

细胞外基质在皮肤组织创面修复中的研究进展

刘青武 何秀娟 张金超 林 燕 李 萍

摘 要 人类皮肤细胞外基质在皮肤创面修复中起着重要作用,本文对近年来有关细胞外基质在皮肤创伤方面的研究进展分类综述,脱细胞细胞外基质材料研究最广,人类、动物、植物等多种来源的细胞外基质都已运用到创面修复的实验研究之中,但对于临床使用来说,细胞外基质仍然还需要进一步研究推广。

关键词 细胞外基质 皮肤 创面修复 研究进展

中图分类号 R75

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.006

人类皮肤细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是由细胞合成并分泌到细胞外,分布在细胞表面或细胞之间的大分子物质,主要是水、蛋白质、蛋白聚糖和多糖。ECM 支持并连接组织结构,调节组织的生长和细胞的生理活动,其在机体发育、组织动态平衡及创面修复中起着重要作用。为便于了解 ECM 用于皮肤创面修复治疗的研究现状,现将近年研究进展综述如下。

一、ECM 的结构和作用

1. ECM 的结构:ECM 是由纤维蛋白和基质所构成的复杂三维网状结构,纤维蛋白主要有胶原蛋白、弹性蛋白和纤维粘连蛋白,胶原蛋白是细胞外基质中主要的蛋白质,Ⅰ~Ⅲ型胶原蛋白含量最丰富,Ⅰ型胶原具有很强的抗张强度,Ⅱ型胶原主要分布于软骨中,Ⅲ型胶原形成细微的胶原纤维网,广泛分布于疏松结缔组织。纤维蛋白将细胞粘连在一起构成组织,并提供细胞外网架,维持细胞形态。而基质成分主要包括蛋白聚糖和糖胺聚糖,在纤维蛋白的周围形成凝胶状物质,参与细胞间及细胞与 ECM 的相互作用,对细胞活性有一定影响^[1]。

2. ECM 的作用:皮肤作为机体屏障的能力,主要由维持皮肤连续性和完整性并在受伤后修复皮肤的细胞决定。皮肤修复依赖于多种细胞信号转导及细胞的功能活动,涉及多种调节,包括生长因子、细胞因子、基质金属蛋白酶、细胞受体和 ECM 成分等。ECM

作为皮肤细胞生存的微环境,不仅对组织细胞起支持保护和营养作用,还与细胞的增殖、分化、代谢、识别、黏着及迁移等基本生命活动密切相关。ECM 影响着干细胞/祖细胞的细胞极性、屏障功能及其微环境,以适应细胞间通讯、细胞迁移等不同需求。ECM 组分中的蛋白质家族可以相互作用,比如,纤维粘连蛋白具有与其他蛋白质结合的位点,而诱导细胞内信号通路及细胞功能的改变。在急性皮肤创伤时,胶原蛋白、蛋白聚糖和糖胺聚糖取代临时 ECM,参与肉芽组织的形成,大量 ECM 的聚集,刺激表皮细胞迁移,促进伤口再表皮化^[2]。ECM 的组分可调节生长因子的释放、血管再生、组织病理改变和炎性应答等,对于机体修复和再生有非常重要的作用,是决定修复质量的关键因素之一。

在广泛的烧伤及其他全层皮肤伤口中,如糖尿病溃疡、严重烧伤和莫氏手术治疗恶性肿瘤等,往往涉及皮肤移植,比如自体、同种异体、异种皮肤移植物等。但由于自体皮肤有限,移植后产生继发缺损、瘢痕,异体移植物免疫反应以及各种疾病风险等缺陷,引起了临床对更先进皮肤替代品的需求。ECM 可来源于人体、动物(牛、猪等)、植物等,这些材料被称为生物支架^[3]。随着基因工程、组织工程的迅速发展,利用基因技术、组织工程皮肤技术将 ECM 用于修复全层皮肤创口,已经成为创伤领域的研究热点。

二、脱细胞组织或器官来源的 ECM

脱细胞组织或器官来源的 ECM 的机械结构及生物功能,与天然组织非常相似,而脱细胞的目的就是去除潜在的免疫应答的细胞组分,为宿主细胞和血管的生长,提供良好生物相容性的生物支架^[4]。因此,脱细胞生物材料可更好的刺激局部环境修复组织,无需基于细胞疗法的监管和科学挑战。目前组织或器

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81774328,81774312,81804093);北京市自然科学基金资助项目(7184216)

