DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20250113

·论　　著·

不同组织来源生物补片重建阴道的效果评价

张琳[1]，田彦鹏[2]，肖艳来[1,3]，李仲康[1]，刘义彬[1]，张明乐[1]，
张敬坤[1]，孟丽[1]，戴建武[4]，黄向华[1]*

（1.河北医科大学第二医院，河北 石家庄 050000；
2.郑州大学第一附属医院，河南 郑州 450052；
3.河北医科大学第三医院，河北 石家庄 050000；
4.中国科学院遗传与发育生物学研究所，北京 100101）

【摘要】目的 探讨不同组织来源生物补片重建阴道的效果。**方法** 以巴马小型猪为动物模型，手术切除阴道，构建阴道缺失的大动物模型，并以猪小肠黏膜的脱细胞基质（SIS）和猪膀胱的脱细胞基质（ABM）重建小型猪阴道组织。于术后3个月手术切除重建后的阴道组织，通过组织病理学染色和组织浴槽验证重建阴道组织结构和功能。**结果** 重建术后3个月，SIS和ABM可在解剖学上重建阴道。通过组织学和功能学比较，SIS和ABM组织结构与正常阴道一致，并可表达阴道的组织特异性分子标记物CK14、α-actin、HSP47、ER、CD31。但SIS重建组的阴道上皮细胞层数较ABM重建组少，表明ABM重建效果可能优于SIS。同时，PAS染色及组织浴槽实验也证实，重建的阴道上皮细胞可合成糖原，且相应药物可引起舒缩反应。这些结果表明，SIS和ABM能够在大体、组织结构和功能上重建阴道。**结论** 巴马小型猪可作为阴道重建再生的大动物模型。SIS和ABM能够达到解剖学、组织学和功能学重建，但ABM的重建效果可能优于SIS。

【关键词】MRKH综合征；生物补片；巴马小型猪；阴道重建；组织工程

中图分类号：R713.3+1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2025）01-0087-06

Evaluation of vaginal reconstruction using biological patches from different tissue sources

Zhang lin[1], Tian Yanpeng[2], Xiao Yanlai[1,3], Li Zhongkang[1], Liu Yibin[1],
Zhang Mingle[1], Zhang Jingkun[1], Meng Li[1], Dai Jianwu[4], Huang Xianghua[1]*

(1. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China;
2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China;
3. The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China;
4. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】Objective To evaluate the effectiveness of biological patches derived from different tissue sources for vaginal reconstruction. **Methods** Large animal models of vaginal agenesis were established using Bama miniature pigs through surgical removal of vaginal tissue. Small intestinal submucosa (SIS) and acellular

收稿日期：2024-10-31；**修回日期：**2025-03-08

基金项目：国家自然科学基金面上项目（8167060210）；河北中央引导地方科技发展资金项目（236Z7756G）；河南省医学科技攻关计划联合共建项目（LHGJ20220359）

通信作者：黄向华（1963-），女，河北泊头人，主任医师，教授，博士研究生导师，主要从事生殖道畸形、阴道重建方面的研究，E-mail: huangxh2003@163.com

bladder matrix (ABM) were used for vaginal reconstruction. Three months postoperatively, the reconstructed vaginal tissues were surgically removed and evaluated for tissue structure and function using histopathological staining and organ bath assays. **Results** Three months after reconstruction, both SIS and ABM achieved anatomical reconstruction of the vagina. Histological and functional analyses revealed that the tissue structures of SIS- and ABM-reconstructed vaginas resembled normal vaginal tissue and expressed vaginal-specific molecular markers, including CK14, α-actin, HSP47, ER, and CD31. However, the SIS-reconstructed group exhibited a thinner vaginal epithelial layer compared to the ABM-reconstructed group, indicating that ABM may provide better reconstruction outcomes. Additionally, PAS staining and organ bath assays confirmed that the reconstructed vaginal epithelial cells were capable of synthesizing glycogen and exhibited contractile and relaxant responses to corresponding drugs. These results indicated that both SIS and ABM could achieve vaginal reconstruction in terms of gross anatomy, tissue structure, and function. **Conclusion** Bama miniature pigs can serve as suitable large animal models for vaginal tissue regeneration and reconstruction. Both SIS and ABM can achieve anatomical, histological, and functional vaginal reconstruction, with ABM potentially offering better outcomes than SIS.

