

# 血管内皮细胞和成纤维细胞混合移植对人工真皮血管化的影响

陈欣 副岛一孝 野崎翰弘



**【摘要】** 目的 观察同种血管内皮细胞和成纤维细胞移植对人工真皮血管化的促进作用。

**方法** 在 27 只 Wistar 大鼠背部造成 2.5 cm × 2.5 cm 全层皮肤缺损创面(2 处/只),将其分为血管内皮细胞组:将血管内皮细胞混入 0.5 ml 纤维蛋白胶中,按  $1.0 \times 10^5/cm^2$  的密度均匀喷洒于移植床;混合组:将血管内皮细胞和成纤维细胞混入等量纤维蛋白胶后,同前密度喷洒于移植床;对照组:按同样方法喷洒等量纤维蛋白胶。随后各组移植人工真皮,每组 9 只大鼠 18 处创面。于移植后 5、10 d 切取移植的真皮及周围组织行 HE、血管内皮生长因子(VEGF)、Masson 和墨汁灌注染色,观察新生血管生长情况。于移植后 5 d 行伊文思灌注,以分光光度计定量检测测定微血管形成情况。 **结果** 移植后 5 d, HE、VEGF、Masson 和墨汁灌注染色均可见各组移植床有新生血管长入。HE 染色见血管内皮细胞组、混合组新生血管数量分别为  $(14.2 \pm 3.6)$ 、 $(12.1 \pm 2.5)$  条,较对照组  $[(3.9 \pm 1.6)$  条] 明显增多 ( $P < 0.05$ )。移植后 10 d, 人工真皮内及移植床均有微血管形成,且胶原组织的合成增加。移植后 5 d, 经伊文思灌注,收集并检测血管内皮细胞组、混合组真皮组织溶出的上清液,吸光度值分别为  $0.167 \pm 0.058$ 、 $0.155 \pm 0.046$ , 均高于对照组的  $0.066 \pm 0.024$  ( $P < 0.05$ )。 **结论** 同种血管内皮细胞和成纤维细胞移植可促进创面愈合过程中的血管新生,加速人工真皮移植后血管化过程,促进类真皮组织的成熟。

**【关键词】** 内皮细胞; 成纤维细胞; 胶原; 皮肤,人工; 新生血管化

**Influence of mixed grafting of vascular endothelial cells and fibroblasts on the angiogenesis of artificial dermis**  
CHEN Xin\*, Soejima Kazutaka, Nozaki Motohiro. \*Department of Burns, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, P. R. China

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the effects of mixed grafting of vascular endothelial cells and fibroblasts on the angiogenesis of artificial dermis. **Methods** Full-thickness skin defects with the size of 2.5 cm × 2.5 cm were made on the back of 27 Wistar rats, and they were randomized into endothelium group (cultured vascular endothelial cells were mixed into 0.5 ml fibrin glue, and evenly sprayed onto wound bed in density of  $1.0 \times 10^5/cm^2$  before artificial dermis grafting), mixed grafting group (cultured vascular endothelial cells and fibroblasts were mixed into 0.5 ml fibrin glue, and evenly sprayed onto wound bed in density of  $1.0 \times 10^5/cm^2$  before artificial dermis grafting), and control group (with spraying of equal amount of fibrin glue on the wound bed). Each group consisted of 9 rats and 18 wounds. On 5 and 10 post-grafting day (PGD), the grafts and surrounding tissue were harvested for the observation of neo-vascular growth with HE staining, VEGF antibody staining, Masson's trichrome staining and India ink staining. Evans blue perfusion method was also used to measure the angiogenesis of micro-vascular vessels on 5 PGD. **Results** The growth of new vessels was observed in each group on 5 PGD with HE staining, VEGF antibody staining, Masson's trichrome staining and India ink staining. Under high power field, the number of new vessels in endothelium and mixed grafting groups was  $(14.2 \pm 3.6)$  and  $(12.1 \pm 2.5)$ , which were obviously higher than that in control group  $(3.9 \pm 1.6, P < 0.05)$ . On 10 PGD, angiogenesis and increased synthesis of collagen tissue were observed in both wound bed and artificial dermis. On 5 PGD, the amount of absorbed Evans blue extracted from the grafted dermis in endothelium group  $(0.167 \pm 0.058)$  and mixed grafting group  $(0.155 \pm 0.046)$  was significantly higher than that in control group  $(0.066 \pm 0.024, P < 0.05)$ . **Conclusion** Mixed grafting of homogenous vascular endothelial cells and fibroblasts is beneficial for the promotion of neovascularization, acceleration of angiogenesis and maturation of artificial dermis during the wound healing process.

