

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.51.022 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

苗宗宁, 李芳, 张学光, 吕国忠. 丝素蛋白材料复合骨髓间充质干细胞修复皮肤创面[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(51): 9616-9623.

## 丝素蛋白材料复合骨髓间充质干细胞修复皮肤创面<sup>☆</sup>◆

苗宗宁<sup>1,2</sup>, 李芳<sup>2</sup>, 张学光<sup>2</sup>, 吕国忠<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 无锡第三人民医院研究所, 江苏省无锡市 214041;  
<sup>2</sup> 苏州大学江苏省干细胞研究重点实验室, 江苏省苏州市 215007

苗宗宁<sup>☆</sup>, 男, 1974年生, 江苏省淮阴市人, 汉族, 2010年苏州大学毕业, 博士, 副主任技师, 主要从事干细胞及组织工程研究。  
zongningm@yahoo.com.cn

通讯作者: 吕国忠, 主任医师, 无锡第三人民医院研究所, 江苏省无锡市 214041  
luguozhong@hotmail.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2012)51-09616-08

收稿日期: 2012-04-16  
修回日期: 2012-05-19  
(20120312006/GW·C)

**文章亮点:** 证实丝素蛋白材料与骨髓间充质干细胞联合移植可修复大鼠全层皮肤缺损。

**关键词:** 丝素蛋白; 骨髓间充质干细胞; 皮肤缺损; 组织工程

### 摘要

**背景:** 丝素蛋白材料具有良好的生物相容性。

**目的:** 观察丝素蛋白材料复合骨髓间充质干细胞修复大鼠全层皮肤缺损的可行性。

**方法:** 应用 5-溴脱氧尿核苷标记 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 并复合丝素蛋白材料培养。建立 SD 大鼠全层皮肤缺损模型, 随机分组: 实验组移植同种异体骨髓间充质干细胞与丝素蛋白材料复合物, 细胞组移植骨髓间充质干细胞, 对照组移植丝素蛋白材料, 空白组不作处理。

**结果与结论:** ①大体观察: 空白组术后 8 周仍可见坏死组织, 且瘢痕挛缩明显; 细胞组与空白组愈合情况相近。对照术后 8 周末愈合, 有少量瘢痕形成, 与周围皮肤融为一体。实验组术后 4 周创面无明显瘢痕形成, 术后 8 周愈合良好。②组织学观察: 实验组术后 4 周免疫荧光染色显示带有 5-溴脱氧尿核苷标记的骨髓间充质干细胞定位在重建的表皮和真皮组织中, 术后 8 周创面愈合良好; 细胞组免疫荧光染色显示少量带有 5-溴脱氧尿核苷标记的骨髓间充质干细胞存在。表明丝素蛋白材料与骨髓间充质干细胞联合移植可修复大鼠全层皮肤缺损。

## Repairing full-thickness cutaneous defects with silk fibrin combined with bone marrow mesenchymal stem cells

Miao Zong-ning<sup>1,2</sup>, Li Fang<sup>2</sup>, Zhang Xue-guang<sup>2</sup>, Lü Guo-zhong<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The silk fibroin material has good biocompatibility.

**OBJECTIVE:** To observe the feasibility of silk fibroin material and bone marrow mesenchymal stem cells for repairing the rat full-thickness cutaneous defects.

**METHODS:** The bone marrow mesenchymal stem cells of Sprague-Dawley rats were labeled with 5-bromodeoxyuridine and cultured with silk fibroin material. The Sprague-Dawley rat full-thickness cutaneous defect models were prepared and divided into four groups: the experimental group was transplanted with the complex of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and silk fibroin material; the cell group was transplanted with bone marrow mesenchymal stem cells; the control group was transplanted with silk fibroin material; and the blank group without any treatment.

**RESULTS AND CONCLUSION:** ①General observation: the necrotic tissue was observed in the blank group at 8 weeks after operation and the scar contracture was obvious; the wound healing in the cell group was similar with that in the blank group. The wound in the control group was not healed and a little amount of scar was observed and integrated with the surrounding skin. There was no obvious scar in the experimental group at 4 weeks after operation and the wound was healed well at 8 weeks after operation. ②Histological observation: the immunofluorescence staining in the experimental group at 4 weeks after operation showed that the 5-bromodeoxyuridine labeled bone marrow mesenchymal stem cells were located in reconstructed epidermis and dermal tissues, and wound surface was recovered well at 8 weeks after operation; the immunofluorescence staining in the cell group showed a little amount of 5-bromodeoxyuridine labeled bone marrow mesenchymal stem cells. It indicates that co-transplantation of silk fibroin material and bone marrow mesenchymal stem cells can repair rat full-thickness cutaneous defects.

Miao ZN, Li F, Zhang XG, Lü GZ. Repairing full-thickness cutaneous defects with silk fibrin combined with bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(51): 9616-9623.

