DOI:10.16016/j.1000-5404.201503043

论著

壳聚糖/藻酸盐纳米膜在促进小鼠全层损伤皮肤创面愈合中的作用

孔 易[1],徐 瑞[1],邢梦秋[2],贺伟峰[1],罗高兴[1],吴 军[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1];MBR3T 2N2, 温尼伯,加拿大曼尼托巴大学机械工程学院[2])

[**摘要**] **目的** 评价复合生物材料壳聚糖/藻酸盐纳米膜作为组织工程的细胞支架材料,通过促进小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)在其表面的粘附、迁移、增殖及分化,从而加速皮肤创面修复的效果。**方法** 实验动物为 BALB/c 小鼠,8 周龄,于各小鼠背部制备皮肤缺损创面模型。实验先分 2 组,实验组小鼠背部创面以壳聚糖/藻酸盐纳米膜覆盖,对照组不予该纳米膜覆盖创面,直接粘贴手术贴巾,并分别围绕创缘皮下注射等量绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的骨髓间充质干细胞(GFP-MSCs),在术后进行小动物活体成像观察绿色荧光蛋白信号强度,用流式细胞仪检测阳性 GFP-MSCs 比例,并取创面新生组织行冰冻切片观察 GFP-MSCs 生长情况;再分别设置空白对照组、纳米膜组、MSCs 注射组和纳米膜 + MSCs 注射组,观察术后各组小鼠创面愈合情况。**结果** 实验组小鼠术后第 7 天的创面 GFP 信号强度[$(25.97 \pm 6.98) \times 10^4$]明显高于对照组[$(6.00 \pm 2.84) \times 10^4$, $P < 0.05$];流式细胞仪检测创面 GFP-MSCs 水平,术后第 5 天实验组阳性率[(66.78 ± 7.00)%]明显高于对照组[(33.58 ± 3.62)%, $P < 0.01$],第 7 天实验组阳性率[(53.03 ± 3.15)%]明显高于对照组[(34.20 ± 7.98)%, $P < 0.01$];术后第 14 天小鼠新生组织中 GFP-MSCs 密度实验组[(101.00 ± 15.51)个/视野]明显高于对照组[(25.25 ± 5.07)个/视野, $P < 0.05$];创面愈合观察发现纳米膜 + MSCs 注射组创面愈合速度快于其他 3 组($P < 0.05$)。**结论** 壳聚糖/藻酸盐纳米膜用于皮肤创面,可促进 MSCs 在体内粘附、生长、分化、迁移,进而促进皮肤组织修复,加速创面愈合,是一种良好的细胞支架材料。

[**关键词**] 壳聚糖/藻酸盐;纳米膜;组织工程;细胞支架;创面愈合
[**中图法分类号**] R318.08; R64 [**文献标志码**] A

Chitosan/alginate nanomembrane promotes healing of full-thickness wounds in mice

Kong Yi[1], Xu Rui[1], Malcolm M. Q. Xing[2], He Weifeng[1], Luo Gaoxing[1], Wu Jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; [2]Department of Mechanical Engineering, University of Manitoba, Winnipeg, MBR3T 2N2, Canada)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the efficacy of the chitosan/alginate nanomembrane as cell scaffold material to enhance burn wound healing by promoting the adhesion, migration, proliferation and differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** BALB/c mice (aged 8 weeks) were selected as the experimental animals. A 5-mm diameter full-thickness cutaneous burn wound was inflicted on the depilated dorsal skin in each of mice. Then the animals were firstly divided into 2 groups. The wounds in experimental group were covered with the nanomembrane, while those in control group were not. Equal bone marrow-derived MSCs transduced with green fluorescent protein (GFP) gene were transplanted to the periphery of the skin wounds in both groups of mice. The intensity of the GFP signal was evaluated after

