

论著·基础研究

大鼠深Ⅱ度灼伤后皮肤力学性质改变及变性真皮再利用的初步观察

王志勇¹, 王西樵², 刘英开², 董叫云², 宋菲², 曹晓赞², 陆树良²

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院灼伤整形科, 上海 200025; 2. 上海市烧伤研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·研究大鼠深Ⅱ度灼伤后皮肤力学性质的改变及变性真皮脱细胞后用于复合移植再利用的可行性。**方法**·建立SD大鼠背部深Ⅱ度灼伤模型, 灼伤后3 h及3 d后切取皮肤组织, 利用力学检测器, 检测皮肤弹性模量及最大载荷; 另外, 制作正常皮肤及灼伤后3 h皮肤的脱细胞真皮基质, 比较真皮基质的结构差异以及进行异体复合移植, 观察移植成活皮片的大体及组织学结构。**结果**·大鼠正常皮肤、灼伤后3 h及3 d皮肤的弹性模量分别是 (8.7 ± 6.4) MPa、 (7.2 ± 2.7) MPa和 (2.7 ± 0.3) MPa, 最大载荷分别是 (107.1 ± 41.7) N、 (81.5 ± 10.8) N和 (42.2 ± 7.0) N; 灼伤后3 d皮肤的弹性模量和最大载荷均较正常组显著降低(均 $P < 0.05$)。灼伤后3 h的变性脱细胞真皮基质仍保留了与正常真皮大致相近的孔隙结构; 将变性脱细胞真皮基质进行复合移植, 愈后外观和组织学结构与对照组基本相似。**结论**·深Ⅱ度灼伤早期变性皮肤组织与正常皮肤的力学性质相近, 组织结构相似, 可作为脱细胞真皮基质的潜在来源进行复合移植。

[关键词] 灼伤; 变性真皮; 生物力学; 脱细胞真皮基质; 复合移植

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.11.004 **[中图分类号]** R644 **[文献标志码]** A

Changes of skin mechanical properties and reuse of denatured dermis after deep second-degree burn in rats

WANG Zhi-yong¹, WANG Xi-qiao², LIU Ying-kai², DONG Jiao-Yun², SONG Fei², CAO Xiao-zan², LU Shu-liang²

1. Department of Burns and Plastic Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025; 2. Shanghai Burns Institute, Shanghai 200025

[Abstract] **Objective**·To investigate the changes of skin mechanical properties after deep second-degree burn, and study the feasibility of composite transplantation by using denatured dermal acellular matrix. **Methods**·The deep second-degree burn models in SD rats were constructed, and then the full skins were harvested after 3 h and 3 d, respectively, to compare the skin modulus of elasticity and ultimate load with normal skins. In addition, the structural differences of the dermal matrix were also compared. The composite transplantations were conducted by using the normal or denatured dermal acellular matrix, and then the general and histological structures of living skin grafts were observed. **Results**·The moduli of elasticity of the normal skins and the skins 3 h and 3 d after burn in SD rats were (8.7 ± 6.4) MPa, (7.2 ± 2.7) MPa and (2.7 ± 0.3) MPa, respectively. The ultimate loads were (107.1 ± 41.7) N, (81.5 ± 10.8) N and (42.2 ± 7.0) N, respectively. Both indexes were significantly reduced in the skins 3 d after burn compared to the normal ones ($P < 0.05$). In the acellular matrix of denatured dermis 3 h after burn, the pore structure was still similar to that of normal one, and the appearance and histological structure after healing from composite transplantation were similar to those of the control group. **Conclusion**·The early denatured skin tissue after deep second-degree burn maintains the similar mechanical properties and histological structure to the normal skin, which is a potential source of acellular dermal matrix for composite transplantation.

