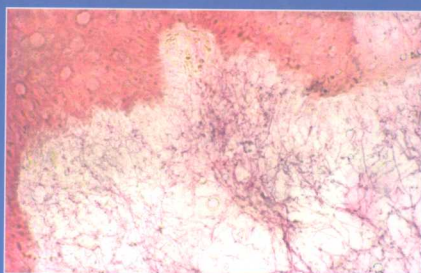
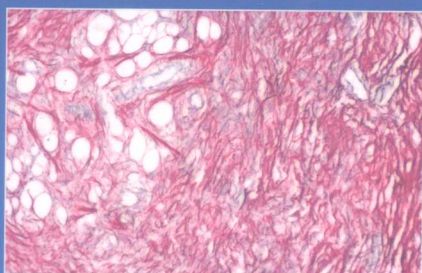
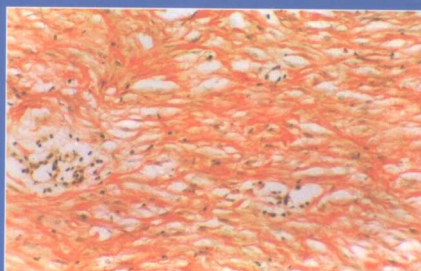
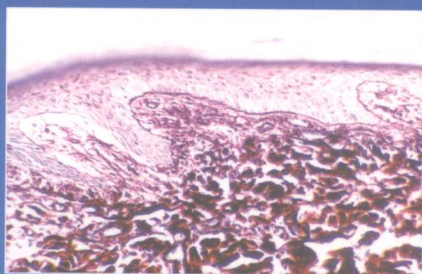


Transplantation of Composite Skin

复合皮移植

陈 璧 贾赤宇 主编



第四军医大学出版社

复合皮移植

Transplantation of Composite Skin

主编

陈 璧 贾赤宇

副主编

姜笃银 许伟石

编著者

(以姓氏笔画为序)

丁国斌(第四军医大学西京医院烧伤科 博士)

许伟石(第二医科大学瑞金医院烧伤研究所 教授)

杨定文(江苏省南京市鼓楼医院烧伤整形科 教授)

吴秋合(山东省济南市中心医院烧伤科 副主任医师)

陈 璧(第四军医大学西京医院烧伤科 教授)

姜笃银(江苏省泰州市第四人民医院 副主任医师)

创伤整形研究所

贾赤宇(第四军医大学西京医院烧伤科 教授)

夏照帆(第二军医大学长海医院烧伤研究所 教授)

韩军涛(第四军医大学西京医院烧伤科 讲师)



第四军医大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

复合皮移植/陈璧, 贾赤字主编. —西安: 第四军医大学出版社, 2004.10
ISBN 7-81086-090-9

I. 复… II. ①陈…②贾… III. 皮肤-移植术(医学) IV. R622

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 103730 号

复合皮移植

主 编 陈 璧 贾赤字
责任编辑 徐文丽
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路 17 号 (邮编: 710032)
电 话 029-83376765
传 真 029-83376764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 人民日报社西安印务中心
版 次 2004 年 10 月第 1 版 2004 年 10 月第 1 次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 16 印张 2 印张彩色插页
字 数 360 千字
书 号 ISBN 7-81086-090-9/R·95
定 价 40.00 元

(版权所有 盗版必究)

前 言

烧伤为平、战时常见皮肤损伤。纵观我国几十年烧伤创面处理手段,多采用大张异体皮打洞嵌植小片自体皮、网状和点状植皮、微粒植皮等手段救治大面积深度烧伤患者,但治愈后畸形发生率高。尤其是大面积Ⅲ度烧伤患者,由于自体皮源严重缺乏,很难再进行后期的整形治疗而导致终生残废,国内外众多学者均无良策。为了使这类患者减少畸形发生率,使伤者不残,残者不废,最大限度地恢复其功能,提高他们的生活质量,烧伤研究以改进深度烧伤的修复方法和利用有限的自体皮源为突破口,并已成为烧伤领域研究中的重点和难点。人们希望有一种理想的创面覆盖物,它应具备良好的组织弹性、抗摩擦性和外观质地近似正常皮肤,而复合皮(composite skin)是一种永久性替代物,是由自体表皮和异体/异种真皮或人工真皮组成,被认为是目前最接近正常皮肤结构的皮肤代用品,故其一问世,就引起世人关注。

国内外不少科研人员为了寻求真皮组织的替代物而开展了大量的研究,尤其是脱细胞异体/异种真皮。本书反映了复合皮移植方面的最新研究成果,包括脱细胞真皮的制作和复合皮移植的方法和临床效果、移植后基底膜重塑、各种组织学的构建,真皮基质的稳定性、移植后的炎症、免疫反应和细胞外基质的变化等。大量的实验数据表明,复合皮移植后能够改善创面的愈合质量,具有良好的稳定性;有利于基底膜的重塑,促进表皮和真皮之间的连接;降低胶原代谢,增加透明质酸含量,早期促进纤维连接蛋白的表达,而后期则抑制其表达,这对抑制瘢痕增生有重要意义。以上结果都优于单纯自体刃厚和薄中厚皮的移植。

脱细胞异体真皮的国产化为国人提供了满意的组织工程学修复材料,一经应用至临床就显示了其良好的可操作性和实用性。由于脱细胞真皮的抗原性很低,移植后不易被排斥,可永久存在于宿主体内。另外,脱细胞真皮可引导组织再生,神经、血管生长和基底膜形成,因此为上皮细胞的定植与上皮化提供了天然平台,使它发挥永久性真皮支架和引导组织再生的真皮“模板”作用。复合皮移植的创面愈合后,无论是外观,还是柔软度与弹性,堪与中厚自体皮移植效果相媲美。复合皮移植揭开了皮肤移植领域中崭新的一页,为皮源奇缺的烧伤或瘢痕畸形患者提供了一种全新的治疗方法。

