

# 壳多糖-胶原凝胶构建组织工程口腔黏膜固有层\*★

丁越<sup>1</sup>, 武志强<sup>2</sup>, 张力平<sup>2</sup>

## Chitosan and collagen gel constructed tissue-engineered oral mucous propria

Ding Yue<sup>1</sup>, Wu Zhi-qiang<sup>2</sup>, Zhang Li-ping<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have explored the feasibility of tissue engineered artificial human skin using chitosan-collagen as scaffold material.

**OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of *in vitro* construction of artificial lamina propria using artificial scaffold of chitosan-collagen and oral mucous fibroblasts (OMF).

**METHODS:** The OMF was extracted from adult rat buccal division, gingival or pars palatalis and cultured in 2XDMEM solution, serum of embryo cattle, collagen solution and chitosan, or 2XDMEM solution, serum of embryo cattle and collagen solution were mixed together into gel solution pro rata. OMFs were added into above gel solution to form oral mucous of artificial lamina propria. OMFs were observed; chitosan-collagen gel substrate and collagen gel substrate were also investigated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After 1 day of collagen-OMF complex (FPCL) and chitosa-collagen-OMF complex (FPCCL) culture, OMF adhered to artificial scaffold and grew in rendered olive-like and unordered. OMFs proliferated with time, and the gel became pale and thin, constrict at second and third days respectively. OMFs may grow and secrete substrate in three-dimensional space formed by chitosan-collagen gel, which forms compact connective tissue similar to oral mucous propria. Chitosan-collagen gel is a suitable material for constructing oral mucous propria by tissue engineering.

Ding Y, Wu ZQ, Zhang LP. Chitosan and collagen gel constructed tissue-engineered oral mucous propria. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(25):4623-4626. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 有研究探讨了以胶原/壳聚糖聚合物为支架材料构建组织工程人工皮肤的可行性。

**目的:** 拟探讨以壳多糖-胶原凝胶支架材料与口腔黏膜成纤维细胞在体外构建人工固有层的可行性。

**方法:** 口腔黏膜成纤维细胞取自成年鼠颊部、牙龈或腭部。以 2×DMEM 培养液、胎牛血清、胶原溶液、壳多糖等或 2×DMEM 培养液、胎牛血清、胶原溶液等按一定比例配置成凝胶溶液, 将大鼠口腔黏膜成纤维细胞与上述凝胶溶液迅速混合制成口腔黏膜人工固有层, 动态观察细胞生长状况和凝胶收缩情况。

**结果与结论:** 胶原-口腔黏膜成纤维细胞复合物、壳多糖-胶原-口腔黏膜成纤维细胞复合物体外培养 1 d, 口腔黏膜成纤维细胞在支架材料中生长良好, 细胞呈长梭形, 排列无一定方向。随时间推移, 口腔黏膜成纤维细胞逐渐增多, 凝胶颜色变浅, 厚度变薄, 分别于 2, 3 d 后发生收缩。结果证实, 口腔黏膜成纤维细胞可在壳多糖-胶原凝胶形成的三维空间结构生长并分泌基质, 形成类似黏膜固有层的致密结缔组织。壳多糖-胶原凝胶是构建组织工程化口腔黏膜固有层的合适材料。

**关键词:** 口腔黏膜成纤维细胞; 胶原; 凝胶; 壳多糖; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.25.016

丁越, 武志强, 张力平. 壳多糖-胶原凝胶构建组织工程口腔黏膜固有层[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(25):4623-4626. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

颌面部恶性肿瘤手术、创伤及溃疡等引起的皮肤黏膜缺损, 缺损后自体往往很难恢复原有的形态和功能, 需要足够的皮肤黏膜进行修复, 但当缺失面积较大时, 通过植皮来修复缺损创面就变得更加困难。以往临床上多采用自体皮片和皮瓣移植, 自体移植虽无排斥反应, 但由于自体皮源有限, 多不能达到完美的修复效果。

组织工程学是应用工程科学和生命科学的原理, 开发用于恢复、维持和提高受损组织和器官功能的生物替代物的一门科学<sup>[1]</sup>。随着组织工程技术的发展, 人们更注重研究和开发组

织工程替代物来修复皮肤黏膜的缺损<sup>[2-3]</sup>。应用生命科学和工程学的原理与技术将种子细胞与适当的支架材料相结合构建出组织工程化皮肤, 用于修复、维护和改善损伤皮肤组织功能和形态<sup>[4]</sup>。人工皮肤对创面的保护及对上皮组织修复具有显著的促进作用<sup>[5]</sup>。

