

# 皮肤组织工程学在我国

夏照帆 肖仕初



Skin tissue engineering in China XIA Zhao-fan, XIAO Shi-chu. Burn Center of PLA, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, P. R. China

【Abstract】 Great progress has been made in the basic research and clinical application of skin tissue engineering in China over the past 20 years. It includes culture of epithelial cells and their preliminary clinical use, research and development of various dermal substitutes such as acellular dermal matrix, spongiform collagen membrane and high molecular weight polymer membrane, and modification of physical properties of dermal substitutes for the sake of raising their bioaffinity and vascularization, based on which composite skin containing epithelial cell layers has been constructed and used successfully in the repair of full-thickness skin defects. More recently, greater efforts have been made in the study of new epithelial seeding cells such as epithelial stem cell and hair follicle stem cell. With the work going into the center, it is hopeful into constructing an artificial skin that mimics the normal human skin in terms of structure and function with better viability of the transplant, so that it can eventually be used in clinical practice as a skin source for large area deep burn patients to improve the wound healing quality.

【Key words】 Burns; Skin tissue engineering; Dermal substitute; Composite skin

【关键词】 烧伤; 皮肤组织工程; 真皮替代物; 复合皮

“组织工程”的概念由美国国家科学基金会于 1987 年正式提出,标志着损伤、缺失的组织器官修复或替代方法的重大革新。由于皮肤结构相对简单,人工皮肤是最早应用于临床的组织工程产品。近 20 年来,国内在皮肤组织工程的基础研究与临床应用方面均取得了较大的进展,部分成果已成功应用于烧伤创面的修复和瘢痕整形,显示了良好的应用前景。

## 1 表皮细胞培养与移植

表皮细胞培养、扩增是皮肤组织工程学中最基础也是最关键的技术之一,它的发展早于组织工程概念的提出。1975 年, Rheinwald 和 Green<sup>[1]</sup> 首次成功地培养、扩增了人体表皮细胞,随后将培养的自体表皮细胞膜片用于深度烧伤创面修复<sup>[2]</sup>。紧跟国外表皮细胞培养技术,国内多家研究单位如第二军

医大学、第三军医大学和第四军医大学也积极地开展了表皮细胞的培养与应用研究。他们成功地培养出表皮细胞,并对表皮的分离和表皮细胞的传代方法进行了改良<sup>[3-4]</sup>。

在临床应用方面,陈璧等<sup>[3]</sup> 将培养的异体表皮细胞单层膜片移植于 14 例烧伤切削痂创面,半数成活。其他单位也尝试将异体表皮细胞用于封闭深度烧伤创面<sup>[5-6]</sup>。使用异体表皮细胞的优点是可预先培养、扩增、冻存与能及时应用。但由于具有抗原性,最终仍将被机体排斥。

要将培养的自体表皮细胞应用于大面积深度烧伤创面的修复,需建立一整套操作流程。患者入院后,切取邮票大小的皮肤标本,分离表皮细胞,经体外培养、扩增 3~4 周后才能获得较充足的可供移植的细胞膜片。而且对创面的处理要求也较高,应保持创面清洁、避免感染,创面处理和细胞培养在时间上也应吻合。国外已将自体表皮细胞膜片培养、移植技术产业化,并成功地救治了一些大面积烧伤患者。遗憾的是,国内在自体表皮细胞的临床应用方面未能取得突破,尚未见常规化和规模化地将自体表皮细胞应用于烧伤创面的报道。体外培养的表皮细胞是否具有较强的分裂增殖能力,关键在于能否有效地保持表皮细胞群内干细胞的比例。长海医院利用表皮干细胞的黏附特性,通过 IV 型胶原黏附选择收集表皮干细胞,并将 CD29<sup>+</sup>/增殖细胞核抗原<sup>-</sup> 作为鉴定表皮干细胞的标志<sup>[7]</sup>。近年来研究者也观察到,毛囊干细胞可望成为具有潜力的表皮种子细胞<sup>[8]</sup>。

## 2 真皮替代物的研制与应用

单纯的表皮细胞膜片移植由于缺乏真皮支撑,愈合过程中形成的真皮不完整,新生皮肤弹性欠佳,耐磨性差,易发生破溃,晚期瘢痕挛缩严重。这些不足促使研究者进行真皮替代物的研制与应用。

