

# 自体骨髓间充质干细胞为种子细胞构建 组织工程化全层皮肤

何丽娟 南 雪 王韞芳 管利东 白慈贤 施双双  
袁红丰 陈 琳 刘大庆 裴雪涛\*

(军事医学科学院野战输血研究所 干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

**摘要** 利用自体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)为种子细胞分别在体外一定条件下向表皮细胞和真皮成纤维细胞诱导分化, 并且和 I 型胶原膜复合后移植修复裸鼠皮肤创面, 观察以自体 BMSCs 为种子细胞构建组织工程化全层皮肤的可行性. 研究发现, 将分离纯化的 BMSCs 接种于表皮细胞诱导体系中, 3 天后细胞即发生形态改变, 汇合成表皮细胞特有的“铺路石”状; 透射电子显微镜观察到张力原纤维、黑色素小体和透明角质颗粒; 诱导分化细胞表达表皮细胞表面标志 CK19 和 CK10, 且 CK19 的诱导分化效率达到 60%, 表明诱导分化的细胞大部分为表皮干细胞; 通过检测细胞诱导前后紫外线照射诱发的凋亡状况, 证实诱导后的细胞具有抵抗紫外线照射的功能; 另一方面, BMSCs 在真皮成纤维细胞诱导体系作用下, 超微结构观察到细胞外胶原微纤维的沉积, RT-PCR 证实诱导分化细胞具有分泌 I 型胶原的功能; 放射免疫法检测到诱导后的细胞还具有分泌细胞因子 IL-6 与 IL-8 的功能, 其最高分泌量分别为 115.06 pg/mL 和 0.84 ng/mL. 体内移植实验也证实, BMSCs 与生物支架材料复合后具有明显促进皮肤缺损创面愈合的作用. 研究结果表明, BMSCs 具有向表皮细胞和成纤维细胞分化的潜能, 以及作为种子细胞构建具有生物学功能的组织工程化全层皮肤的可行性, 并且自体来源的 BMSCs 构建的皮肤组织无免疫排斥风险, 具有广阔的临床应用前景.

**关键词** 骨髓间充质干细胞 分化 表皮 真皮 组织工程

目前临床工作中对于皮肤缺损的修复治疗通常采用常规敷料处理、异体/种皮移植以及自体皮肤移植等方法, 但这些方法存在着修复效果不佳、来源有限, 以及供皮区新的创伤缺陷等问题. 随着组织工程研究的深入, 通过一定技术手段体外构建组织工程化皮肤进行皮肤损伤的修复已经成为该领域的研究趋势. 目前用于构建组织工程化全层皮肤的种子细胞多来源于患者自身或异体的表皮细胞和成纤维

细胞, 这些终末分化的细胞本身不具有再生能力, 因而缺乏持续分泌各种促进创面愈合的细胞因子等生物活性物质的功能, 而且异体细胞会引发免疫排斥反应, 临床应用受到一定的限制.

近年来骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为组织工程种子细胞来源的研究逐渐受到关注. BMSCs 可从自体获得, 不存在组织配型及免疫排斥反应的问题, 并且具有多向

收稿日期: 2006-09-25; 接受日期: 2006-12-26

北京市科学技术委员会科技计划重大项目(批准号: H060920050130)及国家重点基础研究发展计划项目(批准号: 2005CB522702)资助

\* 联系人, E-mail: [peixt@nic.bmi.ac.cn](mailto:peixt@nic.bmi.ac.cn)

分化的潜能. 已有研究表明, BMSCs可以分化为骨、软骨、脂肪、肌腱等组织细胞<sup>[1-4]</sup>, 并且诱导分化的细胞移植到体内能整合入相应的组织, 进而发挥特定的生物学功能. Nakagawa等人<sup>[5]</sup>通过体内实验证明, BMSCs具有促进伤口愈合的潜能, 并且修复的组织内能检测到骨髓来源的成纤维细胞. 付小兵等人<sup>[6]</sup>也通过体内实验证明, BMSCs具有向表皮细胞分化的潜能. 但在体外条件下, BMSCs能否分化为表皮细胞尚未见相关报道. 本研究拟观察BMSCs在一定的诱导条件下向表皮细胞和成纤维细胞分化的可行性, 并与生物材料复合移植修复小鼠全层皮肤缺损, 为以BMSCs为种子细胞构建组织工程化全层皮肤在临床皮肤缺损创面修复的应用提供理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 BMSCs 的分离纯化与扩增

无菌条件下直接抽取健康志愿者骨髓(捐献者均签署知情同意书, 并经解放军307医院医学伦理委员会同意), BMSCs的分离纯化及扩增参照侯玲玲等人<sup>[7]</sup>的方法进行.

### 1.2 体外诱导 BMSCs 向表皮细胞分化

(1) 诱导分化及形态学观察: 在预先铺有 Matrigel 胶(BD)的6孔板上, 种植  $6 \times 10^4$  个第3代 BMSCs, 加入含10%胎牛血清(FBS, Biochrom)的低糖 DMEM 完全培养基  $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  孵箱中培养, 至细胞达到50%融合后, 改用含低糖 DMEM-DF12 (1:1), 20 ng/mL 表皮细胞生长因子(EGF, R&D), 15 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, R&D), 1%ITS(Sigma), 0.1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松(Sigma), 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素的表皮诱导条件培养基进行诱导, 隔天半量换液. 诱导期间倒置显微镜下动态观察细胞形态变化; 收集第7天诱导分化细胞, 将细胞刮下来, 3%戊二醛固定液固定, 梯度酒精脱水, 包埋、超切、染色, 透射电子显微镜观察细胞超微结构.

