

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.12.003
文章编号: 1005-8982 (2019) 12-0012-04

微粒皮移植联合医用自凝集水凝胶修复 家兔全层皮肤缺损的实验研究

陈斌¹, 王晓辉¹, 李睿智², 史梦柔¹, 李东风², 于欢²,
刘伟伟¹, 崔晓雪¹, 刘山海¹, 高萍¹

(1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2. 爱美客技术发展股份有限公司,
北京 100022)

摘要: 目的 评价自凝集水凝胶(医用可注射聚羧甲基葡萄糖胺凝胶)的皮内刺激反应, 以及该材料与微粒皮移植联合对全层皮肤缺损的疗效。**方法** 依据国家标准 GB/T 16886.10—2005, 对该材料进行皮内刺激反应安全性评价。麻醉家兔背部, 切除 3.5 cm × 3.5 cm 全层皮肤。切下的皮肤裁剪成 1 mm × 1 mm 的微粒皮, 将微粒皮在创面上摆放, 滴洒水凝胶原液于创面。通过凝胶自凝完成微粒皮固定, 用制备好的异体兔脱细胞真皮紧密覆盖创面、缝合。观察 4 周, 修复创面做病理观察。**结果** 自凝集水凝胶无潜在的皮内刺激。凝胶联合微粒皮移植术 4 周后伤口完全愈合且有毛发生长, 病理切片可见皮肤创面修复, 炎症细胞浸润较轻。

结论 自凝集水凝胶对局部皮肤组织无刺激。凝胶联合微粒皮移植可促使创面皮肤组织的修复再生。

关键词: 移植物; 水凝胶类; 设备安全性; 生物相容性材料

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

Treatment effect of micro-skin transplantation combined with medical self-agglutination hydrogel for whole skin defect in rabbits

Bin Chen¹, Xiao-hui Wang¹, Rui-zhi Li², Meng-rou Shi¹, Dong-feng Li², Huan Yu²,
Wei-wei Liu¹, Xiao-xue Cui¹, Shan-hai Liu¹, Ping Gao¹

(1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China; 2. Imeik Technology
Development Co, Ltd, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To evaluate the intradermal stimulation response of medical self-agglutination hydrogel (carboxymethyl glucosamine) and the effect of it combined with micro-skin transplantation on animal experiments. **Methods** According to the national standard GB/T 16886.10-2005, intradermal stimulation test of this material was evaluated. The whole skin of 3.5*3.5 cm was excised from the back of anesthetized rabbits. The cut skin was cut into 1*1 mm fine micro-skin. Micro-skin was placed on the wound surface. The hydrogel stock solution was dripped onto the wound surface. Micro-skin was fixed by hydrogel self-coagulating, then the wound surface was tightly covered and sutured with the prepared allogenic rabbit acellular dermis. Rabbits were observed for 4 weeks, and the repaired wound surface was cut for pathological observation. **Results** No abnormality was found in intradermal stimulation test after 4 weeks of hydrogel combined with micro-skin transplantation. The wounds healed completely and had hair growth. Pathological findings showed that the skin of wound surface repaired and the infiltration of inflammatory cells was light. **Conclusions** The self-agglutination hydrogel has no irritation to local skin tissue. Hydrogel combined with micro-skin transplantation can promote the repairment and regeneration of wound skin tissue.

收稿日期: 2018-12-09

[通信作者] 高萍, E-mail: gaopingcao@sina.com; Tel: 13752371576

Keywords: transplantation; hydrogel; equipment safety; biocompatible materials

本研究将有一定黏合能力和组织修复活性的自凝集水凝胶(医用可注射聚羧甲基葡萄糖胺凝胶)联合微粒皮移植,评估其修复动物大面积全层皮肤创伤的效果。实验中使用以羧甲基葡萄糖胺为主要前体的产品,其凝胶原液和双重交联剂液体混合后,在物理和化学催化下,可温和、迅速地变为有黏附性的弹性凝胶,且有一定强度,对微粒皮起到保护和固定作用。自凝集水凝胶使用方便,与微粒皮移植手术联用于皮肤创面愈合。

1 材料与方法

1.1 材料和实验动物

医用可注射聚羧甲基葡萄糖胺凝胶(北京爱美客技术发展股份有限公司),凝胶原液和聚合剂分别装载在双联装置的 2 个针筒内(批号 20141008,北京爱美客技术发展股份有限公司),麻醉用戊巴比妥钠(批号 127K1005,北京化学试剂公司),生理盐水(批号 4D74G1,天津大冢制药有限公司),芝麻油(批号 A0318542,比利时 ACROS 公司),家兔(北京隆安实验动物养殖中心)。