[Key words] burn; denatured dermis; biomechanics; acellular dermal matrix; composite transplantation

真皮组织是引导细胞功能趋向的“模板”, 参与皮肤损伤后结构和功能的重建。创伤导致真皮组织完整性、连续性遭到破坏, 以致真皮“模板作用”缺失, 可能是影响修复细胞功能、导致瘢痕形成的重要机制之一^[1]。尽可能保留真皮组织、防止进行性损害或回植足够厚度的真

皮组织, 能起到减轻瘢痕形成的作用, 这也成为临床治疗深度灼伤的共识。近年来发现, 保留深度创面变性真皮, 然后复合移植大张自体皮的方法, 能显著改善深度灼伤愈合后的外观和功能恢复(此处的变性真皮是指灼伤创面上组织细胞存在新陈代谢障碍、细胞功能降低并有形态

[基金项目] 国家自然科学基金(81671914, 81071567, 30872686, 81000838)(National Natural Science Foundation of China, 81671914, 81071567, 30872686, 81000838)。

[作者简介] 王志勇(1971—), 男, 副主任医师, 博士; 电子邮箱: wzy10830@rjh.com.cn。

[通信作者] 王西樵, 电子邮箱: wxqiao2002@hotmail.com。

学改变, 但仍有可逆性、能恢复正常形态和功能的那部分真皮^[2-4]), 但其机制尚未完全阐明。本实验利用深Ⅱ度大鼠灼伤模型, 从皮肤力学性质和组织结构变化的角度, 探讨灼伤后保留变性真皮组织改善创面修复质量的内在机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作及分组

将 22 只体质量约 250 g 的 SD 大鼠[购自复旦大学实验动物科学部, 生产许可证号为 SYXK (沪) 2014-0029] 分成 3 组, 分别为正常组、灼伤 3 h 组和灼伤 3 d 组, 正常组 6 只, 灼伤 3 h 组和 3 d 组每组 8 只。用 2.5% 戊巴比妥钠(购自上海西唐生物科技有限公司)按 1.4 mL/kg 腹腔注射麻醉。2 个灼伤组大鼠背部脱毛后用 80 ℃ 水浴 5 s 造成深Ⅱ度灼伤模型。灼伤后大鼠立即在腹腔内注射乳酸钠林格注射液 10 mL 进行液体复苏, 灼伤 3 d 组继续分笼饲养。取正常、灼伤后 3 h 及灼伤后 3 d 大鼠背部全层灼伤皮肤样本供力学检测。正常组大鼠仅背部脱毛后取皮。实验动物操作及饲养均在复旦大学实验动物科学部动物实验室完成[使用许可证号为 SYXK (沪) 2014-0029]。

1.2 力学检测

将 3 组待测皮肤均修剪成长 2 cm、宽 1.5 cm 的长方形, 两端固定于生物力学测定仪 (Instron 公司, 美国) 上, 以 2.4 mm/min 匀速拉伸皮片, 同步描绘载荷-位移曲线, 记录皮片的弹性模量和最大载荷。

1.3 脱细胞真皮制作及组织学观察

另取 12 只 SD 大鼠, 分成正常组和灼伤 3 h 组, 每组 6 只, 按 1.1 的方法制作深Ⅱ度灼伤模型, 用鼓式取皮刀反向切取厚 0.3 mm 的刃厚皮片。将取下的皮片浸入 1.25 g/L 中性蛋白酶溶液 (dispase II) (Sigma 公司, 美国), 4 ℃ 作用 24 h 后以弯头镊揭去表皮, 并吸去 dispase 液; 再将脱细胞后的真皮皮片置入 0.5% 十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶液 (上海金璐贸易有限公司), 室温振荡 24 h; 部分脱细胞真皮皮片经过石蜡包埋后, 行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H-E) 染色, 显微镜下观察结构变化; 其他真皮皮片用生理盐水充分清洗后制备成 2 cm×2 cm 的大小, 作为后续复合移植的异体脱细胞真皮基质来源。