真皮替代物可分为天然真皮和人工合成的真皮。天然真皮替代物是将天然的生物材料如异体(种)皮、羊膜等去除具有抗原性的细胞成分,保留胶原结构,形成各种脱细胞真皮基质。人工合成的

基金项目:国家自然科学基金(30571921,30730091);国家重点基础研究发展规划(2005CB522603);全军医学科学技术研究“十一五”专项课题(06Z019);上海市医学重点学科建设项目(05IV007)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院全军烧伤中心

真皮替代物是采用生物原料(如胶原、葡聚糖、透明质酸)或高分子聚合物[如聚羧基乙酸(PGA)/聚乳酸]等制备而成的真皮支架。国外已有多种商品化真皮替代物如 Integra、Dermagraft、Alloderm 等,并已广泛应用于烧伤创面的修复、瘢痕整形等。国内对真皮替代物的研制最早源于异体真皮。苏波等<sup>[9]</sup>将新鲜异体皮移植于深度烧伤切痂创面,10 d 后削除表皮层并覆盖自体表皮细胞膜片。35 d 后未见排斥征象。

随着研究的深入,人们观察到去除真皮中细胞成分能减少异体真皮的抗原性。第四军医大学以猪为模型,在经胰蛋白酶处理的异体真皮上重叠移植自体皮片,成活率达 85%<sup>[10]</sup>。用经胰蛋白酶处理的异体真皮与自体表皮细胞膜片组合成复合皮行一步法移植,在动物实验中也获得成功<sup>[11]</sup>。胰蛋白酶处理的异体真皮是脱细胞真皮替代物的雏形。其后,孙永华等<sup>[12]</sup>采用酶消化和去垢剂处理法,进一步去除异体真皮中的细胞成分,研制成功“J-I 型脱细胞异体真皮”,应用于临床取得良好效果。

此后,脱细胞真皮替代物得到了深入研究与广泛应用。先后研制了异种(猪)脱细胞真皮、戊二醛交联的脱细胞真皮等。临床上主要将其与自体皮片如大张刃厚皮、网状皮、邮票皮等结合应用于深度烧伤削切痂创面的修复<sup>[13-14]</sup>。在实践中不断改进移植方法,由早期的二步移植发展到一步移植,成活率达 90% 以上,减少了手术次数,缩短了住院时间。经长期随访观察,成活的复合移植皮肤无明显皱缩,触感柔软,活动度好。

脱细胞真皮替代物在瘢痕治疗方面也取得了良好的效果<sup>[15]</sup>。特别是严重大面积烧伤患者,由于皮源极度缺乏,给后期整形造成了极大的困难。陈壁等<sup>[16]</sup>采用较柔软的瘢痕皮和脱细胞真皮联合移植,对腋窝、肘关节等功能部位的瘢痕挛缩畸形进行整复,结果远期效果与自体中厚皮片相似,外观与功能恢复良好。

在人工合成真皮替代物的研制方面,国内的临床工作者与相关专业如材料学科的同人们紧密协作,做了大量的工作。所研制的聚乳酸、聚乙交酯/丙交酯二元共聚物多孔支架等,显示出一定的前景<sup>[17-18]</sup>。

尽管真皮替代物已得到广泛应用,但与国外产品相比,仍存在差距。为了提高一步法移植的成活率,对脱细胞真皮替代物拉网或者减少真皮基质的厚度,以求加速其血管化。在应用中观察到,真皮基

质经拉网后容易形成点状瘢痕,而太薄则明显降低了真皮支架的支撑作用。因此,如何改进真皮支架的制作工艺,对提高应用效果具有重要作用。肖仕初等<sup>[19]</sup>将异种脱细胞真皮替代物进行微孔化处理,明显改善了真皮替代物的渗透性。结合自体网状皮、邮票皮移植于烧伤创面,成活率达 100%,随访未见明显瘢痕形成<sup>[20]</sup>。该微孔化的脱细胞真皮替代物已获得国家实用新型发明专利(专利号:ZL00125272.0)。

### 3 复合皮的体外构建与移植

真正意义上的组织工程皮肤应是包含表皮层和真皮层的皮肤类似物,具有正常皮肤的解剖结构和生理功能。目前制备的复合皮是指将表皮细胞接种于真皮支架表面,经体外培养后使表皮细胞在真皮替代物上分化、成熟,从而得到类似皮肤的复合组织。在国外,以海绵状胶原膜、PGA 等支架为载体,构建复合皮并应用于深度烧伤创面的修复。其中,皮肤替代物 Apligraf 已被美国食品与药品管理局批准用于临床。在国内,大部分研究仍处于动物实验阶段,临床应用尚不多。以胶原基质网架、PGA 膜等为培养载体,在两侧分别接种表皮细胞和成纤维细胞,培养出的人工复合皮具有表皮和真皮双层结构。动物实验表明这种复合皮可修复全层皮肤缺损创面<sup>[21-22]</sup>。

