文章编号:1000-5404(2014)03-0209-04

论著

膨体聚四氟乙烯自体血管组织化提高抗菌能力的实验研究

李 佳,樊东力,雷泽源,刘晓伟 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院整形美容科)

[摘要] **目的** 观察膨体聚四氟乙烯(expanded polytetrafluoroethylene,ePTFE)自体血管组织化后抗菌能力的变化。**方法** ①ePTFE片随机埋植在20只大鼠腹壁皮下自体血管组织化12周,观察组织长入材料情况;②每只大鼠各距背部中线2 cm处皮下左、右分别作切口,各注入表皮葡萄球菌(SE)菌液10 μL(10^5 ~ 10^8 CFU/L),随机埋植ePTFE片和自体血管组织化ePTFE片,1周后取出材料,ePTFE片为对照组、自体血管组织化ePTFE片为实验组,计数表面粘附细菌量并行HE染色和扫描电镜观察。**结果** HE染色观察结果显示体内血管组织化ePTFE内部已有细胞浸润及组织长入,无明显炎症细胞浸润,而普通ePTFE内部可见大量炎症细胞,材料表面可观察到类似肉芽肿样组织增生。扫描电镜观察结果显示体内血管组织化ePTFE表面可见少许、分散呈簇集状生长的葡萄球菌菌落,且见血管组织覆盖材料表面,而普通ePTFE表面覆盖大面积葡萄球菌,可见大量圆形、椭圆形菌体表面突起,呈簇集状生长,材料表面未见血管组织覆盖。实验组菌落粘附数量为$(4.73 \pm 0.62) \times 10^7$ CFU/L,对照组菌落粘附数量为$(15.46 \pm 1.33) \times 10^7$ CFU/L,术后1周实验组粘附细菌数量明显少于对照组($P < 0.05$)。**结论** 膨体聚四氟乙烯体内血管组织化后再次植入机体靶向部位,可快速与周围组织建立微循环结构,且材料表面粘附细菌数量减少,从而提高膨体聚四氟乙烯材料的抗菌能力。

[关键词] 膨体聚四氟乙烯;血管组织化;抗菌;生物材料
[中图法分类号] R-33; R318.08; R62 [文献标志码] A

Autologous vascularization improves antibacterial ability of expanded polytetrafluoroethylene

Li Jia, Fan Dongli, Lei Zeyuan, Liu Xiaowei (Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the antibacterial ability of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) after autologous vascularization in rats. **Methods** ePTFE films were randomly implanted into 20 rats subcutaneously for autologous vascularization for 12 weeks. The tissue growth in the materials was observed. Incisions were made on the two sides (distance = 2 cm) of the back midline. *Staphylococcus epidermidis* of 10 μL (10^5 ~ 10^8 CFU/L) was injected into the incisions, and ePTFE with or without autologous vascularization were implanted into the incisions. After 1 week, the materials were taken out to count the number of adhered bacteria. **Results** HE staining results displayed that ePTFE after autologous vascularization had normal cell infiltration and tissue growth but no obvious inflammatory cell infiltration, while ePTFE without autologous vascularization had a large amount of inflammatory cells. Scanning electron microscopy showed blood vessel tissue and a few of bacterial colonies on the surface of ePTFE after autologous vascularization, but no blood vessel tissue and a large amount of bacterial colonies on the surface of ePTFE without autologous vascularization. The number of adhesion colonies was $(4.73 \pm 0.62) \times 10^7$ CFU/L in the autologous vascularization group and $(15.46 \pm 1.33) \times 10^7$ CFU/L in the control group which was significantly less ($P < 0.05$). **Conclusion** Microcirculation can be quickly established between ePTFE implants after autologous vascularization and the surrounding tissues. ePTFE implants after autologous vascularization show reduced bacteria adhesion and improved the antibacterial ability.

