

皮肤全层缺损真皮修复不同阶段对表皮再生的影响★

宋宁, 富玲, 辛畅泰, 马世伟, 石岫昆

Effects of different dermis repairing stages on epidermis regeneration in full thickness wound

Song Ning, Fu Ling, Xin Chang-tai, Ma Shi-wei, Shi Xiu-kun

Abstract

BACKGROUND: Presently, studies concerning tissue engineering mainly focus on epidermal stem cells and dermal scaffolds, few report the effects of generation speed and different repairing periods of dermis on neogenesis and reconstruction of epidermis.

OBJECTIVE: To investigate the potential influence of dermis during repairing process on the repair and reconstruction of epithelial tissues and to reveal the possible optimum stage for repair of epithelial tissues.

METHODS: Ten New Zealand rabbits were made into animal models with 3 wounds on each dorsum at 0, 7 and 14 days and were divided into 0, 7 and 14 days groups. Amnion carrier compound-membrane loaded with auto-epithelial cells was embedded into rabbits at 21, 14 and 7 days after model preparation. Samples were harvested 7 days after operation to observe the wound healing by using macroscopic and histological assessment (hematoxylin-eosin staining, Mallory PTAH staining), and type I collagen immunohistochemistry observation.

RESULTS AND CONCLUSION: The wound in the 0 day group was closely contacted with surrounding tissues without gaps. However, there was concavity in the 7 days group, and the concavity was great and thick in the 14 days group, with a clear boundary to surrounding tissues. It demonstrated that the repairing effect was superior in the 0 day group to other 2 groups ($P < 0.05$). Compared with other groups, the positive type I collagen stratum reticulare dermidis and papillary layer, composed of fibroblast, blood vessel, and collagen fiber, were obviously in the 0 day group ($P < 0.05$), with high healing rate ($P < 0.05$). The differences of promoting action on epithelial tissue regeneration exist in different repairing stages of dermis, late stage of hyperplasia and beginning of reconstruction are the optimal periods for accelerating epidermis regeneration.

Song N, Fu L, Xin CT, Ma SW, Shi XK. Effects of different dermis repairing stages on epidermis regeneration in full thickness wound. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41): 7631-7634.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Hand Surgery, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Song Ning★ Master, Associate chief physician, Department of Hand Surgery, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China songningsn@sina.com

Received: 2010-06-18 Accepted: 2010-07-06

摘要

背景: 当前组织工程研究多着重表皮干细胞和真皮支架材料的研究, 而少有真皮新生速度和真皮修复不同时期组织结构对表皮新生和重建影响的报道。

目的: 观察真皮修复过程中对表皮修复和重建的影响以及是否有促进表皮修复速度的最佳阶段。

方法: 新西兰大白兔 10 只分别于第 0, 7, 14 天在背部制成 3 个直径约为 3 cm 的创面, 随机分为 0, 7, 14 d 组, 每组计 10 个创面, 3 组创面分别于皮肤全层损伤修复后 21, 14, 7 d 植入自体表皮细胞羊膜载体复合膜。7 d 后取材, 采用大体观察、常规组织学观察(苏木精-伊红染色, Mallory PTAH 染色)、I 型胶原免疫组织化学观察等化学染色动态观察创面愈合情况。

结果与结论: 0 d 组创面与周边正常有毛皮肤齐平, 与周边组织连接明显较 7 d 组及 14 d 组紧密, 7 d 组尚有凹面, 而 14 d 组创面凹陷明显较 7 d 组大而深, 与周边组织分界明显, 这表明 0 d 组皮肤缺损的修复效果明显优于其他 2 组($P < 0.05$)。0 d 组 I 型胶原阳性的成纤维细胞、血管及胶原纤维等组成的真皮网状层和乳头层较其他 2 组明显($P < 0.05$), 创面愈合率高($P < 0.05$)。真皮修复的不同时期, 对表皮再生的促进作用存在不同, 全层皮肤缺损处于真皮修复的增生晚期与重建初期是促进表皮新生的最佳阶段。

