

NaOH消蚀法制备脱细胞真皮基质修补腹壁疝**

王 军¹, 张宝良¹, 袁庆鑫¹, 米立国²

Acellular dermal matrix prepared by NaOH-maceration for ventral hernia repair

Wang Jun¹, Zhang Bao-liang¹, Yuan Qing-xin¹, Mi Li-guo²

Abstract

BACKGROUND: The use of an acellular dermal matrix (ADM) may represent a new alternative to prosthetic mesh products.

OBJECTIVE: To study the value of porcine ADM made by NaOH-maceration as ventral hernia-repairing material.

METHODS: ADM was made from the full thick skin of the back of swines by NaOH-maceration. Forty-five male SD rats were randomly divided into three groups including ventral hernia group ($n=7$), ADM group (the ventral hernia repaired by 3.5 cm \times 4.0 cm ADM, $n=28$) and Marlex mesh group (the ventral hernia repaired by 3.5 cm \times 4.0 cm Marlex mesh, $n=10$). The occurrence of ventral hernia was observed postoperatively 1 week. To evaluate ADM histology, 4 rats in ADM group were sacrificed at 1, 2, 3, 5 and 10 weeks after surgery respectively; 6 rats were respectively selected from the Marlex group and ADM group for the experiment of tension resistance at 5 weeks after surgery.

RESULTS AND CONCLUSION: The occurrence of ventral hernia in ADM group and Marlex mesh group was significantly lower than that of ventral hernia group 1 week after surgery ($P < 0.001$), but there was no difference between ADM group and Marlex mesh group ($P > 0.05$). The collagen of ADM did not change much after implantation. ADMs became infiltrated with little fibroblasts by 1 week after surgery. New vessels in ADMs were found by 2 weeks after surgery. The vessel density of ADMs kept stable by 5 weeks after surgery. The Marlex had a significantly higher breaking strength than that of the ADM ($P < 0.001$). But 5 weeks after surgery, the tension resistance of ADM-fascial interface was higher than that of the Marlex-fascial interface ($P < 0.05$). ADM prepared by the maceration of NaOH can be used as the material repairing ventral hernia.

Wang J, Zhang BL, Yuan QX, Mi LG. Acellular dermal matrix prepared by NaOH-maceration for ventral hernia repair. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(25):4579-4582. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 与其他疝修补材料相比, 脱细胞真皮基质具有易血管化、抗感染、从而可用替代传统补片用于感染腹壁缺损重建等特点。

目的: 观察NaOH消蚀法制备的脱细胞真皮基质作为修补材料应用于腹疝的应用价值。

方法: 以全厚猪皮制成脱细胞真皮基质, 45只SD雄性大鼠制备腹壁疝模型, 随机数字表法分为腹壁疝组: 直接缝合皮肤, Marlex网组和脱细胞真皮基质组: 分别应用大小为3.5 cm \times 4.0 cm的Marlex网和脱细胞真皮基质缝合皮肤; 观察修复后1周时有无腹壁疝发生, 脱细胞真皮基质组修复后1, 2, 3, 5, 10周分别取材, 其中每周各组取4只用于苏木精-伊红染色, 光镜观察。修复后第5周Marlex网组和脱细胞真皮基质组各取6只用于抗张力试验。

结果与结论: 术后1周脱细胞真皮基质组与Marlex网组腹壁疝发生率均显著低于腹壁疝组($P < 0.001$)。脱细胞真皮基质的胶原纤维无明显变化, 即有少量成纤维细胞植入, 术后2周可见新生血管, 术后5周脱细胞真皮基质内部血管密度基本稳定。将单独脱细胞真皮基质片与Marlex网行抗张力试验, Marlex网的抗张力显著高于脱细胞真皮基质($P < 0.001$)。但植入体内5周后, 脱细胞真皮基质筋膜组织的抗张力高于Marlex-筋膜组织($P < 0.05$)。提示复合消蚀制备的脱细胞真皮基质可以作为良好的疝修补材料。

关键词: 脱细胞真皮基质; 脱细胞真皮基质-筋膜组织; 疝; 修补材料; NaOH消蚀法; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.25.006