[**Key words**] ePTFE; autologous vascularization; antibacterial; biomaterial

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81071574) and the Achievements Transformation Project of Third Military Medical University (2012XZH05). Corresponding author: Fan Dongli, E-mail: fdltmmu@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81071574);第三军医大学成果转化课题(2012XZH05)
[通信作者] 樊东力,E-mail:fdltmmu@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2214.019.html(2013-12-19)

在整形外科中，膨体聚四氟乙烯（expanded polytetrafluoroethylene，ePTFE）是常用于临床的高分子软组织填充材料[1]。它生物相容性佳，质地软，含微孔，允许细胞、组织长入，组织粘附性强，是一种理想的软组织充填人工材料，由于血管、组织可在材料内部生长，因此其手术远期固定效果好，形态自然，发生感染、假体外露的概率低于硅胶材料，而其缺点是质地软，内部结构受压后易变形，影响组织内生，且长期在摩擦力的作用下产生颗粒、微屑，引发慢性感染[2]。另外，在鼻腔、耳部等整形外科手术中术前消毒无法完全将鼻腔、耳部藏匿的细菌清除，因此容易将细菌带入术区，也是导致慢性感染的原因之一，并且生物材料作为异物进入体内可降低诱发感染的最低细菌数量[2]，远期也易诱发慢性感染、材料外露等并发症，最终导致手术失败。

为解决以上临床面临的难题，关键是要降低入侵细菌的粘附率及细菌生物膜的形成[3]。目前的研究观点认为细菌很难在活性、完整的细胞上粘附，基于此观点，本研究将 ePTFE 预先在动物自体体内皮下埋植，让组织、血管向微孔内适度生长，使材料与自身组织交联融合，形成一个携带微血管循环结构、结缔组织、细胞因子等物质的复合物，然后再次将复合物植入动物体内，并在伤口内注入一定量的细菌（模拟整形外科手术中的“带菌”状态），通过肉眼观察、HE 染色、电镜观察及细菌粘附量计数评价该复合物在细菌粘附方面是否具有抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

ePTFE 外科补片 1 cm×0.1 cm×1 cm（上海索康医用材料有限公司）；哥伦比亚血琼脂平板（CAN，重庆庞通医疗器械有限公司）；表皮葡萄球菌 SE_{235} 菌株（第三军医大学西南医院病理科）；健康雄性成年 SD 大鼠 20 只，体质量 200～250 g，由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供，并统一进行三级饲养。

1.2 方法

1.2.1 材料自体血管组织化（动物腹壁内） 无菌条件下，消毒 ePTFE 片备用。大鼠全身麻醉，腹部备皮，消毒铺巾，在腹部正中作长约 1 cm 切口，逐层分离至腹膜下，形成约 3 cm×3 cm 大小潜行腔隙。将备 ePTFE 片放入潜腔，切口缝合、消毒。埋植时间 12 周。12 周取出材料，HE 染色，步骤：①取出埋植于大鼠腹壁内 ePTFE 片，生理盐水冲洗 3 次。②将材料放入 4% 多聚甲醛溶液内固定 24 h。③70%、85%、95%、100% 乙醇溶液中脱水。④二甲苯溶液透明。⑤石蜡包埋。⑥切片。⑦苏木精-伊红染色。

1.2.2 材料取出再次植入体内靶向部位（动物背部） 12 周后，20 只大鼠全身麻醉，背部、腹部备皮，消毒铺巾，在大鼠腹部取出 20 块自体血管组织化 ePTFE 片放入 PBS 液中备用，随后背部消毒铺巾，在两侧脊柱旁 2 cm 处，皮肤各作两个长 2.5 cm×2.5 cm 的切口，每侧切口内各注入 SE_{235} 菌液 10 μL（光密度值 0.08～0.1，10^5～10^8 CFU/L），按随机原则背部左、右侧分别埋植普通 ePTFE 片、体内血管组织化 ePTFE 片，20 处埋植体内血管组织化 ePTFE 片为实验组，20 处埋植普通 ePTFE 片为对照组，伤口缝合、消毒包扎。

