

异种脱细胞真皮替代睑板材料重建眼睑的可行性*☆

张向荣¹, 周琼¹, 肖卫², 刘德伍³, 彭燕³

Feasibility of eyelid reconstruction with acellular xenogenic dermal matrix

Zhang Xiang-rong¹, Zhou Qiong¹, Xiao Wei², Liu De-wu³, Peng Yan³

Abstract

BACKGROUND: Reconstruction of posterior lamella of eyelid is an important and difficult issue in eyelid reconstruction, and tarsal substitute is the focus of the study. Xenogenic acellular dermal matrix as a new tissue engineering material, is being widely studied and applied in the field of burn and plastic surgery at home and abroad.

OBJECTIVE: To observe histocompatibility and histopathological changes of xenogenic (porcine) acellular dermal matrix transplantation for eyelid reconstruction in rabbits.

METHODS: Full skin at 20 cm×20 cm was stripped from healthy little white pigs, for preparation of xenogenic (porcine) acellular xenogenic dermal matrix. Model of rabbit tarsal defect was established in 8 New Zealand rabbits, then acellular dermal matrix was implanted.

Samples of implanted materials were collected for histological examination at 1, 2, 3 weeks postoperation under light microscopy.

RESULTS and CONCLUSION: There were no obvious rejection and eyelid deformation observed. One week after implantation, partial inflammatory cells invasion was seen with light microscopy, and the inflammatory cells were reduced noticeably at 2 weeks after implantation, at 3 weeks after implantation, normal fibrous tissue ingrew and gradually split, instead of collagen fibers implanted, the inflammation disappeared. With low immunogenicity, and guidance for the growth of new collagen, the xenogenic acellular dermal matrix may be an ideal material of tarsal substitutes.

Zhang XR, Zhou Q, Xiao W, Liu DW, Peng Y. Feasibility of eyelid reconstruction with acellular xenogenic dermal matrix. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(3):395-398. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 眼睑后层重建是眼睑重建的重点和难点, 其中睑板替代物更是研究的焦点。异种脱细胞真皮作为一种新型的组织工程材料, 在国内外烧伤整形领域, 正得到广泛的研究和应用。

目的: 观察异种(猪)脱细胞真皮植入兔眼睑后的组织相容性及其组织病理学变化。

方法: 剥取健康小白猪全层皮肤 20 cm×20 cm, 制备异种(猪)脱细胞真皮基质。同时制备兔睑板全层缺损模型并植入脱细胞真皮基质, 观察大体情况, 并分别于第 1, 2, 3 周取移植交界处眼睑组织光镜下观察组织学的改变。

结果与结论: 大体观察未见明显排斥反应及眼睑的变形; 光镜下 1 周时可见局部炎症细胞浸润, 2 周时炎症细胞减少, 3 周时正常纤维组织长入, 逐渐分割代替植入的胶原纤维, 炎症反应消失。提示异种脱细胞真皮免疫原性低, 并可引导新生胶原的生长, 是一种良好的睑板替代物。

关键词: 异种脱细胞真皮; 眼睑重建; 组织工程; 材料; 相容性
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.03.004

张向荣, 周琼, 肖卫, 刘德伍, 彭燕. 异种脱细胞真皮替代睑板材料重建眼睑的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(3):395-398. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

眼部外伤、感染、肿瘤切除以及先天性缺损, 均可造成眼睑部分或全部全层缺损, 不仅严重影响外观, 而且很容易引发暴露性角膜溃疡, 影响视力甚至失明。眼睑后层重建是眼睑重建的重点和难点, 其中睑板替代物更是研究的焦点^[1]。

目前, 睑板替代物多为硬腭、鼻中隔软骨、耳郭软骨、健侧睑板等自体组织, 手术复杂、增加患者的痛苦和负担, 同时可能造成供材区并发症^[2-4]。Rubin等^[5]最早使用异种脱细胞真皮移植作为上睑植入物, 取得了满意的组织隔离