王军, 张宝良, 袁庆鑫, 米立国. NaOH消蚀法制备脱细胞真皮基质修补腹壁疝[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(25):4579-4582. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)是利用异种或同种异体皮肤, 经脱细胞处理, 去掉表皮和真皮的细胞成分, 保留下免疫抗原性低的真皮细胞外基质而制成, 是近十年国内外兴起的一种新型组织代替物。课题组研发了NaOH消蚀法制备ADM, 并发现其韧性和抗牵拉力均强于其他方法所制备的ADM^[1-2], 因此实验采用大鼠腹壁疝模型以观察其作为腹壁

疝修补材料的应用价值。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2007-08/2008-05在河北医科大学基础医学院完成。

材料: 选用质量约250 g的成年雄性SD大鼠45只, 由河北医科大学实验动物中心提供, 分笼饲养, 遵循实验动物使用及管理原则。随机数字表法分为腹壁疝组($n=7$)、Marlex网组

¹Department of General Surgery, Tangshan Workers' Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China; ²Department of Anatomy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Wang Jun★, Master, Associate chief physician, Department of General Surgery, Tangshan Workers' Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China junw1971@yahoo.cn

Correspondence to: Mi Li-guo, Professor, Department of Anatomy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Supported by: Science and Technology Foundation of Hebei Health Bureau, No. 04106*

Received: 2011-01-06 Accepted: 2011-05-04

¹ 河北医科大学附属医院唐山工人医院普通外科, 河北省唐山市 063000; ² 河北医科大学解剖学教研室, 河北省石家庄市 050017

王军★, 男, 1971年生, 河北省唐山市人, 汉族, 2008年河北医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事普通外科临床工作。junw1971@yahoo.cn

通讯作者: 米立国, 教授, 河北医科大学解剖学教研室, 河北省石家庄市 050017

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)25-04579-04

收稿日期: 2011-01-06
修回日期: 2011-05-04
(20110106024/WL-W)

($n=10$)和ADM组($n=28$)。取猪背部全厚皮肤, NaOH 消蚀法制备ADM^[1-2]。Marlex网来自美国巴德公司。

实验方法:

动物模型制作: 术前大鼠禁食12 h, 不禁水。供体用4%水合氯醛溶液7.5 mL/kg腹腔内注射, 麻醉成功后仰卧固定于手术台上, 腹部剪毛, 腹正中切口去除约2.5 cm ×3.0 cm大小的腹壁肌层、筋膜及腹膜(Marlex网组保留腹膜)。腹壁疝组直接缝合皮肤; Marlex网组和ADM组分别应用大小为3.5 cm×4.0 cm的Marlex网和ADM片, 用0号丝线间断缝合于腹肌上, 使补片和腹肌缺损边缘之间有0.5 cm重叠, 缝合皮肤。

指标检测: 观察术后1周时腹壁疝的发生情况。

病理组织学检测: ADM组术后1, 2, 3, 5, 10周各取4只大鼠处死取材, 观察ADM片的大体形态及中间部位组织学改变, 行常规苏木精-伊红染色, 并在200倍镜下随机选取4个视野, 计数细胞及新生血管。

抗张力试验: 单独ADM片与Marlex网抗张力试验: 将ADM片与Marlex网裁剪成2 cm×3 cm大小的平片, 置于夹持器上, 以50 mm/min拉伸, 记录拉至补片完全断裂时所用的力。术后第5周Marlex网组和ADM组各取6只大鼠处死, 修剪补片中心部组织剪成2 cm×3 cm大小, 检测Marlex网和ADM片的抗张力。

主要观察指标: 术后1周腹壁疝发生情况、ADM-筋膜的外形、组织学改变及抗张力。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入SD大鼠45只, 均进入结果分析, 无脱落。

