

· 论著 ·

微孔化猪脱细胞真皮基质与大鼠骨髓间充质细胞对裸鼠皮肤附件细胞再生的作用



罗旭 辛国华 曾逃方 林才 曾元临 李郁葱 邱泽亮

【摘要】 目的 观察微孔化猪 ADM 复合含有骨髓间充质干细胞(BMSC)的大鼠骨髓间充质细胞群对裸鼠部分皮肤附件细胞再生的作用。方法 将 1 只清洁级健康小白猪处死,切取制作面积约 20 cm × 10 cm、0.3 mm 厚断层真皮片,通过激光打孔、高渗盐溶液脱细胞、交联等处理制作激光微孔化猪 ADM(LPADM),无孔猪 ADM 仅行脱细胞、交联等处理,进行外观、组织学、扫描电镜观察。将 1 只 SD 大鼠处死,取股骨和胫骨,分离培养骨来源的骨髓间充质细胞群,取第 3 代贴壁细胞进行成骨、成脂肪细胞分化实验。之后将其接种于 LPADM、无孔猪 ADM 上,构建骨髓间充质细胞-LPADM 和骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM。取 21 只健康裸鼠随机区组分为骨髓间充质细胞-LPADM + 无孔猪 ADM 组(简称 A 组,6 只)、LPADM + 刃厚皮片组(简称 B 组,6 只)、骨髓间充质细胞-LPADM + 刃厚皮片组(简称 C 组,6 只)、骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM + 刃厚皮片组(简称 D 组,3 只),麻醉后在其背部正中做一 2 cm × 2 cm 的全层皮肤缺损创面,达深筋膜,同时切取相同大小刃厚皮片备用,并分别移植相应材料覆盖创面。于移植术后 5、7、14 d 观察裸鼠局部情况及不良反应,各组分别处死 1 只裸鼠切取全部移植植物,HE 染色观察其组织结构;移植术后 7、14 d 透射电镜下观察相应复合物中新生皮肤附件情况。结果 (1)LPADM、无孔猪 ADM 呈瓷白色,柔软、有弹性,组织学观察显示真皮基质未见细胞成分;扫描电镜示孔径中胶原纤维排列有序;LPADM 还有微孔结构。(2)细胞传至第 3 代时,形态趋于一致,呈 Fb 样,生长较快。(3)诱导分化实验表明,细胞可向成骨细胞、成脂肪细胞分化。(4)移植术后 5 d,A 组无孔猪 ADM 局部干燥,D 组皮片局部干燥坏死,A、D 组均未见感染及炎症反应;B、C 组移植皮片成活。移植术后 7、14 d,A 组表面的覆盖物局部色泽发黑,干燥发硬;D 组皮片出现完全变黑干燥坏死,皮下可见淡黄色清亮渗液;A、D 组均未见明显脓性分泌物。B、C 组皮片外观与周围皮肤颜色接近。(5)移植术后 5、7 d,A、B、C 组真皮基质的微孔结构中已见血管化,其内可见有形红细胞;D 组移植皮片部分干燥坏死。移植术后 14 d,A、B、C 组真皮基质的微孔结构中已完全血管化,其内可见大量的红细胞。纵切片中,A 组微孔真皮基质成活,但与其上所覆盖的无孔猪 ADM 未紧密结合;B、C 组皮片与真皮基质间连接紧密,皮片中均未见皮肤附属器,C 组创面皮片与真皮基质交接处可见特殊的单层细胞。(6)D 组移植皮片未能成活,故放弃电镜观察。移植术后 7 d,A、B、C 组透射电镜图片未见明显差别。移植术后 14 d,A、B 组移植植物中未见皮脂腺样及汗腺样细胞,也未见新生神经末梢,仅见 Fb 迁入。C 组创面刃厚皮与真皮基质交接处可见大量新生毛细血管增生,Fb 粗面内质网分裂增殖旺盛,可见新生的无髓神经末梢;在真皮基质浅层,出现单个游离的皮脂腺样及汗腺样细胞。结论 LPADM 为骨髓间充质细胞群的迁移和分化提供了“干细胞龛”样微环境,联合刃厚皮片移植可在体诱导外源性 BMSC 分化,实现部分皮肤附件的重建。

【关键词】 伤口愈合; 皮肤; 真皮; 再生; 骨髓间充质干细胞

Effects of microporous porcine acellular dermal matrix combined with bone marrow mesenchymal

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.06.012

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(Z2080985);浙江省“十二五高校重点学科”危重病与灾害救援医学;温州市科技计划项目(Y20080101)

作者单位:325000 浙江省温州医科大学附属第一医院烧伤·伤口中心(罗旭、林才);南昌大学第一附属医院烧伤科(辛国华、曾元临);宜春市人民医院烧伤科(曾逃方);赣州市人民医院烧伤整形科(李郁葱);上海市浦东新区周浦医院重症医学科(邱泽亮)