1.2.3 肉眼观察 术后 1 周内每天观察大鼠背部左、右侧伤口有无血肿、皮瓣坏死、感染、排斥、材料移位及脱落。炎症评价标准：按血肿形成的大小、皮瓣坏死百分比及植入材料脱落程度，参照 Neel[4] 的分级方法分为 3 级：0 级表示不存在；1 级表示轻度；2 级表示中度；3 级表示重度或广泛血肿形成或皮瓣坏死。

1.2.4 细菌计数 术后 1 周，取出所有大鼠背部埋植的材料，右侧埋植的体内血管组织化 ePTFE 为实验组，左侧埋植的普通 ePTFE 为对照组，用无菌水清洗 10 次，去除未粘附上的细菌，然后放入 2 mL 的灭菌水，混合振荡器振荡 15 min，彻底将材料表面粘附的细菌洗脱。最后，各取稀释菌液 1 μL 分别接种于血琼脂平板，温度 37 ℃，放入细菌孵育箱过夜培养，计数平板生长细菌菌落个数。

1.2.5 扫描电镜观察 分别取出体内血管组织化 ePTFE 片、普通 ePTFE 片，PBS 液冲洗，4% 多聚甲醛液、10% 四氧化锇液固定，乙醇、丙酮梯度脱水，乙酸异戊酯置换，临界点干燥，喷金，扫描电镜观察细菌粘附材料表面情况。

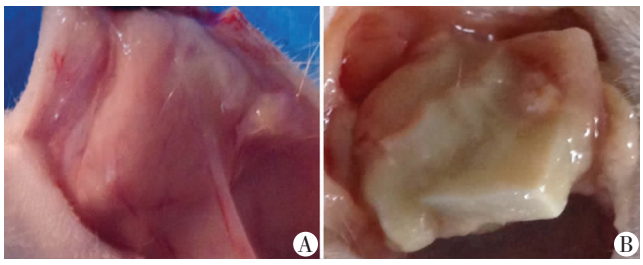
1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件行单因素方差分析和 Tukey 方法。

2 结果

2.1 形态学观察

炎症评价：实验组 10 处 0 级、6 处 1 级、3 处 2 级、1 处 3 级；对照组 5 处 0 级、6 处 1 级、7 处 2 级、2 处 3 级。总计 3 例大鼠死亡，死亡率为 15%。观察两组材料长入情况，体内血管组织化 ePTFE 片与周围组织紧密牢固地结合，表面有新生血管长入材料内部，无明显坏死、脓性分泌物等炎症表现（图 1A），普通 ePTFE 片与周围组织无粘连，未见明显组织、血管长入，且材料表面附有淡黄色脓性黏状分泌物（图 1B）。

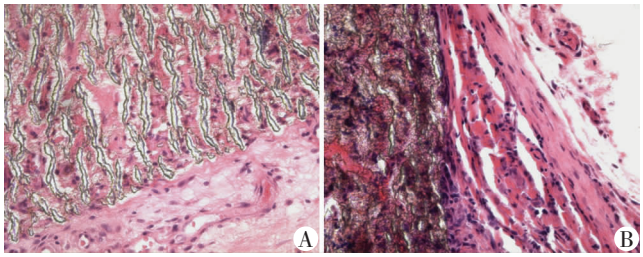


A：血管组织化 ePTFE 片；B：普通 ePTFE 片

图 1 肉眼观察术后 1 周血管组织化 ePTFE 片、普通 ePTFE 片表面炎症情况

2.2 HE 染色观察

体内血管组织化 ePTFE 片内部已有细胞浸润及组织长入，无明显炎症细胞浸润（图 2A），而普通 ePTFE 片内部可见大量炎症细胞，材料表面可观察到类似肉芽肿样组织增生（图 2B）。