应用自体细胞在体外构建组织工程化皮肤, 用于皮肤损伤的诊断、治疗、修复乃至替换, 已起到重要的作用<sup>[6-8]</sup>。包括异种皮肤以及一些经脱细胞处理的天然细胞外基质(如小肠黏膜下层)也被用于活性皮肤替代物的研究<sup>[9-11]</sup>。

实验采用组织工程的方法, 选择Wistar大鼠口腔黏膜成纤维细胞(oral mucous fibroblast, OMF)作为种子细胞, 分别以胶原凝胶、壳多糖-胶原凝胶为生物支架, 研究并比较OMF在其中

<sup>1</sup>Department of Stomatology, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110015, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Stomatology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Ding Yue★, Master, Attending physician, Department of Stomatology, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110015, Liaoning Province, China  
dd120\_cool@126.com

Supported by: the Scientific Research Foundation of Liaoning Provincial Science and Technology Department, No. 00225001-5\*

Received: 2010-04-05  
Accepted: 2010-05-22

<sup>1</sup> 辽宁省人民医院口腔科, 辽宁省沈阳市 110015;  
<sup>2</sup> 中国医科大学盛京医院口腔科, 辽宁省沈阳市 110004

丁越★, 女, 1976年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 1999年大连医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔临床研究。  
dd120\_cool@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2010)25-04623-04

收稿日期: 2010-04-05  
修回日期: 2010-05-22  
(20100405008/W·A)

的生长代谢, 探讨应用胶原凝胶、壳多糖-胶原凝胶体外构建口腔黏膜固有层组织的可行性, 为体外构建组织工程口腔黏膜及临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 实验于2005-03在中国医科大学盛京医院小儿先天畸形实验室完成。

**材料:** 21~25周龄健康Wistar大鼠, 雌雄不限, 由中国医科大学实验动物部提供。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[12]</sup>。

**材料及试剂:**

材料及试剂	来源
壳多糖(脱乙酰度大于95%)	吉林省德鑫生物技术公司生产
溶组织梭状芽孢杆菌 I 型胶原酶	Boehringer Mannheim, UK
非必需氨基酸	Hyclone, USA
两性霉素B	Sigma, USA
鼠尾 I 型胶原	COSTAR, USA

**成纤维细胞培养基:** DMEM 10 g, NaHCO<sub>3</sub> 3.7 g, 胎牛血清 100 mL, 青霉素10×10<sup>-5</sup> U, 链霉素10×10<sup>-5</sup> U, 两性霉素B 250 μg, 超纯水加至1 000 mL。

**实验方法:**

**OMF的分离、培养和传代:** 10 mm×10 mm新鲜鼠全层黏膜标本取自成年鼠颊部、牙龈或腭部。去除上皮层, 保留固有层, 加 DMEM 制成细胞悬液, 按1.0×10<sup>6</sup>/瓶接种培养, 取4~9代细胞用于实验。

**制备胶原凝胶网架:** 参照Wu等<sup>[3]</sup>的方法制备胶原凝胶网架取4~9代OMF, 按细胞数1.5×10<sup>4</sup>/孔加入凝胶溶液中, 继续培养, 制备成胶原凝胶口腔黏膜固有层(fibroblast-populated collagen lattice, FPCL)。

**制备壳多糖-胶原凝胶网架:** 参照Ataia<sup>[4]</sup>的方法制备壳多糖-胶原凝胶网架, 取4~9代口腔黏膜成纤维细胞, 按细胞数1.5×10<sup>4</sup>/孔加入凝胶溶液中, 继续培养, 制备成壳多糖-胶原凝胶口腔黏膜固有层(fibroblast-populated chitosan collagen lattice, FPCCL)。

**培养与观察:** 每日观察FPCL和FPCCL外观, 透明度, 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。21 d后用甲醛液固定, 常规脱水、包埋、切片, 苏木精-伊红染色。

**主要观察指标:** ①FPCL和FPCCL的大体观察。②FPCL和FPCCL在倒置显微镜下观察。③FPCL和FPCCL组织学观察。

**设计、实施、评估者:** 设计、实施、评估均为第一

作者, 接受过细胞培养的训练。

## 2 结果

**2.1 FPCL和FPCCL的大体观察** 刚制备的人工固有层呈粉红色半透明状。2 d后FPCL观察到有明显收缩, FPCCL的收缩发生在第3天或更晚些, 两种人工固有层各方向的收缩基本一致, 随着凝胶的收缩, 人工固有层逐渐与培养板底壁分离, 漂浮于培养液中, 颜色变浅, 厚度变薄, 透光性下降。最大收缩发生在第3~12天, 凝胶直径收缩到50%左右, 15 d后凝胶直径无明显变化, 见图1。



