DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.026
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
68 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0068-03

复合壳多糖人工皮肤的初步实验研究

李 静,伍津津,鲁元刚,朱堂友,李文维,贺 萍,杨宏珍 (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 探讨复合壳多糖人工皮肤移植家兔后表皮层角蛋白的表达以了解移植后皮肤表皮的分化情况。方法 分别将复合壳多糖人工皮肤移植前、移植后1个月、移植后2个月、正常人皮肤、正常兔皮肤石蜡块切片,用抗广谱角蛋白多抗、抗角蛋白K5和K10单抗进行免疫组化染色,观察表皮层角蛋白的表达和表皮分化情况。结果 复合壳多糖人工皮肤移植后1个月及2个月表皮层均有较强的角蛋白表达,与正常皮肤相似;基底层以上细胞有角蛋白K10表达,且越接近表皮表面表达越强,与正常人皮肤相似,基底层细胞有角蛋白K5表达,但明显弱于正常人皮肤。结论 复合壳多糖人工皮肤移植家兔后表皮层均有角蛋白表达,有增生性细胞和分化细胞,表皮分化良好、层次清楚,与正常皮肤相近。

关键词:组织皮肤;壳多糖;动物移植;表皮分化
中图法分类号:R318.1;R322.99 文献标识码:A

Epidermal differentiation of composite chitosan artificial skin grafted onto experimental rabbits

LI Jing, WU Jin-jin, LU Yuan-gang, ZHU Tang-you, LI Wen-wei, HE Ping, YANG Hong-zhen (Department of Dermatology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the expression of epidermal keratin and the epidermal differentiation after graft of composite chitosan artificial skin onto experimental rabbits. Methods Immunohistochemical staining of the paraffin-embedded sections from composite chitosan artificial skin before grafting, one month, and two months after grafting, and from normal human skin and normal rabbit skin was performed using anti-broad spectrum polyclonal antibody to keratin, basal cells and suprabasal cells with monoclonal antibodies to cytokeratin K5 and cytokeratin K10, respectively. The epidermal keratin expression and the epidermal differentiation were observed. Results The keratinocytes in the composite chitosan artificial skin expressed keratin one month and two months after grafting, similar to the normal epidermal keratinocytes. The suprabasal cells expressed cytokeratin K10 one month and two months after grafting. The closer to the surface of epidermis, the stronger the expression was, similar to the normal human epidermis. The basal cells expressed cytokeratin K5 one month and two months after grafting, but the expression was obviously weaker than that of the normal human skin. Conclusion Keratin expression, proliferative cells, differentiated cells, and good differentiation of epidermis with clear layers are found in the epidermis after grafting of composite chitosan artificial skin onto rabbits. The epidermal reconstruction of composite chitosan artificial skin after grafting onto rabbits is satisfactory. The composite chitosan artificial skin is similar to the normal human skin.

Key words: artificial skin; chitosan; animal transplantation; epidermal differentiation

利用组织工程的原理和方法在体外构建组织工程化皮肤已用于治疗大面积烧伤和慢性溃疡等皮肤缺损性疾病[1],在治疗后表真皮的再构建还有待于进一步的研究。我们采用组织工程的方法,在鼠尾胶原中加入糖胺聚糖、壳多糖等天然细胞外基质及培养的人成纤维细胞,形成复合壳多糖真皮替代物,随后将人角质形成细胞接种于表面,进行器官型培养,获得了复合壳多糖人工皮肤。本研究采用免疫组织化学技术观察复合壳多糖人工皮肤移植实验家兔后表皮层角蛋白的表达和表皮分化情况,探讨复合壳多糖人工皮肤移植家兔后表皮的再构建情况,为临床应用提供实验依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870238),国家"863"高科技发展计划资助项目(2001AA216041)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39870238) and the National "863" High-tech Development Plan of China (2001AA216041)

作者简介:李 静(1977—),女,云南省个旧市人,硕士,医师,主要从事组织工程皮肤方面的研究。电话:(023)68757449

收稿日期:2002-11-27;修回日期:2003-11-17

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗人广谱角蛋白多克隆抗体工作液、鼠抗人角蛋白K5单克隆抗体浓缩液、鼠抗人角蛋白K10单克隆抗体浓缩液、兔S-P试剂盒(SP-9001)工作液、鼠S-P试剂盒(SP-9002)工作液和DAB显色液。均为北京中山生物技术有限公司产品。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　方法

复合壳多糖人工皮肤移植前、移植后 1 个月及 2 个月、正常人皮肤(正常成人包皮切除术取得)和正常兔皮肤分为实验组、阳性与阴性对照组, 石蜡包埋组织块切片, 行 HE 染色及免疫组化染色(辣根酶标记链霉卵白素生物素法)。