**【Key words】** Endothelial cells; Fibroblasts; Collagen; Skin, artificial; Neovascularization

血管内皮细胞和成纤维细胞可分泌多种参与创面愈合调控的生长因子,加速新生血管和肉芽组织的形成,如血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性

作者单位:100035 北京,积水潭医院烧伤科(陈欣);日本东京 女子医科大学形成外科(副岛一孝、野崎翰弘)

生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF) $\beta$ 和成纤维细胞生长因子(FGF)2等<sup>[1,2]</sup>。含有胶原网状结构模板的人工真皮移植后,成纤维细胞和血管内皮细胞向网状结构内的侵入是胶原模板中类真皮组织形成过程中关键的一步。为了更深入地研究,笔者在以往工作<sup>[3]</sup>的基础上,以相同的动物模型,进一步观察了同种血管内皮细胞单独和混合成纤维细胞移植对这一过程的影响。

## 材料与方 法

### 一、血管内皮细胞和成纤维细胞的采集和培养

无菌条件下取 1 只 10 周龄 Wistar 雄性大鼠(日本医科学动物株式会社)胸主动脉和背部皮肤。将所采集血管的所有分支结扎并翻转暴露内膜,两端用小夹固定,随后静置于 EGM-UV 培养液(日本 Kurabou 公司)中培养血管内皮细胞。将采集的皮肤用 dispase 酶处理后,剪成小片置于 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司)中培养成纤维细胞。两种细胞分别加入体积分数 10% 的小牛血清(美国 Gibco 公司),在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 2 周。经培养 4 代,细胞数量达  $1.0 \times 10^5$ /ml 后,加入体积分数 10% 甘油防冻液, -150℃ 保存。

### 二、移植实验

12 周龄 Wistar 雄性大鼠(来源同上) 27 只,体重 300~350 g, 苯巴比妥腹腔注射麻醉(50 mg/kg), 背部剃毛, 无菌条件下于大鼠背部脊柱两侧各切除全层皮肤至深筋膜, 制成 2.5 cm × 2.5 cm 缺损创面, 分别移植相同面积的人工真皮(日本 Terumo 公司), 尼龙线缝合固定, 无菌敷料包扎。于移植人工真皮前将大鼠分为(1)血管内皮细胞组:取 0.5 ml 血管内皮细胞混入纤维蛋白胶(日本 Aventis Behring 公司)中,按  $1.0 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> 的密度均匀喷洒于移植床;(2)混合组:将血管内皮细胞和成纤维细胞混入等量纤维蛋白胶中,密度同前喷洒创面;(3)对照组:按同样方法喷洒等量纤维蛋白胶。每组 9 只大鼠 18 处创面。

### 三、检测指标

1. 组织病理学观察:于移植后 5、10 d 每组各取 3 只大鼠(6 处创面),切取移植真皮及周围组织制成病理切片标本,分别行 HE、VEGF 和 Masson 染色。于移植后 5 d 每组各取 1 只大鼠(2 处创面)行组织墨汁灌注染色:大鼠麻醉后处死,行胸主动脉和肝静脉插管,将 2 ml 肝素加入等渗盐水 500 ml 中,在 100 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)压力下灌注循环系

统,自胸主动脉插管注入墨汁 50 ml,体积分数 10% 甲醛固定 24 h,切取移植真皮及周围组织制成病理切片标本。在高倍视野显微镜下随机选取与真皮海绵紧贴的移植床 5 个区域(每个区域相当于  $1.0 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup> 组织),观察移植后 5 d HE 染色、墨汁灌注染色所示新生血管数量及 VEGF 染色阳性细胞数量。