1.2 方法

1.2.1 皮内刺激实验 ①浸提液制备:将实验样品推弃掉初始端 0.5 ml 后取余下混合样品,30 min 凝胶凝固后,以 0.2 : 1.0 比例制备浸提液,浸提介质分别为生理盐水和芝麻油。②皮内刺激:家兔 2 只,背部去毛备皮,75% 乙醇消毒皮肤,于脊柱两侧各选择 10 个注射点,每点间隔 2 cm,每点皮内注射 0.2 ml 实验液。左侧前后 5 点分别注射实验样品生理盐水浸提液和溶剂对照生理盐水;右侧前后 5 点分别注射实验样品芝麻油浸提液和溶剂对照芝麻油。注射后 24、48 及 72 h 观察注射局部及周围皮肤组织反应。

1.2.2 自凝集水凝胶联合微粒皮移植 ①用物理冻融法制备脱细胞真皮:家兔背部皮下取薄中厚断层皮片,-70℃条件下反复冻融,用十二烷基硫酸钠溶液反复超声清洗,得到脱细胞真皮。病理切片观察脱细胞效果。②自凝集水凝胶联合微粒皮移植:将实验组 5 只家兔麻醉,背部切除全层皮肤,形成 3.5 cm × 3.5 cm 缺损创面,并取刃厚皮切碎成 1 mm × 1 mm 微粒皮,直接用自体微粒皮摆放创面,液态黏合凝胶原液滴洒,待凝胶自凝(约 1、2 min)即实现微粒皮固定,创口

封闭;再用准备好的自制脱细胞真皮紧密覆盖创面,将真皮四角与周围皮肤缝合固定,包扎伤口。同时设 3 个对照组,分别为不植入微粒皮组、不使用凝胶组及凡士林纱布覆盖物组(将脱细胞真皮改为凡士林纱布),其余步骤与实验组相同,各组 5 只家兔。观察期为 4 周,观察伤口愈合情况。③病理观察:切取愈合创面皮肤,立即浸入 10% 中性甲醛固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡及包埋后切片,用苏木精-伊红染色法(HE)行常规病理检查。

2 结果

2.1 皮内刺激实验结果

自凝集水凝胶的生理盐水和芝麻油浸提液的局部组织反应综合平均计分与溶剂对照平均计分之差均为 0.0,符合标准中平均计分之差 <1.0 的要求,产品无刺激性。

2.2 家兔异体脱细胞真皮的脱细胞效果

镜下纤维组织中未见残存细胞,脱细胞效果良好。见图 1。

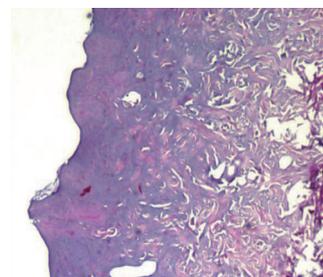


图 1 脱细胞真皮 (×40)

2.3 自凝集水凝胶联合微粒皮移植的伤口愈合情况

实验组 4 周后脱细胞真皮脱落,伤口均完全愈合并生出毛发。愈合创面 HE 染色常规病理切片下可见表皮层与真皮层修复较好,有少量炎症细胞。不植入微粒皮组在 4 周创口处仍有约 2 cm × 2 cm 区域结痂。病理可见结痂区域周围有大量脓细胞和炎症细胞。不使用凝胶组 4 周伤口愈合,有 2 只有局部较小结痂或增生,病理切片显示多数缺损的表皮层与真皮层修复较好,小结痂或增生处表皮层已修复,但真皮和皮下有较多炎症细胞浸润。凡士林纱布覆盖物组家兔 4 周后创面均完全愈合,病理结果与实验组相近。见图 2、3。

