

# 利用胎儿表皮干细胞构建组织工程皮肤修复裸鼠 全层皮肤缺损创面

陶克 陈璧 丁国斌 谢松涛 胡大海

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM 培养基、角质形成细胞无血清培养基、重组人表皮生长因子、霍乱毒素、dispase 酶(美国 Gibco 公司),小鼠 IV 型胶原、L-谷氨酰胺、纤维蛋白、牛胰岛素(美国 Sigma 公司),角蛋白 14 单克隆抗体、角蛋白 19、整合素  $\beta_1$ (美国 ADI 公司),重组人成纤维细胞生长因子 2(FGF2,珠海亿胜生物制药有限公司),凝血酶(奥地利 Immuno AG 公司),聚乙醇酸(PGA,日本 Synthecon 公司,纤维直径 10~14  $\mu\text{m}$ ),6~7 周龄的雄性 BALB/cA 裸鼠 5 只(第四军医大学实验动物中心)。

### 1.2 方法

**1.2.1 胎儿表皮干细胞(ESC)培养与鉴定** 采用丁国斌等<sup>[1]</sup>的方法配制胎儿 ESC 培养液,IV 型胶原黏附法富集并培养胎儿 ESC。传代后的 ESC 用亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法分别行整合素  $\beta_1$  和角蛋白 19 染色。以同一标本同一批次培养的胎儿角质形成细胞作对照。

**1.2.2 组织工程皮肤表皮层的培养** 待原代胎儿 ESC 生长至接近融合时,加入 1.25 g/L dispase 酶,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 左右,即可见细胞膜片周围卷褶,用显微镊可完整取出组织工程皮肤的表皮层。取样行 HE 染色,以胎儿角质形成细胞(条件同上)作对照。

**1.2.3 组织工程皮肤真皮层的培养** 将  $1 \times 10^7$  个/ml 乳头细胞(DPC)悬液、成纤维细胞悬液和 5 g/L 纤维蛋白原按 1:2:3 的比例混合。剪下 1 个 6 孔板的孔底制成直径 2 cm 的圆形塑料板,置于另 1 个 6 孔板的底部,再完整剪下 1 个 12 孔板的孔壁置于圆形塑料板上,组合成 1 个圆柱形可拆卸的容器制作组织工程皮肤真皮层:在底部滴加 500 U/ml 凝血酶 40  $\mu\text{l}$ ,并置入经  $^{60}\text{Co}$  照射灭菌且用培养液预湿的 PGA 材料(1 cm  $\times$  1 cm),加入上述 DPC、成纤维细胞与纤维蛋白混悬液 0.75 ml(与凝血酶迅速混匀),数秒钟内变为含有 PGA 材料的胶冻状纤维蛋白凝胶(图 1)。在纤维蛋白凝胶上加入适量 DPC 培养液,于 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 24~48 h。取

材行 HE 染色。

**1.2.4 组织工程皮肤立体模型的建立** 将制备的 ESC 膜片置于上述纤维蛋白凝胶上,再加 1~2 滴胎儿 ESC 培养液,置 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱内培养。最初 12 h 内,每隔 0.5~1.0 h 滴加培养液 1~2 滴;待表皮层与真皮层结合紧密后,加入 2 ml 培养液培养,24~48 h 后用于裸鼠移植实验。取材行 HE 染色。

**1.2.5 组织工程皮肤移植实验** 将 5 只裸鼠分为 ESC 组(3 只)和对照组(2 只),麻醉固定后在距离背部中线两侧 1 cm 处分别制作 1 个边长 1 cm 的正方形全层皮肤缺损创面。ESC 组 6 个创面移植 ESC 膜片 + DPC + PGA + 纤维蛋白凝胶,对照组 4 个创面移植角质形成细胞膜片 + DPC + PGA + 纤维蛋白凝胶。再将体外培养的组织工程皮肤移植于创面(图 2),覆盖 2 层亲水性敷料,用 5-0 无创缝合丝线四周缝合固定,凡士林油纱外敷,妥善包扎。术后 30~35 d 取 2 组裸鼠术区皮肤标本,40 g/L 多聚甲醛固定、HE 染色,行病理学观察;按照 ABC 法行抗人角蛋白 14 免疫组织化学染色。

