

脱细胞小肠黏膜下层与脱细胞心包修复大鼠腹壁缺损的对比研究 *

肖毅频 王冠宇 王 强[△] 张 剑

(第二军医大学长征医院普通外科 上海 200003)

摘要 目的:观察小肠黏膜下层(small intestinal submucosa ,SIS)和脱细胞心包(pericardium ,PC)修复大鼠腹壁缺损的效果,比较两种生物材料相容性。方法:SD 大鼠 40 只,体重 200~250g,手术造成 3 cm×2 cm 全层腹壁缺损,随机分为二组(n=20),分别采用相同面积的小肠黏膜下层(small intestinal submucosa ,SIS)和脱细胞真皮基质(acellular dermal matr ,ADM)补片进行修补。术后 1、2、4 和 8 周分批取出腹壁修复材料,行动物一般情况观察、腹腔内粘连情况评价、力学强度测定及组织学观察。结果:术后动物都成活,两种材料术后 8 周均无疝发生,缺损得到完整修复。术后各期 SIS 组的腹腔粘连评分明显低于 PC 组。术后 4、8 周,SIS 组力学强度强于 PC 组,有统计学意义。组织学观察两组未见明显免疫排斥反应,SIS 组的组织再生和重塑、血管化优于 PC 组,术后炎症反应两组无明显差异。结论:SIS 和 PC 均能修复大鼠腹壁全层缺损,SIS 在生物相容性方面优于 PC。

关键词 腹壁缺损;小肠粘膜下层;脱细胞心包;生物相容性

中图分类号:Q95-3 R318 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)08-1443-04

Comparative Study of Acellular Small Intestinal Submucosa and Acellular Pericardium for Repairing Abdominal Wall Defects in Rats*

XIAO Yi-pin, WANG Guan-yu, WANG Qiang[△], ZHANG Jian

(Department of General Surgery, Shanghai Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, PR China,200003)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of small intestinal submucosa (SIS)and acellular pericardium (PC)on repairing wall defeats in rats, to compare compatibility of the two biological materials. **Methods:** A full-thickness 3cm × 2cm abdominal wall defeat was created in 40 rats weight from 200 to 250g, then they were repaired with an interpositional implant(SIS,n=20 ,PC,n=20). And the rats were harvested at week 1 ,week 2 ,week 4 ,and week 8 after operation. Animal general state of health, intra-abdominal adhesions and tensile strength were investigated. **Results:**All rats survived and the defeats were completely repaired by the materials without fistula or hernia. There were less adhesion in SIS group than that in PC group 4 ,8 weeks after operation, the tensile strength of abdominal wall in SIS group is stronger than that in PC group (p<0.05). No obvious immunoreaction was observed in two groups by histology. Remodeling and regeneration and vascularization of the abdominal wall were better in SIS group compared with PC group. There was not difference of inflammatory reaction of the two groups. **Conclusion:**Both SIS and PC were feasible to repair full-thickness abdominal wall defeat and SIS is superior to PC in regards to tissue compatibility.

Key Words:abdominal defeats ,small intestinal submucosa ,acellular pericardium ,biocompatibility

Chinese Library Classification(CLC):Q95-3 R318 Document code:A

Article ID:1673-6273(2011)08-1443-04

前言

修复腹壁肿瘤切除术后、严重创伤等所导致的腹壁较大缺损,仍然是临床医生常常面临的棘手问题。修复腹壁缺损,临床上有多种方法^[1]。由于自体取材的局限性,修复腹壁缺损方法逐渐由自体修复转向替代材料修复^[2]。所以寻找一种理想的腹壁替代材料具有重要意义。当今用于临床修补材料主要分为人工合成材料和生物材料,如小肠黏膜下层(SIS)和脱细胞心包(PC)等^[3]。人工合成材料是目前应用最广泛,效果较好的一类材料,但临床应用过程中发现,1%-15%病例可出现肠瘘、肠梗阻、感染、腹腔粘连和补片移位等并发症^[4,5]。与之相比,由于生物材料在抗感染、抗腹腔粘连等方面优于人工合成材料,逐渐被临床认可^[6],故此本研究以临床上常用的两种生物材料修复

大鼠缺损,从腹腔粘连、补片力学强度、腹腔粘连、组织反应几方面进行比较。

1 资料与方法

1.1 实验仪器与试剂

超净工作台,0.1%过氧乙酸,无水酒精。

1.2 实验动物

SD 大鼠 40 只,体重 200~250g,雌雄各半,由上海市第九人民医院实验动物中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 生物腹壁修复材料的制备 先采用物理方法剔除原始材料附带的筋膜、脂肪、上皮等组织,后应用 Abraham 法制备生物腹壁重建材料—猪小肠黏膜下层(SIS)以及猪脱细胞心包(PC)^[7]。