关键词: 表皮再生; 羊膜; 碱性成纤维生长因子; 维生素 C; 皮肤缺损; 皮肤组织工程
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.008

宋宁, 富玲, 辛畅泰, 马世伟, 石岫昆. 皮肤全层缺损真皮修复不同阶段对表皮再生的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7631-7634. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

沈阳医学院奉天医院手外科, 辽宁省沈阳市 110024

宋宁★, 男, 1969 年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2003 年中国医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事组织工程与临床康复的研究。songningsn@sina.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)41-07631-04

收稿日期:2010-06-18
修回日期:2010-07-06
(20100226011/YJ-Z)

0 引言

皮肤损伤特别是大面积皮肤缺损的修复一直是临床急待解决的难题^[1-4], 尤其减轻创面收缩和瘢痕增生至今仍然没有行之有效的解决方法。

目前临床上常采用皮肤移植来修复大面积的皮肤缺损, 但是无论自体皮或异体皮移植均受到供体来源的限制, 且移植异体皮或人工

合成皮肤替代物, 更存在免疫排斥反应的问题^[5-7]。

构建复合皮时, 选择合适的种子细胞及其负载材料尤为重要^[8-10]。羊膜以其来源广泛, 取材方便, 生物相容性好, 抗原性低等优点被誉为“神奇之膜”^[11]。本次实验用含有碱性成纤维细胞生长因子和维生素 C 的羊膜载体复合膜, 在真皮缺损修复不同时间植入条件一致的表皮细胞, 探索真皮对表皮新生和重建作用的最佳修复期。

1 材料和方法

设计: 对比观察, 动物实验。

时间及地点: 实验于2009-06/2010-06在沈阳医学院奉天医院动物实验室完成。

材料:

实验动物: 3月龄新西兰大耳白兔10只, 雌雄不限, 体质量1 500~2 500 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胰蛋白酶	北京奥博星生物技术有限公司
EDTA	美国 Biosharp 公司
明胶, 壳聚糖	美国 Sigma 公司
人淋巴细胞分离液	中国医学科学院生物医学研究所
碱性成纤维生长因子和维生素 C	珠海东大制药有限公司
肝素	美国 Gibco 公司
NIKE-2000 倒置显微镜	日本 NIKE 公司
Leica Q 500IW 图像分析仪	德国徕卡仪器有限公司

方法:

表皮细胞的制备: 氯氨酮(100 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 无菌条件下取新西兰大耳白兔背部皮肤, 面积为1.0 cm×1.5 cm, 修剪皮下组织, 用含青链霉素的磷酸盐缓冲液洗涤3次, 0.5%分散酶4 ℃消化过夜, 将表皮与真皮分离。将分离的表皮用磷酸盐缓冲液洗涤3次, 将表皮剪成1 mm³大小, 置入15 mL的离心管中, 0.2%的胰蛋白酶消化30 min, 用含体积分数10%胎牛血清的K-SFM培养基终止消化, 1 000 r/min离心3 min, 弃去上清液。加入含1 mL的体积分数10%胎牛血清的K-SFM培养基, 备用^[12]。

羊膜载体复合膜的制备: 取新鲜牛羊膜, 磷酸盐缓冲液洗两三次, 去除上皮细胞组织, 超声波振荡30 min, 水浴振荡器消化过夜, 用0.25%胰蛋白酶在超声波振荡器中作用40 min, 恒温水浴振荡消化3 h, 磷酸盐缓冲液洗涤3次, 把羊膜放在涂有油纱的干燥盘中, 冷冻干燥后消毒备用。在羊膜上涂含有碱性成纤维生长因子和维生素C的明胶和壳聚糖复合凝胶, 待向皮肤缺损移植时, 将自体表皮细胞在条件一致下, 植入明胶面上, 即为羊膜载体复合膜。