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所(刘青武、何秀娟、张金超、林燕、李萍);100029 北京中医药大学(刘青武、李萍)

通讯作者:李萍,博士生导师,电子信箱:liping411@126.com

官脱细胞的方法包括化学法、酶法和机械法,化学法是用表面活性剂或酸碱破坏细胞形态而去细胞,机械法通过冻融、超临界二氧化碳或提供高静水压的方式使组织细胞膨胀破裂,留下基本上由 ECM 成分组成的材料^[5]。不同的脱细胞方法决定了 ECM 保留成分及数量的不同,影响 ECM 的生物学活性。但普通化学法、酶法和机械法脱细胞的方法存在着遗传物质(DNA)去除不完全或 ECM 成分损失或生物活性受损等缺点^[6]。郭宝林等^[7]使用磷脂酶 A₂ - 脱氧胆酸钠(phospholipase A₂ - sodium deoxycholate, PLA₂ - SDC)复合脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)、核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)的去细胞方法,制备的 ECM 无遗传物质保留,而且胶原、胶原层连蛋白和纤连蛋白等保存良好,该方法的优点是操作时间短,ECM 成分暴露时间短,对 ECM 的生物活性影响小,这种改良的酶脱细胞法为 ECM 支架的提取提供了新的思路。

1. 人胎盘来源的 ECM:人胎盘含有丰富的 ECM 成分和保存完好的多种内源性生长因子,如胰岛素样生长因子-1、表皮生长因子、血小板衍生长因子、成纤维细胞生长因子-2、血管内皮生长因子和转化生长因子- β 等,这些细胞因子通过胎盘传递给胎儿,在促进胎儿发育中起重要作用。此外,胎盘的抗炎、抗菌、低免疫原性、抗痉挛和伤口保护等生物学特性,使其成为治疗烧伤皮肤、腿部溃疡和眼科疾病的理想材料。

Choi 等^[8]利用人胎盘制造多孔的脱细胞 ECM 片,其中含有来自胎盘的各种保存完好的蛋白质和生物活性分子,并将其用于治疗兔全层皮肤伤口。在早期阶段,ECM 片有效地吸收伤口渗出物,并紧密附着在伤口表面。植入后数周,伤口完全闭合,表皮细胞排列整齐,表皮和真皮的双层结构恢复,并形成新的毛囊和微血管。总体而言,ECM 片是具有与正常皮肤组织相似的真皮替代物,人胎盘衍生的 ECM 片提供有利于细胞生长和分化的微环境,从而促进全层伤口的愈合。Rameshbabu 等^[9]在胎盘 ECM 中加入丝素蛋白,改进其机械性能,制成的多孔复合 ECM 海绵。在体外实验中,多孔复合 ECM 海绵能促进人包皮成纤维细胞、人表皮角质形成细胞和人羊膜来源的干细胞的黏附、渗透、增殖和迁移。此外,在大鼠全层伤口模型中植入多孔复合 ECM 海绵,明显的促进血管生成,增强肉芽组织形成和早期再上皮化,改善表皮-真皮连接的愈合。另外,皮下植入的多孔复合

ECM 海绵,对宿主没有严重的免疫应答。说明具有优异物理机械性质和细胞因子装饰的多孔复合 ECM 海绵,可以是全厚度皮肤伤口的合适皮肤替代物。

2. 胆囊来源 ECM:胆囊细胞来源的 ECM 是一种新型的无细胞蛋白质可降解生物材料,该基质富含胶原蛋白。胆囊源性 ECM 被证明可用于胃肠切除术和吻合术,还具有类似于心脏瓣膜的微结构,支持瓣膜内皮细胞和间质细胞的增殖。

Poonam 等^[10]从猪胆囊中提取了胆囊源性 ECM,并比较了其与市场售胶原片,在大鼠全厚皮肤创面的愈合潜力,发现胆囊源性 ECM 通过增加切除伤口中的细胞增殖、新血管形成、胶原合成及上皮形成,增强伤口愈合活性,对大鼠全层皮肤创伤的修复效果优于市售胶原片。Shakya 等^[11]使用阴离子生物洗涤剂制备源自牛脱细胞胆囊 ECM,并发现牛脱细胞胆囊 ECM 比空白组创面更显著的促进伤口收缩、促进表皮及新血管、纤维组织的增生,再次证明胆囊源性 ECM 具有修复全层皮肤伤口的潜力。