效果, Pushpoth等^[6-7]应用异种脱细胞真皮行眼睑原位重建, 取得满意效果。然而异种真皮与异体巩膜、异体硬脑膜这些异体材料均受取材来源限制, 因此, 寻找一种与异种脱细胞真皮效果接近的替代品非常必要。鉴于猪与人有较高的组织同源性, 且具有取材方便、廉价、韧性大、可随意塑形和剪裁、无传播疾病的危险等优点, 近年来, 人们把目光转向了猪真皮制作的异种脱细胞真皮(acellular xenogenic dermal matrix, Xeno-ADM)。目前, Xeno-ADM作为一种新型的组织工程材料, 在国内外烧伤整形、头颈外科等领域, 正得到广泛的研究和应用, 且被证明术后无明显的免疫排斥反应, 有望取代异体真皮^[8-11]。

¹Department of Ophthalmology,
³Department of Burns, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China;
²Department of Ophthalmology, Zhangcha Hospital in Chancheng District of Foshan, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Zhang Xiang-rong ☆, Doctor, Chief physician, Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China zhangxiangrong924@126.com

Supported by: Science and Technology Plan of Jiangxi Provincial Health Bureau, No. 20071033*

Received: 2010-07-28 Accepted: 2010-08-29

南昌大学第一附属医院,¹眼科,
³烧伤研究所, 江西省南昌市 330006; ²佛山市禅城区张槎医院眼科, 广东省佛山市 528000

张向荣 ☆, 女, 1972 年生, 江西省湖口县人, 汉族。博士, 主任医师, 主要从事眼外伤眼整形眼眶病、组织工程的基础及临床研究。 Zhangxiangrong 924@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)03-00395-04

收稿日期: 2010-07-28
修回日期: 2010-08-29
(20100728005/D·Y)

实验应用Xeno-ADM作为睑板替代物植入缺损睑板的兔眼睑中, 观察大体和组织学方面的变化, 探讨Xeno-ADM作为睑板替代物用于眼睑重建的可行性。

1 对象和方法

设计: 动物体内实验。

时间及地点: 于2009-01/05在南昌大学第一附属医院烧伤研究所完成。

材料: 健康小白猪2只, 3个月大, 雄性, 体质量25 kg, 由南昌大学医学院动物科学部提供, 实验动物许可证号江西医动证字第01214-01号, 普通级。健康成年新西兰大白兔18只, 4个月大, 雌雄不限, 体质量2.0~3.0 kg, 由南昌大学医学院动物科学部提供, 动物质量合格证号江西医动证字第02196-02号, SPF级, 外眼检查无异常。实验过程中对动物处置符合科学技术部2006年《关于善待实验动物的指导性意见》的要求^[12]。

方法:

Xeno-ADM制作: 将小白猪处死后剃毛洗净皮肤, 剥取20 cm×20 cm全层皮肤, 剪去皮下脂肪后在0.1%新洁尔灭液内浸泡15 min, 无菌生理盐水冲洗, 取皮鼓反向取皮, 去除含猪表皮面约0.3 mm厚的皮片, 将余下的猪真皮, 再用取皮鼓于近表皮面取约0.4 mm厚断层皮片, 将皮片置于0.25% Trypsin-0.02% EDTA消化液(美国Gibco公司)中, 4 °C 孵育48 h后, 轻轻揭掉表皮, PBS冲洗3遍; 置入0.5%的曲拉通X-100溶液中, 在25 °C左右摇摆48 h, 80 次/min, 使真皮中细胞完全脱净。以含庆大及青霉素的PBS反复清洗至曲拉通无残留; 取部分标本做组织学和扫描电镜观察, 观察脱细胞真皮基质的颜色、结构、空隙分布、细胞残留情况。制备好的脱细胞真皮基质置PBS中, 4 °C 保存备用。

Xeno-ADM基质微生物学监测: 脱细胞真皮基质制备结束后, 取标本置37 °C营养肉汤(上海欧韦达仪器科技有限公司)中培养24 h, 取肉汤样本于血琼脂平板上划线, 37 °C培养24, 48 h观察有无细菌污染, 同时取储存液作微生物学监测。

兔睑板全层缺损模型的制备: 新西兰大白兔常规消毒铺巾, 结膜囊滴爱尔卡因表面麻醉, 用1:1 000升汞和生理盐水洗眼, 氯胺酮100 mg/kg肌肉注射麻醉。下眼睑用1%利多卡因及1:100 000肾上腺素行局部浸润麻醉, 距睑缘2 mm平行睑缘切开睑结膜长12 mm。向下分离结膜, 游离出睑板, 全层切除中央睑板10 mm×5 mm, 植入睑板替代物(Xeno-ADM), 大小为10 mm×5 mm。植入前先将供体浸于庆大霉素溶液中5 min, 植片与残存睑板用4-0丝线间断缝合, 将结膜分离后移行覆盖于植片表面, 用4-0丝线间断缝合固定。结膜下注射庆大霉素5 kU, 局部涂金霉素眼膏。肌肉注射庆大霉

