

不同组织来源的生物补片修补腹壁肌部分层次缺损的研究

程文悦¹ 陈金水² 刘耀婷² 赵美彪² 王强¹ 张剑²

【摘要】 目的 探讨不同组织来源的生物补片体内组织重塑的差异,并提供信息供临床选择生物补片时参考。**方法** 选取健康SD大鼠,随机分组,每组10处缺损,建腹壁肌部分层次缺损模型并以基底膜(basement membrane, BM)/小肠黏膜下层(small intestine submucosa, SIS)复合细胞外基质补片、SIS补片、真皮补片和心包补片修补,设立未修补组为空白对照。术后2、4、8、16周评价修复区血清肿发生、皱缩率、植入降解比例,取修复区组织做组织学切片分析补片内组织长入、新生血管化、周围组织包裹情况。**结果** 实验期内,BM/SIS复合细胞外基质补片未发生血清肿,基本维持植入面积,术后4周再生高度有序的新生胶原替代缺损区域,术后8周补片降解。术后2周,SIS补片的血清肿发生率为65%,修复区早期大量炎性细胞浸润,再生胶原组织有序性较差,术后8周补片降解,术后16周皱缩率为 $-52.0\% \pm 9.8\%$ 。50%的真皮补片细胞浸润补片中央,完全降解。其余真皮补片出现纤维囊包裹,细胞仅浸润交界区,修复区显著扩张,实验期内无降解。心包补片仅少量细胞浸润交界区,无组织长入,术后16周皱缩率为 $-29.5\% \pm 14.0\%$,出现致密纤维囊包裹,实验期内无降解。**结论** 与SIS补片、心包补片和真皮补片相比,BM/SIS复合细胞外基质补片具备优异的组织修补和再生疗效。

【关键词】 生物补片; 基底膜; 猪小肠黏膜下层; 心包; 真皮基质

Experimental assessment of tissue repair of basement membrane in partial thickness defect in abdominal wall of rats Cheng Wenyue¹, Chen Jinshui², Liu Yaoting², Zhao Meibiao², Wang Qiang¹, Zhang Jian¹. ¹Department of Regenerative Medicine, Shanghai Jingan District Zhabei 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 To evaluate the therapeutic effects of biological grafts derived from different tissue, to provide reference information for the clinical choice of biological grafts. **Methods** Healthy SD rats were randomly divided into 5 groups ($n=10$). Bilateral partial thickness defect in abdominal wall of rats were created and repaired with either basement membrane (BM)/small intestine submucosa (SIS) composite extracellular matrix (ECM) graft, SIS, dermis or pericardium, while untreated defects were served as control. Animals were sacrificed at 2, 4, 8 and 16 weeks after surgery, the incidence of seroma, shrinkage in repair area and degradation of implants were recorded. The repaired abdominal walls were harvested for histological evaluation to observe cell ingrowth, neovascularization, and fibrous encapsulation. **Results** No seroma formation was observed in BM/SIS composite ECM graft repaired samples, and the samples replaced with dense and well-organized collagen fibers with mainly initial dimensions at 4 weeks post-surgery, degraded at 8 weeks post-surgery. There still presents massive inflammatory cells infiltration in SIS repaired area at 4 weeks post-surgery. At 8 weeks post-surgery, seroma incidence in SIS repaired samples was 65% and SIS was degraded. SIS had reconstructed tissue defects with a notable shrinkage rate

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-392X.2019.03.002

基金项目: 国家自然科学基金(81601237); 上海市自然科学基金(16ZR1433400); 上海市科委国际合作项目(16410724400); 上海市卫计委科研重点项目(201540388); 上海市科技支撑项目(16441904800)

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

of $-52.0\% \pm 9.8\%$. 50% of dermis repaired area was infiltrated by cells and fully degraded. Fibrous encapsulation was formed in other dermis repaired area and cells were only infiltrated in the interface area. Significant enlargement compared with original implant area and no obvious degradation were observed. During the experimental period, scarcely any cells infiltrated the scaffold of pericardium with a shrinkage rate of $-29.5\% \pm 14.0\%$ at 16 weeks post-surgery. No degradation was observed and fibrous encapsulations were formed in pericardium repaired samples. **Conclusion** BM composite graft has shown a better tissue regeneration compared with SIS, dermis and pericardium.

