

# 以活性复合真皮基质为载体构建组织工程皮肤的研究

马忠锋 柴家科 杨红明 梁黎明 许明火



**【摘要】** 目的 构建含活性真皮基质的组织工程皮肤。方法 将人成纤维细胞(Fb)与 I 型牛胶原混合接种于猪脱细胞真皮基质(PADM)的表面,构建活性真皮替代物。其上接种人表皮细胞进行气-液面培养,获得组织工程皮肤,进行组织学观察。结果 Fb 在胶原内结构完整,与 PADM 形成复合真皮基质。所构建的组织工程皮肤表皮层结构与正常皮肤相似,具备基底层、棘层、颗粒层和角质层,细胞之间有桥粒连接,细胞分化良好。结论 Fb-胶原-PADM 真皮替代物可作为较好的构建组织工程皮肤的真皮支架。

**【关键词】** 组织工程; 皮肤,人工; 细胞培养技术; 表皮细胞; 真皮基质

Construction of tissue-engineering skin with carrier of active composite dermal matrix MA Zhong-feng, CHAI Jia-ke, YANG Hong-ming, LIANG Li-ming, XU Ming-huo. Burns Institute, the First Affiliated Hospital to the PLA General Hospital, Beijing 100037, P. R. China

Corresponding author: CHAI Jia-ke, Email: cjk304@126.com, Tel: 010-66867972

**【Abstract】** Objective To construct of tissue engineering skin including active composite dermal matrix. Methods The human fibroblasts and bovine collagen with type I were inoculated on the surface of porcine acellular dermal matrix(PADM) for construction of active dermal substitute, then epidermal cells were inoculated on the dermal matrix for gas-liquid interface culture. The tissue-engineering skin was observed by histological examinations. Results The structure of fibroblasts in collagen was intact, which was used to construct composite dermal matrix with PADM. The epithelial structure of tissue-engineering skin was similar to that of normal skin with good cell differentiation. Some phenomena were showed in epidermis: basic layer, stratum spinosum, granular layer and stratum corneum, desmosomes. Conclusion Fibroblasts-Collagen-PADM can be an optimal dermal matrix for construction of tissue-engineering skin.

**【Key words】** Tissue engineering; Skin, artificial; Cell culture techniques; Epithelial cell; Dermal matrix

组织工程皮肤是创面修复领域的研究热点,人们希望运用组织工程皮肤修复皮肤缺损和瘢痕,重建功能形态。本实验中,笔者在体外构建含表皮细胞和成纤维细胞(Fb)-胶原-猪脱细胞真皮基质(PADM)的组织工程皮肤,旨在为临床全层皮肤缺损的移植修复提供新的选择。

## 1 对象与方法

### 1.1 主要试剂及器材

乙酸、氢氧化钠、I 型牛胶原(美国 Sigma 公司), dispase II、胰蛋白酶、乙二醇四乙酸、DMEM 培养基、无血清表皮细胞培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。MCO-15AC 型超净工作台、YD-1320 型 CO<sub>2</sub>

培养箱(日本三洋公司),离心机(美国 Sigma 公司),MT-2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),H-800 型透射电镜(日本日立公司)。细胞培养板(美国 Corning 公司)、丝网架(笔者自制)。

### 1.2 Fb-胶原-PADM 活性真皮基质的制备

**1.2.1 人 Fb 的培养** 按常规方法培养人 Fb,取第 10 代备用。

**1.2.2 制备 PADM** 采用高渗盐水-氢氧化钠法制备 PADM<sup>[1]</sup>,以含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液浸泡 48 h。

**1.2.3 制备 I 型胶原凝胶** 在无菌条件下,用体积分数 0.1% 的乙酸溶液 4 ℃ 溶解 I 型牛胶原(终浓度为 4 g/L)。将溶解后的牛胶原加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,用 1 mol/L 的氢氧化钠调整 pH 值达 7.0 ~ 7.2。乙酸、胶原、DMEM 培养液体积比约为 8:1:1。

**1.2.4 活性真皮替代物的构建** 将 Fb 均匀接种于胶原凝胶中(5.0 × 10<sup>6</sup> 个/mL)。取该凝胶 0.2

基金项目:全军医学科学技术研究“十一五”计划专项课题(06Z054);首都医学发展科研基金(2005-2040);北京市科技计划研发攻关课题(H060920050830)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所(马忠锋现在秦皇岛市第一医院外科,066000)

通讯作者:柴家科,Email:cjk304@126.com,电话:010-66867972

mL,滴加于 PADM 表面使其均匀分布,以含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液常规培养(37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下)4 d,应用前改换无血清 DMEM 培养 24 h。

### 1.3 组织工程皮肤的培养

**1.3.1 人表皮细胞培养** 按常规方法培养人表皮细胞,传至第 3 代置液氮中冻存。

**1.3.2 组织工程皮肤培养** 取液氮冻存的人表皮细胞并复苏。将细胞以  $5 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 种植于活性真皮基质的胶原面,用无血清表皮细胞培养液培养,2 d 后改行气-液面培养(图 1),持续 8 d。

