

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520131153429

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

负载有自体 BMSCs 的 PLGA-Collagen I 复合
补片修复腹股沟疝的研究

The development of seeding autologous BMSCs into PLGA-
Collagen I hybrid patch for inguinal herniorrhaphy

赵斌

指导教师姓名: 赵一麟副教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 4 月

学位授予日期:

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘 要

腹股沟疝为多发病,传统使用疝修补术,有张力较强、易复发、疼痛等缺点,现在临床上多使用无张力疝修补术,能较好解决上述问题。目前临床上大量使用补片修补疝气,然而各种疝气补片均有其不足之处,如不可降解性、易感染、顺应性差等。同时手术之后常伴有并发症,如阴囊血肿、切口感染、术后疼痛、缺血性睾丸炎或睾丸萎缩、腹腔脏器损伤及疝复发等。这些并发症的发生多与医生、患者及手术环境等多方面因素有关。然而随着当今材料学科的飞速发展,以及对干细胞治疗的研究有了更深刻的认识,因而材料与细胞的结合无疑是治疗手段的关键。

PLGA 由聚乳酸和羟基乙酸两种单体聚合而成,是一种可降解的功能性高分子化合物,具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜的性能。I 型胶原蛋白是哺乳动物组织内含量丰富的蛋白质,其能形成胶原纤维,胶原纤维具有在组织修复中维持组织机械力学性能的特点。骨髓间充质干细胞作为成体多能干细胞,是一类具有自我更新和多向分化能力的干细胞,在体外不同条件诱导下可分化为多种细胞。骨髓间充质干细胞应用于腹股沟疝自体移植修复方面,免疫排斥较低。

为了更好地促进疝修补术后血管、腹肌、平滑肌组织再生,尽量避免并发症的发生,我们制备了 PLGA-Collagen I 补片,然后负载自体骨髓间充质干细胞,用于修补腹壁缺损,术后通过检测白细胞介素-6 和白细胞介素-10,巨噬细胞的含量,以及血管新生、胶原纤维形成情况,发现负载有自体骨髓间充质干细胞的 PLGA-Collagen I 支架补片是一种非常有前景的医用材料。

关键词: 腹股沟疝 疝气补片 骨髓间充质干细胞 组织工程

Abstract

As a frequently occurring disease, inguinal hernia was usually treated by hernia repair surgery. Hernia repair surgery has some disadvantages such as tension, relapse easily, insufferable pain and so on. Tension-free hernioplasty is now using in clinical surgery. Currently a large number of patches are used in operation, but all kinds of hernia patches has its shortcomings, such as non-degradable, more susceptible, poor compliance. Complications, such as scrotal hematoma, wound infection, postoperative pain, ischemic orchitis or testicular atrophy, abdominal organ injury and hernia recurrence, were often occurred. These complications are often caused by doctors, patients themselves, the surgical environment as well as other unknown factors. However, with the rapid development of the today's materials science, as well as having a deep cognition research on stem cell therapy, there is no doubt that combining stem cell with materials is a promising method to repair hernia.

PLGA is a copolymer which is synthesized by means of ring-opening and copolymerization of two different monomers. It owns following properties: biodegradability, biocompatibility, non-toxic, good film-forming and encapsulated ability. As a kind of adult pluripotent stem cell, Mesenchymal Stem Cell is a class of self-renewal and multipotent stromal cells that can differentiate into a variety of cell types under induced vitro conditions. Type I Collagen is the most abundant collagen of mammal body which forms large, eosinophilic fibers known as collagen fibers, which maintain the mechanical properties during tissue repairing.

To better promote the repairing of angiogenesis, abdominal, muscle regeneration and avoid complications after inguinal hernia repair surgery, we prepared PLGA-Collagen I patch, then load autologous bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of abdominal wall defects. After that the level of interleukin-6 and interleukin-10, as well as the number of macrophages, collagen fibers formation and neovascularization were detected. It turned out that loading autologous marrow mesenchymal stem cells into PLGA-Collagen I mesh is a promising approach for inguinal hernia repair.

