

# 组织工程皮肤的应用研究

罗奇志

目前,人们对人工活性皮肤替代物(细胞工程或组织工程人工皮肤)的研究已进行了约半个世纪。将表皮细胞培养于经辐照的鼠成纤维细胞(Fb)滋养层,是组织工程皮肤治疗大面积烧伤的里程碑<sup>[1]</sup>。由于培养基的改良与商品化,促使角质形成细胞的无血清层和无滋养层培养成功,结合早期切痂和应用临时皮肤覆盖物,无论多大面积的烧伤创面,理论上均可在伤后3~4周被覆盖,但现实情况距之甚远。目前临床应用的培养皮肤可分为三大类,单纯自体角质形成细胞<sup>[1,2]</sup>、基质复合皮和组织工程皮肤<sup>[3]</sup>。

## 1 单纯自体角质形成细胞

20世纪80年代初,各国就开始对单纯自体角质形成细胞复层皮片进行大量研究。英国 Genzyme Biosurgery 公司生产的 Epicell™(成分:培养自体角质形成细胞)是其中的代表。2004年钟展芳等<sup>[4]</sup>将人自体-异体表细胞混合培养后用于创面修复,为解决大面积烧伤患者自身皮源不足提供了新思路。但是该复层皮片的培养,有以下几点不足:(1)费用过高。如烧伤面积为88%TBSA患者的治疗费用达425 000欧元<sup>[5]</sup>。(2)皮片受皮率低,为15%~65%(平均50%)。(3)植皮后的最初几天皮片尚未定植,最易发生感染且程度严重。(4)由于培养皮片仅为几层细胞,自培养皿剥离至创面的过程中易破碎且难掌握。

为解决皮片受皮率的问题,研究者建立了多种移植法。角质形成细胞悬液移植法是其中一种,又称角质形成细胞播种技术。有学者将表皮细胞与血浆(血液)混合后对创面进行注射,创面虽可愈合但其下可能形成表皮囊<sup>[6]</sup>。表皮细胞与血浆混合用于角质形成细胞的培养,虽不能改变克隆形成率、生长率和细胞寿命,却明显提高了受皮率<sup>[7]</sup>。Horch等<sup>[8]</sup>应用该技术,伤后10d可获得足量角质形成细胞,治愈烧伤面积为88%TBSA的患者6例。若该技术与异体网状皮同时应用,可在1周内使创面上

皮化,即使在肘关节也有良好的机械稳定性。笔者认为,异体网状皮避免了移植后上皮细胞在生长过程中出现的干燥,同时其血管化有助于表皮细胞的营养,而真皮的留存改善了受皮部位的机械稳定性。

膜载培养皮片翻转移植法,又称角质形成细胞融合前移植术,可明显改善培养皮片易碎且难掌握的状况。角质形成细胞培养于聚亚胺酯或胶原网<sup>[9]</sup>上,单层细胞融合前翻转(细胞面向创基)移植于创面,省去了皮片移植所需细胞分化达复层化的时间,也不需用酶消化法行皮片剥离。将该技术结合早期切痂+异体皮覆盖创面,增强了培养皮片对创基的黏附作用,能成功地封闭创面<sup>[10]</sup>。翻转后的聚亚胺酯膜对细胞的分化与多层化起一定的保护作用。若将培养的角质形成细胞喷洒于创面,虽能保证细胞均匀且最大比例地分布,但临床结果不尽人意<sup>[11]</sup>。

## 2 基质复合皮

基质+角质形成细胞复合皮始于1981年<sup>[12]</sup>。使用胶原水化凝胶网作为角质形成细胞锚定的真皮替代物,其上种植角质形成细胞行悬浮培养,改善了培养皮的定植率。但在体实验时,这种具有复层化角质形成细胞、基质的复合皮却出现了明显挛缩,限制了临床应用。体外实验证明,凝胶的收缩是由植入的Fb收缩引起,其收缩强度与Fb数量、胶原浓度、凝胶内细胞种群的收缩特性相关。通过改进,部分这类复合皮被商品化,如DERMAGRAFT®是成功的组织工程真皮,由Fb、细胞外基质和生物可吸收支架(成分为聚乳糖)组成。其Fb来源于新生儿包皮组织,接种于生物可吸收支架后增殖并填充支架间隙,不断分泌人真皮胶原、基质蛋白、生长因子和细胞因子,建成含有代谢活性和活细胞的三维人真皮替代物。其他的真皮替代物与DERMAGRAFT®相类似,主要差别在于基质和Fb的自体或异体来源。

