

PRP 结合组织工程皮肤修复裸鼠巨大创面的实验研究

张莉¹ 郁淼¹ 王浩² 严钰锋² 姚莉韵³

(上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院检验科; 2 上海复旦大学上海医学院基础实验中心;

3 上海交通大学医学院化学教研室 上海 202150)

摘要 目的 探讨富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)结合组织工程皮肤对裸鼠巨大创面修复的影响。方法 首先,利用密度梯度离心法制备富含生长因子的浓缩血小板的血浆,并测其所含生长因子的量;其次,在裸鼠的背侧部分构建大面积皮肤创面,分别用人工真皮、组织工程皮肤、碱性成纤维细胞生长因子组织工程皮肤、表皮生长因子组织工程皮肤和 PRP 结合组织工程皮肤修复裸鼠巨大创面,最后,手术后不同时间间隔收集组织标本,采用 HE 染色、PAS 染色和免疫组化等方法评估创面愈合情况。结果: PRP 结合组织工程皮肤组创面修复愈合情况最好。

关键词 富血小板血浆; 生长因子; 皮肤创伤

中图分类号 :Q95-3 R318.08 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)06-1065-10

Combining Platelet-Rich Plasma and Tissue Engineer Skin in the Treatment of Large Skin Wound on Nude Mice

ZHANG Li¹, YU Miao¹, WANG Hao², YAN Yu-feng², YAO Li-yun³

(1 Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Chongming Branch Laboratory;

2 The Experimental Center of Basic Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University;

3 Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Department of Chemistry Shanghai 202150, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of tissue engineered skin in combination with PRP and other preparations on the repair of large skin wound on nude mice. **Methods:** Platelet-rich plasma (PRP) from venous blood was prepared by density gradient centrifugation. Large skin wounds were created surgically on the dorsal part of nude mice. The wounds were then treated with either artificial skin, tissue engineered skin, tissue engineered skin combined with basic fibroblast growth factor, and tissue engineered skin combined with epidermal growth factor or tissue engineered skin combined with PRP. Tissue specimens were collected at different time intervals post surgery. HE, PAS stains and immunohistochemistry were performed to assess rate of wound healing. **Results:** Macroscopic observations, HE/PAS staining and immunohistochemistry revealed that the tissue engineering skin in combination with the PRP group showed the most satisfactory wound recovery out of the five groups.

Key words: Platelet-rich plasma (PRP); Growth factor; Skin wound

Chinese Library Classification: Q95-3 R318.08 **Document code:** A

Article ID :1673-6273(2012)06-1065-10

前言

皮肤是人体最大的器官,总重量约占体重的 5%~15%,总面积为 1.5~2 平方米。皮肤覆盖全身,它保护体内各种组织和器官免受物理性、机械性、化学性和病原微生物性的侵袭,同时防止体内水分、电解质和其他物质的丢失,保持着人体内环境的稳定上,在生理上起着重要的保护功能,同时皮肤也参与人体的代谢过程^[1]。由于烧伤、大面积溃疡、恶性肿瘤等原因,常导致大面积的皮肤缺损,创面难以自行愈合,如直接暴露在外,会发生感染、水电解质流失,甚至危及生命。因此常需要进行皮肤移植,以覆盖创面,保护内环境稳定,促进再生修复。而皮肤移植所需的材料,也由自体皮、异体皮甚至异种皮,逐渐发展到了利用组织工程方法制成的人工合成皮肤替代物,即组织

工程皮肤。

单纯以表皮替代物覆盖创面无法克服由于缺乏真皮层的支持,愈合后的上皮组织弹性差、耐磨性差、易破溃和收缩等缺点,自 20 世纪 80 年代开始兴起对真皮替代物的研究。对真皮替代物的要求是具有良好的生物相容性,能很好地粘附创面,具有合适的被吸收速率,同时内部具有孔径供成纤维细胞及毛细血管长入^[2]。好的真皮替代物结合表皮替代物可使修复后的上皮组织具有更好的弹性,更耐磨,并减少瘢痕的产生,使用生物合成材料避免了传播疾病的风险,同时取材也更加容易,本实验采用的人工真皮垫主要成分来源于牛腱的无末端胶原蛋白(ATelocollagen)海绵体的长方体,具有与正常真皮支架相似的三维结构,成纤维细胞和毛细血管可顺利长入,于植入后 2-3 周可被肉芽样组织取代。Lin 等采用鼠胚胎干细胞在体外分化成表皮干细胞,接种于成纤维细胞-胶原-明胶海绵体复合物中,并注射到小鼠皮下。3 周后,表皮干细胞仍然存活,并分化成毛囊样结构和腺体结构,10 周内未发现明显的排异反应^[3]。

生长因子能促进皮肤创面的修复。PRP 是利用密度梯度离

作者简介 张莉(1965-),女,大学本科,主任技师,研究方向:主要从事临床免疫学研究,电话:18917892609,
E-mail: z1535535@tom.com

(收稿日期:2011-06-02 接受日期:2011-06-28)

心法所制备的浓缩血小板的血浆,其所含的血小板浓度至少为全血的4倍以上^[4]。当PRP中血小板被激活时,可以产生如血小板衍生生长因子AB (platelet-derived growth factor, PDGF-AB)、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、类胰岛素生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种生长因子^[5,6],这些生长因子已经学者实验证实具有促进组织再生的生物学效应,临床上已用于治疗慢性愈合创面、软组织缺损、骨缺损、面部除皱、急性创伤等^[7],能有效的加速修复创面,增加临床治疗的成功率,降低患者住院天数及换药的痛苦与经济负担,还可降低骨髓炎的发生率、再次行2次修复手术机率,因此在整形修复外科及骨科具有良好的发展前景。

PRP中的生长因子浓度与PRP中的血小板浓度成正比相关,血小板自身表面可作为生物支架,为生长因子及趋化细胞的聚集提供场所^[8,9]。这些生长因子共同参与及促进创面修复。PDGF可刺激内皮细胞生长,增加创面中成纤维细胞及趋化中性粒细胞和单核细胞,促进毛细血管生成、胶原合成增加、及肉芽生长。TGF在皮肤重建中起重要的作用,TGF- α 通过刺激上皮细胞进而增加皮肤角化细胞的迁移和增殖,TGF- β 在创面愈合过程中可促进胶原合成增加,并参与多种炎症反应和刺激细胞外基质的合成,与PDGF一起作用加强伤口愈合^[10]。EGF对表皮细胞、成纤维细胞等有趋化性和促分裂增殖的作用,透过成纤维细胞的增殖,增加胶原的合成。VEGF具有促进内皮细胞增殖,诱导新生血管形成,增加微小血管的通透性,为细胞生长和新生毛细血管网的建立提供营养。IGF包括IGF-I跟IGF-II,IGF-I是血管内皮细胞的趋向剂,可刺激血管内皮细胞像创伤部位迁移,促进新生血管形成,并可与PDGF协同作用增加表皮及内皮的再生^[11]。

Carter用PRP修复马小腿伤口的实验中,发现PRP治疗组伤口修复明显优于对照组,并发现由于PRP中含大量白细胞及单核细胞,抑制伤口炎症反应,导致伤口疤痕减少^[9]。Croveti使用PRP治疗皮肤溃疡发现,伤口肉芽组织生长较好,上皮组织再生加快^[12]。相关研究结果表明,PRP含有多种高浓度的生长因子,在促进创面愈合中,不但有单因子的生物学效应,还有各种生长因子间的协同作用,于创面早期起覆盖黏附创面并避免生长因子的流失,从而为创面愈合提供有利条件,加速了愈合的时间。Mars应用PRP修复全层皮肤缺损结果显示,术后20天的创面上皮形成率为100%。

