

真皮细胞外基质中氨基聚糖与蛋白多糖的组成及功能研究进展

赵筱卓 张国安

真皮 ECM 由胶原支架与氨基聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 及蛋白聚糖有机交联构成, GAG、蛋白聚糖填充在胶原纤维支架中, 发挥黏附、润滑、抗压、维持内环境稳定、干预代谢、影响细胞行为等作用, 对维持真皮的功能产生重要影响。同时 GAG、蛋白聚糖与胶原纤维相互作用, 影响彼此的功能及代谢。功能完备的组织工程真皮应同时具备胶原支架成分及填充于其中的无定形基质成分, 以模拟人类真皮的构造及组成, 实现结构及功能的仿生化^[1]。本文就真皮 ECM 中 GAG 与蛋白聚糖的组成、功能、代谢特点、相互作用作一综述。

1 真皮 ECM 概况

1.1 ECM

生物体并非由细胞简单堆积而成, 在细胞外间隙中充满由多种不溶性大分子精密组装起来的错综复杂的网架——ECM, 发挥重要生物学作用^[2]。ECM 分为有形纤维成分及无定形基质^[3]。各种成分的组成、含量及组装形式具有组织器官特异性, 并与组织器官的发育阶段及功能状态相适应。

1.2 真皮 ECM

成人皮肤真皮厚度是表皮的 14~40 倍, 一般为 1~3 mm。真皮 ECM 中有形成分为各型胶原纤维, 占 ECM 总量的 95%^[4], 赋予真皮良好的物理性能; 同时血管可穿行于真皮胶原支架的孔隙中, 为表皮提供营养^[5]。真皮中的无定形基质成分主要由 GAG 及蛋白聚糖组成, 填充于胶原支架中^[6]。

2 真皮 ECM 中胶原纤维的代谢

胶原纤维由直径约 69 nm 的胶原微纤维定向排列聚合而成, 不能被一般蛋白酶水解。胶原酶在胶原的降解过程中使原胶原分子断裂为 2 部分, 断裂后的胶原分子可自动变性, 丧失螺旋构型, 易被组织中其他蛋白酶进一步分解。调控胶原酶的表达在调

控胶原基质代谢中具有重要意义。皮肤创伤后, 凝血系统、肾素血管紧张素系统及补体系统相继激活, 导致大量血管活性介质和细胞因子释放入基质, 刺激炎症细胞迁移及释放促炎症因子, IL-1、TNF- α 、TGF- α 、EGF、成纤维细胞生长因子和血小板源性生长因子等促进胶原酶表达; TGF- β 和 IL-4 抑制胶原酶表达, 从而调控胶原基质的代谢^[7-8]。

3 真皮 ECM 中的 GAG 与蛋白聚糖

GAG 是由重复的二糖单位构成的无分支直链多糖, 其二糖单位的组成之一是氨基己糖, 故得名氨基聚糖或糖胺聚糖。人类真皮中的 GAG 主要为: 透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS)、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)、肝素、硫酸乙酰肝素以及硫酸角质素。蛋白聚糖是 GAG 与核心蛋白质的共价结合物。人类皮肤真皮 ECM 中的蛋白多糖主要为核心蛋白聚糖。

3.1 HA

HA 首先由 Meyer 和 Palmer 于 1934 年从牛眼玻璃体中分离出来, 它是以葡萄糖醛酸-N-乙酰氨基葡萄糖为双糖单位组成的直链高分子多糖, 平均相对分子质量为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$, 广泛存在于机体的多种组织中, 在结缔组织 ECM 中起重要作用。HA 是惟一不含硫酸基的 GAG, 不以蛋白聚糖的形式存在, 但可与某些蛋白聚糖非共价结合形成相对分子质量更大的集集体^[9]。

3.1.1 HA 的合成及代谢 HA 是在透明质酸合成酶 (hyaluronan synthase, HAS) 催化下, 在 Fb 细胞膜的內面合成的, 合成的多糖链伸出细胞外。与其他葡胺聚糖不同的是, HA 不需硫酸化及差向异构化, 即可发挥多种生化功能^[10]。HAS 是 HA 合成的重要启动因素, 其活性受多种因素影响, 如多种激素、生长因子、炎症因子等。细胞增殖时, HAS 活性增强, HA 合成增多^[11]。有报道指出, 糖皮质激素可下调 HA 的合成^[12]。