(2) 免疫细胞化学和免疫荧光染色: 取诱导分化7天的细胞爬片, 4%多聚甲醛固定, 0.3% Triton X-100 及山羊血清处理后, 与鼠抗人细胞角蛋白19单克隆抗体(CK19)、鼠抗人角蛋白10&13单克隆抗体(CK10&13)一抗工作液(1:50)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 用生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记链霉卵白素

$37^\circ\text{C}$  孵育 30 min, DAB 显色 30 min, PBS 冲洗, 苏木素复染, PBS 洗涤后镜下观察结果(以上试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司).

免疫荧光染色是将一抗工作液(1:50)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 标记抗小鼠的 FITC 荧光二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司), 室温孵育 30 min, PBS 冲洗, 在荧光显微镜(IX70, Olympus)下观察.

(3) 抗紫外线照射的功能检测: 以 UVB 治疗仪(Waldmann UV800K)作为 UVB 光源, 辐射计测定光强, 通过控制照射时间来计算 UVB 剂量.

当诱导前后的 BMSCs 达到 90%以上融合时, 分别接受 42, 48, 60  $\text{mJ/cm}^2$  的 UVB 照射; 然后用含 10%FBS 的低糖 DMEM 完全培养基继续培养, 24 h 后消化细胞将其重悬在冰的结合缓冲液中, 与 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC(Serotec) 暗室室温孵育 10 min, PBS 洗涤细胞, 加入 20  $\mu\text{g/mL}$  的碘化丙啶(PI) 进行染色, 流式细胞仪分析(Becton Dickinson).

### 1.3 体外诱导 BMSCs 向真皮成纤维细胞分化

(1) 诱导分化及形态学观察: 在6孔板上种植  $6 \times 10^4$  个第3代 BMSCs, 加入含10%FBS的低糖 DMEM 完全培养基  $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  孵箱中培养, 至细胞达到50%融合, 改用含高糖 DMEM 培养基, 5%FBS, 15 ng/mL 转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ , R&D), 20 ng/mL bFGF, 1%ITS, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松, 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素的真皮诱导条件培养基进行诱导, 隔天半量换液. 诱导期间倒置显微镜下动态观察细胞形态变化; 收集第7天诱导分化细胞, 透射电子显微镜观察细胞超微结构.

(2) RT-PCR 检测 I 型胶原 mRNA 水平的表达: 用 Trizol 一步法提取诱导前后细胞的总 RNA 并进行反转录. I 型胶原蛋白包含 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 链,  $\alpha 1$ 链引物序列为 5'-GCCTGGGGCAAGACAGTGAT-3', 5'-AGCA-GAAAGGGCAGCATTGG-3', 扩增产物长度为 498 bp;  $\alpha 2$ 链引物序列为 5'-TCGTGGCGATAAGGG-AGAGC-3', 5'-GTGCTGAGCGAGGCTGGTC-3', 扩增产物长度为 366 bp;  $\beta$ -actin 内参引物序列为 5'-CA-TCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 5'-ATCATGTTTGA-GACCTTCAACA-3', 扩增产物长度为 496 bp. PCR 反应退火温度为  $59^\circ\text{C}$ , 扩增 25 个循环, 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 用高效凝胶成像分析系统进行分析(AlphaImager<sup>TM</sup>3300, Alpha).

(3) 放射免疫法检测细胞培养上清中细胞因子的分泌: BMSCs 在向成纤维细胞诱导过程中, 分别在诱导第 0, 7, 10, 14 天收集细胞培养上清, 检测培养上清中白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8) 的分泌量, 同时以未诱导的 BMSCs 相同时间段培养上清的分泌量作为对照. 实验严格按照白细胞介素 6、白细胞介素 8 放射免疫分析测定盒(解放军总医院科技开发中心东亚放射免疫研究所)要求进行操作.

#### 1.4 诱导细胞的安全性评价

(1) 裸鼠致瘤实验: 分别取  $5 \times 10^6$  个诱导分化的表皮细胞和真皮成纤维细胞接种裸鼠背部皮下, 以人宫颈癌 HeLa 细胞作为阳性对照, 观察裸鼠成瘤情况.

(2) 染色体核型分析: 取  $1 \times 10^7$  个诱导分化 7 天的表皮细胞和真皮成纤维细胞, 加入终浓度为 2.5  $\mu\text{g/mL}$  的秋水仙素孵育 5 h 后, 进行染色体核型分析.

#### 1.5 BMSCs 与胶原膜复合修复皮肤缺损

(1) 胶原膜的制备: 将新鲜牛肌腱用生理盐水洗净, 剪碎后加入 0.03~0.05 mol/L 醋酸, 4 $^{\circ}\text{C}$  反复振荡溶胀制成胶原溶液. 然后加入 1/10 体积的 10 $\times$ DMEM, 10%FBS, 并以 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 7.2~7.4. 在培养皿中加入胶原溶液, 置 -30 $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻 4 h 后, 置于冻干机中冻干 12~24 h 制成胶原海绵. 再将其浸于 0.25%戊二醛与 0.05 mol/L 醋酸的混合溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$  交联过夜; 双蒸水清洗, 扫描电子显微镜观察其结构特征.

