

不同组织来源生物补片降解性能的比较研究

程文悦^{1,2} 杨旭霞² 陈思诗² 赵美彪² 张嘉鹏² 王妍妍² 张剑²

【摘要】 目的 比较3种不同组织来源生物补片的体内外降解性能。方法 采用I型胶原酶对来源于基底膜(BM)与小肠黏膜下层(SIS)复合细胞外基质、单纯小肠黏膜下层、戊二醛化学交联心包(PC)三种生物补片进行体外降解试验,确定各材料的降解率;采用各材料修补大鼠腹壁肌部分层次缺损评估3种补片的降解和组织修复情况。结果 体外降解试验中,酶溶液作用120 h后,非交联的BM/SIS复合补片和SIS补片完全降解,PC补片的降解率仅为4.3%±1.9%。体内降解试验中,术后2个月,大体观和组织病理切片染色结果证实BM/SIS复合补片完全降解,组织重塑,再生胶原有序;SIS补片完全降解,再生胶原有序性较差;术后12个月,PC补片未见明显降解,未见细胞长入补片中央区。结论 虽然BM/SIS复合补片的体内外完全降解时间均较短,但其可以实现组织的良好快速重塑,提示BM/SIS复合补片是一种降解与再生同步的组织修复材料。

【关键词】 生物补片; 降解性; 基底膜; 小肠黏膜下层; 心包; 非交联; 化学交联

Comparative study on the in vivo and in vitro degradation process of biological grafts derived from different tissues Cheng Wenyue^{1,2}, Yang Xuxia², Chen Sishi², Zhao Meibiao², Zhang Jiapeng², Wang Yanyan², Zhang Jian². ¹Department of Regenerative Medicine, Shanghai Jingan District Zabei Central Hospital, Shanghai 200070, China; ²Department of General Surgery, Shanghai ChangZheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Corresponding author: Zhang Jian, Email: txzhangjian@126.com

【Abstract】 **Objective** Degradation behaviors of biological grafts derived from different tissue were investigated by taking the degradation experiments in vivo and in vitro respectively. **Methods** In vitro, solutions of collagenase type I was used to mimic the degradation of biological grafts including the basement membrane (BM)/small intestine submucosa (SIS) composite extracellular matrix (ECM) graft, SIS and chemical cross-linking pericardium (PC). Wistar mice were used as abdominal degradation model in vivo to evaluate the degradation process and therapeutic effect of biological grafts derived from different tissue. **Results** Results showed that the non-crosslinked BM/SIS and SIS matrix were totally degraded in 120 h for collagenase I in vitro corresponding the degradation rate of the PC patch was only 4.3%±1.9%. BM/SIS matrix was totally degraded in 2 months in vivo, the samples replaced with dense and well-organized collagen fibers. At 2 months post-surgery, SIS also was degraded. While SIS had reconstructed tissue defects with novel-organized collagen fibers. During the experimental period, no degradation was observed and fibrous encapsulations were formed in pericardium repaired samples at 12 months post-surgery. **Conclusion** Results demonstrated the processes of degradation and tissue repair were matched well of BM composite graft with a better degradation rate and tissue regeneration compared with SIS and pericardium.

【Key words】 Biologic graft; Degradation; Basement membrane; Small intestinal submucosa; Pericardium; Non-crosslinked; Chemical cross-linking

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-392X.2021.01.023

基金项目: 国家自然科学基金(31771043); 国防科技卓越青年科学基金(2019-JCJQ-002); 国防科技基础加强计划(2019-JCJQ-JJ-069); 上海市卫计委科研重点项目(201540388)

作者单位: 200070 上海市静安区闸北中心医院再生医学实验室¹; 200003 上海, 海军军医大学长征医院普通外科²

通信作者: 张剑, Email: txzhangjian@126.com

生物补片目前是疝外科领域的研究热点^[1]。理想的生物补片植入人体后的降解吸收与组织再生应同步进行^[2-4]。若补片降解过快则无法为细胞的增殖提供支撑^[5-6]；降解过慢则可能导致细胞无法长入，机体识别为异物引起免疫反应和纤维囊包裹^[7-9]。因此，生物补片的完全降解时间和组织重塑时间研究对于保证其确切的治疗效果尤为重要。本研究选择非交联的基底膜与小肠黏膜下层复合细胞外基质(basement membrane/small intestine submucosa, BM/SIS)复合补片、单纯小肠黏膜下层(small intestine submucosa, SIS)补片和戊二醛化学交联心包(pericardium, PC)补片为研究对象，比较其体内外降解能力，明确常用生物补片的降解再生时间，旨在为临床应用提供依据。

