文章编号:1000-5404(2005)10-0985-03

论著

组织工程皮肤分泌细胞因子的初步研究

杨亚东,朱堂友,伍津津,雷 霞,毕建军 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆市创伤愈合与组织工程研究所,重庆 400042)

提 要: 目的 研究组织工程皮肤培养液中IL-1β、IL-6和IL-8的分泌情况。**方法** 收集组织工程皮肤制备过程中单层成纤维细胞(fibroblast, FB)培养液、胶原凝胶真皮替代物(dermal equivalent, DE)、复合壳多糖DE和复合壳多糖皮肤替代物(skin equivalent, SE)培养液标本,ELISA法检测其中IL-1β、IL-6和IL-8分泌量。**结果** 复合壳多糖真皮基质促进FB、角质形成细胞(keratinocyte KC)分泌IL-6、IL-8。SE分泌的IL-6、IL-8在DE加KC之后和SE形成分层表皮时形成两个高峰。**结论** FB、KC在壳多糖组织工程皮肤中混合器官型培养时分泌IL-6和IL-8较明显,这些细胞因子可在创面愈合中发挥重要作用。

关键词: 壳多糖;组织工程皮肤;白细胞介素;创面愈合
中图法分类号: R318.19; R322.99; R392.11 **文献标识码**: A

Pilot study on secretion of IL-1β, IL-6 and IL-8 in cultured tissue-engineered skin

YANG Ya-dong, ZHU Tang-you, WU Jin-jin, LEI Xia, BI Jian-jun (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the secretion of IL-1β, IL-6 and IL-8 in cultured tissue-engineered skin. **Methods** IL-1β, IL-6 and IL-8 from the culture medium of monolayer fibroblast (FB), collagen dermal equivalent (DE), composite chitosan DE, and composite chitosan skin equivalent (SE) were detected by ELISA. **Results** Composite chitosan dermal matrix could promote FB and keratinocyte (KC) to secrete IL-6, IL-8. There were two rush hours of IL-6, IL-8 secretion from SE, after KC to DE and epidermal stratification of SE were added. **Conclusion** Chitosan can facilitate FB and KC to secrete IL-6 and IL-8 in cultured tissue engineering skin and benefit wound healing process.

Key words: chitosan; tissue engineered skin; interleukin; wound healing

创面愈合过程可分为炎症、组织形成和组织重建3个主要阶段,各阶段相互重叠,每个阶段都有大量细胞因子参与。移植组织工程皮肤修复创面时,组织工程皮肤所含活细胞分泌的细胞因子参与并影响创面愈合过程及结果。IL-1β、IL-6、IL-8是参与炎症反应的重要细胞因子,在创面愈合中发挥重要作用。本研究检测复方壳多糖组织工程皮肤培养液中的IL-1β、IL-6和IL-8的分泌情况,观察壳多糖基质对细胞分泌白细胞介素的影响,并探讨组织工程皮肤分泌细胞因子对移植后创面愈合的影响。

基金项目:国家"863"计划专题(2003AA205022),重庆市重点攻关课题(2003-7897)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2003AA 205022) and the Foundation for the Key Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-7897)
作者简介:杨亚东(1974-),男,四川省渠县人,硕士研究生,医师,主要从事组织工程皮肤及其在美容整形外科等应用方面的研究。电话:(023)68757449
通讯作者:伍津津,电话:(023)68757478,E-mail: Wjjjj@163.com
收稿日期:2005-01-11;**修回日期**:2005-03-15

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

人IL-1β、IL-6、IL-8 ELISA试剂盒:晶美公司进口分装;DMEM培养基:Gibco公司、Hyclone公司;壳多糖、硫酸软骨素C:Sigma公司;二氧化碳孵箱TC2323型:SHEL LAB公司;超净工作台:苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;十万分之一电子天平:德国赛多利斯公司;24、12、6孔培养板:CORNING、FALCON;低温高速离心机:武汉科学仪器厂;酶标仪:英国Denley dragon。

