



应用组织工程方法构建瘢痕疙瘩模型

瘢痕疙瘩是临床上常见的病理性瘢痕。其治疗一直是困扰整形外科的难题，但由于缺乏理想的动物模型，这方面的临床和实验室研究一直受到很大限制。建立有效的瘢痕动物模型成为整形外科领域面临的重要课题。随着组织工程学的迅速发展，从细胞水平构建相应的组织和器官已有不少成功的报道。我们应用组织工程方法，以新型高孔隙率海绵状聚乳酸-乙醇酸共聚物[(copolymer of polylactic acid (PLA) and polyglycolic acid (PGA), PLGA) 支架为成纤维细胞培养载体，建立稳定的瘢痕成纤维细胞三维培养复合体，然后植入实验动物皮下，构建了人瘢痕疙瘩动物模型，报告如下。

1 材料与方 法

1.1 可吸收性支架材料

研究采用的可吸收支架材料为PLGA材料由暨南大学化学系提供，其主要技术参数为：PLA与PGA共聚物，两者单体的摩尔比为50/50，完全降解时间1/2~1 Y，泡沫孔隙率为85%以上，孔径200~300 μm 。

1.2 裸鼠及瘢痕组织的来源

动物实验用 BALB/ C纯合雌性裸鼠 20只，鼠龄 6~8周，由第一军医大学实验动物中心提供。动物存放在预先消毒的微隔离器里，再置于隔离室的层流通风窗内。裸鼠 1鼠 1笼放置，用消毒的专用饲料和水喂养。

患者男，21岁。13年前自行灼烧前胸部小斑点后导致瘢痕增生，且进行性增大。尚未作任何治疗，术后病理检查证实为瘢痕疙瘩。

1.3 瘢痕成纤维细胞的原代及传代培养[1][2]

1.3.1 原代培养 手术切取的瘢痕组织约2~3 mm^3 ，去除皮下脂肪后，在无菌超净台上，用含双抗PBS漂洗标本2~3次，用眼科弯剪迅速将组织剪成0.5~1 mm^3 大小组织块。弯头吸管吸取组织块FBS混合液，均匀覆盖于25 ml培养瓶接种面，翻转培养瓶使组织贴壁面朝上。加入3~5 ml含20% FBS DMEM培养液于培养瓶底部，保持培养瓶湿润。置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 湿化，培养箱内12~24 h，待组织块贴壁后，小心翻转培养瓶，使组织块浸没于培养液中，1周内切勿翻动，以免影响组织块贴壁生长。约1周后半量更换培养液，以后每3 d换液1次。

1.3.2 传代培养 当原代细胞生长至基本融合时，即可传代。于超净台上弃去培养液，用5 ml PBS漂洗1次。滴加0.25%胰蛋白酶1~2 ml，均匀湿润细胞生长面。室温消化2~3 min，倒置显微镜下观察细胞分离、收缩变圆即可终止消化。加入新鲜的10%FBS DMEM培养液8~10 ml，用弯头吸管反复有序轻轻吹打贴壁成纤维细胞(fibroblasts, FB)，使其成均匀的细胞悬液，稍静止沉淀组织块。根据细胞密度按1:2或1:3传代。视FB生长速度大约每10~14 d传代一次，每4~5 d换液1次。第6~8代的FB用于后继实验。

1.4 瘢痕成纤维细胞的三维培养[3]

将PLGA切成5 mm×5 mm×0.5 mm正方形小块放入培养皿中，分别75%酒精浸泡消毒 2 h，双抗浸泡过

夜，无菌PBS浸洗3遍；然后置入90 mm无菌培养皿中干燥，用时再紫外线照射 30 min。实验分2组，每组20个标本。

实验组：将20个标本置于24孔培养板中，滴加适量含20% FBS DMEM于37 °C、5% CO₂培养箱内预湿过夜，以增加其亲水性。取1ml经胰酶消化的2×10⁵/ml单细胞悬液置于PLGA海绵支架上，再加入2 ml 10% FBS DMEM培养液使其均匀分布。