【**Keywords**】MRKH syndrome; Biological patches; Bama miniature pigs; Vaginal reconstruction; Tissue engineering

阴道是女性重要的生殖器官，是经血流出、性交及胎儿娩出的通道。多种原因可引起阴道缺失，如生殖系统先天性发育异常，肿瘤术后或严重外伤。患者承受着巨大的心理和生理痛苦，有迫切阴道重建需求。美国妇产科医师协会提出顶压法应作为阴道缺失患者的首选治疗方案[1]。因顶压法治疗周期长、治疗过程痛苦，大多数患者选择手术治疗。目前，临床常用的阴道重建手术方式主要包括腹膜代阴道成形术、肠道代阴道成形术。这两种术式均取自体正常组织进行原位重建，有供体部位缺损、术后并发症较高等缺点[2]。因此，临床亟需可替代自体组织的生物材料。随着组织工程技术和材料学的发展，利用生物材料重建组织器官已成为可能。2011年，Dorin等[3]利用高分子可降解合成材料聚羟基乙酸支架重建了雌兔的阴道组织。脱细胞基质由于其良好的可降解性和组织相容性也广泛应用于组织重建研究。截至目前，不同种属和不同组织来源的脱细胞基质已经成功重建了阴道组织[4-6]。然而，关于最优的脱细胞基质选择尚无统一结论。本研究旨在探讨猪小肠黏膜脱细胞基质（Porcine Small Intestinal Submucosa，SIS）和猪膀胱脱细胞基质（Porcine Acellular Bladder Matrix，ABM）重建阴道的效果。通过构建巴马小型猪阴道缺失大动物模型，并以SIS和ABM进行原位重建，评价两种生物材料的阴道重建效果。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 实验动物

本研究使用4~6月龄未生育且性成熟的雌性巴马小型实验猪，共10只，体重均为25~30 kg。将实验动物随机分为两组，分别为SIS组和ABM组，每组各5只。巴马小型猪均购自泰和生物科技有限公司[SCXK(SU)2017-0010]，饲养于河北医科大学实验动物中心。

1.1.2 SIS和ABM来源

本研究使用的SIS是购自大清生物技术股份有限公司（北京）的猪小肠黏膜脱细胞基质，ABM是一种来源于猪膀胱脱细胞基质，由中国科学院遗传发育研究所提供。

1.1.3 主要试剂

CK14抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司，α-actin抗体购自美国Santa Cruz公司，HSP47购自美国Affbiotech公司，雌激素受体（Estrogen Receptor，ER）、CD31抗体购自北京博奥森生物技术有限公司，HE染色液、Masson染色液、VG染色液、PAS染色液，及常用试剂均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 巴马小型猪阴道缺失模型的构建

所有实验猪术前禁食禁水12 h，麻醉后观察基础生命体征平稳后开始手术。取下腹部正中切口，依次切开皮肤、筋膜、肌层，进入腹腔。找到膀胱，以此为标志性位置找到子宫，猪的子宫为双角子宫，游离两侧子宫角，找到宫颈并向下分离，打开膀胱腹膜反折，继续向下游离阴道组织，分离至阴道与阴道前庭交界处时，可触及缩窄环，将缩窄环以上部分全部切除，包括子宫及全部阴道。

1.2.2 SIS和ABM原位重建巴马小型猪阴道组织

取SIS和ABM，修剪成约8 cm×10 cm的补片，将两种补片分别包裹于预先消毒灭菌的模具，间断缝合。将补片和模具的复合物原位移植，上段固定

于腹后壁，下端与前庭阴道移形处缩窄环吻合；生理盐水冲洗腹腔，逐层关腹；手术完毕后臀部肌注160万单位青霉素钠，每日臀部肌注320万单位青霉素钠，连用7天。

1.2.3 取材

于术后3个月取重建阴道组织，将阴道均分为上、下两段，各取部分组织，放入4%多聚甲醛溶液中固定。

1.2.4 大体形态和组织学评价

将固定好的组织石蜡包埋，并制成厚度为4 μm的玻片，进行HE、Masson、VG染色评价组织结构，同时进行CK14、α-actin、HSP47、ER、CD31免疫组织化学染色评价分子标记物的表达。