* 基金项目:军队临床高新技术重大项目(2010gxjs060)

作者简介:肖毅频(1983-),男,硕士研究生 E-mail xiao7093@163.com

[△]通讯作者:王强,男,教授,主任医师 E-mail wang2929@hotmail.com

(收稿日期:2010-12-06 接受日期:2010-12-31)

两种材料均采用 0.1%过氧化乙酸、无水酒精消毒,4℃保存备用。

1.3.2 动物实验 将动物随机分成三组(每组 20 只),速眠新 0.1ml/100g 肌肉注射麻醉。腹部脱毛,常规消毒铺巾。取腹部正中切口,切开皮肤皮下组织,沿皮向下向两侧锐性分离,暴露肌层,将 3cm×2cm 大小肌肉连同腹膜整块切除,造成腹壁全层缺损模型。两组分别用同样面积的 SIS 和 ADM 进行修补(其中 SIS 为 4 层,厚度约为 400μm),6-0 丝线间断缝合。3-0 丝线间断缝合皮下组织和皮肤。术后动物分笼饲养。

1.4 术后检测指标

定期观察动物活动及进食情况,分别于术后 1、2、4 和 8 周分批处死动物(每组每时间点 5 只),以进行以下项目检测。

1.4.1 动物一般情况观察 伤口感染(定义为:表面皮肤有无裂开、伤口及腹壁形成脓肿或脓液,经细菌培养阳性),腹壁疝瘘有无发生。

1.4.2 腹腔粘连评分 根据文献报道的方法对补片修复后腹腔面粘连情况进行评分^[8]。

1.4.3 力学强度测定 各时间点准时取标本,经处理,沿纵轴将材料标本平均剪成 5 长条。取中间长条,精确测量其宽、厚后,垂直置于 Instron 4502 Tensiometer(上海市第九人民医院组织工程实验室提供)两端铁夹之间,以恒定 10mm/s 速度,向上拉伸,直至标本长条断裂,详细记录每个标本弹性模量。

1.4.4 组织学观察 首先观察和记录修复的大体效果,然后将修补区域连同周围 1cm 正常肌肉组织整块切除。4%中性甲醛固定液,石蜡包埋切片(5μm 厚),进行 HE 染色,观察材料-肌肉交界处局部反应、新生组织细胞构成及比例。在光镜下以相同

光亮强度,用 C6 网格目镜测微尺在 40×镜下(1mm²)计数炎症细胞数、微血管数。每组中每个动物随机取 2 张切片,每张切片随机取 3 个视野,记录网格内的炎症细胞数、微血管数,取其均值。

1.5 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学处理,实验数据以均数±标准差表示。两组比较采用均数 t 检验,P 值 <0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

因麻醉过量死亡 2 只(两组各一只),其余均完成实验,术后 1 周 SIS 和 PC 修补组分别死亡 1 只、和 3 只,死亡动物均合并有伤口感染。三组存活的 18、16 只大鼠在各时间点腹壁缺损均得到完整修复,三组修复后 8 周(至术后 8 周)均未见疝、瘘发生。

2.2 腹腔粘连的比较

SIS 组修复区质地较柔软,腹腔面较光滑,腹腔粘连较轻,质地较柔软,修补处腹腔面与网膜有 1 条或 2 条系带粘连,PC 组修补区域欠光滑,腹腔面有较多网膜或肠管粘连(图 a、b)。根据以下评分标准:0,无粘连;1,稀疏较薄的粘连;2,明确的局部粘连;3,明确的多发内脏粘连;4,腹腔广泛的致密粘连。术后各期 SIS 组的腹腔粘连评分明显低于 PC 组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 腹腔粘连评分($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Evaluation of abdominal adhesion($\bar{x} \pm s$)

Group	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
SIS group	0.5± 0.2	1.1± 0.4	1.6± 0.6 ^a	2.2± 0.5 ^a
	n=4	n=5	n=5	n=5
PC group	0.6± 0.1	1.4± 0.3	2.4± 0.6	3.2± 0.5
	n=4	n=5	n=5	n=5

^a compared with PC group, P<0.05

2.3 力学强度的测定

弹性模量为材料每横断面积的最大断裂力,本研究详细记录下每标本断裂时的弹性模量。以术后 1 周为基准点,SIS 组

的弹性模量与 PC 组无明显差异,术后 2 周两组比较无统计学意义(P>0.05),术后 4 周、8 周 SIS 组的弹性模量强于 PC 组(P<0.05),见表 2。