1.4 脱细胞真皮复合移植的观察

另取 12 只 SD 大鼠, 分成正常移植组和变性真皮移

植组, 每组 6 只, 作为异体脱细胞真皮基质移植的受体。采取二步法复合移植, 先于大鼠背部皮下埋置上述制作的异体脱细胞真皮基质; 埋置 3 d 后 (此时基本完成血管化), 切下受体大鼠埋置部位相应大小的全层皮肤, 用鼓式取皮刀反向切取厚度 0.2 mm 的自体薄层刃厚皮, 覆盖在预先埋置的真皮基质上, 完成复合移植。然后观察复合移植皮片的成活情况, 若移植皮片成活, 则在 2 周后观察 2 组移植皮片的外观情况; 并切取复合移植的全层皮肤, 石蜡包埋、切片后 H-E 染色, 于显微镜下观察。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 当差异具有统计学意义时采用 LSD 法进行两两比较。认为 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 深Ⅱ度灼伤后皮肤力学性质变化

由于制备灼伤模型时个别大鼠死亡, 实际纳入力学检测包含正常组大鼠 6 只, 灼伤 3 h 组 4 只, 灼伤 3 d 组 7 只。

将灼伤皮肤切取后, 利用生物力学测定仪检测各组的力学改变, 结果显示: 灼伤后大鼠皮肤的弹性模量及最大载荷均较正常皮肤下降, 灼伤后 3 d 下降最为明显, 和对照组比较差异具有统计学意义 (表 1)。

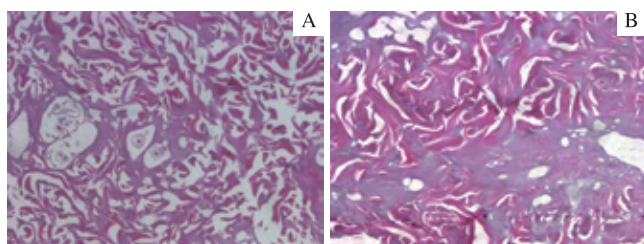
表 1 正常组与灼伤不同时相组皮肤弹性模量及最大载荷情况
Tab 1 Modulus of elasticity and ultimate load in normal and burn skin groups

组别	弹性模量 /MPa	最大载荷 /N
正常组 (n=6)	8.7±6.4	107.1±41.7
灼伤 3 h 组 (n=4)	7.2±2.7	81.5±10.8
灼伤 3 d 组 (n=7)	2.7±0.3 ^①	42.2±7.0 ^②
F 值	3.843	10.404
P 值	0.047	0.002

注: ^① $P=0.018$, ^② $P=0.000$, 与正常组比较

2.2 深Ⅱ度灼伤后脱细胞真皮组织结构变化

灼伤后 3 h 的变性真皮组织学观察发现, 变性的脱细胞真皮基质中虽然部分基质融合成片, 但仍保留了与正常真皮大致相近的孔隙结构 (图 1)。而灼伤后 3 d 的大鼠皮肤在制备脱细胞真皮过程中基本都裂解或溶解, 无法形成完整的脱细胞真皮基质结构。



注: A. 正常皮肤真皮脱细胞基质; B. 灼伤后 3 h 真皮脱细胞基质

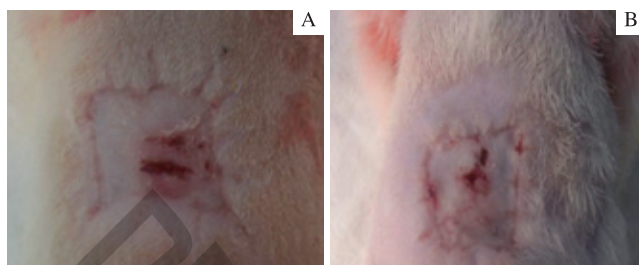
图 1 正常组与灼伤 3 h 组大鼠脱细胞真皮组织结构 (H-E 染色, $\times 200$)

Fig 1 Acellular dermal matrix made from normal group and 3 h after burn group (H-E staining, $\times 200$)

2.3 不同性质脱细胞真皮基质复合移植观察

正常移植组和变性真皮移植组复合移植后, 每组仅有 2 只移植皮片成活, 考虑可能是由于未预先在脱细胞真皮基质上打孔。变性脱细胞真皮基质复合移植成活后与正常皮肤脱细胞真皮基质愈合后的外观相似 (图 2); 组织学观察