Keywords: Inguinal hernia; Hernia mesh; Mesenchymal Stem Cells; Tissue engineering

符号说明

英文缩写	英文名称	中文名称
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)	聚乳酸-羟基乙酸共聚物
BMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
PS	penicillin-streptomycin	青霉素/链霉素
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium	达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基
ORC	Oxidized Regenerated Cellulose	氧化再生纤维素
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DAB	diaminobenzidine	二氨基联苯胺
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
EDTA	enthylenediamine tetracetid acid	二胺四乙酸
PP	polypropylene	聚丙烯
ePTFE	expande polyteraflouroethylene	膨化聚四氟乙烯
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
PGA	polyglycolic acid	聚羟基乙酸
AEM	acellular Extracellular Matrix Mesh	脱细胞外基质补片
HFIP	hexafluoroisopropanol	六氟异丙醇
TEP	totally extraperitoneal	完全腹膜 外修补术
IPOM	intraperitoneal onlay mesh	腹腔肌鞘前补片
TAPP	transabdominal preperitoneal	经腹腹膜前修补术
H&E	hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay	酶联免疫吸附测定

符号说明

SEM

scanning electronic microscopy

扫描电子显微镜

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
符号说明	III
第一章 前言	1
1. 疝的分类及其病因和治疗	1
2. 疝气补片材料种类	4
3. 目前疝气材料缺陷	9
4. 生物补片研发现状	9
5. 组织工程补片研发	10
第二章 种子细胞的提取与鉴定	12
1. 材料	12
2. 方法	14
3. 结果	16
第三章 组织工程疝气补片制备与检测	19
1. 材料	19
2. 方法	19
3. 结果	21
第四章 材料细胞毒性和细胞材料相容性	23
1. 材料	23
2. 方法	23
3. 结果	25
第五章 负载有自体 MSCs 细胞的 PLGA-Collagen I 补片修补腹壁缺损 的实验研究	28
1. 材料	28
2. 方法	30

3. 结果.....	34
第六章 结论.....	44
第七章 讨论.....	45
参考文献.....	50
致 谢.....	55

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Symbol description	III
Chapter 1 Introduction	1
1. The type of hernia , pathogenesis and treatment	1
2 The type of mesh about inguinal hernia	4
3. The defects of current mesh	9
4. The research and development of biological mesh	9
5. Research and development of engineering mesh	10
Chapter 2 Extraction and identification of seed cells	12
1. Materials	12
2. Methods.....	14
3. Results	16
Chapter 3 Preparation and detection of tissue engineering hernia patch	19
1. Materials	19
2. Methods.....	19
3. Results	21
Chapter 4 Cytotoxicity and cellular material compatibility	23
1. Materials	23
2. Methods.....	23
3. Results	25
Chapter 5 Experimental study of autologous BMSCs loaded with PLGA-Collagen I patch repair abdominal wall defects	28
1. Materials	28
2. Methods.....	30
3. Results	34
Chapter 6 Conclusion	44
Chapter 7 Discussion	45

References50
Acknowledgements.....55

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1. 疝的分类及其病因和治疗

1.1 疝的分类

腹横筋膜是一薄层结缔组织,位于腹横肌内表面和腹膜外脂肪层之间。它是腹膜和腹壁之间总筋膜的一部分,并与髂筋膜和盆筋膜相连续。在男性有精索,在女性有子宫圆韧带在腹股沟内环处穿过腹横筋膜,当腹横筋膜受损,腹腔内某个器官或组织离开其正常解剖位置,通过腹壁薄弱点、缺损或孔隙进入另一部位而形成疝。常见的疝有脐疝,腹股沟直疝、斜疝,切口疝、手术复发疝、白线疝、股疝等。腹壁疝多由于咳嗽、喷嚏、用力过度、腹部肥胖、用力排便、妊娠、小儿过度啼哭、老年腹壁强度退行性变等原因引起腹内压增高,迫使腹腔内的游离脏器,如:小肠、盲肠、大网膜、膀胱、卵巢、输卵管等脏器通过人体正常的或不正常的薄弱点或缺损、孔隙进入另一部位。