HA 的代谢包括 4 种方式: (1) 细胞内降解。HA 在合成的局部代谢, 通过与细胞受体 CD44 及

HA 介导运动的受体 (RHAMM) 结合, 进入细胞内, 被溶酶体透明质酸酶 (HAase) 降解, 产生 2 种单糖, 最终氧化分解^[12]。(2) 细胞外降解。HA 根据双糖数量不同可分为高相对分子质量 HA 与低相对分子质量 HA。3 种 HAS 均合成高相对分子质量 HA, 由此推测低相对分子质量 HA 是在细胞外由高相对分子质量 HA 与一系列 HAase 作用裂解而来。高相对分子质量 HA 在酶作用下逐级降解, 一次反应的产物可作为下一次反应的底物, 因此推论, 可以通过 HAase 的作用产生特殊大小的 HA 片段, 以发挥不同的功能。(3) 循环代谢。组织中的 HA 进入血管及淋巴, 通过肝脏代谢。(4) 氧自由基裂解。在细胞外, HA 可以被组织中氧自由基裂解^[10]。

采用标记合成 HA 前体物质的实验表明, 内源性 HA 在大鼠皮肤内的半衰期为 2.6 ~ 4.5 d, 在兔皮肤内的半衰期为 1.9 ~ 3.7 d。其每日清除量相当于代谢总量的 15% ~ 35%, 局部 HA 被完全替代需 3.0 ~ 6.5 d^[12]。

3.1.2 HA 的含量及定位 人体含有约 15 g HA, 其代谢量约为 5 g/d。HA 在皮肤组织中的含量占其在人体内总量的一半以上, 约 0.5 ~ 1.0 mg/g 湿组织, 在细胞间液中的浓度为 1 ~ 2 mg/mL^[12]。

Meyer 和 Stern^[11] 通过组织学定位观察到, 在胎儿时期, HA 只分布在真皮层。随着孕周增加, HA 逐渐出现在表皮层。出生后 3 个月起, HA 的分布呈现一种不变的模式, 较高相对分子质量的 HA 出现在表皮底层和真皮乳头层上部, 从两侧环绕基底膜。棘细胞层的最上部有中等浓度的 HA, 可能与刺激 HA 释放的物质位于基底层附近有关。

3.1.3 HA 的功能 不同相对分子质量的 HA 在 ECM 中起着不同甚至相反的作用。高相对分子质量 HA 的主要功能表现为构成基质、抗血管生成、抑制细胞分化和免疫抑制等。低相对分子质量的聚糖片段则具有炎性作用、免疫刺激以及促进血管形成等作用。

3.1.3.1 高相对分子质量 HA ($4 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$) 的功能 高相对分子质量 HA 是 ECM 中最大的分子之一, 具有高度亲水性, 最多可结合自身质量 1000 倍的水, 使无定形基质形成多孔亲水凝胶结构, 占据细胞外大部分空间, 形成分子筛, 对内环境的稳定起缓冲作用^[6]。同时还使真皮组织具备抗压性、黏弹性、润滑性等特性。

高相对分子质量 HA 具有构成基质功能。HA 是构成皮肤 ECM 的主要成分, 其中高相对分子质量

HA 对构成 ECM、维持 ECM 功能起主要作用。HA 分子中含有的大量羧基和羟基, 可与水形成氢键而具有很强的保水能力, 可固定及阻止真皮中水的流动, 占据有形基质及细胞成分外的大量空间, 使真皮基质含有大量水分, 赋予真皮抗压性及黏弹性。HA 的亲水作用还赋予组织一定渗透压, 对维持组织正常状态具有重要作用。HA 填充在胶原支架孔隙内, 以水胶体的形式占据空间, 对到达细胞及有形基质的物理及分子信息进行过滤和甄别, 从而对基质中各种生化反应发挥调节作用, 为细胞成分及胶原支架提供相对稳定的内环境。