对照组：将未接种细胞的单纯支架材料滴加适量含20% FBS DMEM于37 °C、CO₂培养箱内预湿过夜，再加入2 ml 10% FBS DMEM培养液。两组静置培养72 h后转移至旋转式细胞培养系统(rotatory cell culture system, RCCS)容器内进行培养。复合体以及对照组的支架材料在体外分别培养 7 d。每天倒置显微镜下观察细胞生长情况，第1、7天取标本照相(光镜，电镜观察)

1.5 动物实验方法

20只裸鼠按实验分组，在裸鼠背部左右两侧用 75%酒精消毒，于两肩胛骨处各作一 0.5 cm切口，潜行分离形成皮下腔隙；将体外培养的两组的支架材料共 40个样本，于每只鼠背部皮下植入2个复合体(左侧为实验组、右侧为对照组)，切口用 5/ 0丝线缝合。伤口涂酒精后裸露，术后不用任何抗生素。裸鼠转入各自笼内饲养后，每天观察，在预定时间内切开背部皮肤，切取植入物，迅速置于 10%甲醛或2.5%戊二醛中固定，以待进一步处理后作光镜或电镜检查。

1.6 组织学处理及观察方法

实验前，将瘢痕疙瘩组织取 3块留作对照，其中 2块行 HE染色和 Masson三色染色光镜下观察，另 1块处理后作电镜观察。植入术后 4、8、16、24 w，分批处死20只实验裸鼠(每批 4只)，取出其背部的 2块植入物，每块切成 3部分，分别作 HE染色、Masson三色染色和电镜观察。作光学和电镜观察的标本均按常规处理。观察以下指标(采用免疫组化染色、I型胶原测定)并同原瘢痕对照：1胶原纤维形状及密度；2细胞成分、密度和特点；3血管形成情况；4有无变性坏死、炎性细胞浸润等现象。

2 结果

2.1 维培养FB(成纤维细胞)的生长特性观察

2.1.1 细胞体外培养观察 细胞悬液接种PLGA支架 48 h，倒置显微镜下可见细胞以单个或群落状吸附于支架纤维上。培养 1周，PLGA纤维之间有呈蜘蛛网状的基质产生(图1A、B)。

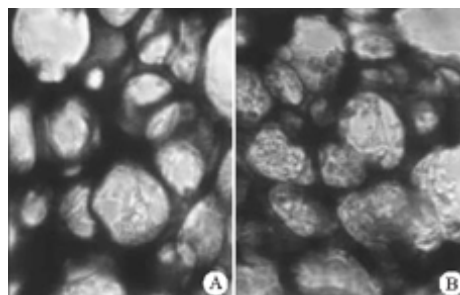


图1 接种PLGA支架后的细胞悬液

Fig.1 Fibroblasts inoculated with the scaffold (Original magnification: ×20)
A:Cultivated in vitro for 48 h; B: Cultivated in vitro for one week

2.1.2 扫描电镜观察 PLGA材料均为珊瑚状多孔结构，气孔多为连通气孔。气孔分布为大孔-微孔结构，其中大孔孔径为200~300 μm，相互连通；在大孔孔壁上分布着孔径5 μm以下的微孔(图2)。与细胞共孵育1周后，可见FB呈椭圆球形或不规则形，紧密粘附于PLGA支架表面，细胞与材料及细胞间有丝状纤维形成(图3)。

2.2 移植物的生长特性观察

术后裸鼠全部成活，完成实验观察。

2.2.1 大体观察 种植后伤口及种植区未见感染和种植物排出。第 4 周时，裸鼠两肩胛区可触及各有一皮下结节，推动该处皮肤，结节可同时活动，植入物同表面皮肤结合紧密，与底部肌肉组织结合疏松。切开皮肤，见植入物形状改变，左侧由原来的正方块变圆变光滑，呈“鹅卵石”样，有包膜覆盖，包膜上有丰富小血管网，主要来自裸鼠皮肤。移植物的尺寸同植入前无明显差别。右侧移植物的尺寸同植入前无明显差别，有包膜覆盖，包膜上无小血管网。第 8 周时，左侧移植物的体积较植入前大，右侧移植物的体积较植入前小，切开皮肤，左侧继续变扁变光滑，有包膜覆盖，来自裸鼠皮肤的血管进入包膜，然后广泛发出分枝，质地变软。右侧开始萎缩，表面有包膜覆盖，包膜上无小血管网，质地变软。第 16 周时，左侧体积继续增大，右侧体积明显缩小，切开皮肤，左侧继续变扁变光滑，有包膜覆盖，来自裸鼠皮肤的血管分支增多，质地由软变韧。右侧继续萎缩卷曲，包膜上无小血管网，质地继续变软，易碎。第 24 周时，左侧体积继续增大，切开皮肤，左侧继续变扁变光滑，有包膜覆盖，表面布满细小血管网，质地韧。右侧移植物的体积继续变小，卷曲变形，包膜上无小血管网。