20世纪80年代研制的Integra人工皮(美国Integra Lifescience公司),是目前Ⅲ度烧伤创面切痂后较为理想的创面覆盖物。它的内层由牛胶原纤维及6-硫酸软骨素氨基葡聚糖构成,厚度为2mm,具有微孔(直径为70~200μm);外层由聚有机硅氧烷

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

多聚化合物(厚度为 0.23 mm)构成,具有蒸发通透特性,能刺激正常上皮生长,在移植后 2~3 周可用自体刃厚皮或培养皮取代,最终使创面达永久性修复<sup>[13]</sup>。有学者应用 Integra 人工皮结合网状皮,成功地救治 1 例烧伤面积达 76% TBSA 的患者,Integra 的应用面积达体表面积的 60%<sup>[14]</sup>。

基质改进的目的在于提高角质形成细胞的定植率、缩短真皮层的血管化时间和减轻移植皮片收缩<sup>[15]</sup>。可作为细胞基质的材料很多。一类是以真皮基质成分为基础材料与其他材料交联,如胶原及胶原与氨基葡聚糖交联膜、胶原与氨基葡聚糖和壳聚糖交联膜、胶原与血纤维蛋白混合基质<sup>[16]</sup>、胶原与弹性蛋白混合基质<sup>[17]</sup>等。其中胃蛋白酶降解蛋壳膜蛋白与胶原酶交联膜<sup>[18]</sup>,是通过胃蛋白酶降解甲酸氧化蛋壳蛋白,应用水溶性碳化二亚胺与胶原蛋白相交联,其稳定性、弹性、韧性、变性温度较单纯的胶原酶更优。此外有以透明质酸和纤维蛋白为基础材料的基质<sup>[19,20]</sup>;也有将聚乳酸-乙醇酸共聚物与胶原透明质酸膜双层复合的基质,用以降低植皮收缩率,而应用最广泛的是胶原与氨基葡聚糖膜。另一类基质是脱细胞异体(种)真皮<sup>[21,22]</sup>,甚至尝试利用它培养 Fb 产生基质支架<sup>[23]</sup>。其特点是保留了真皮乳头和网状层的支架结构,由于基膜结构的存在使角质形成细胞的定植率明显提高,对上皮细胞黏附、复层化、生长和分化有利,其原因可能是 IV 型胶原和层粘连蛋白促进角质形成细胞的黏附和分化,同时完全可吸收材料减少了异物性感染率。

1996 年王旭等<sup>[24]</sup>将人的表皮细胞与 Fb 直接种植在胶原膜的两面,经培养形成 Fb 胶原膜复合皮作为皮肤替代物试用于烧伤创面。随后又产生了与可形成微血管状结构的脐静脉内皮细胞共同培养的内皮化人工皮肤<sup>[25]</sup>,以及带有色素细胞的仿真人工皮肤<sup>[26]</sup>。本文将这种体外培养得到的由多种细胞和基质构成,有表皮、真皮结构,有生长能力的组织称组织工程皮肤。代表产品是摩洛哥 Organogenesis 公司的 Apligraf,由胶原明胶、异体 Fb、异体角质形成细胞构成。它具有与正常皮肤相同的真皮、表皮组织结构,但真皮与皮下组织交界、表皮与真皮交界均缺乏钉突或锯齿样结构。组织工程皮肤的物理强度虽比单独的表皮细胞膜片或“真皮”膜强,但仍比中厚皮片差。因此移植后需将其和覆盖的敷料一并与创缘缝合,以使移植植物能稳妥地固定在创面上。在植皮创面的要求、术后处理方面,它与移植单纯培养表皮细胞膜片相同。术后 10 d 左右,表皮细胞各

层分化良好,表层已明显角质化,部分已开始有脱屑现象;“真皮”内已有毛细血管生长及 Fb 等结缔组织长入。术后 4 周,皮肤表面柔软光滑,表皮、真皮界面已开始形成表皮钉突,但无皮肤附件。工程皮肤(异体)只起着暂时覆盖的作用<sup>[27]</sup>,其组织染色体和 PCR 鉴定证明,移植后 1 个月患者尚存异源 DNA,2 个月未见异源 DNA。