【Key words】 Biologic graft; Basement membrane; Small intestinal submucosa; Pericardium; Acellular dermal matrix

脱细胞基质生物补片是组织修复材料的发展趋势之一,其制备过程由天然组织如同种或异种真皮、心包、猪小肠黏膜下层(small intestinal submucosa, SIS)、基底膜(basement membrane, BM)等,彻底去除细胞成分以及可能引起体内免疫排斥反应或疾病传播的蛋白、核酸、病毒等物质,保留下细胞外基质后成型而得,而具备良好的生物安全性^[1]。随着临床应用逐渐增多,外科医师慢慢认识到脱细胞基质生物补片包含有多种组织修复机制。非交联脱细胞基质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;而化学交联生物补片则通过延缓材料降解、甚至永久植入物残留形成慢性炎症来刺激纤维组织生成而修复缺损。此外,目前对脱细胞基质生物补片的临床应用效果仍存在一定争议,因此本研究拟通过比较不同组织来源的补片植入肌肉缺损修复效果,评价补片在体内安全性和有效性、组织再生情况及并发症发生率,为临床使用提供建议。

材料与方法

一、实验材料与动物

实验材料:基底膜与小肠黏膜下层复合细胞外基质补片[卓阮医疗科技(苏州)有限公司安替生产品,以下简称BM复合补片],小肠黏膜下层补片(美国COOK公司Biodesign产品,以下简称SIS补片),人尸脱细胞真皮补片(美国Lifecell公司Alloderm产品,以下简称真皮补片),牛心包交联补片(美国Synovis公司Peri-guard产品,以下简称心包补片)。

实验动物:健康SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司),雌性,体质量190~210 g,清洁级。大鼠均经过5 d适应性饲养后开始实验。

二、方法

1. 实验方法^[2]: (1) 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0.5 ml 7%水合氯醛(w/v,生理盐水配制),褪去腹部毛发,取腹部正中切5 cm长切口,游离双侧皮下,于双侧腹直肌外侧切除1.5 cm×1.5 cm大小腹外斜肌、腹内斜肌,保留腹横肌;(2)分别使用与缺损同等大小(1.5 cm×1.5 cm)的不同补片植入修补缺损,4/0聚丙烯缝线间断缝合8针;3/0可吸收缝线间断缝合腹部,并设立缺损空白对照,共计5组,每个时间点每组补片10处缺损。

2. 术后随访:(1)术后每天观察大鼠大体情况,包括基本活动、修复区血清肿/血肿发生率、感染、腹壁运动、补片降解情况,其中手术区域明显隆起,高于皮肤平面2 mm以上判定为血清肿;(2)术后第2、4、8、16周处死大鼠,每个时间点每组补片10处缺损,取各组补片的修复区组织,评价补片内组织长入(细胞浸润情况、胶原纤维有序性)情况、新生血管化情况、纤维囊包裹情况、补片皱缩/扩张率、补片降解情况。

三、统计学分析

采用SPSS 22.0软件包进行统计学处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组采用均数t检验,3组以上比较采用One-way ANOVA检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、修复区大体观察

术后所有大鼠存活情况良好。术后2周25%的SIS补片修复区(10/40)发生严重血肿,其余各组均未发生严重血肿,20%的心包补片修复区(8/40)和65%的SIS补片修复区(26/40)发生血清肿,BM复合补片和真皮补片未见血清肿发生(表1)。各组材料皱缩率无显著性差异。5/10的真皮补片和心包补片出现轻度纤维囊包裹。术后4周,SIS补片修复区发生皱缩 $-21.5\% \pm 7.5\%$ 。BM复合补片

表1 大鼠术后2周各组补片修复区大体观察[处(%)]