2　结果

复合壳多糖人工皮肤移植后 1 个月组织切片 HE 染色可见表皮层次清楚, 分为基底层、棘层及角质层。真皮内细胞分布均匀, 可见较多新生血管, 并有网眼状结构形成(图 1)。



Layers in the epidermis clear, with neogenetic blood vessels and reticular structure in the dermis

图 1　复合壳多糖人工皮肤移植后 1 个月时　(HE× 100)

Fig 1　Composite chitosan artificial skin one month after grafting　(HE× 100)

复合壳多糖人工皮肤移植前、移植后 1 个月及 2 个月表皮层广谱角蛋白抗体免疫组化染色阳性, 与正常皮肤相似。移植前表皮细胞间结合较松, 移植后表皮细胞间结合紧密, 表皮层分为角质层、棘层及基底层(图 2)。



Positive epidermal cells stained brown

图 2　复合壳多糖人工皮肤移植后 1 个月广谱角蛋白抗体免疫组化染色　(S-P× 200)

Fig 2　Composite chitosan artificial skin one month after grafting by immunohistochemical staining with broad-spectum polyclonal antibody to keratin　(S-P× 200)

复合壳多糖人工皮肤移植前表皮细胞角蛋白 K10 抗体和角蛋白 K5 抗体免疫组化染色均为阳性, 后者的染色较浅; 移植后 1 月及 2 月基底层以上细胞角蛋白 K10 抗体免疫组化染色阳性, 且越接近表皮表面染色越深, 与正常人皮肤相似, 基底层细胞角蛋白 K10 抗体免疫组化染色阴性。而基底层细胞角蛋白 K5 抗体免疫组化染色弱阳性, 明显弱于正常人皮肤, 基底层以上细胞角蛋白 K5 抗体免疫组化染色阴性(图 3, 4)。

阴性对照组中抗体免疫组化染色均为阴性。



Positive suprabasal cells of epidermis stained brown. Cells closer to the surface of epidermis stained more deeply

图 3　复合壳多糖人工皮肤移植后 1 个月角蛋白 K10 抗体免疫组化染色　(S-P× 200)

Fig 3　Composite chitosan artificial skin one month after grafting by immunohistochemical staining with monoclonal antibody to cytokeratin K10　(S-P× 200)



Basal cells of epidermis stained brown

图 4　复合壳多糖人工皮肤移植后 1 个月角蛋白 K5 抗体免疫组化染色　(S-P× 200)

Fig 4　Composite chitosan artificial skin one month after grafting by immunohistochemical staining of monoclonal antibody to cytokeratin K5　(S-P× 200)

3　讨论

角蛋白是表皮角质形成细胞、毛囊上皮细胞、毛发、甲板及粘膜上皮细胞的主要结构蛋白。角蛋白的表达特异性地局限于上皮组织, 具有组织特异性。缺

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

乏角蛋白的上皮细胞会丧失一些基本的功能，如生长和分化受阻，随着角质形成细胞逐渐向上分化，角蛋白的分子量逐渐增大，因此角蛋白的表达是角质形成细胞具有生长分化功能的标志[2]。本研究显示移植前复合壳多糖人工皮肤、移植后1个月和2个月表皮替代物中广谱角蛋白抗体免疫组化染色均阳性，说明移植前至移植后2个月的时间内，复合壳多糖人工皮肤表皮替代物中均有角蛋白表达，体外培养的角质形成细胞基本具备正常角质形成细胞生长分化的功能。

表皮是一种不断自我更新的组织。基底细胞是增殖干细胞，它不断分裂产生新的细胞，后者向表皮表面移动而开始分化过程，处于不同分化阶段的角质形成细胞表达不同的角蛋白亚型。因此角蛋白亚型是鉴别上皮细胞来源和分化阶段的重要标记。就表皮主要角蛋白而言，在具有增生能力的表皮基底细胞层，表达的角蛋白是增生特异性角蛋白K5与K14，随着细胞移行到棘层、角质层，出现了分化特异性角蛋白K1/K10蛋白对的表达。因此，K5/K14是角质形成细胞增生的标记[3]，而K1/K10是角质形成细胞分化、角化和成熟的标记[4]。