因此,我们在本实验首先置备PRP,并测其所含生长因子的量,探索构建裸鼠巨大创面,PRP结合组织工程膜片修复创面的可行性。

1 材料与方法

1.1 富血小板血浆的制备与检测

1.1.1 标本采集 取24位志愿者(男女各12位,年龄11-78岁)无传染性、肿瘤性、血液系统疾病病史,并半年内未服用阿司匹林等影响血小板功能的药物,先用含ACD-A抗凝剂负压采血管采静脉血20ml,再用含EDTA抗凝剂负压采血管采静脉血10ml。

1.1.2 制备方法 用含ACD-A抗凝剂负压采血管采静脉血20ml,经第一次2400 rpm 10 min离心后,全血分为3层,上层为血浆,中间为白色薄膜样沉积层,此为血小板沉积层,下层为红细胞层。在超净台上用无菌吸管,移液器吸取上层血浆至交界面下2 mm到另一离心管,摇匀,再以3500 rpm 15 min行第二次离心后,分为2层,上层为贫血小板血浆层,下层为富血小板血浆层,弃去上清液的3/4,其余摇匀后即即为富血小板血浆(Platelet rich plasma, PRP)。

1.1.3 血小板计数检测 PRP制备完成后,取0.5ml于30分钟内同0.5 ml全血静脉血,用全自动血细胞分析仪检测全血细胞计数。PRP中血小板计数需大于全血血小板计数的4倍以上。

1.1.4 生长因子浓度的检测 2000IU凝血酶+5%氯化钙2 ml混合制成激活剂。PRP及全血与激活剂以10:1混匀后,形成凝胶状,静置1小时,以3000 rpm 20 min离心后,上清即为富生长因子血浆,吸取上清入EP管,-80℃储存。ELISA检测PRP及全血中的血小板衍生生长因子-AB (platelet derived growth factor, PDGF-AB)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的浓度。

1.2 组织工程皮肤修复裸鼠创面

1.2.1 实验动物 5周龄雌性裸鼠,体重(15 $\pm$ 2)g,购自中国科学院上海实验动物中心(合格证书:医动字-1996-02-22-6号),饲养于中科院上海生化所实验动物中心。动物自由进食进水。动物房7:00-19:00光暗交替,55%相对湿度,温度22℃。动物适应环境1周后开始实验。

1.2.2 创面收缩限制模型制作 裸鼠称重后以氯胺酮120mg/kg腹腔注射,麻醉满意后,消毒,于裸鼠背部制作约1.5 cm $\times$ 1.5 cm全层皮肤创面,并于创缘缝合固定特制限制皮肤收缩装置。

1.2.3 复合细胞悬液的制备 整形外科手术切除的成人头皮,头皮以0.01%新洁尔灭溶液及PBS交替冲洗3次,每次5 min。保护毛囊并去除皮下部分脂肪组织。使用眼科剪将头皮组织剪至糊状,加入30倍体积复合酶溶液,置于磁力水浴搅拌器中,37℃水浴,磁力转子40 rpm搅拌。每30 min过滤收集细胞,将剩余未消化头皮组织再次剪碎,继续搅拌消化,直至所得细胞数 $<5 \times 10^4$ 个/ml,停止消化。经台盼蓝染液染色检测细胞存活率。用消化液分散单层培养细胞,制成单个细胞悬液。要求细胞密度不低于 10^4 细胞/ml,制备复合细胞悬液 1×10^6 - 1×10^7 /ml,其中含表皮细胞:成纤维细胞为6:1。

1.2.4 组织工程皮肤制备 取已灭菌1 cm $\times$ 1 cm人工真皮,PBS冲洗3次,K-SFM培养液浸泡24h,平铺于培养皿内的气-液界面培养支架上。将原代复合细胞悬液以1500 rpm离心5 min,PBS洗涤1次,再次以1500 rpm离心5 min,以 1×10^5 /cm 2 的密度接种于人工真皮,置于37℃恒温培养箱中培养9天。每隔3天,换液一次。

1.2.5 创面修复 实验动物分成5组:人工真皮组(A组) 1 cm $\times$ 1 cm人工真皮充分浸泡生理盐水10分钟,四角缝合于裸鼠背部限制收缩创面内,油纱覆盖,40万单位青霉素盐水湿纱布打包包扎,透明薄膜完整贴覆限制收缩创面装置,自粘绷带缠绕固定;组织工程皮肤组(B组):取复合细胞接种的人工真皮培养7天,组织工程皮肤种植细胞面向上,四角缝合于裸鼠背

部限制收缩创面内,包扎固定,碱性成纤维细胞生长因子组织工程皮肤组(C组):取复合细胞接种的人工真皮培养7天,组织工程皮肤种植细胞面向上,四角缝合于裸鼠背部限制收缩创面内,贝复剂1喷(约420IU,0.1ml)于创面约238 IU/cm²,静置5分钟后,包扎固定,表皮生长因子组织工程皮肤组(D组):取复合细胞接种的人工真皮培养7天,组织工程皮肤种植细胞面向上,四角缝合于裸鼠背部限制收缩创面内,金因肽1喷(约200IU,0.1ml)于创面约113 IU/cm²,静置5分钟后,包扎固定;富生长因子组织工程皮肤组(E组):取复合细胞接种的人工真皮培养7天,组织工程皮肤种植细胞面向上,四角缝合于裸鼠背部限制收缩创面内,于创面加入术前当天制备的富血小板血浆0.3ml及激活剂(2000 IU 凝血酶+5%氯化钙2ml)0.03ml,静置5分钟使其形成富血小板凝胶后,包扎固定。所有小鼠单笼饲养,自由进食。

1.2.6 标本采集 取术后第3d、7d、14d、21d标本,常规4%多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋后,待进行HE染色、PAS染色和pan-ck、vimentin、CK15、CD29等免疫组化检测。

1.2.7 HE、PAS染色和免疫组化检测 取材组织块,脱水,常规石蜡包埋,4μm连续切片,经脱蜡,水化后,进行苏木素-伊红染色(HE)、PAS染色。将选取的切片置入Leica Boud-Max系统(二抗+显色系统 Leica Boud Polymer Refine Detection),一抗工作浓度:CK15(1:100,anta Cruz, USA),pan-ck(1:100, Dako, Denmark),vimentin(1:100, Dako, Denmark),and CD29(1:100, Santa Cruz, USA),同时每组设置阴性对照(PBS代替一抗),选用IHC-P程序自动控制进行免疫组化实验,全程3.5小时。

2 结果

2.1 血小板计数检测

24组标本,全部行全自动血细胞分析仪检测全血细胞计数,PRP血小板计数为375-1414×10⁹/L,平均数为931±276.40×10⁹/L,是静脉血血小板计数206.79±50.83×10⁹/L的4.5倍,两者有统计学差异。PRP中血小板计数需大于全血血小板计数的4倍以上(图1)。

2.2 生长因子浓度的检测

PRP中生长因子浓度分别为PDGF-AB 161.68±67.05

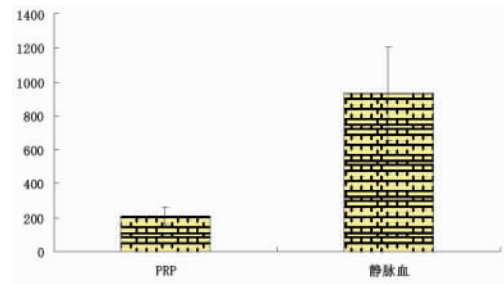


图1 全血与PRP血小板计数(单位:10⁹/L)