## 0 引言

随着组织工程研究的不断拓展, 利用组织工程原理构建人工皮肤替代物, 用于皮肤移植可有效解决严重创伤、大面积烧伤和慢性皮肤溃疡等皮肤缺损皮源不足的难题<sup>[1]</sup>。组织工程的支架材料不仅影响种子细胞的生物学特性和培养效率, 而且决定移植后能否很好地与受体结合起来, 发挥修复缺损作用。

近年来在组织工程支架材料的研究中, 丝素蛋白引起高度重视。丝素蛋白作为生物材料有以下优点: ①较其他天然纤维机械特性好, 能与许多高性能的纤维媲美。②可加工成膜支架或其他形式。③表面易化学共价修饰黏附位点和细胞因子。④可通过遗传工程改造丝蛋白成分来调节相对分子质量的大小、可结晶性和可溶性。⑤可部分生物降解, 降解产物不仅对组织无毒副作用, 还对周围组织有营养与修复作用<sup>[2]</sup>。

在前期研究发现间充质干细胞在体外具有分化为血管内皮细胞的能力及丝素蛋白材料具有良好生物相容性的基础上<sup>[3]</sup>, 将骨髓间充质干细胞与丝素蛋白材料复合培养后移植修复皮肤缺损创面, 为皮肤组织工程研究和临床治疗皮肤缺损寻求新的思路与方法。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学动物实验。

**时间及地点:** 于2010年9月至2011年12月在无锡第三人民医院烧伤研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** ①二三月龄SD大鼠, 雌雄不拘, 体质量200-250 g, 由江苏省血吸虫病防治研究所提供, 许可证号SCXK(苏)2007-0021。用于骨髓间充质干细胞的培养。②健康纯种SD大鼠24只, 雌雄不拘, 体质量250-300 g, 由江苏省血吸虫病防治研究所提供, 许可证号SCXK(苏)\_2007-0021。用于制作全层皮肤缺损模型。实验过程中对动物处置符合2009年相关动物伦理学标准的《Ethical issues in animal experimentation》条例。

### 试剂与材料:

试剂及材料	来源
丝素蛋白材料	江苏省干细胞研究重点实验室
DMEM-LG Penicillin-Streptomycin、胰蛋白酶	GIBCO 公司
胎牛血清 FBS	Hyclone 公司
羊抗鼠-FITC	Sigma 公司
Percoll	Amersham pharmacia biotech 公司
5-溴脱氧尿核苷、抗 5-溴脱氧尿核苷单克隆抗体、sABC 试剂盒	武汉博士德公司
羊抗鼠单克隆抗体 CD44	Exalpha Biological Inc
CD29、CD106、CD105	BD
CD34	Caltag Laboratories
CD45	Bioleand

### 实验方法:

**大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养:** 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养参照Spagnoli等<sup>[4]</sup>的方法, 具体步骤是: SD大鼠颈椎脱臼法处死, 无菌条件下分离并剪下股骨、胫骨, 置于已消毒并盛有含双抗(100 U/L的青霉素、链霉素)的PBS平皿中, 除去残留的肌肉, 用剪刀分别剪开两端骨垢, 暴露骨髓腔, 用体积分数为10%胎牛血清的DMEM液20 mL冲出骨髓, 细胞悬液吹打混匀, 加入到预置10 mL Percoll分离液(密度1.073 g/mL)的离心管中, 2 000 r/min离心30 min, 收集云雾状白膜层的单个核细胞, 调整细胞浓度, 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种细胞于培养瓶中, 置于37 °C、饱和湿度、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>培养箱中, 3 d全量换液1次, 显微镜下观察细胞的生长情况。

**流式细胞仪检测鼠骨髓间充质干细胞表面抗原表达:** 取培养的第2代骨髓间充质干细胞, 经0.25%胰蛋白酶消化后, 用含体积分数1%小牛血清白蛋白的PBS调整细胞浓度至 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。取50 μL细胞悬液, 分别加入下列羊抗鼠单克隆抗体: CD34-FITC、CD45-PE、CD29-PE、CD44-PE、CD105-PE、CD106-PE, 置4 °C孵30 min, PBS洗2次, 进行流式细胞仪分析。

**5-溴脱氧尿核苷标记鼠骨髓间充质干细胞:** 取培养的第3代骨髓间充质干细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于培养瓶。培养基包括

<sup>1</sup>Research Institute, Wuxi Third People's Hospital, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China;  
<sup>2</sup>Jiangsu Provincial Key Laboratory of Stem Cells Research, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China

Miao Zong-ning☆, Doctor, Associate chief technician, Research Institute, Wuxi Third People's Hospital, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China; Jiangsu Provincial Key Laboratory of Stem Cells Research, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China  
zongningm@yahoo.com.cn

Corresponding author: Lǚ Guo-zhong, Chief physician, Research Institute, Wuxi Third People's Hospital, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China  
luguo-zhong@hotmail.com

Received: 2012-04-16  
Accepted: 2012-05-19

DMEM、体积分数10% FBS和100 U/mL Penicillin-Streptomycin。待细胞长到铺满80%瓶底时加入5-溴脱氧尿核苷，终浓度为10 mg/L，37 °C、体积分数5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 48 h。

**5-溴脱氧尿核苷标记鼠骨髓间充质干细胞免疫荧光染色：**去除标记细胞的培养液，经40 g/L多聚甲醛室温环境固定30 min，0.3% TritonX-100处理20 min，然后用体积分数10%羊血清封闭20 min，加5-溴脱氧尿核苷单克隆抗体(1：200稀释)，37 °C孵育2 h，最后滴加FITC标记的羊抗鼠荧光抗体(1：500稀释)，37 °C水浴箱中孵育30 min，PBS 洗涤后置荧光显微镜下观察。