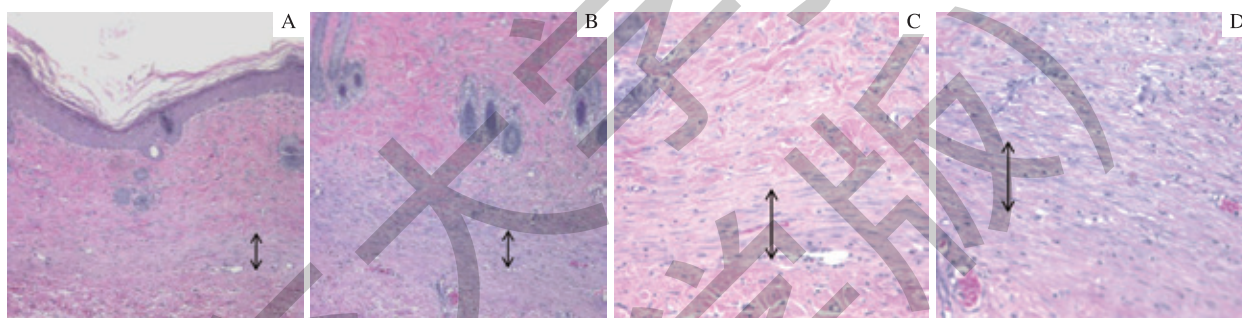
可见, 2 组真皮基质附近胶原排列较为整齐, 没有明显炎症细胞浸润, 真皮基质外皮肤附件完好, 可见血管和成纤维细胞 (图 3)。结果显示, 变性真皮复合移植和正常真皮复合移植效果没有明显差异。



注: A. 正常移植组; B. 变性真皮移植组

图 2 脱细胞真皮基质复合移植后 2 周成活移植皮片的外观观察

Fig 2 Appearance of survival skin grafts 2 weeks after composite transplantation with acellular dermal matrix



注: A、C 为正常移植组 (A. $\times 100$, C. $\times 200$), B、D 为变性真皮移植组 (B. $\times 100$, D. $\times 200$)。双向箭头标记的范围为异体脱细胞真皮基质

图 3 脱细胞真皮基质复合移植后 2 周成活移植皮片的组织学观察 (H-E 染色)

Fig 3 Histological observation of survival skin grafts 2 weeks after composite transplantation with acellular dermal matrix (H-E staining)

3 讨论

深Ⅱ度灼伤累及真皮深层, 需要等待坏死组织脱落, 然后依靠残留的皮肤附件中的上皮细胞增殖、分化和迁移来修复创面。由于存在较多真皮组织缺损, 比浅度灼伤有更明显的血管内皮细胞、成纤维细胞增殖和结缔组织形成, 创面愈合后通常有瘢痕增生。有实验证明, 在热力作用下由于胶原蛋白的变性, 使皮肤的力学性质发生显著变化^[5-6]; 而当细胞周围力学环境发生变化后, 细胞的功能也随之发生变化^[7-8]。体外实验^[9]也发现, 胶原凝胶力学性质的改变 (断裂模量下降) 能诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化, 与正常胶原凝胶存在显著差异。本研究中, 我们比较了正常大鼠与深度灼伤后不同时期大鼠皮肤的力学特性, 发现灼伤早期皮肤的弹性模量和最大载荷与正常皮肤相差不大, 但灼伤 3 d 后皮肤的弹性模量发生明显下降,

同时皮肤组织的最大载荷也明显下降, 在拉力负荷下更容易发生断裂。上述结果提示皮肤组织灼伤后其力学性质也存在进行性演变的过程。我们推测, 早期热力作用后胶原蛋白等细胞外基质虽然发生一定程度的变性, 但皮肤的力学性质尚未发生明显改变; 随着病程的进展, 创面血流淤滞区域的微循环未得到改善、炎症反应加重及感染等原因导致创面真皮组织结构进一步遭到破坏, 使局部皮肤的力学性质发生显著改变, 这可能也是影响细胞生物学行为并成为愈合后瘢痕形成的原因之一。

