

复合皮移植的实验研究与临床应用

陈璧 姜笃银 贾赤宇 汤朝武 姚庆君 韩军涛 刘亚玲 徐明达

【摘要】 目的 寻求一种较理想的真皮替代物,用以修复全厚皮肤缺损创面。方法 (1)将异体/异种脱细胞真皮基质(allo/xeno-ADM) + 自体刃厚皮组成复合皮(CS),以自体刃厚皮作对照,采用一步移植法进行实验研究和临床研究。移植术后应用生物化学及免疫学方法观察移植物抗原性的改变、表皮-真皮连接区(DEJ)基底膜带结构的再形成情况。(2)在此基础上,应用前述 CS 移植技术治疗 53 例全厚皮缺损或瘢痕切除患者,观察术后皮片成活情况并作随访。结果 CS 一步法移植后的成活情况良好。(1)移植后 28 周可见 DEJ 基底膜带重新形成,基底膜细胞呈极性生长并呈波浪形排列,真皮乳头与皮钉再生。allo-ADM 的抗原性明显低于 xeno-ADM,仅在术后早期有少数炎性细胞浸润,未见明显的免疫排斥反应。(2)移植于 53 例患者的 70 块 CS 中,65 块完全存活占 92.9%,2 块因更换敷料不当部分存活,3 块因创面感染移植失败。患者最长随访时间为 8.5 年,所移植的 CS 质地和色泽接近正常皮肤。结论 allo/xeno-ADM 的抗原性很低,移植后能发挥长期的真皮支架或诱导组织再生的真皮“模板”作用。

【关键词】 移植,异种; 移植,同种; 脱细胞真皮基质

Experimental study and clinical application of composite skin grafting CHEN Bi, JIANG Du-yin, JIA Chi-yu, TANG Chao-wu, YAO Qing-jun, HAN Jun-tao, LIU Ya-ling, XU Ming-da. Department of Burns, Plastic Surgery Center, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 P. R. China.

【Abstract】 Objective To explore an ideal skin substitute with its appearance and texture similar to normal skin, to repair wounds with full-thickness skin defect. Methods Composite skin (CS) in question was composed of allo/xenogeneic acellular dermal matrix (ADM) and razor thin autoskin. One step skin grafting was employed in the experimental study and clinical trial. Razor thin autoskin alone was used as the control in the study. Changes in the antigenicity of ADM and the reformation of basement membrane (BM) structure at epidermis-dermis junction (EDJ) of ADMs were studied at designated time points after the grafting with biochemical and immunohistochemical methods. Fifty-three patients with full thickness skin defects due to various causes, including scar excision were grafted with CS, and survival rate and long-term result were observed. Results The grafted CS survived satisfactory. The reformation of the basement membrane structure was clearly observed at the 28th post-graft week. The basement membrane cells grew with polarization in an undulating arrangement. There was reformation of dermal papillae and ridges. The antigenicity of allo-ADM was obviously lower than that of xeno-ADM. Sixty-five out of 70 pieces of CS grafting (92.9%) survived totally, two of them survived partially, and three failed due to infection. The longest follow-up period was 8 and a half years. The grafted CS appeared similar to the normal skin in regard to the texture and color, especially allo-ADM, and no evident rejection reaction was seen. Conclusion ADM possessed very low antigenicity, thus serving a lasting framework after grafting. In addition, it could serve as a “dermal template” for the induction of tissue regeneration.

【Keywords】 Transplantation, homologous; Transplantation, heterologous; Acellular dermal matrix

自体皮源不足是大面积深度烧伤治疗中亟待解决的难题。1984 年笔者将培养的人角质细胞应用于临床,为解决大面积烧伤创面的覆盖问题及瘢痕整形术等提供了表皮,但移植后效果并不理想。1988 年笔者应用胰蛋白酶处理的异体真皮 + 自体刃厚皮进行一步法移植实验,获得 84.6% 的成活率^[1];1995 ~ 2003 年笔者用胰蛋白酶、Triton X-100 和戊二醛交联处理中厚皮片,制成异体/异种脱细胞真皮基质(allo/xeno-ADM)^[2]。本研究中笔者采用

allo/xeno-ADM 和自体刃厚皮组成复合皮(composite skin, CS),采用一步法进行实验和临床研究,以期为真皮替代物的研制和开发提供一种较新方法。