(2) BMSCs 与胶原复合膜的制备: 将密度为

$1 \times 10^7$  个/mL 第 3 代 BMSCs 悬液与 5  $\mu\text{g/mL}$  DAPI 孵育 30 min, PBS 洗去未结合的 DAPI 后, 用含 10%FBS 的低糖 DMEM 完全培养基重悬细胞, 种植到无菌胶原膜上孵育 24 h.

(3) 动物移植实验: 用 3.5%水合氯醛麻醉裸鼠后, 于背部切取全层皮肤作一 8  $\text{cm}^2$  的圆形缺损创面, 实验组移植 BMSCs 与胶原复合膜, 对照组移植胶原膜, 外敷无菌纱布, 用打包法进行缝合固定后单笼饲养. 术后 3, 7, 14, 21 天各时间点随机选择实验动物, 切取创面中央直径 0.5 cm 范围的皮肤, 分别进行创面愈合率、透射电子显微镜、免疫荧光、组织学检测.

#### 1.6 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据处理及统计学分析采用 SAS 统计软件, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 向表皮细胞诱导分化

(1) 形态学观察: BMSCs 向表皮细胞诱导分化 72 h 后即发生形态改变, 由梭形变成圆形或椭圆形, 细胞大小不一, 排列成典型的铺路石状, 继续诱导细胞呈现复层生长. 透射电子显微镜观察细胞超微结构, 可见细胞呈椭圆形, 核大呈卵圆形, 胞浆内有丰富的张力原纤维, 黑色素小体和透明角质颗粒, 相邻细胞间可见桥粒相连(图 1).

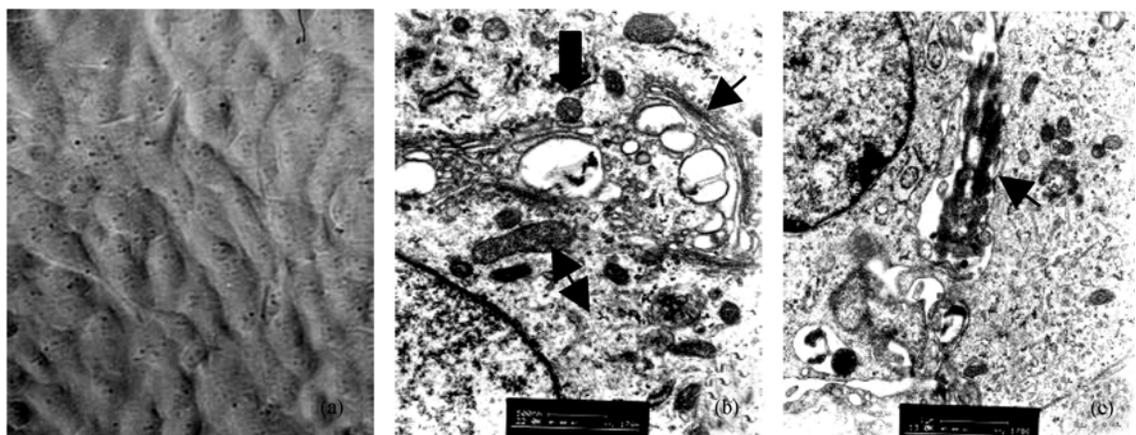


图 1 BMSCs 向表皮细胞诱导形态学观察

(a) 倒置显微镜下的细胞形态(200 $\times$ ); (b) 透射电子显微镜下细胞超微结构, 细箭头所指为张力原纤维, 粗箭头为黑色素小体, 双箭头为透明角质颗粒( $\times 42000$ ); (c) 箭头所指为细胞间的桥粒连接( $\times 13000$ )

(2) 免疫组织化学和免疫荧光染色: BMSCs 向表皮细胞诱导, 表达表皮干细胞所特有的表面标志 CK19, 显微镜(100×)下随机计数 10 个视野内的细胞总数和完全分化的细胞数, 经统计学分析显示, 细胞分化效率为(59.6±4.2)%; 同时少量细胞表达成熟表皮细胞的表面标志 CK10, 诱导分化效率为(5.5±0.8)% (图 2)。未诱导的 BMSCs 不表达 CK19 和 CK10。

(3) 紫外线照射后细胞凋亡检测: 流式细胞仪检测 BMSCs 经 UVB 照射后 24 h 细胞发生凋亡的状况, 在 42 mJ/cm<sup>2</sup> 的照射强度下即出现亚二倍体峰即凋亡峰, 并且随着照射强度的增强, 细胞发生凋亡的比例越来越大, 凋亡率分别为(8.86±0.23)%、(29.20±2.35)%和(31.39±1.57)%, 出现剂量依赖性改变。BMSCs 向表皮细胞诱导后的细胞, 随着 UVB 照射强度的增强, 细胞发生凋亡的比例未见明显差异, 反而还略有下降, 从(5.45±0.05)%到(3.81±0.03)%到(3.74±0.04)% (图 3)。

## 2.2 BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导分化

(1) 形态学观察: BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导, 倒置显微镜下未见明显形态改变, 胞体呈梭形或三角形, 细胞汇合后, 排列紧密, 呈典型的漩涡状、放射状走行; 透射电子显微镜下可见细胞呈多角形, 胞核较大, 核膜下异染色质聚集。胞质内可见高尔基复合体、粗面内质网和少量的溶酶体, 细胞外有胶原微纤维沉积(图 4)。