素 2×10^4 U至术后第3天。术后第1天开始用复方硫酸新霉素滴眼液点眼, 3次/d, 连续3周。术后每日观察眼睑结膜切口情况, 有无植片暴露, 排出, 感染及角膜情况, 有无睑球粘连, 下穹隆缩窄; 观察眼球运动。每周拍照1次。术后1, 2, 3周取带植片的眼睑, 10%甲醛溶液固定行苏木精-伊红染色染色, 在光镜下行组织学观察。

主要观察指标: ①制备的Xeno-ADM基质的物理特性、组织学特点及微生物学检测。②移植术后大体情况观察。③移植后组织学观察。

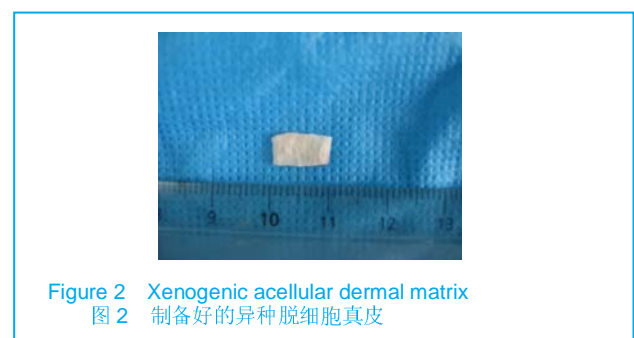
2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入实验动物兔数量18只, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 大体观察 植入供体后兔眼睑结膜光滑, 眼睑厚度、外形无改变, 植片平整在位, 见图1a。植入后第1~3天, 兔睑结膜充血水肿明显, 分泌物多, 植入后第4天开始兔睑结膜充血水肿明显消退, 分泌物减少, 1周后结膜无明显充血水肿, 结膜切口愈合可, 3周后眼睑形状可, 未见睑缘切迹、睑球粘连形成, 角膜染色阴性。均无植入物排斥和暴露现象, 见图1b。植入后第4周时触摸兔眼右下睑发现可感觉到柔韧的眼睑后层。