[**基金项目**] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2012AA020504)
[**通信作者**] 吴 军,E-mail:junwupro@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150910.1105.004.html(2015-09-10)

surgery with an *In Vivo* Imaging system. Fluorescence activated cell sorting (FACS) was used to quantify the ratio of the positive GFP-MSCs. Frozen sections of the newly formed tissues were observed respectively to evaluate the survival condition of the GFP-MSCs. Then another groups of mice were divided into blank control group, nanomembrane group, MSCs injected group and nanomembrane + MSCs injected group ($n=8$). The condition of wounds healing in each group were observed and assessed at different time points after surgery. **Results** The expression of GFP was significantly higher in the experimental group than the control group on the 7th day after surgery [intensity of GFP signal $(25.97\pm6.98)\times10^4$ *vs* $(6.00\pm2.84)\times10^4$, $P<0.05$]. Flow cytometry showed that the average percentage of the positive GFP-MSCs was obviously higher in experimental group than that in control group on the 5th day after surgery [$(66.78\pm7.00)\%$ *vs* $(33.58\pm3.62)\%$, $P<0.01$] and on the 7th day [$53.03\pm3.15)\%$ *vs* $(34.20\pm7.98)\%$, $P<0.01$]. Fluorescence microscopy indicated the density of GFP-MSCs in newly formed tissue was greater in experimental group than control group in 14 d after surgery [(101.00 ± 15.51)/horizon *vs* (25.25 ± 5.07)/horizon, $P<0.05$]. The wounds of the namomembrane + MSCs group showed significantly faster healing speed than the other 3 groups ($P<0.05$). **Conclusion** When applied in skin wounds, the chitosan/alginate nanomembrane promotes the adhesion, migration, proliferation and differentiation of MSCs, and can served as a good cell scaffold for reconstruction of skin tissue.

[**Key words**] chitosan/alginate; nanomembrane; tissue engineering; cell scaffold; wound healing

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2012AA020504). Corresponding author: Wu Jun, E-mail: junwupro@126.com

皮肤是人体最大的器官,起着对细菌等有害物质无可替代的天然屏障作用。对于烧伤、创伤以及慢性溃疡等原因导致的皮肤组织损伤,目前最常见的治疗方式是通过自体皮肤移植来达到组织修复的目的。然而对于大面积烧伤的患者,自体皮源不足仍然是存在的巨大难题。同种异体皮和异种皮移植虽然为皮肤创面的修复提供了可能性,但由此引发的免疫排斥反应无法避免[1-4]。因此,皮肤组织工程越来越成为研究重点。细胞亲和力好的生物多聚物材料可作为细胞支架为干细胞在创面的粘附、迁移、生长和分化提供良好的微环境,因而在组织工程方面有着广泛的运用。壳聚糖和藻酸盐均被视为细胞支架材料并广泛运用在组织工程领域[5-6]。本研究以壳聚糖/藻酸盐复合纳米膜为细胞支架材料,通过接种小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),探究其在体内对MSCs粘附、迁移、增殖等的影响,及其运用于全层损伤皮肤中对组织修复和创面愈合的作用和影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物(BALB/c小鼠)由第三军医大学实验动物中心提供,壳聚糖(85%脱乙酰度)和明胶购自美国Sigma公司,藻酸盐(低黏度)购自美国Alfa Aesar公司,7-氨基放线菌素D(7-AAD)购自美国Life Technologies公司,DAPI染色剂购自中国Beyotime Biotechnology公司。

1.2 实验仪器

透射电子显微镜(LVEM5, Quantum Design公司),小动物活体成像仪(Maestro EX,凯隆国际实业有限公司),倒置荧光显微镜(modelIX70,日本Olympus公司),流式细胞仪(Attune® NxT,美国Life Technologies公司)。

1.3 壳聚糖/藻酸盐超薄游离纳米膜的制备

壳聚糖/藻酸盐超薄纳米膜由加拿大曼尼托巴大学(University of Manitoba)工程学院机械与纺织系实验室研制。实验步骤根据Caridade等[7]的实验方案改进,分别配制5 mg/mL的壳聚糖和藻酸盐水溶液,并分别以0.1 mol/L醋酸调节壳聚糖溶液pH至5.0,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节藻酸盐溶液pH至7.0待用。另配制0.2 g/mL的明胶溶液,在37 ℃水浴中溶解后转入4 ℃冰箱冷却凝固。在室温环境下(约20 ℃),以凝固的明胶作为基底,在其表面分别交替浸泡壳聚糖溶液和藻酸盐溶液。每浸泡一次为1层,总共15层。组装完毕,将壳聚糖/藻酸盐-明胶复合物转入37 ℃去离子水中,随着明胶基底熔化,可得到游离的壳聚糖/藻酸盐纳米膜。