HA 通常与 ECM 中其他分子相结合, 如各种蛋白多糖、细胞表面受体等, 这类分子称为 HA 结合蛋白或 HA 黏素。球形的连接蛋白将 HA 与 HA 黏素相连, 使它们所组成的三维网状结构保持稳定。HA 组成了蛋白多糖系统的支柱, 结合成蛋白多糖网络, 还在胶原纤维及其他基质之间构建联系, 维持 ECM 的完整性^[13]。HA 与细胞表面受体结合, 在细胞周边装配 ECM, 使细胞与 ECM 连接在一起。如 Fb、造血细胞以及上皮细胞均通过 HA 受体与 ECM 固定在一起^[14]。高相对分子质量 HA 还可保护细胞使其免受损伤, 维持内皮细胞的完整。HA 与细胞受体结合固定在细胞膜上, 在细胞周围形成不同厚度的细胞周分子笼蔽 (pericellular molecular cage), 可使细胞免受溶解毒性细胞、病毒等的攻击, 对氧自由基、IL-1 和植物凝集素的降解或侵害也有防护作用^[14]。高相对分子质量 HA 可作用于细胞表面受体, 抑制细胞分化, 通过抑制细胞 NF- κ B 介导抑制细胞凋亡, 还可通过膜受体 CD44 作用于胞内蛋白, 使细胞周期静止, 维持组织完整性^[15]。

高相对分子质量 HA 具有抗血管生成作用。含有高相对分子质量 HA 的 ECM 可抑制颗粒组织中血管的生成, 其抑制作用与高相对分子质量 HA 的浓度及相对分子质量大小呈正相关。HA 的亲水性令其可填充组织中体积, 排除其他分子和细胞, 抑制细胞的移动、增殖、分化和吞噬, 抑制血管内皮细胞的增殖和迁移。

高相对分子质量 HA 具有抑制炎症反应的作用。高相对分子质量 HA 可以覆盖细胞表面, 防止配体与细胞表面受体结合; 可抑制单核细胞、巨噬细胞、多形核细胞的吞噬作用; 在炎症局部, 可以和周围多种细胞缠绕、交联, 并充填到炎症组织的纤维中。高相对分子质量 HA 可以起到一种“粘蝇纸”的作用, 抑制炎症细胞活性, 隔绝前炎症因子, 从而

抑制整个炎症反应,以保护层的形式维护组织的完整性^[10]。

高相对分子质量 HA 可调节创伤愈合。伤口在早期炎症反应阶段,HA 合成增加,局部大量的高相对分子质量 HA 聚集,形成组织水肿,扩大组织空间,为细胞提供一个开放的、高度水化的 ECM,有助于 Fb、炎症细胞迁移到伤口局部;HA 还可以通过结合细胞上特异性的 HA 受体 CD44、RHAMM 来调节细胞的迁移。反之,高相对分子质量 HA 降解或 HA 受体阻滞可导致细胞迁移受抑制。

3.1.3.2 低相对分子质量 HA (大于或等于 200 且小于 4×10^5) 的功能 低相对分子质量 HA 与许多生理及病理情况相关,它的功能与分子的大小相关,是一种重要的细胞外信号分子。在皮肤损伤的第 1 阶段,高相对分子质量 HA 大量合成,扩大组织空间,利于炎症细胞迁移。在皮肤损伤的第 2 阶段,低相对分子质量 HA 聚集,诱导炎症因子表达,促进炎症细胞吞噬细菌及组织碎片^[11]。低相对分子质量 HA 在细胞间并非以游离形式存在,而是与 HA 结合蛋白结合,借以保护自我。细胞内的 HA 片段也有可能受到结合蛋白的保护。

3.1.4 HA 结合蛋白 HA 结合蛋白是影响 HA 功能的重要物质,包括纤维蛋白原,胶原蛋白,细胞表面受体 CD44、RHAMM,肿瘤坏死因子刺激基因 6,蛋白聚糖及 HAase。HA 结合蛋白的共性是通过与 HA 结合,使 HA 与 ECM 中其他成分结合成一体,调节 ECM 的构成及细胞-基质、细胞-细胞间的相互作用。此外,HA 与 HA 结合蛋白结合可影响胶原代谢,调节细胞运动或者自身的功能^[16]。