1.2.5 功能学评价

按照PAS染色实验步骤染色，评价阴道上皮合成糖原的能力。通过组织浴槽实验，评价阴道收缩能力。

2 结果

2.1 大体组织观察

SIS和ABM原位移植术后3个月获取新生阴道组织。术后3个月，SIS和ABM均成功重建了巴马小型猪的阴道组织，呈肌性管状结构，长度可达4~6 cm（见表1、图1）。管腔表面可见粉红色的黏膜层覆盖，湿润光滑，未见明显挛缩、狭窄，黏膜面可见横嵴和纵行皱襞，外观与正常阴道结构一致（见图1）。

表1 SIS和ABM重建阴道的长度

Table 1 Length of reconstructed vaginas using SIS and ABM

	再生阴道的长度（cm）				
动物编号	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
SIS组	6.0	5.5	6.0	4.5	5.0
ABM组	5.5	6.0	5.0	5.0	4.0

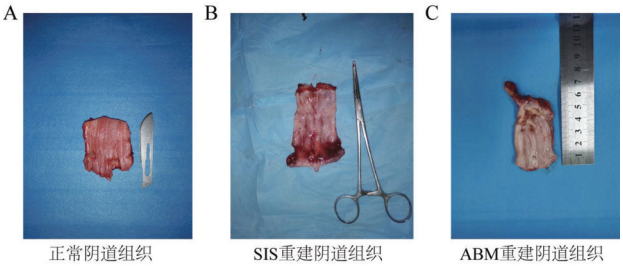


图1 正常阴道、SIS重建阴道组织、ABM重建阴道组织观察

Figure 1 Observation of normal vaginal tissue, SIS-reconstructed vaginal tissue, and ABM-reconstructed vaginal tissue

2.2 重建阴道的组织学评价

2.2.1 HE染色

重建术后3个月，SIS组和ABM组阴道组织均可见复层鳞状上皮，复层鳞状上皮下为疏松的结缔组织，可见规则排列的胶原纤维，其间有大量动静脉穿行，为黏膜下层。再向外为内环外纵的平滑肌层，肌纤维间即可见动静脉穿行其间，结构与正常阴道组织一致（见图2A）。与SIS组相比，ABM组的鳞状上皮细胞的层数更多，表明ABM具有更好地促进上皮组织再生的能力。

2.2.2 Masson染色及VG染色

Masson染色可见富含弹性纤维的上皮细胞呈红色，形成复层鳞状上皮；蓝染的胶原纤维相互交织形成疏松结缔组织。结缔组织间可见大量动静脉分布，血管壁内层为蓝染的内皮细胞，外层为红染的肌层。黏膜下层为红染的平滑肌组织层，可见内环外纵的平滑肌束和血管穿行其间（见图2B）。除Masson染色外，本研究同时进行了VG染色，其结果与Masson染色基本一致。胶原纤维被酸性复红染成橘红色，肌纤维被苦味酸染成黄色（见图2C）。上述结果表明，SIS组和ABM组阴道组织中均有大量胶原纤维和弹性纤维，且二者分布与正常阴道组织一致（见图2）。