2. 伊文思蓝灌注:移植后 5 d 每组各取 2 只大鼠,麻醉后自股静脉注入伊文思蓝溶液(20 mg/kg),30 min 后处死,切取移植的人工真皮,除去周围粘连组织,放入 5 ml 体积分数 40% 丙酮中,50℃ 振荡溶解 24 h。溶解液经离心半径 8.8 cm,3 000 r/min 离心 30 min,回收上清液,用分光光度计(日本 Spectroscopic 公司)在波长 620 nm 下检测上清液吸光度值。

### 四、统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,采用配对 *t* 检验。

## 结 果

1. HE 染色:移植后 5 d,各组人工真皮内及移植床底均有明显的细胞浸润,人工真皮内未见新生血管侵入。血管内皮细胞组和混合组真皮下移植床新生血管数量分别为(14.2 ± 3.6)、(12.1 ± 2.5)条,均多于对照组[(3.9 ± 1.6)条, *P* < 0.05]。移植后 10 d,各组均可见新生血管侵入到人工真皮表层,但血管内皮细胞组及混合组血管数量较对照组增多。

2. VEGF 染色:移植后 5 d,血管内皮细胞组移植床和人工真皮内可见大量的 VEGF 染色阳性细胞,而对照组较少(图 1)。高倍视野下血管内皮细胞组、混合组阳性细胞数分别为(47 ± 8)、(41 ± 5)个,均多于对照组[(30 ± 8)个, *P* < 0.05]。移植后 10 d,血管内皮细胞组、混合组人工真皮内和移植床 VEGF 染色阳性细胞数均较对照组增多。

3. Masson 染色:移植后 5 d,各组人工真皮内均有少量胶原纤维沉积。移植后 10 d,血管内皮细胞组真皮胶原更加致密,已基本与移植床胶原组织融合,真皮较对照组增厚;对照组真皮海绵内胶原沉积量较少,仍可见残留的人工真皮海绵结构。

4. 墨汁灌注染色:移植后 5 d,血管内皮细胞组、混合组真皮海绵内虽未见明显的新生血管芽,但移植床可见密集的网状新生血管形成;对照组真皮海绵内未见血管侵入相,移植床也仅见极少量的单束支的新生血管相(图 2)。



图1 移植后5 d,人工真皮及移植床组织切片 VEGF×100。1.血管内皮细胞组内可见大量阳性细胞;2.混合组内可见大量阳性细胞;3.对照组阳性细胞较少



图2 移植后5 d,人工真皮及移植床组织切片 苏木精灌注×100。1.血管内皮细胞组移植床内可见密集的网状新生血管;2.混合组移植床内可见密集的网状新生血管;3.对照组移植床新生血管极少

5.伊文思蓝灌注:移植后5 d,伊文思蓝灌注后血管内皮细胞组、混合组真皮组织溶出的上清液吸光度值分别为 $0.167 \pm 0.058$ 、 $0.155 \pm 0.046$ ,均高于对照组( $0.066 \pm 0.024$ ,  $P < 0.05$ )。而血管内皮细胞组、混合组之间无明显差异。

## 讨 论

本实验证实,外源性同种血管内皮细胞和成纤维细胞移植可明显加速人工真皮移植后类真皮组织的形成,促进创面愈合。血管内皮细胞和成纤维细胞是创伤修复过程中主要的功能细胞,可分泌多种促进创面愈合的生长因子(如 FGF2、PDGF、TGF- $\beta$ 、VEGF)和胶原、纤维连接蛋白(FN)等基质成分,对创面愈合过程中的微血管形成具有明显的促进作用<sup>[4,5]</sup>。人工真皮移植后,随着细胞成分的侵入、增殖,毛细血管生长以及细胞外基质的充填,逐渐构筑成类真皮样组织,在这一过程中血管内皮细胞和成纤维细胞同样起着重要的作用。在正常情况下,体内的血管内皮细胞处于静止状态,促进血管生成的生长因子可刺激内皮细胞表型向血管生成转变。在这类生长因子中最重要的是 VEGF 和 FGF2<sup>[6]</sup>。VEGF 为糖蛋白,是血管内皮细胞的特异有丝分裂原,由内皮细胞、成纤维细胞等产生,特异性作用于血管内皮细胞,刺激体外培养的内皮细胞增殖、迁移,能诱导形成大量新生血管,维护血管正常状态,增加血管的通透性,并可促进蛋白水解酶的合成,分