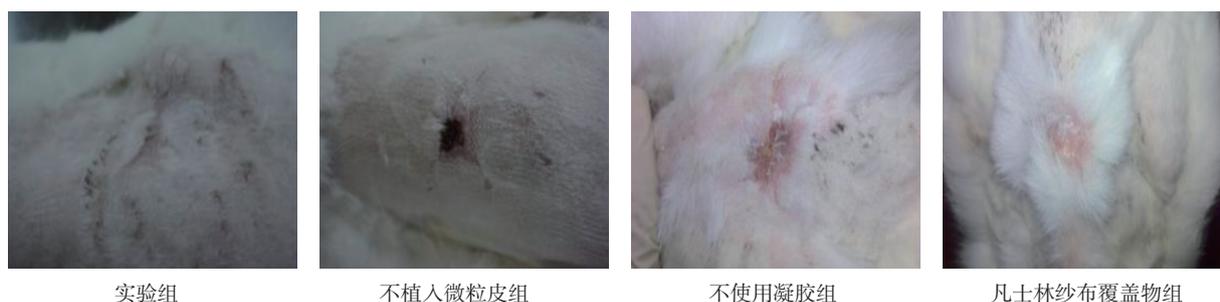
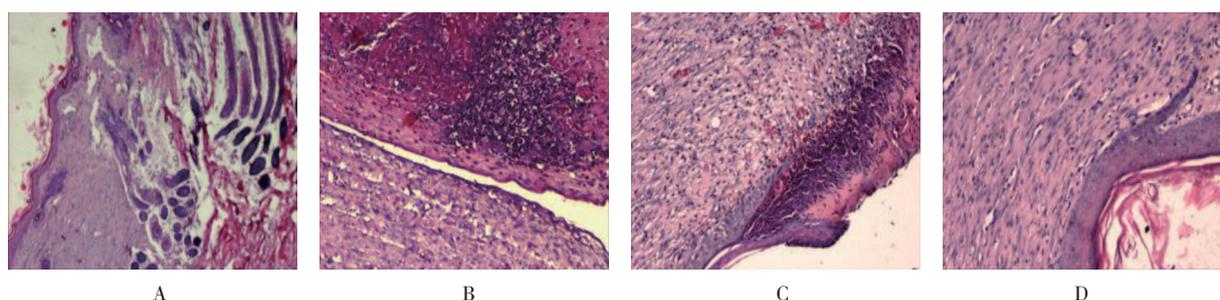


图 2 各组术后 4 周创面愈合情况



A: 实验组 (×100); B: 不植入微粒皮组 (×40); C: 不使用凝胶组 (×40); D: 凡士林纱布覆盖物组 (×40)

图 3 各组术后 4 周创面病理切片图

3 讨论

目前, 临床用人工皮治疗大面积皮肤缺损局限很多, 如种子细胞通常来源于新生儿包皮组织。使用异体细胞会引起排异反应, 如选用自体皮肤细胞, 需要体外培养一定时间, 不适用于紧急手术^[1], 且结构和力学强度等无法与自体皮肤组织相比^[2]。除仍在实验阶段的干细胞人工皮外, 都不具备皮肤附属器官^[3]。自体微粒皮移植是另一种修复大面积严重皮肤损伤的临床治疗方式, 实验中家兔在自体微粒皮移植术后, 新生皮肤的结构较好, 镜下可见附属器官, 还可见新生毛发。

自体微粒皮移植, 指将面积 $<1 \text{ mm}^2$ 自体皮片^[4] 植于皮肤创面上, 并在接种面上敷以保护层 (如异体皮、脱细胞皮肤及人工真皮或高分子敷料甚至普通敷料^[5-9]) 的皮肤移植术, 用于治疗大面积深度烧伤或皮肤剥脱的治疗。术中所用自体皮与创面面积比约为 1:10 ~ 1:20^[10], 可缓解短时间内自体皮源有限而创面面积较大的矛盾^[11]。

实验中不使用凝胶组部分创面在愈合后有局部小结痂和增生, 推断与微粒皮植入后的异位翻转有关。邱宇轩等^[12] 使用小型猪皮肤缺损模型, 未解决微粒皮定位问题。自凝集水凝胶能进行原位交联, 在伤口处

迅速形成凝胶, 很好地解决微粒皮定位问题, 有效提高微粒皮的成活率。张旭辉等^[13] 用脱细胞真皮微粒与微粒皮混合种植证明, 合适的基质支持对微粒皮的生长修复有利。本实验采用新上市的医用可注射聚羧甲基葡萄糖胺凝胶与微粒皮移植手术联合, 创口处快速成形凝胶, 保护伤口, 为移植组织的生长提供结构支持。相比黏附力较差的透明质酸类等凝胶^[14], 本实验采用的产品还有一定的黏附性能。4 周的实验观察中, 实验组家兔皮肤愈合良好, 未出现微粒皮翻转导致的局部小结痂等病变。而覆盖物脱细胞真皮改为用凡士林纱布后, 发现创面修复效果尚可, 提示将自凝集水凝胶联合微粒皮移植可降低对覆盖物的要求, 节约手术成本。