材料与方 法

一、试剂仪器与动物

1. 试剂与仪器：I型胶原酶(美国Sigma公司)，THZ-103B型恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司)，XLW-PC型智能电子拉力试验机(济南兰光机电技术有限公司)，ME204E型分析天平(Mettler toledo公司)，H01-1C型恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司)，DHG-9140A型鼓风干燥箱(上海慧泰仪器制造有限公司)，异氟烷和水合氯醛(上海麦克林生化科技有限公司)，吸入式小动物麻醉机(上海瑞曼信息科技有限公司)。

2. 动物：健康SD大鼠购自昭衍(苏州)新药研究中心有限公司，雌性，33只，体质量190~210g，清洁级。大鼠饲养条件为室温控制在16~26℃，相对湿度控制在40~70%，光照控制12h光照12h黑暗。大鼠均经过5d适应性饲养后开始实验。本研究试验方案符合《关于善待实验动物的指导性意见》等国家现行动物伦理原则并通过上海市静安区闸北中心医院医学伦理委员会的审查。

3. 材料：由卓阮医疗科技(苏州)有限公司提供的猪膀胱BM/SIS复合补片、牛心包膜PC补片及SIS补片。

二、方 法

1. 体外降解率的测定^[10]：将补片剪成1cm×7cm的长条状，45℃烘干4~6h至恒重后称重，记为 m_1 。将烘干后的补片放入10ml的离心管中，加入I型胶原蛋白酶溶液(10mg:1ml)，在恒温摇床

中反应(37℃, 200rpm)，分别在8、24、48、72、96、120、144及168h后取出样品45℃烘干4~6h后称重，记录样品的质量，记为 m_2 。各时间点的补片样品称重，以公式计算降解率。降解率(%)= $(m_1 - m_2) / m_1 \times 100$ 。以时间点为横坐标，各时间点对应的降解率为纵坐标，绘制降解曲线。

2. 降解液中胶原蛋白含量的测定：同时将各个时间点的降解液取1.0ml置于比色管中，加入2ml异丙醇和1ml氧化剂溶液，摇匀，室温放置4min。加入2ml艾氏试剂，60℃水浴加热显色20min，室温放置1h。用比色皿在560nm处测吸光度，并以梯度浓度羟脯氨酸溶液绘制标准曲线，计算降解液中胶原蛋白的含量^[11]。根据公式：胶原蛋白含量=羟脯氨酸含量×11.1，换算胶原蛋白含量。

3. 构建大鼠腹壁肌部分层次缺损模型：大鼠给予异氟烷混合气体诱导麻醉后，腹腔注射0.5ml 7%水合氯醛，褪去腹部毛发，取腹部正中切5cm长切口，游离双侧皮下，于双侧腹直肌外侧切除1.5cm×1.5cm大小的腹外斜肌、腹内斜肌分别使用与缺损同等大小的不同补片植入修补缺损部位，每组补片设6处缺损修补^[3]。

三、观察指标

术后1、2、4、6及12个月处死动物，取各组补片的修复区及周围2mm组织进行病理组织学评价。评价补片降解及补片内细胞浸润、胶原纤维有序性、新生血管化情况。

结 果

一、体外降解率的测定

在胶原酶处理48h后BM/SIS复合补片降解率过半，达到 $60.5\% \pm 6.8\%$ ，SIS补片降解率为 $44.0\% \pm 4.6\%$ 。胶原酶处理120h后，BM/SIS复合补片和SIS补片降解液中未见固形物，提示补片已完全降解；PC补片降解率为 $4.3\% \pm 1.9\%$ 。胶原酶处理168h后，PC补片降解率仅为 $16.9\% \pm 3.3\%$ 。见图1。

二、降解液中胶原蛋白含量的比较

BM/SIS复合补片和SIS补片降解液的胶原蛋白含量随时间延长而增加，至120h后不再增加。见图2。PC补片降解液中的胶原蛋白含量明显少于BM/SIS复合补片和SIS补片，与降解率一致。

