

370-373

脱细胞异体真皮与自体薄皮片 移植的研究与应用[△]

孙永华 李迟[✓] 王春元 覃凤均 于东宁 陈忠 王荣 胡杰 吴亚楠

R644.05
R622.145

【摘要】 目的 为深度烧伤创面的修复寻求良好的覆盖材料。方法 采用固定剂对异体皮肤细胞外基质固定交联,再用胰蛋白酶和 EDTA 螯合剂去表皮,保留基底膜,用 DNA 酶、RNA 酶和化学制剂对真皮内可引发宿主细胞识别反应的细胞成分进行处理,保留完整的基底膜和细胞外基质的形态,制成网状“脱细胞异体真皮”。结果 通过动物实验(纯种 Wistar 大鼠)证明移植成活率高,无排斥反应,组织学观察术后 8 周形状结构完整,炎性反应消失,12 周钉突与脱细胞真皮结合良好,胶原排列整齐。37 例烧伤病人 I 度创面和瘢痕切除后,进行脱细胞真皮+自体薄皮片(8%英寸)移植,成活率平均为 96.2%±3.4%。创面收缩轻,外观平整,色较深,触软,功能良好。结论 脱细胞同种真皮+薄自体皮移植是修复烧伤深度创面比较理想的材料。

【关键词】 烧伤 移植 脱细胞真皮 皮自体移植 自体皮片
Experimental study and clinical application of acellular dermis for coverage of burn wounds Sun Yonghua^{*}, Li Chi, Wang Chunyuan, et al. *Department of Burns, Beijing Ji Shui Tan Hospital, Beijing 100035

【Abstract】 **Objective** To prepare acellular dermal matrix for the coverage of deep burn wounds. **Methods** After conjugation of extracellular matrix, the allogeneic skin was treated with trypsin and EDTA chelating agent to remove epidermis. The cells, which could induce recognition reaction by cellular immunity of the host, were further removed with the treatment of DNA and RNA enzymes and chemical agents, and intact basement membrane and extracellular matrix were preserved, finally forming “acellular allogeneic dermis”. It was used to cover burn wounds together with split-thickness autologous skin only. **Results** In Wistar rats, it was proved that the transplantation of acellular allogeneic dermis and split-thickness autologous skin graft resulted in high rate of take without signs of rejection. Histological examination 8 weeks after the transplantation revealed intact structure, with subsidence of inflammation. 12 weeks after the transplantation, it was shown that the dermis joined well with epidermal rete, and collagen was orderly arranged. Eschar excision or scar excision was performed in 37 patients, and the wounds were covered with allogeneic acellular dermis and autologous split-thickness skin (8% inch). Take rate was found to be 96.2%±3.4%. There was only slight wound contraction, the surface was smooth, the color was darker, the consistency was soft, and the function was good. **Conclusion** Acellular dermis with only split-thickness autologous skin graft is an ideal covering material for deep burns.

【Key words】 Burn Grafting Acellular all-dermal matrix

深 I 度烧伤创面愈合后或大面积全层烧

伤,经早期切痂植皮或覆盖自体表皮细胞培养皮片;或大张异体皮开窗嵌入自体微型皮片;或自体网状植皮以及自体微粒皮移植等常有不同程度的瘢痕形成,且外观不整、痛痒难忍,尤其在功能部位往往导致畸形和功能障碍。以往的

作者单位:100035 北京积水潭医院烧伤科(孙永华、李迟、覃凤均、于东宁、陈忠);解放军 262 医院烧伤科(王春元、王荣);北京杰亚生物医学工程部(胡杰、吴亚楠)

治疗表明,移植的皮片所含真皮厚度与皮片挛缩程度有直接关系,但自体供皮区切取皮肤越厚,供皮区遗留瘢痕也越重,更不能反复切取。为了解决供皮材料的困难,国内外学者都着眼于复合皮的研究^[1~6],即自体表皮和异体真皮组合形成的一种新型烧伤创面覆盖物或人工真皮(Integra)与自体表皮移植。我们采用脱细胞异体真皮+自体薄断层皮片一次性手术移植方法,进行了动物实验和初步临床观察,以期为临床提供较理想的永久性创面覆盖材料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 纯种 Wister 大白鼠 80 只,体重 250~300 克,由军事医学科学院动物实验中心提供。