解妨碍血管新生的多余基质成分<sup>[7,8]</sup>。外源性血管内皮细胞是否直接参与了微血管的形成尚无直接证据,但有研究证实,外源性成纤维细胞移植于真皮替代物中可以成活、增殖,并分泌相关生长因子,促进新生血管的形成<sup>[9]</sup>。谢卫国等<sup>[10]</sup>以含 VEGF 目的基因的腺病毒载体转染人成纤维细胞,并接种于人工皮后移植于鼠鼠创面,观察到基因修饰所致 VEGF 高表达明显促进移植皮肤替代物的血管化过程,提高了移植成活率。在本实验中,笔者选择了 VEGF 作为创面愈合过程的观察指标,通过对移植组织切片行 VEGF 免疫抗体染色观察到,血管内皮细胞和成纤维细胞移植后,移植床和真皮海绵内 VEGF 阳性细胞明显增多,表明外源性细胞移植后通过促进生长因子的产生加速了新生血管的形成。另外,Black 等<sup>[11]</sup>报道,将人脐静脉内皮细胞和人真皮成纤维细胞共同接种到胶原葡糖胺聚糖模板上,成功合成了含有毛细血管样结构的组织工程皮肤。这个体外模型强调了成纤维细胞及其分泌的细胞外基质对内皮细胞形成毛细血管样结构的作用,是通过成纤维细胞和内皮细胞的相互接触及内皮细胞与细胞外基质的相互作用完成的。Knox 等<sup>[12]</sup>的研究显示,伤后第3天创面内纤维素凝块中除炎症细胞外尚无成纤维细胞侵入,仅有 FN 等成分作为暂时性支架载体存在,成纤维细胞在伤后第4天才逐渐游走迁移到创伤部位的中心,并迅速增殖合成胶原。另有研究观察到,成纤维细胞最早于术后第2天出

现在移植的人工真皮内,但大量成纤维细胞的侵入、增殖开始于移植后 7 d<sup>[13]</sup>。由此可见,创伤愈合过程本身对人工真皮海绵内的真皮形成具有滞后作用,应用外源性细胞促进这一过程具有理论依据。成纤维细胞和血管内皮细胞在创面愈合早期移植于受体,通过持续释放生长因子和分泌细胞外基质,促进了移植床和人工真皮内的血管新生和胶原合成,缩短了人工真皮的“成熟时间”。由于成纤维细胞和血管内皮细胞在真皮组织构成中的特殊地位,已有多项研究将成纤维细胞和(或)血管内皮细胞应用于含有细胞甚至血管结构的组织工程皮肤的研制,并取得了一定进展<sup>[14]</sup>。而本实验采用的培养细胞移植方法简单,可操作性强,对临床应用有一定的参考价值。

#### 参 考 文 献

- 1 Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am*, 1997, 77: 575 - 586.
- 2 Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2000, 5: 40 - 46.
- 3 陈欣, 副岛一孝, 野崎崎弘, 等. 成纤维细胞移植促进人工真皮内血管新生的研究. *中国修复重建外科杂志*, 2004, 18: 205 - 208.
- 4 杨力, 郭树忠. 成纤维细胞与创伤修复的生物学过程. *中国临床康复*, 2002, 6: 470 - 471.
- 5 王益民, 韦福康, 刘敏. 成纤维细胞与创伤修复的研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2000, 14: 126 - 128.
- 6 Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, 34: 185 - 194.
- 7 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1029 - 1039.
- 8 Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 2004, 56: 549 - 580.
- 9 肖仕初, 夏照帆, 杨珺, 等. 成纤维细胞促进真皮替代物血管化的作用机制. *中国修复重建外科杂志*, 2003, 17: 100 - 103.
- 10 谢卫国, Werner L, Stefan G, 等. 血管内皮生长因子基因修饰对裸鼠移植皮肤替代物的影响. *中华烧伤杂志*, 2005, 21: 203 - 206.
- 11 Black AF, Berthod F, L'heureux N, et al. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J*, 1998, 12: 1331 - 1340.
- 12 Knox P, Crooks S, Rimmer CS. Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. *J Cell Biol*, 1986, 102: 2318 - 2323.
- 13 谢卫国, 谭红, 赵超莉, 等. 真皮替代物移植后的血管化过程及组织学变化的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2005, 21: 37 - 39.
- 14 Kuroyanagi Y, Yamada N, Yamashita R, et al. Tissue-engineered product: allogeneic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts. *Artif Organs*, 2001, 25: 180 - 186.