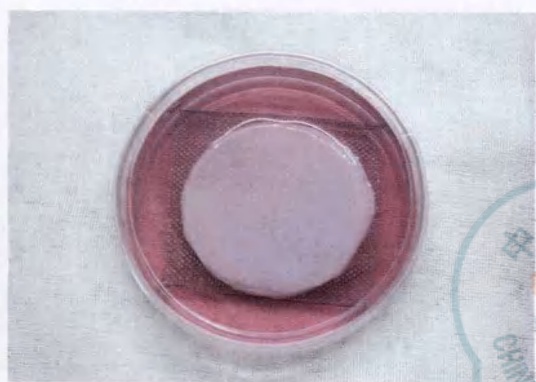


图 1 组织工程皮肤气-液面培养

### 1.4 组织学观察

将培养获取的组织工程皮肤分别固定后,于光学显微镜下(HE 染色)及透射电镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 光学显微镜观察

活性真皮基质培养 2 d 后见培养液颜色变黄,表明 Fb 成活,生长良好,真皮基质无细胞毒性。HE 染色显示,培养所获组织工程皮肤具有较薄的表皮层和较厚的真皮层,两层之间有基底膜样结构。

**表皮层:**大部分表皮具备基底层、棘层、颗粒层和角质层结构(图 2),未见透明层。基底层的细胞附着于基底膜上,多为矮柱状或立方状,胞核呈圆形。基底层上方可见数层棘细胞,呈多边形,体积较基底细胞大,胞间连接处可见明显的细胞间桥。典型部位的颗粒层由约 3~4 层梭形细胞组成,位于棘层上方,细胞核大部分已退化,细胞形态不规则,大小不等,胞质中含有较多颗粒。角质层较厚,细胞呈均质状,轮廓不清,个别部位存在角化珠。

**真皮层:**Fb 呈典型的梭形均匀分布于胶原内,细胞结构完整。真皮层厚度约为表皮层的 6~7 倍,只观察到 Fb,缺少毛囊、汗腺、毛细血管内皮细胞等

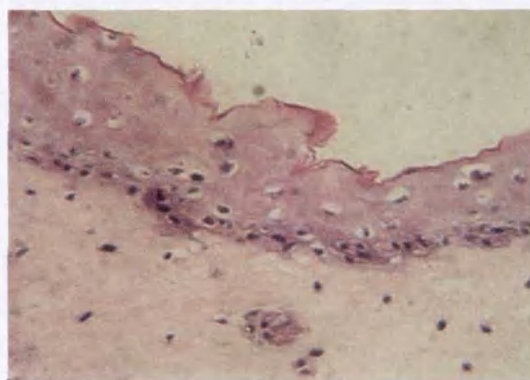


图 2 组织工程皮肤体外培养第 10 天,细胞分化良好,表皮层中可见基底层、棘层、颗粒层和角质层 HE × 200

结构。有些部位可见长短不等的上皮钉突,将表皮层和真皮层连接在一起,无真皮乳头层和网状层。

### 2.2 透射电镜观察

在基底层细胞、棘层细胞和颗粒层细胞之间均有桥粒连接(图 3)。角质层细胞胞质中有大量角蛋白丝,呈束状排列,形成张力纤维。

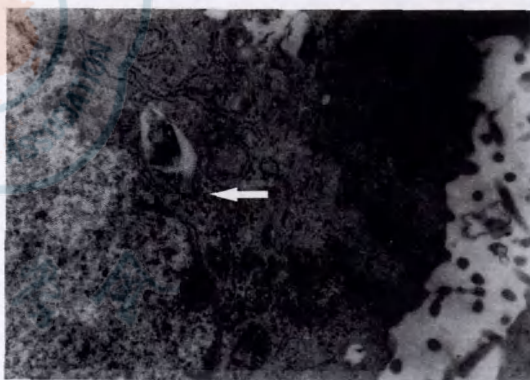


图 3 组织工程皮肤体外培养第 10 天的超微结构,细胞之间有桥粒连接(箭头所示) 透射电镜 × 5000

## 3 讨论

Apligraf(美国 Organogenesis 公司)是目前较常用的商品化组织工程皮肤,但其费用昂贵、抗胶原酶消化能力弱、抗感染能力差,应用于创面降解过快。国内也有以聚羟基乙酸、壳聚糖为基质构建组织工程皮肤的报道<sup>[2-3]</sup>,但均需作进一步的实验研究和临床验证。1995 年 Wainwright 首先将异体脱细胞真皮应用于临床。Herson 等<sup>[4]</sup>的研究表明,表皮细胞能很好地在人异体脱细胞真皮基质上生长。但异体脱细胞真皮存在价格较昂贵、来源有限、易传播疾病等不足,因此开展异种移植的组织工程皮肤研究极为必要。PADM 研制越来越受到关注<sup>[5]</sup>。