通信作者:林才,Email:lincai0577@hotmail.com,电话:13906642368

cells of rats on the regeneration of cutaneous appendages cells in nude mice LUO Xu, XIN Guo-hua, ZENG Tao-fang, LIN Cai, ZENG Yuan-lin, LI Yu-cong, QIU Ze-liang. Center of Wounds and Burns of the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China
Corresponding author: LIN Cai, Email: lincai0577@hotmail.com, Tel: 13906642368

[Abstract] Objective To observe the effects of microporous porcine acellular dermal matrix (ADM) combined with bone marrow mesenchymal cells (BMMCs) population containing bone mesenchymal stem cells (BMSCs) of rats on the regeneration of cutaneous appendages cells in nude mice. **Methods** Split-thickness dermal grafts, 20 cm × 10 cm in size and 0.3 mm in thickness, were prepared from a healthy pig which was sacrificed under sanitary condition. Laser microporous porcine ADM (LPADM) was produced by laser punching, hypertonic saline solution acellular method, and crosslinking treatment, and nonporous porcine ADM (NPADM) was produced by the latter two procedures. Then the appearance observation, histological examination and scanning electron microscope observation were conducted. BMMCs were isolated and cultured from tibia and femur after sacrifice of an SD rat. Osteogenic and adipogenic differentiation experiments were conducted among the adherent cells in the third passage. Then they were inoculated to LPADM and NPADM to construct BMMCs-LPADM and BMMCs-NPADM materials. Twenty-one healthy nude mice were divided into BMMCs-LPADM + NPADM group (A, n = 6), LPADM + split-thickness skin graft group (B, n = 6), BMMCs-LPADM + split-thickness skin graft group (C, n = 6), BMMCs-NPADM + split-thickness skin graft group (D, n = 3) according to randomized block. After anesthesia, a 2 cm × 2 cm full-thickness skin defect reaching deep fascia was reproduced in the middle of the back of each nude mouse, and a split-thickness skin graft of the same size was obtained, and then prepared skin grafts were transplanted to cover the wounds respectively. On post transplantation day (PTD) 5, 7, and 14, local condition and adverse effects observation was conducted; one nude mouse was sacrificed each time to harvest all the transplant for tissue structure observation with HE staining. On PTD 7 and 14, neonatal skin appendages in corresponding composite materials were observed with transmission electron microscope. **Results** (1) LPADM and NPADM appeared to be porcelain white, soft, and flexible. No cellular component was observed in acellular dermal matrix. Scanning electron microscope showed that the collagen fibers were orderly arranged. LPADM had microporous structure. (2) Cells in the third passage were orderly arranged with the shape similar to fibroblasts with high growth speed. (3) Induced differentiation experiments showed that cells could differentiate into osteoblasts and adipocytes. (4) On PTD 5, the NPADM in group A was dry in part; skin grafts in group D were dry and necrotic, and there was no infection and inflammation in groups A and D; skin grafts in groups B and C survived. On PTD 7 and 14, the overlaying material in group A was black, dry, and hard in part; the skin grafts in group D turned to be completely black, dry, and necrotic, and pale yellow clear exudate was found in subcutaneous area; there was no obvious purulent discharge in groups A and D; the appearance of skin grafts in groups B and C was close to the surrounding skin. (5) On PTD 5 and 7, in groups A, B, and C, vascularization was apparent in the pores of dermal matrix, and red blood cells could be found. In group D, skin grafts were dry and necrotic. On PTD 14, in groups A, B, and C, the pore structure of dermal matrix was fully vascularized in which a large number of red blood cells were visible. In group A, the microporous dermal matrix survived, but the overlaying NPADM was not attached closely. In groups B and C, the skin grafts were closely connected to the dermal matrix, and no cutaneous appendages were observed. In group C, special monolayer cells were found at the junction between skin graft and dermal matrix. (6) Skin grafts in group D failed to survive; they were not observed with the electron microscope. On PTD 7, there were no significant differences among groups A, B, and C. On PTD 14, no sebaceous gland-like cell or sweat gland-like cell and no newborn nerve ending were observed in skin grafts in groups A and B, in spite of the immigration of fibroblasts. In group C, a large number of new capillaries were observed at the junction between the skin graft and dermal matrix; rough endoplasmic reticulum of fibroblasts proliferated exuberantly; newborn unmyelinated nerve endings were observed; single free sweat gland-like cells and sebaceous gland-like cells were observed in superficial dermal matrix. **Conclusions** LPADM, which provides a "cell niche-like" micro-environment for the migration and differentiation of the BMMCs population, when combining with the split-thickness skin graft, can induce exogenous differentiation of BMSCs in vivo, thus achieving the reconstruction of skin appendages.