2.2 术后1周腹壁疝发生情况 术后1周时, 腹壁疝组腹壁疝发生率100%(7/7), ADM组腹壁疝发生率0.04%(1/28), Marlex网组腹壁疝发生率0(0/10), ADM组与Marlex网组腹壁疝发生率均显著低于腹壁疝组($P < 0.001$), ADM组与Marlex网组差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 术后ADM-筋膜的外形及组织学改变 术后1周ADM外形和颜色无明显改变, 皮肤面有增生的结缔组织, 腹腔面与腹腔脏器间无粘连, 与周围腹壁组织愈合良好, 此时的ADM与大鼠的自身增生组织融为一体, 称为ADM-筋膜; 术后2周和3周时, ADM-筋膜的皮肤面可见明显的血管爬行, 脏面光滑, 已浆膜化。术后5, 10周时, ADM-筋膜质地稍软, 脏面可见明显的血管爬行。

术后1周时, ADM的纤维结构无改变。ADM的内部细胞较少, 在200倍光镜下10~12个/视野, 成纤维细胞1~2个/视野, 未能观察到新生血管。术后2周时, ADM的内部细胞成分增多至70~80个/视野。并出现较多光镜下可辨的新生血管, ADM的纤维结构无明显改变。术后3周时, ADM内部细胞分布较均匀, 成纤维细胞所占比例增加, 可见岛状分布的细胞密集区, 为炎性浸润灶, 新生血管较多, 管腔明显。纤维结构无明显改变。术后5周时, ADM中的细胞和新生血管与第3周接近, 平均每个视野可观察到约70个细胞, 3个血管断面, 岛状分布的细胞密集区消失, 胶原纤维结构正常。术后10周时, ADM中的细胞数目平均50~60个/视野, 多数为纤维细胞。血管与5周时近似, 胶原纤维结构无明显变化, 见图1。

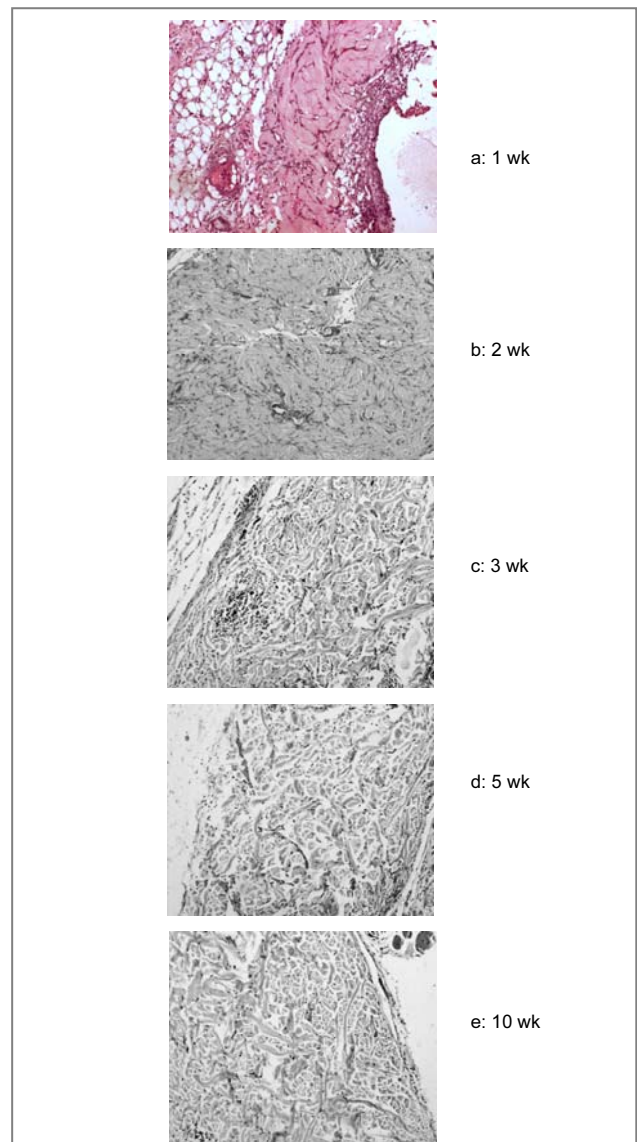


Figure 1 Postoperative histological changes of acellular dermal matrix-fascial (Hematoxylin-eosin staining, ×200)
图1 术后不同时间ADM-筋膜的组学改变(苏木精-伊红染色, ×200)

2.4 抗张力试验结果 将单独ADM片与Marlex网行抗张力试验发现: Marlex网的抗张力高于ADM[(416.6±43.8), (110.6±27.2) N, $P < 0.001$]. 但植入体内5周后, ADM筋膜组织的抗张力高于Marlex-筋膜组织[(103.2±27.4), (70.8±19.4) N, $P < 0.05$].