表 2 弹性模量强度(Pa, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Elasticity modulus(Pa, $\bar{x} \pm s$)

Group	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
SIS group	32.9± 9.1	101.1± 9.1	109.8± 10.3 ^a	125.0± 11.0 ^b
PC group	38.2± 9.2	88.0± 8.4	77.6± 8.7	73.9± 9.5

^a compared with PC group, P<0.05

^b compared with PC group, P<0.005

2.4 组织学观察

由 HE 染色可见,术后 1、2 周,两种材料修复区域均有明显炎症细胞浸润。2 周时,两种材料保持膜状结构,SIS 表面出

现少量未成熟血管,成纤维细胞密度多于 PC,并可见成纤维细胞已迁入 SIS 内,而 PC 成纤维细胞聚集于材料-肌肉交界处,两组成纤维细胞排列紊乱(图 A、B)。此后两组局部成纤维细胞

数目逐渐增加,炎症细胞浸润逐渐减少。4 周时 SIS 结构已较松散,开始降解,炎性细胞浸润明显减少,局部有明显血管化形成。8 周时,SIS 不可分辨,新生肉芽组织已构建成熟,内可见成纤维细胞排列有序,并沿肌肉纵轴方向排列,局部偶见炎症细胞浸润,血管数目更多,并可观察到完整血管壁结构(图 C)。PC 组在术后 8 周时可见少量 PC 原材料基质,新生肉芽组织成熟程度不及同时时间 SIS 组,无完整血管壁结构出现(图 D)。用 C6

网格目镜测微尺在 40×镜下(1mm²)计数各时间点炎症细胞数,微血管数:术后各相同时间点两组炎症细胞数已无明显差异,无统计学意义,P>0.05,术后 8 周 SIS 修复组微血管数明显多于 PC 修复组,有统计学意义(SIS vs. PC: 20.1±1.5 vs 12.0±1.3, P<0.005)。表 3 为两组材料不同时间点的炎症细胞和微血管计数情况。

表 3 各组不同时间点炎症细胞、微血管计数(个 $\bar{x} \pm s$)
Table 3 The number of inflammatory cell and capillary vessel at different intervals in different groups($\bar{x} \pm s$)

Time	inflammatory cell		capillary vesse	
	SIS	PC	SIS	PC
1	99.4± 45.2	112.8± 8.7	0± 0	0± 0
2	58.5± 20.1	61.1± 31.9	4.2± 1.6 ^a	1.3± 0.7
4	21.1± 9.8	26.0± 6.4	10.6± 1.7 ^a	5.3± 1.1
8	5.6± 4.1	5.3± 2.7	20.1± 1.5 ^a	12.0± 1.3

^a compared with PC group P<0.005

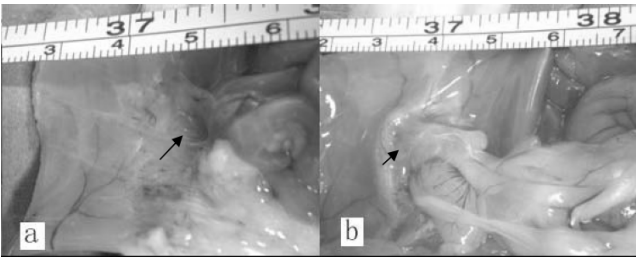


图 1 两组术后 8 周腹腔粘连情况
a SIS 组,修复区域腹腔面粘连较轻,箭头所指修复材料
b PC 组,腹腔面有较多网膜或肠管粘连,箭头所指修复材料
Fig.1 Abdominal adhesion on 2 groups 8 weeks after surgery
a Slight abdominal adhesion was formed in SIS group, arrow represents materials.
B In PC group,there were more omentum or bowel adhesions in peritoneal surface arrow represents materials.