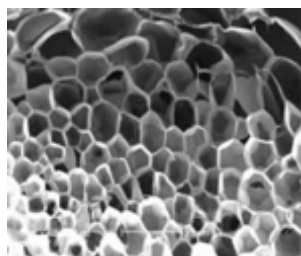


图2 PLGA支架电镜扫描

Fig.2 PLGA under scanning electron microscopy (Original magnification: $\times 1\ 000$)

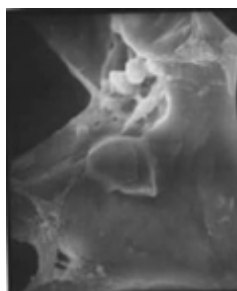


图3 PLGA支架与细胞共孵育1w的电镜扫描

Fig.3 Fibroblasts incubated with the scaffold for one week under scanning electron microscopy (Original magnification: $\times 1\ 500$)

2.2.2 组织学观察

实验组：(1) Masson三色染色：第 4 周 (图4A)，可见成纤维细胞陷窝之间胶原被染成蓝色，色泽较浅，第 8、16、24 (图4B) 周较 4 周时明显深染，范围扩大；(2) HE 染色：第 4 周 (图5A)，可见被染成蓝色成纤维细胞，呈梭形，周围有条状的胶原纤维，还可见被染成深红色的 PLGA 碎片，第 8、16、24 周 (图5B) 较 4 周时成纤维细胞明显增多，胶原纤维增多，增粗呈板状或旋涡状排列，局部胶原逐步融合，呈玻璃样变；(3) 免疫组化染色 (检测人瘢痕疙瘩成纤维细胞分泌的 I 型胶原)：可见从第 4 周 (图6A) 到第 24 周 (图6B)，成纤维细胞分泌 I 型胶原的量是逐步增加的。

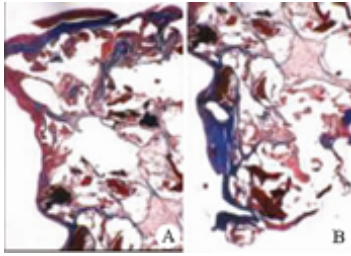


图4 实验组Masson三色染色
Fig.4 Masson staining of the test group after 4(A), 16(B) weeks (Original magnification: $\times 20$)

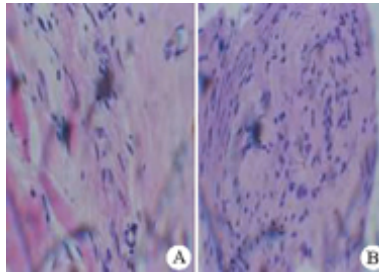


图5 实验组HE染色
Fig.5 Hematoxylin and eosin staining of the test group after 4(A), 16(B) weeks (Original magnification: $\times 40$)

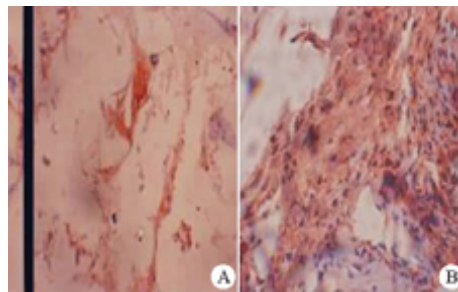


图 6 实验组免疫组化染色
Fig.6 Immunohistochemical staining of the test group after 4(A) , 16(B) weeks (Original magnification: $\times 40$)