为了使较少的自体表皮细胞能覆盖较大的创面,夏照帆等<sup>[23]</sup>采取自(异)体表皮细胞混合移植的方法,初步达到目的。虽然异体表皮细胞移植后只在创面作暂时性存留,但它们合成与分泌的多种生长因子却能有效促进自体表皮细胞的生长和扩增。将某些生长因子基因转染的异体表皮细胞移植于创面,这些转基因细胞可释放一定量的生长因子,促进自体表皮细胞的增殖<sup>[24-25]</sup>。

将复合皮应用于烧伤创面的修复仍有较大的难度,相关报道较少。第三军医大学将异体表皮细胞和成纤维细胞分别种植在海绵状胶原膜的两面,经常规培养后,该复合皮具有一定的机械强度和柔韧性,便于手术操作。将复合皮移植于 10 例深度烧伤患者切削痂创面,成活 7 例,随访 1 年效果满意<sup>[26]</sup>。

近来,人们采用新的表皮种子细胞如表皮干细胞和毛囊干细胞构建复合皮,并进行了动物移植实验。观察到表皮增殖能力强,新生的皮肤瘢痕轻,外形满意<sup>[27]</sup>。混合人毛囊隆突细胞和毛乳头细胞构建复合皮,不但修复了裸鼠全层皮肤缺损创面,并可

见毛囊样结构<sup>[28]</sup>,为构建具有皮肤附件的复合皮提供了思路。

#### 4 存在的问题与展望

随着我国人民生活水平的提高,对烧伤治疗提出的要求也不断增加。组织工程皮肤的开展和普及将改变长期以来传统的“拆东墙补西墙”的植皮模式,有着广阔的临床应用前景。国内的研究者和临床工作者在这方面作了大量的工作,但大部分尚处于动物实验阶段。除了进行前瞻性、创新性的基础研究外,还需要掌握扎实的基本技术,以能真正解决临床问题。(1)自体表皮细胞培养、扩增技术需进一步完善。如何在较短的时间内扩增出足够的表皮细胞,是组织工程皮肤应用于临床的基础。(2)需加强复合皮的应用研究。已能构建含表皮层的复合皮,但移植成活率不稳定,目前多局限于动物实验。真正应用于临床,尚须使表皮层增厚、分化,形成含基底层、棘层甚至角化层的“皮肤”,提高抗感染能力,增强对手术操作、包扎等外部动作的耐受性。(3)加强烧伤创面处理。烧伤创面的基础、周边环境及患者全身情况极为复杂,不同于动物实验中的全层皮肤切除创面。保持创面清洁、避免感染,在一定程度上决定了复合皮移植的成败。此外,术后的包扎固定、敷料更换等,也是影响表皮细胞膜片和复合皮成活的不可忽视的因素。

#### 参考文献

[1] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975, 6(3):331-343.

[2] Gallico GG, O'Conner NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wound with autologous cultured human epithelium. *New Engl J Med*, 1984, 311(7):448.

[3] 陈璧,汤朝武,徐明达.人表皮细胞培养与移植.第四军医大学学报,1987,8(3):164-167.

[4] 王文正,张素珍.表皮细胞培养与移植研究 I:人表皮细胞在三种培养法中生长的观察.第二军医大学学报,1985,6(3):399-401.

[5] 张仕君,王旭,路淑珍,等.体外培养的同种异体表皮细胞在烧伤创面的应用.中华外科杂志,1988,26(3):156-158.

[6] 赵雄飞,张仕君,胡嘉念,等.培养的人表皮细胞片同种移植于

烧伤创面.解放军医学杂志,1989,14(2):82-85.

[7] 程大胜,夏照帆,唐洪泰,等.一种表皮干细胞检测方法的建立.解放军医学杂志,2003,28(6):566-567.

[8] 杨晓妍,夏照帆.毛囊隆突细胞.中国医学科学院学报,2007,29(4):557-561.

