论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0754-05

巴马小型猪与人真皮的组织形态学和生物力学基本特征比较研究

郑必祥,彭代智,左海斌,何 斌,王丽华,何升东,王 勇,周 新,刘 敬 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 通过比较研究巴马小型猪与人皮肤在真皮组织结构、胶原类型和生物力学性能方面的差异,寻找猪脱细胞真皮基质临床应用受限相关的组织结构及生物力学原因。**方法** 收集巴马小型猪与人的背部全层皮肤样本,采用大体观察、HE 染色、Masson 三色染色、天狼猩红染色、VVG 染色、扫描电镜及透射电镜等方法,显微照相后进行形态学观察和图像分析软件测量,同时利用材料试验机检测真皮生物力学性能。**结果** 与人皮肤比较,光镜下可见巴马小型猪皮肤的真皮胶原纤维束更粗[(39.29 ± 10.17) μm *vs* (17.21 ± 5.20) μm] (P = 0.000 3),而其间隙率更低[(19.01 ± 1.55)% *vs* (32.36 ± 1.28)%] (P = 0.029);真皮弹性纤维分布、Ⅰ型和Ⅲ型胶原含量及其比值也与人真皮有明显差异(P < 0.05);扫描电镜显示巴马小型猪真皮的胶原纤维束排列紧密、束间孔隙小,透射电镜显示巴马小型猪真皮的胶原原纤维较细,横纹的周期更长;生物力学检测显示巴马小型猪真皮的最大应变[(0.52 ± 0.05) mm/mm]低于人真皮[(0.80 ± 0.06) mm/mm] (P = 0.003),而弹性模量[(69.65 ± 12.16) MPa]和最大应力[(20.72 ± 1.49) MPa]高于人真皮[分别为(44.23 ± 4.63)、(11.85 ± 0.19) MPa] (P = 0.028, P = 0.001)。**结论** 巴马小型猪的真皮与人真皮差异较大,从组织形态学的角度提示猪脱细胞真皮基质不是修复人体真皮缺损的最佳生物材料。

[关键词] 真皮;组织形态学;猪;人;基质;生物力学

[中图法分类号] R322.99;R318;R329.24 **[文献标志码]** A

Comparative study on dermal histomorphologic and biomechanical properties between Bama miniature pig and human

Zheng Bixiang, Peng Daizhi, Zuo Haibin, He Bin, Wang Lihua, He Shengdong, Wang Yong, Zhou Xin, Liu Jin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To compare the dermal tissue structure, content of difference types of collagen and biomechanical properties between Bama miniature pig and human skin, and to identify the histomorphologic reasons that limit the clinical application of porcine acellular dermal matrix. Methods The dorsal full-thickness skin samples were collected from Bama miniature pig and human, and then observed grossly. The sections of these samples were stained by hematoxylin and eosin (HE) staining, Masson's trichrome staining, sirius red staining and Verhoeff's Van Gieson (VVG) staining, and were examined under light microscopy. These samples were also observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The relevant data of histological images were measured with image analysis software. In the meantime, these samples were detected by material testing machine for biomechanical properties. Results Compared with human dermis, Bama miniature pig had much thicker dermal collagen bundles [(39.29 ± 10.17) μm *vs* (17.21 ± 5.20) μm, P = 0.000 3], and had significant decrease in the gap rate between these bundles [(19.01 ± 1.55)% *vs* (32.36 ± 1.28)%, P = 0.029]. The dermal collagen bundles of Bama miniature pig were densely arranged and had smaller pores by SEM, the collagenous fibrils were thicker, and had longer cyclical transverse striation by TEM. The distribution of elastic fiber, the contents of type Ⅰ and Ⅲ collagen and their ratio also had significant differences between human and porcine dermis (P < 0.05). The maximum strain of Bama miniature pig

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2006AA02A121);国家重点基础研究发展计划(973 计划,2005CB522605)

[通信作者] 彭代智,电话:(023)68754226,E-mail:dzpeng@yahoo.com

dermis (0.52 ± 0.05) mm/mm was smaller than that of human dermis [(0.80 ± 0.06) mm/mm, $P = 0.003$], while the elastic modulus (69.65 ± 12.16) MPa and maximum stress (20.72 ± 1.49) MPa of Bama miniature pig dermis were stronger than that of human dermis (44.23 ± 4.63) and (11.85 ± 0.19) MPa ($P = 0.028$, $P = 0.001$). **Conclusion** The dermis of pig and human are quite different. It is suggested that the acelluar dermal matrix from pig is not an optimal biomaterial for repairing and regenerating the human dermis.