三、体内降解

1. 大体观：本研究结果显示术后1个月，BM/SIS

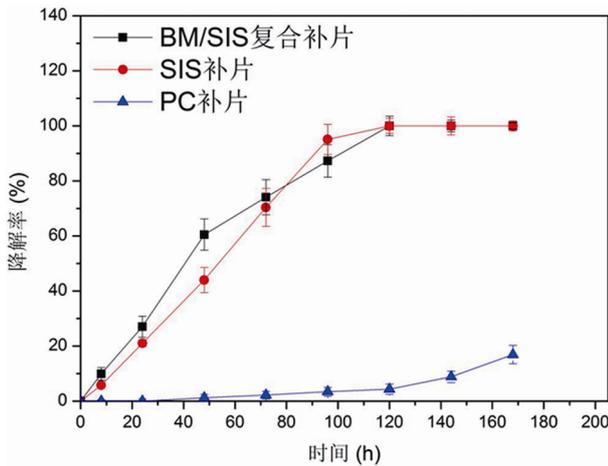


图1 不同生物补片在胶原酶中的降解速率随时间的变化

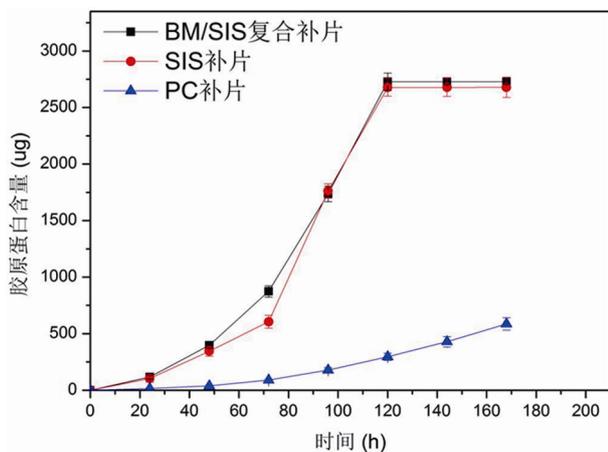


图2 不同生物补片降解液中胶原蛋白含量

复合补片修复区与周围组织融合良好、SIS 补片植入区中央大片补片消失, PC 补片未见明显变化。术后 2 个月, BM/SIS 复合补片修复区外观上完成重塑, 修复效果佳, 未见明显补片残留; SIS 补片出现明显皱缩和再生不佳, 补片进一步消失, 消失面积占修复区面积 80%~95%; PC 补片未见明显降解。术后 4 个月, BM/SIS 复合补片和 SIS 补片修复区较术后 2 个月无明显变化; PC 补片仍清晰可辨, 未见明显降解。由于 PC 补片在 4 个月内仍未见降解, 故此本研究将 PC 补片的观察时间延长至 6 和 12 个月^[3]。从图 3 可知术后 6 和 12 个月 PC 补片依然未见明显降解。

2. 组织学评价: 术后 1 个月, BM/SIS 复合补片内可见丰富新生血管, 分布于补片与机体组织的交界区域, 可见明显胶原新生提示组织重塑的初步完成, 补片大部分降解。而 SIS 补片存在大量的炎症细胞, PC 补片无细胞浸润。植入 2 个月, BM/SIS 复合补片未见补片成分, 补片完全降解时修复区已

再生出高度有序的胶原组织和新生血管, 提示组织重塑完成。SIS 补片未见补片成分残留, 再生组织较薄且胶原纤维较为无序。SIS 补片中央区由于材料的大片消失, 仅交界区组织再生情况良好, 补片中央组织重塑未完全实现。PC 补片未见细胞浸润, 未见血管长入。植入 4 个月, BM/SIS 复合补片修复区与 2 个月相比无明显变化, 为有序排列的胶原组织。SIS 补片内可见丰富新生血管, 但新生胶原纤维有序性较差。PC 补片仍未见细胞浸润和血管长入。PC 补片植入 6 和 12 个月后仍未见明显降解, 细胞仅少量分布于交界区, 中央区未见细胞浸润。

讨 论

理想的生物补片体内重塑过程是“内源性诱导再生”, 即动态的植入物降解伴随着宿主细胞浸润和增殖、血管新生和胶原沉着(即降解-重塑曲线)最终实现组织更替、生物愈合的过程。平衡的降解-重塑曲线实现组织再生需要三个因素: 支架、信号、细胞, 缺一不可^[1]。生物补片提供组织再生支架和信号, 支架降解过快会导致无足够强度的组织再生而致术后疝复发, 降解过慢则会导致补片周围形成纤维囊、甚至形成慢性炎症反应等问题^[14-15]。因此, 生物补片是否具有适当的降解速率对临床应用至关重要。