Fig. 1 The average amount of platelet counts in PRP was 4.5 times more than the platelet counts of in venous blood

pg/ml、TGF-β1 136.83±49.89 pg/ml、EGF 368.98±87.74 pg/ml;全血中生长因子的浓度分别为PDGF-AB 52.60±10.79 pg/ml、TGF-β1 127.88±20.62 pg/ml、EGF 214.90±56.70 pg/ml(表1)。PRP中的生长因子浓度皆大于全血中的生长因子浓度。全血及PRP的PDGF-AB和EGF浓度的P值皆小于0.05,两组间有统计学差异。全血及PRP的TGF-β1浓度的P值大于0.05,两组间无统计学差异。考虑是由于不同的标本TGF-β1的水平可能有较大差异,稀释度未能良好掌握所致。

表1 全血及PRP的PDGF-AB、TGF-β1和EGF浓度
(X±S, n=24, pg/ml)

Table 1 The concentration of PDGF-AB、TGF-β1 and EGF in Whole blood and PRP

生长因子 (Growth factor)	全血 (Whole blood)	血小板富集血浆 (PRP)
PDGF-AB	52.60± 10.79	161.68± 67.05
TGF-β1	127.88± 20.62	136.83± 49.89
EGF	214.90± 56.70	368.98± 87.74

2.3 创面大体观察

术后7d常规打开加压包扎的自粘绷带及揭除透明薄膜,观察打包纱布仍保持潮湿者创面愈合情况较干燥者良好,创面干燥者真皮干燥、脱落;术后14d限制收缩创面装置逐渐脱落,术后21d限制收缩创面装置皆已脱落,除创面中间局部尚未完全愈合,周围愈合可(表2)。

表2 术后14天和21天各组创面尺寸与愈合率

Table 2 Sizes of wounds in the five groups measured at 14 and 21 days post surgery

	术后14d 14days post surgery	术后21d创面大小 21 days post surgery	愈合率 Healing rate
A组	1.77cm ²	1.2cm ²	32.20%
B组	1.77cm ²	完全愈合	100%
C组	1.77cm ²	0.35cm ²	80.26%
D组	1.77cm ²	0.12cm ²	93.22%
E组	1.77cm ²	完全愈合	100%

2.3.1 人工真皮组(A组) 术后3d人工真皮未能与创面稳定贴附,真皮上未见细胞生长(图2A)。术后7d人工真皮与创面贴附较稳定,真皮上仍未见细胞生长(图2B)。术后14d限制收

缩创面装置逐渐开始脱落,创面渗出较多、感染率较高(图2C)。术后21d创面愈合情况较差,愈合处新生表皮较薄(图2D)。

2.3.2 组织工程皮肤组 (B 组) 术后 3d 真皮上可见细胞生长, 组织工程皮肤与创面贴附较 A 组紧密(图 3A)。术后 7d 组织工程皮肤细胞生长情况不如 C 组、D 组(图 3B)。术后 21d 创面愈合可, 新生表皮较 C 组、D 组及 E 组薄(图 3D)。

2.3.3 碱性成纤维细胞生长因子组织工程皮肤组 (C 组) 术后 3d 组织工程皮肤上可见细胞生长, 较 D 组差, 组织工程皮肤与创面基本贴附(图 4A)。术后 7d 组织工程皮肤上可见细胞生长, 仅次于 D 组, 并与创面稳定贴附(图 4B)。术后 14d 观察创面渗出较多, 一例创面形成巨大肉芽肿(图 4C), 术后 21d 除创面中间局部尚未完全愈合, 周围愈合可(图 4D)。

2.3.4 表皮生长因子组织工程皮肤组 (D 组) 术后 3d 组织工程皮肤上可见细胞生长, 并优于其它 4 组, 组织工程皮肤与创面基本贴附(图 5A)。术后 7d 组织工程皮肤上细胞生长情况

优于其它 4 组(图 5B)。术后 21d 限制收缩创面装置基本已脱离, 新生表皮较薄(图 5D)。

2.3.5 富生长因子组织工程皮肤组 (E 组) 术后 3d 组织工程皮肤上见少许富血小板凝胶(图 6A), 细胞生长情况不如 C 组、D 组, 组织工程皮肤与创面基本紧密, 感染例数最少。术后 7d 组织工程皮肤上见少量细胞生长(图 6B)。术后 14d 创面感染例数最低, 并较其它 4 组干燥(图 6C)。术后 21d 创面愈合良好(图 6D)。

2.4 组织学观察

HE 染色切片结果表明富生长因子组织工程皮肤组(E 组)创面愈合效果最好, 碱性成纤维细胞生长因子组织工程皮肤组(C 组)和表皮生长因子组织工程皮肤组(D 组)较好, 组织工程皮肤组(B 组)次之, 人工真皮组(A 组)最差(图 7)。

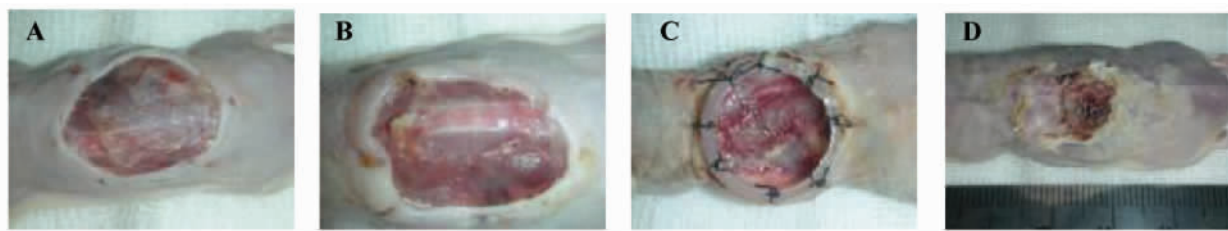


图 2 (A to D)术后人工真皮组创面标本大体观察:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

Fig. 2 (A to D) Macroscopic view of skin wound specimens of artificial dermis after surgery:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

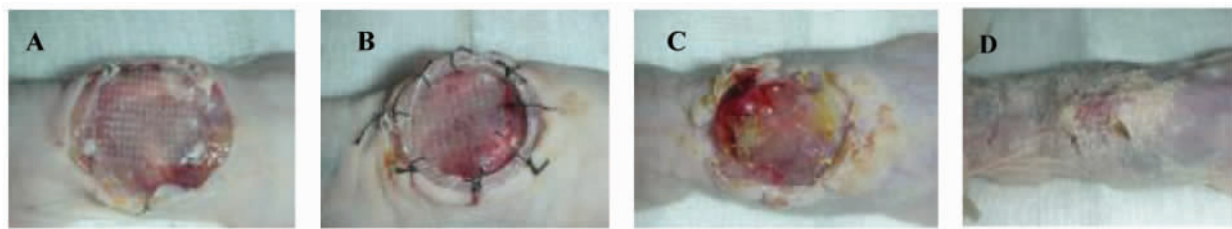


图 3 (A to D)术后组织工程皮肤组创面标本大体观察:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

Fig. 3 (A to D) Macroscopic view of skin wound specimens of tissue engineering after surgery:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

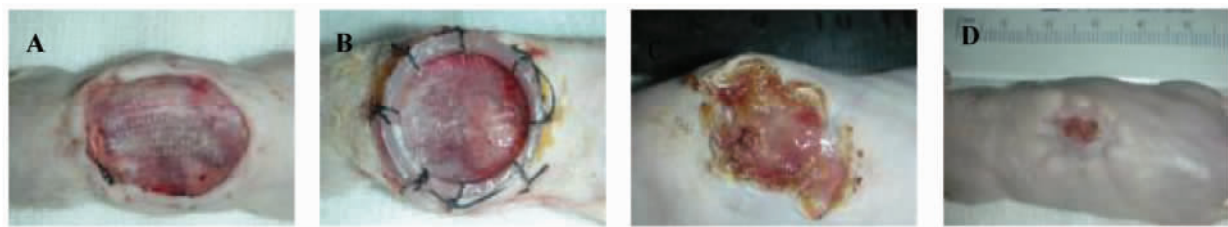


图 4 (A to D)术后碱性成纤维细胞生长因子组织工程皮肤组创面标本大体观察:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