[Key words] dermis; histomorphology; swine; human; matrix; biomechanical properties

Supported by the National High Technology Research and Development Project of China (863 Project, 2006AA02A121) and the National Key Basic Research and Development Project of China (973 Program, 2005CB522605). Corresponding author: Peng Daizhi, Tel: 86-23-68754226, E-mail: dzpeng@yahoo.com

人脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)由于其结构和功能最为接近人天然真皮,已开始在临床应用[1]。但是由于人ADM的价格昂贵、供者极其有限以及产业化生产困难等相关问题使其在临床的应用受到限制,因而,异种ADM引起人们关注。长期以来,国内外学者基于猪皮肤与人皮肤结构相似的认识,对猪ADM做了很多研究[2-5]。虽然猪ADM对修复人体皮肤创面取得了一定效果,但发现其存在营养渗透性差、血管化速度慢、移植皮片成活率低等不足[6-8],其主要原因是异种ADM与创面之间难以建立良好的血管网络。研究认为,新生血管内皮细胞及成纤维细胞等再生修复细胞长入植入支架的关键在于支架既有适宜的孔隙大小、分布和孔隙率来提供三维再生空间,又要有一定的机械强度和柔韧性来维持这一形态[9]。由于天然真皮的组织结构和生物力学性能从根本上决定了ADM的三维结构和机械性能,而猪真皮与人真皮在三维结构和生物力学性能的差异程度尚不清楚,因此,通过对巴马小型猪与人的真皮结构、主要构成成分以及生物力学性能进行对比研究,从而获得猪与人真皮的组织形态学和生物力学性能参数,旨在为脱细胞真皮动物来源的选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 样本获得及处理

雄性巴马小型猪3只(4月龄,体质量25.0~28.5 kg),由第三军医大学实验动物中心提供,从其背部切取全层皮肤样本。人的全层皮肤样本为3例成年男性自愿捐献者(年龄24~35岁)的背部正常皮肤。用于染色的皮肤样本用4%多聚甲醛固定,无水酒精梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,组织切片机切片(切片均垂直切取),厚5 μm。

1.2 大体观察及生物力学性能测定

将皮肤样本去除表皮和皮下组织,通过肉眼观察和触摸比较真皮的质地;然后将其制备为60 mm×5 mm的生物力学检测试件,使用1011型材料实验机(Instron公司,美国)预调3次后进行单轴拉伸实验,拉伸速率为10 mm/min,微机记录其应变-应力数据,并计算其最大应变(mm/mm)、弹性模量(MPa)及最大应力(MPa)。

1.3 HE染色

石蜡切片经脱蜡至水后常规HE染色,IX70型显微镜(Olympus公司,日本)观察全层皮肤结构,并测量以下参数:①厚度测量:按文献[10]的方法测量表皮厚度和真皮厚度。②真皮胶原纤维束粗细测量:按文献[11]的方法,选择200倍照片中独立的单一胶原纤维束,利用Image Pro Plus(IPP)图像处理软件直接测量。③间隙率测量:选取切片中全为真皮纤维结构的200倍视野图片,利用IPP图像处理软件通过测量图片中白色空隙部分的面积占整张照片面积的比例来反映真皮胶原纤维束之间的间隙率。每个样本测量5个视野,5个视野的结果取平均值作为测量结果。

1.4 Masson三色染色

将石蜡切片使用Masson三色染色试剂盒(福州迈新)按试剂盒规定操作方法逐步染色[12],切片在普通光学显微镜下观察胶原纤维的分布。

1.5 Verhoeff's Van Gieson(VVG)染色

石蜡切片经常规脱蜡至水后入Verhoeff's苏木精溶液室温染色30 min;再用2% $FeCl_3$溶液分化至镜下可见到黑色纤维以及灰色背景;入5%硫代硫酸钠溶液1 min清除剩余碘;最后用Van Gieson's溶液复染3~5 min。切片在普通光学显微镜下观察弹性纤维的分布。