1.2 脱细胞异体真皮的制备

供体大白鼠于使用前 1 周单独喂养,术前 1 天脱毛,术中乙醚麻醉、碘酒酒精常规消毒、铺巾。切取大白鼠全厚皮,剪去皮下组织,经大量消毒生理盐水冲洗后使用常规固定剂(20%福尔马林等),对皮肤的细胞外基质进行交联;使用胰蛋白酶及 EDTA 螯合剂去表皮,保留基底膜;再用 DNA 酶、RNA 酶、其他化学药品及低渗化合物缓冲液、EDTA 螯合剂等对真皮内可引发宿主细胞识别反应的细胞成分进行处理,完整保留细胞外基质的形态结构和成分,用特制的制网机制成细网,置 2~8℃条件下保存待用。

1.3 脱细胞异体真皮检验^[7]

1.3.1 物理性能 有弹性,弯曲不断裂,乳白色,网状。

1.3.2 组织学结构 与正常人体真皮内的细胞外基质结构相同的真皮组织结构。有完整基底膜、无细胞、无细胞核,偶有微量细胞碎片。

1.3.3 无菌生长 细胞毒性反应不大于 2 级。皮内刺激(-)。口腔粘膜刺激不大于 1 分。遗传毒性(Ames 试验)为(-)。

1.4 未脱细胞异体皮制备

手术当日乙醚麻醉、脱毛,常规消毒、铺巾。切取大白鼠全厚皮,消毒生理盐水冲洗 3 次,待用。

1.5 复合皮移植手术方法

1.5.1 动物分为脱细胞异体真皮+自体薄皮片组(1 组)和未脱细胞异体皮+自体薄皮片组(2 组)。

1.5.2 大白鼠 64 只,在乙醚开放麻醉下,背部上、下方各切除一直径 3cm 的全层皮肤创面,充分止血。大白鼠背部选取数片薄断层皮待用。

1.5.3 1 组:脱细胞异体真皮植入创面+自体薄断层

皮,周缘缝合数针,油纱布、纱布等敷料覆盖包扎固定(n=32)。2 组:未脱细胞异体皮植入创面+自体薄断层皮,周缘缝合数针,油纱布、纱布等敷料覆盖包扎固定(n=32)。

1.5.4 用创面测量标尺测量留做记录^[8]。每只实验动物专笼喂养。术后观察 2,4,8,12,24 周,每组每次任选 6 只活杀,取标本 12 块(n=12),进行组织学检查。留 2 只作远期观察,最长成活 11 个月。

2 实验结果

2.1 外观 第 1 组移植区与创周正常皮肤厚度接近,创面无明显挛缩。第 2 组未脱细胞异体皮移植,术后第 4 周后创面挛缩较明显。

2.2 皮肤成活率

除被大鼠自己啃噬以外,创面均成活良好。1 组成活率平均 96.2%±3.4%,2 组成活率平均 90.4%±1.2%。

2.3 创面收缩率见表 1

表 1 两组移植区收缩率比较(% ,皮片移植数 60)

Tab 1 Comparing the structure rate of the two groups skin transplantation(%)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周	24 周
1	94.2±2.2	94.4±2.6	90.2±3.4	86.4±3.4	90.1±2.8
2	92.4±1.6	89.0±2.8	72.0±3.6	63.0±3.2	...

2.4 组织学观察

2.4.1 脱细胞异体真皮移植术后 2 周 表皮和异体真皮成活,真皮内有较多成纤维细胞和毛细血管,有大核细胞及炎性细胞。

2.4.2 移植术后 4 周 异体真皮形态接近正常,毛细血管大部分垂直表皮生长,有炎性细胞浸润,有角质层。

2.4.3 移植术后 8 周:异体真皮形态正常未见明显炎症反应。移植术后 12 周:真皮组织形态正常,表皮有少量钉突。移植术后 24 周:见正常皮肤组织,结构完整,未见皮肤附件,无排斥现象。成活最长的大鼠为 11 个月,切片结果同术后 24 周。

2.5 小结

异体真皮移植可成活,抗原性低,可诱导细胞和上皮长入。异体真皮和移植表皮组织结合,外观好,挛缩轻。

3 临床应用

3.1 观察内容

脱细胞异体真皮+自体薄层皮(约 6%~8%英寸)

