文章编号:1000-5404(2006)06-0521-02

论著

组织工程真皮抗张强度的初步研究

周 凌,伍津津,杨亚东,朱堂友,鲁元刚 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042)

提 要:目的 采用高敏度小张力膜状生物材料力学性能测定仪检测组织工程真皮的抗张强度。**方法** 分别培养含有不同数量成纤维细胞的胶原凝胶和复方壳多糖真皮替代物,15 d后检测抗张强度。**结果** 组织工程真皮抗张强度随成纤维细胞数量增多而增强($P<0.01$),复方壳多糖人工真皮的抗张强度高于胶原凝胶真皮($P<0.01$)。**结论** 复方壳多糖真皮替代物具有良好的抗张强度,为临床应用提供稳定机械性能。

关键词:高敏度小张力膜状生物材料力学性能检测仪;壳多糖;组织工程真皮;成纤维细胞
中图法分类号:R318.08;R322.99 **文献标识码**:A

Primary study of VEGF secreted by cultured tissue engineered dermal equivalents

ZHOU Ling, WU Jin-jin, YANG Ya-dong, ZHU Tang-you, LU Yuan-gang (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To measure the tensile strength of tissue engineering dermal equivalent with mechanical property device for high-acuity micro-tension lemma. **Methods** Collagen dermal equivalent and composite chitosan dermal equivalent with different quantities of fibroblasts were cultured for 15 d and were measured of the tensile strength. **Results** The tensile strength of tissue engineering dermal equivalents was strengthened with the increase of fibroblasts ($P<0.01$). The tensile strength of composite chitosan dermal equivalent was stronger than that of collagen dermal equivalent with the same amount of fibroblasts ($P<0.01$). **Conclusion** Composite chitosan skin equivalent has better tensile strength amd stable mechanic property for clinic application.

Key words: mechanical property device for high-acuity micro-tension lemma; chitosan; tissue engineered dermal equivalent; fibroblast

皮肤作为机体抵抗外界不良环境的屏障,具有多种功能,其生物力学性能保证了其抵抗外界拉力、压力等物理因素影响的能力。皮肤具有一定的弹性和韧性,其张力大小主要取决于真皮胶原纤维的机械特性和编织模式[1]。有学者已对生物皮肤在扩张等作用下的生物力学性能[2]进行了大量研究,但尚少见到对组织工程皮肤生物力学性能检测的报道。我们培养的复方壳多糖组织工程真皮有良好的弹性和韧性,能耐受一定的拉力和压力,可以任意剪切和缝合。为此,我们与重庆大学联合研制了高敏度小张力膜状生物材料力学性能检测仪,用以量化复方壳多糖组织工程真皮的抗张强度。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器

高敏度小张力膜状生物材料力学性能检测仪(本实验室与重庆大学机械工程学院联合制造);DMEM培养基(Hyclone公司);新生牛血清(民海生物);壳多糖、硫酸软骨素、透明质酸(Sigma公司)。

1.2 成纤维细胞的分离与培养

所需细胞来源于皮肤科门诊提供的18岁以下健康人包皮。成纤维细胞(FB)原代培养采用两步酶法,培养基为10%新生牛血清的DMEM。

1.3 胶原凝胶人工真皮的制备

按我科建立的方法[3]在冰浴条件下制备胶原凝胶人工真皮基质,调pH值后,将成纤维细胞分别按$5\times10^5/cm^2$、$2.5\times10^5/cm^2$、$10^5/cm^2$、$5\times10^4/cm^2$、$2.5\times10^4/cm^2$、$10^4/cm^2$迅速加入真皮基质并混匀,制成胶原凝胶真皮替代物,吸入6孔板中,厚度0.5~0.7 mm,每个细胞密度各接种6孔,加入10%新生

基金项目:国家高技术研究发展计划("863")资助项目(2003AA205022)和重庆市攻关课题(2003-7897)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2003AA205022) and the Key Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Chongqing (2003-7897)
作者简介:周 凌(1977-),女,湖南省湘潭市人,硕士研究生,医师,主要从事组织工程皮肤血管化方面的研究。电话:(023)68757448
通讯作者:伍津津,电话:(023)68757478
收稿日期:2005-10-21;修回日期:2006-01-04

牛血清的 DMEM 培养基，置 37 ℃ 5% CO_2 孵箱内培养，每天换液 1 次。

1.4 复方壳多糖人工真皮的制备

按我科建立的方法[4]在冰浴条件下制备复方壳多糖人工真皮基质，调 pH 值后，将成纤维细胞按 1.3 中的浓度迅速加入真皮基质并混匀，制成复方壳多糖真皮替代物，培养基和培养方法同 1.3。

1.5 组织工程真皮抗张强度检测

用镊子取出培养 15 d 的复方壳多糖真皮和胶原凝胶真皮替代物，置于高敏度小张力膜状生物材料力学性能检测仪载物台上，安好夹头，测量抗张强度。

1.6 统计学处理

检测结果用 SPSS 10.0 进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 含有不同成纤维细胞数量的复方壳多糖人工真皮和胶原凝胶人工真皮的抗张强度