3 讨论

自1986年Lichtenstein提倡的“无张力疝修补”概念以来, 传统的单纯缝合已逐渐被疝修补材料植入所取代, 在许多国家已经成为标准的治疗方案^[3].

现在广泛用于临床的以聚丙烯为基础的人工合成大分子材料植入体内后炎症反应重, 可能发生肠粘连、肠瘘等并发症, 另外患者往往有较明显的异物感和术后疼痛^[4]. 尤其是免疫力低下的患者(如HIV感染者, 器官移植患者), 人工合成材料修补腹疝被视为禁忌. 所以生物材料作为良好的疝修补材料越来越受到人们的重视. 与其他疝修补材料相比较, ADM主要具有易血管化、抗感染、从而可用替代传统补片用于感染腹壁缺损重建等特点^[5-8].

异体或异种真皮的免疫源性主要是由于供体皮肤的细胞成分所激发免疫反应^[9]. ADM作为一种异体真皮基质, 细胞成分及I、II型细胞相容性抗原已被完全清除, 免疫活性很低, 不会诱发对异体组织移植所产生的特异性细胞免疫反应即排异反应, 亦不会诱发非特异性异物反应^[10-11]. 而本实验室前期的实验表明, 在NaOH消蚀法制备的ADM植入皮下后一两周即可观察到宿主细胞迁入ADM^[10]. 实验在植入后1周复合消化制备的ADM中同样观察到少量的宿主细胞迁入. 术后5周时植入的ADM内可见较多的宿主细胞以成纤维细胞为主, 新生的成纤维细胞便可合成自体胶原, 以及微血管形成, 而且ADM与宿主腹壁组织之间呈现融和现象. 表明实验所制备的ADM具有免疫原性低, 组织相容性好的特点.

ADM中保留了基底膜复合物, 形成基底膜与真皮两面, 真皮面有利于ADM的快速血管化, 另外基底膜的存在, 非常有利于表皮细胞生长增殖与分化^[12]. ADM与正常腹壁组织的愈合过程非常复杂, 首先是炎性细胞浸润期, 随后是ADM相邻组织中的成纤维细胞增生并迁入ADM, ADM相邻组织中的血管芽增生并迁入ADM, ADM血管化; 最后ADM补片经历再塑达到愈合. 其中ADM的血管化对ADM补片很重要, 因为只有血管化的ADM才能为补片的存活提供足够的氧和营养物质, 才能使植入的ADM存活. 实验结果显示, 腹疝修补术后2周时即可以在苏木精-伊红染色的ADM组织切片中观察到管腔明显的新生血管, 术后3周时, ADM内的血管化程度最高, 和Eppley^[9]报道复合皮肤移植中的

结果一致. 术后5周ADM内部的血管密度基本稳定.

实验结果表明, ADM的抗张力与其制备方法有直接的关系, 高渗盐水-SDS法所制备的ADM抗张力远弱于NaOH消蚀法所制备的ADM, 但单纯NaOH消蚀所制备的ADM质地较僵硬, 不利于手术操作, 而实验制备ADM的另一特点是具有较高的抗张力和良好的柔韧性, 易于修剪. 这与ADM中保留皮肤中原有胶原纤维结构的完整性有关. 实验制备的ADM在大鼠腹疝修复后10周时, 其纤维结构仍保持较为完整, 经拉力实验表明, 术后5周, ADM-筋膜的抗张力高于Marlex网-筋膜. 与文献报道相似^[13]. 上述表明, ADM移植体内后, 其纤维的降解较弱, 稳定性较好.

ADM作为皮肤替代物首次于1992年应用于严重烧伤患者, 随后频繁应用于软组织缺损, 肿瘤切除后组织修补、整形外科、口腔外科、疝外科等领域, 并获得良好效果^[14-18]. 与人相比, 猪ADM具有来源广泛, 成本低廉等优点. 实验从动物实验方面证实SDS和NAOH复合消蚀法制备的猪ADM可以作为疝修补良好的生物学材料.

