

组织工程真皮替代物的构建及在创伤修复中的作用

李 静, 孙莉萍*, 叶社房, 张建锋,
李 辉, 王秀燕, 关 嫚, 张其清*

(厦门大学生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 以双层胶原-壳聚糖海绵为支架构建组织工程真皮替代物并研究其在大鼠创伤愈合中的作用. 将双层胶原-壳聚糖海绵支架埋植于 SD 大鼠皮下以考察其组织相容性; 将 SD 大鼠皮肤中分离的成纤维细胞种植在支架上体外构建人工真皮替代物, 并将该替代物移植到 SD 大鼠皮肤缺损处以修复创面. 皮下埋植实验显示支架植入早期有炎症反应, 但一周后炎症反应逐渐减轻, 而且有成纤维细胞和毛细血管的侵入. 皮肤移植实验结果显示: 术后第 7 天和第 14 天实验组创面表皮再生和肉芽组织增生比对照组更快更明显; 第 14 天和第 21 天实验组创面面积明显小于对照组 ($p < 0.05$). 因此以双层胶原-壳聚糖海绵为支架构建的组织工程真皮替代物具有良好的生物相容性, 并能促进皮肤创面的愈合, 可以作为人工真皮替代物用于皮肤缺损的修复.

关键词: 胶原-壳聚糖; 真皮替代物; 生物相容性

中图分类号: R 329

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)03-0387-05

由烧伤、慢性溃疡、创伤等导致的皮肤缺损是临床常见病症之一, 尽早封闭创面是治疗皮肤缺损的关键. 既往临床一般采用自体皮片移植修复创面, 但由于自体皮源的严重缺乏, 导致创面得不到及时、有效的修复. 近年来皮肤组织工程技术的发展与应用为改善创面修复质量和解决皮源问题开辟了崭新的途径^[1]. 其中真皮结构在皮肤重建过程中具有重要作用, 它能促进表皮细胞的迁移、黏附、增殖和分化^[2]. 因此研制理想的真皮替代物是皮肤组织工程的关键. 目前国外研究者已开发出多种真皮替代物, 并已初步应用于深度烧伤创面的修复和疤痕整形等领域, 取得了一定临床效果, 但制品的价格非常昂贵, 因此, 研制和开发适合我国国情和经济实用的高质量真皮替代物具有重要意义. 胶原和壳聚糖均对创面愈合具有促进作用, 其良好的组织相容性已得到实验及临床证实^[3]. 目前, 国内外对胶原-壳聚糖海绵支架的研究很多, 但都是单层支架, 未见双层支架的研究. 本研究以双层胶原-壳聚糖海绵为支架构建组织工程真皮替代物, 并将该真皮替代物移植到 SD 大鼠皮肤缺损创面上取得了满意的修复效果.

1 材料和方法

1.1 材 料

胶原为本实验室提取的经酶消化去除末端肽的不全胶原^[4]. 壳聚糖购自国家海洋局第三研究所开发部, 脱乙酰度 90.6%, 分子量 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$. 新生 SD 大鼠由厦门大学抗癌研究中心提供, 使用许可证号: SYXK(闽)2004-0004. 实验动物为清洁级健康成年近交系 SD 大鼠 40 只, 体质量 200 ~ 250 g, 雌雄各半, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2003-0003.

1.2 方 法

1.2.1 双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备

具体制备方法见文献[5].

1.2.2 双层胶原-壳聚糖海绵支架的皮下埋植实验

选用 20 只 SD 大鼠, 20 g/L 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉成功后, 在背部纵形切开皮肤、皮下组织至深筋膜层, 植入消毒的 2 cm × 2 cm 大小的胶原-壳聚糖海绵支架, 1 号丝线缝合皮肤, 无菌敷料包扎. 术后观察大鼠背部伤口, 并于术后第 3、7、14、21、28 天各处死 4 只大鼠, 取出支架及部分周围组织进行组织学检查.