组别	缺损数(各时间点总和)	感染或腹壁运动障碍发生率	血清肿发生率	血肿发生率
BM 复合补片	40	0	0	0
SIS 补片	40	0	26(65)	10(25)
真皮补片	40	0	0	0
心包补片	40	0	8(20)	0

表2 大鼠术后各时间点各组补片修复区皱缩/扩张率(%, $\bar{x} \pm s$)

时间点	缺损数	术后2周	术后4周	术后8周	术后16周
BM 复合补片	10	-4.5±5.7	-5.9±6.5	-8.5±4.1	-12.5±7.9
SIS 补片	10	-7.0±7.6	-21.5±7.5	-39.0±11.0	-52.0±9.8
真皮补片 未降解	5	-2.0±5.7	-1.0±7.4	27.0±14.8	41.0±16.7
真皮补片 降解	5	-0.6±6.8	-5.0±10.0	2.0±13.5	-2.0±13.0
心包补片	10	-7.6±6.5	-11.4±9.5	-24.5±13.4	-29.5±14.0

注: 术后4周: $P=0.001$, BM 复合补片 vs SIS 补片; $P<0.001$, SIS 补片 vs 真皮补片(未降解); $P=0.006$, SIS 补片 vs 真皮补片(降解)。术后8周: $P<0.001$, BM 复合补片 vs SIS 补片; $P<0.001$, BM 复合补片 vs 真皮补片(未降解); $P=0.025$, BM 复合补片 vs 心包补片; $P<0.001$, SIS 补片 vs 真皮补片(未降解); $P<0.001$, SIS 补片 vs 真皮补片(降解); $P=0.011$, 真皮补片(未降解) vs 真皮补片(降解); $P<0.001$, 真皮补片(未降解) vs 心包补片; $P=0.001$, 真皮补片(降解) vs 心包补片。术后16周: $P<0.001$, BM 复合补片 vs SIS 补片; $P<0.001$, BM 复合补片 vs 真皮补片(未降解); $P=0.024$, BM 复合补片 vs 心包补片; $P<0.001$, SIS 补片 vs 真皮补片(未降解); $P<0.001$, SIS 补片 vs 真皮补片(降解); $P=0.001$, SIS 补片 vs 心包补片; $P<0.001$, 真皮补片(未降解) vs 真皮补片(降解); $P<0.001$, 真皮补片(未降解) vs 心包补片; $P=0.002$, 真皮补片(降解) vs 心包补片。

表3 大鼠术后各时间点真皮补片(未降解)和心包补片修复区纤维囊包裹厚度(μm , $\bar{x} \pm s$)

组别	缺损数	术后2周	术后4周	术后8周	术后16周
真皮补片(未降解)	5	10.4±4.5	22.0±4.5	27.0±10.5	25.0±6.8
心包补片	10	17.3±8.4	70.1±15.8	196.3±28.4	280.4±39.9
P 值		0.114	<0.001	<0.001	<0.001

和 SIS 补片部分降解。术后8周, BM 复合补片和 SIS 补片基本降解(图1), 5/10 的真皮补片开始降解, 心包补片仍维持植入形态。SIS 补片和心包补片均出现明显皱缩。术后16周, BM 复合补片、SIS 补片、真皮补片(未降解)、真皮补片(降解)和心包补片的皱缩/扩张率分别为(-12.5%±7.9%)、(-52.0%±9.8%)、(41.0%±16.7%)、(-2.0%±13.0%)、(-29.5%±14.0%), 其中 BM 复合补片和真皮补片(降解)未发生明显皱缩, SIS 补片和心包补片的修复区皱缩, 而真皮补片(未降解)的修复区(5/10)明显扩张(表2)。

二、组织学观察

术后2周, HE 染色结果(图2)表明 BM 复合补片修复区炎性细胞大量浸润和血管化, 补片明显分层; SIS 补片已经开始降解, 可见材料-宿主交界区大量血管新生。真皮补片和心包补片内仅较少细胞浸润交界区。