用1%壳聚糖和1%明胶制成明胶壳聚糖缓释降解复合凝胶液, 配制时分别加入10 mL 碱性成纤维生长因子和10 mL 维生素C。取30 mL凝胶液平铺于大小为4.52 cm²近似圆形的羊膜上, 于自制的模具中塑形, 冷冻干燥后备用。

分组: 新西兰大耳白兔10只分别于第0, 7, 14天在背部制成3个创面(直径约为3 cm, 深 0.2 cm), 分别记

为0 d, 7 d, 14 d组。3组创面分别于皮肤全层损伤修复后21, 14, 7 d植入自体表皮细胞羊膜载体复合膜。

大体观察: 术后动物单笼饲养, 观察其活动、进食情况、创面变化、创面愈合和创面与周边皮肤的关系等情况^[13-14]。

创面面积测量: 用无伸缩性的透明薄膜覆盖于所有创面上, 描下创面轮廓。计算机扫描将该图像扫描入计算机。通过MIG 2000软件计算出创面面积。

创面组织制备: 创口植入自体表皮细胞羊膜载体复合膜7 d后, 氯氨酮麻醉, 俯卧位固定于手术台上, 将脊柱及两侧部剃毛备皮, 消毒, 于术区切取圆形创面, 直径约为3 cm, 深度达深筋膜^[15]。表面放置同一条件的加压物, 以避免皮肤创面长期裸露和皮肤收缩而影响实验效果。二次植入自体表皮细胞羊膜载体复合膜后, 亦在植入物表面放置同一加压物。

苏木精-伊红染色: 将30个创面所取组织放置于10%中性甲醛溶液固定, 连续切片10片, 进行苏木精-伊红染色^[16]。观察创面新生组织的结构, 新生真皮和新生表皮的相互关系。400倍光镜下每张切片取3处不同位置测定真皮和表皮组织厚度, 计算均值。

免疫组织化学染色: 采用S-ABC法检测 I 型胶原^[17]。每张切片取浅层、中层及深层的真皮组织, 各3处, 在400倍光镜下计数 I 型胶原阳性细胞数, 计算均值。

主要观察指标: 观察移植后实验兔的创面愈合情况以及创口中I型胶原的表达。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均由全体作者完成。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验兔10只均进入最终统计分析, 无脱落。

2.2 大体观察 载体复合物植入兔皮肤缺损处后, 刀口愈合良好, 创面与覆盖物结成紧密不同的硬痂, 创面凹陷程度不同, 与其周边正常有毛皮肤连接紧密程度不同, 分界程度各异: 0 d组覆盖物几乎全部脱离, 创面已与周边正常有毛皮肤长平, 与周边组织连接紧密。7d组尚有凹面。14 d组覆盖物脱离创面少, 创面凹面明显, 且与周边组织分界明显。

2.3 组织学观察 在各组切片均可见新生真皮组织不同程度变厚, 其中胶原纤维增多, 粗细不等, 成纤维细胞增多。特别是功能活跃的核呈椭圆形、常染色质着色淡、核仁清楚和 I 型胶原免疫组化染色染成阳性的细胞增多尤为明显, 且血管丰富多少不一。新生真皮表面均有多少薄厚不等的表皮细胞存在, 见图1, 2。