对照组：HE染色，第4周，可见阶梯样排列的PLGA纤维，未见成纤维细胞(图7A)；第16周，均为PLGA纤维，其间有一些结缔组织长入，未见成纤维细胞(图7B)。

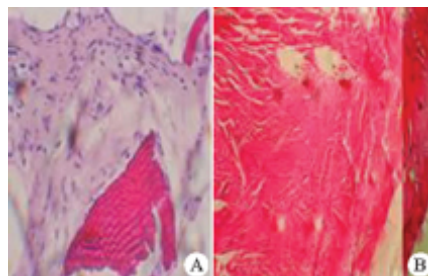


图7 对照组HE染色
Fig.7 Hematoxylin and eosin staining of the control group after 4(A), 16(B) weeks (Original magnification: $\times 40$)

2.2.3 电镜观察 实验组：第4周，扫描电镜可见成纤维细胞在PLGA纤维上贴附生长，部分细胞为长梭

形，表面有微绒毛，伸展良好，另一部分细胞为球形，未伸展，另外可见部分小的球形细胞，可能为裸鼠的淋巴细胞(图8)。透射电镜下见降解的PLGA纤维和贴附于其上的成纤维细胞，周围可见肥大细胞，周围有大量胶原形成(图9)。第24周，扫描电镜可见细胞在PLGA纤维上贴附生长，伸展良好，细胞为长梭形，跨纤维贴附，表面有微绒毛，有细丝样基质分泌(图10)。透射电镜下见贴附于PLGA纤维上的细胞为成纤维细胞，成纤维细胞内含丰富的粗面内质网，肥大细胞胞质中颗粒明显，周围有大量胶原形成(图11)。

对照组第8周(图12A)，透射电镜下见材料孔洞变大，不光滑，连续性不明显，有崩解现象。第24周(图12B)，透射电镜下见材料孔洞变大，密度降低，有明显崩解现象。



图8 实验组第 4周扫描电镜观察

Fig.8 Scanning electron microscopic observation of the test group after 4 weeks
(Original magnification:×1500)

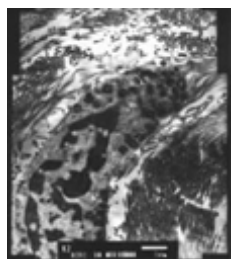


图9 实验组第 4周透射电镜观察

Fig.9 Transmission electron microscopic observation of the test group after 4 weeks
(Original magnification:×8 000)

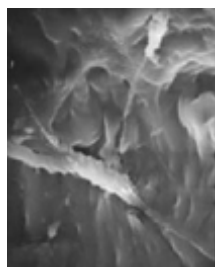


图10 实验组第 24周扫描电镜观察

Fig.10 Scanning electron microscopic observation of the test group after 24 weeks
(Original magnification: ×1 500)



图11 实验组第 24周透射电镜观察

Fig.11 Transmission electron microscopic observation of the test group after 24 weeks
(Original magnification: ×20 000)

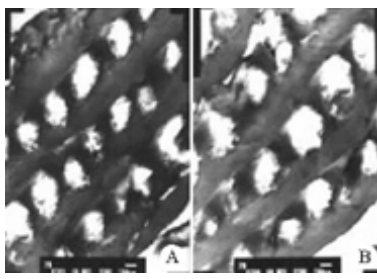


图12 对照组第 4(A)、16周(B)透射电镜观察

Fig.12 Transmission electron microscopic observation of the control group after 4(A), 16(B) weeks (Original magnification:×20 000)

3 讨论

病理性瘢痕是以胶原等大量结缔组织的基质过度沉积为特征的皮肤纤维化疾病。瘢痕疙瘩是一种常见的病理性瘢痕，仅见于人类，其原因不明。由于缺乏理想的动物模型，这方面的临床和实验室研究一直受到很大限制。复制有效的瘢痕动物模型成为整形外科领域面临的重要课题。自20世纪50年代起，国内外学者为了对瘢痕疙瘩的发病机制和防治进行研究，开始尝试建立不同类型的动物模型，主要是以下两种：(1)将人的瘢痕疙瘩移植于动物(裸鼠)；(2)在动物身上构建类似瘢痕疙瘩的瘢痕增生。虽然上述动物模型有一定的可取之处，但仍不够理想，存在以下方面的问题：(1)构建过程缺乏完整性和普遍性，无法对瘢痕的发病机制和预防进行深入研究；(2)混杂因素多，所得结果可信度不高；(3)模型持续时间不够长，不适于作进一步的治疗学研究；(4)模型的成功率较低。