术后4周, BM 复合补片内炎性细胞开始消退, 提示组织重塑的初步完成, 修复区被高度有序的新生胶原纤维替代; SIS 补片内仍存在大量

炎性细胞浸润。BM 复合补片、SIS 补片和降解的真皮补片未出现纤维囊包裹, 心包补片和未降解的真皮补片可见致密纤维囊包裹(表3), 厚度分别为(70.1±15.8) μm 和(22.0±4.5) μm , 纤维囊包裹的补片仅有少量细胞浸润交界区。此外, 未降解真皮补片植入前的厚度显著大于降解真皮补片[(0.45±0.11) mm vs (1.01±0.26) mm, $P<0.001$]。

术后8周, BM 复合补片组织重塑基本完成, 炎性细胞完全消退, 修复区以成纤维细胞为主; SIS 补片中央区由于材料降解过快, 仅交界区组织再生情况良好, 补片中央未实现良好的组织重塑。5/10 的真皮补片细胞完全浸润, 补片降解。但心包补片和纤维囊包裹的真皮补片中央区仍无细胞浸润, 补片未降解, 纤维囊包裹进一步增厚。

术后16周, BM 复合补片和 SIS 补片均完全降解, 修复区完全由新生胶原纤维替代, 组织学形态与8周基本一致。心包补片实验周期内未见明显降解, 细胞仅少量分布于交界区, 纤维囊包裹进一步增厚。