1.4 透射电镜观察纳米膜层层自组装结构

层层自组装完毕后,纳米膜-明胶复合物首先在含

3%戊二醛的0.1 mol/L索伦森缓冲液(Sorensen's Buffer)中浸泡24 h,第2天将样品从溶液中移出,PBS清洗两次后,用含1%四氧化锇(OsO_4)的0.1 mol/L索伦森磷酸盐缓冲液(Sorensen's Phosphate Buffer)再次浸泡2 h。此后,该样品按照以下步骤逐一脱水处理:30%酒精浸泡10 min,50%酒精浸泡10 min,70%酒精浸泡10 min,90%酒精浸泡20 min,100%酒精浸泡30 min。脱水完毕,将样品移入环氧丙烯(PO)中浸泡10 min。移除PO,将样品再置入环氧树脂/PO(50%/50%)混合液中,在室温条件下旋转摇晃3 h。操作完毕后,再加入100%环氧树脂浸泡24 h。第3天,将该样品置入烤箱中,调节温度至60 ℃,维持24 h。样品制作完毕,可存放于室温环境中待用。最后,用透射电镜观察纳米膜横截面层层自组装纳米结构。

1.5 实验动物及分组

8周龄BALB/c小鼠48只,全部以相同方式制作小鼠背部皮肤全层烧伤创面。通过简单随机抽样(抽签法)选取其中8只,分为2组(每组4只),实验组小鼠背部创面以壳聚糖/藻酸盐超薄纳米膜覆盖,对照组不予该纳米膜覆盖创面。2组小鼠分别围绕创缘注射等量的GFP-MSCs,在术后行小动物活体成像观察实验。另以抽签法选取8只小鼠,以同样的分组和实验方式,在术后第5天和第7天用流式细胞仪进行阳性GFP-MSCs比例定量分析,并在术后第14天取创面新生组织冰冻切片观察GFP-MSCs存活情况。余32只小鼠仍以抽签法随机分为4组(每组8只),分别设为空白对照组、纳米膜组、MSCs注射组和纳米膜+MSCs注射组并依次做相应处理,在术后不同时间点观察创面愈合情况。

1.6 小鼠背部全层皮肤损伤模型制备

实验动物予1%戊巴比妥钠腹腔注射(100 mg/kg,0.01 mL/g)麻醉。背部术区备皮后,于俯卧位固定,术区常规碘伏消毒,酒精脱碘。于小鼠背部用打孔器制备直径0.5 cm全层皮肤缺损创面。

1.7 GFP-MSCs在创面接种培养

收集从转基因小鼠分离培养3代的GFP-MSCs,PBS重悬后,制备50 μL含细胞数约为5×10^6的细胞悬液,在距创缘0.3 cm的4个注射点(沿创缘360°每90°选取1个注射点)分别注射培养好的GFP-MSCs(即1只老鼠注射细胞5×10^6个,注射的液体量为50 μL,每个点12.5 μL)。实验组将纳米纤维膜置于小鼠背部创面,展平,用手术粘巾粘贴固定创面上的纳米膜;对照组直接粘贴手术粘巾,并予同样方式注射GFP-MSCs。

1.8 小动物活体成像观察GFP-MSCs荧光信号强度

2组动物在术后7 d打开创面,去除纳米膜后,在小动物活体成像仪下观察创面绿色荧光信号强度,即GFP-MSCs在创面的存活情况。

1.9 流式细胞仪检测

2组动物在术后5、7 d打开创面,去除纳米膜后,取创面组织在干燥的培养皿中剪碎,加适量0.5%胰酶后将混悬液移至离心管,37 ℃消化10 min,再用2倍体积培养基终止消化,吹打,混匀。然后用200目滤网过滤至另一培养皿中即得到创面细胞悬液。4 ℃ 1 000 r/min离心10 min,弃上清,加500 μL PBS重悬,然后转入流式管中。为排除组织中杂质和死细胞,按1∶500加入7-AAD染料,室温避光孵育10 min。最后用流式细胞仪对该混合细胞液进行检测。

1.10 冰冻切片组织学检查

术后14 d麻醉2组动物后取创面部位新生组织,制作8 μm厚冰冻切片,按照以下步骤依次处理:①室温晾干10 min,4 ℃丙酮固定10 min,PBS浸洗5 min×3次;②1% BSA室温封闭1 h,倾去,勿洗;③滴加一抗(兔抗鼠GFP多克隆抗体:1∶200),湿盒内4 ℃过夜;④第2天37 ℃复温20 min,PBS浸洗5 min×3次;⑤滴加FITC-偶联羊抗兔二抗(1∶100),37 ℃孵育1 h,PBS浸洗5 min×3次;⑥DAPI复染10 min,PBS浸洗5 min×3次;⑦抗荧光淬灭封片剂封片;⑧倒置荧光显微镜下观察(×200)。