笔者将人 Fb 与胶原凝胶混悬,与 PADM 共同构建复合真皮基质,进而构建出组织工程皮肤。该技

术有以下优点:(1)复合真皮基质克服了细胞与基质黏附性较差这一问题,表皮细胞培养成功率大大提高。在 PADM 上直接种植表皮细胞,细胞与 PADM 黏附不够紧密,这可能与 PADM 制作过程中破坏了部分细胞外基质成分(表皮细胞与基质之间的锚着点,如IV型胶原、硫酸软骨素及纤维连接蛋白等)有关<sup>[6]</sup>,另外也与缺乏 Fb 对表皮细胞的诱导分化作用有关。(2)从功能角度考虑,胶原凝胶除了为细胞生长提供空间结构以外,也对细胞的生长、分化和迁移起重要调控作用,它可以结合细胞因子,调节其浓度和活性。胶原本身结构上又有生长因子的同源序列和黏附分子的结合位点,在细胞间信号转导中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。(3)单纯采用 I 型牛胶原作为 Fb 载体构建活性基质的过程中,胶原凝胶容易发生收缩,我们选择浓度比较高的胶原凝胶,使其和下方的 PADM 紧贴在一起,从而防止其收缩。(4)Fb 分泌的多种生长因子和细胞外基质可调节体外培养的表皮细胞间的相互作用,从而促进细胞增殖、迁移及成熟,在调节表皮细胞形态、细胞外基质的合成及基底膜形成方面起重要作用<sup>[8]</sup>。

参考文献

[1] 马忠锋,柴家科,杨红明,等.表皮细胞膜片与猪去细胞真皮基质复合的移植.中华实验外科杂志,2005,22(3):366-367.  
 [2] 杨光辉,崔磊,刘伟,等.利用聚羟基乙酸构建组织工程皮肤的实验研究.中华实验外科杂志,2003,20(11):984-985.  
 [3] 周余来,侯立中,马刚,等.壳多糖基质网架复层组织工程皮肤的移植研究.中国修复重建外科杂志,2003,17(2):117-121.  
 [4] Herson MR, Mathor MB, Altran S, et al. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. Artif Organs,2001,25(11):901-906.  
 [5] Srivastava A, DeSagun EZ, Jennings LJ, et al. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats. Ann Surg, 2001,233(3):400-408.  
 [6] Walter RJ, Matsuda T, Reyes HM, et al. Characterization of acellular dermal matrix (ADMs) prepared by two different methods. Burns,1998,24(2):104-113.  
 [7] Ehrlich HP, Gabbiani G, Meda P, et al. Cell coupling moderates the contraction of fibroblast-populated collagen lattice. J Cell Physiol,2000,184(1):86-92.  
 [8] El Ghalbzouri A, Jonkman MF, Dijkman R, et al. Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes. J Invest Dermatol,2005,124(1):79-86.

(收稿日期:2007-11-30)  
(本文编辑:罗勤)

· 书评 ·

《现代烧伤病理学》——值得关注的学术专著

杨宗城

临床医学的发展必须根植于基础医学。我国烧伤医学始于 20 世纪 50 年代,创建之初,便有诸多基础医学的专家参与其中,历经半个多世纪的努力,已取得举世瞩目的成就,在烧伤基础研究领域也取得不少丰硕成果。第三军医大学病理学教研室等单位的病理专家长期致力于烧伤病理学工作,不但全面、详尽地观察烧伤后机体病理形态学变化,而且开展实验病理研究,探讨烧伤发病机制,获得许多创新性成果,使我国烧伤病理的学术水平跻身世界先进行列。该单位陈意生教授等于 1993 年主编出版《烧伤病理学》,全面介绍了我国烧伤病理的成就。

20 世纪 90 年代后,我国烧伤病理又取得长足进展,特别在病理分子生物学领域,取得更快的发展。为此,陈意生、史景泉、程天民、郭乔楠教授又编写了这本《现代烧伤病理学》(北京:化学工业出版社,2008.),全书共 30 章,洋洋百万言,堪称巨著。内容既涵盖烧伤病理的基本内容,又展示了若干探索性创新成果,除重点介绍热力烧伤外,还对特殊原因烧

伤(吸入性损伤、核爆炸伤、电烧伤、化学烧伤)、烧伤感染、烧伤免疫、烧伤代谢等作了详细阐述,并且探讨了烧伤并发脏器损害的发病机制、创面愈合机制等。

《现代烧伤病理学》内容丰富,资料翔实,300 多幅精美照片或线条图基本是我国自己的资料,实属难能可贵,令人获益匪浅。该书阐述清晰,科学严谨,是一本不可多得的学术专著。不但能从中获得基本的烧伤病理信息,能为临床工作者提供不少诊疗原则与措施的形成依据,而且能为临床研究提供新的思路。此书不但有益于病理工作者,更是烧伤医学工作者需要阅读的参考书,从中定能得到启迪。此书的出版,将有助于推动我国烧伤医学的发展,也会提高我国烧伤学科的学术水平。

我认为《现代烧伤病理学》是一本值得关注的学术著作,特此向同道们推荐。

(收稿日期:2008-07-03)  
(本文编辑:王旭)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室