(2) RT-PCR 检测 I 型胶原 mRNA 水平的表达: I 型胶原的  $\alpha 1$  链在 BMSCs 诱导前后的表达量未见明显改变( $P > 0.05$ ),  $\alpha 2$  链在诱导后的表达量是诱导前的 2 倍, 存在明显差异( $P < 0.01$ )(图 5)。

(3) 细胞培养上清中细胞因子的分泌: BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导到第 7 天, 细胞因子 IL-6 和 IL-8 的分泌量达到最高, 分别为(115.06±4.5) pg/mL 和(0.84±0.07) ng/mL, 而 BMSCs 对照组的分泌量分别为(51.52±6.3) pg/mL 和(0.42±0.05) ng/mL, 两者存在显著差异( $P < 0.01$ ); 当 BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导到第 10 和 14 天, IL-6 和 IL-8 的分泌量逐渐降低, 但仍高于对照组(图 6)。

## 2.3 安全性评价

(1) 裸鼠致瘤实验: 经 2 个月的观察, 接种诱导分化的表皮细胞和成纤维细胞的裸鼠均无瘤体形成, 而接种 HeLa 细胞的裸鼠有瘤体形成。

(2) 染色体核型分析: 体外诱导 7 天的表皮细胞和真皮成纤维细胞, 随机分析 100 个中期分裂细胞的染色体核型, 未见异常(图 7)。

## 2.4 动物移植实验

(1) 胶原膜的扫描电子显微镜观察: 扫描电子显微镜观察可见胶原纤维相互连接成多孔网状结构, 网孔大小均匀, 为 20~150  $\mu\text{m}$ , 适合细胞和毛细血管

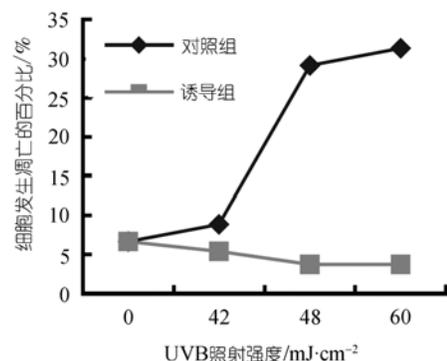


图 3 FACS 检测 UVB 照射后细胞凋亡状况

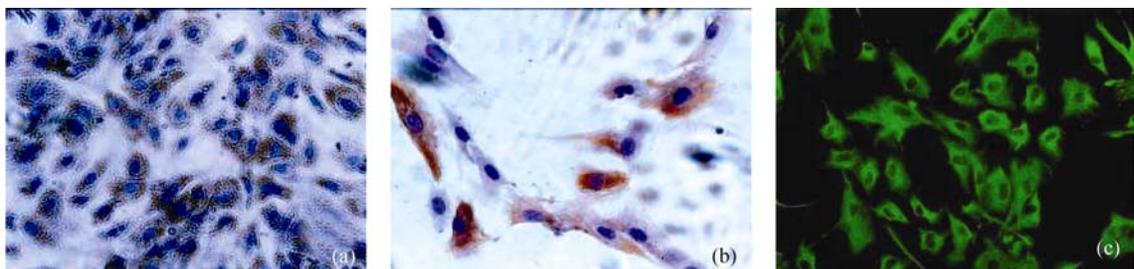


图 2 BMSCs 向表皮细胞诱导后免疫细胞化学和免疫荧光染色  
(a) CK19(×100); (b) CK10(×200); (c) 免疫荧光 CK19(×100)