[Key words] Wound healing; Skin; Dermis; Regeneration; Bone marrow mesenchymal stem cell

本课题组曾研制出一种具有快速血管化能力的激光微孔化猪 ADM (LPADM), 能够提供中厚皮片移植所需要的早期血液运行, 对 Fb 等修复细胞的生物学活性无不良影响^[1]。为了进一步验证 LPADM 是

否可成为骨髓间充质干细胞 (BMSC) 合适的细胞生态样载体, 是否能够为 BMSC 向皮肤附件的分化提供生理样“归巢”微环境, 实现向皮肤附件分化突破的技术课题。在上述研究的基础上, 本实验拟将骨

髓间充质细胞群(含有BMSC)体外种植于LPADM表面,构建出骨髓间充质细胞-LPADM这一复合活性细胞的真皮基质,移植于裸鼠背部全层皮肤缺失创面,外覆盖移植物,观察是否存在皮肤附件细胞再生现象。

1 材料与方 法

1.1 动物及主要材料来源

体质量约 25 kg 健康雄性清洁级小白猪 1 只,体质量约 250 g 雄性无特殊病原体(SPF)级 SD 大鼠 1 只,体质量约 25 g 健康雄性 SPF 级裸鼠 21 只,均购自温州医科大学动物实验中心。含青霉素、链霉素各 100 U/mL 的双抗 PBS 和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。FBS 购自奥地利 PAA 公司。电动取皮刀购自美国 Zimmer 公司,紫外激光器购自美国相干公司,H-600 型透射电镜购自日本日立公司,Quanta 200 型扫描电镜购自荷兰 FEI 公司,倒置相差显微镜及 CKX41-A21PHP 型照相系统购自日本 Olympus 公司。

1.2 2 种真皮基质材料的制备及检测指标^[1]

处死小白猪,电动取皮刀切取 0.2 mm 厚刃厚皮,去除表皮及基底膜层,再于真皮组织上切取约 0.3 mm 厚断层真皮片(面积约 20 cm × 10 cm),经过高渗盐溶液脱细胞、交联,平均分为 2 份进行如下处理。(1)一份皮片经悬空贯穿性激光模板打孔^[2](孔径为 135 μm,孔间隙为 1 mm),制作成面积为 5.0 cm × 5.0 cm LPADM,⁶⁰Co 照射处理后,4 ℃ 冰箱保存备用。(2)另一份猪皮不经如上打孔,同前制备成同规格无孔猪 ADM,4 ℃ 冰箱保存。将制备的 2 种猪 ADM 进行大体、组织学、扫描电镜观察。

1.3 细胞分离与培养及分化实验

1.3.1 细胞分离与培养^[3] 选取 1 只 SD 大鼠脱颈处死,无菌条件下取出股骨和胫骨,无菌纱布擦拭去除附着于骨上的肌肉,将骨转移至已消毒的超净工作台中,用含 100 U/mL 青霉素-链霉素的双抗 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。咬骨钳去除骨两端,用容积 5 mL 的一次性注射器取 5 mL 低糖 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,收集冲洗液以离心半径 155 mm,1000 r/min 离心 5 min,共 2 次,弃上清及脂肪层。以 PBS 漂洗,吹打制成单细胞悬液,用含体积分数 10% FBS 的低糖 DMEM 培养液重新悬浮细胞,加入 1.073 g/L Percoll 细胞分离液中,以离心半径 80 mm,2000 r/min 离心 20 min。收集离心液界面上乳白色云雾状细胞层,D-Hank 液洗涤 2 次,重新悬浮细胞

于含体积分数 10% FBS 的低糖 DMEM 培养液中,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中培养。3 d 后首次换液,之后每隔 2 d 换液 1 次,弃未贴壁细胞,保留贴壁细胞继续培养,当原代细胞生长达 70% 融合时,0.25 g/L 胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 细胞体外诱导成骨、成脂肪细胞分化 取第 3 代贴壁细胞制成细胞悬液,调整细胞浓度至 1 × 10⁴ 个/mL,按每孔 1 mL 细胞悬液分别接种于 2 块 6 孔培养板,分别设 3 个孔为成骨组和成脂组,另分设 3 个孔均为阴性对照组,然后行分化鉴定。成骨组 3 孔细胞改用成骨细胞诱导培养液(含体积分数 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液、100 U/mL 青霉素-链霉素双抗 PBS、5 mmol/L β 甘油磷酸、50 μg/mL 抗坏血酸-2-磷酸、1 × 10⁻⁷ mmol/L 地塞米松)培养;成脂组 3 孔细胞改用成脂肪细胞诱导培养液(含体积分数 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液、10 μg/mL 胰岛素、1 × 10⁻³ mmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤、200 μmol/L 吡啶美辛)培养,阴性对照组培养液不变,每 2 天换液 1 次。诱导培养至第 10 天,将成骨组和成脂组各 3 孔细胞爬片,分别用体积分数 4% 甲醛固定、1 g/L 茜素红染色和体积分数 70% 乙醇固定、油红 O 染色,在光学显微镜下观察。

1.4 体外构建骨髓间充质细胞-LPADM、骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM 复合材料