## 2 结果

### 2.1 胎儿 ESC 的鉴定

胎儿 ESC 整合素  $\beta_1$  和角蛋白 19 染色呈阳性,而胎儿角质形成细胞上述染色呈阴性。

### 2.2 组织工程皮肤培养情况

组织工程皮肤表皮层、真皮层和体外立体培养的组织工程皮肤于光学显微镜下见表皮层由 2~3 层 ESC 组成,真皮层有大量细胞贴附于 PGA 材料生长。立体培养的组织工程皮肤的表皮层由 2~4 层 ESC 组成,真皮层内大量细胞在 PGA 材料中浸润生长(图 3)。

### 2.3 组织工程皮肤移植情况

术后 30~35 d ESC 组 5 个创面已愈合(图 4),余下 1 个创面大部分愈合;对照组创面均未愈合。2 组均有 1 个创面出现 PGA 材料裸露,取材前均未见毛发长出皮肤。HE 染色显示:ESC 组术区皮肤表皮层明显厚于对照组,已形成真皮

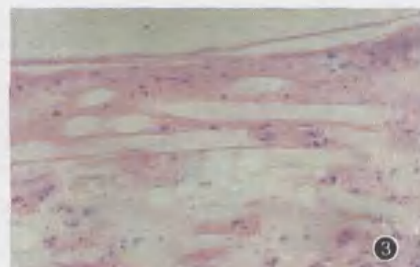
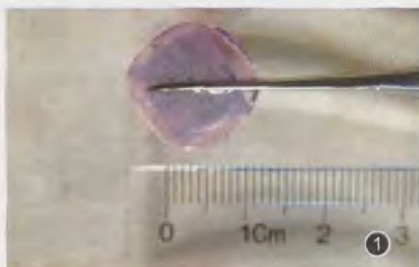


图 1 组织工程皮肤真皮层外观 图 2 裸鼠背部全层缺损创面移植组织工程皮肤 图 3 立体培养的组织工程皮肤具有表皮层和真皮层 HE  $\times 100$

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院全军烧伤中心

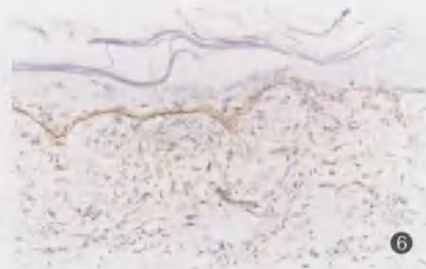


图 4 表皮干细胞组裸鼠移植组织工程皮肤后 35 d,创面基本愈合 图 5 表皮干细胞组术区皮肤有新生毛囊形成 HE × 40 图 6 表皮干细胞组术区表皮基层呈阳性 亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 × 40

乳头并可见真皮层内有结构典型的毛囊形成(图 5),大部分 PGA 材料纤维已被降解吸收;对照组新生皮肤无真皮乳头及毛囊。抗人角蛋白 14 免疫组织化学染色显示:ESC 组裸鼠术区新生皮肤及自体皮肤的表皮基层细胞染色分别呈阳性(图 6)、阴性。

### 3 讨论

将培养的皮肤角质形成细胞与体外构建的真皮替代物复合之后,升至气液面培养模式<sup>[2]</sup>使真皮可与培养液接触从而获得足够的营养。与空气接触的角质形成细胞逐渐成熟与角化,而接近液面的角质形成细胞则继续保持增殖的能力,最终形成与在体皮肤相似的组织工程皮肤。成纤维细胞在可降解生物材料上生长、增殖的同时也生成新的胞外基质。另外角质形成细胞和成纤维细胞除了可分泌炎性介质、生长因子等之外,其复合还会引发细胞间旁分泌机制,如角质形成细胞分泌血小板源性生长因子、转化生长因子  $\beta$ 、FGF2 等和成纤维细胞分泌胰岛素样生长因子等,均可促进细胞增殖和伤口愈合<sup>[3]</sup>。胎儿 ESC 具有生长和增殖较快,内在可塑性强、能产生多种生长因子、细胞抗原性低、细胞外基质富含透明质酸等优势<sup>[4,5]</sup>。研究表明,DPC 最重要特征是诱导毛囊再生功能<sup>[6-8]</sup>。因此笔者采用体外立体培养模式,利用胎儿 ESC + DPC + PGA + 纤维蛋白凝胶,共同构建组织工程皮肤。