应用组织工程皮肤治疗 45 例烧伤患儿[Ⅲ度烧伤面积达(64±3)% TBSA]的部分创面,患者中 40%的Ⅲ度创面以传统的网状断层皮治疗,其中 12 例完成了 1 年的观察。入院时取培养皮标本,分离出角质形成细胞、Fb 后进行培养,达一定数量后 Fb 先种入组织工程皮肤(胶原黏多糖网),18 h 后其上再种植角质形成细胞。培养 2 d 后将皮肤于气液交界面培养,10~14 d 使单张面积达 150 cm<sup>2</sup>,以 1.5:1.0 的比例拉网移植。术后 14、18 d 的创面封闭率分别为(89.2±2.5)%、(95.4±1.8)%,与网状断层皮[(94.9±3.6)%、(99.0±0.8)%]比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),组织工程皮肤的扩增比例为(67±16):1。创面愈合 1 年后产生的红斑、水泡和瘢痕状况与传统网状断层皮治疗效果无差异,出现真皮乳头状突起,皮肤弹性良好<sup>[28]</sup>。

有学者在 4 例患者切痂后的创面上,移植组织工程皮肤(胶原-硫酸软骨素制成的基质网架,两面分别培养表皮细胞和 Fb),Fb 侧直接覆盖创面。术后 9 d,表皮细胞已分化完全,角质化良好,表皮下仍可见人工真皮的胶原结构,开始形成新生的真皮组织,大量血管的形成支持表皮生长,可见 Fb;4 周后创面基本愈合。术后 26 d,表皮-真皮界面已形成类似正常皮肤表皮钉突的结构,增强了表皮的愈合强度,皮肤愈合部位柔软、相对平滑,有较好的耐剪切力;单纯表皮细胞移植的早期,创面只有平坦的表皮基层。从超微结构看,术后 9 d 就形成了连续的致密层和产生大量的半桥粒,不同于单纯表皮细胞的移植和分次移植组织工程皮肤,且能早期形成与表皮贴附密切相关的锚状细丝。2004 年杨军等<sup>[29]</sup>将患者少量自体正常皮肤分离培养后,接种于壳聚糖-明胶膜构建的组织工程膜片,并移植于增生性瘢痕创面。术后 90 d 随访,见表皮膜成活良好,细胞分化正常,基膜完整。

### 3 展望

不同组织来源的多能性细胞对组织工程是一个挑战<sup>[30]</sup>。早期胚胎起源的多潜能成人体细胞,在适

当的实验条件或生物条件下可转化为任何组织细胞<sup>[31]</sup>。一旦诱导多能性细胞向角质形成细胞分化的技术被解决,就可能治愈 100% TBSA 的深度烧伤。表皮的基底细胞是表皮细胞再生的来源,被称为类成人干细胞。有学者将表皮基底细胞的干细胞样潜能以全克隆和亚克隆的形式表现出来,认为复层鳞状上皮细胞的增殖是干细胞和短暂倍增细胞扩增的结果<sup>[32]</sup>。通过表皮细胞与 IV 型胶原 10 min 黏附筛选表皮干细胞的方法,能快速培养和增殖表皮细胞<sup>[33]</sup>。但目前的培养方法与大量扩增并达临床应用要求仍有一段距离。随着干细胞诱导技术的改进,设想通过干细胞的持续扩增,将能成功构建具有各种组织相容性抗原或无组织免疫原性的组织工程皮肤。