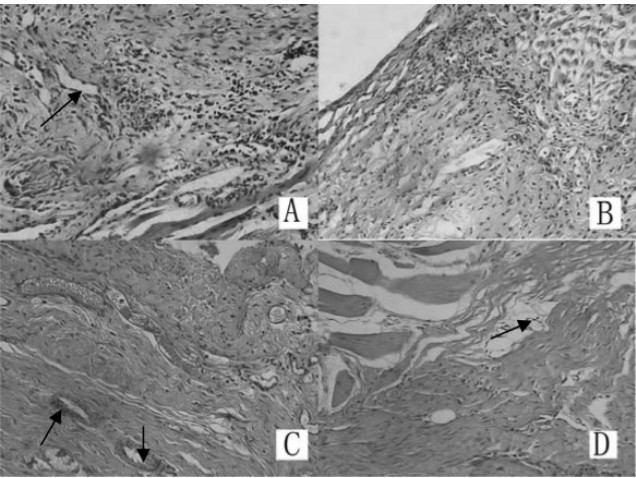


图 2 两组术后不同时间点组织学观察(HE× 200)
A 术后 2 周 SIS 组,可见大量成纤维细胞呈无序排列,并迁入材料中央,已有微血管形成(箭头所指)
B 术后 2 周 PC 组,成纤维细胞密度低于同期 SIS,成纤维细胞及炎症细胞见于材料-肌肉交界处
C 术后 8 周 SIS 组,SIS 不可分辨,新生肉芽组织已构建成熟,内可见成纤维细胞排列有序,并沿肌肉纵轴方向排列,局部偶见炎症细胞浸润,血管数目更多,并可观察到完整血管壁结构(箭头所指)
D 术后 8 周 PC 组,可见少量 PC 原材料基质,新生肉芽组织成熟程度不及同时时间 SIS 组,无完整血管壁结构出现(箭头所指为无完整血管壁结构的微血管)

C 术后 8 周 SIS 组,SIS 不可分辨,新生肉芽组织已构建成熟,内可见成纤维细胞排列有序,并沿肌肉纵轴方向排列,局部偶见炎症细胞浸润,血管数目更多,并可观察到完整血管壁结构(箭头所指)
D 术后 8 周 PC 组,可见少量 PC 原材料基质,新生肉芽组织成熟程度不及同时时间 SIS 组,无完整血管壁结构出现(箭头所指为无完整血管壁结构的微血管)

Fig.2 Histological observation on 2 groups at different intervals after surgery(HE× 200)
A It could clearly be seen that a large number of fibroblasts had arranged disorderly and moved to the central materials in SIS group 8 weeks after surgery micrangium has appeared(arrow).
B In PC group 2 weeks after surgery fibroblast density was lower than the same period SIS. Fibroblasts and inflammatory cells were? found in the junction.
C In SIS group 8 weeks after surgery SIS could not be resolved , construction of new granulation tissue had matured and it was seen that fibroblasts arranged orderly along the longitudinal axis of muscles ,Inflammatory cell infiltration was occasionally visible ,there were greater number of blood vessels and the full structure of the vessel wall could be observed(arrow).
D In PC group 8 weeks after surgery ,little PC matrix could be observed.Granulation tissue maturity was less than SIS group and didn, t have blood vessels with full structure(arrow).

3 讨论

临床常需借助合适的材料来修复腹壁巨大缺损,以维持腹壁的完整性。聚丙烯、聚四氟乙烯等人工合成材料广泛用于临床,但由于其为非降解材料,长期存在机体,易导致感染、腹腔严重粘连等并发症^[9]。理想材料应具有良好的力学强度、组织相容性,且来源比较方便^[10]。已有文献发现生物材料具有良好的上述特征^[11],故本研究于一般情况、粘连分析、力学分析、组织学分析(材料-肌肉交界处局部反应、新生组织细胞构成及比例)几方面对 SIS、PC 两种生物材料对比分析。

本研究以术后 1 周两种生物材料的弹性模量为基准, 消除材料原有胶原的影响, 对 2 周、4 周、8 周的力学弹性模量进行比较。试验结果显示: 术后 4 周, SIS 组的弹性模量强于 PC 组, 这种差异于术后 8 周越加明显。弹性模量大小主要取决于材料胶原量及其排列情况, 一定程度是机体组织长入材料的测量标准, 为术后疝复发的可能性提供一定的临床依据^[12,13], 两组弹性模量差异的原因可能为: 在 SIS 修复大鼠腹壁全层缺损的进程时, 材料的降解和机体组织的长入是同步的, 最终材料接近完全降解, 材料得到完好重塑, 心包在修复腹壁缺损过程中, 材料的降解和组织的再生是非同步的, 总体降解速度快于机体组织长入速度^[14]。

本研究于微血管数、炎症细胞数、材料重塑几方面对两种生物材料进行组织学分析^[15], 评价两种材料的组织相容性。高倍镜下观察结果显示: 术后两组炎症反应程度无明显差异。术后 2 周, SIS 已血管化, 至术后 8 周, SIS 修复组微血管数明显多于 PC 修复组, 有统计学意义。8 周时, 我们观察到 SIS 材料接近完全降解, 新生肉芽组织已构建成熟, 内可见成纤维细胞排列有序, 并沿肌肉纵轴方向排列, PC 在整个观察期内新生肉芽组织重塑程度不及 SIS 组。