1.11 创面愈合观察

空白对照组小鼠创面不予任何处理,纳米膜组小鼠创面仅予纳米膜覆盖而不注射MSCs,MSCs注射组小鼠创面仅进行注射MSCs操作而不予纳米膜覆盖,纳米膜+MSCs注射组小鼠创面用纳米膜覆盖,并注射MSCs。在术后第1、3、5、7、9天分别观察各组小鼠创面愈合情况,根据公式计算残余创面所占原创面的百分比。

$$\text{残余创面百分比}=\frac{\text{残余创面面积}}{\text{原始创面面积}}\times100\%$$

1.12 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件,创面愈合实验采用单因素方差分析,均数比较采用t检验,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察壳聚糖/藻酸盐纳米膜结构

壳聚糖/藻酸盐纳米膜经干燥、固定处理后,在透射电镜下可清晰看见其层层自组装结构,表明壳聚糖

和藻酸盐经层层自组装法组装成功。每两层之间的距离约200 nm,纳米膜厚度与层数成正比关系(图1)。

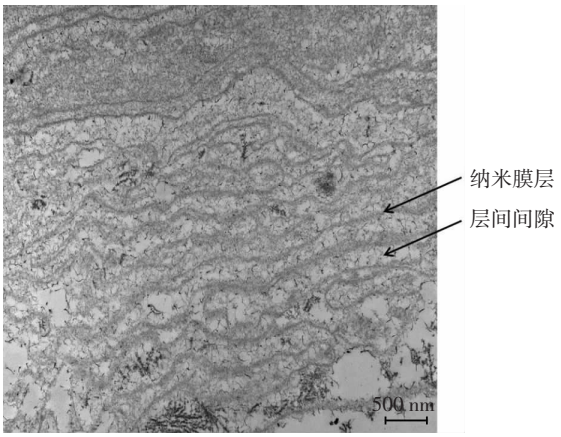
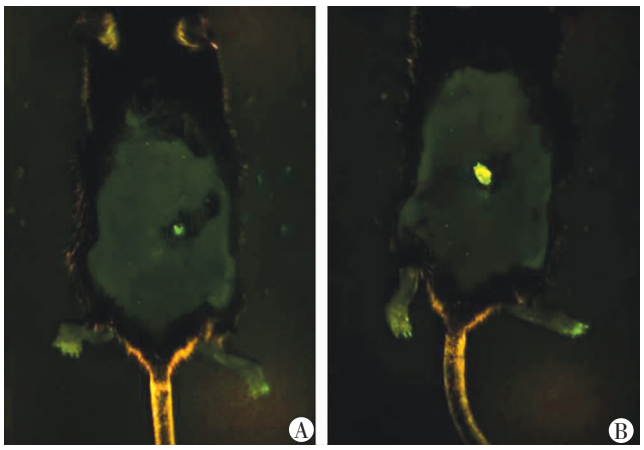


图1 透射电镜观察壳聚糖/藻酸盐纳米膜层层自组装结构

2.2 小动物活体成像检测及GFP-MSCs荧光信号定量分析

背部创面予以壳聚糖/藻酸盐超薄纳米膜覆盖组(实验组)与未予纳米膜覆盖组(对照组)比较,在小动物活体成像仪上可见实验组小鼠创面绿色荧光面积更大,创面中心信号强度更强。荧光定量检测,术后7 d实验组GFP信号强度[$(25.97 \pm 6.98) \times 10^4$]明显高于对照组[$(6.00 \pm 2.84) \times 10^4$,$P<0.05$,图2]。

