DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.07.037
第25卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 7
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)07-0649-02

技术方法

四种真皮替代物的制备和比较研究

Preparation and comparison of 4 kinds of dermal replacements

鲁元刚,伍津津,朱堂友,胡 浪,杨宏珍,贺 萍 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆 400042)

提 要:目的 通过调整复合壳多糖真皮替代物的组分,比较不同配方获得的真皮替代物的组织学特性的异同。方法 在无菌条件下将浓缩的DMEM培养基、小牛血清、鼠尾胶原溶液、糖胺聚糖和壳多糖按比例配制成凝胶溶液,然后将成纤维细胞与上述凝胶溶液混合制成真皮替代物(替代物A)。以A为标准,缺如成纤维细胞为替代物B,缺如壳多糖为替代物C,缺如壳多糖和成纤维细胞为替代物D。比较A、B、C、D四种替代物的生物学特性,并在培养半个月时作组织学检查。结果 四种替代物以C收缩率为最大,A其次,B、D两种替代物几乎无收缩,组织学上A、C未见明显差异,B可见均匀的蜂窝状结构,D结构无序。结论 A复合壳多糖真皮替代物配方是四种真皮替代物中生物学特性最为理想的一种,可以在组织工程研究中发挥重要作用。

在皮肤替代物研究领域,人们常将低抗原性成纤维细胞(FB)作为种子细胞应用于研究,通过种子细胞的生长重建真皮[1],获得生物相容性良好的皮肤替代物。我们通过调整拟定的复合壳多糖人工皮肤的几个重要组分,观察由此产生的影响,从而寻找一种较为理想的真皮替代物配方。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM培养基(美国GIBCO公司);壳多糖、硫酸软骨素C、透明质酸(均为Sigma产品);HEPES(美国KAI生物医学科学公司);胶原酶D(德国宝灵曼公司);胰蛋白酶(中国科学院新疆化学研究所);小牛血清(第三军医大学分子生物学教研室分装)。

1.1.2 主要仪器 二氧化碳孵箱(SHELD LAB公司);超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);倒置显微镜(重庆光学仪器厂)。

1.1.3 种子细胞 来源于正常儿童包皮环切术之切除包皮,0.2%胶原酶消化后获FB。

1.2 方法

1.2.1 制备四种皮肤替代物 在冰浴下将浓缩的DMEM培养基、小牛血清、胶原溶液、糖胺聚糖和壳多糖按比例配制成凝胶溶液,用1 mol/L NaOH调pH至7.2~7.4;在上述溶液中加入FB,室温下在培养皿中形成凝胶后,加入DMEM培养基后在37 ℃,5%CO_2/95%空气,90%以上湿度孵箱内培养。每天更换培养基,浸没培养15 d。得到真皮替代物A。

按上述方法重复制备缺如FB为替代物B,缺如壳多糖为替代物C,缺如壳多糖和FB为替代物D。

1.2.2 培养与观察 每日观察替代物的外观、透光度、细胞生长情况,测量培养物直径,根据所得数据的平均值,绘制收缩曲线。半个月后用Bouin's液固定,常规包埋切片,HE染色。

2 结果

2.1 大体观察

刚形成的基质凝胶呈淡红色半透明,漂浮状态。在倒置显微镜下,A、C凝胶各层面均可见位置相对固定的圆形FB。约2 h后FB逐渐出现多个胞质突起,有的似星状,A、C两组凝胶间细胞生长无差异。随着细胞数目的增多,A、C组替代物收缩变致密,透光性逐渐下降,FB的排列也从刚开始的数目稀疏、排列不规则逐渐过渡到数量较多、交错排列的状态,至第10天,已无法观察凝胶中的细胞生长。经过2周的培养,A、C替代物有一定的弹性和韧性,可用镊子随意搬动而不损坏。B、D替代物收缩不明显,在固定时仍呈红色半透明状,脆性较大,用镊子搬动时易碎。

2.2 收缩曲线绘制

A、C真皮替代物第2天开始明显收缩,各个方向的收缩基本一致;最大收缩发生于第3~11天,真皮替代物的直径收缩到45%左右。B、D替代物无明显收缩,见图1。

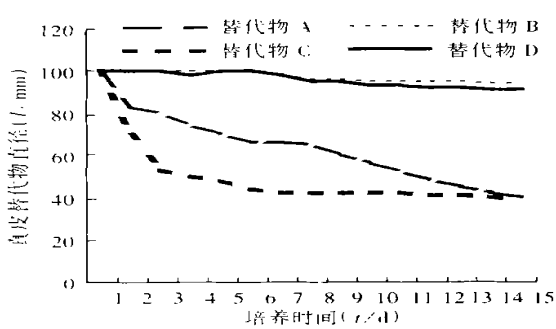


图1 四种真皮替代物收缩曲线图

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870238)

作者简介:鲁元刚(1972-),男,浙江省绍兴县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事毛囊生物学和人工皮肤方面的研究。电话:(023)68757448

收稿日期:2001-09-28;修回日期:2002-07-05

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

2.3 组织学检查

四种不同的真皮替代物，在组织学上A和C替代物基本一致，为蜂窝样结构背景下大致呈平行排列的梭形FB，见图2。而B和D替代物无梭形的FB生长，HE染色基质支架呈淡红色，B基质相对规则，有序，呈均匀的蜂窝样结构，孔隙大小较为一致，D基质凝胶则较为杂乱，呈不均匀的孔隙结构，且孔隙大小十分不一致。