1.6 天狼猩红染色

切片经常规脱蜡至水后先入天青石蓝液染色10 min,再用天狼猩红饱和苦味酸液染色30 min;脱水封片后在BX51型偏振光显微镜(Olympus公司,日本)下观察Ⅰ、Ⅲ型胶原分布情况,并采用IPP软件分析统计各组织内Ⅰ、Ⅲ型胶原所占面积的百分数(像素数Pixels)及二者的比值。

1.7 扫描及透射电子显微镜观察

皮肤样本2.5%戊二醛固定后,梯度脱水,经临界点干燥,喷金,于扫描电镜(Hitachi S-3400,日本)观察真皮组织表面结构。固定脱水后的样本经树脂包埋,切取超薄切片,用透射电镜(Philips Tecnai-10,荷兰)观察胶原原纤维,并用IPP软件测量胶原原纤维的直径及横纹周期的长度。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,运用独立样本 t 检验,Levene's test检验方差齐性(F 值),方差不齐的选择用其 t' 检验。

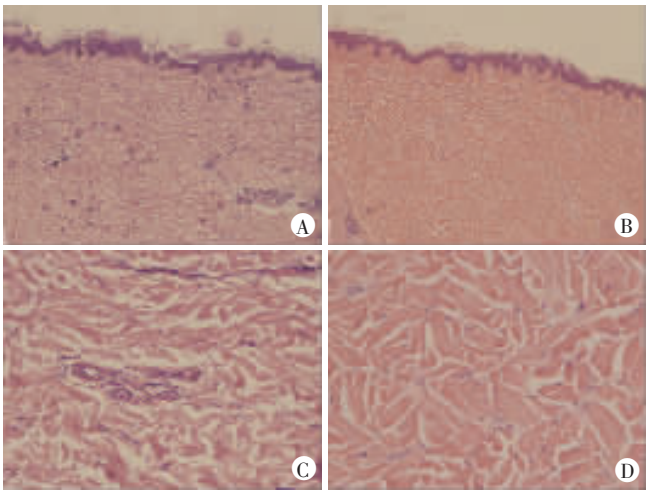
2 结果

2.1 大体观察和生物力学性能

人真皮质地柔软,拉伸后容易变形,而巴马小型猪真皮的质地较硬,不易拉伸变形。巴马小型猪真皮的最大应变[(0.52±0.05)mm/mm]低于人真皮[(0.80±0.06)mm/mm](*P*=0.003);而弹性模量[(69.65±12.16)MPa]和最大应力[(20.72±1.49)MPa]却高于人真皮[分别为(44.23±4.63)、(11.85±0.19)MPa](*P*=0.028,*P*=0.001)。

2.2 HE染色

2.2.1 光镜观察结果 低倍下观察人皮肤与巴马小型猪皮肤厚度相似,表皮都有钉突样结构,但人真皮内有大量毛细血管。高倍下可见人真皮的胶原纤维束比较纤细,排列松散,间隙大;而巴马小型猪的真皮毛细血管少,胶原纤维束粗大,排列紧密,间隙小(图1)。



A:人皮肤(×40);B:巴马小型猪皮肤(×40);C:人皮肤(×200);D:巴马小型猪皮肤(×200)

图1 人与4月龄巴马小型猪皮肤的病理观察 (LM)