2.3 异种(猪)脱细胞真皮基质的物理特性及组织学特点 制备好的脱细胞真皮基质呈瓷白色, 质地柔软有弹性, 韧性好, 易于塑形, 便于手术操作(图2)。

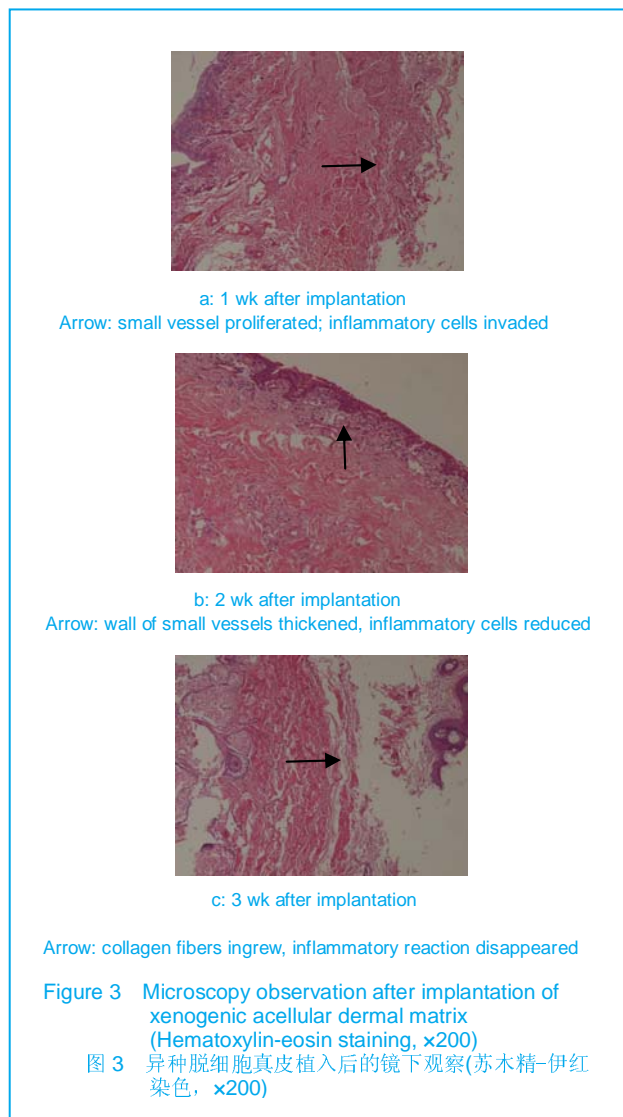


苏木精-伊红染色证实无表皮, 真皮内无任何细胞成分、皮肤附件及血管, 可见去除细胞后留下的许多

空隙, 胶原纤维排列规则。

2.4 微生物学检测 所有异种(猪)脱细胞真皮标本及储存液微生物学监测均为阴性。

2.5 病理检查 1周时脱细胞真皮植片交界处部分小血管增生, 炎症细胞浸润, 见图3a。2周时小血管管壁增厚, 炎症细胞减少, 见图3b。3周时无明显血管扩张充血, 正常纤维组织长入, 逐渐分割代替植入的胶原纤维, 炎症反应消失。长入的胶原排列方向与结膜面平行, 而此时可见脱细胞真皮植片自身的胶原组织排列没有一定的方向, 见图3c。



3 讨论

成功的眼睑重建必需满足以下条件: ①保证眼睑正常的活动功能。②尽量恢复眼睑的原有外观。③减少并发症的发生。其中眼睑板替代物的选择甚为重要。

脱细胞真皮基质是指通过酶消化、高渗盐浸泡等方法去除异体(种)皮中的表皮层和真皮细胞成分, 而保留正常胶原三维结构及基底膜的真皮支架^[13]。脱细胞真皮

具有抗原性弱, 生物相容性好, 血管化速度快, 可诱导自体组织细胞再生及减少瘢痕形成等优点, 显示出很好的应用前景^[14-18]。相关实验表明, Xeno-ADM残余的基底膜成分如IV型蛋白和层粘连蛋白可能是Xeno-ADM抗原性的主要原因^[19-20], 因此, 在实验中, 为尽量降低真皮支架的抗原性, 首先采用机械法去除表皮及真皮乳头层, 排除了基底膜抗原成分及乳头层残存细胞成分可能导致的免疫排斥, 再经过一系列的生物学处理, 以曲拉通X-100去除真皮中细胞成分^[21], 仅保留真皮中胶原束结构, 使其成为无基底膜的脱细胞真皮。

经该法制备的脱细胞真皮, 苏木精-伊红染色证实无表皮, 真皮内无任何细胞成分、皮肤附件及血管, 扫描电镜显示束状结构的真皮胶原纤维交织成网状, 未见细胞成分, 证实达到了预期的效果。Xeno-ADM基质硬度与睑板相似, 胶原排列整齐致密, 其真皮支架可作为一模板, 引导受体的胶原组织结构生长, 而真皮两侧分别与眼轮匝肌、结膜相接触, 由于该两种组织血液运输丰富, 有利于植片的快速血管化。

在本实验短期观察中, 脱细胞真皮可起到支撑眼睑后层结构的作用, 植入后眼睑成形好, 与自体睑板有较好的相容性, 未观察到超急性排斥反应: 1周时移植物及受体表现为炎症细胞浸润; 3周时移植物与受体之间炎症反应消失, 新生胶原纤维生成, 提示猪的真皮经过脱细胞处理后, 可以避免发生异种抗体激活导致的超急性排斥反应。但是Xeno-ADM移植后早期仍存在炎症免疫反应, 因此, Xeno-ADM要成为临床睑板替代物仍需进一步的实验及临床研究。