Fig. 4 (A to D) Macroscopic view of skin wound specimens of basic fibroblast growth factor tissue engineering after surgery:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

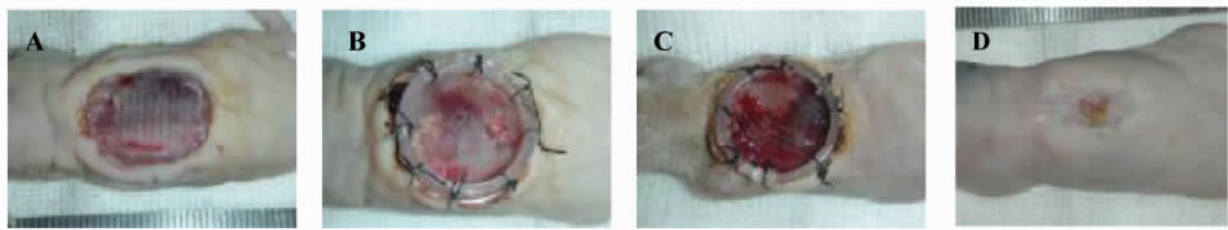


图 5 (A to D)术后表皮生长因子组织工程皮肤组创面标本大体观察:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

Fig. 5 (A to D) Macroscopic view of skin wound specimens of Epidermal growth factor tissue-engineered after surgery:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

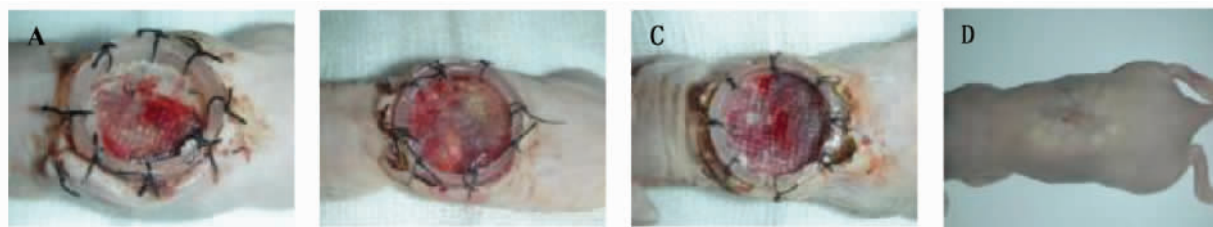


图 6 (A to D)术后富生长因子组织工程皮肤组创面标本大体观察:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

Fig. 6 (A to D) Macroscopic view of skin wound specimens of Rich growth factor tissue-engineered after surgery:(A:3d B:7d C:14d D:21d)

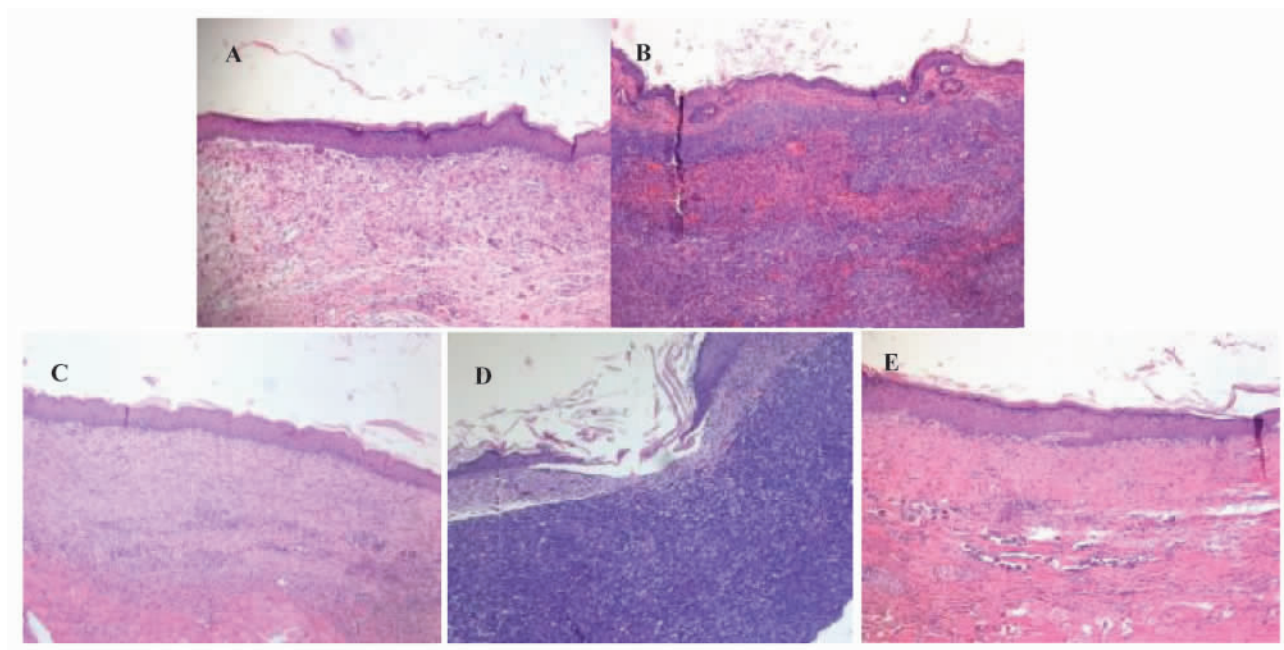


图 7 术后第 21 天各组创面标本 HE 染色低倍镜下观察(10x10)

Fig. 7 (A to E) Observation of HE stained wound tissue sample taken at 21 days post-surgery under low magnification (10 x 10)

术后 21 天采集标本进行 PAS 染色, 低倍镜下观察发现, 各组呈不连续阳性, 提示有基底膜形成(图 8)。免疫组织化学

分析 pan-ck, vimentin, CK15, CD29 蛋白分析结果也证实了伤口愈合的程度是 E 组 > C 组 > D 组 > B 组 > A 组(图 9-12)。

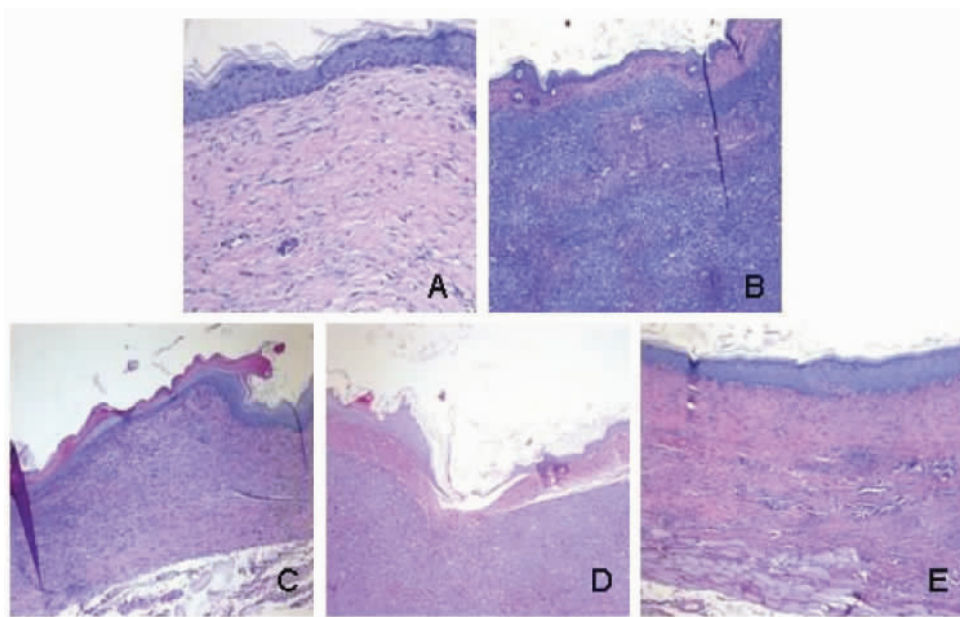


图 8 术后第 21 天各组创面标本 PAS 染色低倍镜下观察(10x10):A 组:B 组:C 组:D 组:E 组

Fig.8 (A to E) Observation of PAS stained wound tissue sample taken at 21 days post-surgery under low magnification (10 x 10) :groupA: groupB: groupC: groupD: groupE