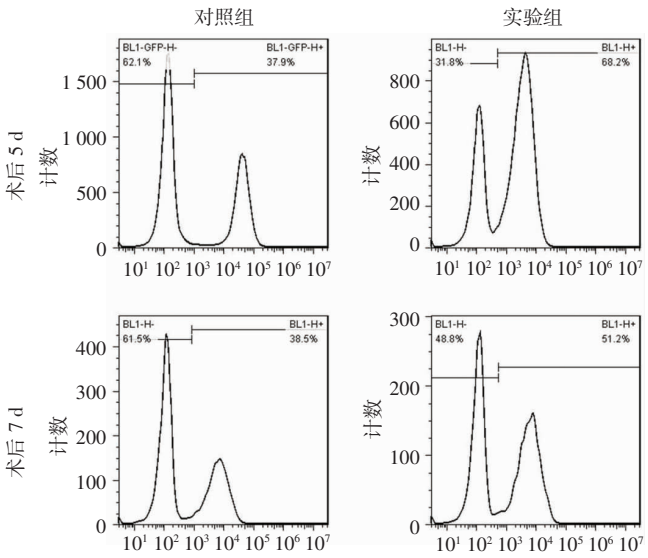


A:对照组;B:实验组

图2 小动物活体成像仪观察术后第7天各组小鼠创面GFP荧光信号强度

2.3 流式细胞仪检测创面组织GFP-MSCs百分比

流式细胞仪检测结果:术后5 d,实验组平均阳性GFP-MSCs百分比(66.78 ± 7.00)%明显高于对照组[(33.58 ± 3.62)%,$P<0.01$];术后7 d,实验组平均阳性GFP-MSCs百分比(53.03 ± 3.15)%明显高于对照组[(34.20 ± 7.98)%,$P<0.01$]。同组两个时相点之间的差别无统计学意义($P>0.05$,图3)。

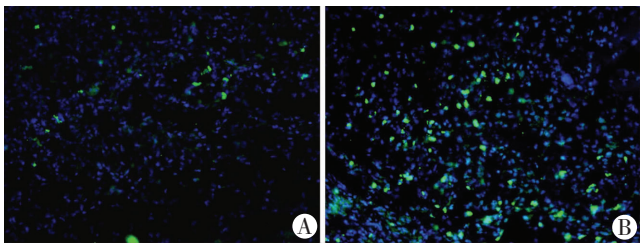


BL1-H-:非GFP标记细胞;BL1-H+:GFP-MSCs

图3 流式细胞仪检测各组小鼠术后5 d和7 d创面组织中GFP-MSCs

2.4 冰冻切片组织学检查

术后14 d取小鼠背部创面新生成组织制作冰冻切片,镜下观察显示实验组新生组织中GFP-MSCs数量及密度均明显高于对照组,随机选取镜下同样大小视野(800 μm × 600 μm)进行绿色荧光细胞计数,实验组为(101.00 ± 15.51)个/视野,对照组为(25.25 ± 5.07)个/视野,实验组荧光细胞数量明显大于对照组($P<0.05$,图4)。



绿色:GFP-MSCs;蓝色:DAPI染色非GFP细胞 A:对照组;B:实验组

图4 术后第14天倒置荧光显微镜观察2组小鼠新生组织GFP-MSCs生长情况 (×200)

2.5 各组小鼠在不同时间点创面愈合情况观察及残余创面比率统计

各组小鼠创面大小均随时间逐渐减小(图5)。纳米膜+MSCs注射组创面随着时间延长(术后第7、9天)在同一时间点创面愈合率优于空白对照组、纳米膜组和MSCs注射组($P<0.05$);空白对照组愈合情况最差。术后第9天纳米膜+MSCs注射组小鼠创面已接近完全愈合,残余创面比率小于空白对照组($P<$

0.01)、纳米膜组($P<0.05$)和纳米膜 + MSCs 注射组($P<0.05$,图 6);纳米膜组与 MSCs 注射组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

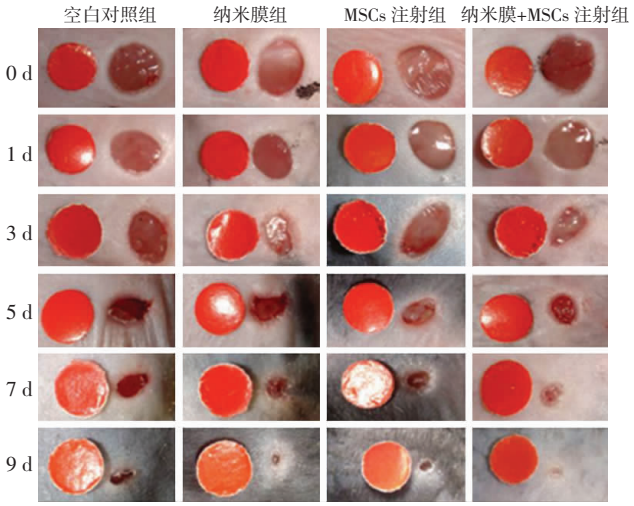
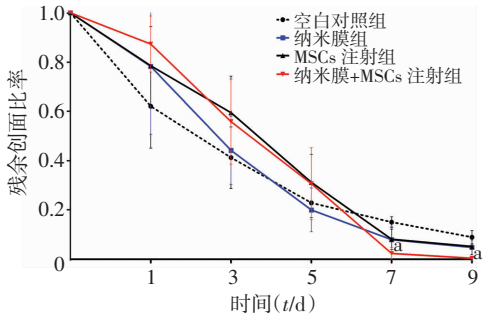