3. 猪皮来源 ECM:郭宝林等^[7]将脱细胞猪皮 ECM 用于小鼠全层皮肤损伤模型,经组织学检查发现生理盐水组小鼠第 28 天时,创口愈合,而猪皮 ECM 创口在 14 天时愈合,猪皮 ECM 组创伤愈合速度有显著提高。证实了 ECM 在创伤愈合中的促进作用,脱细胞猪皮 ECM 也可以作为一种良好的皮肤支架材料。

4. 绵羊膀胱来源 ECM:Zihayat 等^[12]从绵羊膀胱中提取 ECM,观察了绵羊膀胱 ECM 在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠创面愈合中的作用,并与外用凡士林及对照组比较,ECM 处理的动物创面面积和创面愈合率均有显著改善($P < 0.01$),ECM 处理的伤口上皮化得更快。这与绵羊膀胱 ECM 所含的透明质酸(HA)、胶原蛋白、弹性蛋白和生长因子,增加了角质形成细胞的增殖和迁移而促进再上皮化有关,但需要进一步的研究来阐明 ECM 伤口愈合的确切机制。

5. 胎牛来源 ECM:Neill 等^[3]用胎牛胶原(bovine fetal collagen, BFC)治疗 9 例难愈性全层皮肤伤口的患者,并观察了植入 BFC 后取得的活检标本中 BFC 的生物反应。结果在植入 2 周后,BFC 中见成纤维细胞增生、新血管形成及疏松的嗜酸、淋巴细胞浸润,未见中性粒细胞。随着植入时间的增长,在 27 天时,BFC 中的成纤维细胞数量明显增多。患者移植 BFC 治疗时间最长的是 9 个月,BFC 的胶原结构已经与正常胶原类似,移植区域未见明显瘢痕。但与其他患者

不同的是,来自 1 例患有凝血功能障碍的肝衰竭患者的移植,由于受患者机体环境的影响,在 20 天时可见急性炎症反应。说明 BFC 在大多数情况下,对宿主的组织耐受性较好,允许炎症细胞的迁移,支持肉芽组织的形成,有助于慢性伤口的愈合,但宿主和伤口因素也可能通过尚不清楚的机制导致 BFC 的功能障碍。所以,Neill 等^[3]建议在临床使用 BFC 时,BFC 组织学的特征应当由参与患者创面治疗的病理学专家评定。

三、ECM 作为干细胞载体

干细胞疗法提供了一种有希望的新技术来促进伤口愈合,但干细胞移植后,常常出现死亡或从伤口部位迁移,大大降低了治疗效果。而局部应用具有抗氧化作用的化合物,可显著改善伤口愈合过程并保护组织免受氧化损伤。脱细胞 ECM 可能是一种抗氧化治疗方法,可以预防移植的间充质干细胞的氧化损伤,对伤口愈合具有良好的效果^[13]。

猪小肠黏膜下层细胞外基质作为一种运载工具,具有天然的 ECM 成分,包括其胶原纤维网络,可为干细胞提供了合适的生存环境。Lam 等^[14]使用源自猪小肠黏膜下层的 ECM 贴片材料将脂肪来源的干细胞引入小鼠皮肤切口。并使用生物发光体内成像所证实,单独移植至皮肤伤口的干细胞在移植后不能存活,相反,使用贴片进行递送,则使干细胞增殖和存活显著增加,并且与未治疗的伤口比较,在贴片上用于细胞处理的伤口中纤维化的区域(表明瘢痕形成)显著减少。由于贴片是一种非侵入性地提供干细胞治疗的方法,可以进一步尝试与各种干细胞联合治疗其他类型的伤口。

四、ECM 水凝胶

人类脂肪组织来源丰富,并含有丰富的 ECM 蛋白和可溶性生长因子,故常用作 ECM 来源。

Kim 等^[15]报告了基于人脂肪来源的可溶性 ECM (soluble ECM, sECM) 和甲基纤维素 (methylcellulose, MC) 形成的热敏水凝胶,可通过注射以递送干细胞。将提取的 sECM 与 MC 混合,可以改善热敏水凝胶的机械性能。sECM - MC 水凝胶的特征在于 sECM 含量、流变性质和嵌入干细胞的能力。在小鼠全厚皮肤伤口中单次注射干细胞水凝胶后,伤口通过重新上皮化和新生血管化而迅速愈合,瘢痕形成最小。表明 sECM - MC 水凝胶是一种很有前途的干细胞递送和组织再生的可注射载体,代表了水凝胶可以作为一种新型的生物支架方法。Zhu 等^[16]通过将透明质酸和