A:血管组织化 ePTFE 片;B:普通 ePTFE 片

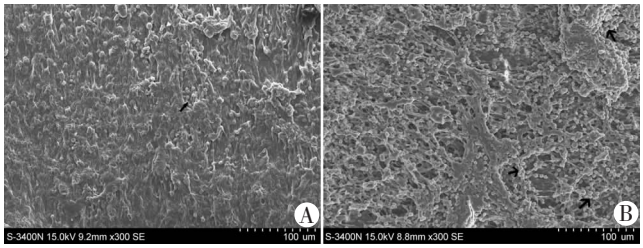
图 2 HE 染色观察血管组织化 ePTFE 片、普通 ePTFE 片内部长入机体组织情况 (×100)

2.3 细菌计数

实验组表皮葡萄球菌粘附菌落形成单位(4.73 ± 0.62) × 10^7 CFU/L、对照组(15.46 ± 1.33) × 10^7 CFU/L,显示术后 1 周实验组粘附细菌数量均明显少于对照组($P < 0.05$),证明大鼠体内埋植自体血管化 ePTFE 片可降低术区材料表面的细菌粘附率。

2.4 扫描电镜观察

体内血管组织化 ePTFE 片表面可见少许、分散呈簇集状生长的葡萄球菌菌落,且见血管组织覆盖材料表面(图 3A),而普通 ePTFE 片表面覆盖大面积葡萄球菌,可见大量圆形、椭圆形菌体表面突起,呈簇集状生长,基底可见连续且具有三维结构的细菌生物膜,材料表面未见血管组织覆盖(图 3B)。



A:血管组织化 ePTFE 片;B:普通 ePTFE 片

图 3 扫描电镜观察体内血管组织化 ePTFE 片和普通 ePTFE 片表面粘附细菌情况

3 讨论

ePTFE 是常用于临床的高分子软组织填充材料,广泛应用于各个学科,含有多孔超微结构是其特点之一,允许细胞、组织长入,植入人体皮下组织后稳固性较强,微孔直径平均长度为 50 μm, 其体积的 80% 为纤维间隙,其间可允许细胞游走及组织向内适度生长。普遍观点认为有孔材料虽然有利组织血管长入,但也利于细菌的隐蔽,增加消除细菌的困难,从而诱发感染[5];然而也有学者认为由于机体各种免疫细胞、组织进入 ePTFE 的微孔,阻止材料-组织交界处形成瘢痕,从而限制了感染[6]。

目前研究表明,导致生物材料术后感染常见的病原菌为定居在人体皮肤和黏膜表面的条件致病菌——SE[2]。由于生物材料与人体血液和组织接触后,表面会吸附人体组织、细胞分泌的各种纤黏蛋白、细胞外基质等物质,而细菌也可定居于材料表面生长、繁殖,两者逐渐混合形成水合多聚糖性质的生物活性膜即细菌生物膜[7],从而增加机体免疫吞噬的难度;另外,抗生素也无法有效清除它,而且大量使用容易诱导细菌耐药。目前普遍观点认为细菌很难在活性、完整的细胞上粘附,如果植入材料表面能快速被内皮细胞覆盖,与周围组织形成严密的连接界面,且组织长入材料孔隙将其填满,可有效地防止细菌粘附和隐藏,或可降低细菌粘附数量,使其不易在材料表面繁殖、扩散,所以曾有报道微孔结构材料对细菌的易感性明显低于致密生物材料。Gruionu 等[8]将放入体外血管床(胶原质Ⅰ、血管片段)进行预血管化后的 ePTFE 材料放入小鼠体内,发现预血管化过程中形成的微血管循环(MVC)结构可自发和机体组织、血管交联融合,替代肉芽组织的形成,促进新生血管长入;同时发现预血管化后基础环境可提高 ePTFE 表面改性分子与组织界面有效接触的概率,并参与材料性能与周围环境的改造,而炎症细胞的浸润也明显减少,从而可以降低手术后感染发生率。文献[9]报道与本实验结果基本吻合。