**5-溴脱氧尿核苷标记的鼠骨髓间充质干细胞与丝素蛋白材料复合培养：**收集5-溴脱氧尿核苷标记的骨髓间充质干细胞，调整浓度为 $5 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ ，先加100 μL培养基(DMEM+1%Penicillin-Streptomycin+体积分数20%FBS)于6孔板的孔底，放入材料，向材料表面加100 μL细胞悬液，常规培养2 h，取出后翻转，向另一面加100 μL细胞悬液，培养2 h，加入培养基(DMEM+1% Penicillin-Streptomycin+体积分数20%FBS)没过材料，常规培养。

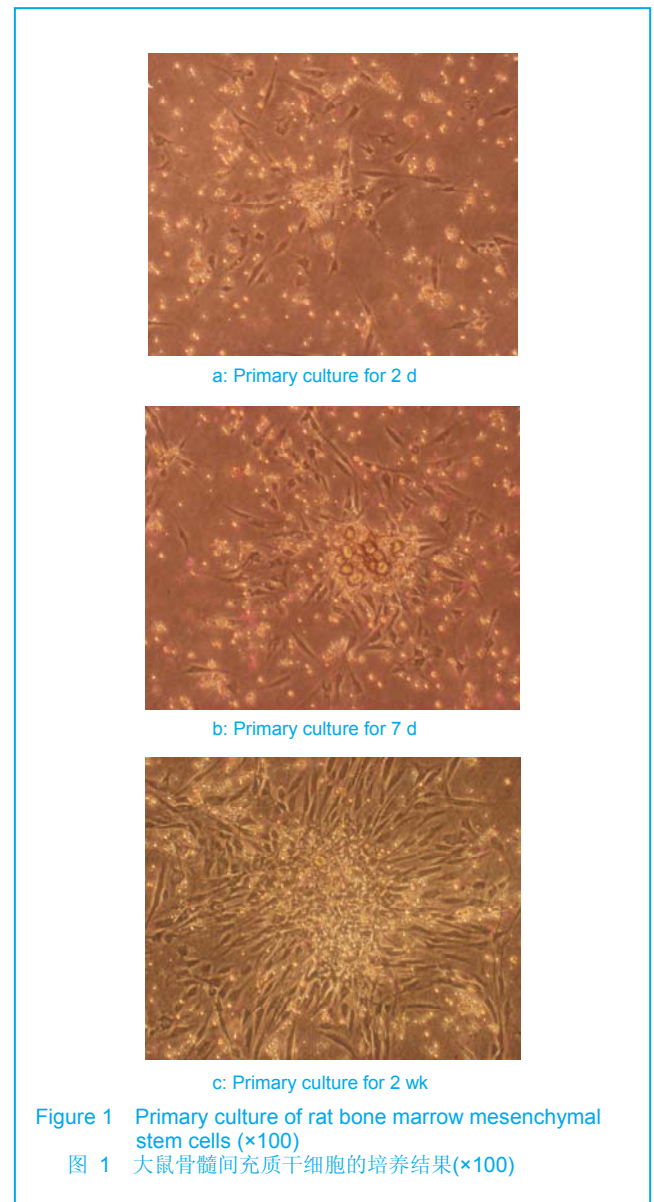
**局部全层皮肤缺损动物模型的制作及实验分组干预：**采用清洁级架式笼养SD大鼠，每笼1只，喂饲标准饲料，饮自来水，动物实验室温度18-24 °C，湿度控制于55%-85%范围内。

将所有SD大鼠戊巴比妥麻醉(30 mg/kg)后，背部去毛，在其背部切除直径为3 cm圆形全层皮肤，于创面内缘皮下埋入直径为3 cm钢丝圈固定皮缘以防止伤口回缩。造模后随机分成实验组、细胞组、对照组及空白组，每组6只。实验组将5-溴脱氧尿核苷标记的鼠骨髓间充质干细胞与丝素蛋白材料复合物植入对应创面上，细胞组通过尾静脉注射20 μL浓度为 $5 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 的骨髓间充质干细胞悬液，对照组植入丝素蛋白材料，空白组不做任何处理，外敷优妥敷料后打包加压包扎。术后4、8周各组随机处死3只动物，取材对创面愈合情况加以动态观测和分析，比较4组皮肤缺损修复情况。

**主要观察指标：**①大体观察：移植物的存活情况，创面部位炎性浸润情况。②病理学检查皮肤生成情况；术后4周取实验组、细胞组(对照组以及空白组均无修复功能，无法取材)皮肤标本行冰冻切片，切片厚度5 μm，抗5-溴脱氧尿核苷免疫荧光染色示踪骨髓间充质干细胞在体内的定位情况。