根据制备方式和植入体内的生物学行为, 生物补片主要分为 2 类, 非化学交联补片和化学交联补片。非化学交联生物补片修复组织缺损的原理是“内源性诱导再生”, 即吸引并调控宿主细胞在支架内生长和分化形成新的自身组织替换植入的材料从而完成对缺损的修复^[16]。化学交联补片是指通过化学试剂处理, 致胶原分子内部胶原蛋白三螺旋支架间发生共价键结合和封闭免疫原性。交联补片的优势是封闭了胶原酶对支架的降解位点、稳定了胶原酶对支架的降解^[17], 缺点是交联处理导致支架网孔缩小, 限制宿主细胞对支架的浸润, 材料-宿主反应类型与合成材料类似, 出现慢性异物反应, 材料周围形成纤维囊“包裹”。

体内外降解的结果表明, SIS 补片与 BM/SIS 复合补片的降解速率接近, 这是由于 BM/SIS 复合补片与 SIS 补片主要成分均为胶原蛋白, 且两者均属于非交联的生物材料, 故耐受胶原蛋白酶的特性一致。BM/SIS 复合补片是将脱细胞后的 BM 与 SIS 以三明治结构和真空层压物理技术复合而成的非化

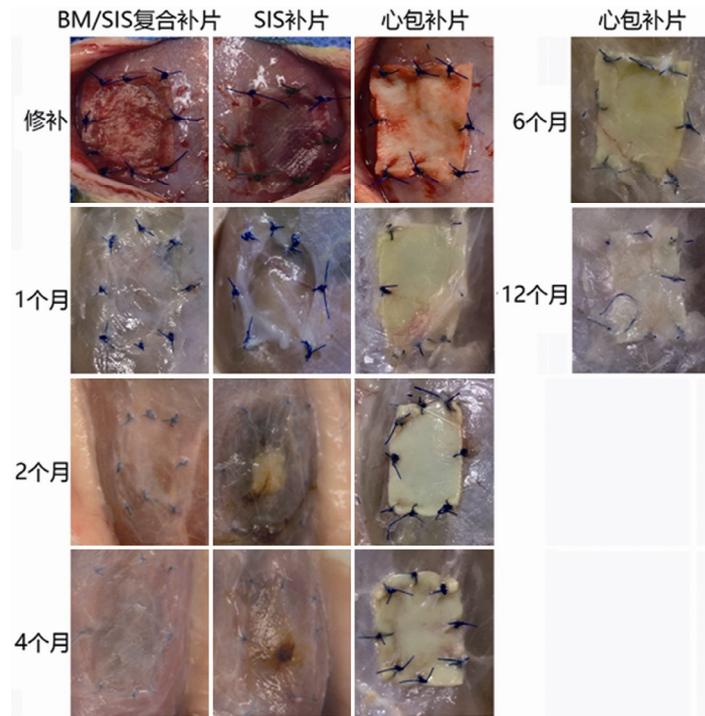


图3 不同补片植入大鼠腹壁肌缺损后的组织修复大体观

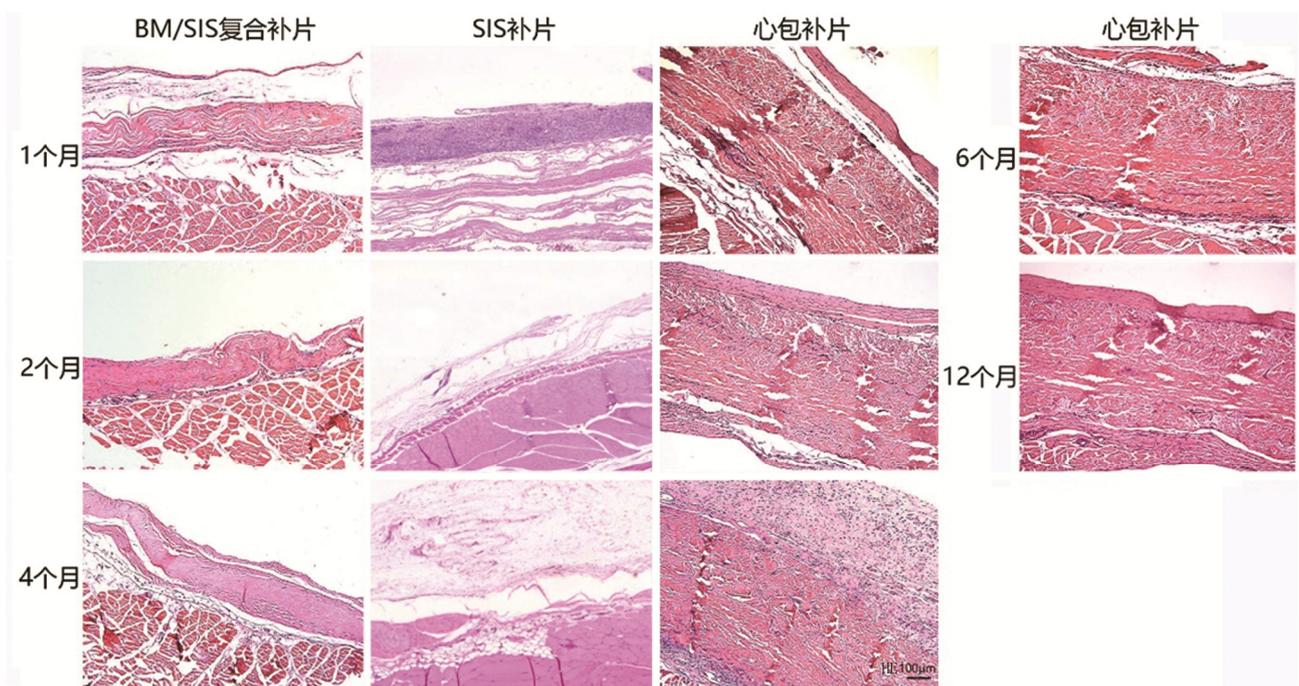


图4 生物补片植入大鼠腹壁肌缺损后不同时间内修复区中央区的组织学染色结果

学交联生物材料。本研究中 BM/SIS 复合补片 2 个月完成降解、修复组织缺损再生效果确切，再生组织重塑好，较 SIS 补片有更好的体内胶原组织再生效果，可能是与 BM 的联合作用有关。BM 富含纤连蛋白、糖胺聚糖、生长因子等活性成分和超过 5000 种多肽^[18-19]。其中，IV 型胶原和 VII 型胶原共同