Figure 1 Comparison between two kinds of artificial lamina propria  
图1 两种人工固有层的收缩比较

充分收缩后的凝胶弹性好、韧性好, 可用持针器挑起并牵拉而不破碎, 见图2。

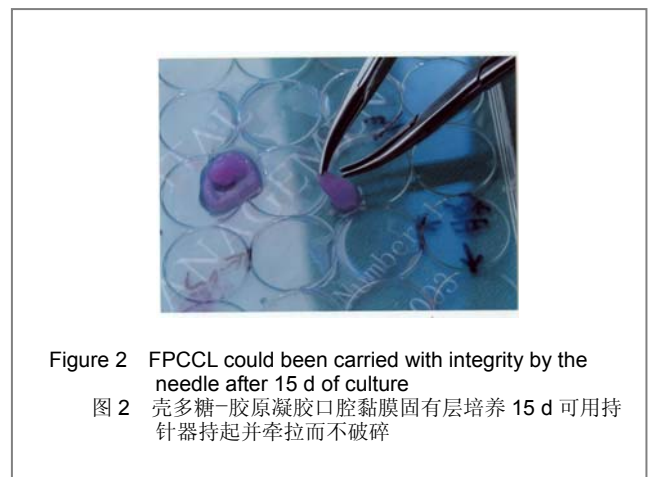


Figure 2 FPCCL could be carried with integrity by the needle after 15 d of culture  
图2 壳多糖-胶原凝胶口腔黏膜固有层培养15 d可用持针器挑起并牵拉而不破碎

**2.2 FPCL和FPCCL在倒置显微镜下观察** 刚接种的细胞呈圆形均匀分布在凝胶中, 24 h后, 细胞呈菱形或三角形, 以后凝胶中的OMF逐渐增多, 细胞狭长或窄短, 一般有两三个分支, 排列无一定方向。在胶原凝胶和壳多糖-胶原凝胶中细胞的生长未观察到明显差异, 见图3, 4。



Figure 3 Oral mucous fibroblasts rendered olive-like and unordered after 7 d in the gel solution (×400)  
图3 胶原凝胶中培养7 d, 大鼠口腔黏膜成纤维细胞呈长梭形, 排列无方向性 (×400)



Figure 4 Oral mucous fibroblasts rendered olive-like and unordered after 7 d in the chitosa-collagen-oral mucous fibroblasts complex (×400)  
图4 壳多糖-胶原凝胶中培养7 d, 大鼠口腔黏膜成纤维细胞呈长梭形 (×400)

### 2.3 FPCL和FPCCL组织学观察

FPCL基质的苏木精-伊红染色: 结构均匀, 凝胶中可以看到细长的胶原纤维, 胶原纤维稀疏, 呈平行排列, 见图5。



Figure 5 FPCL matrix strained by hematoxylin-eosin (×100)  
图5 胶原凝胶口腔黏膜固有层基质的苏木精-伊红染色 (×100)

FPCCCL基质苏木精-伊红的染色: 网架染色呈蜂窝状结

构, 胶原纤维排列无方向性, 见图6。

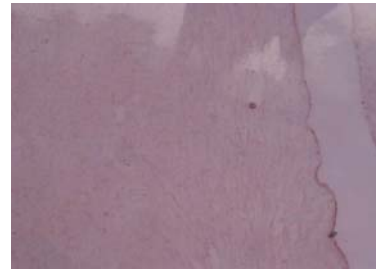


Figure 6 FPCCL matrix strained by hematoxylin-eosin (×100)  
图6 壳多糖-胶原凝胶口腔黏膜固有层基质的苏木精-伊红染色 (×100)

### 3 讨论

胶原蛋白、天然多糖类高分子等作为组织工程化皮肤支架材料在国内也已成为研究的热点<sup>[14-15]</sup>, 天然多糖类高分子是一种常见的支架材料, 此类天然高分子材料包括纤维素、甲壳质、壳多糖、糖胺聚糖(如硫酸软骨素、HA、肝素)及海藻酸盐等<sup>[16-17]</sup>。已有研究表明, 聚苯乙酸和聚乳酸-羟基乙酸具有纳米结构的三维支架是一种良好的真皮替代物<sup>[18-20]</sup>。壳多糖作为一种交联剂, 无免疫原性, 可自然降解, 但不被胶原酶降解, 具有广谱的抑制细菌、真菌生长和止血、止痛作用; 其凝胶开始收缩时间与收缩幅度显著低于胶原凝胶; 有良好的生物降解性、组织相容性和可促进透明质酸的合成<sup>[21-22]</sup>。壳聚糖及其衍生物由于其多孔凝胶结构, 在体内与大分子物质的良好相容性等优势越来越成为一种很有发展前景的组织工程替代品<sup>[13]</sup>。通常将其通过不同的交联剂与胶原或其他物质聚合成混合物, 应用于生物医学领域<sup>[23-24]</sup>。有研究探讨了以胶原/壳聚糖聚合物为支架材料构建组织工程人工皮肤的可行性<sup>[25-27]</sup>。

