

· 论著 ·

体外构建皮肤基底膜的组织学特征

鲁元刚 伍津津 张教扬 杨桂红 杨涛



【摘要】 目的 观察制备的组织工程皮肤基底膜的组织学特征。方法 取门诊正常儿童包皮环切术之包皮,采用胰蛋白酶胶原酶顺序消化得到角质形成细胞(KC)和成纤维细胞(Fb)悬液。制备复方壳多糖组织工程皮肤,浸没培养 3 d 后,继续行气液界面培养。将培养 7、10、15 d 的复方壳多糖组织工程皮肤用中性甲醛溶液固定后石蜡包埋、切片,行 HE 及高碘酸-雪夫(PAS)染色,并用免疫组织化学染色法观察基底膜的重要成分:IV 型胶原、VII 型胶原及层黏连蛋白(LN)的存在情况。结果 HE 染色可见培养的组织工程皮肤表皮结构分化良好,大致可分为基底层、棘层和角质层,各层均有数量不等的扁平梭形细胞。PAS 染色显示真皮表皮间有一均匀红染的条带。免疫组织化学染色结果显示,IV 型胶原、VII 型胶原及 LN 呈阳性表达。结论 复方壳多糖组织工程皮肤基底膜构建良好。

【关键词】 壳多糖; 组织工程; 皮肤,人工; 基底膜

Histologic characteristics of in vitro constructed skin basement membrane LU Yuan-gang, WU Jin-jin, ZHANG Jiao-yang, YANG Gui-hong, YANG Tao. Department of Dermatology, Daping Hospital, Field Surgery Institute, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China
Corresponding author: WU Jin-jin, Email: wjjj@163.com, Tel: 023-68757816

【Abstract】 **Objective** To observe the histological characteristics of constructed basement membrane in tissue-engineered skin. **Methods** Forskins from circumcission in normal children were obtained with informed consent of the parents, and then the epidermal keratinocytes (KC) and dermal fibroblasts (Fb) were isolated with trypsin and collagenase D digestion in sequence. Tissue engineered skin with composite chitosan was maintained in a submerged state for 3 days, and then at the air-liquid interface. The tissue-engineered skins were fixed in neutral formalin and then embedded in paraffin after culture for 7, 10 and 15 days, respectively for immunohistological examination of the basement membrane component, including the condition of collagen type IV (COL-IV), collagen type VII (COL-VII), and laminin (LN). **Results** HE staining showed that the keratinocytes formed a fine stratified squamous epithelium with the presence of basal, spinous, granular and corneous cell layers, and there was various amount of cells in flat and fusiform shape in each layer. It was found that a regular red staining strip situated at the dermal epidermal junction. Positive staining of collagen IV, collagen VII as well as LN was observed by immunohistological examination. **Conclusion** The results suggest that the composite chitosan tissue engineered skin has a good prospect for clinical use because it presents a perfect reconstruction of basement membrane.

【Key words】 Chitin; Tissue engineering; Skin, artificial; Basilar membrane

人工皮肤一直是组织工程中研究最早、进展最快的领域,也是目前通过美国食品和药物管理局严格验证,正式批准用于临床的组织工程器官之一^[1]。但是表、真皮易于分离是目前许多双层组织工程皮肤的重要缺陷,其原因是二者之间没有构建完整的基底膜。在以往的研究中,构建体外组织工程皮肤最多能形成断续的基底膜,且此种基底膜发育不成熟^[2,3],不能提供足够的结合力。笔者前期研究中制备的组织工程皮肤,在促进家兔皮肤溃疡愈合的早

期实验中取得了满意效果^[4]。为此笔者在基底膜的构建上进行了深入研究,以期在组织学特征方面取得新的进展。

1 对象与方法

1.1 主要试剂及来源

角质形成细胞(KC)培养基 DMEM(美国 Gibco 公司),N-2-羟基哌嗪乙磺酸(HEPES,美国 Sigma 公司),小牛血清(兰州民海生物工程有限公司),表皮生长因子(EGF,美国 Sigma 公司),壳多糖、硫酸软骨素、透明质酸、弹性蛋白、层黏连蛋白(LN)、IV 型胶原单克隆抗体(美国 Sigma 公司),VII 型胶原单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),LN 单克隆抗体(福州迈新生物技术有限公司)。

基金项目:国家高技术研究发展计划(2003AA205022);重庆市科技计划项目(7897)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科

