2 羊膜的临床应用

随着羊膜制备及保存技术的进步,其在烧伤整形外科、眼外科、神经外科以及颌面外科亦有一定应用。同时近年来出现了一些羊膜商业化产品,并在慢性创面修复领域发挥了一定优势。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.08.016

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院烧伤外科,全军烧伤研究所

通信作者:肖仕初,Email:huangzhuoxiao4@hotmail.com

2.1 在烧伤整形外科的应用

羊膜在创面的应用最早即是应用于烧伤创面。随着羊膜保存技术的发展,多种不同保存方式的羊膜开始应用于烧伤创面。一项应用冻藏羊膜对比应用含抗生素敷料治疗烧伤患儿头颈部浅Ⅱ度创面的研究表明,应用羊膜可明显减少创面换药次数^[11]。在另外一项对比脱水干燥辐照消毒羊膜和磺胺嘧啶银治疗烧伤患儿深Ⅱ度创面疗效的试验中,应用羊膜的创面上皮化速度快、创面疼痛感及异味均低于应用磺胺嘧啶银^[12]。使用新鲜羊膜辅助网状刃厚皮片治疗四肢深Ⅱ~Ⅲ度烧伤创面,结果也显示羊膜辅助较常规植皮移植成功率高^[13]。

移植皮瓣的成活率高决定了整个整形手术成功与否。研究证明,羊膜可以显著促进创面毛细血管增生,减少中性粒细胞浸润以提高皮瓣成活率^[14]。在严重创伤及复杂创面修复的患者中,微血管吻合、肌腱及神经修复对于患者抢救和康复都有十分重要的意义。羊膜应用于血管吻合在 SD 大鼠上得到证实,羊膜移植较自体静脉移植在修复大鼠内皮缺损时间上无明显差异^[15]。通过对新西兰兔腓肠肌肌腱修复的实验表明,在修复肌腱及神经中应用羊膜可以明显减少粘连^[16]。

2.2 在眼外科的应用

1995 年以后,羊膜移植开始大规模应用于临床并获得了明确的疗效^[17]。目前羊膜主要应用在眼表面疾病,如永久性角膜上皮缺损、急性化学烧伤所致眼角膜或结膜瘢痕及翼状胬肉等^[2]。在国内,羊膜商业化成品瑞济生物羊膜(江西瑞济生物工程技术有限公司)亦在翼状胬肉、结膜肿瘤、角膜溃疡濒临穿孔、睑球粘连、眼表化学烧伤、青光眼等领域得到应用。

2.3 在神经外科及颌面外科的应用

在神经外科中,羊膜已被应用于颅脑手术后并发脑脊液漏。Tomita 等^[18]首次应用低压干燥并辐照消毒后的羊膜行颅底手术以修补硬脑膜,结果显示,未见任何与羊膜移植相关的如脑脊液漏等不良反应。在颌面外科中,羊膜的抗炎及抗菌特性使其在牙周组织修补方面也发挥了作用。有研究者应用羊膜与自体骨移植结合治疗人牙周颊根分叉二级缺陷,术后 6~9 个月,患者袋口深度明显变浅^[19]。Arai 等^[20]应用羊膜治疗患者舌及颊黏膜癌变手术切除后口腔黏膜缺损,结果表明,羊膜可以很好地黏附在裸露的结缔组织和肌肉组织中。

2.4 在慢性溃疡创面的应用

目前对于慢性溃疡创面的治疗主要为彻底清创、避免感染,以促进创面愈合,同时辅以病因治疗的方法。传统清创治疗花费时间长、次数多、复发率高。羊膜含有大量的生长因子和细胞因子,具有促进间充质干细胞等细胞迁移及增殖的作用,并有一定的抗菌能力,同时可减轻局部炎症和瘢痕组织,在慢性溃疡创面修复上具有优势。

在国外,羊膜已经应用于治疗一些慢性创面。Zelen 等^[21]应用羊膜产品 EpiFix[®](美国 MiMedx Group 公司)治疗患者糖尿病足溃疡,结果显示,应用 EpiFix[®] 治疗以后,创面愈合速度明显较标准护理治疗快。在另外一项糖尿病足溃疡的临床试验中,比较了 EpiFix[®] 与皮肤替代物 Apligraf[®]

