

活性真皮胶原微粒对皮肤创面愈合的影响

王浩¹, 张爱君², 殷雅婷¹, 郑万玲¹, 王莘莘¹, 李健华¹, 金培生^{2*}

(1. 徐州医科大学研究生学院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院整形外科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 制备活性真皮胶原微粒, 研究其对皮肤创面愈合的影响。方法 采用化学销蚀和反复冻融法制备脱细胞真皮 (acellular dermal matrix, ADM), 并研磨成真皮胶原微粒, 在体外与脂肪干细胞 (adipose - derived stem cell, ADSC) 共培养, 检测真皮胶原微粒与 ADSC 的相容性, 构建裸鼠皮肤创面, 比较真皮胶原微粒 - ADSC 复合体组、ADSC 组、真皮胶原微粒组、空白组的创面愈合率。结果 真皮胶原微粒 - ADSC 复合体组的创面愈合率明显高于其他 3 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 活性真皮胶原微粒可携带 ADSC 并促进 ADSC 增殖、迁移, 有效促进创面的愈合。

关键词: 活性真皮胶原微粒; 细胞相容性; 组织工程皮肤; 创面愈合

中图分类号: R622 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096 - 3882(2019)03 - 0185 - 05

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2019.03.007

Effects of active micronized dermal collagen on wound healing

WANG Hao¹, ZHANG Aijun², YIN Yating¹, ZHENG Wanling¹, WANG Pingping¹, LI Jianhua¹, JIN Peisheng^{2*}

(1. Graduate School, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002)

Abstract: **Objective** To prepare active micronized dermal collagen and investigate its effect on wound healing. **Methods** Chemical erosion and repeated freeze - thaw methods were applied for preparation of acellular dermal matrix (ADM) which was then ground into micronized dermal collagen which before co - cultured with adipose - derived stem cells (ADSCs) in vitro. The biocompatibility of micronized dermal collagen and ADSCs was detected, and a model of skin wound in nude mice was constructed. The wound healing rates in the micronized dermal collagen group + ADSC group, the micronized dermal collagen group, the ADSC group and the blank group were compared. **Results** The micronized dermal collagen group + ADSC group demonstrated a remarkably higher rate of wound healing than the other three groups ($P < 0.01$). **Conclusions** Active micronized dermal collagen can carry ADSCs, facilitate their proliferation and migration, and effectively promote wound healing.

Key words: active micronized dermal collagen; cell biocompatibility; tissue - engineered skin; wound healing

皮肤缺损是整形外科治疗过程中的常见问题。该类创面的修复常面临皮源匮乏的窘境, 而构建组织工程皮肤作为真皮替代物在一定程度上可以缓解这一难题。研究表明, 异体脱细胞真皮 (acellular dermal matrix, ADM) 是一种较理想的真皮替代物, 可以用于大面积皮肤创面的治疗。此外, 研究发现脂肪干细胞 (adipose - derived stem cell, ADSC) 对于创面愈合也具有积极的影响^[1]。本研究旨在前期实验的基础上, 制备一种活性真皮胶原微粒, 兼具脱细胞真皮及脂肪干细胞的生物效应, 以期获得更高疗效的组织工程材料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 皮肤、脂肪组织来自徐州医科大学附属医院整形外科手术患者, 年龄 23 ~ 45 岁, 无传染性疾病、无皮肤病变等, 并经我院伦理委员会批准及患者知情同意。试剂: 磷酸盐缓冲液 PBS (北京中杉金桥); 胰酶消化液、青 - 链霉素、苏木精 - 伊红染色试剂盒 (上海碧云天); 氯化钠、氢氧化钠 (上海国药集团); DMEM/F - 12 培养基 (美国 HyClone 公司); I 型胶原酶 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (FBS) (澳大利亚 Gibco 公司); 嘌呤霉素 (VIC-

基金项目: 江苏省卫计委科研课题 (Z201607)

* 通信作者, E - mail: Jinps2006@163.com

MED);SPF级BALB/c裸鼠(北京维通利华)。

1.2 方法

1.2.1 人真皮胶原微粒的制备 ①真皮修剪成中厚皮片,PBS洗净;1 mol/L NaCl溶液浸泡24 h去除表皮;移入1% NaOH溶液,超声清洗仪、摇床间断振荡洗涤,4 h换液1次,共5次;PBS(含1%青-链霉素)振荡浸洗至pH约为7.2; -80℃/37℃反复冻融3次以上,每次间隔4 h;冷冻真皮放入-60℃冷冻干燥机处理48 h,冻干保存备用。②ADM以灭菌PBS(含1%青-链霉素)反复清洗,浸泡24 h后放入烧杯,加入100 ml无菌PBS,以手持式搅拌机低速研磨5~10 min,100目筛网过滤,滤液以3 000 r/min离心10 min,沉淀即为真皮胶原微粒。