1.2 皮肤标本来源

包皮标本10例,来源于皮肤科接受包皮环切术者。入选要求:年龄小于18岁;无疱疹、疣及其它皮肤病变的包皮。术后标本立即以生理盐水浸泡送实验室备用。

1.3 KC及FB的分离培养及DE胶原凝胶和复合壳多糖SE的制备

按李伟等[1]的方法分离培养。分别留取单层FB培养48、72 h的DMEM培养液。按朱堂友等[2]的方法制备胶原凝胶DE、SE。分别在DE培养的1、3、5、7 d,SE培养的1、3、5、7、9 d

收集培养液。按朱堂友等方法制备复合壳多糖 DE、SE，在 DE 培养的 1、3、5、7、9 d 和 SE 培养的 1、3、5、7、9、11、13、15 d 分别收集培养液。

上述各类培养液每次取样分别取 3 个复孔，标记，－20 ℃冻存。测量前 30 min 解冻。

1.4 ELISA 法检测 IL-1β、IL-6、IL-8

将收集的标本按取样来源分组，检测步骤：①按说明书要求的浓度稀释标准品、浓缩洗涤液、生物素化检测抗体和酶结合物（辣根过氧化酶标记的亲合素）；被检标本稀释 3 倍；②加样：按说明书要求的量加入不同浓度标准品和标本；③加生物素化检测抗体工作液，封板胶封住反应孔，室温共同孵育 1～2 h；④洗板 4 次；⑤加酶结合物工作液，封板胶封住反应孔，室温共同孵育 30 min（IL-6 检测时步骤 3 和 5 同时加入）；⑥洗板 4 次；⑦显色：加入显色剂 A、显色剂 B，避光、室温孵育 5～15 min；⑧每孔加终止液 1 滴，混匀，立即测量 D(450)值。

1.5 统计学分析

微软 EXCEL 软件进行单因素方差分析和回归分析。均数间差别显著性检验多重比较用 FLSD 法。任两组均数之差大于 FLSD 则这两组均数间差别有显著性。回归分析的可决系数 $R^2 = r^2 = SS_D/SS_T$，值越大，回归效果越好。

2 结果

根据测定的 D 值减去空白对照绘制标准对照图 1、2。对测定数据的回归分析显示，IL-1β $F = 524.598\ 5$，$P < 0.000\ 1$，$r^2 = 0.992\ 4$；IL-6 $F = 522.767\ 0$，$P < 0.000\ 1$，$r^2 = 0.992\ 4$；IL-8 $F = 74.231$，$P < 0.001$，$r^2 = 0.948\ 9$。均显示浓度与 D(450)值之间有非常显著的线性相关。单层 FB 培养液、胶原凝胶 DE、SE 培养液、复合壳多糖 DE、SE 培养液 IL-1β 的量极微，均未测到。对于 IL-6 和 IL-8，复合壳多糖 SE 和胶原凝胶 SE 分泌水平分别远远高于复合壳多糖 DE 和胶原凝胶 DE，FB 在凝胶中分泌大于单层培养，以 IL-6 最明显。复合壳多糖 SE 与胶原凝胶 SE 分泌的 IL-6、IL-8 及复合壳多糖 DE 与胶原凝胶 DE 分泌的 IL-8 具有显著性差异（$P < 0.01$）。复合壳多糖 DE 与胶原凝胶 DE 分泌的 IL-6 间差异也有统计学意义（$P < 0.05$），见图 3。复合壳多糖 SE 分泌的 IL-6、IL-8 均有两个高峰，分别在 DE 加 KC 之后（3～5 d）和 SE 形成分层表皮时（13～16 d）（图 4）。