脱细胞真皮基质不具备皮肤最主要的功能,即缺乏免疫细胞,不具备免疫监视功能,缺乏毛囊、汗腺、皮脂腺等附件。这些细胞、组织的重建也是今后研究的重点。组织工程化的器官型活性皮肤将是 21 世纪烧伤界最有希望和最有价值的应用型科研成果。

复合皮是近十几年来的一项新型成果,有不少地方尚未完全成熟,书中难免存在一些问题以及错、漏之处,祈盼读者及同道们予以批评指正。

陈 璧

2004 年 10 月

目 录

第一章 复合皮的研究和进展	(1)
第一节 表皮细胞培养与移植	(1)
一、表皮细胞培养的目的与方法	(1)
二、表皮细胞膜片的移植	(2)
第二节 复合皮的产生与种类	(4)
一、复合皮的由来	(4)
二、复合皮的种类及其特点	(4)
第三节 复合皮的基础研究	(7)
一、脱细胞真皮基质的制作、结构和主要成分	(7)
二、脱细胞真皮基质的作用机制	(8)
三、脱细胞真皮基质存在的问题	(8)
四、复合皮的成活条件与过程	(9)
五、弹性纤维与复合皮	(11)
六、复合皮与类脂化合物	(11)
七、复合皮与色素细胞	(12)
八、复合皮与基因治疗	(13)
九、复合皮与免疫排斥反应	(14)
第四节 复合皮移植的常用方法	(14)
第五节 复合皮的临床应用	(15)
第二章 异体表皮(培养的和非培养的)与异体真皮复合移植的实验研究	(26)
第一节 异体表皮(培养的和非培养的)与异体脱细胞真皮复合移植的对比研究	(26)
第二节 培养的自体角质细胞膜片与脱细胞异体真皮重组复合皮移植的实验研究	(29)
第三章 脱细胞异体/异种真皮基质的研制和生物学特性	(33)
第一节 正常真皮的组织形态学和主要抗原物质	(33)
一、正常真皮的组织形态学	(33)
二、正常真皮组织中的主要抗原物质	(36)
第二节 异体/异种皮肤脱细胞处理的研究历史	(37)
一、异种移植的基本概念和研究进展	(38)

二、培养的表皮细胞移植物与真皮替代物的产生	(41)
三、脱细胞异体/异种真皮基质的研究历史	(41)
第三节 器官特异性脱细胞基质的研究进展	(43)
一、AMGs 的基本特点	(43)
二、AMGs 的炎症-免疫学特点	(44)
第四节 脱细胞异体/异种真皮基质的研制和生物学特性	(44)
一、猪和人皮肤通用抗原标志的比较研究	(44)
二、不同方法制备的异体/异种脱细胞真皮基质的抗原性比较	(46)
三、脱细胞异体/异种真皮基质的组成及其生物学性状	(48)
第四章 脱细胞真皮基质移植后细胞外基质的变化	(54)
第一节 细胞外基质与瘢痕的关系	(54)
一、胶原	(54)
二、蛋白多糖和糖胺多糖	(57)
三、纤维连接蛋白	(58)
第二节 脱细胞真皮基质移植后细胞外基质的变化	(59)
第五章 脱细胞异体/异种真皮基质移植实验及其免疫学反应特征	(66)
第一节 人工皮肤的一般概念	(66)
一、皮肤创伤愈合对人工皮肤的需要	(67)
二、临床常用的皮肤移植方法简介	(68)
三、复合皮的组成、构建和分类	(69)
四、真皮替代物产品的质量控制和安全评价	(70)
第二节 脱细胞异体/异种真皮基质复合移植实验	(73)
一、异体/异种 ADM 复合移植实验	(73)
二、影响双层 CS 成活的相关因素	(77)
三、双层 CS 的二次上皮化及其发生机制	(82)
第三节 脱细胞真皮基质复合移植后的免疫反应特征	(83)
一、移植免疫反应基础	(84)
二、异体/异种 ADM 在体移植后的炎症-免疫学反应	(87)
三、ADM 移植后炎症免疫反应机制探讨	(88)
四、小 结	(95)
第六章 复合皮结构再生与功能重建	(100)
第一节 脱细胞真皮基质在体移植后的稳定性及其影响因素	(100)
一、脱细胞真皮基质在体移植后的稳定性	(100)
二、影响脱细胞真皮基质稳定性的相关因素	(102)

第二节 真皮-表皮连接处结构再生与复合皮功能重建	(111)
一、真皮-表皮连接处结构和功能	(111)
二、基底膜Ⅳ型胶原和蛋白多糖的分子调控机制	(116)
三、真皮-表皮连接结构再生与复合皮功能重建	(121)
四、表皮细胞增殖的不平衡性与 DEJ 结构再生机制	(126)
五、脱细胞真皮基质的 BMZ 重塑作用	(128)
第三节 神经支配恢复对复合皮移植质量的影响	(131)
一、正常皮肤的神经支配	(132)
二、皮肤神经结构和功能常用的研究方法	(132)
三、皮肤神经功能异常对炎症免疫和创伤修复结局的影响	(133)
四、真皮替代物诱导神经再生及其与皮肤质量的关系	(139)
第四节 (异体)成纤维细胞对复合皮存活和成熟的影响	(146)
一、真皮成纤维细胞在创伤修复中的作用	(146)
二、人工真皮中异体成纤维细胞的重要性	(147)
三、免疫反应与异体成纤维细胞存活	(150)
四、对脱细胞真皮基质和活性异体真皮研究的反思	(152)
第五节 脱细胞真皮基质的引导性组织再生作用	(153)
一、“组织引导性再生作用”学说	(153)
二、ADM 交联与真皮模板作用	(154)
第七章 复合皮移植	(161)
第一节 创伤修复概述	(161)
第二节 皮肤的组织学结构	(162)
一、表皮、真皮、皮下组织	(163)
二、血管、淋巴管、神经分布	(164)
第三节 皮肤的生理功能	(165)
一、屏障作用	(165)
二、温度调节作用	(166)
三、吸收作用	(166)
四、分泌和排泄作用	(166)
五、皮肤的再生和愈合	(166)
第四节 游离皮片移植的分类与适应证	(167)
一、皮片移植的作用与价值	(167)
二、皮片的分类特点与适应证	(168)
三、植皮前准备	(169)
四、取皮术	(171)
五、皮片移植	(172)