超净台中将 LPADM 剪成 2.0 cm × 2.0 cm 大小,将其表面朝上置于 6 孔培养板中,加入含体积分数 10% FBS 的低糖 DMEM 培养液浸润,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中静置 4 h。取生长良好的第 3 代贴壁细胞,0.25 g/L 胰蛋白酶消化成细胞悬液,调整浓度至 4 × 10⁵ 个/mL。更换 6 孔培养板培养液,在 LPADM 表面接种 1 mL 细胞悬液,放入 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中孵育 4 h 后换液,之后隔天换液共培养 5 d,构建骨髓间充质细胞-LPADM 复合材料。同上取无孔猪 ADM 行相同处理,构建骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM 复合材料。

1.5 全层皮肤缺失移植实验及观察指标

取 21 只裸鼠采用随机区组分为骨髓间充质细胞-LPADM + 无孔猪 ADM 组(简称 A 组,6 只)、LPADM + 刃厚皮片组(简称 B 组,6 只)、骨髓间充质细胞-LPADM + 刃厚皮片组(简称 C 组,6 只)、骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM + 刃厚皮片组(简称 D 组,3 只),采用 3.5 g/L 水合氯醛腹腔注射(0.01 mL/g)麻醉,俯卧位固定于实验操作台上,在裸鼠背部正中

做一 2 cm × 2 cm 的全层皮肤“口”形创面,达深筋膜,同时避开创面切取同大小刃厚皮片备用。分别将相应覆盖材料剪裁为与创面同样大小并移植于各组裸鼠深筋膜层表面,外用粗网油纱覆盖缝合、打包固定,单笼饲养。

于移植术后 5、7、14 d,开包揭开油纱,观察各组裸鼠皮肤有无过敏、感染、坏死征象,同时各组取 1 只裸鼠处死切取深筋膜上含有相应材料的全部组织标本经体积分数 10% 甲醛固定、包埋、常规制作 4 μm 厚石蜡切片行 HE 染色,光学显微镜下观察组织结构变化。于移植术后 7、14 d 常规处理样本,透射电镜下观察皮肤附件及新生神经超微结构。

2 结果

2.1 2 种真皮材料的外观、组织学及扫描电镜观察

LPADM、无孔猪 ADM 呈瓷白色,柔软、有弹性,组织学观察显示真皮基质脱细胞干净,未见细胞成分。扫描电镜示孔径中胶原纤维排列有序^[1]。LPADM 除了以上形态特点,还有贯穿性圆形、均一微孔结构。组织学检查显示 LPADM 微孔边缘激光炭化程度轻^[1]。

2.2 细胞形态及生长特点

分离得到的单核细胞在倒置相差显微镜下呈圆形,折光性强。培养 2 d 后可见部分细胞贴壁生长,呈梭状。培养 5 d 时,细胞已出现分裂增殖。培养 12 d 时细胞融合达 80%,此时细胞呈现为 Fb 样。至第 3 代时,细胞形态趋于一致,为 Fb 样,细胞生长较快,每 7 天传代 1 次。

2.3 细胞体外诱导成骨、成脂肪细胞分化

成骨细胞诱导培养液培养 3 d,细胞密度增大,呈短梭形。培养 5 d,细胞形态不一,部分细胞呈现为多角形。培养 7 d,细胞间可见细小的钙质沉积。培养 10 d,形成明显的钙结节;阴性对照组细胞密度增加,未见钙结节出现。茜素红染色,成骨组细胞可见散在的钙结节,高倍镜下呈深红色(图 1),阴性对照组无明显改变。

成脂肪细胞诱导培养液培养 3 d,细胞中可见细小脂滴,部分细胞质反光增强,5 d 后细胞质内出现小脂滴并逐渐融合,10 d 后出现明显的脂滴,且含有脂滴的细胞变为圆形或多边形;阴性对照组细胞无显著变化。油红 O 染色,成脂组见大量含有红色脂滴的成脂肪细胞(图 2),阴性对照组未见明显改变。

