

人表皮细胞与无细胞异种真皮复合移植的实验研究

刘旺 郇京宁 陈玉林 夏照帆 肖仕初 刘志国 黄康

【摘要】 目的 观察人表皮细胞与无细胞异种真皮复合移植全层皮肤缺损创面后的效果,寻找一种新的创面覆盖物。**方法** 42 只裸鼠作背部全层皮肤缺损创面,分别进行复合皮移植(复合皮组)和单纯表皮细胞膜片移植(对照组),术后定期观察创面愈合情况并进行创面愈合率及创面收缩率的计算,同时留取创面组织进行组织学检测。**结果** 与对照组相比较,复合皮组的创面愈合及外观情况良好,两组创面愈合率及收缩率的差异有显著性意义($P < 0.05$);组织学检测提示复合皮上表皮分化充分,胶原增生有序,表皮-真皮连接结构重建明显,未见明显的急性期免疫排斥反应。**结论** 人表皮细胞与无细胞异种真皮复合移植能改善创面愈合质量,可作为一种新的皮肤代用品。

【关键词】 表皮细胞; 无细胞异种真皮; 生物敷料

An experimental study on the recombinant composite skin graft consisting of human epithelium and acellular xeno-dermis LIU Wang, HUAN Jingning, CHEN Yulin, et al. Department of Burns, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, P. R. China

【Abstract】 Objective To observe the effects of the recombinant composite skin graft consisting of human epithelium and acellular xeno-dermis on full thickness skin loss wounds, so as to find a new wound covering material. **Methods** Forty-two nude mice with full thickness skin loss on the back were grafted with the composite skin (compound skin grafting group, G) and human keratinocyte sheet (control group, C), respectively. The wound healing conditions, such as wound healing rate and wound contraction rate, were observed at different time points after the operation. Simultaneously, wound tissue samples were harvested for histological examination. **Results** The wound healing rate in G group was much higher than that in C group. In contrast, the wound contraction rate in G group was obviously lower than that in C group ($P < 0.05$). It was indicated by histological examination that there was full differentiation of epithelium, orderly collagen proliferation and obvious reconstruction of the epithelial-dermal conjunction structure in G group. There was no obvious sign of acute immune rejection. **Conclusion** The wound covering with recombinant composite skin graft of human epithelium and acellular xeno-dermis could improve wound healing quality. The composite skin could be a new skin substitute.

【Key words】 Epithelia; Acellular dermis; Biological dressing

及时有效地封闭烧伤创面是烧伤治疗的重要环节。采用体外培养表皮细胞膜片覆盖创面,虽可扩大皮源,但由于缺乏真皮结构的支持,存在移植成活率低、韧性差、瘢痕收缩严重等问题^[1]。本实验采用表皮细胞培养与无细胞异种真皮重组复合皮的方法,进行移植裸鼠全层皮肤缺损创面的实验研究,以期临床提供较为最理想的创面覆盖材料。

材料与方 法

1. 无细胞异种真皮的制备:取 10 cm × 20 cm 新鲜猪皮,制成约 0.3 mm 厚的薄中厚皮片后,浸泡于质量浓度为 5g/L 的 Dispase II 24 h 去除表皮,再用

体积分数为 0.5% 的 TritonX-100 浸泡并持续震荡 24 h 以进一步去除细胞成分, PBS (pH7.0) 充分浸泡洗涤, 4℃ 保存。

2. 人表皮细胞培养:将人包皮用 Dispase II-胰蛋白酶消化法制成单细胞悬液,一部分接种于直径为 10 cm 的培养皿中,用无血清表皮细胞培养基(K-SFM, 美国 Gibco 公司)进行培养,约 10~15 d 融合成细胞膜片;另一部分用于复合皮的制作。

3. 复合皮的制备:取处理好的无细胞真皮,将真皮面向下平帖于直径于 10 cm 的培养皿中,置于层流工作台内 3 h,至无细胞真皮紧密贴附于培养皿底部。将制备好的单细胞悬液接种于无细胞真皮上,密度不小于 $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 。用 K-SFM 培养基培养 15 d。取标本行 HE 染色。