存在，前者是上皮基底膜的重要组成^[18]。完整的基底膜可以帮助组织特异性细胞快速形成连续的片层、抑制瘢痕组织生成，引导机体实现功能性完全自我修复^[3]。Liu 等^[20]对 Bama 小型猪中所获取的 SIS、BM、脱细胞真皮、胆囊派生的 ECM 及 PC 等 5 种脱细胞补片进行了比较研究，结果表明 BM 在

亲水性、抗感染及促细胞增殖等方面有更优越的生物学特性,在将来可能成为盆底重建材料中的理想生物补片。这表明用BM作为制备生物补片的组织工程支架材料,具有很好的应有前景。

此外,BM可能是SIS材料具有组织诱导再生能力的源头。传统观点曾认为SIS中含有各种促进组织再生的成分,故能支撑肠黏膜上皮细胞的快速新陈代谢(每3天可更新1遍);但通过小肠横断面的组织学可见,是SIS内腔面的BM,而不是SIS(苏木精-伊红染色上呈紫色、致密的纤维结缔组织)支撑着肠黏膜细胞,故此BM较SIS有更好的促进组织再生的活性。SIS制备过程中在刮除黏膜时会有部分BM片段残留在SIS上^[21],很有可能是SIS上残留的片段BM带来了SIS的促组织再生活性。

体内外降解结果均表明化学交联PC补片降解慢,甚至可能基本不能降解。有学者认为,化学交联处理只是延缓了补片的降解,交联材料的组织长入在一段时间后与非交联材料相比无差异,与研究结果不一致^[17]。由于化学交联的补片不降解、上面也无孔洞利于组织液流动,植入后补片周围形成纤维包裹,一旦有细菌定植,很有可能细菌在补片表面形成生物被膜而致慢性感染。临床上有PC补片植入后慢性感染、窦道形成,经保守治疗2年未能痊愈,被迫二次手术取出补片;术中见补片周围慢性脓肿形成、补片结构完整,与本研究观察到的结果一致。部分观点认为生物补片应用于污染创面的疝修补较合成网片并无优势^[22]。笔者认为产生这一现象的原因就是交联生物补片所致,不适用于非化学交联生物补片。建议化学交联生物补片的使用原则应与合成不降解聚四氟乙烯和重量编织网片一样。