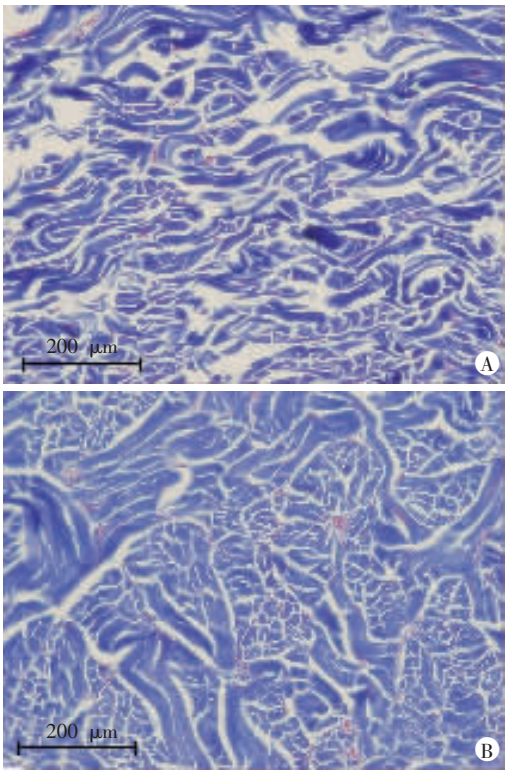
2.2.2 测量结果 人皮肤与巴马小型猪皮肤比较,真皮间隙率[(32.36±1.28)% *vs* (19.01±1.55)%]和胶原纤维束粗细[(17.21±5.20)μm *vs* (39.29±10.17)μm]均有统计学差异(*P*=0.000 3,*P*=0.029);而真皮厚度[(7.00±1.31)mm *vs* (5.11±0.25)mm]、表皮厚度[(109.68±13.10)μm *vs* (139.11±53.68)μm]和真皮厚度/表皮厚度比值[(64.32±14.11) *vs* (41.17±17.43)]上没有统计学差异(*P*>0.05)。

2.3 Masson三色染色

经Masson三色染色的胶原纤维呈比较明显的蓝色,更形象地显示出人真皮胶原纤维束均呈条索状,纤维比较纤细,排列松散;而巴马小型猪胶原纤维束呈团块状,纤维比较粗大,排列非常紧密(图2)。

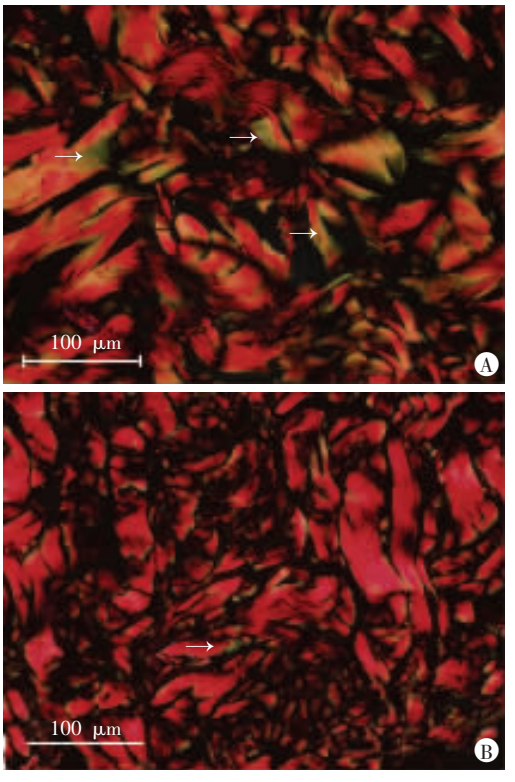
2.4 天狼猩红染色

天狼猩红染色的Ⅰ型胶原在偏振光显微镜下显示强的双折光性,为红色或橙黄色;Ⅲ型胶原显示弱的双折光性,呈绿色。人真皮Ⅰ型胶原周围均散在分布着较多的绿色Ⅲ型胶原纤维;而巴马小型猪真皮内少见Ⅲ型胶原(图3)。人和巴马小型猪真皮中Ⅰ型、Ⅲ型胶原含量及其比值均有统计学差异(分别为*P*=0.018,*P*=0.008和*P*=0.006)。见表1。



A:人真皮;B:巴马小型猪真皮

图2 人与4月龄巴马小型猪皮肤真皮的Masson染色观察



A:人真皮;B:巴马小型猪真皮

图3 人与4月龄猪皮肤真皮胶原的天狼猩红染色观察
(↑:Ⅲ型胶原)