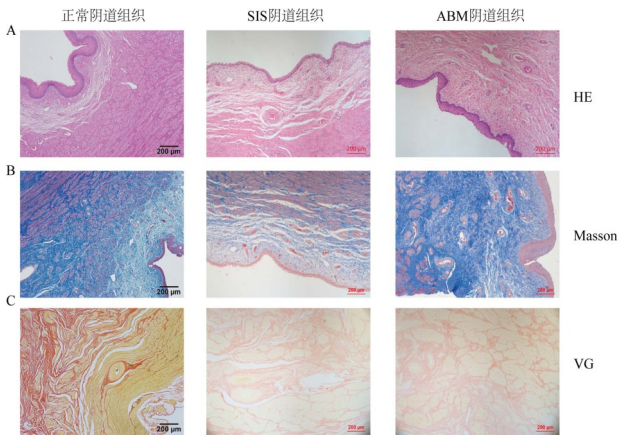


图2 正常阴道、SIS重建阴道组织、ABM重建阴道组织的组织学染色

Figure 2 Histological staining of normal vaginal tissue, SIS-reconstructed vaginal tissue, and ABM-reconstructed vaginal tissue

2.2.3 免疫组织化学染色

为了验证SIS和ABM重建的阴道组织能否表达正常阴道组织细胞特异性分子标记物，本研究对两组重建的阴道组织分别进行了免疫组织化学染色。阴道黏膜为复层鳞状上皮细胞，可表达上皮细胞标志物CK14，染色结果表明，SIS组和ABM组

阴道组织均可表达上皮细胞标志物CK14。与HE染色结果相似，ABM组鳞状上皮细胞的层数比SIS组更多。同时，血管内皮细胞也可观察到CK14表达。α-actin免疫组织化学染色结果表明，SIS组和ABM组阴道组织平滑肌细胞均表达平滑肌细胞的分子标记物α-actin。阴道黏膜下层散在分布大量成纤维细胞，HSP47免疫组织化学染色结果发现，SIS组和ABM组阴道组织黏膜下层中可见大量表达HSP47的成纤维细胞。血管内皮标志蛋白CD31染色结果表明，SIS组和ABM组阴道组织中的血管内皮细胞均可表达CD31。阴道上皮细胞可表达ER从而受雌激素影响发生周期性变化，ER染色结果表明，SIS组和ABM组阴道组织上皮层均可表达ER（见图3）。

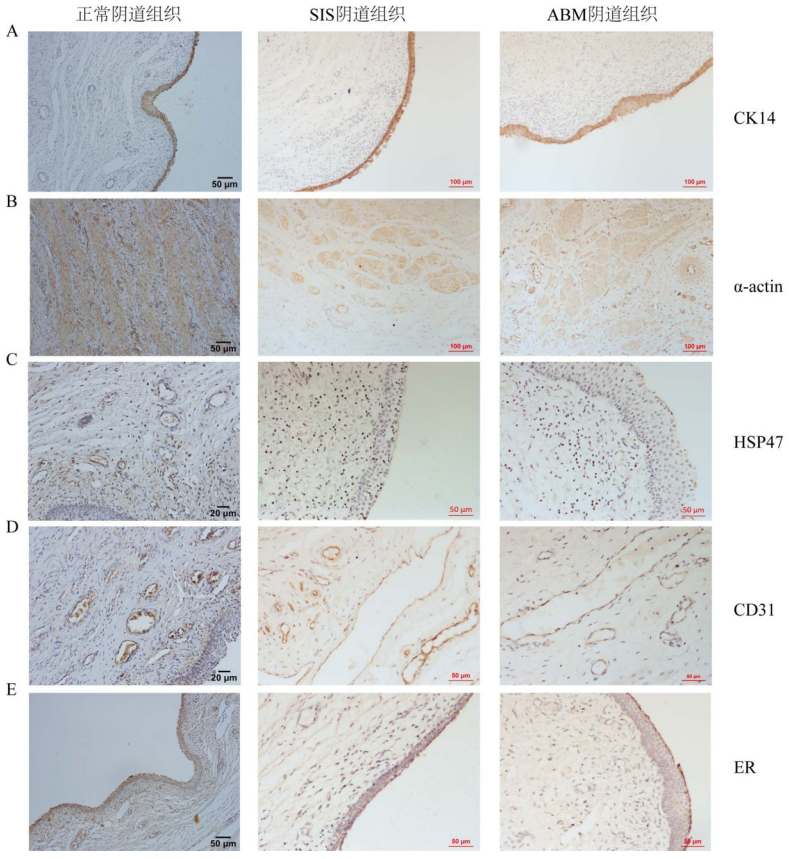


图3　正常阴道、SIS重建阴道组织、ABM重建阴道组织的免疫组织化学染色

Figure 3　Immunohistochemical staining of normal vaginal tissue, SIS-reconstructed vaginal tissue, and ABM-reconstructed vaginal tissue