1.2.2 人脂肪干细胞的分离、培养及标记 ①参考Zuk等^[2-3]及课题组前期实验方法以胶原酶消化法分离、培养ADSC。②含GFP慢病毒转染:ADSC于100 mm培养皿中培养至约80%融合,胰酶消化收集细胞,1 400 r/min离心5 min,保留沉淀;加入3 ml完全培养基重悬;取6孔板,每孔预置完全培养基约2 ml,移入细胞悬液约100 μl,于37℃、5% CO₂条件下培养。③细胞约50%融合时进行病毒转染:取1.5 ml EP管,逐次加入GFP慢病毒10 μl、Opti-MEM 490 μl、DMEM/F-12 + 10% FBS + 1% 双抗500 μl、聚凝胺(polybrene) 1 μl(终浓度5 mg/L),混匀备用。④移除6孔板中培养液,PBS清洗2次,加入病毒溶液1 ml,培养24 h;第2天加入1 ml完全培养基;第3天去上清液,加入2 ml完全培养基;第4天加入含嘌呤霉素的完全培养基(终浓度2 mg/L);第5天倒置相差显微镜镜下观察细胞部分死亡,更换含嘌呤霉素(终浓度2 mg/L)的完全培养基继续培养。⑤显微镜下观察GFP标记成功,移入100 mm培养皿,以DMEM/F12培养液(含10% FBS + 1% 双抗) + 嘌呤霉素(终浓度2 mg/L)培养,适时传代。

1.2.3 复合组织体外培养 ①称取等量ADM和真皮胶原微粒;取约80%融合P4代ADSC(已GFP标记),收集细胞后500 r/min离心5 min,重悬后细胞计数,约 6×10^6 个。②将细胞等分,部分接种于ADM表面,部分与真皮胶原微粒吹打混匀后悬浮培养。③培养3 d后,吸取10 μl复合体涂片,荧光显微镜下观察细胞存活情况。

1.2.4 苏木精-伊红染色 分别将ADM、真皮胶原微粒及两种复合体以4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色,树脂封片,于显微镜下观察拍照。

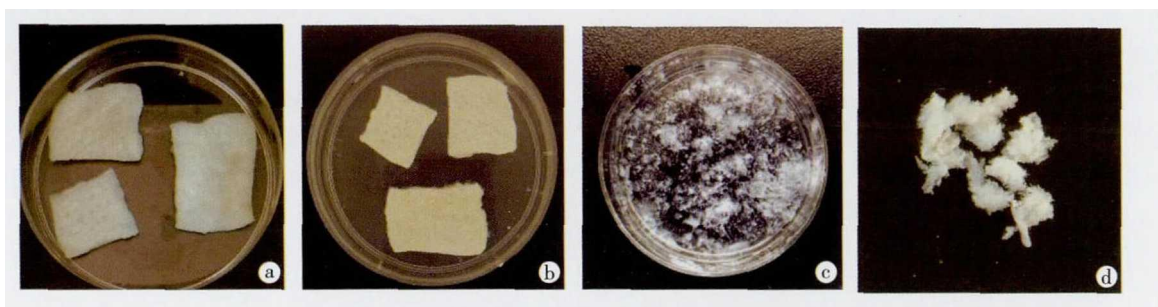
1.2.5 真皮胶原微粒-ADSC复合体扫描电镜检查 2%多聚甲醛+3%戊二醛固定;0.1% PB清洗3次,每次10~15 min;1%~2%四氧化锇溶液浸没染色1 h;0.1% PB清洗3次,每次5~10 min;梯度乙醇脱水;醋酸异戊酯浸洗2次,每次15 min;临界点干燥仪干燥后粘台;真空喷镀仪镀膜,扫描电镜观察拍照。