3.2 核心蛋白聚糖

核心蛋白聚糖是一种普遍存在于 ECM 的蛋白聚糖。在皮肤组织中,核心蛋白聚糖可由 Fb 合成分泌,散布在 ECM 中^[17],在胶原纤维的合成和维持皮肤的动态平衡方面起着重要作用^[18]。它因能修饰胶原原纤维也被称为饰胶蛋白聚糖。核心蛋白聚糖相对分子质量为 $90 \times 10^3 \sim 140 \times 10^3$,由富含亮氨酸的核心蛋白(相对分子质量为 36×10^3)和一条 GAG 链组成。GAG 链的种类随组织来源不同而不同,在骨和软骨中为 CS,在皮肤、肌腱等组织中为 DS^[17]。核心蛋白聚糖的核心蛋白可修饰多型胶原,结合多种细胞因子及生长因子,发挥十分复杂的生物学作用。目前研究显示核心蛋白聚糖在 ECM 中的功能有多种:(1)结合或“修饰”I 型胶原原纤维,调节胶原原纤维的重组和生长,阻止 3 股螺旋胶原分子之

间的不正常融合,使胶原纤维的直径更加统一、均匀^[19]。(2)结合 ECM 中的纤维连接蛋白、血小板反应蛋白 1 等,调节细胞的增殖、迁移及血管生成。(3)与某些因子结合作为其在 ECM 中的贮存形式。(4)可影响创伤后细胞的凋亡、分化和增殖^[20-21]。

4 问题与展望

真皮结构在皮肤愈合中具有不可替代的意义。严重创伤和大面积烧伤患者存在皮肤缺失的巨大创面,消除创面基本以自体刃厚皮移植为主,但自体皮源紧张导致愈合后创面皮肤功能极度不良。因此寻找永久的真皮替代物覆盖创面,成为严重创伤及大面积烧伤治疗的需要。目前的真皮替代物包括合成材料及天然真皮材料,均存在一定限制。合成材料胶原纤维排列与天然真皮不同,不具备真皮的三维结构,不利于 Fb 及血管内皮细胞的长入,对创面愈合后的外观及功能有所影响。异体皮如美国 Life-cell 公司生产的 AlloDerm^[5],来源有限,有传播传染性疾病的可能,并存在伦理道德问题。异种皮价格低廉,来源广泛,消除其抗原性可使其成为理想的真皮替代物。

目前采用各种方法制备的脱细胞真皮,在去除细胞成分的同时保留完整的胶原支架结构,可降低异种皮的抗原性。但是在脱除细胞成分的同时,充填在胶原框架之间的无定形基质成分 GAG、蛋白多糖等也被脱除,使胶原纤维失去了原有的环境和保护。在移植至创面后,创面在炎症反应状态时,胶原酶活性增强,直接作用于裸露的胶原纤维,加速脱细胞真皮胶原纤维降解。此外,脱细胞真皮缺乏无定形基质的各种理化生物功能,不利于创面 Fb 及内皮细胞的迁移及长入,阻碍新的基质合成及再血管化的进程。ADM 在新生真皮合成之前降解,造成创面二次暴露、植皮失败。

理想的组织工程皮肤替代物应具备满意的物理性能、完整的支架结构、可靠的生物学安全性、较低的细胞毒性以及良好的组织相容性。同时要求能模拟正常真皮组织的代谢过程及对损伤修复过程的调控作用,诱导自体 Fb、血管内皮细胞按照应有的组织学方式长入,指导 Fb 正确合成新的 ECM,构成新的自体真皮,最终取代组织工程皮肤,充分发挥皮肤功能。由此设想,在脱细胞真皮支架中引入无定形基质成分,修饰保护胶原纤维,可能提高脱细胞真皮对胶原酶的耐受性,并改善 ADM 生理功能,实现结构及功能的仿生化。

参考文献

[1] Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes; a review. *Burns*, 2001,27(5):534-544.

[2] 周柔丽. 医学细胞生物学. 2 版. 北京:北京大学医学出版社, 2006:491-531.

[3] 鄂征,刘流. 医学组织工程技术与临床应用. 北京:北京出版社,2003:188-214.

[4] 成令忠,钟翠平,蔡文琴. 现代组织学. 上海:上海科学技术文献出版社,2003:198-214,717-718.

[5] Jones I, Currie I, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg*, 2002,55(3):185-193.

[6] 李伯坝. 现代实用皮肤病学. 西安:世界图书出版西安公司, 2007:5-18.

[7] van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns*, 2009,35(1):15-29.