植皮后的成活率,创面愈合后瘢痕生长,创面收缩率及功能等。

3.2 手术方法

选择 1996 年 5 月~1997 年 2 月有新鲜 III 度烧伤创面的成年住院病人和烧伤后瘢痕畸形的成年病人 37 例,III 度创面焦痂切除手术或瘢痕切除后创底充分止血,无菌生理盐水冲洗。将已准备好的脱细胞异体真皮+自体薄层皮(采用 Zimmer 电动取皮机或用滚轴取皮刀切取约 8% 英寸左右的薄层皮)进行移植,油纱布覆盖创面后,多层敷料适度加压包扎。术中注意无菌操作,创底充分止血,无菌生理盐水冲洗。一般术后 10~14 日检查创面。

3.3 观察方法和结果评价

创面分别于术后 2, 4, 8, 12 周观察颜色、软硬度弹性。并用创面测量标尺测量植皮成活率^[6],于术后 4, 8, 12, 24, 48 周测量植皮面积与原始面积相交计算皮片收缩率等各项数值, *t* 检验方差分析统计学处理。

3.4 结果

3.4.1 皮肤成活率 37 例病人移植 41 个创面除 1 例因脱细胞异体真皮下积血,皮片未成活外,余均成活良好,成活率平均 $96.2\% \pm 3.4\%$ 。

3.4.2 创面收缩率见表 2。

表 2 伤后创面收缩率(%)

Tab 2 The wound contraction rate (%)

4 周	8 周	12 周	24 周	48 周
n=40	n=38	n=19	n=29	n=5
96.8±2.1	90.4±2.6	90.2±2.6	96.4±3.4	95.1±2.8

3.4.3 外观平整,无瘢痕增生,色仍较深,触之柔软,功能部位功能良好。

3.5 典型病例

例 1 男,40 岁。1996 年 5 月 27 日因嗜酒后昏迷,双下肢泡在热开水中,被人发觉后救起,双下肢、臀部,尤其左下肢为 III 度烫伤,足、踝、小腿中下部大部骨皮质坏死,入院后行坏死组织切除,部分自体皮肤移植术,选择臀部和左膝上外侧行 J-1 脱细胞异体真皮移植,其上覆盖自体薄断层皮,术后 2 周,植皮全部成活,术后半年,愈合创面平整、光滑、功能好,肤色接近正常(图 1~3)。

例 2 男,20 岁,1996 年 5 月 23 日因颜面、双上肢煤气火焰烧伤,面积 20%,III 度,急诊入院。5 月 27 日上午全麻下行双上肢切痂,双大腿取薄断层皮,双前臂部分行 J-脱细胞异体真皮移植,其上覆盖自体细胞薄



图 1 新鲜 III 度烧伤皮肤移植术中

Fig1 After excision of full-thickness burn injury on the leg

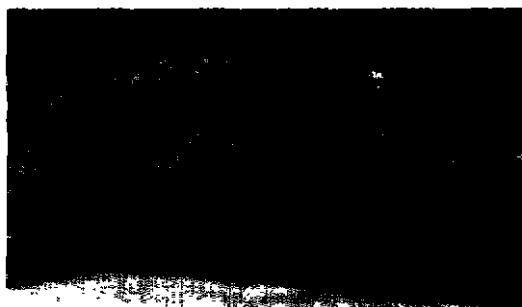


图 2 术后 2 周移植皮肤全部成活

Fig2 Two weeks after grafting the skin was taken



图 3 术后半年复合皮移植处光滑无瘢痕

Fig3 Half a year after the transplantation the surface was smooth

断层皮,部分仅自体薄断层网状皮移植。术后 5 周,检查创面皮成活良好,术后 12 周,单纯断层网状皮移植部位,可见突出小瘢痕生长,复合皮移植部位光滑平整,取标本光镜检查表面表皮各层细胞完整,并有钉突,真皮浅层少量炎性细胞浸润,真皮深层有粗大胶原、纤维细胞,未见皮肤附件(图 4,5)。

4 讨论

4.1 1913 年 Loewe^[7]首次应用真皮移植成功。真皮组织不仅能增强移植皮的韧性,还能抑制肉芽组织生长和瘢痕形成,减少创面收缩。采用复合皮移植修复深度烧伤或外伤引起的组织