1.2.6 动物实验 选取4~6周雌性裸鼠共12只,随机分为真皮胶原微粒-ADSC复合体组、ADSC组、真皮胶原微粒组、空白组,每组3只。设计裸鼠背部皮肤创面,直径约1 cm,4%水合氯醛以0.4 g/kg腹腔注射麻醉,于裸鼠背部切除皮肤全层,创面外敷实验材料,观察1周后创面愈合情况并拍照,计算创面愈合率。创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面×100%。

1.3 统计学处理 使用SPSS 16.0软件处理数据,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脱细胞真皮大体观察 ADM呈乳白色(图1a),质地柔软,弹性佳;冻干后呈皮革状(图1b),质地较坚韧;真皮胶原微粒呈乳白色(图1c),膏冻状;冻干后呈乳白色碎纸屑状(图1d),结构疏松。



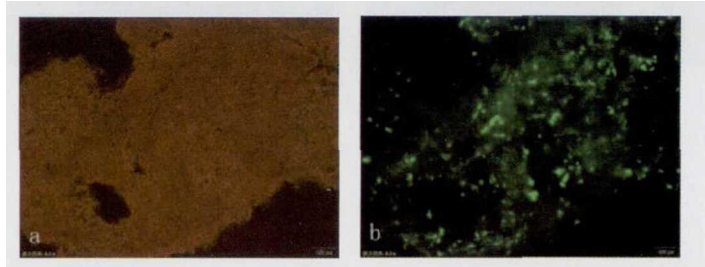
a. ADM;b. ADM(冻干);c. 真皮胶原微粒;d. 真皮胶原微粒(冻干)

图1 ADM及真皮胶原微粒冻干前后大体外观

2.2 复合组织荧光显影 复合组织结构疏松(图2a),荧光下组织间可见绿色显影(图2b),证实真皮胶原微粒间有细胞黏附。

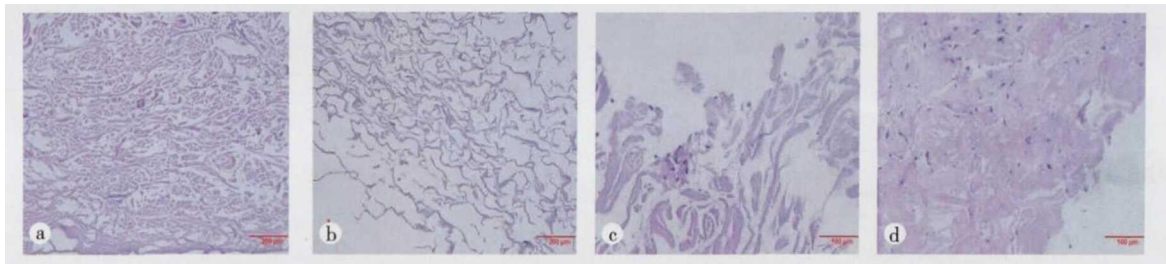
2.3 苏木精-伊红染色观察 ADM 胶原结构(图3a)排列规律呈海绵状,空隙间无细胞结构残留,表皮面结构连续、致密,基底面胶原结构疏松、连续性

部分中断;真皮胶原微粒间不连续(图3b),结构疏松,无细胞结构残留,胶原形态各异、大小不一,介于200~400 μm;ADM-ADSC 复合体(图3c)中细胞仅出现在基底面且数量较少,未穿透至胶原空隙;真皮胶原微粒-ADSC 复合体(图3d)微粒沉积、挤压后胶原间缝隙减小、体积压缩,其间有大量 ADSC。



a. 微粒-细胞复合体涂片;b. 荧光下细胞显影

图2 复合培养后涂片荧光显影(×20)



a. ADM;b. 真皮胶原微粒;c. ADM-ADSC 复合体;d. 微粒-ADSC 复合体

图3 苏木精-伊红染色比较 ADM 及真皮胶原微粒性状及细胞相容性(bar=200 μm)