[8] Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*, 1995,7(5):728-735.

[9] 田梦玉. 蛋白聚糖研究进展. 生命的化学,1999,19(3):113-115.

[10] Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments; an information-rich system. *Eur J Cell Biol*, 2006,85(8):699-715.

[11] Meyer LJ, Stern R. Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol*, 1994,102(3):385-389.

[12] Laurent TC, Fraser JRE. Catabolism of hyaluronan//Henriksen JH. Degradation of bioactive substances: physiology and pathophysiology. Boca Raton: CRC Press, 1991:250-265.

[13] Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*, 1999,7(2):79-89.

[14] 凌沛学. 透明质酸. 北京:中国轻工业出版社,2007:53-83.

[15] Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan; a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol*, 2000,12(5):581-586.

[16] Wight TN. Versican; a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*, 2002,14(5):617-623.

[17] 王慧君,郭慕依. 饰胶蛋白聚糖与肾脏疾病. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2000,20(2):106-108.

[18] Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J*, 2002,19(4/5):249-255.

[19] Kuwaba K, Kobayashi M, Nomura Y, et al. Size control of decorin dermatan sulfate during remodeling of collagen fibrils in healing skin. *J Dermatol Sci*, 2002,29(3):185-194.

[20] 冯秀艳,张志刚,郭慕依. 饰胶蛋白聚糖的多种生理功能及其作用机制. 国际病理科学与临床杂志, 2005,25(5):434-437.

[21] Seidler DG, Schaefer L, Robenek H, et al. A physiologic three-dimensional cell culture system to investigate the role of decorin in matrix organisation and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,332(4):1162-1170.

(收稿日期:2009-10-10)
(本文编辑:谢秋红)

· 烧伤早期并发症与处理进展链接 ·

阻断 P 物质对烧伤后急性肺损伤的早期保护作用

为寻找烧伤后早期急性肺损伤(ALI)的内源性触发因素,作者采用30% TBSA III度烧伤小鼠模型,研究促炎神经肽 P 物质在严重烧伤后 ALI 发生过程中的作用及其对伤后早期呼吸功能的影响。将小鼠分为3组:野生型组、前速激肽原 A(PPT-A 基因,编码 P 物质)敲除组以及 PPT-A 基因敲除 + 外源性 P 物质组,检测烧伤后 ALI 及肺功能变化情况。结果显示,野生型组小鼠 P 物质生成增加,使得促炎细胞因子、炎症趋化因子及内皮黏附因子的含量显著上升,同时引起了肺通透性屏障的破坏、中性粒细胞的过度浸润及严重 ALI;而这些效应在 PPT-A 基因敲除组中则显著减弱。在 PPT-A 基因敲除 + 外源性 P 物质组中,这些过度的炎症反应及 ALI 又得以重现。该研究表明,内源性 P 物质的缺失可改善烧伤后呼吸功能,使机体免遭 ALI 侵害。因此,阻断 P 物质或许有利于预防严重烧伤患者的早期炎症反应和 ALI。

尹泽钢,编译自《Am J Respir Crit Care Med》,2010,181(1):36-46;黄跃生,审校

严重烧伤后等渗液及高渗液复苏的比较

为了解高渗盐溶液复苏的效果,作者做了如下前瞻性临床试验。将110例严重烧伤患者按随机双盲原则均分为高渗盐溶液复苏组和等渗盐溶液复苏组,等渗盐溶液组按 Parkland 公式(成人)或按 Shriner 公式(小儿)补液。补液过程中根据2组患者临床表现和尿量精确调整补液量。在补液的第1小时,高渗盐溶液复苏组的液体负荷、钠负荷、血浆钠离子浓度和血浆渗透压均明显高于等渗盐溶液复苏组(P值分别为0.001、0.001、0.003、0.002),但其24h累积水负荷则低于等渗盐溶液复苏组,累积钠负荷和钠排泄高于等渗盐溶液复苏组。高渗盐溶液复苏组血钠浓度始终低于上限(155 mmol/L),对治疗效果无不良影响。该研究证实2种补液方案均有效,高渗盐溶液复苏在补液后第1小时会增加水钠负荷,但可使24h液体总量降低,并减轻积水。

尹泽钢,编译自《Am J Emerg Med》,2009,27(9):1091-1096;黄跃生,审校