

# 人工皮 Bio Fill® 的实验研究

利天增<sup>1</sup> 陈景荣<sup>2</sup> 谭洁芳<sup>3</sup> 伍建林<sup>3</sup> 丘钜世<sup>4</sup> 陈菊君<sup>5</sup>

(中山医科大学 1 附属第一医院烧伤科 2 生理教研室 3 附属第一医院麻醉科  
4 病理教研室 5 附属第一医院检验科细菌室; 广州, 510080)

**摘要** 目的: 人工皮 Bio Fill® (BF) 在临床上应用效果较好。为探讨其作用机制, 我们设计和进行了本实验研究。方法: ①用新西兰白兔造成平均为体表面积 8.74% 的全层皮肤缺损的动物模型, 在其创面上分别覆盖 BF 和生理盐水纱布, 观察诸兔术后精神状态, 并测定它们的基础代谢、血清丙二醛和生化 8 项 (Na、K、Cl、TCO<sub>2</sub>、Glu、BUN、Cr、Tp), 观察其变化; ②用液体接种法、平板接种法, 分别接种金黄色葡萄球菌等 10 个致病菌种, 观察 BF 的杀菌和防御细菌入侵能力; ③用光镜观察用 BF 覆盖后创面局部变化; ④用电镜观察 BF 的超微结构。结果: ①BF 组诸兔术后能饮水、进食, 次晨即恢复活泼可爱状态; 生理盐水组精神状态差, 有 2 兔术后 20 h 内死亡, 其余各兔术后 3 d 才恢复正常活动; ②实验组兔伤后第 1、2、3、6 天的基础代谢比对照组低 ( $P < 0.05$ ); ③实验组兔伤后第 1、2、3、6 天血清丙二醛含量较对照组低 ( $P < 0.05$ ); ④两组兔的生化 8 项变化无显著差异; ⑤液体接种法的 10 个菌种培养后全部有细菌生长, BF 无抑菌或杀菌能力; 平板接种法的结果相同, 但 BF 下面培养基上无细菌生长, 或者已生长的菌落缩小、消失, 在 BF 上面接种的细菌不能穿过 BF, 于其下面培养基上生长; ⑥用 BF 覆盖的创面, 光镜下见 BF 呈均质红染膜状, 其下有薄层的坏死组织, 再下为正常的肉芽组织, 无排斥反应; ⑦电镜见 BF 的纵切面厚约 50~100 μm, 由多层弯曲的纤维组成, 纤维间有小而弯曲的窦道样间隙, 有微孔通向 BF 的表面。结论: 用 BF 覆盖创面的免病理生理改变比对照组轻, 恢复快; BF 不能抑菌或杀菌, 但能防止细菌从外界侵入创面; 用 BF 覆盖的培养基不利于细胞生长; 应用 BF 后无排斥现象。

**主题词** 皮肤, 人工; 烧伤/治疗

**中图分类号** R 318.1; 644

## A EXPERIMENTAL STUDY ON ARTIFICIAL SKIN BIO FILL®

Li Tianzeng Chen Jingrong Tan Jiefang Wu Jianlin Qiu Jushi Chen Jujun

(Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

**Abstract Objective** Investigating the effects and the mechanism of Bio Fill® (BF). **Methods** ① 8.574% TBSA full thickness skin loss wounds of Newzland rabbits were covered with BF(12) of normal saline (NS) gauze(12). Comparing the changes of vigor, basal metabolism serum malondialdehyde(MDA) and serum eight biochemical items. ② The antibiotic and obstructive effects of BF were investigated through liquid inoculation and surface plate inoculation. ③ The light microscopic changes of burn wound covered with BF were studied. ④ The ultra-structure of BF was researched. **Results** ① All rabbits of BF group restored taking food night after regaining consciousness and regained vigor the next day. By contrast, 2 rabbits died with in 20 h postoperation and the remainders had been dull until 3 days postoperation in NS group. ② The basal metabolism and the serum MDA of the BF group in the four different times were lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). ③ The serum MDA of the BF group in the four different times were lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). ④ The levels of eight biochemical items between two groups were not significant different. ⑤ The results of liquid inoculation and surface plate inoculation indicated that BF had obstructive but not antibiotic effect. ⑥ The wound covered with BF didn't show rejection under light microscopy. ⑦ Under electronic microscopy, the ply of BF was 50~100 μm, which consisted of lays of crooked fiber and had lots of microduct among the fibers. **Conclusions:** The pathophysiological changes of the rabbits covered with BF were not as severe as that of the control group and recovered rapidly. BF had not antibiotic but obstructive effect. The wound covered with BF didn't show rejection under light microscopy.