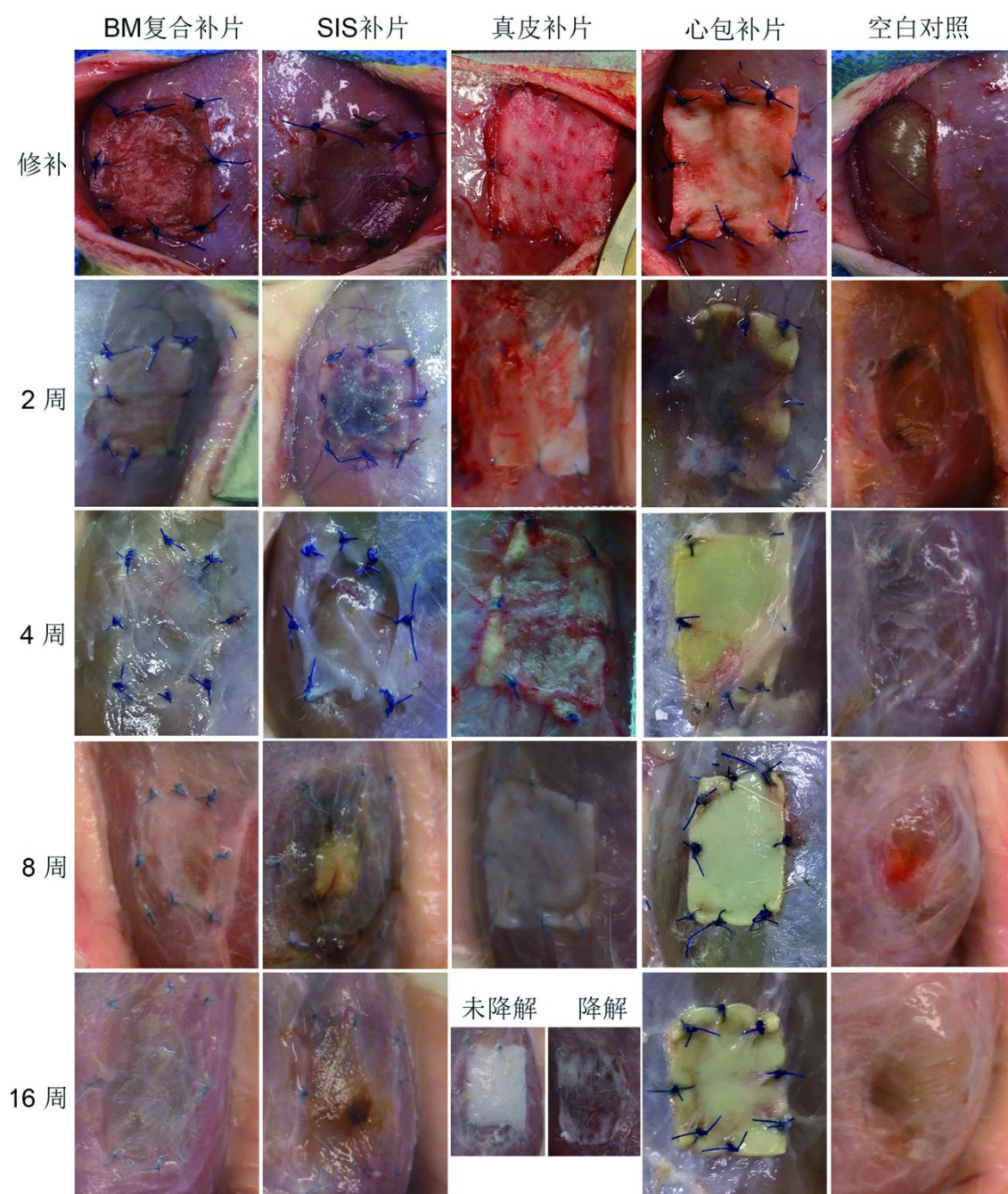


图1 大鼠腹壁肌部分层次缺损模型修补及术后组织重建大体观

讨 论

国外市场上生物疝修补片主要为 SIS、真皮、心包、BM 源产品,国内市场上主要为小肠黏膜下层、真皮、心包产品,亦可分为交联和非交联产品。目前对于各种产品的组织修复效果的优劣比较鲜有报道,因此,本研究考察 SIS、真皮、心包和国内自主研发的新型材料-基底膜/小肠黏膜下层复合细胞外基质补片修补大鼠腹壁肌部分层次缺损的治疗效果,为临床修补材料的选择提供参考。

本研究发现 SIS 植入后血清肿发生率高达 65%。Beale 等^[3]报道的血清肿/血肿/疼痛等并发症发生率为 40.2%, Gupta 等^[4]报道血清肿发生率甚至高达 90% (10/11)。本研究中 SIS 的高血清肿的发生率与手术方式无直接相关性,而与材料自身性能相关。组织学结果中可见 SIS 修复区大量炎性细胞浸润,提示炎症反应剧烈,这可能是由于 SIS 取材自受肠内容物污染的小肠,其所携带的生物负载在脱细胞过程中无法彻底脱除,导致植入后引起排斥反应和血清肿。国家食品药品监督管理局济南医疗器