目前发现可直接诱导细胞分化及生长的重要活性分子,例如在 ePTFE 表面镀层血管生成因子和细胞的混合物,FN、VEGF 联合使用可以提高血管长入微孔内的能力,并促使伤口愈合[10]。总体而言,目前常用的生物材料表面改性技术操作复杂,经济成本高,临床应用目前还有一定限制[11]。另外在组织工程学中,生物材料支架通过细胞体外培养或构建修复器官、组织,最终需要植入体内与机体周围组织相融合。本实验中将生物材料支架在体内进行血管组织化,不仅方法简单、易操作,减少体外细胞组织培养、构建失败率,并且材料在体内血管组织化后的生态环境模拟化程度高,几乎可等视为活体组织,所以能在短时间内与机体周围组织建立有效的血液循环结构,缩短材料与机体组织融合时间,促使伤口愈合,而缺点是该手段有创伤性,存在二次手术感染风险。在整形外科皮肤扩张术耳廓再造病例中,一期埋入扩张器的时间为 3 ~ 6 个月[12],与本实验中植入材料自体血管组织化时间基本相同,如果埋入扩张器的同时进行耳廓支架材料自体血管组织化,我们推测可能会减少二期扩张器取出埋入耳廓支架材料后由于局部皮肤薄、弹性差、血供欠佳,术后出现材料脱落、感染的并发症。

总之,本研究证实类似 ePTFE 具有微孔的生物材料放入机体体内进行血管组织化,使血管、组织向微孔

内适度生长,成为一个携带微血管循环结构、细胞因子等物质的复合有机体,该复合有机体可有效减少细菌粘附量,降低感染发生率,对临床工作具有参考意义,然而具体细节尚需进一步动物实验及临床实验支持。

参考文献:

[1] Cozad M J, Grant D A, Bachman S L, *et al*. Materials characterization of explanted polypropylene, polyethylene terephthalate, and expanded polytetrafluoroethylene composites: spectral and thermal analysis[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010, 94(2): 455-462.

[2] Zimmerli W, Sendi P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host[J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(2): 295-306.

[3] 许亚夫. 抗菌生物材料的抗细菌黏附能力[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(51): 9671-9678.

[4] Neel H B 3rd. Implants of Core-Tex: comparisons with Teflon-coated polytetrafluoroethylene carbon and porous polyethylene implants[J]. Arah Otolaryngol, 1983, 109(7): 427-433.

[5] Carbonell J M, Martin I S, Santos A, *et al*. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2013, pii: S0901-5027(13)00256-7. [Epub ahead of print].

[6] Wu Y, Zitelli J P, TenHuisen K S, *et al*. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness[J]. Biomaterials, 2011, 32(4): 951-960.

[7] Arciola C R, Campoccia D, Speziale P, *et al*. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials[J]. Biomaterials, 2012, 33(26): 5967-5982.

[8] Gruionu G, Stone A L, Schwartz M A, *et al*. Encapsulation of ePTFE in prevascularized collagen leads to peri-implant vascularization with reduced inflammation[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 95(3): 811-818.

[9] Wijelath E, Kohler TR, Murray J, *et al*. Enhancement of capillary and cellular ingrowth in ePTFE implants with a proangiogenic recombinant construct derived from fibronectin[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 95(2): 641-648.

[10] Kingshott P, Andersson G, McArthur S L, *et al*. Surface modification and chemical surface analysis of biomaterials[J]. Curr Opin Chem Biol, 2011, 15(5): 667-676.

[11] Zimmerli W. Implanted devices: biocompatibility, infection and tissue engineering[J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(3): 219-220.

[12] 康深松, 张栋益, 刘宏建, 等. 改良Nagata法耳廓再造术治疗小耳畸形[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 48(4): 337-340.