综上所述, ADM可以应用SDS和NaOH复合消蚀法制备, 此法可以完全去除真皮中的细胞成分, 并且ADM的韧性好, 质地柔软, 具有较好的抗张力作用; 植入机体体内后, 经血管化, 宿主细胞植入, 胶原纤维的再塑, 与机体形成稳定的愈合, 并保持稳定的抗张力性, 可作为良好的疝修补材料. 但是, 不同制备方法的ADM使用后其纤维化及炎性细胞浸润程度不一, 以及使用ADM修补腹壁疝后复发率较高, 仍需进一步研究及探讨^[19-20].

4 参考文献

- [1] Sun H, Che PC, Wang XL, et al. Jiepouxue Zazhi. 2003;26(2):172-174.
孙红, 车鹏程, 王学礼, 等. 一种新型无细胞真皮基质的研制[J]. 解剖学杂志, 2003, 26(2): 172-174.
- [2] Xia JC, Mi LG, Gao Y, et al. Zhongguo Linchuang Jiepouxue Zazhi. 2005;23(4):409-412.
夏建春, 米立国, 高英, 等. NaOH消蚀法制备胎儿脱细胞真皮基质的研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2005, 23(4): 409-412.
- [3] Amid PK. Lichtenstein tension-free hernioplasty: its inception, evolution, and principles. Hernia. 2004;8(1):1-7.
- [4] Jezupovs A, Mihelons M. The analysis of infection after polypropylene mesh repair of abdominal wall hernia. World J Surg. 2006;30(12):2270-2278.
- [5] Unemori EN, Lewis M, Constant J, et al. Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites. Wound Repair Regen. 2000;8(5):361-370.
- [6] Patton JH Jr, Berry S, Kralovich KA. Use of human acellular dermal matrix in complex and contaminated abdominal wall reconstructions. Am J Surg. 2007;193(3):360-363.
- [7] Winkler AA, Milburn ML, Holton LH 3rd, et al. Effect of suture material on tensile strength and complication rate in abdominal fascial defects repaired with acellular dermal matrix. Hernia. 2008;12(1):33-38.
- [8] Kim H, Bruen K, Vargo D. Acellular dermal matrix in the management of high-risk abdominal wall defects. Am J Surg. 2006;192(6):705-709.
- [9] Eppley BL. Experimental assessment of the revascularization of acellular human dermis for soft-tissue augmentation. Plast Reconstr Surg. 2001;107(3):757-762.

- [10] Takami Y, Matsuda T, Yoshitake M, et al. Dispase/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute. *Burns*. 1996; 22(3): 182-190.
- [11] Li FF, Mi LG. Dalian Yike Daxue Xuebao. 2009;31(1):18-22. 李菲菲, 米立国. VEGF165对脱细胞真皮基质血管化影响的研究[J]. 大连医科大学学报, 2009, 31(1): 18-22.
- [12] Silverman RP, Li EN, Holton LH 3rd, et al. Ventral hernia repair using allogenic acellular dermal matrix in a swine model. *Hernia*. 2004;8(4):336-342.
- [13] Menon NG, Rodriguez ED, Byrnes CK, et al. Revascularization of human acellular dermis in full-thickness abdominal wall reconstruction in the rabbit model. *Ann Plast Surg*. 2003;50(5): 523-527.
- [14] Lorenz RR, Dean RL, Hurley DB, et al. Endoscopic reconstruction of anterior and middle cranial fossa defects using acellular dermal allograft. *Laryngoscope*. 2003;113(3):496-501.
- [15] Liu FD, Li JY, Zhu YH, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi*. 2010;24(10):1253-1256. 刘飞德, 李基业, 朱瑛梅, 等. 异体脱细胞真皮基质修补31例腹壁疝及缺损[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(10): 1253-1256.
- [16] Cai HX, Pan CW, Li JS, et al. *Zhonghua Shiyuan Waike Zazhi*. 2010;27(9):1333-1334. 蔡华雄, 潘朝武, 李劲松, 等. 异体脱细胞真皮基质修复黏膜缺损的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(9): 1333-1334.
- [17] Asham E, Uknis ME, Rastellini C, et al. Acellular dermal matrix provides a good option for abdominal wall closure following small bowel transplantation: a case report. *Transplant Proc*. 2006;38(6): 1770-1771.
- [18] Ghazi B, Deigni O, Yezhelyev M, et al. Current options in the management of complex abdominal wall defects. *Ann Plast Surg*. 2011;66(5):488-492.
- [19] Lee EI, Chike-Obi CJ, Gonzalez P, et al. Abdominal wall repair using human acellular dermal matrix: a follow-up study. *Am J Surg*. 2009;198(5):650-657.
- [20] Faleris JA, Hernandez RM, Wetzel D, et al. In-vivo and in-vitro histological evaluation of two commercially available acellular dermal matrices. *Hernia*. 2011;15(2):147-156.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 河北省卫生厅科研基金(04106)。