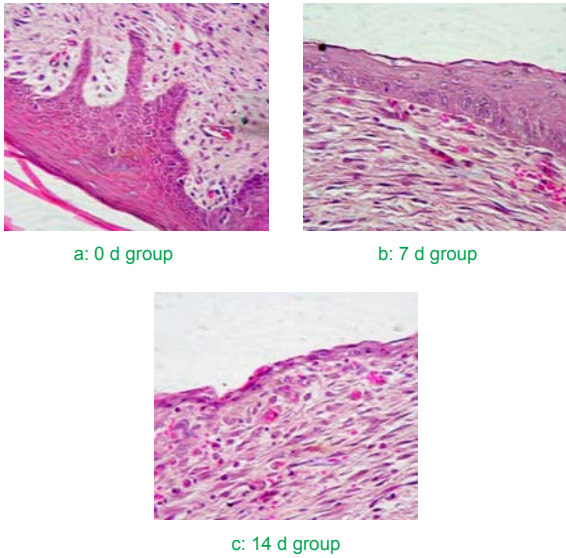


Figure 1 Newly born tissues at wound surface in each group (Hematoxylin-eosin staining, ×400)
图1 各组创面新生组织(苏木精-伊红染色, ×400)

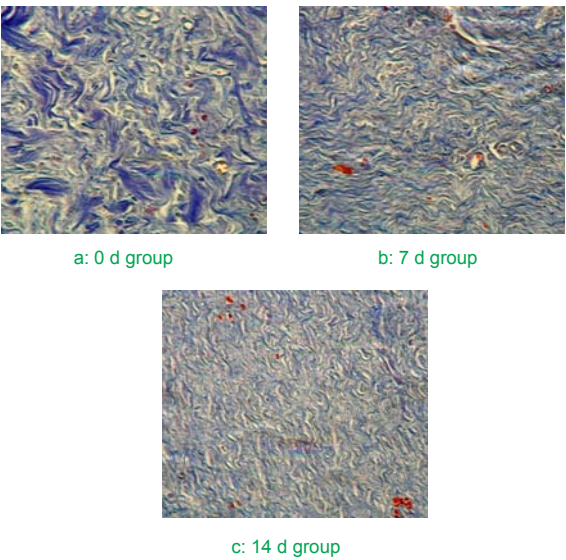


Figure 2 Collagen fibers in newly born dermis in each group (Mallory PTAH staining, ×400)
图2 各组新生真皮的胶原纤维(Mallory PTAH 染色, ×400)

2.4 图像分析仪测定 见图3~6。

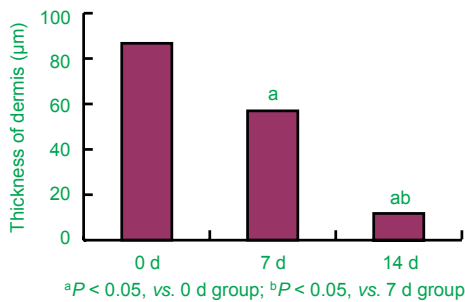


Figure 3 Thickness of dermis in each group (n=10)
图3 各组真皮厚度(n=10)

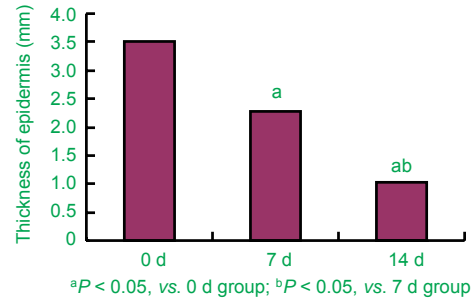


Figure 4 Thickness of epidermis in each group (n=10)
图4 各组表皮厚度(n=10)

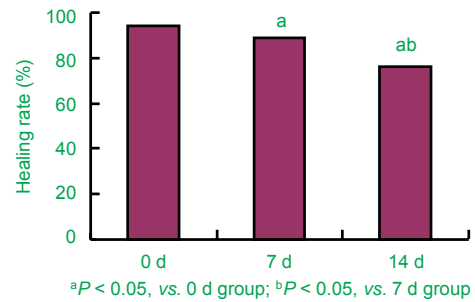


Figure 5 Healing rate of wound in each group (n=10)
图5 各组创面愈合率(n=10)