4. 动物模型及分组:6~8 周龄的裸鼠 42 只,体重 (20 ± 5) g,在乙醚吸入麻醉后,于背部正中切除

基金项目:国家重点基础发展规划项目(G1999054300)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院烧伤科(刘旺、郇京宁、陈玉林、夏照帆、肖仕初、刘志国);宜昌市第一人民医院烧伤整形科(黄康)

15 cm × 15 cm 的全层皮肤至深筋膜,并随机分为两组,即复合皮组:创面移植制备好的复合皮;对照组:创面单纯移植表皮细胞膜片,每组 21 只。两组创面移植后均用凡士林纱布及无菌敷料覆盖,打包固定。

5. 创面愈合情况及组织学观察:定期于术后第 2、3、5 周观察创面愈合情况并计算创面愈合率及收缩率。公式为:

$$\text{创面愈合率} = \frac{\text{创面愈合面积}}{\text{原移植总面积}} \times 100\%$$

$$\text{创面收缩率} = \frac{\text{原移植总面积} - \text{检测时面积}}{\text{原移植总面积}} \times 100\%$$

同时每组任取 7 只裸鼠创面组织,常规处理后分别在光镜及透射电镜下观察其组织形态结构,并行抗人 HLA-ABC 和抗 Laminin 免疫组织化学染色。

6. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验。

结 果

1. 无细胞异种真皮:制备好的无细胞异种真皮呈瓷白色,柔软有弹性,韧性好,不易断裂,易于加工成各种形状。HE 染色显示表皮已完全除去,真皮内已无任何细胞成分、皮肤附件及血管,胶原纤维完整,排列规则。

2. 复合皮的重组:表皮细胞种植后 24 h,细胞贴壁并形成集落开始生长,约 7~10 d 边缘及毛孔内的表皮细胞便可融合成片并与真皮边缘相延续。复合皮 HE 染色可见无细胞真皮表面沿基底膜区覆盖一层融合的表皮细胞,真皮内无细胞成分。这种复合皮使用时可加工成各种形状,易于手术操作。

3. 创面愈合情况:复合皮组移植后 10~15 d,与对照组相比,创面上皮化程度高,复合皮与创面边缘融合较好,与基底贴附紧密。术后 5 周复合皮组创面愈合好,表面光滑,抗摩擦性强,收缩不明显。而对照组移植后 10~15 d 仍有较多裸露创面,5 周后创面愈合,但皮片薄,质地差,抗摩擦性弱,创面收缩明显(表 1)。

表 1 两组创面愈合率及收缩率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the wound healing rate and contraction rate in two groups (% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	创面愈合率	创面收缩
对照组			
移植后 2 周	21	63.2 ± 7.9	25.36 ± 5.82
移植后 3 周	14	78.2 ± 7.6	39.11 ± 4.83
移植后 5 周	7	89.6 ± 5.0	51.18 ± 4.12
复合皮组			
移植后 2 周	21	74.1 ± 8.5*	19.32 ± 5.37*
移植后 3 周	14	88.6 ± 4.4*	26.51 ± 4.06*
移植后 5 周	7	95.1 ± 3.8*	35.93 ± 4.91*

注:与对照组比较, * *P* < 0.05

4. 组织学检查:光镜下显示,术后 5 周复合皮组表皮层已有明显的分层结构,细胞分化明显。真皮胶原纤维密集,排列整齐,可见正常血管分布。与复合皮组相比,对照组上皮化时间较迟,愈合后的上皮层较薄,细胞分化程度差,基底层细胞平坦,真皮内胶原纤维排列疏松紊乱(图 1,2)。透射电镜检查提示复合皮组棘细胞间桥粒、基底细胞半桥粒及基底膜均清晰。而对照组桥粒、半桥粒形成少,基底膜不清晰。免疫组织化学染色显示两组抗人 HLA-ABC