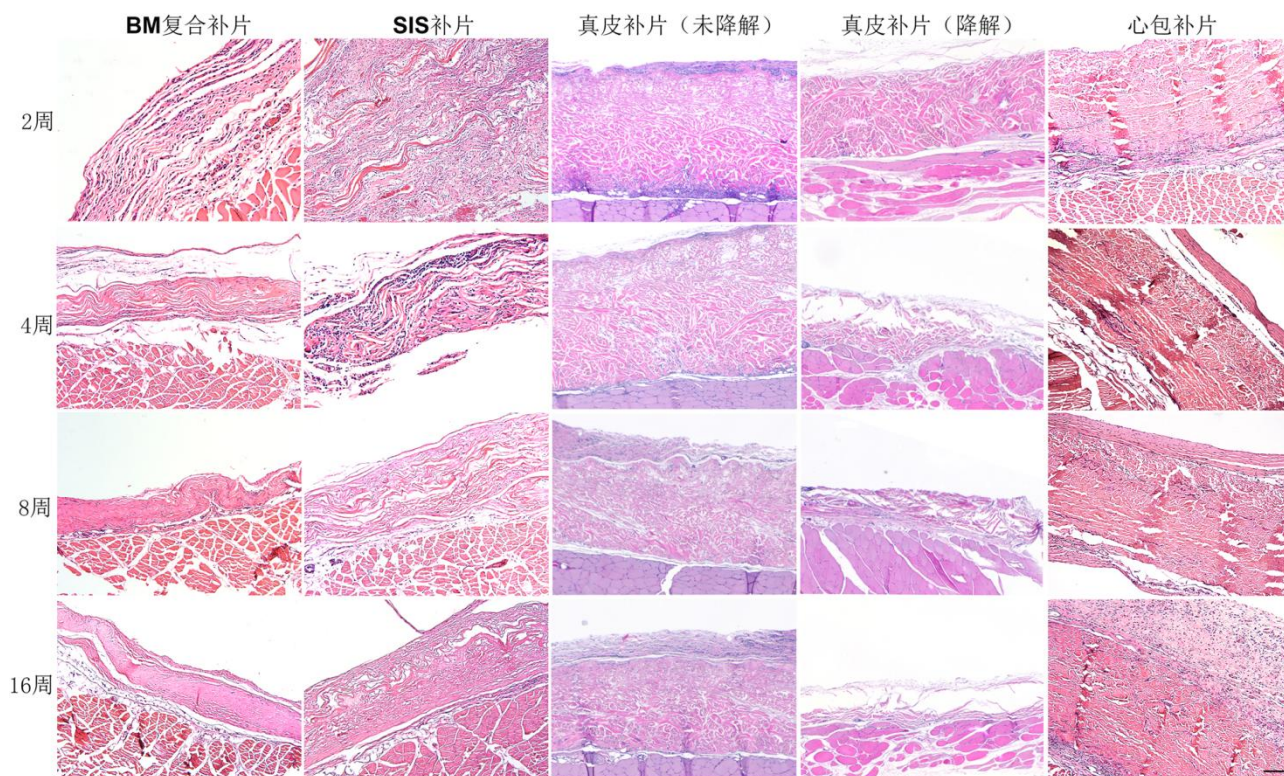


图2 大鼠术后2~16周修复区组织学染色结果

械质量监督检验中心出具的报告显示 SIS 补片的体外细胞毒性实验细胞存活率仅 2%，细胞毒性分级为 4 级（报告编号：S2018050710），提示其可能生物负载超标。剧烈的炎症反应刺激成纤维细胞浸润，分泌无序的纤维组织填充缺损，在这种情况下即使移除补片仍不会导致疝复发^[5]。SIS 补片修复区的明显皱缩可能同样是剧烈炎症反应的表现^[6]。

而 BM 复合补片虽然也含有 SIS，但其结构为 BM 作为上下表面，SIS 作为中间层，SIS 与修复区无直接接触。由于 BM 自身免疫原性极低，几乎无生物负载；且富含可以调节修复区免疫反应的活性因子^[7-8]，因此 BM 复合补片修复区无剧烈炎症反应，无血清肿发生，基本维持植入面积。BM 是隔离细胞与结缔组织、支撑上皮细胞/内皮细胞/肌细胞/雪旺细胞的特化 ECM 结构，呈网膜状、柔软而坚韧^[9]。BM 富含纤连蛋白、糖胺聚糖、生长因子等活性成分和超过 5 000 种多肽^[10-11]，完整基底膜可以帮助组织特异性细胞形成连续的片层、抑制瘢痕组织生成，引导机体实现功能性完全自我修复，如子宫内膜、皮肤、肌肉、角膜等。本研究中 BM 复合补片和单纯 SIS 补片相比，BM 可以缩短组织重塑时间，提升新生胶原纤维的有序性，后期可以使用大动物模型对再生组织的力学强度进行进一

步验证。

实验期内观察到仅 50% 的真皮补片完全重塑，其余 50% 的真皮补片植入区周围可见明显纤维囊包裹，细胞仅少量长入交界区。对比植入时数据，发现未降解真皮补片的平均厚度均大于降解真皮补片，这可能是由于补片厚度增加、补片植入量增大、细胞难以长入真皮致密的结构导致。由于纤维囊内的“免疫逃逸”状态，我们推测较厚的真皮补片虽然为非交联材料，同样可能存在永久植入物残留。此外，真皮补片富含降解缓慢且人体 25 岁后不可再生的弹性蛋白，不利于胶原有序性再生，导致修复区易松弛，未降解真皮补片的修复区可观察到显著的扩张^[12]。