**Subject headings** skin, artificial; burns/therapy

目前, 临床上使用最多的生物性皮肤代用品有异体皮、异种皮(以猪、胎牛、羊皮为多), 其次为胎膜。但它们制备费时, 储存、运输不便; 有抗原性, 移植后有排斥反应; 近年来还发现异体皮的移植会带来病毒感染的问题<sup>[1]</sup>。70年代后期开始了人表皮细胞培养, 近年有人研究用培养的自体表皮和异体真皮联合应用作为永久性覆盖烧伤创面之

用<sup>[2]</sup>。但是, 细胞培养周期较长, 需要一定的条件, 短期内尚难于基层医院推广。半合成的人工皮用牛胶原、或猪皮胶原肽、或从鲨鱼软骨中提取的 6-硫酸软骨素配以硅胶或尼龙等制成。以 Burke 的复合皮(Composite Skin)<sup>[3]</sup>和 Bio-brane<sup>[4]</sup>为代表。近来有人用培养的人角质细胞、成纤维细胞和胶原-葡糖氨基糖合成人工皮<sup>[5]</sup>。至于人工合成的

人工皮种类更是越来越多。但是,所有这些皮肤代用品都各有优缺点,至今尚无一种十全十美、令人完全满意的人工皮。Bio Fill®(BF)是一种新型的植物性的人工皮,临床上具有保护创面,防止外源性创面感染,有利于创面修复的作用。我们对其作用机理和结构进行研究,以作为日后进一步研制更好的人工皮时参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 Bio Fill® 为巴西 Bio Fill Products Biotecnologicos S. A 产品。

1.1.2 动物 二级实验用纯种新西兰白兔 30 只,雌雄不分,按其体重接近者分两组。其中 12 只作 BF 的屏障作用研究,平均体重( $1.95 \pm 0.10$ ) kg,按 Meeh-Rubner 公式<sup>[6]</sup>计算的体表面积平均为( $0.156 \pm 0.008$ ) m<sup>2</sup>。作组织学研究的 18 只,平均体重( $2.18 \pm 0.20$ ) kg。所有动物由中山医科大学实验动物中心提供,合格证号 96-035。

1.1.3 菌 种 包括金黄色葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、硝酸盐杆菌、肺炎克雷白氏菌、异型枸橼酸杆菌、脆弱拟杆菌、以路拟杆菌等 10 种,均为本院细菌室从病人创面分离培养出来的纯菌种。

### 1.2 观察指标方法

1.2.1 BF 的屏障作用的研究 测量各兔正常体重,取血查血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)及钠(Na)、钾(K)、氯(Cl)、总二氧化碳(TCO<sub>2</sub>)、血糖(Glu)、尿素氮(BuN)、肌酐(Cr)、总蛋白量(Tp)(简称生化 8 项,下同);收集各兔 6 min 呼吸的气体,检测其中氧和二氧化碳的含量,以开放式气体代谢测量法<sup>[7]</sup>计算各兔的基础代谢数值。用苯巴比妥钠 30 mg/kg 作各兔耳缘静脉注射。麻醉后,剃除术野被毛,以 3% 红汞及 75% 酒精皮肤灭菌,铺巾。分别切除各兔全层皮肤,平均面积 13 cm×10 cm,平均为体表面积的 8.74%。压迫止血后,按随机分配分为两组,一组创面上覆盖一层 BF 为实验组(BF Group)以观察其是否有皮肤屏障样的作用;另一组创面上覆盖生理盐水纱布包扎,作为正常皮肤屏障完全丧失的对照组(NS Group)。术后每天观察各兔的精神状态,并于术后第 1、2、3、6 天测量各兔的基础代谢、血清丙二醛和生化 8 项。

1.2.2 BF 抗菌能力的研究 ①液体接种法:于血琼脂平板中取培育出的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌纯菌接种于肉汤培养管中,在 37℃ 中培养 48 h。培养后肉汤变混浊,含菌量约为  $2 \times 10^9$  /L,作为实验用菌种。