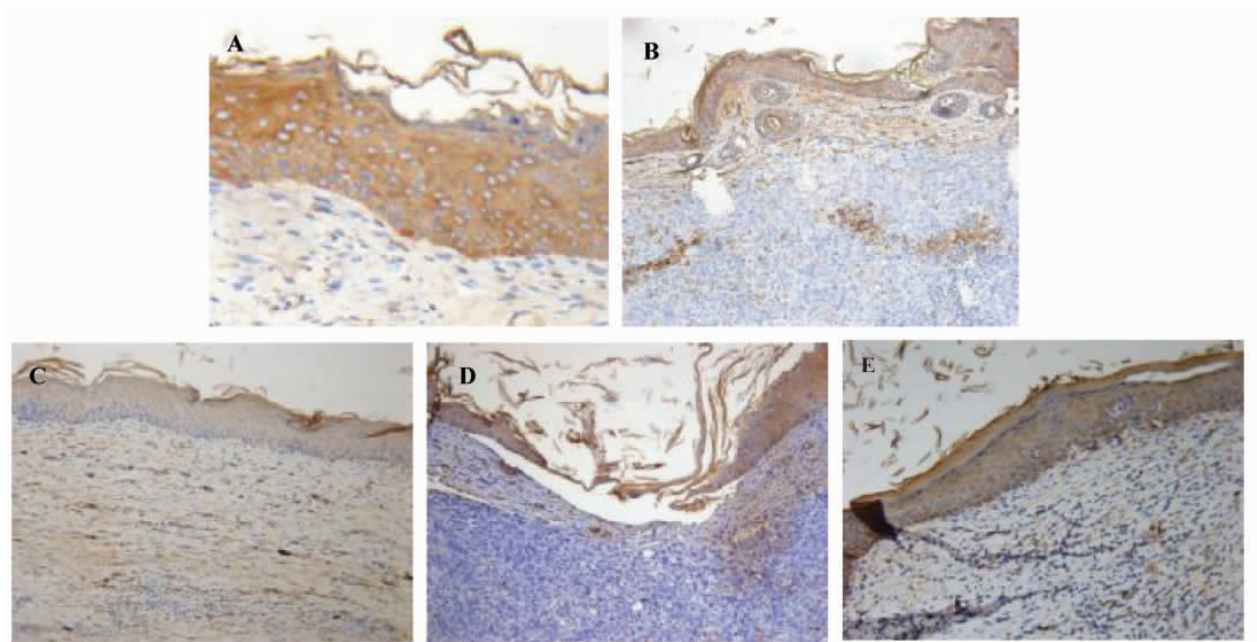


图 9 术后第 21 天各组创面标本 Pan-ck 染色高倍镜下观察(10x20):A 组:B 组:C 组:D 组:E 组

Fig.9 (A to E) Observation of wound tissue sample taken at 21 days post-surgery with staining against Pan-ck under high magnification (10 x 20) : groupA: groupB: groupC: groupD: groupE

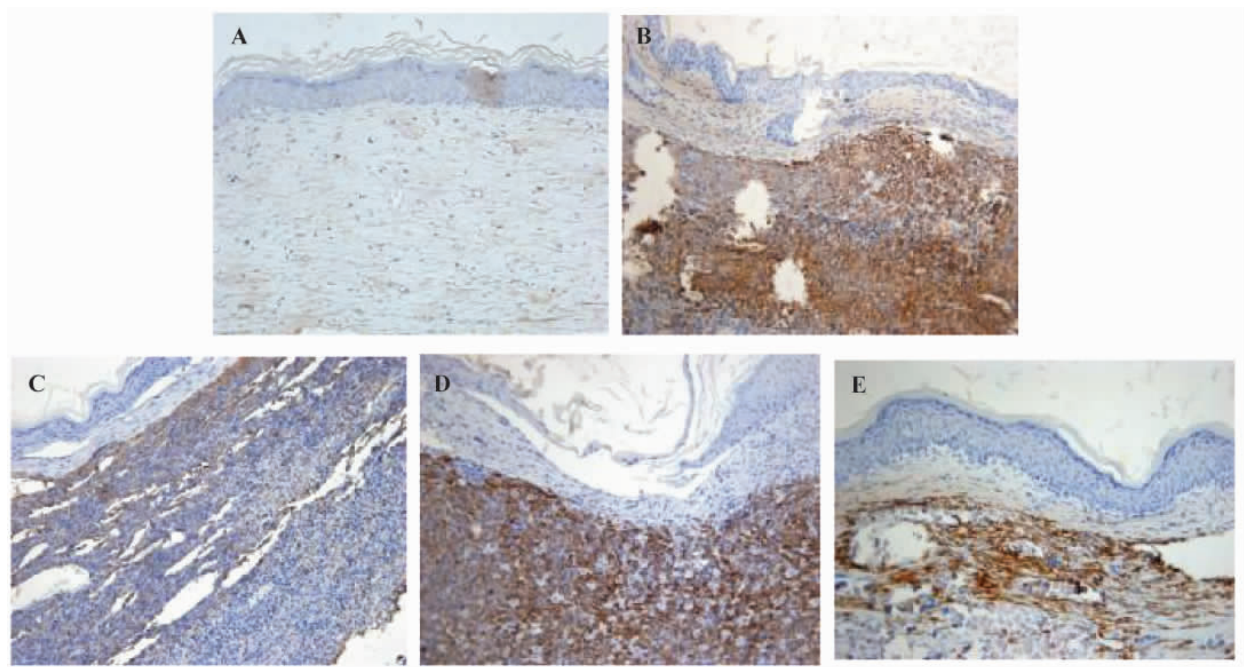
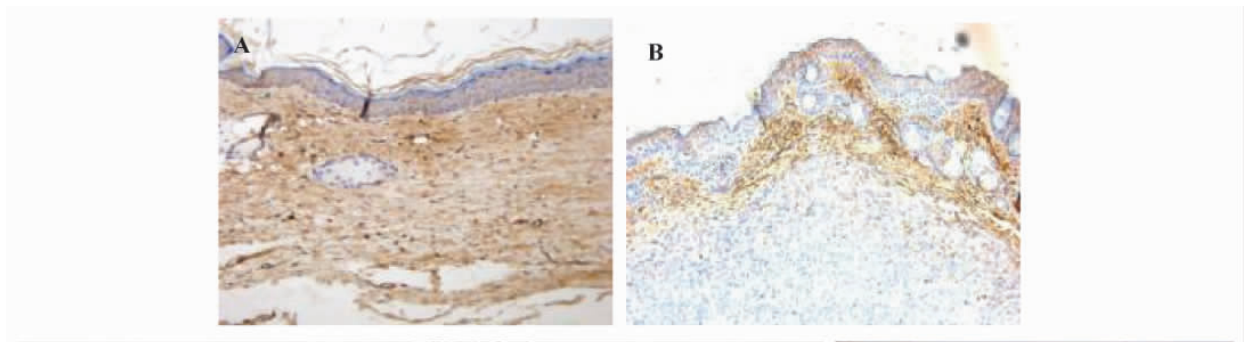