1.2.3 SD 大鼠皮肤成纤维细胞的分离、培养

将新生 SD 大鼠断颈处死后, 放入 75% 酒精浸泡

收稿日期: 2007-07-24

基金项目: 福建省科技计划项目(2003 Y006)资助

*通讯作者: zhangqiq@xmu.edu.cn; sunliping@xmu.edu.cn

5 min, 无菌 PBS 清洗后用眼科剪切取大鼠背部皮肤, 去除皮下组织, 把皮肤剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块; 将组织块移入 15 mL 离心管内, PBS 清洗组织块 2 次, 加入 0.25 % 胰蛋白酶 2 mL, 放入 37 °C 恒温箱内消化 30 min 吸取上清液, 用 200 目钢筛过滤除去组织块, 收集滤液. 剩余组织块再加入新的胰酶消化, 如此重复 2~3 次直至组织完全消化, 收集的滤液以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液以除去胰酶, 用 DMEM 培养基重悬细胞团, 计数, 调整细胞密度为 10^6 / mL, 将细胞接种于培养瓶中, 用含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 置于 37 °C、5 % CO₂ 培养箱, 2~4 h 后细胞贴壁换液一次, 以后每两天换液一次^[6].

1.2.4 人工真皮替代物的体外构建

将消毒的胶原-壳聚糖海绵支架内层即粗糙面向上放入直径 90 mm 培养皿中, 用含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基浸泡 24 h, 然后吸尽培养基, 取指数生长期的第 3 代 SD 大鼠皮肤成纤维细胞以 2.0×10^5 / cm² 的密度接种在支架上, 置入 37 °C、5 % CO₂ 培养箱孵育, 等 1~2 h 细胞沉淀后再补足培养基继续孵育, 隔天换液, 将培养了 1 周的人工真皮替代物用 4 % 福尔马林固定、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 切成 4 μm 厚的石蜡切片, 进行 HE 染色.

1.2.5 人工真皮替代物的移植实验

动物模型的建立及人工真皮替代物的移植: 选取 SD 大鼠 20 只, 经 20 g/L 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后固定于手术台上, 备皮, 常规消毒铺巾后在脊柱两侧对称部位分别切除一块 100 mm² 正方形的全厚皮肤, 两者相隔 10 mm, 建立全层皮肤缺损动物模型. 创面止血后, 把人工真皮替代物有细胞的一面向下贴附于左侧创面(实验组), 并将其修剪至与创面一样大小; 右侧创面直接覆盖无菌油纱(对照组), 两侧创口外再依次覆盖无菌油纱、无菌干纱布, 以胶布固定,

最后用弹性绷带加压包扎, 术后单笼饲养.

检测指标: (1) 创面大体观察: 于术后第 3、7、14、21、28 天观察创面愈合情况; (2) 组织学观察: 于上述各时间点取材, 常规固定、脱水、包埋、切片后行 HE 染色; (3) 创面面积: 于上述各时间点采用透明胶片描记加称重法测定创面面积^[7].

统计学处理: 创面面积的测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件, 用 t 检验比较组间差异, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 实验结果

2.1 双层胶原-壳聚糖海绵支架的皮下埋植实验

2.1.1 大体观察

动物术后均未发生感染, 切口无红肿、无分泌物. 术后第 3 天胶原-壳聚糖海绵支架完整, 易剥离; 第 7~14 天支架外周有纤维包裹包裹, 不易剥离; 第 21 天支架外周的纤维包裹变薄, 有粉红色物质填充于支架之间, 可见毛细血管网; 第 28 天支架变薄变软, 在体内可辨认, 无明显降解.

2.1.2 组织学观察

术后第 3 天胶原-壳聚糖海绵支架被中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润, 支架网孔内有少量成纤维细胞长入(图 1a); 第 7~14 天支架中成纤维细胞逐渐增多, 炎性细胞减少; 第 21~28 天仍能见支架大致形态, 以成纤维细胞浸润为主, 合成的胶原沉积填充网孔, 见大量毛细血管, 无炎性细胞(图 1b).

2.2 人工真皮替代物的构建

人工真皮替代物的组织学观察结果见图 2. 细胞核呈蓝色, 支架的胶原纤维呈粉红色.

2.3 人工真皮替代物的移植实验

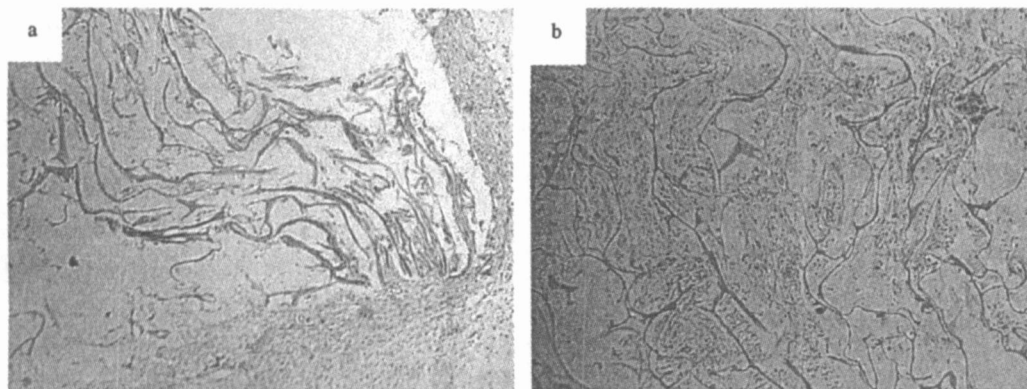


图 1 胶原-壳聚糖海绵支架在皮下埋植后不同时间的组织学观察(HE ×100)