2.4 移植局部情况、组织学和透射电镜观察

2.4.1 外观变化 移植术后 5 d, A 组无孔猪

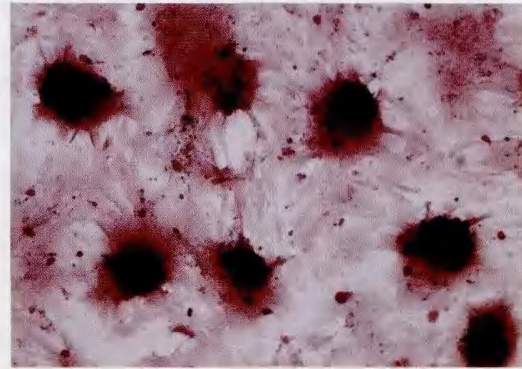


图 1 成骨细胞诱导培养液分化诱导 10 d,成骨组细胞可见结节状钙盐的深染区域 茜素红 × 200

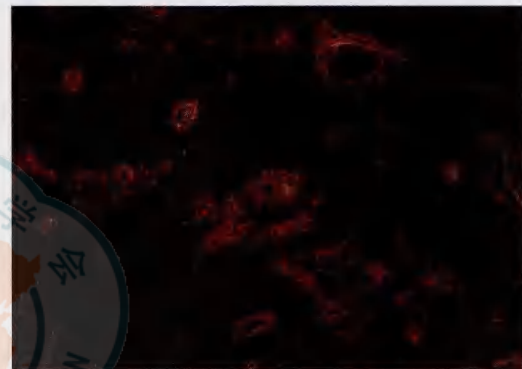


图 2 成脂肪细胞诱导培养液分化诱导 10 d,成脂组大量含有红色脂滴的成脂肪细胞形成 油红 O × 200

ADM 局部干燥, D 组皮片局部干燥坏死, 2 组均未见感染及炎症反应; B、C 组移植皮片成活, 呈粉红色、柔软。移植术后 7、14 d, A 组表面的覆盖物局部色泽发黑, 干燥发硬如皮革样, 未见明显脓性分泌物; B、C 组皮片均成活, 皮片外观与周围皮肤颜色接近; D 组皮片完全变黑干燥坏死、缩小, 皮下可见淡黄色清亮渗液, 未见明显脓性分泌物。

2.4.2 HE 染色 移植术后 5 d, A、B、C 组横切片中真皮基质的微孔结构中已见血管化, 其内可见有形红细胞; D 组移植皮片部分干燥、坏死(图 3a ~ d)。移植术后 7 d 与 5 d 相比无明显区别。移植术后 14 d, A、B、C 组横切片中真皮基质的微孔结构中已完全血管化, 其内可见大量红细胞(图 3e ~ g); D 组未见血管形成, 仅见少许 Fb 注入(图 3h)。纵切片中, 移植术后 14 d A 组微孔真皮基质成活, 但与其上所覆盖的无孔猪 ADM 未紧密结合, 在制作 HE 切片时容易脱落; B、C 组皮片与真皮基质间连接紧密, 皮片中均未见毛囊、皮脂腺、汗腺等皮肤附属器; C 组创面皮片与真皮基质交接处可见特殊的单层细胞; D 组皮片干燥坏死, 皮片与真皮基质有少量细胞结构(图 4)。

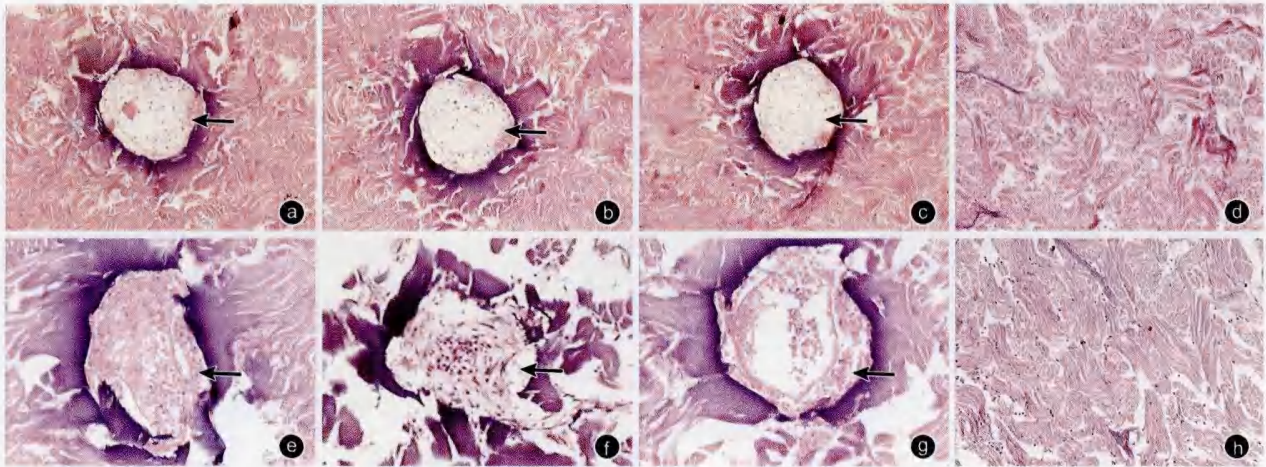


图3 移植术后 5、14 d 各组移植组织结构 HE 染色横切片观察 HE ×200。a、b、c. 分别为移植术后 5 d, 骨髓间充质细胞-激光微孔化猪 ADM(LPADM) + 无孔猪 ADM 组、LPADM + 刃厚皮片组、骨髓间充质细胞-LPADM + 刃厚皮片组, 真皮基质的微孔结构中已见血管化(←), 其内可见有形红细胞, 3 组无明显差别; d. 移植术后 5 d, 骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM + 刃厚皮片组移植皮片部分干燥、坏死, 真皮基质中未见血管形成; e、f、g. 分别为移植术后 14 d, 骨髓间充质细胞-LPADM + 无孔猪 ADM 组、LPADM + 刃厚皮片组、骨髓间充质细胞-LPADM + 刃厚皮片组真皮基质的微孔结构中已完全血管化(←), 其内可见大量的红细胞, 3 组无明显差别; h. 移植术后 14 d, 骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM + 刃厚皮片组真皮基质中未见血管形成, 仅见少许 Fb 迁入