羧化壳聚糖加入到人类胶原中制成水凝胶制剂,发现水凝胶促进了小鼠成纤维细胞的黏附、增殖和迁移,有利于促进伤口愈合。其表现出良好的皮肤修复、药物递送的潜力。但关于水凝胶刺激伤口愈合的机制,仍需要进一步研究。

五、大豆蛋白/纤维素纳米纤维支架仿制的皮肤 ECM

模拟 ECM 的生物支架,具有能够支持参与再生的细胞生长的生物活性分子。大豆蛋白是从大豆中提取的一种膳食蛋白,具有类似于人体组织 ECM 蛋白的生物活性肽,这些 ECM 模拟肽可以促进细胞黏附、增殖和迁移,支持组织再生。大豆蛋白含有植物雌激素,可作为雌性激素的结构和功能类似物。大豆蛋白中的生物活性肽可增加皮肤 ECM 合成,促进创面再上皮化^[17]。大豆植物雌激素通过雌激素受体介导的信号通路,加速愈合过程,它还具有抗细菌、抗炎和抗氧化特性。大豆蛋白质和植物雌激素的口服摄入,可加速老年女性和烧伤患者的皮肤再生^[18]。

Ahn 等^[19]利用旋转喷射纺丝技术,开发一种由醋酸纤维素 (cellulose acetate, CA) 和大豆蛋白水解物 (soy protein hydrolysate, SPH) 组成的完全植物纳米纤维敷料。纺丝纳米纤维成功地模拟了天然皮肤 ECM 的理化性质,并表现出高保水性能。由于其非动物来源,可避免动物源性蛋白的免疫原性、疾病传播和病原体污染等缺点。体外实验表明,与聚己内酯和 CA 纳米纤维比较,CA/SPH 纳米纤维可促进成纤维细胞的增殖、生长、迁移、浸润和整合素 $\beta 1$ 的表达,并表现出低细胞毒性。在体内,CA/SPH 纳米纤维比 CA 纳米纤维或未处理的对照组比较,能加速伤口愈合和组织再生,并以类似于其他纤维支架的方式减少瘢痕形成。这些结果证实了 CA/SPH 纳米纤维作为一种新型伤口敷料的愈合潜力,来源于植物基质的可再生支架可能成为下一代可再生敷料的研究方向。

六、其 他

1. 胎盘生长因子 (PlGF - 2) 序列:生长因子是一类通过与细胞膜受体结合,调节细胞生长和功能的多肽类物质。通过增强生长因子与细胞外基质的结合,可促进创伤愈合。

Martino 等^[20]发现了位于胎盘生长因子 (placental growth factor, PlGF - 2) 上的一个包含 22 个氨基酸的区域,能增强 PlGF - 2 与 ECM 蛋白质的结合力。Martino 将该结构域与血管内皮生长因子 - A、血小板

衍生生长因子-BB和骨形态发生蛋白-2融合而成的工程化生长因子对比未经修饰的生长因子显示了更强的ECM亲和力,更快的促进了新血管形成和肉芽组织的生长,促进伤口愈合,从而大大提高了生长因子对组织损伤修复的能力。

2. 缝隙连接蛋白43(connexin, Cx43):缝隙连接在1967年首次在肝细胞中被描述。目前,在人和啮齿动物皮肤中已经鉴定出多达10个不同的连接蛋白家族成员。用Cx43反义寡脱氧核苷酸处理的受伤和烧伤的小鼠皮肤表现出加速的伤口愈合,增强的角质形成细胞增殖以及成纤维细胞的迁移增加和更显著的胶原沉积,这提示抑制连接蛋白信号转导是能促进创伤愈合的^[21]。Cogliati等^[22]利用杂合子Cx43敲除小鼠,发现Cx43缺乏可促进真皮成纤维细胞的增殖和活化,从而促进再上皮化和创面愈合,促进细胞外基质重塑因子的表达。这些数据再次证实了Cx43在皮肤创伤愈合中可能是一个新的治疗靶点。

综上所述,ECM含有多种有益于细胞增殖的成分,在皮肤创面修复过程中具有重要作用,目前通过基因工程,特别是组织工程皮肤技术,已能够将同种、异种或植物成分ECM用于人或动物的创面修复,并显示了较好的修复效果。但是,关于ECM修复人的皮肤创面的研究仍较少,需要广大研究者深入探索。