资料与方法

一、allo/xeno-ADM 抗原性的测定

1. 实验研究:选用 25 ~ 30 kg 健康白猪、1.8 ~ 2.2 kg 健康雄性日本大耳白兔(第四军医大学实验动物中心,动物来源下同)。将以上动物的皮肤取成断层中厚皮片,参照文献[2]制成 xeno-ADM 和 allo-ADM,将之分别埋植于大耳白兔双耳及脊背皮下。观察移植术后皮片的组织学结构和抗原性改

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39070822)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院烧伤科

变,具体方法参见文献[3]。

2. 临床研究:以笔者单位收治的烧伤患者为研究对象,患者均知情同意。取 25 ~ 30 kg 健康白猪及人体正常皮肤(外科手术后的剩余皮肤)的断层中厚皮片,制成 xeno-ADM 和 allo-ADM,分别与患者自体刃厚皮组成 CS,移植于其全厚皮肤缺损创面。(1)将术后分离患者、白猪及健康献血者的外周血单个核细胞,分别进行同种/异种混合淋巴细胞培养(allo/xeno-MLC)。观察培养后 1 ~ 6 d 淋巴细胞增殖反应及培养液中白细胞介素(IL)-2、IL-4、干扰素(IFN) γ 水平的变化^[3]。(2)采用免疫组织化学法观察术后移植皮片内的免疫细胞分型情况^[5]。

二、CS 表皮-真皮连接区(DEJ)基底膜带结构再形成的观察

1. 参照文献[6],于 7 ~ 10 kg 健康小白猪背部全厚皮肤缺损创面上,移植由 xeno(异种源猪)-ADM 或 allo-ADM + 自体刃厚皮组成 CS 组。以单纯移植猪自体刃厚皮为对照组。

2. 移植后 24、28、68 周取 CS、自体刃厚皮组的组织标本,于光镜下观察 DEJ 的结构(HE 染色)及一氧化氮合成酶(NOS)周围神经纤维的形态(还原型辅酶 II(NADPH)染色)。

三、CS 的临床应用

1. 1995 年 2 月 ~ 2003 年 8 月,笔者单位应用 CS 治疗 53 例全厚皮肤缺损患者共 70 块创面,患者均知情同意。其中烧伤后切痂和肉芽创面 38 例 49 块,瘢痕切除后创面 14 例 20 块,爆炸伤创面 1 例 1 块。41 例患者的 58 块创面移植 allo-ADM + 自体刃厚皮(allo-ADM-CS 组),12 例患者的 12 块创面移植 xeno(猪)-ADM + 自体刃厚皮(xeno-ADM-CS 组)。皮片面积(8 cm \times 8 cm) ~ (25 cm \times 17 cm)。

2. 观察两组患者移植术后皮片存活情况并作随访。

结 果

一、allo/xeno-ADM 的抗原性

1. allo/xeno-ADM 的组织学结构和抗原性观察:

(1)allo/xeno-ADM 保留了正常的胶原三维结构、基底膜和真皮支架,在组成成分上与自体真皮较接近,生物相容性好。(2)allo-ADM 抗原性较低,移植后存活良好,仅在早期有少数炎性细胞浸润,未见明显免疫排斥反应。xeno-ADM 移植后 5 ~ 12 周,有较多炎性细胞浸润,包括淋巴细胞、单核-巨噬细胞等。

2. MLC: xeno-MLC 后,其淋巴细胞增殖反应和培养 4 d 后的 IL-2、IL-4、IFN- γ 分泌水平明显高于 allo-MLC,具体数据见文献[4]。

3. 移植组织免疫细胞分型情况: xeno-ADM 与 allo-ADM 无明显差异,但前者有较明显的免疫细胞浸润,主要是 CD3⁺/CD4⁺ 和 CD45RO⁺ 细胞。

二、基底膜带结构再形成情况

1. CS 组移植后 28 周,随着微小血管增生情况不同,乳头凸出的深浅和大小不一,有清晰的基底膜带(图 1),真皮乳头和皮钉重新形成。基底细胞呈极性生长和排列,基底膜沿乳头表面呈波浪形排列。对照组移植术后 68 周基底膜仍未形成(图 2)。

2. CS 组神经再生较对照组快,移植后 24 周其结构已接近正常皮肤(图 3)。

三、CS 的临床应用

1. 本组 70 块 CS 移植后,其中 65 块完全成活占 92.9%;2 块因术后 5 d 揭开后未加压包扎而部分成活,占 2.8%;3 块因创面感染移植失败,占 4.3%。