六、术后处理	(173)
七、皮片的生长与血运重建	(173)
八、皮片生长后的变化特征	(174)
第五节 复合皮的临床应用	(176)
一、复合皮移植的适应证	(177)
二、复合皮移植的术前准备	(178)
三、复合皮移植的具体步骤	(178)
第六节 脱细胞真皮在医学领域的应用	(185)
一、各种组织缺损的修复	(186)
二、面部软组织缺损的修复	(186)
三、眼科整形	(186)
四、AMGs 对膀胱、尿道和输尿管的重建作用	(188)
五、AMGs 的阴道重建作用	(189)
六、AMGs 在心血管系统中的重建作用	(189)
第八章 表皮干细胞与组织工程化皮肤	(192)
第一节 组织多能干细胞	(192)
一、干细胞及其特征	(192)
二、胚胎干细胞与组织干细胞	(193)
三、组织干细胞的可塑性	(195)
第二节 表皮干细胞	(195)
一、表皮干细胞及其细胞学特征	(195)
二、表皮干细胞的鉴定	(197)
三、表皮干细胞的组织学定位	(199)
四、表皮干细胞的分化调控	(200)
五、表皮干细胞的体外培养	(201)
第三节 表皮干细胞与皮肤附件	(203)
一、毛囊	(204)
二、汗腺	(206)
三、与附件相关的重要细胞	(207)
第四节 组织工程化皮肤	(208)
一、定义及特征	(208)
二、组织工程化皮肤的分类	(209)
三、组织工程化皮肤研究展望	(212)

第一章 复合皮的研究和进展

第一节 表皮细胞培养与移植

一、表皮细胞培养的目的与方法

自 1975 年 Rheinwald 和 Green 发表了具有里程碑意义的有关文献,即《人角质细胞的系列培养:从单个细胞到克隆形成》之后,表皮细胞培养得到了普及。国内外有较多的烧伤学者投入这项工作,主要目的有以下几点:①为大面积烧伤的创面覆盖以及瘢痕的整形手术等提供表皮;②提供组织工程的种子细胞;③为皮肤病机制的探讨提供依据;④是异体器官移植排斥机制研究的工具之一。

表皮细胞培养方法根据取材方式不同分为两大类型:一是组织块培养法,二是细胞悬液培养方法。两种方法各有利弊:组织块培养法,操作简单,易于实施,但面积扩增效果有限,培养过程中很难得到完全不残留孔隙的完整细胞膜片;细胞悬液培养方法,面积扩增较快,一般经一次传代后所得膜片可增至数百倍至一千倍,但操作要求严格。1981 年曲森森等在国内首次报道了采用新生大鼠的表皮细胞培养成单层膜片,回植至大鼠背部创面后生长为复层上皮。1984 年汤朝武等改进了人表皮细胞的培养技术,采用表皮细胞悬液点状接种法,将混合均匀的细胞悬液呈梅花状滴入皿中,每皿接种 7 个点,每点 1 滴悬液,细胞数约为 $(1 \sim 1.5) \times 10^6 \times 0.05\text{ml}/\text{点}$,呈圆形,直径为 $5\text{mm} \sim 6\text{mm}$,点间距离为 10mm 。其实验结果表明,原代培养与对照组相比,人表皮细胞悬液点状接种法,具有接种细胞数少,单层铺满载体快等优点,比一般接种方法面积扩大 3~4 倍(彩图 1-1,彩图 1-2),传代成功率为 91.6%。陈璧对人表皮细胞培养的增殖进行了动态观察,将原代培养后 5d、10d、15d、20d……50d 和继代培养的细胞及细胞单层,用扫描电镜和透射电镜对细胞的增殖和分化进行动态观察。在培养过程中,细胞继续增殖、分化,呈稳定的平衡状态。在扫描电镜下,看到贴壁的细胞增殖形成细胞群落,并不断扩展融合成细胞单层,细胞表面有绒毛和皱褶,细胞间以突起相连,有的呈有丝分裂(彩图 1-3~彩图 1-6),有的脱屑。在透视电镜下看到培养细胞分 3 个区(彩图 1-7~彩图 1-14),即基底细胞、中间层细胞和上层细胞区。基底细胞不断分裂增殖,向上推移,形成中间层和上层细胞,这种分化过程与正常表皮相似。整个过程一直持续到有增生能力的细胞耗竭为止。上述表皮细胞在培养中的生物学特征提示:经培养的细胞单层,最好在培养 3 周左右进行移植为宜,此时间段移植存活率高;移植时以基底细胞层贴于创面,以利细胞的增殖。表皮细胞培养是研究异体移植排斥机制的重

要手段,此外,与移植排斥密切相关的抗原提呈细胞——Langerhans 细胞也备受重视。1978 年张仕君等对人表皮细胞培养中 Langerhans(LC) 细胞进行了研究,结果表明在培养过程中 LC 细胞逐渐减少,7d 减少了 90% 以上,3 周内基本消失,提示培养的同种异体表皮细胞移植后,因其中的 LC 细胞大幅度减少,其存活时间可能延长。