a. 埋植后第 3 天; b. 埋植后第 21 天

Fig. 1 Histological observation of the collagen-chitosan sponge scaffold at different time (HE ×100)

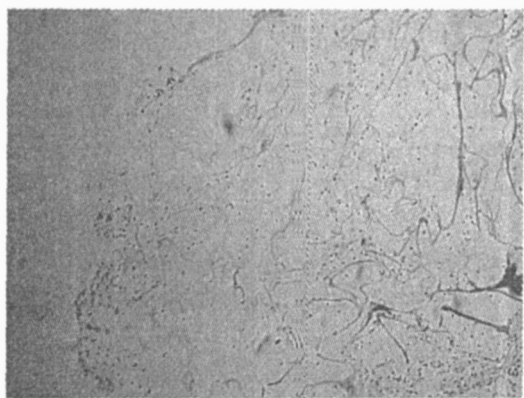


图2 培养1周的人工真皮替代物 HE染色(×100)

Fig. 2 Histological observation of the artificial dermal substitute (HE ×100)

2.3.1 创面大体观察

术后实验动物创面均未感染,动物摄食饮水正常。术后第3天,实验组人工真皮替代物与创面粘附较好,创周可见轻微红肿,无膜下积液;对照组揭开油纱后可见创周红肿。第7天人工真皮替代物完全粘附于创面上,透过皮片观察创面有所缩小,创周红肿基本消退;对照组创面见鲜红湿润的颗粒状组织增生,创周轻微红肿。第14天实验组人工真皮替代物粘附于创面,伤口愈合较好;对照组创面颗粒状组织进一步增多。第

21天实验组创面基本愈合;对照组创面仍有部分未愈合。第28天两组创面均完全愈合,无疤痕形成,愈合处未见毛发生长。

2.3.2 组织形态学观察

术后第3天,实验组人工真皮替代物与创面贴附,创面未见表皮覆盖,缺损达皮下组织,可见组织充血水肿,中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞弥散性浸润;对照组创面组织充血水肿更明显。第7天实验组人工真皮替代物与创面贴附,创缘交界处见新生表皮向创面延伸覆盖,缺损处新生肉芽组织形成,以成纤维细胞增生为主,见新生血管,伴有弥散的炎性细胞(图3a);对照组创面表皮再生,新生肉芽组织中见明显带状充血水肿,成纤维细胞增生,伴大量炎性细胞浸润(图3b)。第14天人真皮替代物结构完整,新生表皮进一步向创面中心长入,肉芽组织中成纤维细胞和新生血管进一步增多,有少量炎性细胞(图3c);对照组创面表皮再生较慢,肉芽组织增生,炎性细胞减少(图3d)。第21天实验组新生表皮完全覆盖创面,真皮层胶原纤维排列规则,未见炎性细胞;对照组新生表皮未完全覆盖创面,成纤维细胞数量减少,未见炎性细胞。第28天两组的组织结构接近正常皮肤。

