

· 论著 ·

不同种属脱细胞真皮与自体皮复合移植的比较性研究

陈金辉 齐顺贞 孙辉臣 贺占国 李辉 朱玉凤 陈兴

【摘要】 目的 观察不同种属脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)与自体皮复合移植的效果,为异种 ADM 的临床应用提供理论依据。**方法** 本地产白色小猪 6 头,分为异种(人)ADM + 自体刃厚皮组(A 组)、同种异体(猪)ADM + 自体刃厚皮组(B 组)、单纯自体刃厚皮组(C 组)及单纯自体中厚皮组(D 组)。观察术后 2、4、8、12、24 周内移植存活率,以及移植皮片收缩程度、移植区组织学变化等情况。**结果** A、B 组移植后皮片外观光滑、有弹性;两组均获得了满意的皮片成活率,并可迅速诱导成纤维细胞、血管内皮细胞等宿主修复细胞的长入;两组移植皮片收缩面积有大于 C、D 组的趋势($P < 0.05$);术后 24 周移植区组织与单纯中厚皮移植组织结构一致。**结论** 在观察期内(复合移植后 24 周),与自体皮复合移植时,同、异种 ADM 具有相近的生物学作用,异种来源的 ADM 可能具有更广阔的应用前景。

【关键词】 脱细胞真皮基质; 皮肤移植; 创面处理

Comparison of composite grafting of autoskin with acellular dermal matrix from different sources CHEN Jin-hui, QI Shun-zhen, SUN Hui-chen, HE Zhan-guo, LI Hui, ZHU Yu-feng, CHEN Xing. Department of Burns, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, P. R. China

【Abstract】 Objective To compare the composite grafts of acellular dermal matrix (ADM) from different sources with autoskin. **Methods** Six local white mini pigs were employed for the experiment. The pigs were randomly divided into four groups according to different skin grafts, i. e. A (human ADM with razor thin autoskin), B (porcine ADM with razor thin autoskin), C (razor thin autoskin only), and D (split thickness autoskin) as control. The survival rate, the contraction degree of the grafts, and the histological changes in grafting area were observed at 2, 4, 8, 12 and 24 hours after the operation. **Results** The grafted area in both A and B groups appeared smooth and elastic with satisfactory graft survival. The ingrowth of the host reparative cells such as fibroblast and vascular endothelium could be induced by composite grafts of different ADMs with skin grafting. The contraction areas in A and B groups seemed bigger than those in C and D groups. The tissue structure of grafting areas was similar to that of split thickness skin grafting area at 24 post-operation weeks. **Conclusion** Combination of the homogenous and heterogenous ADMs with auto-grafts exhibited similar biological function during the observation period (24 weeks after operation). Xenogenous ADMs might have broader clinical applications.

【Key words】 Acellular dermal matrix; Skin graft; Wound management

有效的真皮支持对全层皮肤毁损的创面修复、外观及功能恢复至关重要。脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)以其合理的构成、相对坚韧的机械性能及良好的组织相容性受到学者们的高度重视^[1-3]。目前试用于临床的 ADM,如美国 Life cell 公司生产的 alloderm 等,多来源于同种供体,价格昂贵,难以在临床广泛应用。异种来源的 ADM,其成本低廉、来源广泛,逐渐受到人们的重视。尽管有关于 ADM 的动物和临床试验报道^[4,5],但同、异种 ADM 的生物学作用是否相同尚无确切结论。为此,本文对同、异种 ADM 与自体皮复合移植进行了比较性研究。

材 料 与 方 法

一、同、异种 ADM 的制备

将猪皮和异种(人)皮(河北省烧伤研究中心组织库)取成 0.5 mm 厚的断层皮片,制备程序如下:高渗 NaCl 去表皮,戊二醛短时间交联,胰蛋白酶消化,十二烷基硫酸钠(SDS)处理,PBS 液浸洗,打网封装,⁶⁰Co 照射,4℃ 储存备用。两种 ADM 分别作下列检测:(1)组织学检测,切取小块 ADM,分别作 HE 染色和过碘酸希夫(PAS)特染,光镜下观察;(2)微生物学检测,将 ADM 小块接种于小牛血清蛋白胨培养基中 72 h,观察有无菌落形成;(3)细胞毒性鉴定(MTT 还原测定法),参照 Yourtee 等^[6]和梁卫东等^[7]的方法略加改进。