国外的组织工程人工皮肤均将壳多糖作为交联剂使用, 制备的人工皮肤属于胶原海绵类, 费用昂贵且不能大量制备<sup>[28]</sup>。本实验采用组织工程的方法, 选择Wistar大鼠 OMF作为种子细胞, 分别以胶原凝胶、壳多糖-胶原凝胶为生物支架, 形成FPCL和FPCCL, 研究并比较OMF在其中的生长代谢, 探讨应用胶原凝胶、壳多糖-胶原凝胶体外构建口腔黏膜固有层组织的可行性。结果显示: FPCL实验组基质网架结构均匀, 凝胶中可以看到细长的胶原纤维, 胶原纤维稀疏, 呈平行排列。而FPCCL实验组网架呈网格状, 胶原纤维相交错, 排列较规则。以往研究表明, 网格状结构有利于营养输送, 可保证移植后组织成活与重建, 并且形成的皮肤更耐摩擦, 不易形成水泡。本实验结果提示: FPCCL网架基质与FPCL网架基质相比, 更适于作为组织工程的支架。



壳多糖-胶原凝胶适宜于OMF生长。加入壳多糖不影响胶原凝胶的基本特性。同时,壳多糖的化学特性增强了FPCCL的力学耐受性,使其能耐受一般的手术操作。

综上所述,作者认为壳多糖-胶原凝胶是较好的口腔黏膜组织工程支架材料。相信随着组织工程技术的发展,人工口腔黏膜将得到进一步完善,从而为口腔黏膜缺损后的修复重建治疗提供新的材料。

#### 4 参考文献

[1] Ataia A, Mooney D, Vancanti JP, et al. Synther.Biodegradable Polymer Scaffolda Berlin.Birkhauser.1998.

[2] Wu ZQ,Huang LL,Ding Y,et al.Shanghai Kouqiang Yixue. 2007;16(1):46-51.  
武志强,黄立莉,丁越,等.应用组织工程口腔黏膜固有层修复颊黏膜缺损的实验研究[J].上海口腔医学,2007,16(1):46-51.

[3] Wu ZQ,Ding Y,Zhang LP,et al.Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi. 2006; 20(2):172-176.  
武志强,丁越,张力平,等.组织工程口腔黏膜固有层修复皮肤缺损的初步研究[J].中国修复重建外科杂志, 2006,20(2):172-176.

[4] Zhu XS,Zeng LF,Zhao CH.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(6): 1145-1148.  
朱希山,曾丽芬,赵春华.组织工程化人工皮肤研究的新进展[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(6): 1145-1148.

[5] Yang G,Fu LN,Zhou P,et al.2007nian Quanguo Gaofenzi Xueshu Lunwen Baogaohui Lunwenji.2007.  
杨光,付丽娜,周平,等.纳米纤维素人工皮肤的创制[C].2007年全国高分子学术论文报告会论文集.2007.E-0-010.

[6] Dan WH,Liao LL,Lin H,et al.Shengwu Yixue Gongcheng yu Linchuang. 2007;11(5): 333-336.  
但卫华,廖隆理,林海,等.3D-SC人工皮肤材料组织相容性的实验研究[J].生物医学工程与临床,2007,11(5): 333-336.

[7] Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunprasert T, et al. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;85(1): 210-219.

[8] Tint NL,Pherwani A, Robson K, et al. Ocular surface reconstruction. Ophthalmology. 2007;114(2):394.e1-3.

[9] Zou J,Liu Y, Zhu Y,et al.Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi. 2007;21(8): 872-876.  
邹剑,刘粤,朱轶,等.猪小肠黏膜下层修复鼠皮肤全层缺损的实验研究[J].中国修复重建外科杂志, 2007, 21(8): 872-876.

[10] Wang ZX,Cai WQ,Zhai CB,et al.Jieyou Xuebao. 2008;39(4):598-601.  
王振显,蔡文清,瞿长宝,等.人脱细胞羊膜与体外培养大鼠血管平滑肌细胞的生物相容性[J].解剖学报, 2008, 39(4):598-601.