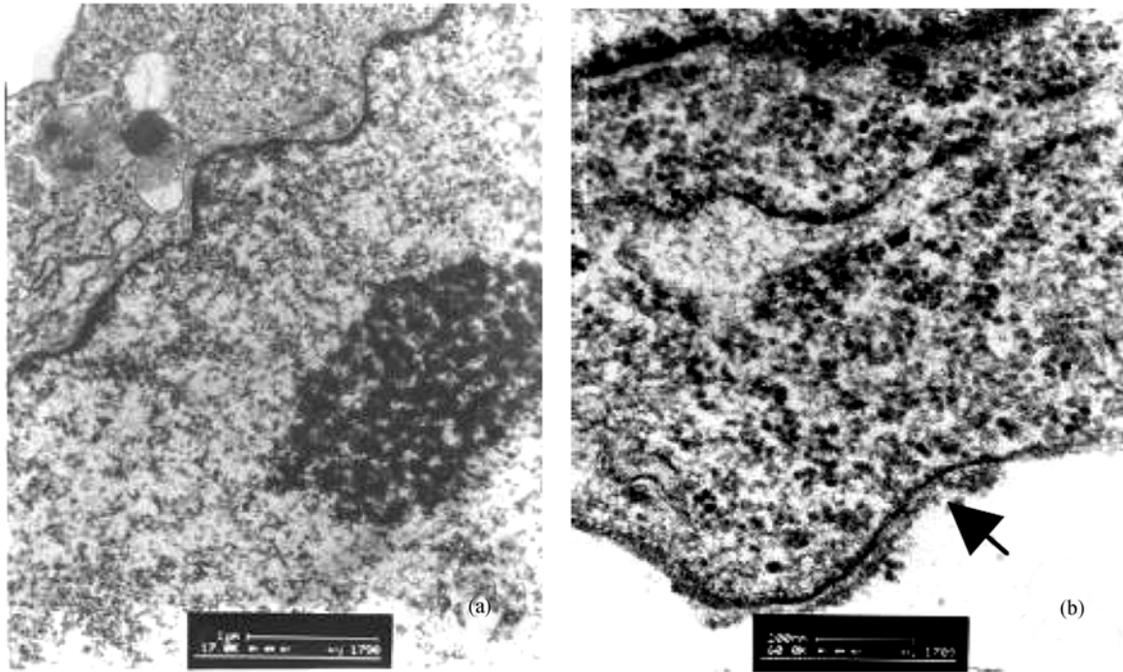


图 4 BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导形态学观察

(a) 透射电子显微镜下细胞的超微结构( $\times 17000$ ); (b) 箭头所指为细胞外的胶原微纤维( $\times 60000$ )



图 5 RT-PCR 检测 I 型胶原的表达

的长入。在胶原膜上种植 BMSCs, 4 天后可见细胞紧密贴附于胶原膜表面, 呈长梭形生长(图 8)。

(2) 创面愈合率计算: 在移植实验第 7 天, 实验组动物即达到 55% 的创面愈合率, 而对照组仅为 25%, 两组愈合效果存在明显差异( $P < 0.01$ ); 移植实验 14 天这种愈合优势逐渐减弱, 21 天实验组完全愈合, 对照组也达到 95% 的愈合率, 最终能够自愈, 整个移植实

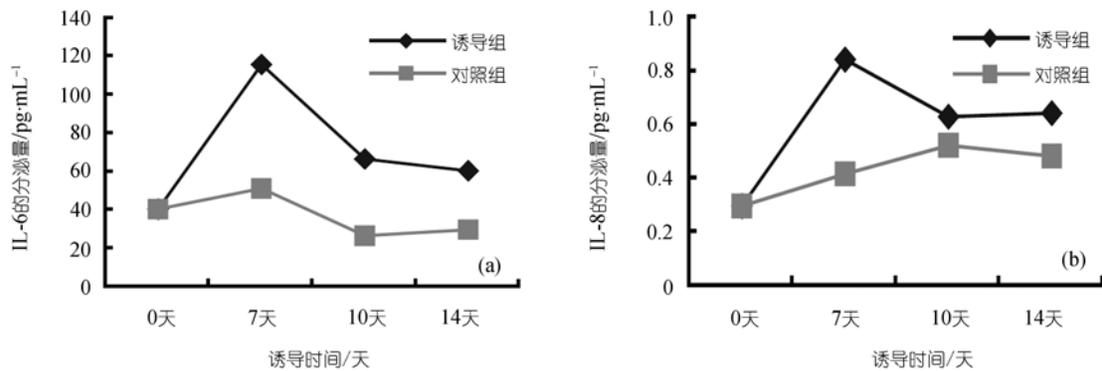


图 6 细胞培养上清 IL-6 和 IL-8 的分泌

(a) BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导培养上清 IL-6 的分泌; (b) BMSCs 向真皮成纤维细胞诱导培养上清 IL-8 的分泌