LC 来源于骨髓,成熟后进入血液循环,随血液循环到达表皮定居。LC 表面抗原及受体与巨噬细胞相比较,两者都有 HLA-D/DR,可被 C36 激活,分泌 IL-1,可诱导 T 淋巴细胞进入表皮,导致细胞免疫反应,最终使移植失败。Morhenn 和 Hefton 等相继提出,角质细胞(keratinocyte, KC)经培养后,其中的 LC 减少或消失,HLA-DR 明显减少,甚至消失,因此培养的 KC 异体移植后可较长时间地存活,这为应用异体培养的角质细胞膜片(cultured keratinocyte sheet, CKS)治疗烧伤创面开辟了广阔的前景。虽然异体 CKS 不导致明显的排斥反应,但是 Johnson 指出,培养基中加入了胎牛血清,其中的蛋白能结合到人表皮细胞膜上,这些异种蛋白会诱发受体的免疫反应,导致移植物失活和下一次移植的排异反应,故发展一种无血清的培养方法将有助于异体 KC 移植的应用。

随着细胞培养技术的发展和进步,目前表皮细胞的培养方法主要有以下几种:

1. 滋养层培养法 由 Rheinwald 1975 年建立,其特点是以小鼠 3T3 细胞作滋养层,并使用含胎牛血清的培养液。该法优点为培养的表皮细胞增殖速度快,传代好;缺点为 3T3 细胞为异种细胞,可产生对机体不利的代谢产物和抗原,培养液中的胎牛血清蛋白和培养的表皮细胞膜结合,易导致植皮后的排斥反应,故这种方法目前很少应用。

2. 无滋养层培养法 特征是无滋养层细胞,使用无血清的培养液,表皮细胞可直接于培养皿底部进行增殖。该法操作方便,形成膜片时间早,没有异种蛋白影响。目前该方法应用较广泛。

3. 气-液界面培养法 传统的表皮细胞培养法是使细胞于培养液液面以下生长,这在一定程度上阻碍了表皮细胞生发层的自然分化和基底膜的形成,而气-液界面培养法应用异种(体)真皮或真皮替代物作为基底物质,或在培养基中接种成纤维细胞形成真皮类似物,而后在其表面接种自体表皮细胞,并升至气体-液体界面处培养。表皮细胞大多数暴露于空气中,在近似生理的条件下,得到充分的分化,最终形成具有表皮层和类似真皮结构的皮肤类似物。移植后可达到长期存活的目的,且创面愈合后平滑、光亮、美观。与传统培养法相比,该法培养的表皮细胞角化程度增大,具有半桥粒和基底膜结构,代表了表皮细胞培养技术发展的新方向。

二、表皮细胞膜片的移植

为验证培养的 KC 异体移植后不导致免疫排斥的理论是否正确,1993 年, Cairns 等选用 CBA 和 B6 雌性小鼠作为实验对象,将培养的 CBA 小鼠的原代 KC 移植于 B6 小鼠,于术后 3d~21d 间断测定混合淋巴细胞反应及血清细胞毒素抗体,发现 T 淋巴细胞反应及细胞毒素抗体滴度未升高,证实未产生排斥反应。但他们观察的时间较短,3 周后是否发生排斥反应,尚不明确。1986 年, Thivolet 等临床应用 3 例,移植于左前臂全层皮肤缺损处,面积为

120cm²。用间接免疫荧光法、ABO/RH 血型测定,以及混合淋巴细胞反应检测,最长观察 5 个月,均未发现排异反应,愈后效果好。Hefton, Madden, Mauduit 都先后发表了与此结论相同的文章。但反对的学者也很多。Arons 等指出,通过组织学、HLA-DR 抗原表达、组织免疫、DNA 杂交和指纹等先进技术检测的结果均不支持此结论。Alsbjorn 和 Tompkins 等在移植后最初几周用性染色体分析方法也未能证实同种 KC 的存在,故目前对培养的 KC 异体移植不产生排斥的结论尚有争议。曲淼淼等在新生鼠培养的 KC 同种移植后第 21 天取材,发现细胞膜片下组织中有少量淋巴细胞浸润,个别创面还见到移植的表皮细胞被增生的结缔组织包围的现象,提示为早期的排异现象。张余光等认为培养的 KC 虽不含 MHC-II 类抗原,但 I 类抗原和非主要组织相容性抗原依然存在,同时,移植后受体内的 LC 可移行进入移植的 KC 中,启动排斥反应。Hansbrough 等的临床应用证实,CKS 中已消失的 HLA-DR 抗原,移植后在一定条件下能够恢复。一般在移植后 7d, KC 中就可发现含有 II 类抗原及 HLA-DR 阳性的细胞。Arons 等认为 10d~22d 后发生排斥反应,比中厚皮片移植晚 5d,排斥反应表现为移植物溶解、坏死、大量单核细胞渗入真皮,还有被激活的 T 淋巴细胞,表皮细胞单个坏死,出现含有 HLA-DR 抗原的细胞,最终表皮溶解,并与真皮分离。其机制是,供体细胞含有 MHC I 类抗原或非 MHC 抗原,受体 LC 进入移植物,可携带这些抗原提呈细胞,引起排斥反应。但排斥反应稍推迟,需要受体 LC 的移行、进入、吞噬、加工、再移行出移植物,将抗原提呈给受体的淋巴细胞,故推迟的时间正好与 LC 移入移植物所需要的时间相同。