综上,BM/SIS复合补片具备优异的降解性能和诱导组织再生能力,修复区组织可快速重塑。提示了BM/SIS复合补片是理想的生物补片,BM是理想的组织来源。有关BM/SIS复合补片的其他生物学特性还需要进一步研究,以保证其临床应用中的安全性与有效性。

参 考 文 献

- [1] 杨凯,刘昶.生物补片的临床应用及研究进展[J].医学综述,2015,21(11):1951-1953.
- [2] 顾春飞,方胜利.不同类型生物补片在开放式无张力疝修补术中的回顾性对照研究[J/OL].中华疝和腹壁外科杂志(电子版),2019,13(5):433-436.
- [3] 程文悦,陈金水,刘耀婷,等.不同组织来源的生物补片修补腹壁

程文悦,杨旭霞,陈思诗,等.不同组织来源生物补片降解性能的比较研究[J/OL].中华疝和腹壁外科杂志(电子版),2021,15(1):97-101.

- 肌部分层次缺损的研究[J/OL].中华疝和腹壁外科杂志(电子版),2019,13(3):198-203.
- [4] 梅昕,马凤森,喻炎,等.高分子可降解生物材料的降解研究进展[J].材料导报,2016,30(27):298-302.
- [5] 张鹏,张永红.羟基丁酸-羟基辛酸共聚物-细胞软骨基质复合支架的制备与体外降解[J].中国组织工程研究,2012,16(21):3883-3814.
- [6] Han P, Cheng P, Zhang S, et al. In vitro and in vivo studies on the degradation of high-purity Mg(99.99wt%) screw with femoral intracondylar fractured rabbit model[J]. Biomaterials, 2015, 64: 57-69.
- [7] 杨磊,陈宇,朱良均,等.一种新型丝素支架材料的体内降解试验[J].蚕业科学,2011,37(4):713-718.
- [8] 陈长春,程海,孙康,等.生物可吸收性甲壳素纤维增强聚乳酸复合材料体内体外降解性研究[J].生物医学工程学杂志,2000,17(2):117-121.
- [9] Poranki D, Whitener W, Howse S, et al. Evaluation of skin regeneration after burns in vivo and rescue of cells after thermal stress in vitro following treatment with a keratin biomaterial[J]. J Biomater Appl, 2014, 29(1): 26-35.
- [10] 孙珍珠.脱细胞猪小肠黏膜下层疝修补片生物学特性研究[D].南宁:广西医科大学,2017.
- [11] 魏清荣,万昌秀,姚红卫,等.不同化学方法改性的牛心包体外降解规律的研究[J].生物医学工程学杂志,2003,20(2):214-218.
- [12] 钟杏霞.改性牛心包膜脱细胞基质应用于疝气补片的研究[D].广州:暨南大学,2015.
- [13] 贡雯玉,卞欢,吴海虹,等.高效液相色谱法检测鲫鱼不同组织中的胶原蛋白含量[J].食品科学,2015,36(14):65-69.
- [14] 马颂章.疝和腹壁外科生物学类修补材料再认识[J].中国实用外科杂志,2015,35(11):1153-1156.
- [15] Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering[J]. J Pediatr Surg, 2016, 51(1): 8-12.
- [16] Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction[J]. Semin Cell Dev Biol, 2002, 13(5): 377-383.
- [17] Liang HC, Chang Y, Hsu CK, et al. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern[J]. Biomaterials, 2004, 25(17): 3541-3552.
- [18] Engvall E. Structure and function of basement membranes[J]. Int J Dev Biol, 1995, 39(5): 781-787.
- [19] Marcal H, Ahrned T, Badylak SF, et al. A comprehensive protein expression profile of extracellular matrix biomaterial derived from porcine urinary bladder[J]. Regen Med, 2012, 7(2): 159-166.
- [20] Liu L, Li D, Wang Y, et al. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic(porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction[J]. Int Urogynecol J, 2011, 22(2): 221-227.
- [21] Brown B, Lindberg K, Reing J, et al. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix[J]. Tissue Eng Pt A, 2006, 12(3): 519-526.
- [22] Köckerling F, Alam N, Antoniou SA, et al. What is the evidence for the use of biologic or biosynthetic meshes in abdominal wall reconstruction?[J]. Hernia, 2018, 22(2): 249-269.

(收稿日期:2020-06-18)

(本文编辑:温玲玲)