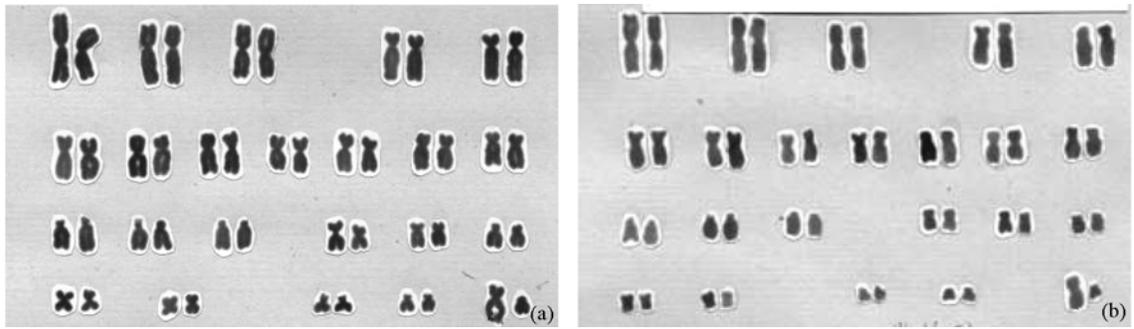


图 7 诱导分化细胞染色体核型分析

(a) 诱导分化的表皮细胞染色体核型分析; (b) 诱导分化的成纤维细胞染色体核型分析

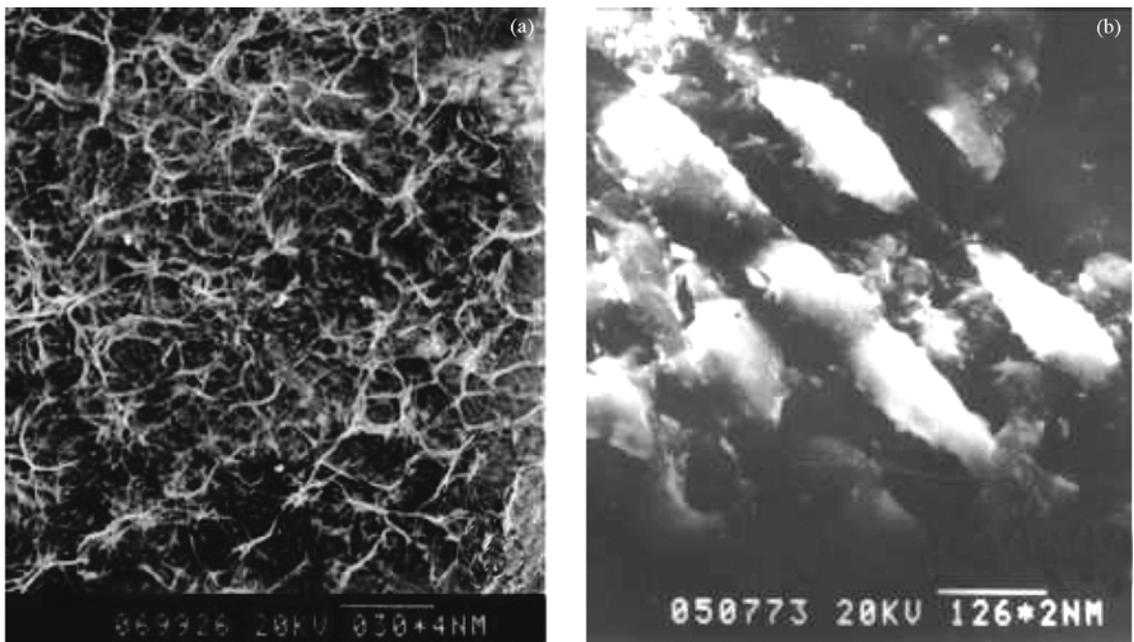


图 8 扫描电子显微镜下的细胞和材料

(a) 胶原支架材料的网状结构( $\times 50$ ); (b) 种植在胶原膜上的 BMSCs( $\times 1200$ )

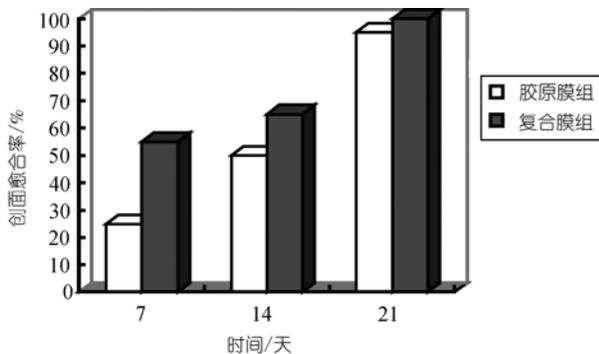


图 9 创面愈合率变化示意图

无一例移植区皮肤坏死(图 9).

(3) 透射电子显微镜观察: 在移植实验第 7 天, 实验组可见表皮细胞间的桥粒连接, 以及表皮基层细胞与基膜的半桥粒连接; 真皮层可见较多中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和血管内皮细胞, 成纤维细胞外可见大量胶原形成和沉积(图 10).

(4) 荧光显微镜检测: 分别在移植实验后的 7, 14, 21 天, 切取实验组动物皮肤标本进行荧光显微镜观察, 结果显示带有 DAPI 标记的 BMSCs 在移植第 7 天已遍布真皮层, 但表皮层细胞较少; 移植实验 14 天, 表皮层细胞明显增多, 并且位于真皮层的 BMSCs 具有向表皮层迁移的趋势; 到移植 21 天真皮

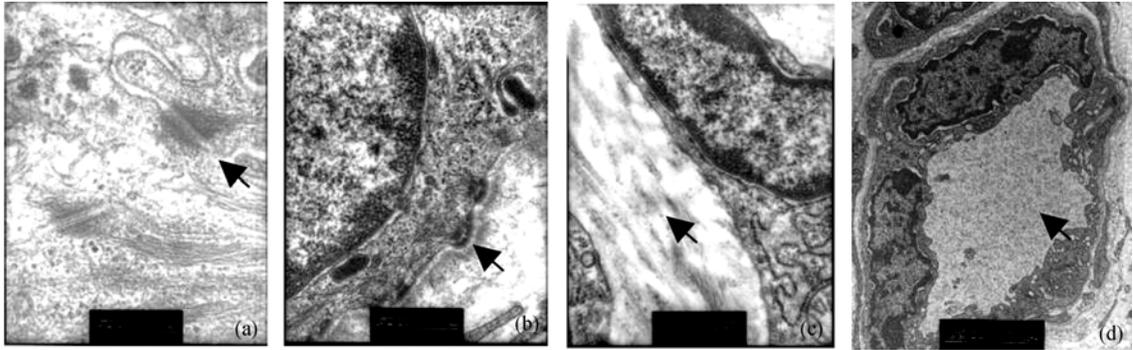


图 10 实验组的透射电子显微镜观察

(a) 箭头所指为细胞间的桥粒连接( $\times 75000$ ); (b) 箭头所指为半桥粒( $\times 45000$ ); (c) 箭头所指为成纤维细胞外的胶原纤维( $\times 35000$ ); (d) 箭头所指为血管内皮细胞围成的毛细血管( $\times 10000$ )



图 11 BMSCs-DAPI 移植实验各时间点细胞定位

(a)~(c)分别为 7, 14, 21 天荧光检测结果

层仍可见到大量带有荧光标记的 BMSCs (图 11).