另一个问题是 CKS 的成活率和治愈效果。1984 年 Callico 等用自体 CKS 在治疗 2 例 95% TBSA 烧伤儿童中,成功地覆盖了一半以上的创面。这为进一步发展、推广 CKS 的应用注入了活力。1985 年日本熊谷惠夫报导将培养的表皮细胞单层移植在 1 例 72% 的深 II 度烧伤创面上获得成功;1989 年 Callico 等将培养的皮肤片移植在焦痂切除后的创面亦获成功;1984 年陈璧将培养的人表皮细胞膜片移植于烧伤创面和深的供皮区创面共 41 例(46 例次),一次移植面积为 75cm²~825cm²,移植存活率在供皮区为 86%,削痂创面为 61.2%,愈合时间较对照组明显缩短。第三军医大学采用组织块培养取得成功,亦移植于烧伤创面,部分取得成功。此后很多类似的治疗也获得了成功。很多学者认为早期临床效果是满意的,早期收缩情况同自体刃厚皮移植相同,瘢痕增生情况与网状皮移植后形成的“卵石状”外形相比,则要轻微得多,且色素沉着较轻,表面滑润,具有一定的强度和弹性。Compton 等研究了 CKS 不同时期的标本,发现再生的表皮,其早期组织形态几乎与传统用的网状自体刃厚皮移植相同,在移植后 5~18 个月中再生了网嵴,3 年后出现了弹力纤维。而在对照组的自体刃厚皮片移植后,既无网状嵴,又无弹力蛋白出现。同时发现在移植后 3 周锚状纤维的形态与密度方面,两者完全相同。至 1~2 年后锚状纤维的大小,密度和结构的复杂程度更接近于正常皮肤。但仍存在一些问题:局部易发生感染、细胞膜片脆性大、不耐磨、不抗压、成活率不稳定,特别在缺乏真皮时更为突出。Woodley 等发现 CKS 移植后效果不稳定,易产生自发性水泡,他认为这是由于皮肤中锚状纤维或基底膜形成的畸变,及缺乏皮嵴和真皮乳头所致。综合正反两方面的观点,对 CKS 的长期效果仍未能达成共识。

第二节 复合皮的产生与种类

一、复合皮的由来

及时合理的覆盖创面对成功治疗大面积深度烧伤至关重要。由于现代医学的发展,特别是复苏措施的改进、超广谱抗生素的应用、高能量营养品的问世以及护理医学的进步,大大增加了大面积烧伤患者的生存率。然而,自体皮源不足仍是临床治疗中最为棘手的难题。为克服这一难题,人们于20世纪70年代发明了自体表皮细胞培养技术,并逐步加以改进,使之能应用于临床。但是,由于自体表皮细胞缺乏真皮结构,移植后很脆弱,抗感染能力差,导致其移植后成功率很不稳定,而且,体外培养周期一般需3周,不能及时满足临床需要,另外移植存活后易产生严重的瘢痕挛缩,因此,单纯的角质细胞培养与移植的方法目前已趋于淘汰。

现多主张采用中厚或刃厚皮移植来治疗大面积烧伤,虽有不少优点,但也存在以下的不足:①供皮区成为新创面,创面的扩大增加了全身性炎症反应的程度;②供皮区可遗留瘢痕和色素沉着;③远期治疗效果不甚理想;④对老年及婴儿烧伤患者,以及伤前有其他疾病或伴有吸入性损伤患者,他们的承受力弱,抵抗力差,采用适宜的伤口覆盖方式,尽量减少供皮区的面积就显得更为重要。

基于以上问题,人们一直在寻求更加理想的皮肤替代物。它应具有以下特性:①与创面贴附;②耐磨;③有较好的柔顺性;④与正常皮肤的水蒸发量相近;⑤对细菌有屏障作用;⑥有一定的止血功效;⑦使用简便,伤后可立即应用;⑧在不引起异物反应或自身免疫反应的前提下,能诱导创面产生“再生样”反应;⑨移植后无明显收缩,且具有一定的生长潜力。此外,还应具有较低的成本、与表皮结构类似的良好通气性能、能适用不同类型的创面、可以适用儿童的生长发育、自我更新周期较长等特性。因表皮在保持皮肤的水价和细菌屏障方面有重要作用,而真皮组织不仅可控制炎症反应和伤口收缩,还可激发移植后新生真皮的改建,在提高皮肤的柔韧性和耐磨性方面起决定性作用,因此,包含表皮和真皮的皮肤替代物——复合皮就孕育而生。

二、复合皮的种类及其特点

鉴于单纯自体表皮细胞膜片的移植效果不尽如人意,人们想到了在细胞膜片下方增加类似真皮的支持物,以提高创面愈合质量。20世纪80年代以后,人们用真皮及应用组织工程技术制成各种真皮替代物,用于创面覆盖,而后在上面接种培养的自体表皮细胞膜片或自体断层皮片,以实现创面的永久覆盖。大量的研究发现,真皮及真皮替代物可为其上方贴附的表皮细胞提供附着和增殖的三维支架,影响表皮细胞的迁移,提高表皮细胞膜片的移植成功率,并改善愈合效果。

目前主要有以下几种类型的复合皮。

(一) 异体真皮 + 自体表皮

采用各种方法去除异体皮肤上的表皮层,而后将真皮部分覆盖创面,在上面移植培养的自体表皮细胞膜片或自体薄层皮片。其优点是可以立即应用,但真皮中残留的上皮成分仍可引发机体产生免疫排斥反应,且存在感染的潜在危险,故在临床上较少应用。

(二) 脱细胞真皮基质 + 自体表皮

用新鲜异体或异种皮肤,先去除表皮层,再对真皮层进一步特殊处理,主要是去除真皮中的细胞成分,并用醛基进行交联,仅保留细胞外基质结构和完整的基底膜,其表面覆盖自体刃厚皮或培养的角质细胞膜片。制备真皮基质的方法不同,所保留的细胞外基质和细胞决定簇(cellular determinants)的量也不同,移植效果也有差异。

这类真皮替代物的代表是由美国得克萨斯 Life Cell 公司生产的,经过特殊程序处理的同种异体脱细胞真皮基质,商品名为 AlloDerm。AlloDerm 支持宽而薄的网状自体皮覆盖,其效果相当于原来的自体皮移植。