腹股沟疝是通过腹壁缺损的腹内容物到达腹管的突出物,腹股沟直疝突出物通过腹股沟深环,然而斜疝突出内容物通过腹股沟内环并且再腹股沟管内会降低。直疝主要发病在成人中,并且相对于斜疝更容易复发^[1]。通常大多数疝气不会有很大的危险性,且可以选择外科手术来修复缺损部位,如果疝气严重到影响肠的血流供应,那么就有必要立即进行手术介入治疗。一般腹股沟疝的临床症状包括腹部疼痛和腹部包块,并且在咳嗽打喷嚏特别明显^[2]。

腹股沟疝是临床外科常见病之一,约占腹外疝的 85%-90%之多。随着年龄的增长,75 岁的男性发生几率大约是 50%^[3]。大约三分之二的腹股沟疝是直疝,三分之一的是斜疝^[3]。在儿童中,其发病率在 0.8%—4.4%,不但男孩的发病率是女孩的 10 倍而且婴儿出生 32 周前发病率也达到 13%,出生前体重少于 1 千克大婴儿发病率更是高达 30%。^[4]

如今国际上对腹股沟疝的定义体系是由疝病学者 Nyhus 于 1993 年创立的^[5]。这个体系采纳了几个临床因素来判断严重级别,包括:直直疝 / 斜疝;腹环面积大小

程度；腹后壁缺损程度。根据这个划分了五个级别：（1）正常内环的斜疝；（2）内环扩大的斜疝；（3）腹股沟直疝；（4）腹股沟斜疝引起的腹后壁缺损；（5）复发性腹股沟疝。^[6]等级越高代表复发率越高。然而 Stoppa^[7]则建议将肥胖和腹胀作为参考因素加入到 Nyhus 体系分类中。

1.2 发病机理

目前越来越多的临床研究和实验表明腹壁疝的形成和发展并不是来自于腹壁磨损^[8, 9]，也不是先天性腹壁突出，而是由组织胶原代谢紊乱以及系统性结缔组织损坏造成的一类组织病变，该病与遗传和后天性因素均有相关性。并且越来越多的研究证据支持这一观点，因此疝病的发生并不是孤立形成的，而是多种因素混合在一起的一种全身系统性疾病，全球范围内的疝病学者也认可这一观点^[8-10]，这些证据包括：

（1）鞘状突未闭合：腹股沟疝最主要的先天性因素是腹膜鞘状突未闭，也就是说存在一个潜在的鞘状突。流行病学研究表明约有 20%的男性在成年后仍存在潜在的鞘状突，但其中只有不到 50%的人 would 形成疝。另外，绝大多数男性腹股沟疝病人的首次发病年龄在五六十岁以后。以上这些现象不能完全用鞘状突未闭来解释。

（2）弹性蛋白的破坏增加：有研究证明，结缔组织中弹性蛋白的破坏增加是引起腹主动脉瘤的重要原因。这些病人如接受开腹手术，其中腹壁切口疝和腹股沟疝的发病率明显增高。股沟疝病人，尤其是直疝病人的血液检查显示大多有较高的弹性蛋白降解物，同时 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶水平低下^[11, 12]。

（3）吸烟：吸烟可诱导蛋白水解酶和抗蛋白水解酶系统的不平衡，从而改变结缔组织的结构。在一项吸烟与非吸烟者的比较研究中发现，在吸烟者的手术伤口中胶原蛋白的聚集较非吸烟者明显减少。研究还显示吸烟者中胶原的生物合成受损是由于尼古丁和一氧化碳导致组织缺氧所致。另外，吸烟者的疝 2 年后复发率较非吸烟者高出至少 2 倍。