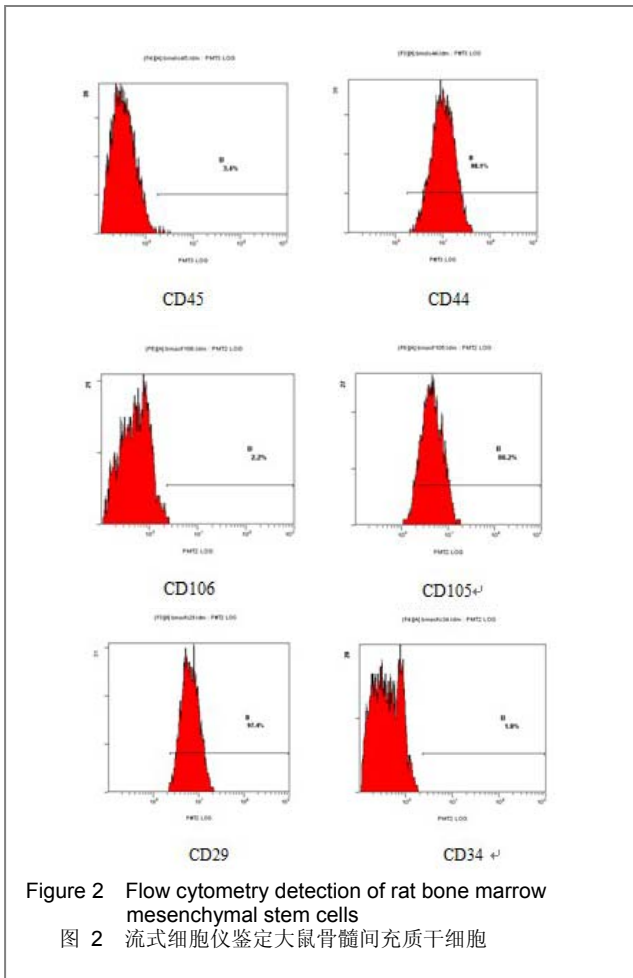
## 2 结果

**2.1 骨髓间充质干细胞的培养结果** 骨髓分离的细胞接种24 h后便有少量细胞贴壁，胞体透亮，折光性强，细胞核成卵圆形，与周围一些血细胞相互混杂；接种24 h后开始出现少部分细胞开始伸展开贴壁生长，贴壁细胞呈梭形、三角形和多角形，经1周后逐渐形成扁平单层细胞，呈漩涡状生长或成簇生长随着细胞密度的增加，胞体变得细长，形态类似成纤维细胞；2周时细胞生长可达90%融合，细胞为大梭形，排列紧密并有一定的方向性，呈成纤维细胞样分布，悬浮细胞在换液时被去除，见图1。

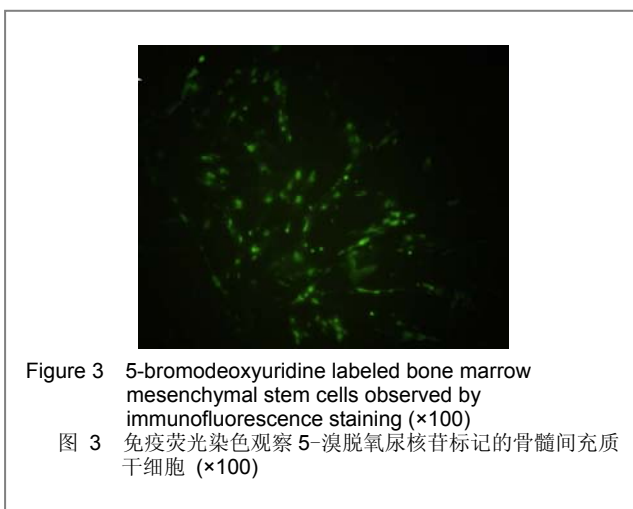


**2.2 骨髓间充质干细胞的表面抗原测定结果** 流式细胞仪检测显示，骨髓间充质干细胞表达CD 29、CD 44

和CD 105, 不表达CD 34、CD45和CD 106, 见图2。



2.3 5-溴脱氧尿核苷标记骨髓间充质干细胞的结果  
加入5-溴脱氧尿核苷后, 可见部分细胞漂浮死亡, 细胞生长速度变慢。免疫荧光染色结果显示大量阳性细胞, 提示标记的大部分细胞是存活的, 见图3。