此类产品的优点有:①真皮可提前预制,伤后可立即应用;②真皮基质的结构类似于体内真皮基质;③可抵抗创面胶原酶的消化,无明显的排斥反应;④宿主真皮细胞容易重新长入;⑤可减轻瘢痕的形成;⑥容易使用、消毒和贮存。主要缺点有:①缺乏活的成纤维细胞,这可能延缓真皮重建;②无细胞异种真皮基质的胶原可能引起免疫反应;③市售产品只达到真皮替代,没有达到表皮重建,必须覆盖自体皮或培养的表皮细胞膜片;④有传播病毒的危险。

目前,同类的产品已完全国产化。如北京桀亚莱福生物技术有限责任公司生产的 J-1 型脱细胞异体真皮(生产批准号为:HDJY1 001-2001),在国内已较广泛应用,临床效果满意。

(三) 无细胞胶原海绵 + 自体表皮

它是利用组织工程技术,用 I 型牛胶原纤维和氨基葡聚糖类 6-硫酸软骨素制成的人工真皮支架,厚度为 2mm,可被生物降解。该支架结构为多孔隙状,孔径大小约 $70\mu\text{m} \sim 200\mu\text{m}$,可诱导创面基底的成纤维细胞、毛细血管、内皮细胞长入,合成胶原和新生血管,形成与真皮结构相似的“新型真皮”。其外层是一层极薄的多聚硅氧醇(硅胶)膜,厚度约 $100\mu\text{m}$,孔径小于 $5\mu\text{m}$,可控制水分流失和阻止细菌侵入,具有类似正常皮肤中表皮的屏障作用。它可移植在切痂后的烧伤创面上,2~3 周后,“新生真皮”完全取代人工真皮。此时可去掉其表层的硅胶膜,换以超薄自体刃厚皮或自体表皮细胞培养膜片覆盖,实现永久性覆盖。代表产品是 Burke 和 Yannas 等研制的双层人工皮肤,商品名为 Integra™,由美国 Integra Life Sciences 公司制造,1996 年获美国食品与药物管理局(FDA)批准用于临床。日本 GUNZE 公司也开发了一种双层人工真皮 Pelanac™,由海绵状猪皮肤胶原组成内层,硅胶膜组成外层(不含氨基多糖),临床移植 3 周后揭去硅胶膜可见合成的真皮样组织。于其上移植 0.02cm 的自体薄层皮肤获得满意的疗效。

该类皮肤的优点有:①可立即应用;②允许移植超薄自体皮;③产生严重瘢痕的程度比单独移植中厚皮轻;④易于工业化生产和贮存;⑤交联处理后提高了对创面胶原酶的抵抗力;⑥形状、大小和厚度易于改变;⑦有良好的机械性能。主要缺点有:①易感染,要求创面新鲜、清洁;②费用昂贵;③使用动物胶原可能有病毒感染和免疫反应的风险;④可能诱发

自身免疫性疾病。

(四)合成网膜 + 自体表皮

该系列由双层结构构成,表层也是采用硅胶膜,内层则由尼龙纤维网或聚乳酸纤维网构成支架,将新生儿成纤维细胞种植于网孔之中。成纤维细胞在支架内繁殖,分泌胶原、氨基多糖、生长因子等,形成真皮基质,并将自身埋于基质中。临床应用表明,其效果优于或等同于异体皮。该系列中由不可降解的尼龙纤维构成网架的产品只能作为烧伤创面的暂时性覆盖物,而由可降解的聚乳酸纤维构成网架的产品可作为支持表皮重建的真皮基质。

由 Advanced Tissue Sciences 公司生产的 Dermagraft-TC™ 系列是此类真皮替代物的代表。它是把新生儿成纤维细胞培养在合成的尼龙网中构成,1996 年已获 FDA 批准用于临床。Advanced Tissue Sciences 公司中生产的另一种人真皮替代物 Dermagraft™,是由新生儿包皮成纤维细胞种植在可降解的聚乳酸纤维网上组成,其表层用一硅橡胶膜覆盖以限制水分蒸发,可结合超薄自体刃厚皮移植。移植后 3~4 周聚乳酸由于生物降解而消失。该产品在临床上已成功用于治疗糖尿病性溃疡。

还有一种人真皮替代物为尼龙网 + 成纤维细胞 + 角质细胞。这个系统是由一尼龙网状膜支撑,有代谢和分裂活性的真皮和表皮层复合而成。是在生物化学和形态学上模仿人类皮肤的一种三维立体人体皮肤组织模型。其特点为新生儿的成纤维细胞可分泌有功能的、有活性的细胞外基质蛋白,然后再种植新生儿的角质细胞。其代表为 Skin2™。

成纤维细胞 + 尼龙网膜,或成纤维细胞 + 可生物吸收网膜的主要优点有:①高度抵抗创面胶原酶消化;②允许移植到污染的烧伤创面;③允许烧伤清创后立即移植;④无病毒感染风险。但其也有缺点:①生产合成网膜真皮替代物需要大量成纤维细胞;②网膜难以改变的厚度;③市售产品只达到真皮重建。

(五)胶原三维立体凝胶替代物 + 表皮细胞

将成纤维细胞以一定密度种植于以 I 型胶原为主的凝胶中,其表面再种植自体表皮细胞膜片。这种复合皮的特性与种植的成纤维细胞的密度、体外培养的条件有一定的关系。胶原凝胶替代物的优点有:①细胞凝胶的组织学表现接近正常真皮;②不必加入可能释放毒性物质的合成聚合体和交联剂;③所需细胞量相对较少;④市售产品达到一次外科手术同时重建真皮和表皮。主要缺点有:①胶原凝胶可收缩 80% 左右,但可通过锚定凝胶(anchored gel)的方法来避免表面积收缩;②胶原凝胶抵抗胶原酶降解能力差;③使用同种异体细胞和牛胶原,易遭到病毒感染和免疫排斥反应;④脆性大,操作困难;⑤胶原凝胶工业生产过程相对复杂。