(5) 组织学观察: 实验组在移植实验 21 天, 可见表皮增厚, 皮突明显, 表皮层结构清楚, 可见分化明显的基底层、棘层、颗粒层、角质层, 基底层细胞排列紧密; 真皮层可见疤痕组织形成, 表现为中性粒细胞减少, 纤维细胞增多, 胶原纤维增多且排列有序. 重建的皮肤与裸鼠正常皮肤在组织形态上存在明显差异. 以抗人核蛋白抗体(Chemicon)作为一抗, 进行免疫荧光染色, 结果显示在重建的裸鼠表皮和真皮组织中, 可检测到抗人核蛋白抗体阳性的细胞(图 12).

### 3 讨论

构建组织工程产品研发的核心技术之一是种子细胞的选择, 理想的种子细胞应具有来源丰富、体外易于培养和扩增、能控制其分化方向以及应用安全等特征. 自体来源的 BMSCs 是具有多向分化潜能的干细胞, 能否以此为种子细胞构建具有良好生物学功

能的组织工程化全层皮肤目前尚未见文献报道. 本研究中, 我们将 BMSCs 在 EGF 和 bFGF 两种细胞因子组合下进行诱导分化, 从形态学、表面标志检测等方面证实 BMSCs 体外可以向表皮细胞诱导分化; 由于 CK10 的分化效率只有 5% 左右, 表明表皮诱导只出现了表型的改变, 还未出现真正的结构变化. 我们还通过 UVB 照射细胞的方法, 对诱导后的表皮细胞抗辐射能力进行了鉴定, 结果显示, UVB 照射 BMSCs 后细胞发生凋亡, 出现剂量依赖性改变; 但 BMSCs 向表皮细胞诱导后, 细胞在相同的照射强度下未出现凋亡, 而且随着照射强度的增大, 细胞发生凋亡的比例反而越来越低. 由于表皮细胞是抵抗紫外线照射的第一道防线, 也是中波紫外线(UVB, 290~320 nm)波长能量作用的主要靶细胞, 而且以往的研究也证实: UVB 照射可诱发细胞凋亡<sup>[8-10]</sup>, 但在低剂量辐射和 EGF 作用下, UVB 具有促进人表皮细胞生长的作用<sup>[11]</sup>, 所以诱导后的表皮细胞具有抵御 UVB 照射的现象其原因可能是由于小剂量辐射促进

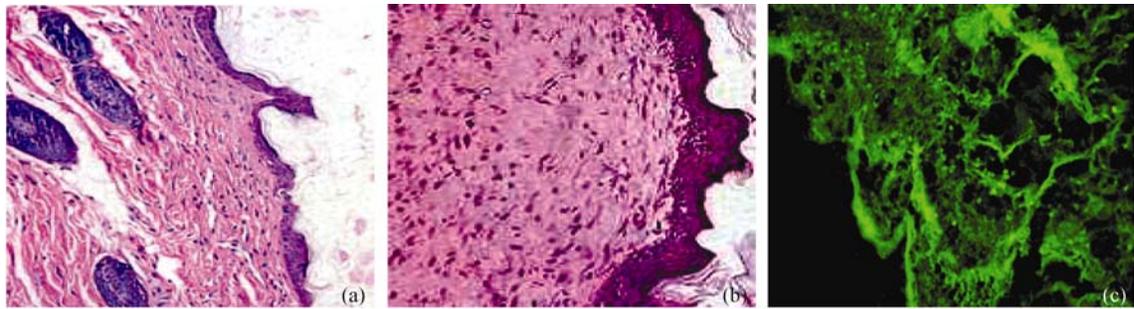


图12 移植实验组织学观察

(a) 正常裸鼠皮肤; (b) 实验组移植实验21天皮肤; (c) 免疫荧光检测抗人核蛋白抗体

了RhoB蛋白的表达,同时伴随着表皮生长因子受体(EGFR)的活化,从而激活了丝/苏氨酸蛋白酶(AKT)信号通路,通过BAD的磷酸化以及负调控P53等方式,传递生存信号给表皮细胞,发生抗凋亡作用<sup>[11~13]</sup>。实验结果初步说明诱导的表皮细胞具备了正常表皮细胞的功能。

在皮肤的真皮组织中,主要的细胞类型是成纤维细胞,成纤维细胞主要的功能是合成和分泌I型胶原。本研究采用TGF- $\beta$ 1和bFGF两种细胞因子相结合,定向诱导BMSCs向真皮成纤维细胞分化。选取TGF作为诱导因子是因为TGF是导致组织纤维化的主要细胞因子<sup>[14]</sup>,它不仅能促进成纤维细胞的增殖,而且还能刺激成纤维细胞合成胶原等细胞外基质,抑制蛋白酶的活性,从而促进细胞外基质的沉积;而TGF- $\beta$ 可通过Smad信号通路以及蛋白激酶C- $\delta$ 信号通路刺激皮肤成纤维细胞合成I型胶原的 $\alpha$ 2链<sup>[15,16]</sup>。实验结果显示,自体BMSCs在TGF- $\beta$ 1和bFGF两种细胞因子的诱导作用下,不仅在形态学表现上具备了成纤维细胞的特征,而且诱导后的成纤维细胞其I型胶原 $\alpha$ 2链的基因表达量是诱导前的2倍,具有了分泌I型胶原的功能。另一方面,我们通过放射免疫的方法检测BMSCs诱导前后细胞因子的分泌状况,发现诱导7天细胞高表达IL-6和IL-8,IL-6是表皮细胞的一种丝裂原,可加速创面表皮化,在创伤修复中发挥重要作用<sup>[17~19]</sup>,IL-8不仅是一种炎性细胞趋化因子,也是表皮细胞的复合有丝分裂原,同样可促进表皮细胞的生长增殖。实验结果说明诱导后的成纤维细胞同时具有了分泌细胞因子的功能,为构建组织工程化皮肤提供了良好的理论依据。