[11] Xiao SC,Zhu SH,Xia ZF,et al.Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao. 2007;29(4):506-509.  
肖仕初,朱世辉,夏照帆,等.含表皮细胞生长因子基因人表皮细胞复合皮的构建与移植[J].中国医学科学院学报,2007,29(4):506-509.

[12] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见.2006-09-30.

[13] Wu Zhiqiang, KJ Davies, DW Thomas. A study to the fibroblast-populated collagen attices. Chinese Journal of Traumatology. 2000;3(3):189-190.

[14] Jing S,Chen QH,Pan XH,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(10): 1885-1888.  
景森,陈庆华,潘兴华,等.胶原蛋白/葡甘聚糖共混膜的制备及性能表征[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(10): 1885-1888.

[15] Liu AJ,Huang JT,Li HB.Zhongshan Daxue Xuebao. 2007;28(1):11-14.  
刘爱军,黄锦桃,李海标.ES细胞源性表皮干细胞与类真皮构成皮肤类似物的分化[J].中山大学学报,2007,28(1):11-14.

[16] Zhang Y,Li XL,Shi YJ.Shengwu Yixue Gongcheng yu Linchuang. 2007;11(2): 97-102.  
张杨,李秀兰,师宜健.含有生肌液的明胶-壳聚糖皮肤支架的生物特性研究[J].生物医学工程与临床, 2007, 11(2): 97-102.

[17] Tan YJ,Hong F,Shao ZY.Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi. 2007;27(4): 126-131.  
谭玉静,洪枫,邵志宇.细菌纤维素在生物医学材料中的应用[J].中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 126-131.

[18] Sun T, Norton D, McKean RJ, et al. Development of a 3D cell culture system for investigating cell interactions with electrospun fibers. Biotechnol Bioeng. 2007;97(5):1318-1328.

[19] Lee JJ, Lee S, Park JC, et al. Investigation on biodegradable PLGA scaffold with various pore size structure for skin tissue engineering. Current Applied Physics. 2007;7S1:e37-e40.

[20] Chong EJ,Phan TT,Lim IJ,et al.Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. Acta Biomater. 2007;3(3):321-330.

[21] Zhu TY,Wu JJ,Hu L,et al.Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi. 2003; 17(2): 113-116.  
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初步研究[J].中国修复重建外科杂志, 2003, 17(2): 113-116.

[22] Zhou YL,Hou LZ,Ma G,et al.Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi. 2003;17(2): 117-121.  
周余来,侯立中,马刚,等.壳多糖基质网架复层组织工程皮肤的移植研究[J].中国修复重建外科杂志, 2003, 17(2): 117-121.

[23] Kim IY, Seo SJ,Moon HS, et al.Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol Adv. 2008;26(1):1-21.

[24] Chen YY, Chen X,Wang ZL,et al.Jilin Daxue Xuebao:Yixueban. 2007;33(5):867-870.  
陈彦彦,陈昕,王宗良,等.壳多糖组织工程支架材料的制备及其应用[J].吉林大学学报:医学版, 2007, 33(5):867-870.

[25] Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, et al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. J Biomater Sci Polym Ed.2007;18(2):147-163.

[26] Liu H, Fan H, Cui Y, et al. Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan-gelatin scaffold. Biomacromolecules.2007;8(5):1446-1455.

[27] Yi YC.Shichuan Daxue Shuoshi Xuwei Lunwen. 2007.  
叶易春.胶原基体表创伤修复膜的研制和性能表征[D].四川大学硕士学位论文, 2007.

[28] Zhu TY,Wu JJ,Li WW.Waiguo Yixue Pifu Xingbingxue Fence. 2000;26(1): 6.  
朱堂友,伍津津,李文维.皮肤创面覆盖物的研究进展[J].国外医学皮肤性病学分册,2000,26(1): 6.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金资助:** 辽宁省科技厅科研基金(00225001-5)资助。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的意义:** 文章探讨了壳多糖-胶原凝胶为生物支架,构建口腔黏膜固有层的可行性,为临床上体外构建组织工程口腔黏膜提供实验依据。

**课题评估的“金标准”:** 实验结果指标评价均为形态学观察。尚未有公认的“金标准”。

**设计或课题的偏倚与不足:** 实验如果能观察不同壳多糖浓度对胶原凝胶强度、降解率及生物亲和性等的影响,内容会更充实、更有意义。

**提供临床借鉴的价值:** 壳多糖-胶原凝胶可作为构建口腔黏膜固有层组织,为体外构建组织工程口腔黏膜提供了实验依据。