损伤,减轻瘢痕,改进功能,已有很多报道。Cuono^[10]用液氮保存的异体真皮植于烧伤后新鲜切痂创面,3~5 天后待真皮建立血运,将真皮去除,然后在异体真皮上移植培养的自体角质细胞膜片。Mekay 等^[11]用 Dispace I 处理,甘油保存的异体真皮,临床初步应用显示成活后瘢痕少。Wainwright^[5]报告无细胞的同种真皮+网状自体薄皮移植。Tompkins 等报告^[3] Integra(商品名)具有与正常真皮相似的三维结构的双层人工皮,对长入的成纤维细胞提供三维结构信息,诱导成纤维细胞合成新生的结缔组织,具有真皮的结构。陈璧报告^[12]以小猪做为动物模型,采用异体冻干真皮,经胰酶处理的异体真皮和新鲜异体真皮,其上再重叠移植自体皮。

本组动物实验和临床结果表明,脱细胞异体真皮和自体薄片同时移植成活率高。移植 2 周后组织学观察显示炎症反应存在,随移植时间的延长,炎性反应逐渐消失,胶原排列整齐,尤为突出的一个特点是它具有完整的基底膜,覆盖在基底膜面上的自体表皮细胞已坚固的同脱细胞的真皮结合,并不断地扩展增厚上皮化。

本实验所得结果从侧面支持了 Chetty^[13] 1992 年报道的基底膜对于创面愈合所起的重要作用,及 Compton 和 O'Connor 等人^[14] 在 1989 年报道的由于缺少基底膜而导致移植后皮肤易脆裂,起水泡等问题。

4.2 应用脱细胞异体真皮移植,保留细胞外基质可引导细胞新生和扩展,促进自体成纤维细胞在异体真皮支架中生长,促进创面愈合。Takami^[15]和本实验的方法均能彻底去除异体真皮内细胞,保留异体真皮结构。

4.3 临床 37 例病人,41 例创面移植观察,脱细胞异体真皮复合移植成活率 96.2%±3.4%,外观平整,功能好。脱细胞异体真皮保留基质做为框架,有完整基底膜为自体表皮成活和真皮与表皮层的连接创造了良好的基础。

同时由于无表皮细胞成分,组织抗原性低,可使皮片长期存活,供皮区损伤小,恢复快,无瘢痕,是修复深度烧伤创面的一种较好的创面覆盖物,有广阔的应用前景。

(本文图 4.5 见插页第 18 页)

参 考 文 献

- Burke JF, Yannas IV, Qurn WC, *et al.* Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 1981, 194: 413.
- Bell E, Ehrlish HP, Batten DJ, *et al.* Development and use of Irving skin equivalent. *Plast Reconstr Surg*, 1981, 67: 356.
- Tompkins RG, Burke JF. Progress in burn treatment and the use of artificial skin. *World J Surg*, 1990, 14: 819.
- Yannas IV, Lee E, Qrgill DP, *et al.* Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 933.
- Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (Allodermal) in the management of full-thickness burns. *Burns*, 1995, 21: 243-248.
- Soejima K, Nozaki M, Sasaki K, *et al.* Reconstruction of burn deformity using artificial dermis combined with thin split-skin grafting. *Burns*, 1997, 23: 501-504.
- International Standard, Biological evaluation of medical devices part 1. Guidance on selection of tests. ISO. 1993-1.
- 李迟,孙永华. 烧伤小创面测量尺. *中华整形烧伤外科杂志*, 1992, 8: 241-242.
- Loewe O. Uber Hautimplantation on stelleder Freien Fa-szienplastik. *Plast Reconst Surg*, 1960, 26: 1.
- Cuono CB. Composite autologous-allogeneic skin replacement; development and clinical application. *Plast Reconstr Surg*, 1987, 80: 626-635.
- Mekay I, Woodward B, Wood K, *et al.* Reconstruction of human skin from glycerol preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. *Burns*, 1994, 20: 19-22.
- 陈璧,汤朝武,龚熙荣. 复合皮片移植的实验研究. *中华整形烧伤外科杂志*, 1990, 7: 29-30.
- Chetty BV, Boissy RE, Warden GD, *et al.* Basement membrane and fibroblast aberration in blisters at the donor, graft and spontaneously healed sites in patients with burns. *Arch Dermatol*, 1992, 128: 181-186.
- Compton CC, Gill JM, Bradford DA, *et al.* Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest*, 1989, 60: 600-612.
- Takami T, Matsuda M, Yoshitake, *et al.* Dispace detergent treated dermal as a dermal substitute. *Burns*, 1996, 22: 182-190.

(收稿: 1997-12-28)