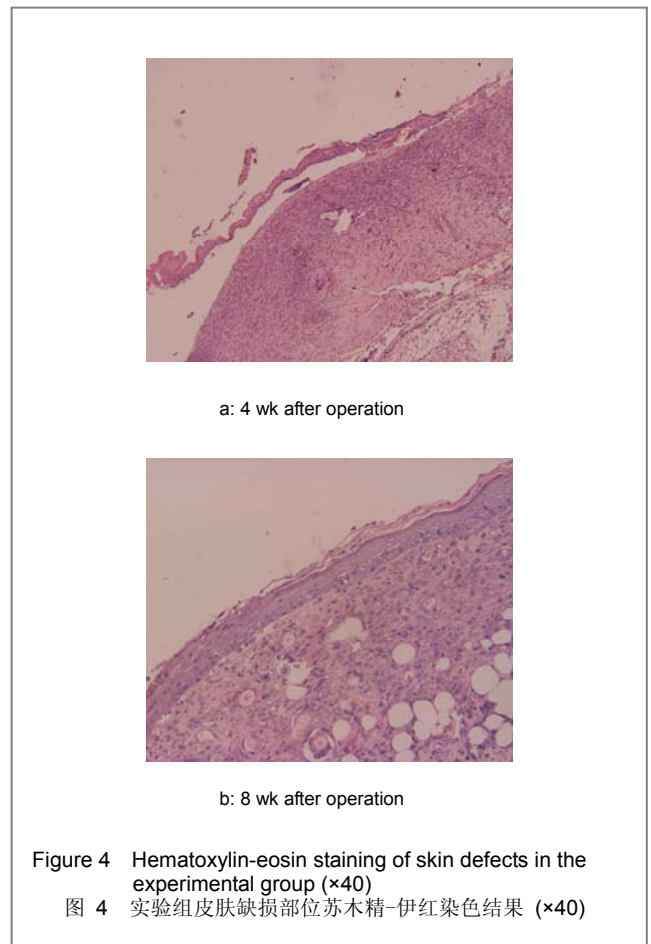


### 2.3 各组皮肤创面修复结果比较

大体观察: 动物均存活至实验完成。各组动物苏醒后

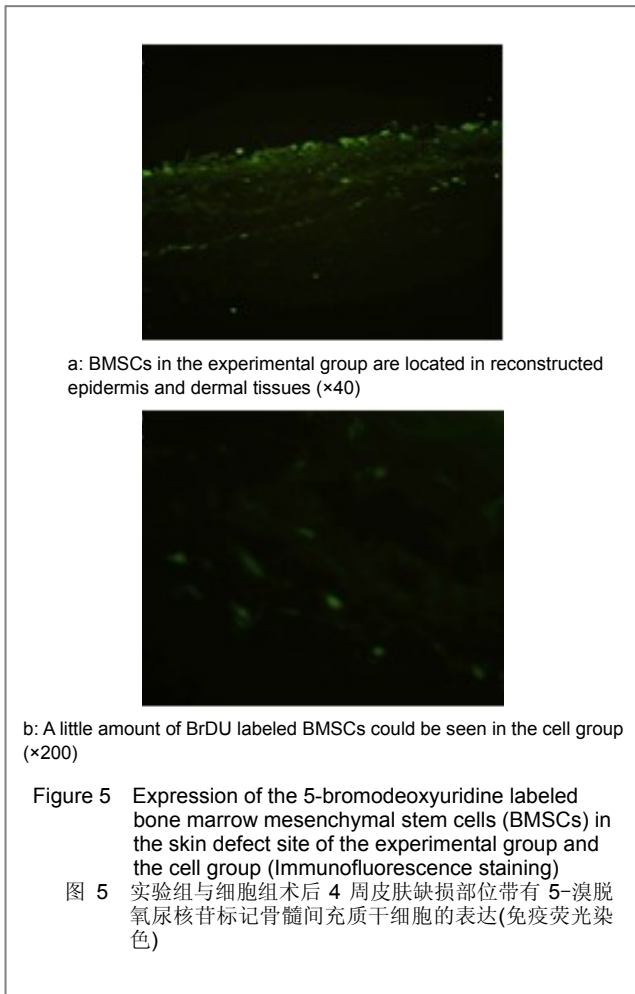
即可自由活动, 很快恢复正常饮食, 无寒战、发热等症状。实验组背部创面干燥, 无分泌物, 对照组创面少量分泌物。术后4周空白组创面约40%皮肤发黑、结痂、坏死; 8周仍可见坏死组织, 且瘢痕挛缩明显。细胞组创面愈合情况与空白组相似。术后8周对照组未愈合, 创面较平整, 有少量瘢痕形成, 与周围皮肤融为一体。实验组术后4周创面皮肤成活, 外观平整有弹性, 无明显瘢痕形成; 8周创面愈合良好。

组织学观察: 术后4周, 实验组苏木精-伊红染色可见表皮突明显, 真皮层可见较多成纤维细胞; 术后8周, 表皮层细胞增多, 角质层增厚, 真皮层成纤维细胞增多, 胶原纤维减少, 移植物与自体皮肤结合良好, 结构完整, 层次清晰, 基底细胞呈柱状, 单层排列, 结合紧密, 表皮钉突较少, 真皮层胶原纤维量多, 横向排列有序, 见图4。



术后4周, 实验组免疫荧光染色显示带有5-溴脱氧尿核苷标记的骨髓间充质干细胞定位在重建的表皮和真皮组织中, 表皮主要定位于其基底膜附近, 真皮层亦可见5-溴脱氧尿核苷标记的骨髓间充质干细胞, 见图5a。术后4周细胞组缺损部位免疫荧光染色显示少量带有5-溴脱氧尿核苷标记的骨髓间充质干细胞存在, 见图

5b。



### 3 讨论

传统上认为骨髓间充质干细胞的主要功能是参与构成造血干细胞生存和分化的微环境, 近年来研究表明, 骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 在体内外一定培养条件下可定向分化为多种不同类型细胞, 作为组织工程的种子细胞得到广泛的关注, 具有广阔的应用前景<sup>[5-6]</sup>。其经培养扩增后, 与不同的生物材料结合可形成组织工程化材料, 用来修复骨、软骨、肌腱等组织缺损<sup>[7]</sup>。由于骨髓间充质干细胞相对的取材来源容易和易培养扩增, 以及不存在免疫原性和其固有的对造血组织的支持作用, 可以克服胚胎干细胞的弊端, 又具有独特的优势, 成为胚胎干细胞以外的重要多能干细胞研究领域<sup>[8-13]</sup>。基因表达系列分析(MicroSAGE)显示骨髓间充质干细胞的单细胞克隆表达多重的细胞谱系, 包括特征性的上皮与内皮如Epican、Keratins8 和Keratins10<sup>[14]</sup>, 这些数据表明骨髓间充质干细胞在体外的分化潜能不再

限定于中胚层而是可以转化为其他胚层的细胞, 为骨髓间充质干细胞的多向分化潜能奠定了理论基础。多数学者也一致认为, 骨髓间充质干细胞分化为何种细胞也与其所处的微环境密切相关, 这是骨髓间充质干细胞向其他组织细胞分化的主要原因之一。因此, 处于受损皮肤的微环境下, 骨髓间充质干细胞可能具有向皮肤组织细胞转化的潜能。