(美国 Organogenesis 公司)的疗效,结果表明,使用 EpiFix[®] 的创面愈合快,且花费比 Apligraf[®] 减少 5% 以上^[22]。在疗效相同的情况下,每周应用 EpiFix[®] 较双周应用可以明显缩短患者糖尿病足溃疡治疗时间^[23]。有研究显示,应用羊膜产品 AmnioFix[®](美国 MiMedx Group 公司)的微粒制剂治疗静脉性小腿溃疡较常规治疗创面愈合率高^[24]。在一项临床试验中,联合应用羊膜产品 AmnioExcel[®](美国 Derma Sciences 公司)和标准护理方法治疗糖尿病足溃疡,联合组中 35% 的患者在 6 周或者 6 周内创面完全愈合,而单独使用标准护理治疗的患者创面在 6 周内未完全愈合^[25]。目前正在进行一项 AmnioExcel[®] 治疗糖尿病足溃疡的临床试验,通过与标准治疗方法相比较以检验其疗效^[26]。另外一项关于糖尿病足溃疡的研究结果表明,接受羊膜产品 Grafix[®](美国 Osiris Therapeutics 公司)治疗的患者治疗 12 周创面愈合率高于标准治疗组,同时 Grafix[®] 组患者糖尿病足溃疡的并发症发生率也明显低于标准治疗组^[27]。Regulski 等^[28]分析了 66 例接受冻存羊膜治疗的门诊患者,结果表明应用羊膜有助于慢性溃疡创面的愈合。目前多种羊膜产品如 Grafix[®]、NEOX CORD 1K[®](美国 Amnio Medical 公司)都在进行糖尿病足溃疡的临床试验,以检验其安全性和有效性^[26]。

3 小结与展望

目前,羊膜的制备技术日益成熟,其在各领域的研究将(或已)进入临床试验阶段。但是临床可用的商业化羊膜成品的价格仍较高,同时保存方式的不同造成了羊膜成分及性质的不同,尚无任何一种羊膜制品可以完全满足临床需求。同时由于伦理问题的影响,国内临床上除眼科外鲜有应用羊膜的病例报道,且国内尚无可用于皮肤创面的羊膜商品化成品。在国外,虽然已有家公司制造的商业化羊膜应用于治疗慢性创面的临床试验中,但是其应用范围仅在一些程度较轻、面积较小的慢性创面上,尚不能大范围应用。相信随着组织工程技术和保存技术的提高,羊膜可能会有更简单的商品化生产方式,并且仍能保持其生物特性。考虑到羊膜在眼科治疗的功效及成功应用,使用制备保存的羊膜有望成为治疗皮肤创面的新方法。

参考文献

- [1] Koob TJ, Lim JJ, Zabek N, et al. Cytokines in single layer amnion allografts compared to multilayer amnion/chorion allografts for wound healing[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015, 103(5):1133-1140. DOI: 10.1002/jbm.b.33265.
- [2] Meller D, Pauklin M, Thomasen H, et al. Amniotic membrane transplantation in the human eye[J]. Dtsch Arztebl Int, 2011, 108(14):243-248. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0243.
- [3] Dino BR, Eufemio GG, De Villa MS. Human amnion; the establishment of an amnion bank and its practical applications in surgery[J]. J Philipp Med Assoc, 1966, 42(7):357-366.
- [4] Russo A, Bonci P, Bonci P. The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane[J]. Cell Tissue Bank, 2012, 13(2):353-361. DOI: 10.1007/s10561-011-9261-5.
- [5] Ji SZ, Xiao SC, Luo PF, et al. An epidermal stem cells niche microenvironment created by engineered human amniotic mem-