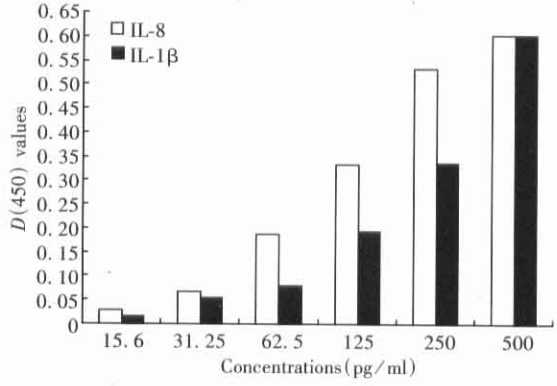


图 1 IL-1β 和 IL-8 标准对照

Fig 1 The standard comparison of IL-1β and IL-8

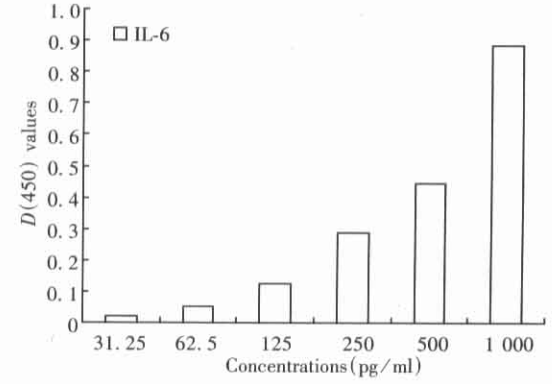
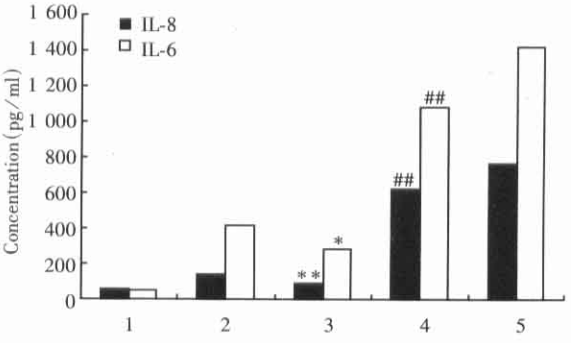


图 2 IL-6 标准对照

Fig 2 The standard comparison of IL-6



1: Fibroblast; 2: Chitosan DE; 3: Collagen DE; 4: Collagen SE; 5: Chitosan SE; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* 2; ##: $P < 0.01$, *vs* 5

图 3 单层培养 FB 与两种 DE、SE 分泌的 IL-6、IL-8 比较

Fig 3 The comparison of IL-6 and IL-8 from monolayer FB, DE and SE

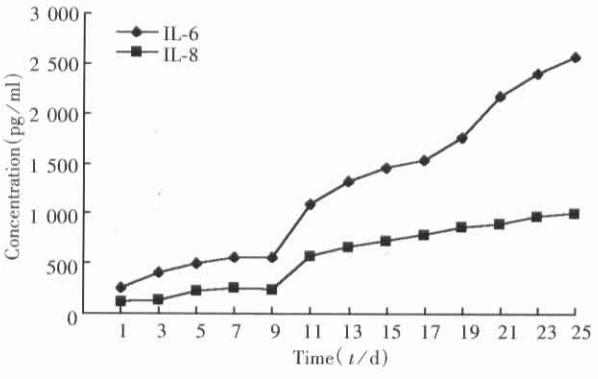


图 4 组织工程皮肤分泌 IL-6、IL-8 的变化情况

Fig 4 The curve of the secretion IL-6 and IL-8 in cultured tissue engineered skin

3 讨论

正常人体皮肤中未受刺激的人 KC 和 FB 均可产生 IL-8、IL-6 和 IL-1。KC 分泌的 IL-6 和 IL-1（主要是 IL-1α）水平较低，FB 主要产生 IL-6 和 IL-8，产量比 KC

大。ELISA 测定白细胞介素的结果受细胞数、细胞来源部位、培养基种类、取上清液时间等的影响，KC 和 FB 在胶原糖胺聚糖(glycosaminoglycan，GAG)海绵人工皮肤中能协同增加 IL-6 的表达[3]。我们的结果表明，凝胶中 FB 分泌的 IL-6 和 IL-8 均高于单层培养，以IL-6 最为显著；SE 又远远高于 DE，KC 和 FB 有协同增加 IL-6 和 IL-8 分泌的作用。Konstantinova 等[4]在用胶原凝胶人工皮肤模型研究银屑病时发现 IL-8 在凝胶 DE 中分泌显著高于单层培养，胶原凝胶 SE 分泌 IL-8 有两个高峰：第 1 个高峰在单层表皮形成后，第 2 个分泌高峰在形成分层表皮时。我们的检测结果也表明，复合壳多糖 SE 分泌 IL-6 和 IL-8 分泌高峰在加 KC 之后，在形成分层表皮过程中分泌逐渐增高。