图 5　各组小鼠术后不同时间点创面愈合情况大体观察



a: $P<0.05$,与纳米膜组和 MSCs 注射组比较

图 6　各组小鼠术后不同时间点残余创面比率

3　讨论

“组织工程”技术概念的提出已有 20 余年。它通过将种子细胞(干细胞)与具有良好生物相容性、可降解性和可吸收的生物材料(支架)按一定的比例混合形成细胞-材料复合物,再将此复合物植入病变组织而达到组织修复重建[8]。“组织工程”的兴起和不断发展,为皮肤的修复提供了新的可能。作为组织工程中一个必不可少的重要环节,良好的生物支架材料需要满足以下条件:①良好的生物相容性,机体异物排斥反应比较轻微;②无组织细胞毒性;③具有仿生三维结构,利于细胞粘附、生长及分化;④可降解吸收[9-11]。壳聚糖和藻酸盐材料已经广泛单独或与其他材料联合应用于组织工程研究,皆源于其满足生物支架材料的基本条件。壳聚糖是一种来源于海洋蟹类生物的天然多糖,生物相容性好、可降解、无毒性[12-13],而且有文献记载其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等具有一定的抗菌效果[14-15]。藻酸盐除了良好生物相容性、可降解性及无毒性之外,还对细胞的粘附、迁移有促进作用[16]。利用层层自组装法[17](一种运用生物材料制作超薄膜的方法),可制备壳聚糖/藻酸盐超薄纳米膜作为细胞支架。透射电镜可清晰观察到该纳米膜由生物材料层层叠加而成。因此其不但具有独特三维立体机构,而且成功综合了两种材料各自的优点。

目前,对于壳聚糖/藻酸盐纳米膜的研究仅证明了其在体外可促进细胞在其表面粘附生长[18],尚少见研究证明该材料在体内对干细胞的行为调节及对组织修复的影响。本实验首次将壳聚糖/藻酸盐纳米膜运用到皮肤创面,通过种植 GFP 标记的 MSCs 形成典型的组织工程细胞-材料混合物,探讨其对干细胞活动的调节及对创面愈合的促进作用。在皮肤组织工程研究中,MSCs 由于其良好的同源性及强大的分化能力和促血管再生能力被广泛采用,以代替表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)对皮肤损伤修复的职能[19-21]。通过小动物活体成像仪观察术后 1 周小鼠创面进行定性分析,实验组(用膜)小鼠创面中心 GFP 荧光信号较对照组(不用膜)更强,展现了壳聚糖/藻酸盐纳米膜良好的生物相容性,它既加强了 MSCs 在创面的粘附,更促进了 MSCs 从创周向创面中心迁移,这无疑对加速创面的愈合有着重要影响,因为深度损伤的皮肤由于创面 ESCs 的丢失,只能依靠创周残存的干细胞向创面中心迁移来达到修复的目的。流式细胞术实验中,我们特意用 7-AAD 染料对创面组织中死细胞及其他杂质进行排除,来提高对 GFP-MSCs 定量分析的准确性。结果显示,术后 5 d 和 7 d 实验组小鼠创面检测到的 GFP-MSCs 百分比都明显较对照组高,充分说明在壳聚糖/藻酸盐纳米膜存在的情况下,MSCs 的生长效率明显提高。而通过对术后创面愈合情况的观察,运用纳米膜 + MSCs 注射与单一使用纳米膜、单一注射 MSCs 或空白对照相比,其创面愈合速度明显加快,说明纳米膜对 MSCs 的增殖有促进作用,MSCs 也能成功分化为表皮细胞来完成对创伤组织的修复。同时,实验结果也证明作为组织工程中的两个重要环节,细胞支架材料和干细胞缺一不可。冰冻切片染色观察创面愈合后新生组织表明,表达 GFP 基因的 MSCs 已成功植入创基并参与了创面的修复重建,同样地,在纳米膜存在的情况下,可观察到新生组织中数量更多、密度更高的表达 GFP 基因的细胞,也证明在愈合过程中纳米膜对 MSCs 的增殖分化有明显促进作用。