二、复合移植术及术后观察指标

作者单位:050082 石家庄,解放军白求恩国际和平医院烧伤科

本地健康 2 月龄小白猪 6 头, 每只动物背部切取全层皮肤形成 4 cm × 4 cm 创面 8 块(左右各 4 块), 每块相距 3 cm。所切取的皮片用鼓式取皮机反取为刃厚皮或中厚皮备用。设两个实验组: 异种(人)ADM + 自体刃厚皮组(A 组)、同种异体(猪)ADM + 自体刃厚皮组(B 组); 两个对照组: 单纯自体刃厚皮组(C 组)及单纯自体中厚皮组(D 组)。每只动物均采取上述 4 种方式完成一次性复合移植, 每组共 12 个创面, 其所在位置随机确定。各动物分圈喂养, 术后 2 周拆线。术后观察时间为 2、4、8、12 和 24 周, 观察指标: (1) 皮片外观。(2) 移植皮片成活率 [(移植皮成活面积/原移植面积) × 100%]。(3) 移植皮片收缩情况: 用胶片网格数格法测算移植区皮片平均面积 (cm²)。 (4) 移植区组织学变化: 用直径 2 mm 皮钻切取各移植区全层皮肤标本, 分别作 HE 染色、PAS 染色以及免疫组化染色 [纤维连接蛋白 (FN) 及第 VIII 因子, 均购自美国 Sigma 公司]。另一部分标本切成 1 mm³ 的组织块, 透射电镜观察。

三、统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用华西医科大学 PEMS 统计软件包行多个样本均数间方差分析。

结 果

一、ADM 外观

ADM 呈乳白色, 质地柔软, 有良好的弹性和韧性, 胶原纤维排列规整, 呈三维立体网状结构, 无任何细胞成分, 未见皮肤附件。微生物学检查无菌落形成。细胞毒性检测结果为 < I 级。

二、大体观察

移植后 2 周时, 各组移植皮片大部分成活良好。皮片成活率分别为: A 组 (87.04 ± 4.17)%, B 组 (89.73 ± 3.19)%, C 组 (91.06 ± 2.98)%, D 组 (90.25 ± 3.22)%, 4 组之间比较差异无显著性意义

($P > 0.05$)。4、8 周时, A、B 组皮肤外观光滑、柔软、丰满、有弹性, 与周围正常组织结合部平坦, 与 D 组相似, C 组皮面则有凹陷, 各组皮片均有不同程度的脱屑。术后 24 周 C 组皮面仍有凹陷, 皮片薄弱, 韧性也较复合皮及中厚皮移植组差。术后各组皮片的平均面积见表 1。

表 1 小猪术后各组创面平均面积比较 (cm², $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of average wound area in each group after operation (cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	术后时间(周)		
		4	8	12
A	12	14.08 ± 0.91	14.15 ± 0.96	14.11 ± 1.05
B	12	14.07 ± 1.10	13.98 ± 1.12	14.17 ± 1.28
C	12	14.05 ± 1.18	14.10 ± 0.92	11.57 ± 0.96*#
D	12	14.03 ± 1.03	13.97 ± 1.10	14.16 ± 0.93

注: 与 A、B、D 组比较, * $P < 0.05$; 与本组 4、8 周比较, # $P < 0.05$

术后第 2 周, 两个复合移植组 ADM 均与宿主组织生长在一起, 但二者分界线仍清晰可见。表皮细胞增生明显, 表现为细胞层数增多, 并可见多数狭长、尖锐的皮脚形成; PAS 特染显示表皮-真皮交界处的基底膜基本完整、连续 (图 1)。ADM 内见 3 类细胞: (1) 大量成纤维细胞按 ADM 中胶原纤维方向排布, 比较规整 (图 2), 电镜下成纤维细胞胞体丰满, 胞浆中粗面内质网显著扩张, 部分呈池状, 提示其功能异常活跃; (2) 较多的血管内皮细胞, 并已形成小血管结构 (图 3); (3) 部分炎性细胞浸润。炎性细胞以淋巴细胞为主, 约占 80% ~ 90%, 偶见少量的嗜酸性粒细胞和功能活跃的巨噬细胞, 中性粒细胞罕见。ADM 中各主要细胞的平均密度见表 2。