在体外研究的基础上,我们将BMSCs与低免疫原性的胶原材料复合后进行了体内皮肤创面修复研

究,结果表明BMSCs与支架材料复合后移植修复皮肤创面,在较短的时间就具有促进创面愈合的功效;组织学观察形成了具有复层皮肤样结构特征的皮肤替代物,免疫荧光染色的结果也表明其中的表皮样细胞和真皮成纤维样细胞来源于BMSCs,说明是由后者在体内的微环境中诱导分化形成。有文献报道成体干细胞在移植后能够发生环境依赖性变化,具有向病变部位迁移并分化成机体所需要的相应细胞的能力<sup>[20]</sup>,我们的实验结果也说明移植到支架材料上的BMSCs有可能在创面微环境的作用下,向表皮细胞和真皮成纤维细胞分化,通过合成细胞外基质和分泌细胞因子等功能,发挥促进缺损创面愈合的作用。

通过我们的实验表明,自体来源的BMSCs在体外可以向表皮细胞和真皮成纤维细胞定向分化,而且在和胶原支架材料复合后体内可以形成具有表皮和真皮样结构的皮肤替代物进行创面缺损修复;为以自体BMSCs作为种子细胞进行组织工程化全层皮肤的构建研究建立了良好的理论基础,由于自体BMSCs获取相对简便,无移植后的免疫排斥风险,所以以其作为种子细胞构建的全层皮肤替代物也具有非常广阔的应用前景。至于如何做到支架材料的优化和筛选以及今后相关产品的规范化研发和应用,则是今后值得深入研究的课题。

## 参 考 文 献

- 1 Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143—147 [\[DOI\]](#)
- 2 Robert J D, Annemarie B M. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hemato*, 2000, 28: 875—884 [\[DOI\]](#)

- 3 David J A, Fred H G, Irving L W. Can stem cells cross the lineage boundaries? *Nat Med*, 2001, 7: 393—395 [\[DOI\]](#)
- 4 Timothy R B, Fabio M V R, Gilmor L K, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000, 290: 1775—1779 [\[DOI\]](#)
- 5 Nakagawa H, Akita S, Fukui M, et al. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol*, 2005, 153: 29—36 [\[DOI\]](#)
- 6 方利君, 付小兵, 孙同柱, 等. 在体诱导骨髓间充质干细胞分化为表皮细胞的初步观察. *中华创伤杂志*, 2003, 19: 212—214
- 7 侯玲玲, 曹华, 白慈贤, 等. 人骨髓间充质干细胞体外扩增和向神经细胞定向诱导分化的实验研究. *自然科学进展*, 2002, 12: 277—281
- 8 Kulms D, Zeise E. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene*, 2002, 21: 5844—5851 [\[DOI\]](#)
- 9 Kulms D, Schwarz T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64: 837—841 [\[DOI\]](#)
- 10 Assefaa Z, Van Laethem A, Garmyn M, et al. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1755: 90—106
- 11 Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, et al. RhoB Protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280: 43257—43263 [\[DOI\]](#)
- 12 Kuhn C, Hurwitz S A. Activation of the insulin-like growth factor-I receptor promotes the survival of human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *Int J Cancer*, 1999, 80: 431—438 [\[DOI\]](#)
- 13 Decraene D, Agostinis P, Bouillon R, et al. Insulin-like growth factor-1-mediated AKT activation postpones the onset of ultraviolet B-induced apoptosis, providing more time for cyclobutane thymine dimer removal in primary human keratinocytes. *J Biol Chem*, 2002, 277: 32587—32595 [\[DOI\]](#)
- 14 Cheng J, Grande J P. Transforming growth factorbeta signal transduction and progressive renal disease. *Exp Biol Med*, 2002, 227: 943—956
- 15 Mori Y, Chen S J, Varga J. Modulation of endogenous Smad expression in normal skin fibroblasts by transforming growth factor. *Exp Cell Res*, 2000, 258: 374—383 [\[DOI\]](#)
- 16 Masatoshi J, Hironobu I. a2(I) collagen gene regulation by protein kinase C signaling in human dermal fibroblasts. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 1337—1351 [\[DOI\]](#)
- 17 Lin Z Q, Kondo T, Ishida Y, et al. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*, 2003, 73: 713—721 [\[DOI\]](#)
- 18 Gallucci R M, Sloan D K, Heck J M, et al. Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*, 2004, 122: 764—772 [\[DOI\]](#)
- 19 Wang X P, Schunck M, Kallen K J, et al. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*, 2004, 123: 124—131 [\[DOI\]](#)
- 20 Mackenzie T C, Flake A W. Human mesenchymal stem cells persist demonstrate site-specific multipotential differentiation and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, 27: 601—604 [\[DOI\]](#)