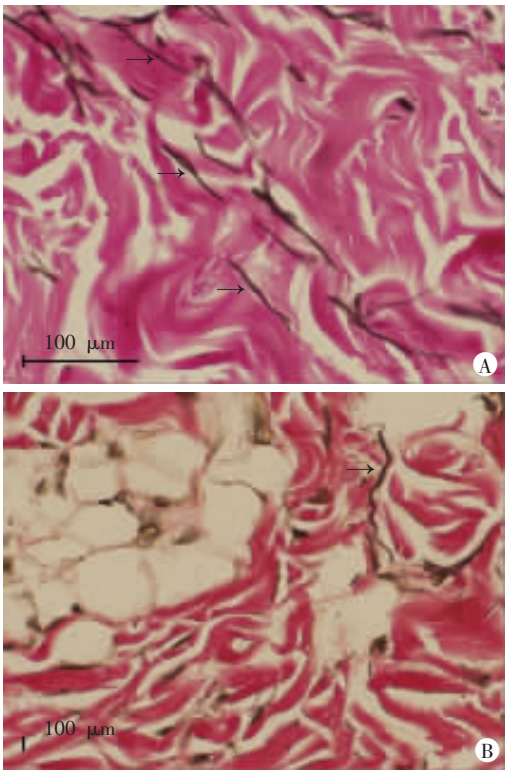
表 1　人与巴马小型猪真皮Ⅰ、Ⅲ型胶原含量及其比值　($\bar{x} \pm s$)

类型	Ⅰ型胶原(%)	Ⅲ型胶原(%)	Ⅰ/Ⅲ型胶原比值
人	83.86 ± 7.62	16.14 ± 2.52	5.32 ± 0.24
巴马小型猪	94.36 ± 4.53[a]	5.64 ± 1.53[b]	17.48 ± 1.66[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与人真皮比较

2.5　弹性纤维 VVG 染色

VVG 染色显示,人真皮网状层存在大量与表皮平行排列的弹性纤维;而巴马小型猪真皮的弹性纤维主要分布在毛囊或血管等附件周围,其走向为环绕附件分布(图 4)。

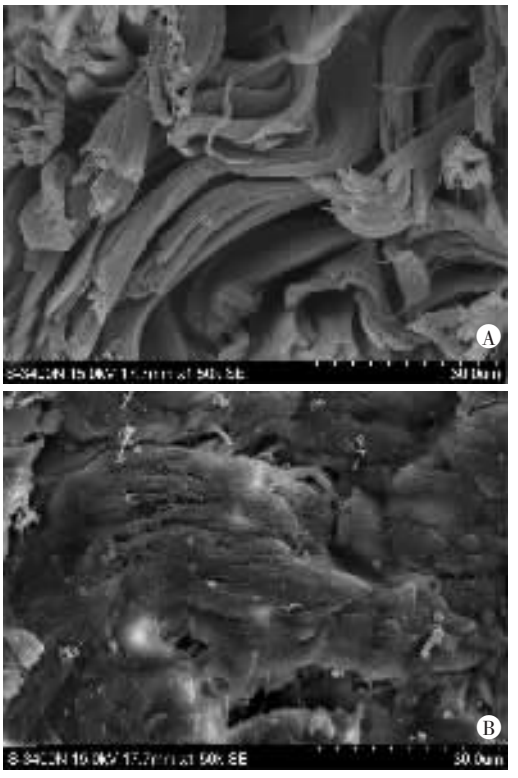


A:人真皮;B:巴马小型猪真皮

图 4　人与 4 月龄巴马小型猪皮肤真皮弹性纤维的 VVG 染色
(↑:弹性纤维)

2.6　扫描及透射电镜观察

扫描电镜可见,人真皮的胶原纤维束比较纤细,排列松散;而巴马小型猪真皮的胶原纤维束成团块状,排列非常紧密(图 5)。透射电镜显示,人真皮原胶原纤维的直径较巴马小型猪的粗[(94.38 ± 1.42) nm *vs* (86.61 ± 0.96) nm, $P=0.001$],人真皮原胶原纤维横纹的周期短于巴马小型猪[(38.70 ± 0.53) nm *vs* (51.18 ± 1.94) nm, $P=0.000$],但人真皮有较多弹性纤维。见图 6。