(收稿日期: 2006-02-27)

(本文编辑: 张红)

## · 病例报告 ·

### 小腿烧伤后巨大瘢痕癌一例

汤培 李金树 黄道强 谢加水

患者男, 52 岁, 因左小腿火焰烧伤后瘢痕溃疡不愈 30 年入院。既往有高血压病史 3 年余, 无糖尿病史。查体: 左小腿下段可见瘢痕溃疡, 面积约 16 cm × 14 cm, 表面凹凸不平, 恶臭, 部分呈菜花样高出周围皮肤, 有黄色分泌物, 伴瘙痒及疼痛感, 痛觉迟钝。左踝关节屈曲功能受限。全身多处可见陈旧性瘢痕, 已软化。左腹股沟可触及肿大的淋巴结, 质地较硬。入院后即取瘢痕处菜花样肿物活检, 病理报告为: 高分化鳞状细胞癌伴表面糜烂出血。给予 10 g/L 氯己定和体积分数 3% 过氧化氢交替冲洗创面, 碘伏纱布湿敷, 2 次/d。3 d 后行左小腿瘢痕癌扩大切除及腹股沟淋巴结清扫术。于距肿瘤边缘 4 cm 作切口, 切至深筋膜及肌层, 术中行快速病理切片, 提示切缘组织无癌细胞浸润, 给予大块自体中厚皮片移植。于左腹股沟触及肿大的淋巴结处切开皮肤, 以止血钳钝性分离, 清除表浅淋巴结。并沿腹股沟中点纵行向下切开, 仔细分离腹股沟淋巴管, 清除深部淋巴结, 缝合封闭创口, 无菌敷料包扎。术后冰冻病理切片结果为: 左小腿皮肤瘢痕癌变; 高分化鳞状细胞癌; 癌组织侵袭皮肤真皮层, 伴表

面糜烂、感染和异物巨细胞反应; 皮肤基底和切缘未见有癌细胞浸润; 腹股沟淋巴结未见有癌细胞转移。术后给予抗感染、换药等处理, 创面愈合良好, 患者痊愈出院。

讨论 烧伤瘢痕癌发病率较低, 占皮肤癌的 1.0% ~ 9.6%、皮肤鳞癌的 18.0%、基底细胞癌的 0.8%。国内鲁开化等<sup>[1]</sup>报道烧伤瘢痕癌占烧伤后畸形病例的 1.7%, 柴家科等<sup>[2]</sup>报道为 0.3%。烧伤瘢痕癌的病变部位多发于肢体, 特别是下肢。因其癌区长期破溃、糜烂, 经久不愈, 逐渐形成侵蚀样溃疡或菜花样病灶, 这是其典型的临床病理过程。本例患者 22 岁时因汽油火焰烧伤, 治愈后遗留瘢痕, 左小腿瘢痕创面反复破溃, 经久不愈, 创面逐渐扩大。对于烧伤瘢痕癌的预防主要是及时处理创面, 若有瘢痕形成慢性、复发性溃疡经久不愈, 应及时手术治疗封闭创面。

#### 参 考 文 献

- 1 鲁开化, 汪良能, 徐明达, 等. 烧伤瘢痕癌的预防、早期诊断与治疗的探讨. *中华整形烧伤外科杂志*, 1985, 1: 258.
- 2 柴家科, 盛志勇, 郭振荣, 等. 烧伤后瘢痕癌五例报告. *中华整形烧伤外科杂志*, 1994, 10: 183 - 185.

(收稿日期: 2006-05-19)

(本文编辑: 张红)

作者单位: 353000 福建南平, 解放军第九十二医院烧伤整形科 (汤培、黄道强、谢加水); 武警福建总队南平市支队卫生队 (李金树)