(**收稿**:2013-10-11;**修回**:2013-11-07)

(编辑 王小寒)

(上接208页)

3 讨论

临床上尺桡骨双骨折内固定骨折不连接概率较高,常见的造成骨折不连接的因素主要有:①开放性骨折;②感染;③多节断骨折,通常中间截断血供受损;④严重创伤引起的粉碎性骨折;⑤固定不牢靠;⑥固定时间不足;⑦不恰当的切开复位;⑧牵引或钢板螺钉固定不当,使骨折端分离[2]。

本例患者因外伤造成尺桡骨双骨折,入院即在臂丛麻醉下行左尺桡骨切开复位内固定术,术中尺桡骨均达到解剖复位,确认断端无软组织嵌入后,解剖钢板固定。术后拍X线片骨折断端对位良好,术后石膏固定,抗生素治疗5 d,切口愈合良好,术后10 d拆除缝线。考虑患者为年轻男性,身体状况较好。左前臂石膏固定3周后开始练习手指屈伸活动和腕、肘关节活动,4周后拆除石膏,X线片检查结果提示尺骨愈合良好;术后3个月复查,X线片检查结果提示桡骨骨折断端骨吸收,给予前臂夹板外固定6周;术后7个月复查X线片仍见桡骨清晰骨折吸收线,无愈合征象,诊断骨折不连接,考虑手术植骨加内固定治疗[1]。患者本人不愿意接受手术治疗,仍要求非手术治疗。分析此患者不连接原因,排除手术方式不当、内固定不牢及感染等原因,考虑尺骨骨折的愈合对桡骨断端的接触造成了阻碍,产生了应力遮挡引起桡骨骨折不连接[3]。有研究表明对骨折端加压可加快骨折愈合[4],轻度加压可使骨折愈合强度更接近正常骨[5]。与患者沟通后,嘱患者在无痛下小幅度行患前臂纵向应力刺激[6]。术后约9个月复查,X线片检查结果提示尺骨愈合良好,桡骨骨折断端无明显连接,未见骨痂生长。术后12个月复查,X线片见桡骨骨折线模糊,可见骨小梁通过骨折线,桡骨基本愈合。术后15个月复查,X线片检查结果提示尺骨和桡骨骨折愈合良好。我们对本例患者采用一定强度的应力刺激,使桡骨骨折不连接得到了治愈,避免了手术给患者带来的痛苦,同时也减轻了经济负担。但换成其他患者,此方法未必得到相同的治疗效果,所以对于可以诊断为骨折不连接的患者时,是否采取手术治疗?何时采取手术时间最佳?我们都无法确定。本组仅1例患者,此方法是否有效?这在今后临床工作中将进一步总结。

参考文献:

[1] 王茂, 孙天胜. 前臂骨折术后骨不连原因分析及治疗对策[J]. 医学综述, 2010, 16(11): 1760-1761.

[2] 刘璠, 祁俊. 骨折不愈合与延迟愈合的成因与治疗[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(5): 405-408.

[3] 陈德旺, 丁真奇. 应力对骨折愈合的影响及作用机制[J]. 中华生物医学工程杂志, 2011, 17(1): 86-89.

[4] 李建福, 李起鸿, 张信东. 压应力促进骨折愈合的实验观察[J]. 中国矫形外科杂志, 1997, 4(3): 217-218, 256.

[5] 许建中, 李起鸿, 马树枝. 骨外固定器轴向加压对骨折愈合影响的实验观察[J]. 第三军医大学学报, 1993, 15(3): 220-222.

[6] Takeda T, Narita T, Ito H. Experimental study on the effect of mechanical stimulation on the early stage of fracture healing[J]. J Nippon Med Sch, 2004, 71(4): 252-262.

(**收稿**:2013-08-14;**修回**:2013-09-10)

(编辑 王 红)