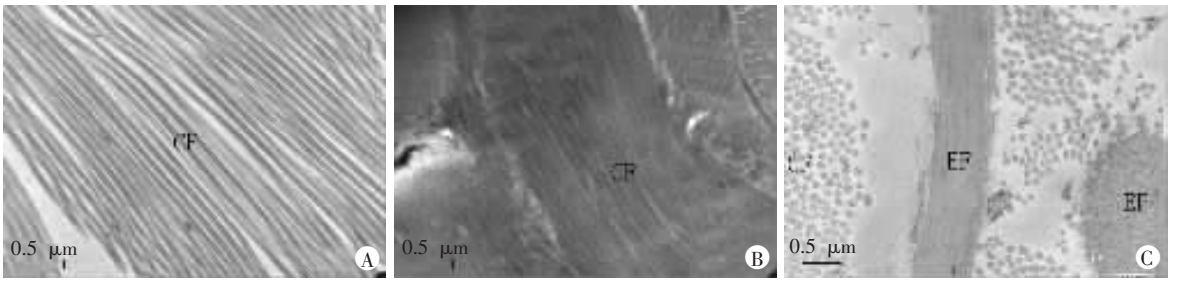
A:人真皮;B:巴马小型猪真皮

图 5　人与 4 月龄巴马小型猪皮肤真皮的扫描电镜观察　(SEM)

3　讨论

脱细胞真皮基质的三维结构及其组成成分所带来的组织再生信号在人真皮重建中起决定作用。在选择异种 ADM 的动物种属来源时,动物真皮的组织结构和组成成分特点与人真皮的相似程度值得首要考虑。

1964 年,Montagna 等[13]提出猪皮肤与人皮肤在形态学和组织学上有许多相似之处,但也存在一些差异的观点。以后人们一直强调两者之间的相似性,而忽略了两者的差异,这与以前的研究结果[14]一致。在本研究中,人皮肤和巴马小型猪皮肤的真皮厚度、表皮厚度及真皮和表皮的厚度比值上都没有统计学差异。然而,光镜结果显示,巴马小型猪真皮的胶原纤维束比



A:人胶原原纤维纵切面(CF);B:巴马小型猪胶原原纤维纵切面(CF);C:人胶原原纤维横截面(CF)和弹性纤维(EF)

图 6　人与 4 月龄巴马小型猪皮肤真皮的透射电镜观察　(TEM)

人粗,其直径为人真皮胶原纤维束的2.28倍。巴马小型猪真皮的胶原纤维束排列紧密,纤维束之间的间隙小,其间隙率比人真皮的间隙率少13.4%。扫描电镜显示,巴马小型猪真皮胶原纤维束粗大和紧密,纤维束之间孔隙小,分布少,而人真皮不仅纤维束松散纤细,且纤维束之间的孔隙大小各异,四通八达。与光镜和扫描电镜结果不同,透射电镜下,人的原胶原纤维的直径反而更大,这提示巴马小型猪胶原纤维的粗大致密源于更多原胶原纤维的紧密排列。从显微到超微层次的结果表明,巴马小型猪真皮具有较为致密的三维空间结构,明显不同于人的真皮,因而其所制备的猪ADM将可能会影响血浆营养成分的渗透、延缓血管化进程,从而降低复合移植皮片的成活率。

胶原纤维是构成真皮三维结构的主要成分。真皮内胶原纤维的主要类型是Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原,成年人真皮内Ⅰ型胶原约占总胶原含量的80%~90%,Ⅲ型胶原约占8%[15]。我们的研究结果与之类似,但与人真皮比较,巴马小型猪真皮中Ⅰ型胶原含量更多,而Ⅲ型胶原含量更少。弹性纤维的成分主要是弹性蛋白,而锁链素(desmosine)是仅存于弹性蛋白内的特殊氨基酸,测定锁链素的含量可以用来定量组织内的弹性蛋白。Starcher等[16]采用放免法测得人皮肤中锁链素含量高达641 pmol/mg,而猪皮肤中锁链素含量仅207 pmol/mg,说明猪真皮中弹性纤维明显少于人真皮,VVG染色也显示巴马小型猪真皮的弹性纤维明显少于人真皮。