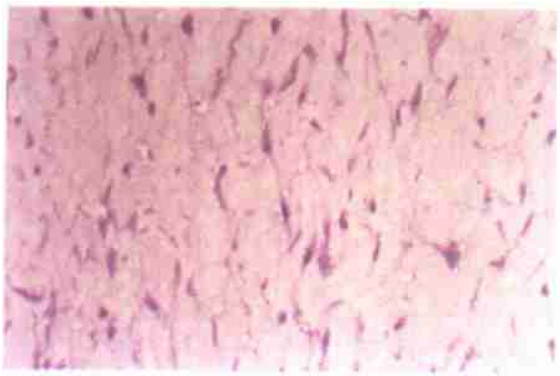


图2 培养15 d所获得的真皮替代物A (HE×200)

3 讨论

自组织工程学创立以来，人们一直在寻求适宜的可降解生物材料(细胞外支架，ECM)和相应的种子细胞，以及摸索最佳的培养条件，以期获得的组织工程化器官能在植入机体后，聚合物材料逐渐降解吸收，细胞存活，形成正常组织并行使相应的功能，从而达到优化生命、把握生命的目标。

胶原，由于其良好的亲水性、低抗原性、强抗张性以及对细胞的粘附性，一直被认为是胚胎发育和组织再生中重要的形态发生因素[2]，因而在组织工程研究中得到广泛应用。研究人员还发现一定的交联剂可诱导胶原分子间交联[3]，进一步降低胶原的抗原性，同时增强胶原海绵强度和对酶的耐受性，且交联后胶原的微孔结构更有利于种子细胞的生长和受体组织的长入[4]。本研究采用的交联剂是目前应用日趋广泛的壳多糖。

细胞胶原凝胶具有很强的收缩性[5]，且收缩的快慢和程度与胶原含量及FB的数量及培养基中牛血清的含量有关[6,7]。在四种真皮替代物的比较研究中，我们发现未加FB的真皮基质没有明显的收缩，而加入FB时，不论有无壳多糖的交联，收缩都十分明显，说明在真皮基质凝胶的收缩中，细胞的运动及收缩占有主导地位[8]，通过压缩纤维束，排出凝胶中多余的水分，并不断合成新的ECM，使人工真皮变得致密。而交联剂壳多糖的加入，使基质凝胶中的胶原排列更加有序，相互间的作用更加稳定，不易被植入的种子细胞挤兑，因而胶原中所含的液体也就不会很快离开基质凝胶，从凝胶中挤出水的速度要缓慢一些，因此开始的收缩速率较没加壳多糖的小，但最后均能获得直径大致相同的真皮替代物。这可从四种真皮基质凝胶的收缩曲线得到结论。

研究中，我们还发现随着培养时间的延长，替代物A和C的韧性逐渐增强，说明真皮替代物的物理学性状还决定于培养基质中种子细胞的量的多少及胶原纤维重建后的空间结构。而FB在胶原支架生长时分泌多种真皮重建所需的基质蛋白和促进创面愈合的糖胺聚糖[9]，也说明了适宜的种子细胞对于组织工程产品的重要性，并为组织工程化皮肤主动覆盖创面提供了基础。

本研究表明复合壳多糖真皮替代物A是一种有着良好物理学特性的真皮替代物，且十分适宜FB的生长，对其进行深入的研究，有利于组织工程化皮肤的改进。

关键词：壳多糖；真皮替代物；成纤维细胞
中图法分类号：R318.08 文献标识码：B

参考文献：

[1] Yannas I, Burke J. Design of an artificial skin: I. Basic design principles [J]. J Biomed Mater Res, 1980, 14(1): 65—81.
[2] Purna S K, Mary Babu. Collagen based dressings—a review[J]. Burns, 2000, 26(1): 54—62
[3] Bailey A J. The fate of collagen implants in tissue defects[J]. Wound Rep Reg, 2000, 8(1): 5—12.
[4] Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, *et al*. Characterization of skin reconstructed on a Chitosan-Cross-Linked Collagen-Glycosaminoglycan Matrix [J]. Skin Pharm, 1990, 3(2): 107—114.
[5] Valle C A, Auger F A, Rompre P, *et al*. Peripheral anchorage of dermal equivalents[J]. Br J Dermatol, 1992, 127(4): 365—371.
[6] Stark H J, Baur M, Breitkreutz D, *et al*. Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and diferentiation[J]. J Invest Dermatol, 1999, 112(5): 681—691.
[7] Ralston D R, Layton C, Dalley A J, *et al*. Keratinocytes contract human dermal extracellular matrix and reduce soluble fibronectin production by fibroblasts in a skin composite model[J]. Br J Plast Surg, 1997, 50(6): 408—415.
[8] Bell E, Ehrlich P, Sher S, *et al*. Development and use of a living skin equivalent[J]. Plast Reconstr Surg, 1981, 67(3): 386—392.
[9] Fleischmajer R, Contard P, Schwartz E, *et al*. Elastin-associated microfibrils(10 nm) in a three-dimensional fibroblast culture[J]. J Invest Dermatol, 1991, 97(5): 638—647.

(编辑 郭建秀)

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