2. 70 块 CS 中,有 3 块 xeno-ADM-CS 移植后早期成活良好,但在术后 3 个月左右出现慢性排斥反应,局部见小片状破溃创面,逐渐连成片。经移植自体皮后创面愈合。

3. 本组患者随访时间为术后 3 个月 ~ 8.5 年,移植部位外形满意,局部皮肤质地柔软、耐磨,有弹



图 1 CS 移植后 28 周基底膜清晰 HE \times 680

Fig 1 Clear basement membrane on 28th week after CS grafting HE \times 680

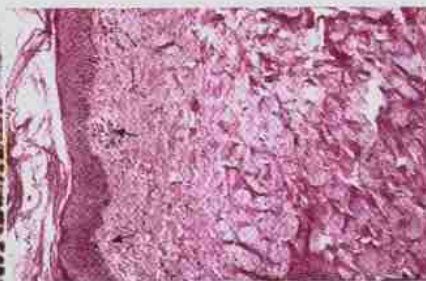


图 2 猪自体刃厚皮移植后 68 周基底膜尚未形成(无) HE \times 680

Fig 2 No basement membrane after porcine razor-thin skin grafting on 68th week after grafting HE \times 680



图 3 CS 移植后 24 周真皮内有神经生长 NADPH \times 1 360

Fig 3 Nerve growth in the dermis of CS on 24th week after grafting NADPH \times 1 360

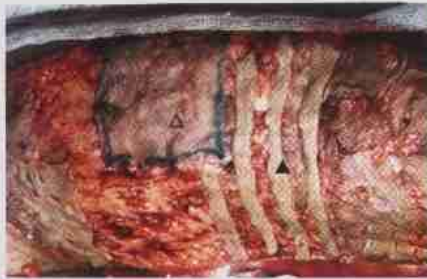


图 4 ADM 上重叠移植患者自体刃厚皮(△);四周采用其他方法植皮(▲)作对比
Fig 4 ADM overlaid with autokin in comparison with other methods around

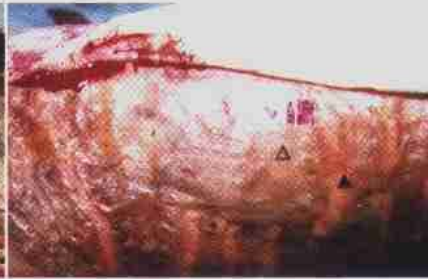


图 5 CS(△)移植后 3 个月色泽、弹性优于其他移植皮片(▲)
Fig 5 Color and elasticity of CS on 3 months after CS grafting



图 6 CS 移植后 8.5 年,色泽、质地接近正常皮肤
Fig 6 Color and texture exhibited similar to normal on Half past 8 years after CS grafting

性,收缩不明显,色泽质地近似正常皮肤,未见瘢痕挛缩现象(图 4~6)。

讨 论

单纯表皮细胞膜片因缺乏真皮成分,移植后易发生感染,其存活率为 50%~80%;细胞膜片脆性较大,愈合后瘢痕挛缩严重,效果差。因真皮在皮肤重建中具有十分重要的作用,它可增强创面移植物的韧性,加速细胞膜的成熟和分化,抑制肉芽生长,减轻移植物收缩与瘢痕形成。角质形成细胞培养技术的成熟加速了 CS 的研究和发展,而 CS 移植中存在的诸多问题,例如怎样改善移植物的性能、增强疗效的稳定性和提高其成活率、消除或明显降低免疫排斥反应、为细胞的锚定提供适当的三维结构位点等,成为当今的研究热点。

目前国外已投放市场可作为 CS 的皮肤替代物有多种,其商品名为 Alloderm、Integra、Biobrane、Trancyte、Apligraf、Dermagraft 等。它们均可归为天然真皮和人工合成真皮替代物,能在其上接种新生儿角质细胞和(或)新生儿成纤维细胞。国外用于临床的皮肤替代物以 Integra 为代表。它由经交联处理的牛胶原和氨基葡聚糖类、6-硫酸软骨素组成,厚约 2 mm,为多微孔隙(孔径 70~200 μm)的可降解支架,引导血管内皮细胞和成纤维细胞长入其间;移植后平均存活率为 85%,瘢痕少、挛缩轻,但需二次手术、易感染、价格昂贵。天然真皮替代物 Alloderm 为人脱细胞真皮基质(ADM),抗原性低,且有迅速血管化和抗感染力较强的优点^[7]。Daniel 等^[8]将人表皮细胞分别培养在 ADM 和胶原凝胶上然后移植于裸鼠皮肤创面,观察到虽然两者都能形成分化良好的上皮,但 ADM 能够促进形成正常皮肤的网状嵴,并可促使黑色素细胞增殖;胶原凝胶不但没有上述表现,还可引起表皮细胞的过度增生。由此说明构建 CS 的真皮替代物的种类能够影响移植后