目前早已明确Ⅰ、Ⅲ型胶原的功能,即Ⅰ型胶原主要聚合成粗纤维,起支架作用,其伸展性和弹性较小;而Ⅲ型胶原主要形成细纤维,决定胶原纤维束的直径和弹性大小,其伸展和弹性较大,二者的比例就决定了胶原纤维的物理特性。而弹性蛋白的功能则主要是对牵拉作用有很大的耐受力,在维持真皮的三维结构及抗变形能力上起着至关重要的作用[17]。猪真皮中Ⅰ型胶原含量高,Ⅲ型胶原和弹性纤维含量少,这些成分在含量和功能上的差异会导致真皮生物力学性能的差异。因而,猪真皮反映弹性性能的最大应变低于人真皮,弹性模量高于人真皮,而反映强度性能的最大应力高于人真皮,在大体表现为质地僵硬、弹性差和伸展性差。人ADM的延伸性和弹性强于猪ADM的研究报道[18]也支持我们的观察结果。

小型猪真皮与人真皮相比,不但三维结构致密,其主要成分也与人真皮相差甚远,而且生物力学特性中弹性性能差。由此可见,作为修复人真皮缺损的生物材料,猪ADM的组织结构和生物力学特性存在明显的不足。在选择脱细胞真皮的来源动物时,可寻找真皮组织结构与人更为相似的动物。

参考文献:

[1] Topol B M, Dalton E F, Ponn T, *et al*. Immediate single-stage breast reconstruction using implants and human acellular dermal tissue matrix with adjustment of the lower pole of the breast to reduce unwanted lift [J]. Ann Plast Surg, 2008, 61(5): 494-499.

[2] MacLeod T M, Sarathchandra P, Williams G, *et al*. Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction [J]. Burns, 2004, 30(5): 431-437.

[3] Hsu P W, Salgado C J, Kent K, *et al*. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009, 62(11): 1484-1489.

[4] Xu H, Wan H, Zuo W, *et al*. A porcine-derived acellular dermal scaffold that supports soft tissue regeneration: removal of terminal galactose-alpha-(1, 3)-galactose and retention of matrix structure[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(7): 1807-1819.

[5] Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T, *et al*. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008, 85(1): 210-219.

[6] 姜笃银, 陈壁, 徐明达, 等. 异种脱细胞真皮基质的制作和临床应用观察[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(1): 15-18.

[7] DeSagun E Z, Botts J L, Srivastava A, *et al*. Long-term outcome of xenogenic dermal matrix implantation in immunocompetent rats[J]. J Surg Res, 2001, 96(1): 96-106.

[8] 杨燕妮, 彭代智, 伍素华. 天然真皮支架抗原性研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(24): 2269-2270.

[9] Ng K W, Khor H L, Hutmacher D W. *In vitro* characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts[J]. Biomaterials, 2004, 25(14): 2807-2818.

[10] 林恒, 彭代智, 严泉, 等. 整合素β1在微粒皮混合移植中的异位表达及定量分析[J]. 中华烧伤杂志, 2008, 24(6): 445-449.

[11] Shehadi I E, Larson D L, Archer S M, *et al*. Evaluation of histologic changes after microdermabrasion in a porcine model[J]. Aesthet Surg J, 2004, 24(2): 136-141.

[12] Dufrane D, Mourad M, van-Steenberghe M, *et al*. Regeneration of abdominal wall musculofascial defects by a human acellular collagen matrix[J]. Biomaterials, 2008, 29(14): 2237-2248.

[13] Montagna W, Yun J S. The skin of the domestic pig[J]. J Invest Dermatol, 1964, 42: 11-21.

[14] Sullivan T P, Eaglstein W H, Davis S C, *et al*. The pig as a model for human wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(2): 66-76.

[15] 荣艳华 张国安 王成, 等. 不同年龄组人正常皮肤Ⅰ型和Ⅲ型胶原含量的比较[J]. 中华烧伤杂志, 2008, 24(1): 51-53.

[16] Starcher B, Aycock R L, Hill C H. Multiple roles for elastic fibers in the skin[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(4): 431-443.

[17] Smith L J, Fazzalari N L. The elastic fibre network of the human lumbar anulus fibrosus: architecture, mechanical function and potential role in the progression of intervertebral disc degeneration[J]. Eur Spine J, 2009, 18(4): 439-448.

[18] Vural E, McLaughlin N, Hogue W R, *et al*. Comparison of biomechanical properties of alloderm and enduragen as static facial sling biomaterials[J]. Laryngoscope, 2006, 116(3): 394-396.

(**收稿**:2009-12-15;**修回**:2010-01-15)

(编辑 吴培红)