2.3　重建阴道的功能学评价

2.3.1 PAS染色

阴道上皮细胞可受雌激素调节合成糖原，ER免疫组织化学染色已证实SIS组和ABM组阴道上皮可表达ER。本研究通过PAS染色证实新生阴道组织是否具备糖原合成功能。染色结果显示，SIS组和ABM组阴道上皮细胞均可见到阳性染色，呈紫红色，位于复层鳞状上皮的近腔面。结果表明，阴道黏膜近腔面上皮细胞具有合成糖原的功能（见图4A）。

2.3.2 组织浴槽实验

阴道是肌性管道，具有收缩功能。本研究通过组织浴槽实验验证SIS组和ABM组阴道是否具备收缩功能。结果表明，去氧肾上腺素和卡巴胆碱均可引起收缩反应，并且加入二者的拮抗剂酚妥拉明和阿托品后可引起相应的舒张反应。上述结果表明，SIS组和ABM组阴道有完整的舒缩功能（见图4B）。

3　讨论

阴道作为重要的生殖器官发挥着重要的生理功能。先天性发育缺陷患者对阴道的再生和重建有迫切要求。目前，临床应用最为广泛的是腹膜代阴道成形术和乙状结肠代阴道成形术，但这两种术式均破坏了自体正常组织的结构[2,7]。近年来，新兴的口腔黏膜代阴道成形术虽已成功构建了阴道组织，