图 10 术后第 21 天各组创面标本 Vimentin 染色高倍镜下观察(10x20):A 组:B 组:C 组:D 组:E 组

Fig.10 (A to E) Observation of wound tissue sample taken at 21 days post-surgery with immuohistochemical staining against Vimentin under high magnification (10 x 20) :groupA: groupB: groupC: groupD: groupE



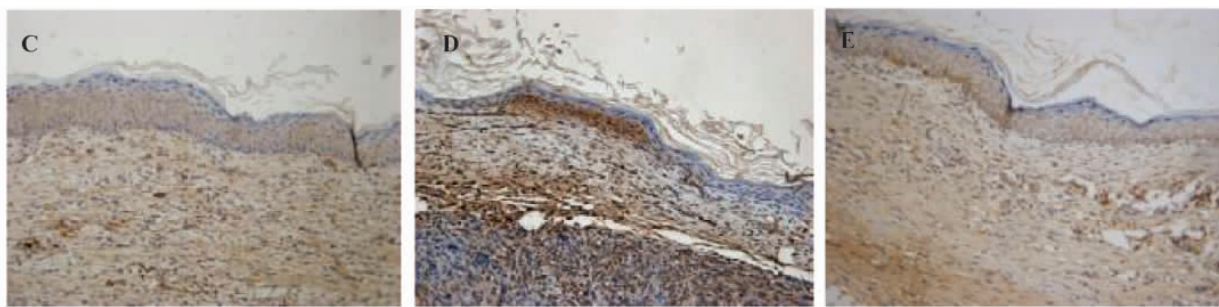


图 11 术后第 21 天各组创面标本 CK15 染色高倍镜下观察(10x20):A 组:B 组:C 组:D 组:E 组

Fig.11 (A to E) Observation of wound tissue sample taken at 21 days post-surgery with immunohistochemical staining against CK15 under high magnification (10 x 20) :groupA: groupB: groupC: groupD: groupE

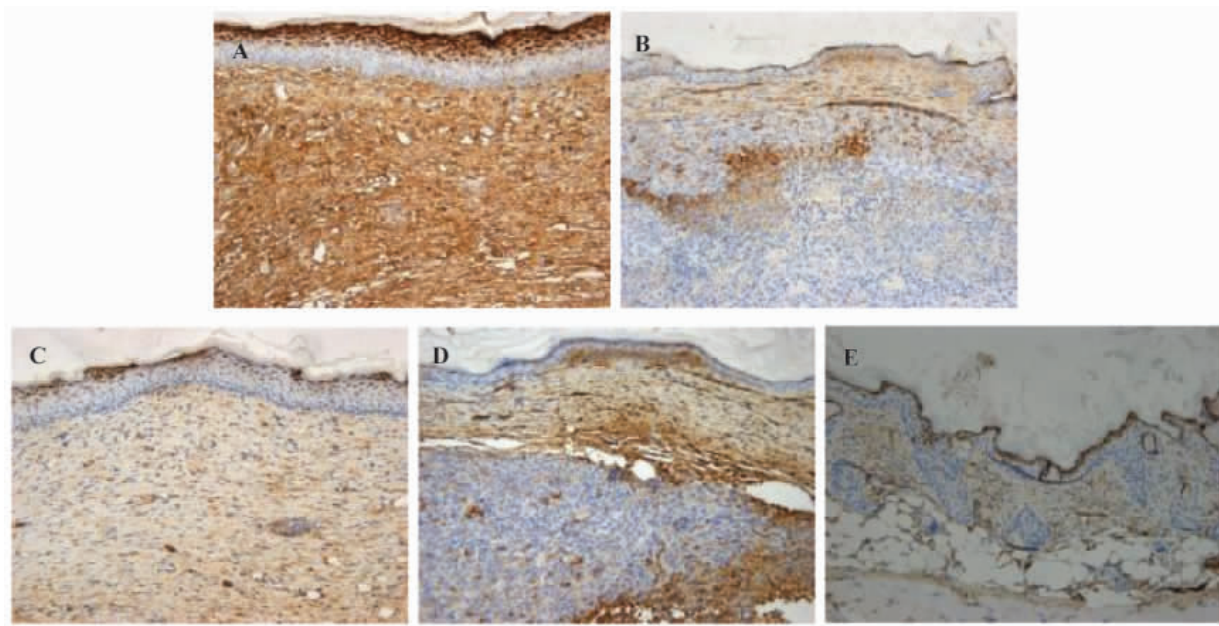


图 12 术后第 21 天各组创面标本 CD29 染色高倍镜下观察(10x20):A 组:B 组:C 组:D 组:E 组

Fig.12 (A to E) Observation of wound tissue sample taken at 21 days post-surgery with immunohistochemical staining against CD29 under high magnification (10 x 20) :groupA: groupB: groupC: groupD: groupE

3 讨论

富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 是自体全血经 2 次离心后,利用密度梯度离心法所制备而得的富含生长因子的浓缩血小板的血浆,其所含的血小板浓度至少为全血的 4 倍以上,PDGF-AB, TGF- β 1 and EGF 含量大于全血。本实验通过分离浓缩得到了 PRP,其血小板含量是静脉全血的 4.5 倍,满足实验要求合理范围,并且两者有统计学差异。另外,PRP 中 PDGF-AB, TGF- β 1 和 EGF 等生长因子都高于全血。然而,全血及 PRP 的 TGF- β 1 浓度无统计学差异。考虑是由于不同的标本 TGF- β 1 的水平可能有较大差异,稀释度未能良好掌握所致。

表皮干细胞(epidermal stem cells, ESC)在正常皮肤中的含量极少,约占表皮细胞的 4%,作为皮肤组织特异性干细胞,不仅维持着表皮日常的新陈代谢,且积极地参与皮肤损伤后的修复。是整合素表达水平最高的一类细胞,主要通过表达整合素实现对基底膜各种成分的黏附,皮肤基底层细胞通过其表面的整合素与基底膜及细胞外基质黏附,在增殖分化过程中,基底层细胞表面整合素表达逐渐下调直至消失,细胞也随之逐渐向皮

肤表面迁徙,最终角质化、脱落。干细胞对基底膜的脱黏附是诱导干细胞脱落,干细胞群落进入分化周期的重要调控机制之一。由于表皮干细胞及暂时增殖细胞表面高表达 β 1 整合素,而有丝分裂后细胞及终末分化细胞不表达 β 1 整合素,因而可以用 β 1 整合素的抗体来鉴别表皮干细胞及暂时增殖细胞(transient amplifying cells, TA cells)^[2]。 β 1 整合素在毛囊隆突部和基质的角朊细胞强烈表达^[2], β 1 整合素阳性细胞与 K15 在毛囊隆突部的分布相吻合,但 β 1 整合素并非干细胞特异性的标志, β 1 整合素阳性细胞包含干细胞和部分 TA 细胞^[3]。 β 1 整合素是 ESC 首要的相对特异标识分子,与过度性扩充细胞的表达水平比较,ESC 的表达水平要高出 2~3 倍,并且 β 1 整合素的表达水平和细胞的增殖能力呈正相关^[4]。

ESC 的分化和增殖受内外因素影响,目前研究报道表明涉及很多细胞因子,例如白细胞介素(interleukins, ILs)、干细胞生长因子(stem cell growth factors, SCGF)、表皮细胞生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)等。干细胞和其周围的支持细胞之间的亲密接触,也可以作为一种控制干细胞行为的关键信号来源,实验发现毛囊外根鞘细胞体外培养