严重创伤、大面积烧伤、整形术后的创面覆盖是一个十分重要的问题, 除利用患者自身皮肤组织外, 人们已采用过同种皮、异种皮、人造皮、以及其他生物膜等材料来覆盖创面, 但由于这些材料的排异性使其应用受到一定限制<sup>[15]</sup>。近些年研究表明, 骨髓间充质干细胞在皮肤微环境下可分化表皮细胞、真皮细胞、血管内皮细胞、及皮肤附属器细胞等, 为组织工程化皮肤提供了新的种子细胞来源<sup>[16-17]</sup>。部分组织工程皮肤产品已取得美国食品与药物管理局的许可而应用于临床, 尽管取得了一定疗效, 但距离具有与正常皮肤类似的结构及屏障功能的组织工程皮肤尚有不少差距<sup>[18]</sup>。大量研究发现, 骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 在体内可以分化为表皮细胞和血管内皮细胞, 并且迁徙到皮肤损伤处加速创面愈合, 其促进创伤愈合的过程同时体现了自身的细胞分化过程<sup>[19]</sup>。在不同创伤组织中, 外源输注或内源性的骨髓间充质干细胞的生物学特性和分子生物学特性不断发生改变, 最终形成具有组织特异的细胞表型<sup>[20]</sup>。丝素蛋白, 是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白, 含量占蚕丝的70%-80%, 含有18种氨基酸, 其中甘氨酸(gly)、丙氨酸(ala)和丝氨酸(ser), 约占总组成的80%以上。丝素本身具有良好的机械性能和理化性质, 如良好的柔韧性和抗拉伸强度、透气透湿性、缓释性等, 而且经过不同处理可以得到不同的形态, 如纤维、溶液、粉、膜以及凝胶等。苗宗宁等<sup>[3]</sup>探讨了丝素蛋白材料与胎盘间充质干细胞的生物相容性。实验运用丝素蛋白溶液包被的培养瓶培养胎盘间充质干细胞, 流式细胞术分析其表型并对其定向分化潜能进行探讨; 胎盘间充质干细胞置于丝素蛋白膜材料培养后通过扫描电镜观察细胞形态变化。结果显示, 用丝素蛋白溶液包被的培养瓶培养的胎盘间充质干细胞, 其生长特性、表面标志、多向分化潜能无明显变化; 胎盘间充质干细胞在丝素蛋白膜材料上生长良好, 培养8 d时材料上细胞伸展增殖, 分泌大量颗粒状、网状基质物质, 材料间隙被基质填满。结果表明丝素蛋白材料不影响胎盘间充质干细胞的生长特性、表面标志和多向分化潜能, 具有良好的生物相容性。有研究为深入研究丝素蛋白在修复大鼠皮肤缺损过

程中的作用机制,用免疫组织化学方法分别检测CD90、转化生长因子 $\beta 1$ 、 $\alpha$ -SMA、I、III型胶原在天蚕丝素材料、家蚕丝素材料和海绵材料修复大鼠皮肤缺损过程中的表达水平,探讨材料对主要修复细胞的影响,分析成纤维细胞CD90表达及其增殖、合成、收缩等功能的相关性。得出实验结论:天蚕丝素和家蚕丝素作为真皮支架材料没有明显差别,移植后局部炎症反应均较轻,具有良好的组织相容性,都可用作真皮缺损的修复材料;组织芯片具有效率高、质控好的优点,适合多因素比较研究,可用于修复大鼠真皮缺损的相关实验研究;丝素蛋白支架材料作为真皮模板早期能诱导创面周围和基底的成纤维细胞长入,后期可使CD90阳性成纤维细胞降低,可能减少成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,减轻瘢痕挛缩;实验结果提示在丝素蛋白支架材料修复大鼠真皮缺损中成纤维细胞CD90表达和转化生长因子 $\beta 1$ 、 $\alpha$ -SMA表达具有相关性,三者之间可能存在一定的协同关系。另有研究探讨了人脐带间充质干细胞的体外分离、纯化及培养条件,并对其生物学特性进行研究;观察了人脐带间充质干细胞冻存复苏后向脂肪细胞定向分化的能力;观察了蚕丝素多孔支架对人脐带间充质干细胞吸附作用及支架对人脐带间充质干细胞形态、功能及活性的影响,探讨蚕丝素多孔支架与人脐带间充质干细胞构建组织工程脂肪的可行性。得出实验结论:人脐带间充质干细胞能在体外培养、扩增,并且具有和骨髓间充质干细胞相似的生物学特性;将人脐带间充质干细胞冻存复苏后培养至第12代,仍具有向脂肪细胞分化的潜能,可作为脂肪组织工程的种子细胞来源;蚕丝素多孔支架对人脐带间充质干细胞具有良好的吸附作用,并能维持其正常形态、功能及活性,蚕丝素多孔支架是人脐带间充质干细胞三维立体培养时良好的天然支架,该支架是一种理想的生物可降解支架,人脐带间充质干细胞接种于蚕丝素多孔支架可构建出组织工程脂肪。谢建军等<sup>[21]</sup>探讨了不同结构丝素蛋白支架材料对小鼠胚胎成纤维细胞NIH-3T3生长繁殖性能的影响。实验将NIH-3T3接种在丝素蛋白纳米纤维膜和浇铸膜上进行体外培养,并设空白对照组。通过MTT法、苏木精-伊红染色、扫描电镜来分析不同结构丝素蛋白膜的生物相容性。结果显示,增殖培养4 d时实验组细胞A值与对照组相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ );增殖培养7 d时实验组细胞A值相比与空白组差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。而对照组细胞A值与空白组相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。苏木精-伊红染色、扫描电镜显示NIH-3T3细胞在纳米纤维膜上比在浇铸膜上有更好的生长和连