- brane[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(31):7801-7811. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.076.
- [6] Willett NJ, Thote T, Lin AS, et al. Intra-articular injection of micronized dehydrated human amnion/chorion membrane attenuates osteoarthritis development[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(1):R47. DOI: 10.1186/ar4476.
- [7] Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 245(1):123-134. DOI: 10.1007/s00417-005-0095-3.
- [8] Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, et al. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(2):216-225. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.034.
- [9] Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(1):93-99.
- [10] Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane[J]. *Acta Ophthalmol*, 2009, 87(4):396-403. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01261.x.
- [11] Branski LK, Herndon DN, Celis MM, et al. Amnion in the treatment of pediatric partial-thickness facial burns[J]. *Burns*, 2008, 34(3):393-399. DOI: 10.1016/j.burns.2007.06.007.
- [12] Mostaque AK, Rahman KB. Comparisons of the effects of biological membrane (amnion) and silver sulfadiazine in the management of burn wounds in children[J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32(2):200-209. DOI: 10.1097/BCR.0b013e31820aad94.
- [13] Mohammadi AA, Seyed Jafari SM, Kiasat M, et al. Effect of fresh human amniotic membrane dressing on graft take in patients with chronic burn wounds compared with conventional methods[J]. *Burns*, 2013, 39(2):349-353. DOI: 10.1016/j.burns.2012.07.010.
- [14] Ozkaya O, Egegen O, Yeşilada A, et al. The effect of nonpreserved human amniotic membrane on the survival of ischaemic skin flaps in rats[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2012, 65(12):1700-1705. DOI: 10.1016/j.bjps.2012.06.013.
- [15] Gray KJ, Shenaq SM, Engelmann UH, et al. Use of human amnion for microvascular interpositional grafts[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1987, 79(5):778-785.
- [16] Ozbölük S, Ozkan Y, Öztürk A, et al. The effects of human amniotic membrane and periosteal autograft on tendon healing: experimental study in rabbits[J]. *J Hand Surg Eur Vol*, 2010, 35(4):262-268. DOI: 10.1177/1753193409337961.
- [17] Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas[J]. *Cornea*, 1995, 14(5):473-484.
- [18] Tomita T, Hayashi N, Okabe M, et al. New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery[J]. *J Neurol Surg B Skull Base*, 2012, 73(5):302-307. DOI: 10.1055/s-0032-1321506.
- [19] Kothiwale SV, Anuroopa P, Gajiwala AL. A clinical and radiological evaluation of DFDBA with amniotic membrane versus bovine derived xenograft with amniotic membrane in human periodontal grade II furcation defects[J]. *Cell Tissue Bank*, 2009, 10(4):317-326. DOI: 10.1007/s10561-009-9126-3.
- [20] Arai N, Tsuno H, Okabe M, et al. Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2012, 70(9):2221-2228. DOI: 10.1016/j.joms.2011.09.033.
- [21] Zelen CM, Serena TE, Denoziere G, et al. A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers[J]. *Int Wound J*, 2013, 10(5):502-507. DOI: 10.1111/iwj.12097.
- [22] Zelen CM, Gould L, Serena TE, et al. A prospective, randomised, controlled, multi-centre comparative effectiveness study of healing using dehydrated human amnion/chorion membrane allograft, bioengineered skin substitute or standard of care for treatment of chronic lower extremity diabetic ulcers[J]. *Int Wound J*, 2015, 12(6):724-732. DOI: 10.1111/iwj.12395.
- [23] Zelen CM, Serena TE, Snyder RJ. A prospective, randomised comparative study of weekly versus biweekly application of dehydrated human amnion/chorion membrane allograft in the management of diabetic foot ulcers[J]. *Int Wound J*, 2014, 11(2):122-128. DOI: 10.1111/iwj.12242.
- [24] Serena TE, Carter MJ, Le LT, et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial evaluating the use of dehydrated human amnion/chorion membrane allografts and multilayer compression therapy vs. multilayer compression therapy alone in the treatment of venous leg ulcers[J]. *Wound Repair Regen*, 2014, 22(6):688-693. DOI: 10.1111/wrr.12227.
- [25] Snyder RJ, Shimozaki K, Tallis A, et al. A prospective, randomized, multicenter, controlled evaluation of the use of dehydrated amniotic membrane allograft compared to standard of care for the closure of chronic diabetic foot ulcer[J]. *Wounds*, 2016, 28(3):70-77.
- [26] Ilic D, Vicovac L, Nikolic M, et al. Human amniotic membrane grafts in therapy of chronic non-healing wounds[J]. *Br Med Bull*, 2016, 117(1):59-67. DOI: 10.1093/bmb/ldv053.
- [27] Lavery LA, Fulmer J, Shebetka KA, et al. The efficacy and safety of Graftax[®] for the treatment of chronic diabetic foot ulcers: results of a multi-centre, controlled, randomised, blinded, clinical trial[J]. *Int Wound J*, 2014, 11(5):554-560. DOI: 10.1111/iwj.12329.
- [28] Regulski M, Jacobstein DA, Petranto RD, et al. A retrospective analysis of a human cellular repair matrix for the treatment of chronic wounds[J]. *Ostomy Wound Manage*, 2013, 59(12):38-43.

(收稿日期:2016-06-30)

(本文编辑:程林)

本文引用格式

郑仕清, 陈甜胜, 纪世召, 等. 羊膜移植物的制备及临床应用研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(8):514-516. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.08.016.

Zheng SQ, Chen TS, Ji SZ, et al. Advances in preparation and clinical application of amniotic membrane graft[J]. *Chin J Burns*, 2017, 33(8):514-516. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.08.016.