通讯作者:伍津津,Email:wjjj@163.com,电话:023-68757816

1.2 方法

1.2.1 KC 和成纤维细胞(Fb)的制备 按文献[5]方法提取鼠尾胶原。取笔者单位门诊正常儿童包皮环切术之包皮(家属均知情同意),采用胰蛋白酶胶原酶顺序消化得到 KC 和 Fb 悬液。

1.2.2 复方壳多糖组织工程皮肤制备 在冰浴条件下按比例混匀醋酸鼠尾胶原、壳多糖、硫酸软骨素、透明质酸、弹性蛋白及 DMEM 培养基,调节 pH 值为 7.2~7.4,加入 Fb,混匀后加入 12 孔培养板中。待形成凝胶后,加入 KC 悬液,最后再加入 KC 培养液 20 ml,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱内培养,每天换液 1 次。在浸没培养 3 d 后,将培养物置于不锈钢筛网上进行气-液界面三维培养。培养 7 d 后,加入 LN 5 μg/ml。

1.2.3 检测指标 将培养 7、10、15 d 的复方壳多糖组织工程皮肤用中性甲醛溶液固定 24 h 以上,常规脱水、浸蜡、石蜡包埋,切片后行 HE 及高碘酸-雪夫(PAS)染色,并进行免疫组织化学检查:IV 型胶原单克隆抗体(工作液)、VII 型胶原单克隆抗体(1:200)、LN 单克隆抗体(工作液),二氨基联苯胺显色。

2 结果

2.1 HE 及 PAS 染色

HE 染色可见培养的组织工程皮肤表皮结构分化良好,大致分为基底层、棘层和角质层,各层均有数量不等的扁平梭形细胞。随着培养时间的延长,组织工程皮肤的成熟程度及表皮厚度增加,结构更加致密,并有表皮突起伸向真皮,基底层 KC 排列规则(图 1)。PAS 染色见真皮部分 Fb 呈梭形平行排列,分布有序。培养 7 d 后的组织工程皮肤表、真皮交界处均可见一条带状结构,PAS 染色阳性(图 2)。

2.2 免疫组织化学染色

IV 型胶原检查见真、表皮连接处可见 IV 型胶原

单克隆抗体的免疫组织化学阳性染色,阳性部位与基底膜结构的位置一致(图 3)。VII 型胶原检查见表皮下方为免疫组织化学染色阳性结果(图 4)。培养 15 d 的组织工程皮肤真、表皮连接处 LN 的免疫组织化学染色呈阳性(图 5)。

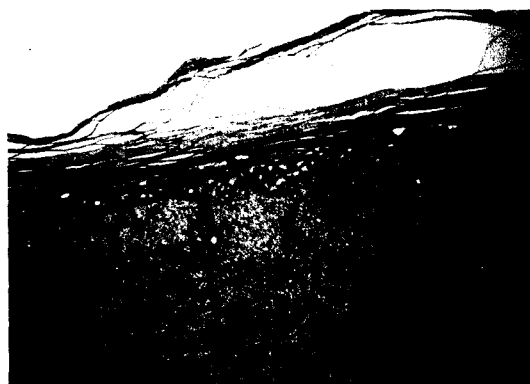


图 1 培养 15 d 的组织工程皮肤表皮增厚且结构分化良好 HE × 200



图 2 培养 7 d 的组织工程皮肤表、真皮间有一连续的紫红色带状结构 高碘酸-雪夫 × 200

3 讨论

皮肤基底膜是位于表皮与真皮之间的一条厚约 0.5~1.0 μm 的重要结构,最主要功能是紧密连接表皮与真皮,为表皮和真皮提供有力的结合;另一个显著作用是确定表皮细胞的极性,提供表皮移行的



图 3 培养 7 d 的组织工程皮肤在表、真皮间有 IV 型胶原阳性染色条带 二氨基联苯胺(DAB) × 200 图 4 培养 7 d 的组织工程皮肤在表、真皮间呈现 VII 型胶原阳性染色 DAB × 200 图 5 培养 15 d 的组织工程皮肤在表、真皮间出现层黏连蛋白阳性染色 DAB × 200

屏障。在正常环境中,基底膜可抑制表皮细胞与真皮的直接接触。此外,还具有渗透和屏障等作用,在保持皮肤的完整性中极其重要。皮肤基底膜带主要由Ⅳ型、Ⅶ型和ⅩⅦ型胶原,Ⅰ型(LN-5、6、10)、巢蛋白、整合素、血小板溶素家族(网格蛋白,大疱性类天疱疮抗原 1)和基底膜蛋白多糖等多种成分组成。其中Ⅳ型胶原形成的一级网络和Ⅰ型形成的二级网络之间通过巢蛋白、网格蛋白等分子的桥联作用^[6],共同维持基底膜结构的完整性,更加紧密地连接表、真皮成分,为发挥多种生物学功能奠定坚实的组织学基础^[7,8]。