接状态。表明与丝素蛋白浇铸膜相比,NIH-3T3细胞在纳米纤维膜上表现出更好的增殖能力,无明显细胞毒性表现;丝素蛋白纳米纤维膜具有良好的生物相容性,是皮肤组织工程的良好载体。

作为组织工程支架材料,丝素蛋白还必须具有良好的生物相容性。陆艳等<sup>[22]</sup>初步观察了多孔丝素材料的体内组织相容性。实验将多孔丝素支架埋藏于SD大鼠背部皮下,术后2, 4, 6, 8周分别取材,对伤口局部及材料情况大体观察,然后材料切片苏木精-伊红染色行组织学观察。结果显示,动物伤口愈合良好,多孔丝素表面形成极薄的纤维包裹,周围组织反应轻微;组织切片观察见炎细胞浸润,以巨噬细胞为主,支架材料边缘孔隙内有成纤维细胞和毛细血管长入;术后8周时材料边缘部分可见支架结构崩解现象,而材料内部变化不大。结果表明组织细胞可以沿多孔丝素支架表面贴附生长,提示支架材料具有较好的组织相容性。马亮等<sup>[23]</sup>应用天然高分子材料丝纤维制备三维丝素蛋白支架材料,并探索其方法的可行性。实验方法:①用全物理相过程制备三维疏松多孔的丝素蛋白支架材料,将鼠骨髓间充质干细胞与上述载体材料体外复合培养。②观察指标:应用倒置显微镜、扫描电镜观察细胞与材料复合生长情况;复合培养1周后流式细胞仪检测细胞周期了解材料有无致畸性;在培养第2, 4, 6, 8天用MTT法测定细胞增殖情况;诱导培养条件下在第2, 4, 6, 8天测定碱性磷酸酶活性,了解材料对骨髓间充质干细胞分化的影响。结果显示:①倒置相差显微镜和扫描电镜观察显示材料为疏松多孔结构,孔隙大小较均一,骨髓间充质干细胞能在材料上良好地黏附、增殖和生长。②复合培养条件后流式细胞仪检测显示细胞周期未受材料的影响,未检测到有异倍体细胞。③MTT法检测显示细胞增殖未受材料的影响,诱导培养条件下检测碱性磷酸酶活性显示其未受到材料的影响。结果表明用全物理相过程可初步制备具有良好的生物相容性和较好孔隙率的三维疏松多孔天然支架材料,其有望作为组织工程理想支架材料。赵广建等<sup>[24]</sup>文章综述了丝素蛋白的生物相容性及应用的研究进展,寻找最佳人工皮肤以应用临床。文章应用计算机检索CNKI和PubMed数据库中1992年2月至2011年3月关于丝素蛋白生物相容性,在组织工程皮肤、生物材料领域应用的文章,在标题和摘要中以“丝素蛋白;生物相容性;组织工程;生物材料;应用”或“Silk fibroin; Biocompatibility; Tissue Engineering; Biological materials; Application”为检索词进行检索,选择文章内容与丝素蛋白的生物相容性及应用相关,同一领域文

献则选择近期发表或发表在权威杂志文章。初检得到215篇文献, 根据纳入标准选择22篇文章进行综述。结果显示, 对丝素蛋白特性及研究应用的了解, 有利于皮肤损伤后的修复和重建, 以皮肤细胞本身作为皮肤替代物修复缺损, 以达到恢复组织器官的形态和功能, 有良好的机械性能和理化性质及有良好的生物相容性, 对表皮细胞生长具有一定的促进作用, 但将其应用于临床治疗方面仍需要很长的时间, 尚有一些问题需要进一步研究、解决。宁丽等<sup>[25]</sup>对医用丝素蛋白皮肤再生膜进行一系列生物学试验和生物相容性研究, 实验将医用丝素蛋白皮肤再生膜材料按国际标准化组织标准要求制备浸提液, 进行急性全身毒性试验、皮肤原发刺激试验、细胞毒性试验, 以及I型胶原、纤维连接蛋白mRNA基因表达等试验, 综合分析评价其生物相容性。结果显示, 医用丝素蛋白皮肤再生膜的急性全身毒性试验、皮肤原发刺激试验、细胞毒性试验, 以及I型胶原、纤维连接蛋白mRNA基因表达等试验都显示阴性结果, 结果表明从整体、细胞和分子生物学水平研究提示医用丝素蛋白皮肤再生膜具有良好的生物相容性。