表皮的分化受细胞和细胞外基质的影响。影响表皮分化的细胞主要是成纤维细胞，成纤维细胞不仅合成细胞外基质，还可促进表皮的生长与分化[5]。成纤维细胞可分泌转化生长因子-β(TGF-β)、表皮生长因子(EGF)等多种生长因子[5]作用于角质形成细胞，促进其生长、分化。对组织工程皮肤的研究已证明皮肤替代物中的成纤维细胞可促进表皮的生长和分化，真皮基质中缺乏成纤维细胞则表皮层的分化较差[6]。表真皮间存在着复杂的相互作用，真皮基质影响表皮的生长、分化，如糖胺聚糖是细胞外基质成分，它可促进角质形成细胞和成纤维细胞粘附于基质，并可促进两种细胞的增生；真皮基质中的纤维连接蛋白也可促进角质形成细胞的生长。不仅细胞外基质的成分影响表皮分化，而且基质的空间构建也影响表皮的分化，角质形成细胞只有粘附于真皮基质骨架之上才能生长和分化，因此胶原、弹性纤维等是支持表皮生长、分化必不可少的基质骨架成分。而类似正常真皮的多孔的三维细胞外基质骨架可促进表皮的生长和分化。因此人工皮肤中表皮的分化主要受成纤维细胞和细胞外基质成分的影响。

本研究采用的复合壳多糖人工皮肤含有胶原、糖胺聚糖、壳多糖等真皮基质及人角质形成细胞和成纤维细胞，移植前的表皮为多层上皮细胞，角质形成细胞有角蛋白K10表达，且有较弱的均匀角蛋白K5表达，角蛋白的表达无分层现象，这可能与缺乏体内环境对表皮分化的诱导及营养供应不理想有关。移植后1个月及2个月基底层细胞均有较弱的K5表达，基底层以上细胞无K5表达。说明移植后2个月内复合壳多糖人工皮肤表皮层中有增生性细胞存在，相当于正常人皮肤的基底细胞。但K5的表达明显弱于正常人皮肤，可能体外培养条件下某些营养缺乏，角质形成细胞的某些功能受抑制，增殖能力降低，因而K5的表达较弱。移植后1个月及2个月，复合壳多糖人工皮肤的基底层以上细胞均表达K10，且越靠近表皮表面的细胞表达K10越强，角质层表达强度最强，基底层细胞无K10表达。说明表皮细胞分化良好，在向表皮表面移动的过程中逐渐实现了终末分化，与正常人皮肤相似。

复合壳多糖人工皮肤移植1月后的组织学观察，可见人工皮肤生长良好，表皮层次结构清楚，分为基底层、棘层及角质层。真皮内细胞分布均匀，可见较多新生血管，并有网眼状结构形成。移植物中成纤维细胞生长旺盛，无明显炎性细胞浸润，提示复合壳多糖人工皮肤对实验家兔具有良好的组织相容性[7]。在覆盖创面的同时，移植物中的成纤维细胞可继续活跃生长，且随着新生血管的长入，长期覆盖创面成为可能。以往研究还表明[7]，复合壳多糖人工皮肤在物理特性、抗感染能力等方面有一定的优越性。复合壳多糖人工皮肤具有良好的物理特性，即有一定的弹性与韧性，可随意剪切及缝合，是目前惟一一种具有抗感染能力的组织工程皮肤，与其中的壳多糖成分有关；能够抵抗胶原酶的消化，延长移植后的降解时间；可降低胶原凝胶的收缩，使人工皮肤的产量显著提高。

参考文献：

[1] 伍津津，刘荣卿，叶庆俏，等. 重建毛书的组织学研究[J]. 第三军医大学学报，1998，20(20)：114－117.

[2] Porter R M，Leitgeb S，Melton D W，*et al*. Gene targeting at the mouse cytokeratin 10 locus：severe skin fragility and changes of cytokeratin expression in the epidermis[J]. J Cell Biol，1996，132(5)：925－936.

[3] Curran J A，Laverty F S，Campbell D，*et al*. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein-1 induces epithelial cell proliferation and sensitizes transgenic mice to chemical carcinogenesis[J]. Cancer Res，2001，61(18)：6730－6738.

[4] Sugawara T，Gallucci R W，Simeonova P P，*et al*. Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes[J]. Cytokine，2001，15(6)：328－331.

[5] Coulomb B，Lebreton C，Dubertret L，*et al*. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization[J]. J Invest Dermatol，1989，92(1)：122－125.

[6] Saintigny G，Bonnard M，Damour O，*et al*. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice：effect of fibroblasts[J]. Acta Derm Venereol，1993，73(3)：175－180.

[7] 鲁元刚，伍津津，朱堂友，等. 复合壳多糖人工皮肤修复家兔全层皮肤缺损的实验研究[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(1)：19－22.

（编辑 刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net