已有研究表明, 机体细胞具有空间依赖性特征, 理想材料应提供足够孔隙率大小以利于氧、代谢废物等物质于材料与机体之间的快速交换, 促进机体细胞的增殖、分化、迁移等^[16,17,18], 生物补片是拥有完整脱细胞支架的取材于动物或人体的脱细胞材料, 由于来自不同的机体组织, 其结构、物理、生物性也会有很大差异^[19]。SIS 作为天然细胞外基质类材料, 被广泛用于临床, 相对其他材料已被证明有理想的空隙率, 这可解释 SIS 组织学方面优越性。此外, 先前文献报道 SIS 含多种生长因子, 如 VEGF, VGF2, TGF, CTGF 等^[20], 这些生长因子对组织的长入及血管的新生也起到重要作用。

总体评价, 在力学弹性模量、粘连情况、组织学观察方面, sis 都表现出显著的优越性。这种优越性在术后 8 周得到更大的体现。

参考文献(References)

- [1] Denis Dufrane, Michel Mourad, Mathieu van Steenberghe, et al. Regeneration of abdominal wall musculofascial defects by a human acellular collagen matrix[J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 2237-2248
- [2] Burger JW, Luijendijk RW, Hop WC, et al. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia[J]. *Ann Surg*, 2005, 240: 578-585
- [3] Vavrik J, Foltynova V, Vitkova I, et al. Changes in abdominal wall after mesh implantation in rats[J]. *Med Sci Monit* 2000; 6: 476-9
- [4] Iannitti DA, Hope WW, Norton HJ, et al. Technique and outcomes of abdominal incisional hernia repair using a synthetic composite mesh: a report of 455 cases[J]. *J Am Coll Surg*, 2008, 206: 83-88
- [5] Mahmoud UHY, Erkek AB, Cakmak A, et al. Incisional hernia treatment with polypropylene graft: results of 10 years [J]. *Hernia*, 2006, 10: 380-384
- [6] Sarikaya A, Record R, Wu CC, et al. Antimicrobial activity associated with extracellular matrices[J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(1): 63-71
- [7] Abraham GA, Murray J, Billiar K, et al. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51: 442-452
- [8] Ersoy E, Ozturk V, Yazgan A, et al. Comparison of the Two Types of Bioresorbable Barriers to Prevent Intra-Abdominal Adhesions in Rats [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13: 282-286
- [9] Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP, et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343: 392-398
- [10] Klinge U, Klosterhalfen B, Ottinger AP, et al. PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes [J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 3487-3493
- [11] Emily E. Soderer, Gary C. Lantz, Evelyn A. Kazacos, et al. Morphologic Study of Three Collagen Materials for Body Wall Repair[J]. *Journal of Surgical Research*, 2005, 118: 161-175
- [12] Judge TW, Parker DM, Dinsmore RC (2007) Abdominal wall hernia repair: a comparison of sepramesh and parietex composite mesh in a rabbit hernia model. *J Am Coll Surg* 2005: 276-281
- [13] Konstantinovic ML, Lagae P, Zheng F, et al. Comparison of host response to polypropylene and non-cross-linked porcine small intestine serosal-derived collagen implants in a rat model[J]. *BJOG*, 2005, 112: 1554-1560
- [14] Nihsen ES, Johnson CE, Hiles MC, et al. Bioactivity of small intestinal submucosa and oxidized regenerated cellulose/collagen[J]. *Adv Skin Wound Care*, 2008, 10: 479-486
- [15] Fang Zheng, Yuan Lin, Eric Verbeken, et al. Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model [J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004, 191: 1961-70
- [16] Williams DF. Future prospects for biomaterials. *Biomed Eng* 1975; 10: 207-212
- [17] Williams DF. Biomaterials and biocompatibility. *Med Prog Technol* 1976; 20: 31-42
- [18] Williams DF. Implants in dental and maxillofacial surgery. *Biomaterials*, 1981; 2: 133-146
- [19] Butler CE, Langstein HN, Kronowitz SJ. Pelvic, abdominal, and chest wall reconstruction with AlloDerm in patients at increased risk for mesh-related complications[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2005, 116: 63-75
- [20] Voytik HSL, Brightman AO, Kraine MR, et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 67: 478-49