2.3.3 创面面积

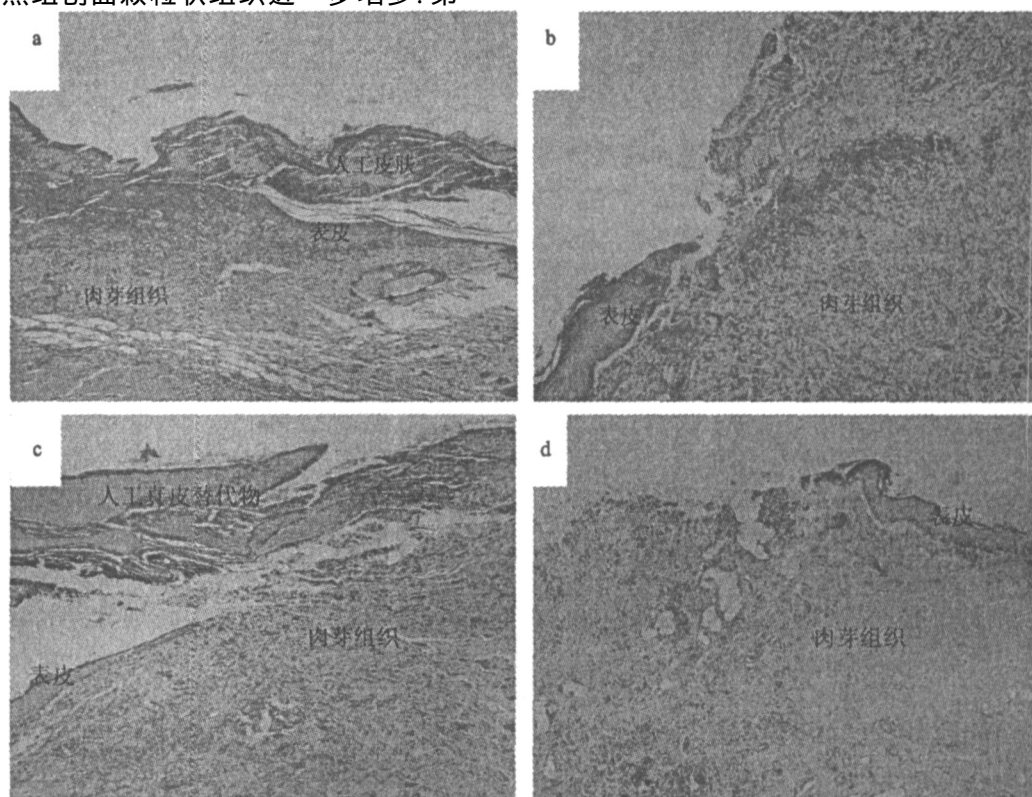


图3 术后不同时间组织学观察(HE ×100)

a. 实验组术后第7天;b. 对照组术后第7天;c. 实验组术后第14天;d. 对照组术后第14天

Fig. 3 Histological observation of each group at different time (HE ×100)

表 1 不同时间各组创面面积变化 ($\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$)Tab. 1 Area changes of each group at different time ($\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$)

分 组	术后时间/ d				
	3	7	14	21	28
实验组	46.57 $\pm$ 7.09	28.99 $\pm$ 4.95	17.95 $\pm$ 2.86 *	0.51 $\pm$ 0.44 *	0.00 $\pm$ 0.00
对照组	53.14 $\pm$ 5.97	53.19 $\pm$ 6.81	40.23 $\pm$ 7.07	33.26 $\pm$ 5.92	0.49 $\pm$ 0.42

与对照组比较,实验组创面面积明显缩小; * $p < 0.05$.

创面面积见表 1,术后各时间点实验组创面面积均小于对照组,术后第 14 天和第 21 天,实验组创面面积明显小于对照组 ($p < 0.05$),差异具有统计学意义。

3 讨 论

在皮肤创伤愈合过程中真皮成分起重要的作用,真皮组织不仅提供牢固的机械保护,改善创面愈合的外观和质地,而且对上皮细胞生长分化以及胶原纤维再生起着相当重要的作用。真皮结构促进成纤维细胞合成分布合理的新生胶原组织,防止瘢痕的过度增生^[8]。所以,要获得良好的创面愈合质量,真皮的构建就显得非常重要。

胶原是哺乳动物体内含量最丰富的蛋白质,真皮组织约 70 %的成分是胶原,它具有良好的生物相容性和细胞亲和性,有利于细胞的附着与生长,可促进创伤愈合。壳聚糖是与硫酸软骨素具有类似结构的多糖类物质,具有可降解、无免疫原性、能促进创面愈合^[9]、其本身及降解产物具有抗菌活性^[10]等优良性能。而且胶原和壳聚糖的成本低廉、来源广泛,是制备组织工程皮肤的理想材料。因此本实验以胶原和壳聚糖为原料,模拟天然皮肤的真、表皮结构,制备出双层胶原-壳聚糖海绵,构建了组织工程皮肤双层支架,支架外层可有效防止外界细菌的入侵,内层可提供细胞增殖的空间,促进细胞增殖。

双层胶原-壳聚糖海绵支架的皮下埋植实验结果表明,胶原-壳聚糖海绵支架具有良好的组织相容性。皮下埋植 4 周人工真皮替代物仍未降解,考虑支架经低浓度戊二醛溶液交联后,壳聚糖的游离氨基和胶原的羟基之间形成了稳定的碳氮共价键,提高了支架的强度,降低了支架对体内胶原酶的敏感性,从而延缓了人工真皮替代物在体内的降解速度,这样就为引导非炎性结缔组织的填充和促进创面愈合赢得了时间^[11-12]。