4 参考文献

- [1] Madge SN, Malhotra R, Thaller VT, et al. A systematic approach to the oculoplastic reconstruction of the eyelid medial canthal region after cancer excision. *Int Ophthalmol Clin*. 2009;49(4):173-194.
- [2] Smith RJ, Malet T. Auricular cartilage grafting to correct lower conjunctival fornix retraction and eyelid malposition in anophthalmic patients. *Ophthalm Plast Reconstr Surg*. 2008;24(1):13-18.
- [3] Rafii AA, Enepekides DJ. Upper and lower eyelid reconstruction: the year in review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;14(4):227-233.
- [4] Inchingolo F, Tatullo M, Abenavoli FM, et al. Upper eyelid reconstruction: a short report of an eyelid defect following a thermal burn. *Head Face Med*. 2009;5:26.
- [5] Rubin PA, Fay AM, Remulla HD, et al. Ophthalmic plastic applications of acellular dermal allografts. *Ophthalmology*. 1999;106(11):2091-2097.
- [6] Gu JJ, Chen JQ, Peng HJ, et al. Yanke Yanjiu. 2003;21(3):229-232. 顾建军, 陈家祺, 彭鸿钧, 等. 脱细胞真皮与异体巩膜在眼睑重建中的实验研究[J]. 眼科研究, 2003, 21(3):229-232.
- [7] Pushpoth S, Tambe K, Sandramouli S. The use of AlloDerm in the reconstruction of full-thickness eyelid defects. *Orbit*. 2008;27(5):337-340.
- [8] Hou JS, Huang HZ. *Zhongguo Kouqiang Hemian Waikie Zazhi*. 2007; 5(3):163-169. 侯劲松, 黄洪章. 脱细胞真皮基质在口腔医学领域的应用进展[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2007, 5(3):163-169.
- [9] Chen F, Pan YC, Zheng ZA, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng yanjiu yu Linchuang Kanfu*. 2009;13(41):8021-8024. 陈斐, 潘云川, 郑志昂, 等. 组织工程同种异体脱细胞真皮复合自体刃厚皮微粒皮移植[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(41):8021-8024.
- [10] Jian DY, Chen B, Xu MD, et al. *Zhonghua Shaoshang Zazhi*. 2002; 18(1):15-18. 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[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(1):15-18.

[11] Wu QH, Liu Y, Zhang X, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2006; 10(1): 50-52.
吴秋合,刘琰,章雄,等.猪无细胞真皮基质在体移植后的稳定性[J].中国组织工程研究与临床康复,2006,10(1):50-52.

[12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China.Guidance suggestion of caring laboratory animals.2006-09-30.中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见,2006-09-30.

[13] Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T, et al. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;85(1):210-219.

[14] Han JG, Xu HM, Song WL, et al. Histologic analysis of acellular dermal matrix in the treatment of anal fistula in an animal model. J Am Coll Surg. 2009;208(6):1099-1106.

[15] Avella D, Garcia LJ, Gusani NJ, et al. Human acellular dermal matrix: an innovative tool for diaphragmatic reconstruction in patients with large intra-abdominal tumors. Am J Surg. 2010;199(1):e12-e16.

[16] Nemeth NL, Butler CE. Complex torso reconstruction with human acellular dermal matrix: long-term clinical follow-up. Plast Reconstr Surg. 2009;123(1):192-196.

[17] Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (Alloderm) in the management of full thickness burns. Burns. 1995;21(4):243-248.

[18] Ehrenreich M, Ruszczak Z. Update on dermal substitutes. Acta Dermatovenerol Croat. 2006;14(3):172-187.

[19] DeSagun EZ, Botts JL, Srivastava A, et al. Long-term outcome of xenogenic dermal matrix implantation in immunocompetent rats. J Surg Res. 2001;96(1):96-106.

[20] Xiao Q,Zhang YF,Pan YG, et al. Zuzhi Gongcheng yu Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2008;4(5):267-270.
肖强,张盈帆,潘银根,等.基底膜对异种脱细胞真皮基质移植免疫排斥反应的影响[J].组织工程与重建外科杂志,2008,4(5):267-270.