在手术中局部填充自凝集水凝胶抑制组织黏连, 能起到很好的抗黏连效果^[15]。本研究也证实, 该材料生物相容性好, 无皮肤刺激性。手术观察发现自凝集水凝胶的黏合强度还有待提高, 未来的研究可进一步优化配方, 提高其机械性能和黏合强度。远期可使自凝集水凝胶结构中连入附着功能性分子, 通过其与细胞膜的化学连接^[16-17], 加强微粒皮细胞与创口面的结合作用; 另外, 凝胶中引入一些活性分子, 并用某些方法使其定向分布, 可诱导和促进皮肤组织生长和血管形成, 这些都是未来的研究方向。

参 考 文 献:

- [1] WORTSMAN X, NAVARRETE N. Two-dimensional and three-dimensional ultrasound of artificial skin[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 36(1): 225-230.
- [2] SHEVCHENKO R V, JAMES S L, JAMES S E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, 7(43): 229-258.
- [3] ZENG R X, HE J Y, ZHANG Y L, et al. Experimental study on repairing skin defect by tissue-engineered skin substitute compositely constructed by adipose-derived stem cells and fibrin gel[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(3): 1-5.
- [4] 赵德君. 微粒皮机与 Meek 植皮机修复大面积烧伤创面的效果对比 [J]. *中国医疗器械信息*, 2017, 23(9): 78-79.
- [5] 李武全, 刘军, 江河, 等. 脱细胞猪皮覆盖自体微粒皮治疗大面积深度烧伤创面的临床研究 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(4): 511-513.
- [6] 陈宝国, 田晓东, 黎凤明, 等. 脱细胞猪皮与异体皮覆盖在大面积烧伤自体微粒皮移植中的应用对比研究 [J]. *中国美容医学杂志*, 2017, 26(11): 29-33.
- [7] 汤永喆, 何奇, 亓发芝. 微粒皮复合人工真皮构建的组织工程皮肤用于大鼠巨大创面修复的研究 [J]. *中国临床医学*, 2015, 22(2): 117-121.
- [8] 解英, 冷崇燕, 汪虹, 等. 高分子生物复合膜作为微粒皮移植覆盖物的实验研究 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(16): 2617-2621.
- [9] 郑家全, 侯勇, 杜丽苹, 等. 凡士林纱布贴附微粒皮移植修复 III 度烧伤创面 18 例 [J]. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(3): 192-193.
- [10] 李允. 自体微粒皮植皮术不同扩展比大面积, 严重烧伤患者的干预效果 [J]. *中国卫生标准管理*, 2016, 7(6): 55-56.
- [11] MIRAHMADI F, SHADPOUR M T, SHOKRGOZAR M A, et al. Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering[J]. *Materials for Biological Applications*, 2013, 33(8): 4786-4794.
- [12] 邱宇轩, 张国安, 万江波, 等. 自交联透明质酸钠凝胶联合异种脱细胞真皮基质覆盖对猪全层皮肤缺损创面愈合的影响 [J]. *中国烧伤杂志*, 2016, 32(9): 555-559.
- [13] 张旭辉, 黄勇, 徐盈斌, 等. 自体微粒皮与异体脱细胞微粒真皮混合移植对大鼠创面 MMP1, MMP10 表达的影响 [J]. *现代预防医学*, 2012, 39(10): 2527-2530.
- [14] 尹刚, 陈汇浩, 郭兴锋, 等. 温敏性壳聚糖止血膜的止血作用及体内降解吸收 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18 (34): 5461-5465.
- [15] 苏迪娅, 刘松, 王世炜, 等. 椎板切除神经根损伤后聚羧甲基葡萄糖胺产品抗瘢痕粘连的效果 [J]. *中国康复理论与实践*, 2015(1): 45-48.
- [16] LIU Y, HE M, NIU M, et al. Delivery of vincristine sulfate-conjugated gold nanoparticles using liposomes: a light-responsive nanocarrier with enhanced antitumor efficiency[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 3081-3086.
- [17] SERGEY P, MACRO W, JENS U S, et al. Nanoparticle-induced permeability of lipid membranes[J]. *American Chemical Society Nano*, 2012, 6(12): 10555-10561.

(唐勇 编辑)