这类产品的代表是由美国 Organogenesis 公司生产的 Apligraf(曾叫 Graftskin™),是体外培养的由同种表皮和同种真皮组成的与皮肤类似、有多种功能的双层、有活力的皮肤结构。其分化良好的表皮层由人角质细胞组成,真皮层由人成纤维细胞和含 I 型牛胶原的基质组成。角质细胞和成纤维细胞来源于新生儿包皮,并经 2~3 代传代培养。其优点有:①伤后可立即应用,②它所携带的活细胞能适应伤口的微环境,这种“组织治疗法”可在适当的时间内提供适当量的基质、细胞因子和其他调节因子。不足之处是:① 2~3 月后,其表皮细胞被排斥,须进行自体刃厚皮移植。②在生产制作过程中,须经过严格检验以排除传染某些

疾病(如 HIV、肝炎病毒)的可能。

(六)有细胞胶原海绵替代物 + 表皮细胞

由人角质细胞取代 Integra™ 的硅膜,并在胶原-氨基多糖基质中种入人成纤维细胞组成。Boyce 等已把这种体外重组的皮肤替代物成功移植到烧伤患者。该皮肤替代物可在小面积烧伤创面早期建立真皮-表皮连接,并再生出结缔组织,移植成功率约 50%。该体外重组皮肤有可立即移植,不需要随后移植皮肤,易于操作等优点。除具有无细胞胶原海绵重组皮肤的缺点外,还有不能大量生产和需要大量细胞的缺点。目前尚无商品化产品出售。

另一种由壳多糖交联的有细胞胶原海绵皮肤替代物,既可用于体外毒理学研究,也可用于严重烧伤患者的治疗。在欧洲,该皮肤替代物被广泛用于化妆品上市前的毒理测试。Lam 用 Laserskin 与角质细胞和成纤维细胞构建复合皮,其效果较单纯性 Laserskin 有显著性提高。Hoeller 报道了用人毛囊细胞和成纤维细胞构建复合皮取得初步成功的实验研究。

第三节 复合皮的基础研究

在过去的 20 多年中,细胞培养、组织工程和基因治疗等医学领域均有了突破性的进展,皮肤是第一个从实验室过渡到临床的组织工程器官。受“细胞外环境和伤口内环境对再生有很大影响”和“若把足够量的表皮细胞移植至有活力的真皮上,表皮可再生”这些论断的启发,利用组织工程技术,Yannas 和 Burke 于 1980 年首次合成了人工皮肤。其真皮层由海绵状牛胶原纤维基质和 6-硫酸软骨素交联而成。整个皮肤厚度很薄,以利于其所容纳的细胞从创基吸取营养。交联后,可延迟其生物性降解,以便为正常皮肤的真皮成纤维细胞提供足够的信息,使新生的基质模型稳定,同时也使其强度增加。另一特点是亲水性的氨基葡聚糖可诱导形成正常的结缔组织基质。

Bell 通过预制组织的思路复制了损伤的真皮。他发现将成纤维细胞种植至胶原凝胶中,细胞可增殖。同时,成纤维细胞可产生胶原和基质蛋白,使胶原重新组合成可收缩性的基质,这种凝胶中含成纤维细胞的产物称为真皮等同物(dermal equivalent),结合角质细胞移植则成为皮肤等同物。

目前,国外正利用此技术生产具有双层结构的复合皮。利用组织工程和细胞培养技术研制的复合皮在近年来已取得了长足的进步,一些产品已开始商品化。我国在复合皮的基础研究方面做了很多工作,临床应用也初步取得成功。目前 J-1 型脱细胞异体真皮获国家产品监督管理局的批准已商品化,供临床应用。

Dai 报道了新型、更接近于完整皮肤的组织工程复合皮,即由胶原-聚乙酸内酯组成异体真皮支架,真皮内种植成纤维细胞,外层种植角质细胞。一种含自体角质细胞和真皮成纤维细胞的 Laserskin(Fidia, Abano Terme, Padova, Italy)亦已经问世。

一、脱细胞真皮基质的制作、结构和主要成分

脱细胞真皮基质(ADM)在治疗全层皮肤缺损中作为真皮替代物的最大效价就在于它

的低抗原性、快速血管化和作为表皮载体或支架的稳定性。这些特性主要决定于 ADM 的组成和结构,其中低抗原性是重要环节。

目前,去除组织内细胞的方法有 3 类:①物理学的反复冻融法;②化学的去污剂(SDS EDTA, Triton X-100 等)法或高渗盐(NaCl)法;③生物学酶(胰蛋白酶,中性蛋白酶和核酸酶等)消化法。为提高效果,目前普遍采取两种方法(依次或同时)联合脱细胞。如用胰蛋白酶(或中性蛋白酶)和 Triton X-100 或 SDS 和高渗盐等。去污剂的使用非常重要,因为去污剂与酶协同作用,可以彻底去除真皮内原有细胞碎片,而且产生的 ADM 可能比单纯使用 Dispace 或胰蛋白酶消化的皮片残留更少的抗原成分。这是由于单纯酶消化法很难将组织中的毛囊、腺体和血管等细胞碎片去除。