[21] Zuo JH,Xu HY,Yang YC, et al. Shangdong Yiyao. 2005;45(11):11-12.
左金华,徐慧英,杨佑成,等.曲拉通X-100对制备脱细胞真皮基质影响的实验研究[J].山东医药,2005,45(11):11-12.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 江西省卫生厅科技计划(20071033), 课题名称: 异种脱细胞真皮在眼睑重建术中的实验及临床研究。

作者贡献: 文章的设计为第一、二作者, 干预实施为全部作者, 评估为第二、三作者。均经过系统培训, 未使用盲法评估。

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。

本文创新性

提供证据: 在中国期刊全文数据库进行检索, 检索时间 2008-01/2010-04, 检索关键词: 异种脱细胞真皮; 眼睑重建; 组织工程; 材料; 相容性。

创新性特点: 在实验的短期观察中, 脱细胞真皮可起到支撑眼睑后层结构的作用, 植入后眼睑成形好, 与自体睑板有较好的相容性, 未观察到超急性排斥反应, 提示猪的真皮经过脱细胞处理后, 可以避免发生异种抗体激活导致的超急性排斥反应。但是异种脱细胞真皮移植后早期仍存在炎症免疫反应, 因此, 要成为临床睑板替代物仍需进一步的实验及临床研究。

CRTER 杂志已出版的生物材料组织相容性相关文章: 本刊学术部

聚乳酸乙醇酸/RNA III抑制肽缓释微球的组织相容性

李静东,张小斌,郝立波等.
2010.14(3): 559-562

关键词: 聚乳酸乙醇酸/RNA; III抑制肽微球; 组织相容性; 动物实验

基金: 国家自然科学基金

人发角蛋白非神经移植材料的解剖学特点及组织相容性

王进,邹云雯,逢文泉等
2009.13(21): 4189-4192

关键词: 人发角蛋白;非神经移植材料;周围神经;组织相容性

聚乳酸乙醇酸/RNA III抑制肽缓释微球组织相容性评价

张小斌,郝立波,王继芳等.
2008.12(1): 39-42

关键词: PLGA/RIP微球;组织相容性;动物实验;生物材料

基金: 国家自然科学基金

聚醚型聚氨酯人工肛门括约肌材料的组织相容性

陈飞,黄宗海,郭雄波等.
2009.13(3): 423-426

关键词: 人工肛门括约肌;硅橡胶;聚氨酯热塑性弹性体;组织相容性

基金: 广东省科技计划

钛扣附着体覆盖全口义齿修复后的组织相

容性评价

邱晓霞,秦红霞,张秋霞.

2009.13(29): 5665-5668

关键词: 附着体义齿;覆盖义齿;基牙;牙周组织;组织相容性

生物衍生骨支架材料制备及在体内的组织相容性

牛云,何旭,张丽红等.

2008.12(7): 1385-1389

关键词: 生物衍生骨支架;组织相容性;骨组织工程;组织构建

基金: 国家高技术研究发展计划(863计划), 高等学校博士学科点专项科研项目, 国家自然科学基金

雷帕霉素-替罗非班复合药物涂层支架的血液及组织相容性

刁繁荣,吕安林,张薇等.

2007.11(13): 2411-2414

关键词: 支架;组织相容性;雷帕霉素;替罗非班;生物材料

明胶/白芨胶载药多孔材料的组织相容性评价

彭锐,邹阳,程井军.

2007.11(18): 3644-3646

关键词: 生物材料;明胶;白芨;中药;组织相容性

基金: 湖北省高新技术研究发展项目, 湖北省科技攻关项目

聚丙烯材料假发移植物的组织相容性及可移

植假发的外观效果

易斌,胡志奇,孙锡金等.

2007.11(4): 621-624

关键词: 毛发/移植;秃发/外科学;聚丙烯类

微创技术与传统切开方法置入钢板内固定材料治疗近关节骨折的组织相容性反应:同期非随机对照

江水华,郭开今,陈树祥等.

2008.12(9): 1635-1638

关键词: 近关节骨折;微创;骨折固定术

钛网与硅胶网板材料在行颅骨成形修补中的应用:组织相容性比较

靳春杰,周伟,田世双.

2008.12(6): 1124-1126

关键词: 钛网;硅胶网板;颅骨成形术;生物材料

自体心包包裹人工气管修复气管缺损的组织相容性评估

曹子昂,顾旭东,林海平等.

2008.12(14): 2645-2647

关键词: 人工气管;移植;记忆合金;胶原;自体组织;动物模型;生物材料

半月板纤维软骨细胞与小肠黏膜下层的组织相容性

赵玉鑫,王洪;杨述华.

2007.11(2): 206-208

关键词: 生物相容性材料;组织工程;黏膜;小肠;软骨细胞;半月板;胫骨