的效果。本研究资料表明,笔者单位研制的 ADM 具有可靠的引导组织和血管迅速再生的特点,这对于乳头结构的形成和成熟有决定性作用。极性生长的基底细胞及其基底膜呈波浪形排列是重新形成 DEJ 的基础。CS 组的神经再生速度较对照组快,各项免疫学指标显示移植后 ADM 抗原强度较移植前均有不同程度下降,尤以 allo-ADM 为明显。CS 的优点在于它具有低抗原性,可快速血管化,并能作为表皮移植的载体或稳定的支架,其中抗原性低是确保其质量的重要条件。

杨敏杰等^[9]曾采用两步法将网状 xeno-ADM 与自体皮片复合移植于 32 例深度烧伤患者的切削创面,其中 28 例获得成功占 87.5%。冯祥生^[10]采用 xeno(猪)-ADM 与自体刃厚皮一步法移植修复皮肤损伤 23 例,成活率为(60.0±3.4)%。笔者在动物实验和临床应用中均采用一步法移植,除 1988 年动物实验采用一步法移植成活率为 84.6%外,临床应用的 53 例 70 块 CS 中,移植成活率>92.9%,其中 65 块完全存活,说明采用一步法移植行之有效。笔者建议,在术中要注意正确处理创基:彻底刮除肉芽创面并反复清洗使细菌减至最少;若为瘢痕组织则应彻底切除,使创基为正常组织。移植时应妥善固定 ADM 四周,使其紧贴于创面,其上再移植自体刃厚皮,然后打包包扎(此时若自体皮片薄如蝉翼,成活后效果更好)。如为感染创面,可在术后 5~7 d 揭视,换药后再行加压包扎。如创面无感染,首次揭视创面时间应>术后 2 周——这是因为 CS 的存活与一般皮片的存活过程不完全一致,后者只需要与创基建立血运,而 CS 除与创基建立血运外,还需要重组 DEJ 的基底膜带,故移植后需等较长的时间方能首次揭视。本组随访 8.5 年的病例表明,ADM 能发挥长久性真皮支架或引导组织再生的真皮“模板”作用。

参 考 文 献

- 1 陈璧, 汤朝武, 龚熙, 等. 复合皮移植的实验研究. 中华实验外科杂志, 1990, 7: 29 - 30.
- 2 姜笃银, 陈璧, 贾赤宇, 等. 戊二醛交联的异种/异体脱细胞真皮基质的制作及临床应用观察. 第四军医大学学报, 1999, 20: 371 - 374.
- 3 姜笃银, 陈璧, 贾赤宇, 等. 异种脱细胞真皮基质抗原性的实验研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 155 - 158.
- 4 姜笃银, 陈璧, 汤朝武, 等. 猪与人致敏的淋巴细胞混合培养及其细胞因子检测. 西北国防医学杂志, 2002, 23: 90 - 93.
- 5 姜笃银, 陈璧, 胡大海, 等. 活化的人淋巴细胞与不同猪真皮共同培养的免疫反应特征. 中国临床康复, 2002, 6: 1432 - 1433.
- 6 姜笃银, 陈璧, 史颖辉, 等. 复合皮真皮-表皮连接区结构再生与功能重建. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16: 397 - 400.
- 7 Wainwright D, Madden M, Luterman A, et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full thickness burns. J burn Care Rehabil, 1996, 18: 147 - 155.
- 8 Daniel A, Sabine A, Maura E, et al. Differences in dermal analogs influence subsequent pigmentation, epidermal differentiation, basement membrane, and rete ridge formation of transplanted composite skin grafts. Transplantation (Baltimore), 1997, 64: 454 - 465.
- 9 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. 江苏医学杂志, 2000, 26: 99 - 101.
- 10 冯祥生. 异种(猪)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.