资料表明，壳多糖磺化衍生物可影响内皮细胞的功能，促进培养的人内皮细胞分泌 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α。ELISA 检测结果表明复合壳多糖 DE、SE 分泌的 IL-6 和 IL-8 分别比胶原凝胶 DE、SE 高，且差别有显著性($F > Fc$ 值，$P < 0.01$，$P < 0.05$)，提示壳多糖能增加人工皮肤细胞因子的分泌。Hansbrough 等[5]在对壳多糖-胶原混合基质的研究中也发现，壳多糖增强 FB 释放细胞因子的功能。

创伤愈合过程是在多种细胞因子参与和调控下完成的。上皮靶性的生长因子，如 EGF 和最新的 KGF，在治疗难愈性的皮肤伤口和急性大面积缺损的表皮伤口中具有潜力。KC 和 FB 是分泌细胞因子的主要细胞。在损伤刺激下，KC 和 FB 的分泌功能被激活。FB 通过旁分泌效应对 KC 产生促有丝分裂和诱导迁移效应。活性 SE 所含细胞成分同样具有功能，其所分泌的细胞因子不仅可调节自身 KC、FB 的生长，在移植到创面后，还能提供创面愈合所需的生长因子，促进创面愈合[6]。IL-1β、IL-6、IL-8 与创伤愈合和炎症反应有密切关系[7]，在创面愈合中发挥重要的作用。IL-1β 是噬中性粒细胞和巨噬细胞的化学趋化因子，已应用于压力性溃疡的治疗。有学者检测了实验大鼠皮肤创面中 IL-6 水平及 IL-6 受体的含量，对比研究表明 IL-6 高水平表达的表皮缺损创面愈合明显较快，证明 IL-6 在创面愈合中具有十分重要的作用[8]。IL-1β、IL-6、IL-8 还可以与 TNF、HGF 等因子协同[9,10]，刺激创面基底部的自体 FB 增殖及毛细血管的新生，在移植组织工程皮肤后新生的毛细血管很快长入移植物，建立营养供应，保证移植物的良好成活，为创面修复打下基础。复方壳多糖组织工程皮肤是含表皮真皮成分的复合皮，其所含 KC 及 FB 具有分泌细胞因子的功能，从而为其在创面愈合中更好的发挥作用提供条件。

参考文献：

[1] 李　伟，伍津津，吴国选，等. 人角质形成细胞库的建立[J]. 第三军医大学学报，2004，26(11)：987－989.

[2] 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制备[J]. 重庆医学，2002，31(10)：940－942.

[3] Wang C K，Nelson C F，Brinkman A M，*et al*. Spontaneous cell sorting of fibroblasts and keratinocytes creates an organotypic human skin equivalent [J]. J Invest Dermatol，2000，114(4)：674－680.

[4] Konstantinova N V，Lemak N A，Duong D M，*et al*. Artificial skin equivalent differentiation depends on fibroblast donor site：use of eyelid fibroblasts[J]. Plast Reconstr Surg，1998，101(2)：385－391.

[5] Hansbrough J F，Mozingo D W，Kealey G P，*et al*. Clinical trials of a biosynthetic temporary skin replacement，Dermagraft-Transitional Covering，compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds[J]. J Burn Care Rehabil，1997，18(1 Pt 1)：43－51.

[6] Auger F A，Rouabhia M，Goulet F，*et al*. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels：clinical and fundamental applications[J]. Med Biol Eng Comput，1998，36(6)：801－812.

[7] Yang E K，Yoon H H，Lee D H，*et al*. Assessment of toxic potential of industrial chemicals using a cultured human bioartificial skin model：production of interleukin 1alpha and hydroxyeicosatetraenoic acids[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol，2000，13(5)：246－257.

[8] Wang X P，Schunck M，Kallen K J，*et al*. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis[J]. J Invest Dermatol，2004，123(1)：124－131.

[9] Takami Y，Motoki T，Yamamoto I，*et al*. Synergistic induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by the inflammatory cytokines interleukin-1 and interferon-gamma[J]. Biochem Biophys Res Commun，2005，327(1)：212－217.

[10] Zhao R Z，Chen X，Yao Q，*et al*. TNF-alpha induces interleukin-8 and endothelin-1 expression in human endothelial cells with different redox pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun，2005，327(4)：985－992.

(编辑　薛国文)