（4）年龄因素：腹股沟疝的发生率随年龄的增长而明显上升。最近的研究发现老年病人的胶原降解酶类的活性增加，导致胶原蛋白和胶原纤维在腹横筋膜中的含

量逐步减少。腹股沟疝病人的腹横筋膜和腹直肌前鞘与对照组（非疝发生组）相比较为薄弱，平均胶原含量明显减少。

(5) I型胶原和III型胶原比例异常：在伤口的愈合过程中，I型胶原和III型胶原是最主要的两种胶原纤维，通常在胶原代谢异常和结缔组织疾病的病人中I型和III型胶原的比例会发生异常，I型胶原减少，这样III型胶原相对于I型胶原的增多会导致非聚合的可溶性胶原增加^[10-12]。研究发现在I型和III型胶原比例失调的群体中疝发生的可能性更大，手术治疗后更容易复发。

(6) 遗传因素：遗传的因素越来越多地被认为是疝发病的一个机制，尤其是在双侧直疝的病人中证据更加明显^[9, 10]。

1.3 腹股沟斜疝治疗方法

随着疝病学者以及临床医生对疝病的认识不断加深，除了考虑疝病发生病理学、病理生理学等理论研究外，要充分考虑到手术是最为有效的治疗方式，同时要综合考虑手术者的因素、病人自身因素以及材料的选择^[13]。

疝修补术是一种十分常见的普通外科手术，许多医生认为疝修补术是一个简单的小手术，可以让一些初级住院医生和急切学习手术实践技能的新手操作。只有很少一部分致力于此的顶级专家才将这种手术推向了前所未有的高度，例如意大利著名的 Edoardo Bassini^[12, 14] 就是其中之一。在 Bassini 原创的疝修补手术技巧应用之前，Czerny^[15]建立的腹股沟疝治疗方法用来修复腹壁上最常见的缺损。

疝修补术在腹股沟疝患者中现在已经相当的普遍，旨在于减低患者痛苦，减少并发症，修复缺损部位以及薄弱点。腹股沟疝修补术在英国是最普遍最需要经验的医生操作的手术^[16]，其也算欧洲和美国最常见的手术^[17-19]。并且医生的经验技术和手术的熟悉程度是选择何种手术方式的关键。

目前针对腹股沟疝有很多的治疗方法和途径。这些主要分为3个类别：（1）开放式手术缝合（例如：腹股沟斜疝修复术和腹横筋膜修复术）；（2）开放式补片修复（例如：Liechtenstein 修复术和腹膜前修复术）；（3）腹腔镜补片修复（完全腹膜外修补术(TEP)和经腹腹膜前修补术(TAPP)）；直到1980s，开放式手术缝合还是标准的手术方式，但是伴随缝合线处的压力产生相对较高的复发率和病人的疼痛

感。非缝合式的“无张力”外科手术补片得到了极大的应用。有学者估计，93%的腹股沟疝气修补术都使用了补片，并且这其中四分之三的修补术中要么涉及了Lichtenstein 修补术或者网孔塞子。^[20]在Lichtenstein 修补术中，医生在疝缺损部位缝合网状补片。在网孔塞子修补术中，医生引入一个预形的塞子或者平面状的补片于疝缺损顶部。^[21]

2. 疝气补片材料种类

目前补片在全球用量每年高达数百万张，而且数量还在不断增加。当今常用的腹壁缺损及腹壁疝修补的补片材料按功能性质划分为四大类约七种包括：第一类包含不可吸收的聚丙烯（polypropylene, PP）材料补片、聚酯（polyester）材料补片、聚酰胺（polyamide）材料补片、以及膨化聚四氟乙烯（expande polyteraflouroethylene, ePTEE）材料补片；第二类包含可吸收的聚羟基乙酸（polyglycolic acid, PGA）材料补片、聚乳酸（polylactic acid, PLA）材料补片、聚乳酸羟基乙酸（poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA）材料补片；第三类即为复合材料补片；第四类为可吸收的脱细胞外基质（Acellular Extracellular Matrix , AEM）补片。