#### 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] DeLuca M, Albanese E, Bondanza S, et al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns*, 1989, 15(5): 303 - 309.
- [3] Bannasch H, Kontny U, Kruger M, et al. A semisynthetic bilaminar skin substitute used to treat pediatric full-body toxic epidermal necrolysis; wraparound technique in a 17-month-old girl. *Arch Dermatol*, 2004, 140(2): 160 - 162.
- [4] 钟展芳, 朱家源, 朱斌, 等. 人自体-异体表细胞混合培养及临床应用. *广州医学院学报*, 2004, 32(1): 49 - 51.
- [5] Horch RE, Stark GB. Economy of skin grafting in burns. *Hospital-J Eur Assoc Hosp Man*, 2001, 3: 6 - 9.
- [6] Marston WA. Dermagraft, a bioengineered human dermal equivalent for the treatment of chronic nonhealing diabetic foot ulcer. *Expert Rev Med Devices*, 2004, 1(1): 21 - 31.
- [7] Altmepfen J, Hansen E, Bonnlander GL, et al. Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res*, 2004, 117(2): 202 - 207.
- [8] Horch RE, Stark GB, Kopp J, et al. Cologne Burn Centre experiences with glycerol-preserved allogeneic skin: Part I: clinical experiences and histological findings (overgraft and sandwich technique). *Burns*, 1994, 20 Suppl 1: S23 - 26.
- [9] 马刚, 杨同书, 颜炜群, 等. 复合培养人工皮肤的制备. *中华皮肤科杂志*, 1998, 31(2): 121 - 122.
- [10] Johnsen S, Ermuth T, Tanczos E, et al. Treatment of therapy-refractive ulcers cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. *Vasa*, 2005, 34(1): 25 - 29.
- [11] Fraulin FO, Bahoric A, Harrop AR, et al. Autotransplantation of epithelial cells in the pig via an aerosol vehicle. *J Burn Care Rehabil*, 1998, 19(4): 337 - 345.
- [12] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301 - 316.
- [13] Hafez AT, Bagli DJ, Bahoric A, et al. Aerosol transfer of bladder urothelial and smooth muscle cells onto demucosalized colonic segments: a pilot study. *J Urol*, 2003, 169(6): 2316 - 2319.
- [14] Wissner D, Steffes J. Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. *Burns*, 2003, 29(4): 375 - 380.
- [15] Ng KW, Huttmacher DW. Reduced contraction of skin equivalent engineered using cell sheets cultured in 3D matrices. *Biomaterials*, 2006, 27(26): 4591 - 4598.
- [16] Lam PK, Chan ES, Liew CT, et al. The efficacy of collagen dermis membrane and fibrin on cultured epidermal graft using an athymic mouse model. *Ann Plast Surg*, 1999, 43(5): 523 - 528.
- [17] Hafemann B, Ensslen S, Erdmann C, et al. Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns*, 1999, 25(5): 373 - 384.
- [18] Ino T, Hattori M, Yoshida T, et al. Improved physical and biochemical features of a collagen membrane by conjugating with soluble egg shell membrane protein. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(4): 865 - 873.
- [19] Liu H, Mao J, Yao K, et al. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15(1): 25 - 40.
- [20] Wang TW, Wu HC, Huang YC, et al. Biomimetic bilayered gelatin-chondroitin 6 sulfate-hyaluronic acid biopolymer as a scaffold for skin equivalent tissue engineering. *Artif Organs*, 2006, 30(3): 141 - 149.
- [21] Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns*, 2004, 30(4): 322 - 328.
- [22] 姜笃银, 陈璧, 汤朝武, 等. 复合皮肤移植实验猪动物模型的建立. *第四军医大学学报*, 1996, 17(6): 452 - 454.
- [23] Lee DY, Lee JH, Yang JM, et al. A new dermal equivalent: the use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials. *J Dermatol Sci*, 2006, 43(2): 95 - 104.
- [24] 王旭, 吴军, 王甲汉, 等. 复合皮覆盖烧伤创面的实验研究. *第三军医大学学报*, 1996, 18(3): 191 - 194.
- [25] Tonello C, Vindigni V, Zavan B, et al. In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds. *FASEB J*, 2005, 19(11): 1546 - 1548.
- [26] Nakazawa K, Nakazawa H, Sahuc F, et al. Pigmented human skin equivalent new method of reconstitution by grafting epithelial sheet onto a non-contractile dermal equivalent. *Pigment Cell Res*, 1997, 10(6): 382 - 390.
- [27] Griffiths M, Ojeh N, Livingstone R, et al. Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng*, 2004, 10(7/8): 1180 - 1195.
- [28] Boyce ST, Kagan RJ, Yakuboff KP, et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. *Ann Surg*, 2002, 235(2): 269 - 279.
- [29] 杨军, 杨光辉, 刘伟, 等. 组织工程化表皮膜片的构建及其在增殖性疤痕治疗中的作用. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(4): 295 - 297.
- [30] Chivu M, Diaconu CC, Brasoveanu L, et al. Ex vivo differentiation of umbilical cord blood progenitor cells in the presence of placental conditioned medium. *J Cell Mol Med*, 2002, 6(4): 609 - 620.
- [31] Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med*, 2003, 349(3): 267 - 274.
- [32] Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, et al. A two-stage, p16 (INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(14): 5157 - 5172.
- [33] Hu K, Dai Y, Hu Q, et al. An experimental study on the repair of full skin loss of nude mice with composite graft of epidermal stem cells. *Burns*, 2006, 32(4): 416 - 422.

(收稿日期: 2006-07-25)

(本文编辑: 莫愚)