取肉汤培养基 18 管,每 3 管为 1 组,共 6 组。其中 3

组的 A 管接种金黄色葡萄球菌菌种液 0.5 mL 和一块 3 cm×3 cm 的 BF 为实验组,观察 BF 能否抑制细菌生长;B 管同样接种菌种,不置 BF 为对照组;C 管为单纯肉汤培养液作空白对照。另外 3 组的 A、B、C 管与上述 3 组一样设计,所异者,接种菌种为铜绿假单胞菌。所有培养管均置 37℃ 培养箱中培养 48 h,培养后 6、12、24、48 h 观察其混浊程度和含菌量。②平板接种法:取血琼脂平板 120 个,以 4 个平板为 1 组,每组平板分别编号为 A、B、C、D 板。用上文 1.1.3 所述的 10 种细菌接种,每 3 组平板接种一种细菌。具体安排如下:

A 板只接种菌种作对照组,观察细菌生长情况;B 板先贴一块 2 cm×2 cm 的 BF,再于 BF 表面接种细菌,以观察细菌能否通过 BF 到 BF 下面的培养基上生长;C 板接种菌种后立即覆盖一块 2 cm×2 cm 的 BF,观察在 BF 覆盖下的培养基是否适宜细菌生长;D 板接种菌种并培养 24 h,细菌生长后于其菌落上覆盖一块 2 cm×2 cm BF,以观察 BF 能否抑制细菌生长。所有平板均置于 37℃ 培养箱中培养,于 24、48、72 h 各观察细菌生长情况。

1.2.3 组织学变化的研究 取新西兰兔 18 只,按上述方法于各兔背部两侧分别切除 4 cm×5 cm 全层皮肤,按随机分配分为 3 组:①第 1 组,一侧创面上覆盖 BF,另一侧覆盖异体皮作对照,观察和比较用 BF 和异体皮覆盖创面后局部组织的病理变化;②第 2 组,两侧创面上移植自体小皮片后,一侧再覆盖 BF,另一侧覆盖异体皮作对照,观察和比较 BF 和异体皮对移植的自体小皮片的生长影响;③第 3 组,创面上移植对侧的自体皮,以观察和比较 BF、异体皮和自体皮移植的后果。所有动物均于术后喂养 7 d 取局部组织活检。

1.2.4 BF 结构的观察 取 BF 切片,分别于光学显微镜和电子显微镜下观察其结构。

## 2 结 果

### 2.1 BF 的屏障作用

2.1.1 精神状态及存活情况 实验组的第 5 号兔因麻醉过深呼吸心跳骤停,经人工呼吸、心脏按摩等复苏救活。随后切除皮肤面积 10 cm×13 cm。术后 4 h 清醒,醒后呈现极度疲乏状态,不饮不食,于术后 16 h 死亡。其余诸兔清醒后均能饮水、进食。翌晨即恢复活泼可爱的状态。对照组醒后也都饮水、进食,但精神状态明显比实验组差。有 2 只兔于术后 20 h 内死亡。其余各兔于术后 3 d 才恢复活泼可爱的状态。

2.1.2 基础代谢变化 用 BF 覆盖创面的兔的基础代谢增高的幅度比对照组明显小,见表 1。

2.1.3 两组家兔血清丙二醛的变化 用 BF 覆盖创面的家兔血清丙二醛含量较对照组低,见表 2。

表 1 两组家兔的基础代谢变化

Table 1 The basal metabolism of the two groups of rabbits (w/m<sup>2</sup>)

	preoperation	postoperation (day)			
		1 st	2 nd	3 rd	6 th
BF group	13.67±1.12	21.96±3.88	65.36±11.62	89.84±9.97	29.21±1.29
NS group	13.95±1.03	24.34±3.41	87.25±7.66	123.39±3.87	51.72±3.23
P	> 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

表 2 两组家兔血清丙二醛的变化

Table 2 Mean serum concentration of MDA (μmol/L)

	preoperation	postoperation (day)			
		1 st	2 nd	3 rd <sup>1)</sup>	6 th
BF group	2.98±0.13	3.59±0.03	4.74±0.13	3.87±0.15	3.18±0.16
NS group	3.03±0.20	3.97±0.28	6.03±0.64	6.12±0.56	3.99±0.38

1) P < 0.05

表 3 两组家兔血清生化 8 项的变化 (平均值)

Table 3 Mean serum concentration of eight items (BF group/NS group, mmol/L)