将 SD 大鼠成纤维细胞种植在双层胶原-壳聚糖海绵支架上,体外构建的组织工程真皮替代物,其特点是结构和成分接近真皮,支架是生物可降解材料,可以

自然降解吸收,其中支架外层还起到了类似表皮的保护作用。将其移植于大鼠皮肤缺损创面,术后第 3、7、14 天,对照组组织充血水肿、炎性渗出和炎性细胞浸润比实验组更明显,提示该人工真皮替代物在创伤后的前 2 周可能具有减轻创口炎症反应的作用。创面面积测定和组织学观察显示该人工真皮能够促进创面的愈合,并起到了诱导上皮再生、加速生理性真皮形成的作用。然而,由于该人工真皮替代物含有异体的细胞和蛋白质,当应用于临床时可能会引起宿主的免疫排斥反应,针对这种情况,除了全身和局部应用抗生素和免疫调节剂外,还可以在人工真皮替代物表面建立药物缓释系统,赋予其一定的免疫调节和抗菌消炎等治疗功能。相信在不久的将来该组织工程真皮替代物可望用于皮肤缺损的修复治疗。

参考文献:

- [1] Steven T Boyce. Fabrication, quality assurance, and assessment of cultured skin substitutes for treatment of skin wounds[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 20: 107 - 112.
- [2] Balasubramani M, Kumar T R, Babu M. Skin substitutes: a review[J]. Burns, 2001, 27: 534 - 544.
- [3] Shanmugasundaram N, Ravichandran P, Reddy P N, et al. Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells[J]. Biomaterial, 2001, 22: 1943 - 1951.
- [4] Yang Hongyi, Zhang Qiqing. Preparation and characterization of collagen-GAGs bioactive matrices for tissue engineering[J]. J Mater Sci Technol, 2001, 17: 495 - 500.
- [5] 关嫚,任磊,吴婷,等. 新型双层皮肤组织工程支架的构建[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45(3): 379 - 382.
- [6] Freshney R I. 动物细胞培养[M]. 北京:科学出版社, 2004.
- [7] 郑军,黄晓元,韦星. 重组人表皮生长因子促进大鼠皮肤创面愈合的研究[J]. 中华整形外科杂志, 2005, 21: 379 - 383.
- [8] Livesey S A, Herndon D N, Hollyoak M A, et al. Transplanted acellular allograft dermal matrix: potential as a template for the reconstruction of viable dermis [J].

- Transplantation,1995,60:1.
- [9] Donate I, Stredanska S, Silvestrini G, et al. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan[J]. Biomaterials, 2005, 26: 987 - 998.
- [10] Tomihata K, Ilicada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives[J]. Biomaterials, 1997, 18: 567 - 573.
- [11] Ma Lie, Gao Changyou, Mao Zhengwei, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering[J]. Biomaterials, 2003, 24: 4833 - 4841.
- [12] Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, et al. Characterization of skin reconstructed on chitosan-cross-linked collagen glycosaminoglycan matrix[J]. Skin Pharmacol, 1990, 3: 107.

Construction of Tissue Engineered Dermal Substitutes and Its Effect on Wounds Repairing

LI Jing, SUN Li-ping^{*}, YE She-fang, ZHANG Jian-feng,

LI Hui, WANG Xiu-yan, GUAN Man, ZHANG Qi-qing^{*}

(Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : A tissue engineered dermal substitute is developed to provide skin wounds healing of rats. The skin graft replacement has been designed as a dermal substitute comprising dermal fibroblast cells isolated from rat skin. The dermal substitute is constructed by a bilayer collagen-chitosan sponge scaffold, into which rat fibroblasts are seeded. Its tissue compatibility was studied by transplantation test on full-thickness wounds of SD rats. Subcutaneous implantation test shows early inflammatory response, which alleviated gradually after one week. The fibroblasts and capillary vessels grow into the porous sponge scaffold. Histological observations indicate that epidermis regeneration and acanthosis hyperplasia of the experimental group are more obvious than that of the control group on the 7th day and 14th day after transplantation. The healing rate of the experimental group is significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$) on the 14th day and 21st day. These experiments provide evidence that the tissue engineered dermal substitute has good biocompatibility and promotes wounds healing. It could be a potential artificial dermal substitute to repair the skin defect.

Key words : collagen-chitosan; dermal substitute; biocompatibility