复方壳多糖人工真皮和胶原凝胶人工真皮抗张强度的均值都随成纤维细胞数量增加而增加（图 1）。

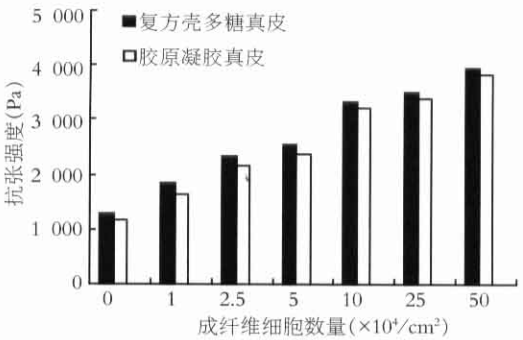


图 1 不同成纤维细胞含量的两种人工真皮的抗张强度

2.2 成纤维细胞数量和真皮基质对组织工程真皮抗张强度的影响

经双因素方差分析，成纤维细胞数量对组织工程真皮的抗张强度有显著影响（$P<0.01$），而且任意两种成纤维细胞浓度的组织工程真皮的抗张强度都有显著差异（$P<0.01$）。真皮基质的不同对组织工程真皮的抗张强度也有显著影响（$P<0.01$），复方壳多糖真皮替代物的抗张强度高于胶原凝胶真皮替代物。成纤维细胞数量和真皮基质间无交互作用（$P>0.05$）。

3 讨论

组织工程是近 10 年来兴起的一个新的前沿领域，种子细胞的培养、可降解生物材料及构架制备是组织工程的两个重要基础。生物力学是生物医学工程的重要基础。组织机械抗张强度是组织生物力学性能的重要指标，而真皮的基本成分胶原纤维，是皮肤的主要抗压力物质。成纤维细胞合成分泌的胶原蛋白和基质网架成分，其主要作用就是承受机械强度、赋予弹性和韧性。

本实验测定了含不同数量成纤维细胞的复方壳多糖组织工程真皮的抗张强度，结果表明组织工程皮肤的抗张强度随成纤维细胞数目的增加而增强。成纤维细胞还能分泌各种生长因子，刺激自体细胞增殖。成纤维细胞越多，合成胶原纤维等细胞外基质的能力越强，胶原纤维趋于平行，排列紧密，抗张强度就越大。

本实验分别测量了含有复方壳多糖真皮和胶原凝胶真皮的抗张强度，结果表明含有复方壳多糖的真皮基质对组织工程真皮的抗张强度有显著影响。壳多糖不仅能刺激成纤维细胞增殖，而且其释放的单糖磷酸化后可整合到透明质酸、硫酸软骨素中，形成细胞外基质[5]，与成纤维细胞相互作用，有利于胶原的沉积，提高抗张强度。壳多糖的纤维刚性结构也可增强真皮基质的机械耐受力，并延缓胶原酶对胶原纤维的降解[6]，弥补了胶原热稳定性差、降解速度快等缺陷，有利于保持组织工程皮肤的抗张强度。

国外报道皮肤生物力学动力检测器检测人体皮肤的生物力学性能具有较高的准确度和可靠性[7]，但尚无量化组织工程皮肤生物力学性能的报道。我们自行研制的检测装置专门针对小张力的组织工程皮肤等膜状生物材料的抗张强度的检测，经反复实验，敏感性和稳定性较好。本实验用自行研制的高敏度小张力膜状生物材料力学性能检测仪测量了组织工程真皮的抗张强度，表明复方壳多糖组织工程真皮具有较好的抗张强度，可为临床应用提供稳定机械性能。

参考文献：

[1] THACKER J G, STALNECKER M C, ALLAIRE P E, *et al*. Practical applications of skin biomechanics[J]. Clin Plast Surg, 1977, 4(2): 167－171.

[2] ZENG Y J, LIU Y H, XU C Q, *et al*. Biomechanical properties of skin *in vitro* for different expansion methods[J]. Clin Biomech (Bristol Avon), 2004, 19(8): 853－857.

[3] 伍津津，刘荣卿，叶庆佾，等. 成纤维细胞胶原凝胶培养研究[J]. 第三军医大学学报，1999，21(1)：16－18.

[4] 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.

[5] 姚子昂，吴海歌，刑福有，等. 壳聚糖在组织工程中应用的研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2003，23(10)：32－36.

[6] 朱堂友，伍津津，胡 浪，等. 复方壳多糖皮肤替代物的制备[J]. 中华创伤杂志，2002，18(10)：625－626.

[7] DAWES-HIGGS E K, SWAIN M V, HIGGS R J, *et al*. Accuracy and reliability of a dynamic biomechanical skin measurement probe for the analysis of stiffness and viscoelasticity[J]. Physiol Meas, 2004, 25(1): 97－105.

（编辑 王 红）