（1）聚丙烯材料补片（polypropylene Mesh,PP）

聚丙烯材料补片（polypropylene Mesh）是由编织的聚丙烯纤维组成，其结构呈现为单层网状形式，目前是临床上最常见的修补腹壁缺损材料。当前国内医药市场上出售的聚丙烯材料补片主要有三种：①Marlex 补片（巴德公司，美国），是单丝股网状结构网片；②Prolene 补片（爱惜康公司，美国），是双丝股结构网片；③Surgipro 补片（外科公司，美国），是多丝股结构网片。其发展速度很快，并且应用也相当广泛，在这应用的 60 年间，聚丙烯材料网片对外科领域产生深远的影响。聚丙烯材料具有稳定、牢固、惰性、手感好等优点，这类补片由聚丙烯纤维交织成网。然而不同厂家生产不同种类的补片之间的差异性很大，在补片大小规格、形状、密度编织情况、孔径规格等方面也有所不同。有研究表明，大孔径、低密度的补片由于炎症反应小，收缩小，疤痕小^[22]，因而术后恢复较好^[23]。与其他组织工程材料相比较，聚丙烯材料补片还具有如下优点^[24]：能够显著刺激纤维组织增生；纤维组织能够从网孔中生长而穿过补片材料，并且达到与组织相互嵌入，抗张力强度高。

当然聚丙烯补片的缺点也是不可忽视的，包括：表面粗糙，与腹腔器直接接触会引起较为严重的腹腔粘连，甚至可能侵蚀肠壁，导致肠痿的发生；由于手术后期补片形成的疤痕明显收缩，会造成补片扭曲以及产生感染和形成皮肤窦道^[25]。

聚丙烯材料补片分为非编织和编织两类，如果按编织纤维的粗细程度和网孔直径的不同，也可以分为标准型补片和轻质型补片。聚丙烯材料补片与组织之间的穿插式嵌入修复促进愈合，这有点类似选择性生物膜一样，聚丙烯网允许微生物、白细胞、蛋白质以及吞噬细胞自由穿插通过，聚丙烯材料补片对感染的耐受能力很强，因此感染程度较轻的伤口使用聚丙烯材料补片是可行的，如果出现感染也无需担心，只需要保持通畅引流，大多情况下都能够愈合，如果完全愈合不了，会形成慢性窦道，过一段时间切除窦道以及部分材料补片。但是聚丙烯材料补片几乎无抗感染能力。聚丙烯材料补片和自身组织的完全牢固愈合大约需要 90 天左右，且时间与个体差异有关，其与自身组织之间如果愈合完全想完整的取出聚丙烯材料也是不可能的，当然也没有必要。因此，有学者认为在嵌顿疝的一期修补中可以使用聚丙烯材料补片。还有学者指出在存在大网膜的环境下也能植入患者腹腔内而不会引起肠痿等相关并发症。

(2) 聚酯材料补片 (Polyester Mesh, PE)

聚酯补片 (Polyester Mesh) 由乙二醇 (ethylene glycol) 和对苯二酸 (terephthalic acid) 聚合而成的聚酯聚合体，目前市场上有两种商品化的补片：①Dacron 网片，单丝股结构网片；②Mersilene 网片，多丝股结构网片。应用于上个世纪 60 年代，目前临床上使用量非常广泛，仅低于聚丙烯补片。此类补片亲水性优良，组织疤痕收缩较重型 (heavy weight) 聚丙烯补片小^[26]，相较于聚丙烯材料网片，聚酯材料网片具有良好的顺应性、柔韧性，但是抗张力能力较前者低 2/3。通过美国塔夫茨大学的关于腹部切口疝患者使用聚酯材料网片修补中长期并发症分析研究结果表明，聚酯材料网片修补手术的复发率较高为 34%，并且感染率达到 12%，以及肠梗阻约 12%，最严重的是发生肠痿的几率达到 16%，他们因此得出的结论是聚酯材料网片不适合于疝修补。然而法国的医生学者则不认同这个观点结论，因此目前主要在法国该材料得到广泛应用。因为涤纶丝是纤维状结构，其感染能力弱于单丝结构的聚丙烯网，

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.