作者贡献: 通讯作者进行实验设计, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为第三作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 通讯作者审核, 通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 检索 CNKI 数据库, 检索时间: 建库至 2011-05, 检索关键词“脱细胞真皮基质, 疝修补材料, NaOH 消蚀法”, 未见相关文献, 提示该实验具有一定的先进性。

实验利用课题组自主研发 NaOH 消蚀法制备脱细胞真皮基质, 发现其韧性和抗牵拉力均强于其他方法所制备的脱细胞真皮基质, 进一步研究其作为腹壁疝修补材料的应用价值, 提示复合消蚀制备的脱细胞真皮基质可以作为良好的疝修补材料。

SCI 收录的生物材料类期刊介绍: 本刊发展部

<p>英文刊名: Cellular and Molecular Bioengineering 中文刊名: 《细胞与分子生物工程》 ISSN: 1865-5025 EISSN: 1865-5033 影响因子: 0.727(JCR 2009) 出版周期: 季刊 出版数据: 55 篇/年 创刊年份: 2008 年 出版单位(或出版地): Springer 期刊网址: http://www.springer.com/engineering/biomedical+eng/journal/12195 投稿网址: http://camb.edmgr.com/ 收录数据库: Academic OneFile, Biological Abstracts, BIOSIS, CAS, Chemical Abstracts Service (CAS), EMBASE, Expanded Academic, Google Scholar, Journal Citation Reports/Science Edition, OCLC, Science Citation Index Expanded (SciSearch), SCOPUS, Summon by Serial Solutions 发稿方向: Behaviors of Biomolecules, Behaviors of Cells, Computational Modeling of Molecules and Cells, Experimental Methods for Cellular and Molecular Bioengineering 生物分子的行为、细胞行为、分子和细胞的计算机模型、细胞和分子生物工程的实验方法 相关学科: Related subjects » Biomaterials - Biomedical Engineering - Biophysics & Biological Physics - Cell Biology - Classical Continuum Physics - Mechanics 发稿体例: Editorial, Research, Special Issue</p>	<p>英文简介: A key challenge in improving human health is to understand how cellular behavior arises from molecular-level interactions. The field of Cellular and Molecular Bioengineering seeks to understand, so that we may ultimately control, the mechanical, chemical, and electrical processes of the cell. The aims of this journal are to publish experimental and theoretical studies that advance our understanding of (1) the biomechanics of cells, including their interaction with the extracellular environment, and of biomolecules, including proteins, lipids, polysaccharides, and nucleic acids; (2) the chemical thermodynamics, kinetics, and transport processes associated with biomolecular interactions and cellular processes; and (3) electrical processes that underlie cell behavior. In addition, an overarching aim is to integrate our understanding of mechanical, chemical, and electrical processes to better understand the integrated, systems nature of cellular processes. 中文简介: 《细胞与分子生物工程》杂志了解分子水平上相互作用的细胞行为, 最终控制细胞的机械、化学和电过程。该杂志主要发表实验和理论研究, 以推进我们对细胞生物力学、细胞行为的电过程等的认识。</p>
---	--