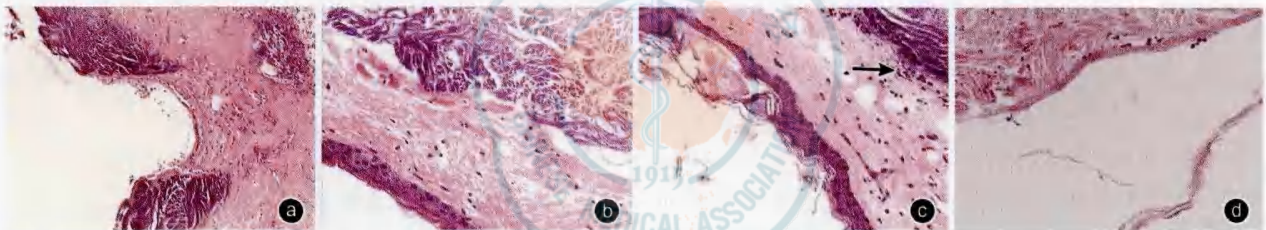


图4 移植术后 14 d 各组移植组织结构 HE 染色纵切片观察 HE ×200。a. 骨髓间充质细胞-激光微孔化猪 ADM(LPADM) + 无孔猪 ADM 组微孔真皮基质存活, 但易与其上所覆盖的无孔猪 ADM 脱离; b、c. 分别为 LPADM + 刃厚皮片组、骨髓间充质细胞-LPADM + 刃厚皮片组皮片成活良好, 皮片与真皮基质贴附紧密, 骨髓间充质细胞-LPADM + 刃厚皮片组皮片与真皮基质交接处可见特殊的单层细胞(→); d. 骨髓间充质细胞-无孔猪 ADM + 刃厚皮片组皮片干燥坏死, 皮片与真皮基质有少量细胞结构

2.4.3 透射电镜观察 D 组移植皮片干燥失活故放弃电镜观察。移植术后 7 d, A、B、C 组透射电镜未见明显差别。移植术后 14 d, A、B 组移植物中未出现皮脂腺样及汗腺样细胞, 也未见新生神经末梢, 仅见 Fb 迁入(图 5); C 组创面刃厚皮片与真皮基质交接处可见大量的新生毛细血管增生, Fb 粗面内质网分裂增殖旺盛, 可见新生的无髓神经末梢(图 6a)。在 C 组真皮基质的浅层, 出现单个游离的皮脂腺样细胞(图 6b)及汗腺样细胞(图 6c)。



图5 移植术后 14 d, 骨髓间充质细胞-激光微孔化猪 ADM + 无孔猪 ADM 组真皮基质未出现皮脂腺样及汗腺样细胞, 也未见新生神经末梢, 仅见 Fb(←) 迁入 透射电镜 ×5000, 图中标尺为 2 μm

3 讨论

随着对皮肤浅层(表皮)、深层(真皮)损伤的细胞发育学、再生理论研究的不断深入, 一定程度上缓解了大面积皮肤缺失愈合后瘢痕增生明显的难题。但对于皮肤附属器的再生修复问题, 尽管基础研究领域已得到长足进步, 如观察到干细胞具有分化为毛囊、汗腺、皮脂腺等皮肤附属器的多向潜能, 但在

体研究进展不大, 严重制约了皮肤组织工程“复合皮”在临床的开发速度和应用前景^[4-6]。最主要的原因之一是种子细胞的接种平台载体(如真皮基质), 缺乏实现快速血管化的性能, 无法使种子细胞在接