组织工程学的迅速发展，为解决上述问题提出一条新的思路。组织工程目前已在软骨、骨、皮肤、肝脏等领域取得可喜的进展，某些组织已进入临床应用[4][5][6][7]。生物可降解材料是组织工程研究中主要采用的材料，有PLA、PGA和它们的共聚物 PLGA、聚丁酸等，这些可吸收的细胞外基质(ECM)已获得美国FDA的批准，可应用于人体。目前，利用组织工程技术构建相应的动物模型已有不少成功的报道。我们采用新型高孔隙海绵状PLGA作为三维培养支架，成功建立了瘢痕疙瘩三维培养模型，这一方法尚罕见报道。

瘢痕疙瘩成纤维细胞三维培养体系中的ECM材料的选择是模型成功建立的关键环节，也是限制瘢痕基础研究进一步发展的主要因素之一[8][9]。理想的三维培养ECM材料的要求有以下几个方面：第一，良好的组织相容性。Mikos等[10]通过乙醇和水两步法有效地对支架进行预湿，增强了亲水性，促进了细胞在支架表面均匀分布。Bujia等[11]用多聚赖氨酸来包被PLA聚合物，明显增加支架对细胞的吸附力。刘彦春等[12]选择卵磷脂和多聚赖氨酸共同包埋PGA加PLA，也显著提高了支架的亲水性和细胞吸附力。我们使用乙醇和20%FBS DMEM两步预湿法，结果发现FB种植4 h即黏附于支架上，2 d已在支架上生长良好，PLGA的亲水性和细胞吸附力显著增强。第二，可控生物降解性。PLGA的酯键可水解，而且通过控制聚合物的分子量及其组成，降解速度可在几周到几年的范围内调控，其降解产物乳酸、乙醇酸等无毒副反应。因此聚 α -羟基酸类聚酯PLGA是首选的人工合成高分子ECM替代材料。我们在实验中还发现PLGA在细胞培养过程中逐渐降解，由FB分泌的胶原纤维取而代之，继而形成FB-ECM统一体，完全模拟了FB的在体生长环境。第三，基质材料具有三维立体多孔结构，可加工成高孔隙率海绵状结构。本实验用的PLGA孔隙率达85%以上，孔径200~300 μm ，与人体真皮层结构非常相似。这种泡沫内各孔呈内连续性的结构具有极高的面积体积比，可提供宽大的表面积和适宜的空间，有利于细胞黏附生长，ECM沉积，营养和氧气进入，代谢产物排出，从而保证细胞获得足够养料和及时排放废物[13]。

在研究中，我们采用了RCCS系统，该技术通过模拟微重力环境，能使培养物始终处于悬浮状态而又避免了较大的剪切力和气泡的产生，使气体、营养成分和代谢废物均匀扩散。它在软骨细胞、成骨细胞、平滑肌细胞等多种细胞的三维培养中获得了良好的结果[14][15][16]。与静止培养体系相比，RCCS有促进成纤维细胞

在聚乙醇酸纤维上吸附、均匀分布增殖以及功能表达的作用。在该实验中也发现，经RCCS培养后，支架材料上的细胞数量明显增加，分布更均匀，功能增强[17]。

本组在长达 24周的移植过程中，未观察到裸鼠排斥征象及感染或炎症过程，亦无变性坏死现象，在电镜下可观察到植入物内同时存在纤维细胞和成纤维细胞，且成纤维细胞内可见丰富的粗面内质网，说明植入物内的成纤维细胞仍保持合成和分泌胶原蛋白的能力。

另外，我们注意到，实验组，第4、8、16、24周样品的组织学变化不太明显，其原因可能有以下几个方面：1支架材料提供的空间有限，而细胞生长迅速，达到饱和状态后，其数量便不会随时间而相应地增加；2细胞间的相互抑制，细胞自身的凋亡使细胞数量以及其分泌胶原的量随时间的变化不明显；3支架材料自身的毒性影响，PLGA随着时间的增加而逐渐降解，在降解过程中的产物对细胞的生长会有一定的影响；4实验的误差，染色技术等原因。