未经处理的异种真皮组织内含有大量抗原性较强的细胞成分,包括附件上皮细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞、Langerhans 细胞和成纤维细胞等。经脱细胞处理后,真皮剩余的非细胞成分主要包括基质蛋白和胶原。ADM 主要由细胞外基质(ECM)成分(包括 HA, fibronectin, laminin, vitronectin 等)、弹性蛋白、胶原成分(包括 I/Ⅲ/Ⅳ/Ⅶ型胶原)和极少量的细胞相关抗原(HLA-ABC, HLA-DR, Vimentin, Desmin, Talin 等),其中残留的细胞膜抗原和基质蛋白的免疫原性较强。前者通过反复脱细胞处理即可去除,后者经酶和醛基(-CHO)等处理虽可降低抗原反应,但目前的技术和方法尚不能完全去除异种真皮的抗原性。

二、脱细胞真皮基质的作用机制

ADM 有抑制创面收缩和增生性瘢痕形成的作用,这在很大程度上取决于真皮模板作用。所谓模板作用就是指宿主利用该组织进行有序的组织再生,而原先的组织被逐渐降解、吸收和更替。Gustafson 等认为 Allo-ADM 有与胶原引导骨组织再生相似的作用,即 Allo-ADM 在全层缺损的皮肤创面成活后能诱导宿主细胞按 Allo-ADM 样“模板”再生。

与单纯的无细胞真皮基质移植植物比较, Santamaria 等先在 ADM 上接种人成纤维细胞进行培养,再将此活性真皮替代物移植到创面,显示其能加速血管形成和减少创面的收缩率。这些研究结果提示,脱细胞真皮基质通过创面内细胞起到一个引导真皮再生的模板作用。

三、脱细胞真皮基质存在的问题

理想的 ADM 应具备 3 个重要特征:①极低的抗原性;②快速的血管再生能力;③稳定的真皮支架或模板作用。但目前的 Allo-ADM 仍存在以下几方面的不足:①开放创面上 Allo-ADM 的成活率低;②缺乏廉价的皮源和存在传染疾病的可能;③ Allo-ADM 中缺少皮肤附件。

脱细胞真皮在大面积烧伤治疗和整形外科应用中获得了较好的效果,但还存在不少的问题。Pang 等报道经 Dispace 处理制备的冷冻异体或异种真皮进行移植造成 27%~39% 移植皮坏死。Takami 等实验证明,在同种或异种真皮上移植自体皮,大约有 39% 自体皮坏死。他们认为这种一期移植自体皮成活率不佳的现象,主要是由于移植的无细胞真皮没有

长入足够的毛细血管的缘故。Oliver 等将胰蛋白酶处理的真皮埋藏在皮瓣下,术后 2~5 周切除皮瓣,再把自体皮移植在此种真皮上,自体皮存活良好。

已有大量实验证明,真皮移植 1 周是不能达到完全血管化的,真皮内没有血管或真皮深层仅有少许血管无法给真皮上移植的自体皮提供较好的营养,显然会影响自体移植皮的成活率。

真皮完全血管化的创面能为自体皮提供营养方面的支持,但也存在不少弊端:①延长了封闭创面的时间;②增加保护真皮的难度;③增加创面感染的危险;④由此影响自体皮移植的成活率,甚至造成移植失败。大多数研究者认为在真皮移植 7d~10d 后再移植自体皮是成功的,但在此期间必须用创伤覆盖材料保护创面。

四、复合皮的成活条件与过程

异体真皮在创面上成活,在很大程度上取决于创基的条件。受皮区血管内皮细胞通过异体真皮内原有的已失活的血管,穿入异体真皮内而形成新的血管,原有的血管内皮细胞均变性而降解。光镜下,新生血管与异体真皮原有的血管具有一致性,表明微血管的长入及移植植物原有的血管成分对复合皮早期血运的建立和成活具有极其重要的意义。不管是真皮的血管化,还是表皮-真皮的牢固连接,都要求有良好的微环境。早期强调保持局部湿润,良好的制动和全身营养支持。严格控制感染是最重要的条件之一,不管在早期还是晚期,都会因感染而导致移植失败,故应十分重视。

复合皮早期存活过程与普通皮片的成活过程不完全一样,后者仅需与创基建立血运,而复合皮还要求表皮-真皮重组后建立稳定连接(DEJ)以及真皮的改建和上皮的分化成熟。不管是异体真皮还是人工真皮,移植后部分均会被改建,如血管重塑、成纤维细胞的游入、胶原纤维等基质的代谢、上皮细胞的分化成熟、结构和功能的逐渐改善等。

Wainwright 认为在与自体网状皮片复合移植时,首先网状皮边缘的自体表皮细胞增殖、迁移、扩展,覆盖网状皮间隙,然后进一步匍匐爬行于网状皮下,铲除自体网状皮片并覆盖其下创面,完成创面上皮化,即复合移植愈合时,表皮来源于自体,而真皮完全来源于基质。用此机制可较好地解释自体网状皮片和自体小皮片复合移植愈合过程及其表现。Sheridan 发现当自体真皮或事先移植的异体真皮存在时,培养的上皮细胞移植成活率显著增加,因为真皮产生的一系列多肽生长因子对其生发细胞具有复杂的调节作用。Erdag 认为,成纤维细胞分泌的基质膜蛋白增加真皮以及上皮再生和角质细胞粘附,因为基底膜对角质细胞的粘附是极为重要的,尤其是对那些缺少基底膜的生物合成材料制成的真皮类似物。同时成纤维细胞在真皮再生中也占有重要地位。他发现含有成纤维细胞的皮肤替代物移植后再血管化很快。无成纤维细胞的真皮移植 1 周后无血管形成,而含成纤维细胞的则有一些血管形成。两周时这种差别更加明显。分析原因可能是成纤维细胞分泌血管内皮细胞生长因子(VEGF),并使更多的角质细胞分泌 VEGF。

随着研究的不断深入,国外已有不少学者注意到复合皮移植后真皮-表皮连接(dermal-epidermis junction, DEJ)区的表皮规范物质钉、真皮乳头、基膜带(BMZ)、锚丝