BF Group/NS Group (d)	Na	K	Cl	TCO <sub>2</sub>	Glucose	BUN	Cr	TP
1 st	137.8/138.3	4.83/5.00	100.5/99.7	18.75/21.00	7.82/8.01	8.75/8.69	70.7/67.2	62.5/66.0
2 nd	139.0/139.0	5.08/5.60	102.3/102.0	13.50/16.33	5.29/4.27	9.01/7.14	69.0/68.1	64.0/69.6
6 th	121.0/116.0	4.03/3.53	97.5/89.3	24.25/21.00	6.13/5.37	6.60/8.80	91.1/84.9	62.3/67.2

Note: The results of preoperation and postoperated 3rd day were not showed, because these blood samples haemolyted

2.1.4 两组家兔血清生化 8 项的变化 术前与术后第 3 天部分兔血标本溶血, 未作检测, 其余各天检测结果见表 3, 两组比较无显著差异。

2.2 BF 防御细菌入侵能力

2.2.1 液体接种法结果 培养 6 h 后 A、B 两管已开始混浊, 有菌生长; 随时间推移混浊加重。培养 48 h 两管同样混浊, 含菌量基本相同, 约 1.2 × 10<sup>9</sup>/L。C 管始终澄清, 说明 BF 无抑菌或杀菌能力。

2.2.2 平板接种法结果 不同细菌结果相同。A 板: 培养 24 h 即有菌落生长, 且越来越多。B 板: 培养 24 h, 于 BF 上有菌落生长, 并渐增多, 蔓延至 BF 周围血琼脂上生长。培养 72 h 揭去 BF, 其下无菌生长。C 板: 培养 24 h, 见 BF 周围有菌生长, BF 表面无菌生长, 72 h BF 表面及揭去 BF 后其下血琼脂均无菌生长; BF 周围的血琼脂上菌落生长连成片。D 板: 培养 48 h, 见 BF 周围细菌生长密集, 揭去 BF, 见其下原来生长的菌落缩小或消失, BF 表面无菌生长。

2.3 组织学改变结果

创面覆盖 BF 者镜下见局部无皮肤组织, BF 呈均质红染膜状, 厚约 50~100 μm, 其下有薄层坏层组织, 再其下为正常肉芽组织, 无排斥反应, 边缘上皮向创面中心爬行生长。创面移植自体小皮片后再盖以 BF 者, 镜下见 BF 下创面上移植的小皮片成活, 有皮肤结构及皮肤附件; 小皮片向周围扩展, 其间有瘢痕组织。创面移植异体皮者见有厚层坏死组织, 其下为肉芽组织, 内有少量异物巨细胞反应。创面移植自体小皮片后再覆盖异体皮者见部分皮片间瘢痕组织上有表皮被覆或皮片间为薄层坏死物, 下有肉芽组织形

成。创面移植对侧自体皮, 术后被兔咬去者有两个创面。镜下见创面坏死深达肌层, 坏死组织下有肉芽形成。创面移植与创面等大的大块全层对侧的自体皮者镜下见皮片成活, 创面已全为皮肤覆盖, 无坏死及炎症反应。

2.4 BF 的结构观察结果

BF 在 100 倍光学显微镜下呈均质膜状, 表面无明显孔隙。用电子显微镜观察 BF 的纵切面, 见 BF 厚约 50~100 μm, 由多层弯曲的纤维组成, 纤维间有小而弯曲的隧道样间隙, 有微孔通向 BF 表面。这种结构可以解释 BF 用于创面上, 水蒸气能蒸发出来, 不引起 BF 下积液; 而水、细菌不能通过 BF, 使 BF 有屏障作用。

3 讨论

3.1 BF 的屏障作用

临床上见 BF 人工皮色白, 半透明, 质地柔软光滑, 具有较强的弹性及抗牵张强度, 不透水, 与创面贴附好。从本实验的结果中可见, 实验组与对照组的比较除血清生化 8 项的变化无显著差异外, 实验组术后恢复较对照组快; 超高代谢和丙二醛的含量比对照组低且其下降也是实验组快而明显。这些指标的比较, 两组有显著的差异。

此外, 在切除皮肤面积相同的情况下, 实验组 1 只兔除麻醉意外后随即接受切除皮肤的第 2 次打击而死亡外, 其余诸兔均活存, 恢复迅速; 而对照组则有 2 只兔于术后 20 h 内死亡, 其余诸兔恢复也较慢。从上述可见, BF 有皮肤样的屏障作用, 能保护机体内环境的稳定。