我们应用组织工程方法成功构建了瘢痕疙瘩动物模型，为进一步开展FB细胞的功能研究及有效药物的筛选，提供了一个广阔的空间。另外，由于本实验中使用PLGA高分子材料作为支架建立了FB三维培养体系，将瘢痕来源的FB在体外与ECM构成一个整体，在模拟瘢痕组织在体环境中研究FB的各种生物学特性，结果稳定、重复性好，为进一步探讨瘢痕形成的机制奠定了一个较好的实验模型。

参考文献：

- [1]鲁峰, 高建华, 黎小间. 病理性瘢痕和正常皮肤中成纤维细胞间缝隙连接通讯的差异[J]. 解放军医学杂志, 2000, 15(2): 150-2.
- Lu F, Gao JH, Li XJ. Differences between the gap junctional communication function of fibroblast derived from pathological scars and normal skin[J]. Med J Chin PLA, 2000, 15(2): 150-2.
- [2]Luo S, Benathan M, Raffoul W, et al. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1): 87-96.
- [3]Zoppi RA, Ciontani S, Duek EAR, et al. Porous poly(L-lactide) films obtained by immersion precipitation process: morphology, Phase separation and culture of VERO cell[J]. Polymer, 1999, 40: 3275-89.
- [4]Peretti GM, Randolph MA, Villa MT, et al. Cell-based tissue-engineered allogeneic implant for cartilage repair[J]. Tissue Eng, 2000, 6(5): 567-76.
- [5]Shea LD, Wang D, Franceschi RT, et al. Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds[J]. Tissue Eng, 2000, 6(6): 605-17.
- [6]Liu K, Yang Y, Mansbridge J. Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression[J]. Tissue Eng, 2000, 6(5): 539-54.
- [7]Sjiki T, Iwata H, Peak HJ, et al. Transmission electron microscopic study of hepatocytes in bioartificial liver[J]. Tissue Eng, 2000, 6(6): 627-640.
- [8]Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16: 224-30.
- [9]郑磊, 王前, 裴国献, 等. 可降解聚合物在骨组织工程中的应用进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(3): 175-80.
- Zheng L, Wang Q, Pei GX, et al. Development of biodegradable polymer scaffolds for bone tissue engineering[J]. Chin J Rep Reconstr Surg, 2000, 14(3): 175-80.
- [10]Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, et al. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams[J]. Polymer, 1994, 35: 1068-77.

[11]Puelacher WC, Wissler J, Vacanti CA, et al. Temporomandibular joint disc replacement made by tissue engineered growth of cartilage[J]. J Oral Maxillofac Surg, 1994, 52(11): 1172-7.

[12]刘彦春, 王炜, 曹谊林, 等. 卵磷脂、多聚赖氨酸和PLA包埋PGA与软骨细胞体外培养的实验研究[J]. 实用美容整形外科杂志, 1997, 8: 225-7.

Liu YC, Wang W, Cao YL, et al. The culture of chondrocyte seeding onto PLA coated PGA, lecithin and poly-L-lysine[J]. Prac Orthop Surg J, 1997, 8: 225-7.

[13]Shasti VP, Martin I, Langer R. Macroporous polymer foams by hydrocarbon templating[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(5): 1970-5.

[14]Vunjak Novakovic G, Martin I, Obradovic B, et al. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineering cartilage[J]. J Orthop Res, 1999, 17(1): 130-8.

[15]Granet C, Laroche N, Vico L, et al. Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions[J]. Med Biol Eng, 1998, 36(4): 513-9.

[16]Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, et al. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices[J]. Biotechnol Biol Eng, 1998, 57(1): 46-54.

[17]熊猛, 艾玉峰, 王潘勇, 等. 采用组织工程方法体外构建血管模型的初步实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(2): 109-12

Xiong M, Ai YF, Wang PY, et al. Reconstruction of tissue engineered vascular model in vitro[J]. Chin J Reparation Reconstr Surg, 2001, 15(2): 109-12.