后移植到小腿溃疡创面,治疗效果良好,并且新生上皮从生物学角度和形态学方面与周围皮肤无明显差异。因此,应用干细胞的无限增殖和多向分化潜能对今后的表皮重建具有重大实用价值^[9]。国内有学者探讨了表皮干细胞直接分化为汗腺细胞的可能性^[9],以及胎盘表皮干细胞在毛囊乳头层的诱导下形成新的毛囊结构^[7]。通过毛囊干细胞可以制备皮肤替代物,移植到深度烧伤创面以期达到表皮的功能康复^[9]。皮肤组织有着很强的再生能力,表皮的不断更新依赖于基底层中的干细胞终身不断自我持续分裂。终末分化细胞的死亡脱落与基底干细胞的分裂维持一定的平衡,这是维持正常的组织结构和细胞内环境稳定的基本条件^[9]。

移植同源异体组织工程皮肤,术后 3 d、7 d、14 d、21 d 采集创面活检标本,常规 4%多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋后,进行 HE 染色、PAS 染色、pan-ck、vimentin、CK15、CD29 等免疫组化检测。组织切片 HE 染色揭示在组织再生方面从最好到最差依次是富生长因子组织工程皮肤组(E 组)、碱性成纤维细胞生长因子组织工程皮肤组(C 组)、表皮生长因子组织工程皮肤组(D 组)、组织工程皮肤组(B 组)和人工真皮组(A 组)。术后 21 天采集标本进行 PAS 染色,低倍镜下观察发现,各组间呈不连续阳性,提示有基底层结构的再生。随后,对 pan-ck、vimentin、CK15、CD29 免疫组织化学分析,显示不同实验组与对照组的创面修复进展与 HE 染色结果一致。

本研究证实移植富含血小板衍生生长因子 AB(platelet-derived growth factor, PDGF-AB)、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、类胰岛素生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种生长因子的组织工程皮肤能加速创面愈合的速度。与人工真皮、组织工程皮肤和单生长因子组织工程皮肤相比,富含多种不同生长因子的组织工程皮肤对创面修复更有效果。

成纤维生长因子(Fibroblast growth factors, FGFs)是生长因子家族成员之一,主要参与血管生成、伤口愈合和胚胎发育,在各种各样细胞和组织的增殖和分化过程中起到重要作用。成纤维生长因子于 1973 年在垂体提取物中首次发现,初始为“酸性成纤维细胞生长因子”(acidic fibroblast growth factor, aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)两种形式,随后 FGF-5 等其它异构体也相继被发现。到目前为止,成纤维生长因子家族共有 9 名成员。作为成纤维生长因子家族成员之一,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是一种有多种生物特性的多功能蛋白,在不同领域被广泛研究。bFGF 对多种类型细胞株有多种生物学功能,例如参与中胚层诱导、神经诱导和神经系统发育等。在成熟组织,它可以促进血管生成、伤口愈合和组织修复。碱性成纤维细胞生长因子在机体正常生长发育过程中起到关键的作用,对整形外科中遇到的发育缺陷的发病机制和治疗研究有很大的意义^[10]。

bFGF 调节与创面修复相关细胞的有丝分裂、分化和调节蛋白的分泌。其重要职能之一,是直接诱导的内皮细胞迁移和增殖。其他功能包括刺激巨噬细胞内源性 bFGF 表达、成纤维细胞增殖,合成新的细胞外基质形成结缔组织,以及新血管的

生长。bFGF 在创面修复过程中起到多方面的调节作用。Fang 等人研究表明可提高皮肤移植成活率、减少组织坏死及坏死表面积率,也能显著减轻移植皮肤收缩^[11]。大量的动物实验证实 bFGF 在创面修复方面有突出的作用,为 bFGF 在临床上的应用提供了重要的理论基础。

表皮生长因子(epidermal growth factor, egf)是 Cohen 1962 年首次在小鼠的颌下腺中发现的一种小分子蛋白。1975 年从人尿中提取出人表皮生长因子(hegf),由于其可抑制胃酸分泌,又称抑胃素。由于其在临床实践的巨大大生物学效应和广阔前景,表皮生长因子和表皮生长因子受体(EGFR)的研究已成为近年来在生物化学领域的研究热点^[12]。egf 能促进细胞内糖、蛋白质、DNA 和 RNA 的合成,加速细胞的有丝分裂,从而促进上皮细胞的增殖,与免疫皮肤病、伤口组织的修复和牙周炎等疾病的治疗紧密相关^[13]。分离纯化的人 EGF 重组蛋白促进伤口愈合及皮肤烧伤治疗的功能越来越受到人们的重视,已被广泛用于浅度烧伤、深度烧伤、慢性伤口、皮肤移植等多种组织创伤的研究,并已经在临床上得到广泛的应用。

血小板衍生生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)主要由巨核细胞合成,储存在血小板的 α 颗粒中。其他细胞经适当刺激后也能产生 PDGF,例如巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞、成肌细胞、神经胶质瘤细胞和胶质母细胞瘤等肿瘤细胞株。PDGF 能诱导细胞做一些事情,如合成 DNA、激活酪氨酸激酶,上调花生四烯酸、PGI₂ 和 PGE₃ 的释放,激活腺苷酸环化酶,激活丝氨酸苏氨酸激酶,诱导基因的转录,并改变细胞表面活性。Saygin 等^[14]用 PDGF 作用细胞发现可以增加基因表达,PDGF 不但可以促进细胞增殖,还增加胶原蛋白和非胶原蛋白的合成^[15]。

转化生长因子 β (Transforming growth factor beta, TGF- β) 是一类具有多种生物学活性的多肽生长因子。在不同类型的细胞和组织中起到关键的细胞生物学活性,参与创面愈合、病理性瘢痕形成和骨生成。机体组织损伤后,由血小板分泌释放 TGF- β ,聚集在创面边缘,与细胞外基质的物理接触诱导其生物学活性发挥。活化的 TGF- β 诱发单核细胞、中性粒细胞和成纤维细胞发生趋化反应,向创面部位迁移并活化,发生免疫应答反应。活化的细胞也可以释放 TGF- β ,进一步招募其他免疫细胞在损伤区域聚集。TGF- β 还可以启动上皮细胞的趋化作用,促进上皮细胞分裂和增殖,增加角质细胞的流动性,刺激角质细胞角质蛋白的表达。TGF- β 能刺激损伤部位成纤维细胞合成很多种类的细胞外基质蛋白,主要有 I 型胶原、II 型胶原、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、弹性蛋白、整合素和多聚糖蛋白,同时, TGF- β 可以减少蛋白酶分泌,降低基质破裂,促进基质与细胞的交联作用,增强创面部位的抗拉强度和局部纤维蛋白沉积,加速创面愈合。实验已表明,外源性 TGF- β 有助于切除伤口、裂伤、闭合性损伤和溃疡等伤口的治疗^[16,17]。有研究表明 EGF 通过与细胞表面 EGF 受体结合,启动某些基因的表达,最终加快细胞的增殖^[18]。同时依次刺激上皮细胞,增加细胞内基质的合成,加速伤口愈合。在伤口愈合过程中,EGF 受体在损伤部位是高表达的,另一方面,EGF 受体在细胞外液体通常是低表达的。EGF 的局部高表达可加速上皮修复和肉芽组织的形成,进而加速伤口愈合。

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors ,IGFs)是一类与胰岛素呈高度同源的多肽生长因子,其结构与胰岛素原类似,并具有胰岛素样活性,包括2个成员即IGF-I and IGF-II。体外实验表明IGFs是生长激素(growth hormone ,GH)启动生长活性和神经发育、稳态的介导者。IGF-I主要生物学功能是调节多种类型细胞新陈代谢和有丝分裂,促进动物生长发育;而IGF-II的功能研究主要是成人胸腺和妊娠期激素的促生长特性。IGFs的生物学功能不但要促进有丝分裂细胞分裂作用,还可以诱导细胞分化和分化细胞的功能性表达。