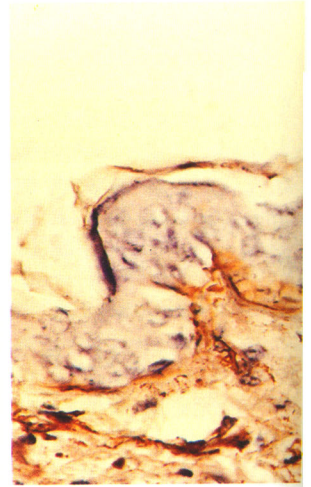
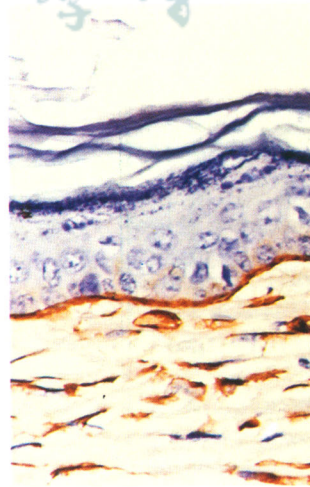
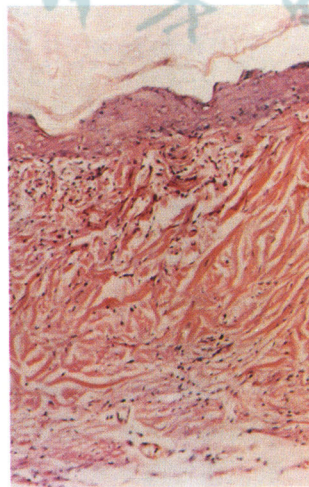
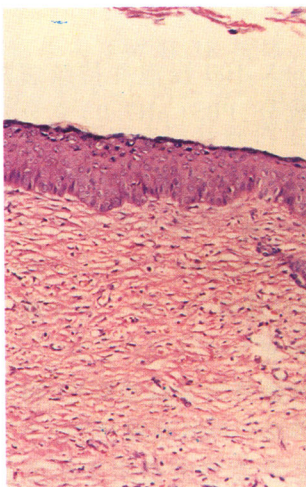


图 1 术后 5 周复合皮组表皮分化明显,胶原纤维排列整齐 HE × 20

Fig 1 Fully differentiated epidermis and regular arranged collagen fibres in C group at 5 post-grafting weeks HE × 20

图 2 术后 5 周对照组表皮分化较差,胶原纤维排列紊乱 HE × 20

Fig 2 Less differentiated epidermis and deranged collagen fibres in C group at 5 post-grafting weeks HE × 20

图 3 基底膜区染色深,较连续 抗 Laminin 免疫染色 × 40

Fig 3 Thick and continuous staining of the basement membrane in G group anti-laminin immunohistochemical staining × 40

图 4 基底膜区染色浅,较连续 抗 Laminin 免疫染色 × 40

Fig 4 Lighter and discontinuous staining of basement membrane in C group anti-laminin immunohistochemical staining × 40

均呈阳性反应,抗 Laminin 免疫组化染色显示两组均在基底膜区及真皮血管束周围呈阳性反应,但复合皮组于基底膜区染色深,呈线状连续。而对照组与之相比染色淡,连续性差(图 3,4)。

讨 论

自体皮源不足是大面积深度烧伤患者救治的难题。1975 年, Rheinwald 等^[2]建立了表皮细胞培养技术,标志着皮肤组织工程的开端。随后 O'Conner 等^[3]将体外扩增的自体表皮细胞膜片应用于临床并获得成功。但这种单纯移植自体表皮细胞膜片的方法由于缺乏真皮的支持,成活率低,预后质量差。1995 年 Wainwright^[4]研制的异体无细胞真皮在临床应用效果较好,但其表面仍需要自体皮肤的覆盖。