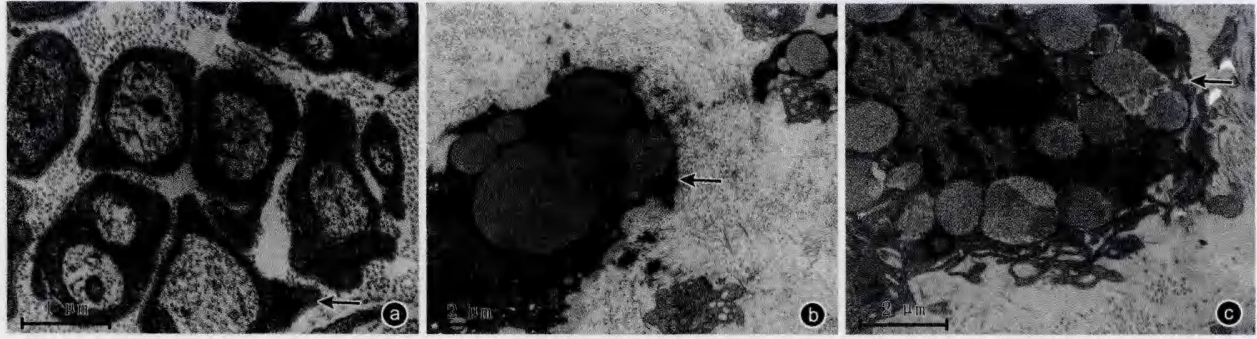


图6 移植术后14 d,骨髓间充质细胞-激光微孔化猪ADM+刃厚皮片组织结构观察。a.刃厚皮片与真皮基质交接处出现新生的无髓神经末梢(←) 透射电镜×20 000,图中标尺为1 μm;b.真皮基质的浅层出现单个的皮脂腺样细胞(←) 透射电镜×6000,图中标尺为2 μm;c.真皮基质的浅层出现单个的汗腺样细胞(←) 透射电镜×10 000,图中标尺为2 μm

种、分化、传输、增殖过程中,获得如体外实验通过及时换液得到的早期、有效、持续的必需养分,以保证细胞存活。同样因未能更好突破种植的真皮材料快速血管化的技术难题,临床多采用“二步法”保证移植皮片的存活。即第1步:将覆盖一层硅胶膜的多孔人工真皮(皮耐克或 Integra™)材料,移植于清创后的创基;第2步:揭去已经血管化的真皮材料表面的硅胶膜,再移植刃厚皮片或中厚皮片,完成创面的修复过程。随后进展到“一步法”,在植入真皮支架同时覆盖刃厚皮片或中厚皮片。可见,“一步法”比“二步法”在缩短愈合时间和住院时间等方面更加有效。如果“一步法”的早期血管化技术难题得到较好解决,这种优良的真皮材料无疑将为皮肤组织工程的种子细胞(目前认为最有望成为皮肤组织工程种子细胞的是 BMSC 和脂肪干细胞)提供理想的生理样功能微环境,将为皮肤干细胞多向分化潜能的表达和适时定向分化提供诱导平台,有望在皮肤附件再生领域获得重大突破,实现皮肤附件修复“质”的飞跃,解决临床中烧伤患者瘢痕愈合中存在的无发汗、无新生体毛等缺陷。

BMSC 具有多向分化潜能及一定的免疫抑制作用^[7],且来源不受皮肤缺失、脂肪层清除的制约,无疑是作为皮肤附件再生的种子细胞较好选择。大量的体外实验研究显示,其分化方向与其所处的微环境密切相关,BMSC 活性的正常表达必须依赖可靠的细胞生长平台、“干细胞龛”样结构^[8-11],目前鲜见 BMSC 完成皮肤附件的有效修复和重建报道。因此,在 LPADM 真皮基质快速血管化实现的基础上,开展外源性 BMSC 弥补创面区域种子细胞的不足,验证 LPADM 是否可以作为 BMSC 提供类似体外培养合适的营养支持,在体观察 BMSC 在 LPADM 生理样“归巢”微环境中的可能增殖和分化的状态及其与

皮肤附件重建再生相互关系就有了研究意义。

在本实验中,笔者首先取异体骨髓来源的单核细胞层进行离心,并开展向成骨细胞、成脂肪细胞2个方向诱导分化的实验,结果显示选用的细胞具有多向分化的能力,同时有助于排除可能因取材分离不彻底混杂其他细胞的假阳性结果。将这种具有分化潜能的混合 BMSC 及其短暂扩增细胞、甚至部分终末分化细胞的骨髓来源的间充质细胞群与 LPADM 和无孔猪 ADM 进行体外接种,形成4种搭配实验设计组。A组采用无孔猪 ADM 覆盖,B、C、D组均采用刃厚皮片覆盖打包固定。

实验组织学结果显示:(1)除D组外,其他3组真皮材料与创基黏附紧密,新生血运关系建立。与微孔化结构的A、B、C组相比,无微孔化结构的D组ADM移植后仅凭残留的自然孔径无法实现有效血供,提示干细胞平台的快速血管化是保证其在细胞生物学活性正常表达,甚至正常存活的基本条件。(2)B组移植皮片存活,但组织学切片检查未能找到新生的皮肤附件样结构,与临床常见的深Ⅱ~Ⅲ度创面移植皮片修复后患者不能正常排汗较为相似。(3)与单纯LPADM的B组相同,虽然A组为含有BMSC骨髓来源的间充质细胞的LPADM,也未能找到皮肤附件结构。但在C组中观察到了新生皮脂腺样细胞、汗腺样细胞、无髓神经细胞,说明尽管A、C组均采用骨髓间充质细胞-LPADM的移植方式,但由于C组采用了刃厚皮片移植的外覆盖,A组采用的是模拟临床的生物外敷料覆盖形式,导致最终实验结果不同,提示在深筋膜上修复创面,其基底来源的皮肤干细胞损伤殆尽。A组无孔猪ADM覆盖物未能提供良好的生物学诱导,指引外源性的BMSC在体实现多向分化;而移植自体刃厚皮片的C组却出现生物诱导BMSC向皮肤附件分化的效果。该现