根据大体观照片、胶原纤维的结构和不同时间点细胞浸润数量的变化可以看出，交联心包补片在实验期内几乎无降解，且无细胞浸润至补片中央，无血管长入。这是由于交联后胶原蛋白的三螺旋支架间发生黏结，阻碍胶原酶对材料的降解和细胞的长入^[13]，最终在修复过程中纤维性包膜的产生远胜于“重塑”过程，补片周围形成纤维囊包裹，交联植入物永久存在，因此不适合应用于污染或感染创面^[14-15]。

综上，BM/SIS 复合细胞外基质补片具备优异

的组织修复和诱导再生疗效,修复区组织快速重塑,再生组织胶原纤维有序。与其他组织来源补片相比,BM/SIS 复合细胞外基质补片较 SIS 补片显著降低了修复区血清肿和皱缩等不良反应发生率,较真皮补片避免了修复区失弹性、膨出的不足;同时完全可降解,无永久异物残留,是理想的生物补片组织来源。

参 考 文 献

- [1] Londono R, Badylak SF. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling[J]. Ann Biomed Eng, 2015, 43(3): 577-592.
- [2] Zhang J, Hu ZQ, Turner NJ, et al. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template[J]. Biomaterials, 2016, 89: 114-126.
- [3] Beale EW, Hoxworth RE, Livingston EH, et al. The role of biologic mesh in abdominal wall reconstruction: a systematic review of the current literature[J]. Am J Surg, 2012, 204(4): 510-517.
- [4] Gupta A, Zahriya K, Mullens PL, et al. Ventral herniorrhaphy: experience with two different biosynthetic mesh materials, Surgisis and Alloderm[J]. Hernia, 2006, 10(5): 419-425.
- [5] Akyol C, Kocaay F, Orozakunov E, et al. Outcome of the patients with chronic mesh infection following open inguinal hernia repair[J]. J Korean Surg Soc, 2013, 84(5): 287-291.
- [6] 陈富强, 申英末. 生物补片在疝和腹壁外科的应用及研究进展[J/CD]. 中华疝和腹壁外科杂志(电子版), 2016, 10(5): 364-368.
- [7] Sadtler K, Sommerfeld SD, Wolf MT, et al. Proteomic composition and immunomodulatory properties of urinary bladder matrix scaffolds in homeostasis and injury[J]. Semin Immunol, 2017, 29: 14-23.
- [8] Jacobs HN, Rathod S, Wolf MT, et al. Intra-articular injection of urinary bladder matrix reduces osteoarthritis development[J]. AAPS J, 2017, 19(1): 141-149.
- [9] Turner NJ, Badylak SF. The use of biologic scaffolds in the treatment of chronic nonhealing wounds[J]. Adv Wound Care(New Rochelle), 2015, 4(8): 490-500.
- [10] Engvall E. Structure and function of basement membranes[J]. Int J Dev Biol, 1995, 39(5): 781-787.
- [11] Marçal H, Ahmed 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.
- [12] Ko JH, Salvay DM, Paul BC, et al. Soft polypropylene mesh, but not cadaveric dermis, significantly improves outcomes in midline hernia repairs using the components separation technique[J]. Plast Reconstr Surg, 2009, 124(3): 836-847.
- [13] 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.
- [14] Delgado LM, Bayon Y, Pandit A, et al. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2015, 21(3): 298-313.
- [15] 张剑. 非交联生物补片临床相关事项分析[J]. 手术, 2016, 1(2): 26-29.

(收稿日期: 2018-12-28)

(本文编辑: 李晓霞)

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肌部分层次缺损的研究[J/CD]. 中华疝和腹壁外科杂志(电子版), 2019, 13(3): 198-203.