参考文献

- 1 Ayerst BI, Merry CLR, Day AJ. The good the bad and the ugly of glycosaminoglycans in tissue engineering applications[J]. *Pharmaceuticals*, 2017,10(2):1-53
- 2 Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2014,22(3):313-325
- 3 Neill JS, Lineaweaver WC. Tissue response to bovine fetal collagen extracellular matrix in full-thickness skin wounds[J]. *Am J Clin Pathol*, 2013,140(2):248-252
- 4 Moore MA, Samsell B, Wallis G, et al. Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review[J]. *Cell Tissue Bank*, 2015,16(2):249-259
- 5 Xing Q, Yates K, Tahtinen M, et al. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015,21(1):77-87
- 6 Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications[J]. *Biomed Res Int*, 2017,2017:1-13
- 7 郭宝林,陈志强,王术勇,等.猪皮细胞外基质促进创伤小鼠再表皮化的实验研究[J]. *军事医学*,2018,42(3):169-175,181
- 8 Choi JS, Kim JD, Yoon HS, et al. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013,19(3-4):329-339

- 9 Rameshbabu AP, Bankoti K, Datta S, et al. Silk sponges ornamented with a placenta-derived extracellular matrix augment full-thickness cutaneous wound healing by stimulating neovascularization and cellular migration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018,10(20):16977-16991
- 10 Poonam, Sharmaa, Naveen, et al. Porcine cholecyst derived extracellular matrix (p-CEM) for reconstruction of full thickness skin wounds in rats[J]. *Wound Med*, 2015,10(11):23-31
- 11 Shakya P, Sharma AK, Kumar N, et al. Bubaline cholecyst derived extracellular matrix for reconstruction of full thickness skin wounds in rats[J]. *Scientifica*, 2016,2016:1-13
- 12 Zihayat B, Khodadadi A, Torabi M, et al. Wound healing activity of sheep's bladder extracellular matrix in diabetic rats[J]. *Biomed Engineering: Applications, Basis and Communications*, 2018,30(2):1850015
- 13 Liu X, Zhou L, Chen X, et al. Culturing on decellularized extracellular matrix enhances antioxidant properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016,61:437-448
- 14 Lam MT, Nauta A, Meyer NP, et al. Effective delivery of stem cells using an extracellular matrix patch results in increased cell survival and proliferation and reduced scarring in skin wound healing[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013,19(5-6):738-747
- 15 Kim EJ, Choi JS, Kim JS, et al. Injectable and thermosensitive soluble extracellular matrix and methylcellulose hydrogels for stem cell delivery in skin wound[J]. *Biomacromolecules*, 2015,17(1):4-11
- 16 Zhu C, Lei H, Fan D, et al. Novel enzymatic crosslinked hydrogels that mimic extracellular matrix for skin wound healing[J]. *J Mater Sci*, 2018,53(8):5909-5928
- 17 Harel YE, Gerstenhaber JA, Brodsky R, et al. Electrospun soy protein scaffolds as wound dressings: enhanced reepithelialization in a porcine model of wound healing[J]. *Wound Med*, 2014,5:9-15
- 18 Babajafari S, Akhlaghi M, Mazloomi SM, et al. The effect of isolated soy protein adjunctive with flaxseed oil on markers of inflammation, oxidative stress, acute phase proteins, and wound healing of burn patients; a randomized clinical trial[J]. *Burns*, 2018,44(1):140-149
- 19 Ahn S, Chantre CO, Gannon AR, et al. Soy protein/cellulose nanofiber scaffolds mimicking skin extracellular matrix for enhanced wound healing[J]. *Adv Healthc Mater*, 2018,7(9):e1701175
- 20 Martino MM, Briquez PS, Güç E, et al. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing[J]. *Science*, 2014,343(6173):885-888
- 21 Mori R, Power KT, Wang CM, et al. Acute downregulation of connexin 43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration[J]. *J Cell Sci*, 2006,119(Pt 24):5193-5203
- 22 Cogliati B, Vinken M, Silva TC, et al. Connexin 43 deficiency accelerates skin wound healing and extracellular matrix remodeling in mice[J]. *J Dermatol Sci*, 2015,79(1):50-56

(收稿日期:2018-12-16)

(修回日期:2019-01-09)