本实验采用表皮细胞培养与无细胞真皮重组复合皮的方法,可在许多方面克服单纯表皮细胞膜片或单纯真皮移植的不足。无细胞异种真皮以猪皮为原料,来源广泛,其生物性状与人皮相近,经系列处理去除表皮及真皮内可诱发宿主排斥反应的细胞成分,而保留了完整的纤维组织及基底膜等细胞外间质成分。这种无细胞真皮既无免疫原性,又提供了近似于正常结构的形成。制作复合皮时,将无细胞真皮置于培养皿内稍干燥后,无细胞真皮的胶原面便会牢固地贴附于平皿底部。表皮细胞接种于无细胞真皮后,可正常地贴附并分裂增殖,直到形成一层表皮细胞膜片覆盖于真皮上。

复合皮移植于创面后,表皮细胞最初靠渗透的血浆营养,由于无细胞真皮具有良好的血管化特性,可在短期内毛细血管化供养表皮细胞。无细胞真皮可为成纤维细胞提供良好的支架,有利于成纤维细胞对无细胞真皮胶原成分的改建,并形成形态结构及排列分布正常的胶原纤维。与对照组相比,复合皮组移植后新生胶原纤维较对照组排列更加有序。这与创面愈合后外观的差异相一致。

Laminin 主要存在于基底膜区及真皮血管束周围,是基底膜的主要成分,对上皮细胞的生长及分化起着重要作用^[5,6]。虽然两组抗人 HLA-ABC 呈阳性,证明人表皮细胞成活,但复合皮移植本身具有完

整的基底膜,有利于表皮细胞的贴附及生长分化,促进棘细胞间桥粒、基底细胞半桥粒的形成;而对照组桥粒、半桥粒及基底膜结构不清晰,创面上皮化时间较迟,愈合后的上皮层较薄,细胞分化程度差,表皮-真皮连接不牢固,愈合质量差。

随着组织工程的深入研究,在复合皮的研制方面,出现了许多类型的表皮细胞培养与真皮替代物重组的复合皮产品,部分虽已应用于临床,但仍存在着抗原性强或降解度大等缺点^[7-9]。笔者认为,表皮细胞培养与无细胞异种真皮重组的复合皮不仅可以一次性移植封闭创面,而且从多方面促进了表皮及真皮的重建,在一定程度上克服了由于缺乏真皮的支持、单存移植表皮细胞膜片出现的愈合质量较差的问题,然而对于复合皮移植后的远期组织学变化,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Kumagai N, Hishina H, Tanabe H, et al. Clinical application of autologous cultured epitelia for the treatment of burn wounds and burn scars. *J Plast Reconstr Surg*, 1988, 2: 99 - 108.
- 2 Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes; the formation of keratinizing colonies from single cell. *Cell*, 1975, 6: 331 - 334.
- 3 O'Conner NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, 1981, 1: 75 - 78.
- 4 Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (Alloderm) in the management of full-thickness burns. *Burns*, 1995, 21: 243 - 248.
- 5 Rennekampff HO, Hansbrough JF, Woods V, et al. Integrin and matrix molecule expression in cultured skin replacements. *J Burn Care Rehabil*, 1996, 17: 213 - 221.
- 6 Leary T, Jones PL, Appleby, et al. Epidermal keratinocyte self-renewal is depended upon dermal integrity. *J Invest Dermatol*, 1991, 99: 422 - 430.
- 7 Bell E, Ehllich HP, Sher S, et al. Development and use of a living skin equivalent. *Plast Reconstr Surg*, 1981, 67: 386 - 391.
- 8 Boyce ST, Goresky MJ, Greenleaf G, et al. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil*, 1995, 22: 743 - 752.
- 9 Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M, et al. Cultured skin as a smart material for healing wounds-experience in venous ulcers. *Bionaterial*, 1996, 17: 311 - 320.

(收稿日期: 2000-11-06)

(编辑: 张 宁)

· 广 告 目 次 ·

安徽安科生物工程股份有限公司(封二)
开封市康复医用设备厂(插页一)
珠海亿胜生物制药有限公司(插页二)
上海医药工业研究院亚东药业公司(插页三)

北京永安公司(插页四)
兴运实业(成都)有限公司(封三)
长春金赛药业有限责任公司(封底)