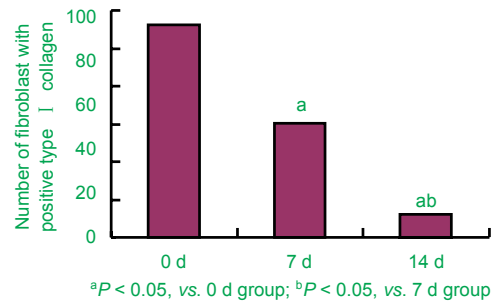


Figure 6 Number of fibroblast with positive type I collagen (n=10)
图6 各组I型胶原阳性成纤维细胞的数量(n=10)

皮肤损伤后, 随着时间的延长, 新生真皮组织内I型胶原阳性成纤维细胞数量明显增多, 厚度增加。损伤21 d后移植羊膜复合膜创口, 新生的真皮组织已显示出真皮网状层和乳头状层的结构, 表皮细胞不但具有基底层、棘细胞层、颗粒细胞层、角质层等, 且与正常有毛皮肤结构(除毛囊、皮脂腺等)无明显不同。

3 讨论

皮肤缺损真皮组织的修复是表皮新生和重建的基础, 能加速真皮修复, 随之就会加快表皮再生和重建。一般认为真皮与表皮两者间存在相互影响机制。真皮修复的炎症期和增生初期, 其组织结构处于肉芽组织和一

般结缔组织形成阶段, 不具备真皮的结构功能, 惟有在增生晚期和重建初期, 逐渐形成似真皮的网状层和少许的乳头层的结构, 应该认为此真皮修复时期的组织结构, 方会对表皮重建和再生起到最佳作用。因此, 实验利用羊膜载体复合膜孔隙大, 降解慢, 渗透性强^[18], 证明损伤后新生真皮随时间延长明显增厚, 新生真皮不但全被新生表皮覆盖, 而且已构建成颇似正常表皮的五层细胞—基底细胞层、棘细胞层、颗粒细胞层、透明层和角化层。表皮细胞与下方由疏松结缔组织和丰富血管组成的真皮乳头层紧密连接, 且表皮细胞层的基底部在乳头之间显出表皮细胞脚, 表皮基底层出现大小不等的表皮细胞突起伸向真皮乳头层, 表皮细胞与真皮组织结合紧密, 形成完整的基底膜, 未见有脱离现象。说明在真皮修复的过程中有可能存在促进表皮再生和重建的最佳时期, 即真皮修复的增生晚期和重建初期为真皮组织结构对表皮再生和重建的最佳作用期。

损伤7 d后的羊膜复合膜移植, 使新生真皮组织几乎均处于结缔组织增生初期结构, 其表面覆盖表皮细胞多为单层或双层, 大部分尚没有表皮细胞出现。而损伤14 d后的羊膜复合膜移植, 使新生真皮组织表面虽可见有表皮细胞覆盖, 但较薄且细胞层次较少, 多为两三层即基底层和棘细胞层, 罕有颗粒层细胞。在新生真皮与表皮细胞相连接部位, 多为平坦, 少见大小不等的弯曲现象, 还可看到真表皮脱离的现象。在由此可知真皮组织在修复中, 并非全层都起同样作用, 而是应该存在真皮对表皮再生和重建最佳影响的修复时期, 即可能是真皮修复的增生晚期和重建初期为真皮组织结构对表皮再生和重建作用的最佳时期。如果能进一步探讨这一问题, 对皮肤组织工程治疗将有重要意义。

4 参考文献

[1] Clayman MA, Clayman SM, Mazingo DW. The use of collagen-glycosaminoglycan copolymer (Integra) for the repair of hypertrophic scars and keloids. *J Burn Care Res.* 2006;27(3):404-409.

[2] Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, et al. Clinical trial of allogeneic cultured dermal substitute for the treatment of intractable skin ulcers in 3 patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50(5):803-804.

[3] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26(4):433-441.

[4] Iida T, Takami Y, Yamaguchi R, et al. Development of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent based on an acellular allogeneic dermal matrix: a preliminary report of clinical application to burn wounds. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2005;39(3):138-146.