全层皮肤损伤之所以难以修复,除 ESCs 对表皮

的修复功能丧失外，细胞外基质(extracellular matrix，ECM)的缺失和结构破坏也使残存的干细胞难以在创面粘附生长。具有生物活性的三维支架材料通常能起到ECM的作用，为目的细胞的粘附、迁移、增殖、分化等提供良好微环境[22]。本研究表明，复合生物材料壳聚糖/藻酸盐纳米膜是一种超薄的三维纳米膜，生物相容性好，当其运用于小鼠全层皮肤缺损创面，可促进种子细胞即小鼠MSCs在体内粘附、迁移、增殖、分化，进而促进皮肤组织修复和创面愈合。同时证明该纳米膜是一种理想的细胞支架材料，其展示出的所有优势无疑预示着它在皮肤组织工程中的良好前景。

参考文献：

[1] Bottcher-Haberzeth S, Biedermann T, Klar A S, *et al*. Tissue engineering of skin: human tonsil-derived mesenchymal cells can function as dermal fibroblasts[J]. Pediatr Surg Int, 2014, 30(2): 213-222.

[2] Chen X, Feng X, Xie J, *et al*. Application of acellular dermal xenografts in full-thickness skin burns[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(1): 194-198.

[3] Tam J, Wang Y, Farinelli W A, *et al*. Fractional skin harvesting: autologous skin grafting without donor-site morbidity[J]. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2013, 1(6): e47.

[4] Poranki D, Whitener W, Howse S, *et al*. Evaluation of skin regeneration after burns *in vivo* and rescue of cells after thermal stress *in vitro* following treatment with a keratin biomaterial[J]. J Biomater Appl, 2014, 29(1): 26-35.

[5] Lee K Y, Mooney D J. Alginate: properties and biomedical applications[J]. Prog Polym Sci, 2012, 37(1): 106-126.

[6] Li Z, Ramay H R, Hauch KD, *et al*. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2005, 26(18): 3919-3928.

[7] Caridade S G, Monge C, Gilde F, *et al*. Free-standing polyelectrolyte membranes made of chitosan and alginate[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(5): 1653-1660.

[8] Wong D J, Chang H Y. Skin tissue engineering[J]. StemBook, 2009.

[9] MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin[J]. Mater Today, 2008, 11(5): 26-35.

[10] Drury J L, Mooney D J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications[J]. Biomaterials, 2003, 24(24): 4337-4351.

[11] Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529-2543.

[12] Croisier F, Jerome C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering[J]. EurPolym J, 2013, 49(4): 780-792.

[13] Ravi-Kumar M N V. A review of chitin and chitosan applications[J]. React Funct Polym, 2000, 46(1): 1-27.

[14] Raafat D, von-Bargen K, Haas A, *et al*. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound[J]. ApplEnvironMicrobiol, 2008, 74(12): 3764-3773.

[15] Tran C D, Duri S, Harkins A L. Recyclable synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan-based polysaccharide composite materials[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101A(8): 2248-2257.

[16] Rowley J A, Madlambayan G, Mooney D J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials[J]. Biomaterials, 1999, 20(1): 45-53.

[17] Decher G, Hong J D, Schmitt J, *et al*. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces[J]. Thin Solid Films, 1992, 210-211(Part 2): 831-835.

[18] Chen J, Qiu X, Wang L, *et al*. Free-Standing Cell Sheet Assembled with Ultrathin Extracellular Matrix as an Innovative Approach for Biomimetic Tissues[J]. Adv Funct Mater, 2014, 24(15): 2216-2223.

[19] Chen L, Tredget E E, Liu C, *et al*. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7119.

[20] Walter M N, Wright K T, Fuller H R, *et al*. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(7): 1271-1281.

[21] 王文平，李薇，陈亮，等. OPN诱导小鼠MSCs向表皮细胞分化促进创面愈合的研究[J]. 第三军医大学学报，2014，37(7)：594-599.

[22] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Dhanasopon A P, *et al*. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering[J]. Biomaterials, 2008, 29(19): 2907-2914.

（**收稿**：2015-03-06；**修回**：2015-05-19）

（编辑　黄　超）