[9] 苏波,孙家玲,王文正,等.自体表皮细胞培养与异体真皮组合应用研究.中华创伤杂志,1995,11(3):140-141.

[10] 陈璧,汤朝武,龚熙.复合皮移植的实验研究.中华实验外科杂志,1990,7(1):29-30.

[11] 崔正军,陈璧,施新猷,等.复合皮研究中去除真皮中上皮成分的方法和意义.中华整形烧伤外科杂志,1997,13(1):37-39.

[12] 孙永华,李迟,王春元,等.脱细胞异体真皮与自体薄片移植的研究与应用.中华整形烧伤外科杂志,1998,14(5):370-373.

[13] 柴家科,杨红明,李利根,等.去细胞异体真皮、去细胞猪真皮和自体厚皮移植在临床中的应用.中华外科杂志,2000,38(10):790-792.

[14] 唐冰,朱家源,朱斌,等.早期削痂复合皮混合移植治疗颜面部深度烧伤.中山大学学报,2007,28(4):478-480.

[15] 夏成德,赵耀华,狄海洋,等.脱细胞异体真皮在烧伤瘢痕畸形治疗中的应用.河南医学研究,2006,15(4):356-357.

[16] 陈璧,贾赤宇,徐明达,等.自体皮源奇缺条件下瘢痕挛缩畸形的晚期临床修复.中华烧伤杂志,2003,19(6):361-363.

[17] 郇京宁,陈玉林,董肇杨,等. Integra 人工皮在烧伤创面的应用.第二军医大学学报,1998,19 增刊:116.

[18] 石柱欣,夏照帆.皮肤组织工程-细胞支架的构筑及其生物相容性评价.北京生物医学工程,2002,21(3):222-225.

[19] 肖仕初,杨珺,夏照帆,等.一种新型的无细胞真皮替代物的研制及移植试验.上海医学,2003,26(8):560-562.

[20] 肖仕初,夏照帆,杨珺.微孔异种无细胞真皮复合移植用于烧伤创面的功能评估.中国临床康复,2003,7(32):4311-4313.

[21] 马刚,杨同书,颜炜群,等.复合人工皮肤的制备.中华皮肤科杂志,1998,31(2):121-123.

[22] 蔡霞,崔磊,刘伟,等.组织工程技术修复皮肤缺损的动物实验.中华医学美容杂志,2004,10(6):349-351.

[23] 夏照帆,肖仕初,杨珺,等.混合表皮细胞与异种脱细胞真皮构建复合皮的移植和转归研究.解放军医学杂志,2003,28(5):402-404.

[24] 肖仕初,朱世辉,夏照帆,等.含转表皮细胞生长因子基因人表皮细胞复合皮的构建与移植.中国医学科学院学报,2007,29(4):506-509.

[25] 夏照帆,肖仕初,田建广,等.永久性皮肤替代物的研究.第二军医大学学报,2004,25(5):553-555.

[26] 王旭,王甲汉,吴军,等.复合皮的制作与临床应用.中国修复与重建外科杂志,1997,11(2):100-102.

[27] 胡葵葵,戴育成,李剑,等.表皮干细胞活性复合皮肤修复裸鼠全层皮肤缺损.中华医学美容杂志,2006,12(5):293-297.

[28] 王洪涛,陈璧,汤朝武,等.用毛囊隆突细胞构建复合皮的实验观察.中华烧伤杂志,2007,23(3):222-224.

(收稿日期:2008-03-21)  
(本文编辑:莫恩)

(上接第 333 页)

[6] 肖光夏.腹腔间隙综合征——应引起重视的烧伤并发症.中华烧伤杂志,2002,18(2):69-70.

[7] 程君涛,肖光夏,夏培元,等.腹内高压对免肠道通透性及内毒素细菌移位的影响.中华烧伤杂志,2003,19(4):229-232.

[8] 邵洪,尤忠义,汪仕良,等.严重烧伤早期肠黏膜屏障功能改变及肠道营养的实验研究.中华医学杂志,1994,74(2):80-82,126.

[9] 余斌,汪仕良,尤忠义,等.严重烧伤早期肠道营养加用谷氨酰胺对肠道血流量及氧耗量的影响.中华整形烧伤外科杂志,1996,12(1):37-40.

[10] 彭毅志,肖光夏,马利,等.早期肠道营养对严重烧伤患者肠道的保护作用.中华医学杂志,1995,75(1):39-41.

(收稿日期:2008-03-14)  
(本文编辑:罗勤)