2.4 真皮胶原微粒-ADSC 复合体电镜扫描观察 真皮胶原微粒间可见 ADSC 存活(图4a、4b);真

皮胶原微粒表面积大于 ADSC,其表面可供细胞粘附生长(图4c)。

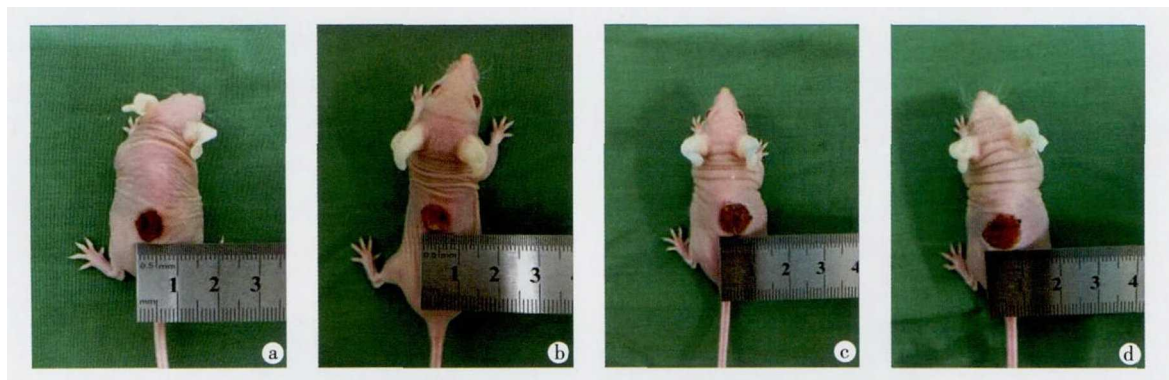


a, c. ×3500;b. ×8000

图4 真皮胶原微粒-ADSC 复合体电子显微镜扫描观察(箭头指示为 ADSC)

2.5 术后7天创面愈合情况 术后7d 检测创面愈合率,复合体组为 69.7% ± 2.2%,ADSC 组为 49.7% ± 1.8%,真皮胶原微粒组为 32.8% ±

3.2%,空白组为 19.0% ± 1.8%,复合体组创面愈合率明显高于其他3组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图5。



a. 复合体组; b. ADSC 组; c. 真皮胶原微粒组; d. 空白组

图5 裸鼠术后1周创面观察

3 讨论

皮肤创面的治疗是整形外科临床工作中的难点之一。在皮肤移植过程中,创面皮肤缺损的面积大小、皮源是否充足决定了治疗的成败。选用异体皮肤移植可在一定程度上缓解皮源不足的困境,但是后期抗排斥反应治疗造成患者生理、心理及经济方面的巨大负担。而采用免疫原性低的组织工程皮肤治疗,可以有效根除这种不足。既往文献报道及本课题组前期实验^[4-8]表明,人异体脱细胞真皮 ADM 具有免疫原性低、异体移植排斥反应极少、生物亲和性高、可降解等优点,是较理想的工程皮肤支架材料。但是,ADM 胶原结构致密连续、孔隙间非贯通,造成胶原孔隙利用率低、细胞渗透性差,不利于细胞突破基底层进入空隙间浸润生长^[9],造成移植血管化程度低、创面愈合率低,继而出现移植下方积液、感染等问题,严重影响创面的愈合,一定程度上限制了治疗效率。本课题组通过一系列实验,尝试提高 ADM 孔隙率,例如应用老年人皮肤制备 ADM,质地疏松、孔径大、孔隙率更高^[10];提高碱溶液温度,明显提高 ADM 孔隙率^[11-12]。其他学者通过不同方法亦取得理想的效果^[13]。

2001 年 Zuk 等^[2-3]发现了 ADSC,为生物工程研究及生物治疗的临床应用指出了新方向。研究表明,ADSC 是一种具有多分化潜能的细胞,对缺血组织的血管化治疗有显著的促进作用^[14-16];也可以通过诱导向表皮分化^[17]而促进创面愈合。ADSC 为难治性创面的治疗提供了一种新的选择。采用局部注射干细胞的方法,易造成细胞“岛”样沉积,创面细胞分布不均,细胞大量流失,细胞因缺血、缺氧难以长期存活等问题,影响干细胞在创面修复中的作用。本研究旨在制备一种组织工程皮肤,为干细胞提供