虽然组织工程皮肤的研究已经取得了许多突破性进展,从最初单纯的表皮片到真皮结构的皮肤替代物,再到具有表、真皮双层结构的组织工程皮肤,已经越来越接近人体的皮肤结构^[9]。但迄今为止所有的组织工程皮肤仍不同程度地存在一些缺陷,如皮肤附属器的缺乏、临床操作不便等,尤其是表、真皮耐摩擦性差,表皮易与下方的真皮部分分离,更是不可忽视的问题^[10]。

我们研究制备的复方壳多糖组织工程皮肤 HE 染色呈明显的表、真皮双层结构^[2,9],是体外构建基底膜结构的理想平台。改变体外培养的环境因素,就有可能促进表、真皮间产生连续的基底膜结构,从而达到提高组织工程皮肤生物学性能的目的,更真实地模拟皮肤在体情况,为皮肤的功能学研究提供更优良的技术平台。

本研究在器官型培养系统中加入外源性 LN,结果显示,获得的组织工程皮肤表皮生长良好,有明显的表皮突起伸向真皮内,PAS 染色在真、表皮间呈现一条连续的紫红色条带,说明组织工程皮肤能在体外完整地构建基底膜结构。外源性的 LN 作为细胞外基质,有可能参与了表、真皮细胞间相互作用过程中的信号传递,促进基底膜结构的构建。通过免疫组织化学染色,我们还观察到在真、表皮连接处确实存在Ⅳ型胶原、Ⅶ型胶原及 LN 等大分子物质,说明加入外源性 LN,可促使更多的大分子复合体在表、真皮之间形成,从而构建更有效的连接网络。而免

疫组织化学染色阳性区域呈局限性分布,一定程度上也反映了组织工程皮肤基底膜构建过程中分子间作用的选择性。即使加入外源性 LN,也只能与表、真皮间的Ⅳ型和Ⅶ型胶原特异性结合,而不会与位于真皮区的Ⅰ型胶原结合。这与文献^[11]报道的结果一致,也说明我们构建的基底膜结构在位置分布上具有明显的特异性。本实验结果提示,复方壳多糖组织工程皮肤在培养 7 d 后加入外源性 LN,可明显促进表皮基底膜的体外构建,对于进一步提高组织工程皮肤的质量具有重要意义,也为体外研究基底膜的生物学功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Hansbrough JF, Franco ES. Skin replacements. *Clin Plast Surg*, 1998, 25(3):407-423.
- [2] 鲁元刚,伍津津,朱堂友,等.复合壳多糖人工皮肤组织学特征研究. *中国临床康复*, 2002, 6(4):518-519.
- [3] Nolte CJ, Oleson MA, Hansbrough JE, et al. Ultrastructural features of composite skin cultures grafted onto athymic mice. *J Anat*, 1994, 185(2):325-333.
- [4] 鲁元刚,伍津津,朱堂友,等.复合壳多糖人工皮肤修复家兔全层皮肤缺损的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2002, 18(1):19-22.
- [5] 朱堂友,伍津津,胡浪,等.壳多糖-胶原-糖胺聚糖凝胶人工皮肤的初步研究. *中国修复重建外科杂志*, 2003, 17(2):113-116.
- [6] Tsunenaga M, Adachi E, Amano S, et al. Laminin 5 can promote assembly of the lamina densa in the skin equivalent model. *Matrix Biol*, 1998, 17(8/9):603-613.
- [7] Kuwano A, Ueno T, Katayama Y, et al. Unilateral basement membrane zone alteration of the regenerated lamellar region in equine chronic laminitis. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(7):685-691.
- [8] Bekou V, Thoma-Uszynski S, Wendler O, et al. Detection of laminin 5-specific auto-antibodies in mucous membrane and bullous pemphigoid sera by ELISA. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(4):732-740.
- [9] 周宏祁,谭谦.皮肤组织工程学研究进展. *中华烧伤杂志*, 2001, 17(1):56-59.
- [10] Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, et al. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin Dermatol*, 2001, 19(5):551-562.
- [11] Baker SE, DiPasquale AP, Stock EL, et al. Morphogenetic effects of soluble laminin-5 on cultured epithelial cells and tissue explants. *Exp Cell Res*, 1996, 228(2):262-270.

(收稿日期:2006-10-22)

(本文编辑:张红)

读者·作者·编者

关于刊登作者照片的补充声明

为进一步丰富学术交流方式,本刊自 2006 年第 1 期起在“专家论坛、专家述评、论著”栏目中已刊登第一作者照片。部队从 2007 年 8 月 1 日起陆续换穿 07 式军装,请第一作者系军人者提供给编辑部的照片须着 07 式军装。

中华烧伤杂志编辑部