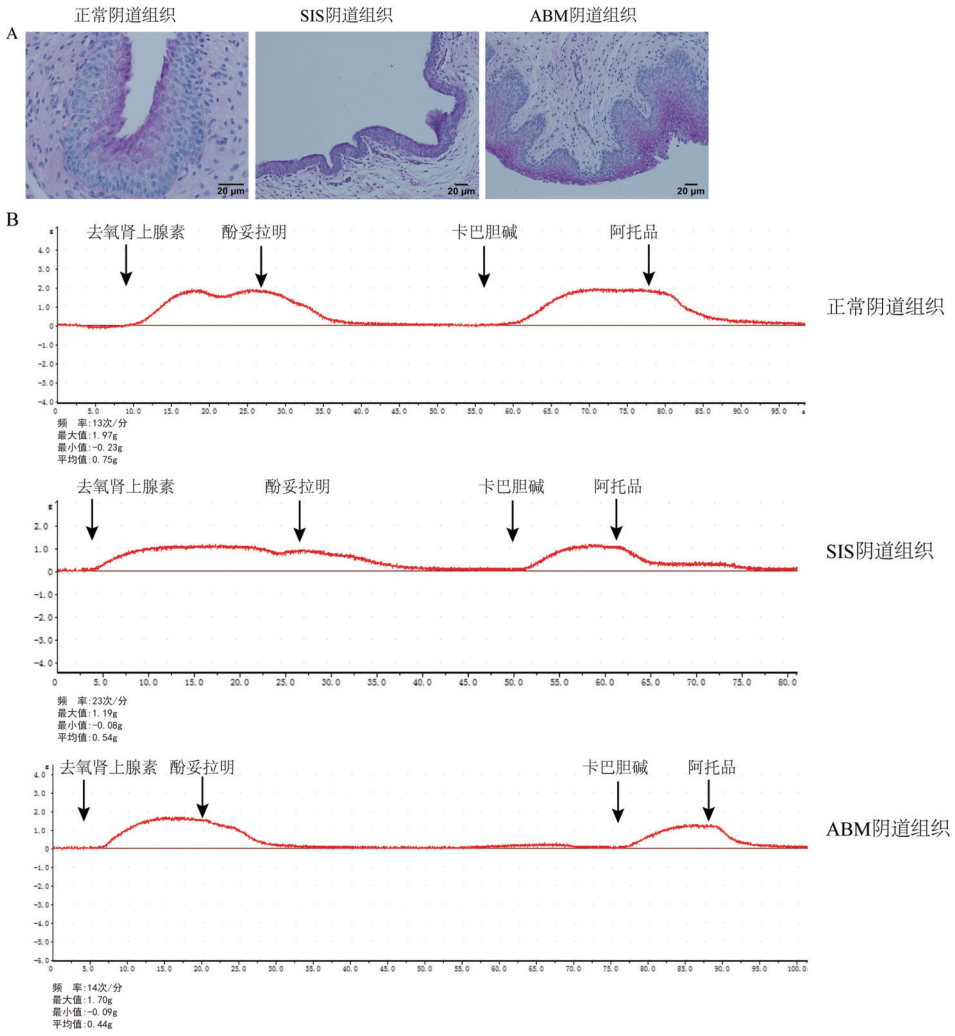


图4　正常阴道、SIS重建阴道组织、ABM重建阴道组织的功能学评价

Figure 4　Functional evaluation of normal vaginal tissue, SIS-reconstructed vaginal tissue, and ABM-reconstructed vaginal tissue

但其远期的临床效果尚待评估，且口腔黏膜的缺损会引起相应的术后并发症[8-9]。满意的阴道成形术应具备组织来源充分、手术创伤小、组织再生好的特点。随着组织工程技术的发展，多种高分子合成材料、同种或异种生物来源的生物材料均应用于阴道组织的重建[10-11]。Raya-Rivera等[12]应用SIS为4例苗勒管发育不全（Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser，MRKH）综合征患者重建了阴道组织。朱兰教授团队[4]应用同种异体脱细胞真皮基质为MRKH综合征患者重建了阴道组织。然而，尚无研究指出何种生物材料是最优选择。新型生物材料的开发和应用可能为阴道缺失患者提供更多选择[13-14]。本研究应用SIS和ABM重建阴道组织，并以正常阴道组织作为对照评价其阴道重建的效果。为了更好地评价阴道组织的重建效果，本研究选择巴马小型猪作为阴道缺失动物模型。小型猪具有遗传稳定、成熟早、便于手术操作护理等优点，其组织结构与人的阴道组织结构极为相似，且基础生命体征与人类接近。研究从大体结构、组织结构和功能学3方面评价阴道的重建效果。大体结构上，两组再生阴道在外观上与正常阴道组织基本一致，且均无挛缩、狭窄和闭锁。组织学上，通过HE染色、Masson染色、VG染色、免疫组织化学染色分别对组织学结构进行评价。功能学上，通过PAS染色、组织浴槽实验验证新生阴道的功能。这些结果表明，SIS及ABM可以促进阴道组织的良好再生。其中，ABM表现出了更好地促进上皮再生的效果，可能与膀胱和阴道共同起源于泌尿生殖窦有关，这一结果未来也需要更大量的动物实验验证。

如今，阴道重建手术不仅追求解剖学的完整性，还重视功能的恢复，特别是新生的阴道组织能否受激素调节和对刺激产生收缩反应，对患者重拾心理自信及女性身份认同感至关重要[15]。ER免疫组织化学染色证实SIS组和ABM组阴道组织均可

表达ER。PAS染色证实两组阴道组织上皮细胞均具备糖原合成能力。同时，组织浴槽实验显示，SIS组和ABM组阴道组织对去氧肾上腺素和卡巴胆碱均能产生收缩反应，添加相应的拮抗剂酚妥拉明和阿托品后可观察到相应的舒张反应。表明SIS和ABM不仅在形态上重建了阴道，还在功能上恢复了对雌激素的反应及收缩能力。

本团队在先前的研究[16]中制备了猪阴道来源的脱细胞基质，并将其应用于阴道组织的重建。临床上应用生物补片重建阴道的研究仍然较少，可选择的材料有限。本研究结果说明，ABM可作为候选补片应用于临床，其重建效果或优于SIS。但本研究仍存在缺点：动物数量少、缺少多个观察时间点以及组织相容性和免疫排斥方面的数据。未来的研究中，应继续扩大动物数量及观察时间点，并增加材料组织相容性的研究内容。结合团队既往研究结果，阴道来源脱细胞基质也应作为可选材料，增加相应组别评价重建效果。另外，3D打印技术的兴起使其在组织重建领域得到了巨大发展前景，未来，3D打印阴道组织或可成为更加理想的阴道重建方式[17]。