黏附、生长、增殖的位点,保护干细胞的活性、充分发挥干细胞生理效应,构建为兼具 ADM 及 ADSC 优点的生物材料。

本实验首先通过化学销蚀和反复冻融法,脱去真皮中的细胞成分,降低 ADM 的免疫原性。再采用机械研磨、过滤,获得直径 200 ~ 400 μm 真皮胶原微粒。该微粒在原有 ADM 特性的基础上又产生了一些新的特征。实验发现,真皮胶原微粒间相互独立(图 3b),具有更好的可塑性,可根据创面制作成任意规格,如固体、膏冻状、悬液等(图 1c、1d),覆盖创面、填充缺损时不再受到 ADM 面积不足及可塑性差的困扰,提高了稀缺材料的使用效率,且微粒化的胶原更容易被宿主降解。真皮胶原微粒打破了 ADM 孔隙间非贯通的束缚,结构更加疏松,真皮胶原微粒直径略大于 ADSC(图 4c),理论上每个胶原均可承载 1 个及以上的干细胞(图 4a、4b),可供干细胞黏附的总表面积增大。混合培养后携带的干细胞数(图 3d)明显多于 ADM(图 3c)。构建裸鼠皮肤创面,外敷实验材料 1 周后观察发现,复合体组创面愈合速度较其他组差异有统计学意义,提示这种活性真皮胶原微粒可以促进皮肤创面的愈合。该制备过程简单易用,对于临床应用有一定的指导意义。

国内外文献表明,ADSC 可以通过释放各种细胞因子促进内皮细胞生长或诱导自身向表皮分化,刺激血管新生等方式促进皮肤创面的愈合。本实验发现,移植了活性真皮胶原微粒的皮肤创面愈合率显著提高,可能是因为微粒间的细胞存活率、增殖率更高,作用时间更长;也可能是微粒激活了某种信号通道从而释放某种细胞因子的作用。本实验尚未就这些指标进行检测,有待后期进一步研究以提供数据支持。

参考文献:

- [1] 夏斯展,李强,郭艳萍,等. SCF/c-Kit 反应轴调控 ADSCs 在糖尿病创面修复中的作用研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(14): 8-13. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.002.
- [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue; implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211-228.
- [3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12): 4279-4295.
- [4] 张爱君,金培生,陶常波,等. 组织填充材料在单侧唇裂鼻畸形整复中的应用 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2010, 21(11): 676-677. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2010.11.014.
- [5] Biedermann T, Boettcher-Haberzeth S, Reichmann E. Tissue engineering of skin for wound coverage [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2013, 23(5): 375-382. DOI: 10.1055/s-0033-1352529.
- [6] Varkey M, Ding J, Tredget EE. Advances in skin substitutes - potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing [J]. *J Funct Biomater*, 2015, 6(3): 547-563. DOI: 10.3390/jfb6030547.
- [7] Huang SP, Hsu CC, Chang SC, et al. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect [J]. *Ann Plast Surg*, 2012, 69(6): 656-662. DOI: 10.1097/SAP.0b013e318273f909.
- [8] Zamora DO, Natesan S, Becerra S, et al. Enhanced wound vascularization using a dsASCs seeded FPEG scaffold [J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(4): 745-757. DOI: 10.1007/s10456-013-9352-y.
- [9] 张爱君,李强,崔莹莹,等. 不同年龄阶段人脱细胞真皮的制备及细胞渗透性研究 [J]. 中华医学美学美容杂志, 2014, 20(2): 130-133.
- [10] 张爱君,李强,崔莹莹,等. 不同年龄阶段人脱细胞真皮的制备及性状分析 [J]. 徐州医学院学报, 2013, 33(11): 755-758.
- [11] 姜涛,张爱君,李雪阳,等. 人新型脱细胞真皮制备及性状分析 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(7): 1006-1012. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.07.013.
- [12] 姜涛,金培生,陶常波,等. 改良法制备人脱细胞真皮的特性与体外细胞相容性 [J]. 中华医学美学美容杂志, 2016, 22(6): 369-372. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0290.2016.06.015.
- [13] 王莹,张明利,王大为,等. 异种(猪)脱细胞真皮基质微粒注射填充研究 [J]. 中华整形外科杂志, 2003, 19(2): 132-134. DOI: 10.3760/j.issn:1009-4598.2003.02.018.
- [14] Zhang F, Oswald T, Lin S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat [J]. *Br J Plast Surg*, 2003, 56(7): 653-659.
- [15] Fujihara Y, Koyama H, Ohba M, et al. Controlled delivery of bFGF to recipient bed enhances the vascularization and viability of an ischemic skin flap [J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(1): 125-131. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00339.x.
- [16] Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration [J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 399-408. DOI: 10.1016/j.trsl.2013.11.009.
- [17] 赵晗,金培生. RUNX2 基因对于 ADSCs 向表皮分化的影响研究 [J]. 徐州医科大学学报, 2017, 37(5): 287-292.

收稿日期:2018-05-10 修回日期:2018-05-28
本文编辑:郭昊