PGA 属  $\alpha$ -聚酯类,在体内降解为羟基乙酸,参与体内三羧酸循环,具有极高的生物相容性和生物安全性。Vacanti 和 Upton<sup>[9]</sup>首先将 PGA 和聚乳酸(PLA)用作软骨细胞体外培养的基质材料,通过组织工程方法成功获得新生软骨。此后 PGA 和 PLA 及其共聚物被广泛用作组织工程软骨、骨、肌腱等各类组织细胞外的基质材料,取得了初步成功。本实验以胎儿 ESC 膜片为表皮层,以含 DPC、成纤维细胞、PGA 材料的纤维蛋白凝胶为真皮层构建组织工程皮肤,可有效地修复裸鼠全层皮肤缺损创面,形成的新生皮肤结构类似于正常皮肤,具有典型的表皮和真皮层结构。其表皮层明显较厚,真皮层内可见新生毛囊形成,而对照组未见毛囊形成,表明 ESC 和 DPC 在毛囊形成的过程中均不可缺少。由于本研究选用的裸鼠自然寿命偏短,术后观察时间相对不足(30 ~ 35 d),加上手术、敷料包扎等影响,术区均未见新生毛发。但病理切片显示 ESC 组术区新生皮肤真皮层有完整毛囊形成;ESC 组和对照组术区表皮基层细胞抗人角蛋白 14 染色均

为阳性,而裸鼠自体皮肤该染色为阴性,表明新生皮肤是人源性的,并非是裸鼠创缘正常皮肤收缩自愈。为进一步明确 ESC 作为组织工程种子细胞的可行性及对创面愈合的作用提供了初步的理论依据。

移植实验中 2 组均有 1 个创面出现 PGA 材料裸露,分析原因是组织工程皮肤表皮层与真皮层未能完全贴附生长,导致表皮层坏死而引起。因此实验中应该注意:(1)构建的组织工程皮肤必须培养 24 ~ 48 h,直至表皮层和真皮层完全贴附生长,且移植前必须始终浸于适量培养液中,防止表皮层和真皮层干燥分离。(2)实验前对支架进行有效的预湿,增强其亲水性,促进细胞在支架表面均匀分布,并有利于移植后细胞的长入;实验过程中组织工程皮肤上应添加亲水性敷料维持湿润状态,防止未成活之前干燥坏死。

### 参考文献

- [1] 丁国斌,陈璧,韩军涛,等. 人胎儿表皮干细胞的体外分离培养及基因转染. 中华烧伤杂志,2003,19(1):18-21.
- [2] Supp DM, Beu SM, Morqan JR, et al. Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A. Wound Repair Regen, 2000, 8(1):26-35.
- [3] Vogt PM, Thompson S, Andree C, et al. Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(20):9307-9311.
- [4] Watt FM. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. J Dermatol Sci, 2002, 28(3):173-180.
- [5] 刘虎仙,贾赤宇,付小兵,等. 表皮干细胞来源、分布及其在创面愈合中的作用. 中华创伤杂志,2006,22(3):238-240.
- [6] Jahoda CA, Reynolds AJ, Oliver RF. Induction of hair growth in ear wounds by cultured dermal papilla cells. J Invest Dermatol, 1993, 101(4):584.
- [7] Randall VA, Hibberts NA, Hamada K. A comparison of the culture and growth of dermal papilla cells from hair follicles from non-balding and balding (androgenetic alopecia) scalp. Br J Dermatol, 1996, 134(3):437.
- [8] Roh SS, Kim CD, Lee MH, et al. The hair growth promoting effect of Sophora flavescens extract and its molecular regulation. J Dermatol Sci, 2002, 30(1):43-49.
- [9] Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. Clin Plant Surg, 1994, 21(3):445-462.

(收稿日期:2006-08-24)

(本文编辑:莫愚)