表 2 复合移植 2 周 ADM 内各类细胞的平均密度 (细胞数/mm², $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Average density of different species of cells 2 weeks after combined transplantation (cells number/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	成纤维细胞	血管内皮细胞	炎性细胞
A	5	1 398.86 ± 30.13	628.35 ± 25.41	598.67 ± 48.23
B	5	1 415.74 ± 50.41	647.24 ± 39.77	619.08 ± 39.86

注: 组间比较, $P > 0.05$

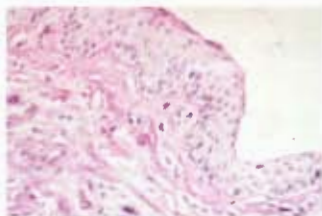


图 1 ADM 植入 2 周表皮-真皮连接处形成完整基底膜 PAS × 400

Fig 1 Intact basal membrane formed in the conjunction of epidermis and dermis two weeks after implantation of ADM PAS × 400

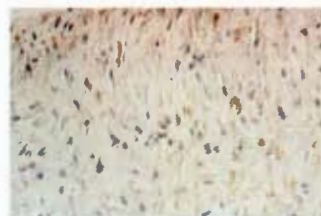


图 2 ADM 植入 2 周长入的成纤维细胞 DAB × 400

Fig 2 The fibroblasts in the graft two weeks after implantation of ADM DAB × 400

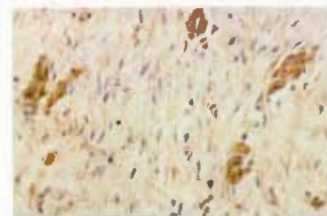


图 3 ADM 植入 2 周新生的小血管结构 DAB × 400

Fig 3 The structure of blood vessels growing into ADM graft two weeks after implantation of ADM DAB × 400

术后 4、8 周, 两组 ADM 内胶原纤维及成纤维细胞的密度似有所下降, 新生血管继续增多。镜下表现为典型的肉芽组织。其内还可见到部分胶原纤维呈玻璃样变。

术后第 12 周时, ADM 内的细胞数逐渐变少, 组织疏松, 结构逐渐接近正常真皮(图 4), 与自体中厚皮移植后的真皮层结构相似, 而单纯自体刃厚皮移植组表皮下仍表现为致密的肉芽组织。

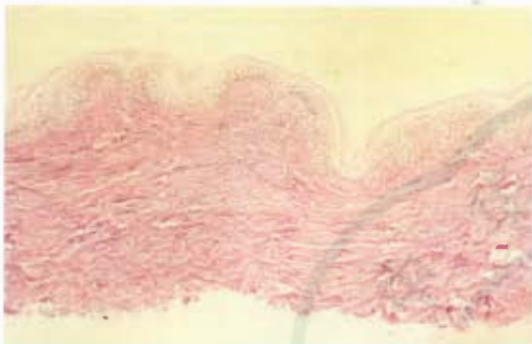


图 4 ADM 植入 12 周结构接近正常真皮 DAB × 400

Fig 4 The structure of the graft was similar to that of normal dermis two weeks after implantation of ADM DAB × 400

术后 24 周, 镜下难以区分植入的 ADM 与宿主组织, 两种复合移植的活检标本与单纯中厚皮移植的标本, 从胶原纤维排列、细胞种类、细胞数目、血管分布等方面均没有差别; 单纯刃厚皮移植的活检标本镜下见胶原纤维非常致密, 细胞成分进一步减少, 基本上与瘢痕组织镜下观察的结构一致。

讨 论

国内外研究表明, 同种异体 ADM 可以在受皮区内长期存在, 且在改善受皮区的外观、减少创面收缩等方面起到积极作用^[8,9]。异种 ADM 与自体表皮复合移植同样可以起到较好的真皮支架作用, 但需二步法移植才可取得较高植皮成活率^[10], 对异种 ADM 移植未作对比观察。