(收稿日期: 2003 - 09 - 01)

(本文编辑: 莫 愚 罗 勤)

· 经验交流 ·

治疗重症眼烧伤 14 例

朱志军 许庆建 王野 邱明昕 徐国士

重症眼烧伤往往同时存在眼睑和眼球组织严重烧伤。2001 年 1 月 ~ 2003 年 12 月, 笔者单位收治重症眼烧伤患者 14 例, 经采用“眼内外伤兼治、局部治疗与全身治疗相结合”的综合措施, 疗效满意。

临床资料: 本组患者中男 12 例、女 2 例, 年龄 18 ~ 45 岁。化学烧伤 7 例(酸烧伤 6 例、碱烧伤 1 例), 铁水烧伤 5 例, 火焰烧伤 2 例。烧伤总面积(20.1 ± 5.3)% TBSA。共 26 只眼受损, 参照 1982 年眼外伤与职业性眼病协作小组通过的分度标准^[1]诊断: 眼睑 III ~ IV 度烧伤 26 只眼; 角膜 I 度烧伤 2 只眼、II 度 7 只眼、III 度 13 只眼、IV 度 4 只眼。伤后 7 d 内入院 12 例, 7 d 后入院 2 例。

治疗: 患者入院后立即用大量无菌等渗盐水冲洗眼部。早期入院者眼睑创面行切痂术, 后期入院者眼睑肉芽创面行清创术。随后创面均移植超量皮片^[2], 不做睑缘粘连。眼内创面清创后应用止痛、扩瞳药物及抗生素、皮质激素等。其中角膜 III ~ IV 度烧伤的部分患者, 早期用低温储备的健康人羊膜覆盖角膜创面, 待其 I 期愈合后, 限期行角膜移植或眼睑瘢痕修整术。全身治疗: 静脉滴注哌拉西林/他巴唑坦 3.375 g, 2 次/d; 静脉滴注地塞米松 10 mg, 1 次/d, 均连用 1 周。皮下注射重组人生长激素(批号: 20001125-1、20020728-1 等, 长春金赛药业有限责任公司)9 U, 1 次/d, 连用 2 周。

结果: 眼睑植皮术后, 伤后 7 d 内入院的 12 例患者中仅 2 例因睑外翻需 II 期修整, 而 7 d 后入院的 2 例患者均需 II 期修整。角膜 I ~ II 度烧伤的 9 只眼经综合治疗后均痊愈, 视力恢复良好。角膜 III ~ IV 度烧伤的 17 只眼中, 15 只眼早期行羊膜覆盖术, 其中 10 只眼视力恢复良好; 另外 5 只眼出现明显角膜白斑或混浊, 其中 4 只经行角膜移植术, 视力恢

复良好, 1 只未作进一步治疗。另有 2 只角膜 III ~ IV 度烧伤的患眼未行羊膜覆盖术, 结果 1 只失明, 1 只因全眼球炎而被摘除。

讨论 重症眼烧伤强调早期、综合治疗, 要有整体观念, 内外兼治。眼睑植皮时建议采用超量皮片, 即皮片面积 > 正常眼睑面积, 不做睑缘粘连, 这样既可防止眼睑挛缩外翻, 又便于对眼内创面进行观察和处理^[2]。而及时处理眼内创面, 能减少感染性分泌物污染眼睑创面, 利于创面愈合。本组资料显示, 伤后早期眼睑切痂植皮效果明显优于后期肉芽创面清创植皮。此因早期切痂可以阻止眼睑淤滞区发展为凝固区, 减轻创伤和瘢痕增生, 减少感染机会。上眼睑植皮宜用中厚皮片, 利于眼睑运动; 下眼睑宜用全厚皮片, 以保持适当支持力。

局部治疗眼球烧伤的同时, 应积极进行全身治疗, 强调应用皮质激素和生长激素^[3]。前者可抑制炎症反应, 预防溃疡形成; 后者可促进上皮生长, 缩短修复过程。两者联用可以减少眼球伤后并发症, 减轻瘢痕增生。角膜深度烧伤后早期建议用羊膜覆盖^[4], 以保护创面, 控制炎症, 促进上皮化, 防止出现角膜溃疡及穿孔, 抑制纤维组织增生及新生血管形成, 减轻眼球组织瘢痕增生, 有利于眼表组织功能重建和眼球的保留。

参 考 文 献

- 1 李凤鸣, 主编. 眼科全书. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 3360 - 3361.
- 2 王伟, 主编. 整形外科学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999. 634.
- 3 韩春茂, 姚玉峰, 余朝恒. 眼烧伤的激素治疗. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 330 - 332.
- 4 潘栋平, 李学喜, 徐建锋. 羊膜移植治疗眼烧伤疗效的观察. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17: 318 - 320.

(收稿日期: 2004 - 01 - 08)

(本文编辑: 罗 勤)

作者单位: 266011 青岛市立医院烧伤整形科