以往很多研究都已经证实真皮组织的缺失是瘢痕形成的重要原因。我们既往实验^[1, 10-11]也发现, 细胞外基质结构越接近生理状态, 越有利于细胞生物学行为的恢复; 真皮组织参与组织修复的过程中, 其空间结构起了至关重要的作用。本研究通过正常与变性真皮脱细胞基质的组织学观察比较发现, 变性真皮基质中虽然可见较多部位有玻璃

样变性,部分基质融合成片,但仍保留了与正常真皮基质大致相近的孔隙结构。因此,将早期变性真皮进行脱细胞处理,与自体薄层刃厚皮一并行复合移植,仍能取得与正常脱细胞真皮相似的愈合效果,其结果也与保留变性真皮促进创面愈合的临床实践相吻合。可见,早期变性真皮仍保持相对的完整性和连续性,并继续发挥真皮“模板”作用,是其减少瘢痕形成的原因之一。同时也说明,利用早期变性真皮进行复合移植是手术成功的关键所在。

尽管细胞实验、动物实验乃至临床研究都证实变性真皮在创面修复过程中的重要意义,但仍有许多问题需要解决。如保留变性真皮与自体皮植皮的方法仅适用于深Ⅱ度

或混合度灼伤的患者,对于全层皮肤坏死的Ⅲ度灼伤患者并不适用。如何控制适当的削痂深度(既要去除表层坏死,又要保留足够的间生态的变性真皮)需要临床医师有丰富的临床经验和手术技巧;另外,保留的变性真皮仍有可能进一步坏死,导致感染,引起局部甚至全身的炎症反应。这些问题都限制了其临床的推广应用。但如果对变性的灼伤真皮进行脱细胞处理后作为真皮基质进行回植或在组织工程皮肤中引入适当的变性胶原成分或对胶原进行一定的修饰,既发挥其促进细胞增殖的作用,又不影响人工真皮力学性质的改变,可能对促进深度灼伤创面修复具有一定的意义。

参·考·文·献

- [1] 陆树良,青春,刘英开,等. 瘢痕形成机制的研究: 真皮“模板缺损”学说[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(1): 6-13.
- [2] 黄晓元,杨兴华,雷少榕,等. 变性真皮与自体皮移植修复手部深度烧伤[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(1): 60-61.
- [3] 刘英,黄晓元,杨兴华. 大鼠深Ⅱ度烧伤创面保留变性真皮并覆盖自体皮疗效观察[J]. 中华烧伤杂志, 2005, 21(1): 14-16.
- [4] 杨兴华,黄晓元,雷少榕,等. 保留变性真皮并移植大张自体皮修复手部深度烧伤的远期疗效观察[J]. 中华烧伤杂志, 2005, 21(1): 27-29.
- [5] Xu F, Lu TJ, Seffen KA. Thermally-induced change in the relaxation behavior of skin tissue[J]. J Biomech Eng, 2009, 131(7): 071001.
- [6] 卢天健,徐峰,Seffen KA. 皮肤组织的热力学行为表征: I. 拉压行为[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 29(3): 247-252.
- [7] 刘英开,陆树良. 力学刺激对肌成纤维细胞转归的影响[J]. 中华创伤杂志, 2002, 18(11): 244-246.
- [8] 曲华,吴文周,安美文,等. 细胞生长与增殖的生物力学实验研究进展[J]. 医用生物力学, 2004, 19(1): 61-64.
- [9] Wang ZY, Wei J, Yuan B, et al. The change of break modulus drives human fibroblast differentiation in 3D collagen gels[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19: 727-733.
- [10] 毛志刚,青春,陆树良. 细胞外基质成分及空间形态结构对成纤维细胞生物学行为的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2005, 21(3): 238-240.
- [11] 章伏生. 瘢痕形成机理的研究: 肌成纤维细胞的诱导及其信号传导[D]. 上海: 上海交通大学, 2006: 1-102.

[收稿日期] 2019-04-03

[本文编辑] 瞿麟平