本研究表明, 用高渗盐水、胰蛋白酶、SDS 为主要试剂制备的 ADM, 不但能达到完全脱细胞的目的, 而且具有方法简单、成本低廉及低毒等优点。另外两种 ADM 具有相似的结构: 来源于人和猪的两种 ADM 均为胶原纤维构成的立体网状结构, 具有高度的多孔性及较大的内表面积, 不但利于细胞的长入、粘附, 对营养成分的渗入和代谢产物的排出也有重要作用。它们均不含有细胞成分, 因而具有良好的组织相容性^[4]。两种 ADM 具有相似的生物学作用, 为异种 ADM 在烧创伤领域的临床应用提供了重要的依据。

ADM 的移植方法, 有主张行二步法移植术者。

即在创面上先移植 ADM, 经 2 周或更长的时间, ADM 已有明显的血管再生后, 在其表面移植自体表皮, 并认为二步法表皮成活率明显高于一步法^[10,11]。本研究结果表明, 在新鲜创面上行一步法复合移植, 自体表皮存活率高达 90%。肉芽作为一种组织修复形式, 在局部循环不佳或有感染的情况下很可能向瘢痕转化, 所以 ADM 对创基的条件要求较严。本研究中有个别复合皮移植区因发生感染而呈瘢痕愈合。因此笔者认为移植方法的选择, 应视创面的具体情况而定, 对于清洁的创面可以采取一步移植, 否则采用二步移植可能更为安全。同时还应注意以下几点: (1) 创基止血一定要彻底。本研究中曾有 1 块受皮区因创基产生血肿致使近一半的复合皮发生干性坏死。一般选用电凝止血, 尽量避免 ADM 与创基间有线头等异物而影响愈合。(2) ADM 植入后皮片四周要适当固定几针, 防止发生移动, 影响其创基细胞及血管长入。(3) ADM 的网孔要合适。因为创基的血管首先从这些网孔长入, 形成所谓的血管蒂, 若网孔太疏可能会影响其愈合。

参 考 文 献

- 1 苏波, 孙家玲, 王文正, 等. 自体表皮细胞培养与异体真皮组合应用研究. 中华创伤杂志, 1995, 11: 140-141.
- 2 Hickerson WL, Comptom C, Fletchall S, et al. Cultured epidermal autografts and allografts combination for permanent burn wound coverage. Burns, 1994, 20: 52-56.
- 3 Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (Allo-Derm) in the management of full thickness burns. Burns, 1995, 21: 243-248.
- 4 贾生贤, 徐惠贞, 廖镇江, 等. 无细胞真皮基质与自体皮复合移植的应用. 上海第二医科大学学报, 1998, 18: 25-29.
- 5 杨敏杰, 潘银根, 谢卫, 等. 异种去细胞真皮支架与自体皮片复合移植的临床应用. 江苏医药杂志, 2000, 26: 99-101.
- 6 Yourtee MD, Tong PT, Rose LA, et al. Effect of spiroorthocarbonate volume modifier comonomers on the in vitro toxicology of trial non-shrinking dental epoxy copolymers. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1994, 86: 347.
- 7 梁卫东, 石应康. 细胞培养法评价生物材料生物相容性研究进展. 生物医学工程杂志, 1999, 16: 86-90.
- 8 贾生贤, 廖镇江, 黄伯高, 等. 无细胞真皮基质与自体皮复合移植愈合过程的观察. 实用美容整形外科杂志, 2000, 11: 136-139.
- 9 孙永华. 脱细胞异体真皮与自体薄皮片移植的研究与应用. 中华整形烧伤外科杂志, 1998, 14: 370.
- 10 冯祥生, 潘银根, 谭家驹, 等. 脱细胞真皮与自体表皮复合移植研究. 中华整形外科杂志, 2000, 16: 40-42.
- 11 Akami Y, Toshitake M. Dispase/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute. Burns, 1996, 22: 182-190.

(收稿日期: 2001-10-12)

(本文编辑: 赵云苟学萍)