[5] van Geel N, Ongenaes K, Vander Haeghen Y, et al. Subjective and objective evaluation of noncultured epidermal cellular grafting for

repigmenting vitiligo. *Dermatology.* 2006;213(1):23-29.

[6] Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf a human skin equivalent. *Adv Wound Care.* 1998;11(4 Suppl):1-8.

[7] Dagregorio G, Guillet G. Artificial skin as a valuable adjunct to surgical treatment of a large squamous cell carcinoma in a patient with epidermolysis bullosa. *Dermatol Surg.* 2005;31(4):474-476.

[8] MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature.* 2007;445(7130):874-880.

[9] De Gado F, Chiummariello S, Monarca C, et al. Skin grafting: comparative evaluation of two dressing techniques in selected body areas. *In Vivo.* 2008;22(4):503-508.

[10] Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(1): 105-118.

[11] Liang J, Fan JC, Cai GB. *Zhongguo Meirong Yixue.* 2009;18(1):131-133.
梁婧, 范金财, 蔡国斌. 人羊膜对创面愈合的促进作用[J]. *中国美容医学*, 2009, 18(1):131-133.

[12] Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1985;161(3):526-546.

[13] Cuttle L, Kempf M, Phillips GE, et al. A porcine deep dermal partial thickness burn model with hypertrophic scarring. *Burns.* 2006;32(7):806-820.

[14] Norhayati MM, Mazlyzam AL, Asmah R, et al. Collagen fibers an important entity in skin tissues remodeling. *Med J Malaysia.* 2004;59 Suppl B:184-185.

[15] Fu XB, Fang LJ, Wang YX, et al. *Zhonghua Yixue Zazhi.* 2004;84(11):920-924.
付小兵, 方利君, 王玉新, 等. 骨髓间充质干细胞自体移植提高猪皮肤创面修复质量的初步研究[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(11):920-924.

[16] Liu ZH. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
刘增辉. 病理染色技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

[17] Liu HH, Cao YJ, Zhang YL, et al. *Zhongguo Linchuang Shenjing Kexue.* 2008;16(4):369-374.
刘慧慧, 曹勇军, 张艳林, 等. 纤维蛋白原、纤维蛋白及其降解产物对培养血管平滑肌细胞表型转换的影响[J]. *中国临床神经科学*, 2008, 16(4):369-374.

[18] Hou AL, Yan GH, Su YP, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(1): 149-152.
侯爱莲, 闫国和, 粟永萍, 等. 羊膜负载骨髓干细胞与角胚细胞对放射性全层皮肤缺损创面胶原合成的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(1):149-152.

来自本文课题的更多信息—

致谢: 衷心感谢吉林大学石岫昆教授、沈阳医学院奉天医院辛畅泰教授对本文的科学严谨的指导, 衷心感谢沈阳医学院组胚教研室安贵林教授、沈阳医学院奉天医院手外科研究所魏侃、徐媛、于宁老师, 在实验过程中给予的鼎力帮助和指导。衷心感谢吉林大学白求恩医学院和沈阳医学院全体教师对实验的大力支持。

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。

课题的创新点: 实验所采用的载体复合物, 为羊膜载体复合明胶和壳聚糖的复合膜, 在以往研究中未见报道, 为皮肤全层缺损的组织工程修复提供理论依据, 具有一定创新性。

课题评估的“金标准”: 苏木精-伊红染色、Masson 染色、Van Gieson 染色观察胶原形态, 免疫组织化学方法观察胶原数量, 为目前检测常规方法。

设计或课题的偏倚与不足: 应进一步探究真皮组织在修复不同时期, 对表皮再生和重建的影响因素。

提供临床借鉴的价值: 真皮新生速度和真皮修复不同时期的组织结构对表皮新生和重建的研究, 对于临床皮肤移植具有一定的指导意义。