参考文献

[1] COMMITTEE ON ADOLESCENT HEALTH CARE. ACOG Committee Opinion No. 728: Mullerian Agenesis: Diagnosis, management, and treatment[J]. Obstet Gynecol, 2018, 131(1): e35-e42.

[2] HERLIN M K, PETERSEN M B, BRANNSTROM M. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: A comprehensive update[J]. Orphanet J Rare Dis, 2020, 15 (1): 214.

[3] DORIN R P, ATALA A, DEFILIPPO R E. Bioengineering a vaginal replacement using a small biopsy of autologous tissue[J]. Semin Reprod Med, 2011, 29(1): 38-44.

[4] ZHU L, ZHOU H, SUN Z, et al. Anatomic and sexual outcomes after vaginoplasty using tissue-engineered biomaterial graft in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: A new minimally invasive and effective surgery[J]. J Sex Med, 2013, 10(6): 1652-1658.

[5] LI Y, LIU F, ZHANG Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells could acquire the phenotypes of epithelial cells and accelerate vaginal reconstruction combined with small intestinal submucosa[J]. Cell Biol Int, 2015, 39(11): 1225-1233.

[6] MAO M, ZHANG Y, FU H, et al. Long-term results of sexual function and body image after vaginoplasty with acellular dermal matrix in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2024, 31(1): 37-42.

[7] YANG L, XU G, TAO K, et al. Laparoscopic sigmoid vaginoplasty for the treatment of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome in a single center: 20 years' experience [J]. Int Urogynecol J, 2024, 35(7): 1503-1510.

[8] SIMMAN R, JACKSON I T, ANDRUS L. Prefabricated buccal mucosa-lined flap in an animal model that could be used for vaginal reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(3): 1044-1049, 1050-1051.

[9] LIN W C, CHANG C Y, SHEN Y Y, et al. Use of autologous buccal mucosa for vaginoplasty: A study of eight cases[J]. Hum Reprod, 2003, 18(3): 604-607.

[10] ZHANG X, QIU J, DING J, et al. Comparison o f neovaginoplasty using acellular porcine small intestinal submucosa graft or Interceed in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome[J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 300(6): 1633-1636.

[11] JAKUBOWSKA W, CHABAUD S, SABA I, et al. Prevascularized tissue-engineered human vaginal mucosa: *In vitro* optimization and *in vivo* validation[J]. Tissue Eng Part A, 2020, 26(13-14): 811-822.

[12] RAYA-RIVERA A M, ESQUILIANO D, FIERRO-PASTRANA R, et al. Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: A pilot cohort study[J]. Lancet, 2014, 384(9940): 329-336.

[13] XIAO Y, TIAN Y, ZHANG J, et al. Small intestinal submucosa promotes angiogenesis via the Hippo pathway to improve vaginal repair[J]. Biomol Biomed, 2023, 23 (5): 838-847.

[14] XIAO Y, ZHANG J, TIAN Y, et al. Vaginal reconstruction with a double-sided biomembrane-a preclinical experimental study on large animals[J]. Biomater Sci, 2023, 11(21): 7077-7089.

[15] KOLLE A, TARAN F A, RALL K, et al. Neovagina creation methods and their potential impact on subsequent uterus transplantation: A review[J]. BJOG, 2019, 126(11): 1328-1335.

[16] TIAN Y, LIU Y, XIAO Y, et al. Alternative biological material for tissue engineering of the vagina: Porcine-derived acellular vaginal matrix[J]. Tissue Eng Regen Med, 2024, 21(2): 277-290.

[17] HOU C, ZHENG J, LI Z, et al. Printing 3D vagina tissue analogues with vagina decellularized extracellular matrix bioink[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 180: 177-186.