VEGF是Ferrara于1989年从牛垂体滤泡细胞培养液中分离出的一类糖蛋白,能促进血管内皮细胞的分裂与增殖和新血管的形成,并能增加微血管的通透性,因此,也称为血管通透因子(vascular permeability factor, VPF)^[19]。VEGF的过表达在肿瘤生长、转移、促进伤口愈合、牛皮癣、迟发性超敏反应、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩发病过程中起重要作用^[20]。最近研究热点集中于阐明VEGF在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩形成过程中表达情况,增生性瘢痕和瘢痕疙瘩形成机制可能与角质化细胞的VEGF过表达有关,VEGF可通过旁分泌诱导内皮细胞促进皮肤血管的形成^[21],Janes等人发现VEGF还可以通过不同的机制调节成纤维细胞活性影响胶原蛋白的新陈代谢,这与Detmar等人的研究发现是一致的^[22]。众多研究证明,组织缺氧可以诱导角质化细胞表达VEGF^[23]。

创面愈合是一个受不同生长因子调节和相互作用的复杂过程,外源性生长因子局部应用和抗体的抗原性中和的有效性仍有待证实和解决。这一领域的研究还有很多不足,没到临床应用阶段,但是,通过不同的生长因子是如何影响细胞生长、修复和调节的研究,我们发现这种生长因子结合治疗皮肤伤口的方法还是有十分广阔的前景。

参考文献(References)

[1] Lin Y, Li H, Huang J, et al. Following the fate of murine epidermal stem cells in a syngeneic dermal equivalent in vivo [J]. Burns, 2005, 31(8): 1007-1012

[2] 刘涛, 金岩. 无细胞组织工程真皮材料的研究进展 [J]. 国际生物医学杂志, 2006, 29(3): 170-173

Liu Tao, Jin Yan. Development of tissue engineering dermal materials without cells [J]. International Journal of Biomedical Engineering, 2006, 29(3): 170-173(In Chinese)

[3] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cell, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114 (3): 413-420

[4] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998, 85: 638-646

[5] 张长青, 袁霆, 曾炳芳, 等. 富血小板血浆促进骨缺损修复的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17: 355-358

Zhang Chang-qing, Yuan Ting, Zeng Bing-fang, et al. Experimental study of effect of platelet-rich plasma in repair of bone defect [J]. Chinese journal of reparative and reconstructive surgery, 2003, 17: 355-358(In Chinese)

[6] Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration

in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration [J]. Bone, 2004, 34: 665-671

[7] Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing [J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 114(6): 1502-1508

[8] Carter A, Jolly DG, Worden CE Sr, et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing [J]. Exp Mol Pathol, 2003, 74(3): 244-255

[9] Babbush CA, Kery SV, Jacobson MS. An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction [J]. Implant Dent, 2003, 12(1): 24-34

[10] Tamariz DE, Castro MF, Kuri HW. Growth factors and extracellular matrix proteins during wound healing promoted with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes [J]. Cell Tissue Res, 2002, 307(1): 79-89

[11] 付小兵, 王德文. 创伤修复基础 [M]. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997: 129-204

Fu Xiao-bing, Wang De-wen. Chuang shang xiu fu ji chu [M]. 1st Ed. Beijing: Ren ming jun yi chu ban she, 1997: 129-204

[12] Crovetti G, Martinelli G, Issi M, et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wound [J]. Transfus Apheresis Sci, 2004, 30 (2): 145-151

[13] 伍津津, 刘荣卿, 叶庆倩, 等. 人工皮肤培养模型的建立 [J]. 重庆医学, 1999, 28(4): 247-248

Wu Jin-jin, Liu Rong-qing, Ye Qing-qian, et al. A model of artificial skin established by three-dimensional culture [J]. Chong qing yi xue, 1999, 28(4): 247-248

[14] Moll I. Proliferative potential of different keratinocytes of plucked human hair follicle [J]. J Invest Dermatol, 1995, 105(1): 14-21

[15] Lyle S, Christofidou SM, Liu Y, et al. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells [J]. J Cell Sci, 1998, 111: 3179-3188

[16] Larouche D, Hayward C, Cuffley K, et al. Keratin 19 as a stem cell marker in vivo and in vitro [J]. Methods Mol Biol, 2004, 289: 103-106

[17] Taylor G, Lehrer MS, Jenson PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not forming not only the follicle but also the epidermis [J]. Cell, 2000, 102(4): 451-461

[18] Li J, Fu XB, Sun XQ, et al. The interaction between epidermal growth factor (EGF) and metalloproteinases induces the development of sweat glands in human fetal skin [J]. J Surg Res, 2002, 106(2): 258-263

[19] 韩军涛, 陈璧, 张晓辉, 等. 胎鼠表皮干细胞的分离培养及毛囊再生研究 [J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19 (1): 8-11

Han Jun-tao, Chen Bi, Zhang Xiao-hui, et al. In vitro culture of murine fetal epidermal stem cell and its relationship with the regeneration follicle [J]. Chinese journal of burns, 2003, 19 (1): 8-11(In Chinese)

[20] Ma DR, Yang EN, Lee ST. A Review: The Location, Molecular Characterisation and Multipotency of Hair Follicle Epidermal Stem Cells [J]. Ann Acad Med Singapore, 2004, 33: 784-788

[21] Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells [J]. J Pathol, 2002, 197(4): 479-482

[22] 胡亚兰, 郭树忠. 碱性成纤维细胞生长因子在整形外科的研究进

- 展[J].白求恩医学院学报, 2004, 9(2): 166-169
- Hu YL, Guo SZ. Basic fibroblast growth factor in the Plastic Surgery Research Progress [J]. Journal of norman bethune medical college, 2004, 9(2): 166-169
- [23] Huang BR. A brief introduction of the EGF application[J]. Basic Clin Med, 1991, 11: 79-83
- [24] Hom DB. Groth factors in wound healing [J]. Otolaryngol Clin North Am, 1995, 28(5): 933-953
- [25] Saygin NE, Tak Y. Gianobile WV. Growth Factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblast[J]. Journal of periodontology, 2002, 71 (10): 1591-1600
- [26] 郭涛, 陈艺新. PDGF 与 IGF 对骨形成的协同作用及机制[J]. 中国骨伤, 2003, 16(9): 574-576
- Guo T, Chen YX. Synergetic interaction and mechanism of combination of PDGF with IGF on bone formation [J]. Zhongguo Gu Shang, 2003, 16(9): 574-576
- [27] Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing [J]. Clin Orthop, 1998, (355): S294-300
- [28] 龙海珊, 戴海汇, 周芸, 等. 重组表皮生长因子治疗外伤性鼓膜穿孔的临床观察[J]. 中国耳鼻喉 - 头颈外科, 2004, 11: 83-88
- Long Hai-shan, Dai Hai-hui, Zhou Yun, et al. Effect of reconstruct human epidermic growth factor on closing traumatic tympanic membrane perforations[J]. Zhongguo er bi yan hou tou in wai ke, 2004, 11: 83-88(In Chinese)
- [29] Fermra N, Henzel WJ. Pituitary follicular cell secrete a novel heparin-binding growth factor specific vascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161: 851-858
- [30] Cohen G, Rudnicki M, WMter F, et al. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of poly-morphonuclear leukocytes[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(6): 1264-1271
- [31] Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse[J]. Diabetes, 2001, 50(3): 667-674
- [32] Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, et al. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells[J]. J Invest Dermatol, 1995, 105: 44-50
- [33] Funayama E, Chodon T, Oyama, et al. Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid [J]. J Invest Dermatol, 2003, 121(6): 1326-1331

· 重要信息 ·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN :978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学专家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。