本实验结果表明, 实验组创面愈合速度和效果均优于细胞组、对照组和空白组, 术后4周皮肤即已成活, 创面平整, 无明显瘢痕形成; 组织学观察可见形成了具有表皮和真皮的皮肤样结构, 基底膜完整, 同时可见大量移植的细胞存活。术后8周, 组织工程皮肤创面愈合明显, 皮肤平整光滑, 重建的皮肤组织中表皮层细胞增多, 一方面是由于创面边缘的表皮细胞具有高度迁移性, 具有在最短时间内修复表皮创面的作用; 另一方面骨髓间充质干细胞在创面微环境作用下, 具有向病变部位迁移并分化成机体所需相应细胞的能力。理论上通过鼠尾静脉注射骨髓间充质干细胞悬液应该达到同样的愈合效果, 但由于细胞在体内循环后到达缺损部位的只有少量细胞, 所以愈合效果几乎和空白组一样, 这与国外学者的研究结果一致<sup>[4]</sup>。而直接在创面注射细胞, 由于缺乏营养供应, 细胞存活较少, 效果差<sup>[20]</sup>。对照组由于未复合细胞, 只是起到覆盖作用, 所有创面愈合情况不是很好。综上所述, 利用异体骨髓间充质干细胞与丝素蛋白膜材料复合后进行体表移植, 可以形成具有表皮和真皮样结构的皮肤替代物进行创面缺损修复。丝素蛋白可以作为组织工程皮肤研究中新型且更具实用价值的支架材料, 同时也为异体骨髓间充质干细胞作为种子细胞进行组织工程全层皮肤构建的临床前应用研究提供相关实验依据。

#### 4 参考文献

- [1] Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*. 2010; 7(43):229-258.
- [2] Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci*. 2009; 10(4):1514-1524.
- [3] Miao ZN, Li F, Lü GZ, et al. *Guoji Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi*. 2010; 33(4):220-223.  
苗宗宁, 李芳, 吕国忠, 等. 丝素蛋白与胎盘间充质干细胞生物相容性的实验研究[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2010, 33(4):220-223.
- [4] Spagnoli A, Longobardi L, O'Rear L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. *Endocr Dev*. 2005; 9:17-30.
- [5] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005; 111(2):150-156.
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-317.
- [7] Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 25(10):2648-59.
- [8] Li C, Zhang W, Jiang X, et al. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. *Cell Tissue Res*. 2007; 330(3):437-446.
- [9] Aldinucci A, Rizzetto L, Pieri L, et al. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J Immunol*. 2010; 185(9):5102-5110.
- [10] Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009; 27(8):1954-1962.
- [11] Kasper G, Mao L, Geissler S, et al. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells*. 2009; 27(6):1288-1297.
- [12] Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008; 26(1):212-222.
- [13] Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, et al. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*. 2008; 26(1):99-107.
- [14] Tremain N, Korkko J, Ibberson D, et al. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*. 2001; 19:408-418.
- [15] Zou ZM, Cheng TM, Li YP, et al. *Zhonghua Yixue Zazhi*. 2007; 87(18):1227-1229.  
邹仲敏, 程天民, 粟永萍, 等. 成体干细胞参与创伤修复基本模式的思考[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(18):1227-1229.

- [16] Li Y, Lu W, Ji K, et al. *Disi Junyi Daxue Xuebao*. 2009; 30(24): 2921-2924.  
李媛, 陆伟, 冀堃, 等. 组织工程皮肤与正常皮肤组织学差异的实验研究[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(24): 2921-2924.
- [17] Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008; 180(4): 2581-2587.
- [18] Wang XY, Zheng Y, Meng BX, et al. *Zhonghua Yixue Meixue Meirong Zazhi*. 2011; 17(4): 298-300.  
王晓燕, 郑岩, 孟宝玺, 等. 异体骨髓间充质干细胞移植提高皮肤扩张效率[J]. *中华医学美容杂志*, 2011, 17(4): 298-300.
- [19] Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010; 28(3): 585-596.
- [20] Altman AM, Yan Y, Matthias N, et al. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells*. 2009; 27(1): 250-258.
- [21] Xie JJ, Xiong J, Liu XL, et al. *Jiankang Yanjiu*. 2011; 31(3): 169-171, 174.  
谢军军, 熊杰, 刘小玲, 等. 丝素蛋白膜与小鼠胚胎成纤维细胞的体外生物相容性研究[J]. *健康研究*, 2011, 31(3): 169-171, 174.
- [22] Lu Y, Zhao X, Shao ZZ, et al. *Zhongguo Zuhzi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011; 15(34): 6364-6367.  
陆艳, 赵霞, 邵正中, 等. 多孔丝素材料组织相容性的初步研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(34): 6364-6367.
- [23] Ma L, Wang H, Li YJ. *Zhongguo Zuhzi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007; 11(40): 8021-8024.  
马亮, 王洪, 李艳军. 三维丝素支架材料制备及其与骨髓间充质干细胞的生物相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(40): 8021-8024.
- [24] Zhao GJ, Zhao Y. *Zhongguo Zuhzi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011; 15(51): 9648-9650.  
赵广建, 赵耀. 丝素蛋白的生物相容性及临床应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(51): 9648-9650.
- [25] Ning L, Xue M, Huang HN. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi*. 2000; 14(1): 44-48.  
宁丽, 薛淼, 黄海宁. 皮肤再生膜的生物相容性系列研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2000, 14(1): 44-48.

## 来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 苗宗宁、吕国忠进行实验设计, 实验实施为苗宗宁、李芳, 实验评估为张学光, 资料收集为李芳, 苗宗宁、李芳成文, 吕国忠、张学光审校, 苗宗宁、吕国忠对文章负责。

**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。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**文章概要:**

**文章要点:** 观察丝素蛋白材料复合骨髓间充质干细胞修复大鼠全层皮肤缺损的可行性。

**关键信息:** 丝素蛋白材料可以应用于组织工程皮肤研究。

**研究的创新之处与不足:** 创新: 丝素蛋白材料与骨髓间充质干细胞复合修复创面, 不足: 无法构建全层组织工程化皮肤。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。