象是否由移植皮片中本身残留的皮肤附件结构所致,为此笔者进行了局部样本的透射电镜观察,结果均为非腺腔样非成熟汗腺样细胞、皮脂腺样细胞以及无髓神经样细胞,这种缺乏功能性完整排列成熟的结构,恰好说明确为新生。(4)实验过程中各组均未观察到毛囊样细胞新生结构。相对而言,毛囊的发育较复杂,需要外胚层和间充质的 20 多种细胞的相互作用才可以完成,而作为中胚层来源的皮脂腺和汗腺的发育较为简单。笔者构建的这种 LPADM 细胞平台龕与皮肤组织胚胎发育时期所处的微环境有很大差距,这种差距可能在发育初期就决定了。也有可能是观察时间较短,毛囊发育所处的环境尚不健全所致。但更大的可能是毛囊的形成过于复杂,LPADM 的真皮基质尚不足以提供如此复杂的微环境。笔者设想若改变干细胞的来源,选用毛囊干细胞或添加混合毛囊的培养基或移植混合毛囊细胞的 BMSC,是否能在 LPADM 提供的细胞平台中观察到毛囊新生的现象。若可行,则不仅可以从发育学和结构学的角度重新认识细胞龕的生物性,也为修正调整完善 LPADM 的真皮仿生学设计和深化微环境和干细胞的相互作用研究提供新的思路。

综上,本研究显示当 LPADM 处于在体微环境中,外源性 BMSC 的迁移和分化具有良好的生物学活性,可在诱导下自觉定向分化成皮肤汗腺、皮脂腺细胞,具有重建部分皮肤附件的潜能。

参考文献

[1] 林才,罗旭,王平,等.激光微孔猪脱细胞真皮基质的制备及生

物相容性评价.中华烧伤杂志,2011,27(6):463-465.

- [2] 温州医学院附属第一医院.激光微孔猪脱细胞真皮基质及其制备方法:中国,201010127369.0.2011-09-21.
- [3] 张向荣,郭光华,刘德伍,等.人骨髓间充质干细胞的分离培养及 BrdU 标记鉴定.中国组织工程研究与临床康复,2009,13(19):3618-3622.
- [4] Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1(4): 30.
- [5] Formigli L, Benvenuti S, Mercatelli R, et al. Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(2): 125-134.
- [6] Matsumoto Y, Kuroyanagi Y. Design of a matrix for cultured dermal substitute suitable for simultaneous transplantation with autologous skin graft: evaluation in animal test. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010, 21(1): 83-94.
- [7] Rossignol J, Boyer C, Thinard R, et al. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2547-2558.
- [8] Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*, 2004, 14(6): 1035-1041.
- [9] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [10] Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, et al. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005, 65(3): 321-329.
- [11] Tao YX, Xu HW, Zheng QY, et al. Noggin induces human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into neural and photoreceptor cells. *Indian J Exp Biol*, 2010, 48(5): 444-452.

(收稿日期:2012-12-27)

(本文编辑:贾津津)

· 读者·作者·编者 ·

读作编“面对面”之后 精彩续盼您的参与

中华医学会烧伤外科学分会(简称烧伤分会)2013 年学术年会如期在北京成功召开,这次盛大的聚会因恰逢烧伤分会成立 30 周年而显得格外隆重。《中华烧伤杂志》编辑部积极参与,在会场中时时可见编辑们活跃的身影。

《中华烧伤杂志》为了在会议期间更好地配合烧伤分会成立 30 周年的庆典活动,为了与读者、作者及合作伙伴进行面对面的沟通交流,编辑部进行了特别策划,专门设立了杂志咨询台,从投稿过程演示到写作送审答疑,吸引了众多参会者驻足。大家还意外地收到编辑部精心准备的小礼物——文献检索卡,便于在课题设计或论文撰写中应用。

这次会议不仅让我们重逢老朋友结识新朋友,更加直接地获取对办刊的认可和建设性建议,同时在精彩的学术交流中得到学习并更新专业知识,为进一步办好《中华烧伤杂志》、发挥好平台效应起到了良好的促进作用。

在此,诚挚邀约各位莅会专家、临床医师及护士同道结合自己的专长,针对本次会议中涉及的热点、难点成文投于我刊,以飨广大读者、作者,推动烧伤学科进一步发展。

注:请登录《中华烧伤杂志》官网“<http://www.zhsszz.org>”远程稿件处理系统投稿,稿件一经录用,将尽快安排发表。

本刊编辑部