### 3.2 BF 防御细菌入侵的作用

从细菌学实验的结果可见, BF 对本实验的 10 种细菌无抑菌和杀菌作用。在 BF 表面接种的菌种可以在 BF 的表面生长; 揭去 BF, 其下的血琼脂培养基无菌生长, 说明细菌不能通过 BF 到达其下的培养基。接种细菌后立即覆盖 BF, 与在细菌生长后的血琼脂平板上覆盖 BF, 结果 BF 下面无菌生长, 或已生长的菌落缩小、消失, 提示 BF 下面的环境不适宜细菌生长。这些结果与临床应用结果相符。

### 3.3 BF 能透气, 不引起人工皮下积液

从 BF 的透气性能测定结果可见, 其透气性比保留腐皮的 II 度创面上的腐皮透气性高<sup>[8]</sup>。这说明临床上在应用持续热风治疗时 BF 下无积液的原因; 也提示用 BF 后仍有较大的不显性失水, 临床上需要补充水分, 以防应用持续热风治疗后高钠血症和高渗综合征。

### 3.4 BF 无异物和抗原作用

从组织学检查结果可见, 用 BF 保护的创面, 坏死组织层比用异体皮保护的创面薄, 而且无异体皮一样引起受体的异物反应和排斥反应。在临床上用 BF 保护的深 II 度烧伤创面也能于 BF 下愈合, 无出现排斥反应, 与本实验结果相符。

### 3.5 研制人工皮的借鉴

目前国内外尚无一种能完全代替皮肤的人造皮。理想的人工皮需要达到下列的指标: ①无色、透明, 用后便于观察创面; ②质地柔软光滑, 有较强的弹性及抗牵张强度, 能贴附于身体任何部位的体表, 与创面贴附快而牢固, 不起皱折, 肢体活动时不脱落; ③有良好的透气性能, 不引起人工皮下积液; ④能减少热量、电解质和蛋白质的丢失, 改善病人的全身机能状态; ⑤能防止细菌通过, 或不利细菌生长; ⑥不损害组织细胞, 不影响正常修复; ⑦不引起受体的异物反应; ⑧无抗原性, 不引起受体的排斥反应; ⑨有皮肤样的屏障作用, 减轻疼痛, 保持受体内环境的稳定; ⑩便于消毒; ⑪便于贮存和运输; ⑫能大量生产; ⑬价格便宜。

BF 是目前常用的人工皮中较好的一种, 本实验与临床

都证明其作用。然而, BF 之所以具有比较接近上述的要求可能与其由多层弯曲的纤维组成, 纤维间有微小窦道开口于 BF 的表面的结构有关。这对我们今后研制更好的人工皮无疑是一个很好的借鉴。

(参加本实验研究者还有中山医科大学附属第一医院陈宝珠、吴博恒、温春光、黎志明、祁少海、陈连周、李永勇、谢举临和西京医院朱雄翔、陈璧同志等, 于此一并致谢)

### 参 考 文 献

- 1 Greenleaf G, Hansbrough J F. Current trends in the use of allograft skin for patients with burns and reflections on the future of skin banking in the United States. *J Burn Care Rehabil*. 1994, 15(5): 428
- 2 Hickerson W L, Compton C, Fletchall S, *et al*. Cultured epidermal autografts and all demis combination for permanent burn wound coverage. *Burns*. 1994, 20(1): S52
- 3 Burke J F, Yannas I V, Quinby W C, *et al*. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burns injury. *Ann Surg* 1981, 194(4): 413
- 4 Hansbrough J F, Zapata-Sirvent R, Carroll W J, *et al*. Clinical experience with Biobrane<sup>®</sup> biosynthetic dressing in the treatment of partial thickness burns. *Burns*. 1984, 10(6): 415
- 5 Cooper M L, Hansbrough J F, Diego S. Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and collagen-GAG matrix to cover full-thickness. *Surgery*, 1991, 109(2): 198
- 6 章元沛, 苏怀德主编. 药理学实验. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 239
- 7 周衍椒, 赵轶千, 王雨若, 主编. 生理学方法与技术(第 3 集). 北京: 科学出版社, 1987. 436~482
- 8 朱雄翔, 陈 璧. Bio Fill 人工皮临床应用及疗效观察. *中华整形烧伤外科杂志*, 1993, 9(1): 76

(1997-12-18 收稿 1998-04-10 修回)