

内皮祖细胞与组织工程皮肤构建

李 洁 李 欣 蒋如如 阎春生 哈小琴

摘 要 细胞生物学、分子生物学和材料科学的发展,推动了仿生组织工程皮肤的科学化和简单化,为了提高组织工程皮肤的安全性、耐久性、弹性、生物相容性和临床疗效,一些功能强大的种子细胞已经在皮肤修复中得到了应用,尤其是内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),内皮祖细胞可以通过成人外周血和脐带血从受体体内无创供应,也可以从诱导的多能干细胞中提取,可分化为组织内皮细胞,显示出了治疗血管化的巨大潜力。机体的各种损伤导致皮肤缺损或先天性畸形的修复,往往需要采取各种类型的组织移植,应用皮瓣的转移或游离移植是其最主要的措施之一。本综述主要阐述了内皮祖细胞在改善皮瓣血运状况中的研究进展以及其在组织工程皮肤构建中的意义。

关键词 内皮祖细胞 皮瓣 组织工程皮肤

中图分类号 R319

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.006

1963 年,首次报道了血液中可能存在内皮细胞,而后在心脏移植患者的冠状动脉内壁发现了受体来源的内皮细胞,提示受体血液中的内皮细胞定居于移植体并参与血管壁的构建,再次证明移植体表面存在内皮细胞,而这些内皮细胞只可能来源于血液。1997 年,Asahara 等^[1]首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞,并将其命名为血管内皮祖细胞。内皮祖细胞来源于骨髓,它们进入循环血,在血管移植体上分化为内皮细胞^[2]。内皮祖细胞是在缺氧等病理条件下从骨髓中募集的,在缺血组织的新生血管形成中起着至关重要的作用。

目前已经建立了两种主要的 EPCs 亚型:所谓的“早期”EPCs(随后称为早期 EPCs)和后期衍生的 EPCs(晚期 EPCs)^[3]。在体外培养过程中,根据其生物学特性和外观可对其进行分类。“早期”EPCs 出现在外周血来源的单核细胞在内皮细胞特异性培养基中培养后不到 1 周,而在 2~3 周后可以发现晚期的 EPCs。晚期 EPCs 被认为主要是通过其分化成熟内皮细胞的能力直接参与新生血管的形成,而早期 EPCs 将各种血管生成因子表达为内源性货物,以旁

分泌的方式促进血管生成。

一、内皮祖细胞在改善皮瓣血运状况中的研究进展

作为最大的器官,皮肤覆盖整个身体的外部,占总体重的 8% 左右。由于其直接暴露于潜在有害的微生物、热、机械和化学损伤,皮肤的损失可能由于多种原因而发生,包括紊乱、急性创伤、慢性伤口甚至手术干预。皮瓣的愈合是一个复杂的过程,主要涉及多种细胞、生长因子、炎性介质等,由多种因子相互交错、重叠而有序地完成,整个过程要经过炎症反应期、细胞增殖期与组织重建期。血液供应的不足,将直接影响愈合的时间及质量,充足的血液供应能够加速组织的新陈代谢,改善组织循环,修复组织缺血、缺氧的状态,而充足的血液供应来自血管的再生和重建,因此血管再生在皮瓣修复过程中是治疗的关键。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一类多肽生长因子,其作为细胞有丝分裂源,可促进细胞的增殖、分化,且在机体的各种损伤中起着重要的修复作用^[4]。

相关研究表明,bFGF 可诱导血管内皮细胞增殖、加快细胞迁移速率,促进内皮细胞形成管腔,改善组织的血液循环,增加供氧量,加速组织的新陈代谢,进而缩短愈合时间^[5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是促进血管内皮细胞有丝分裂的细胞因子,能促进血管内皮细胞的增殖、变形、移动,使其进入胶原,形成新生血管^[6];增加微静脉、小静脉通透性,有利于蛋白质大分子外渗,部分外渗的蛋白质可形成纤维蛋白原,支持内皮细胞生

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2015CB755400)

作者单位:730030 兰州大学公共卫生学院(李洁、阎春生、哈小琴);730050 兰州,解放军联勤保障部队第 940 医院(李洁、李欣、蒋如如、哈小琴);730050 兰州,甘肃省干细胞与基因药物重点实验室(李洁、李欣、蒋如如);730050 兰州,甘肃中医药大学临床医学院(李欣、蒋如如)

通讯作者:阎春生,副教授,硕士生导师,电子信箱:yanchsh@lzu.edu.cn;哈小琴,主任医师,电子信箱:haxiaoqin2013@163.com

长,从而促进血管生成及生长。在促进血管再生过程中 VEGF 与 bFGF 具有协同作用,其机制在于皮瓣移植后吻合区处于缺血状态,缺血诱导 bFGF 分泌,其作用于血管内皮后,调节 VEGF 基因表达,进而增加 VEGF 的产生。两者协同,共同诱导血管内皮细胞的增殖、分化、迁移的过程,从而起到修复血管的作用^[7]。

现如今,已经在组织中成功建立了皮瓣预制技术,这项技术可以通过构造显微外科血管环在体内形成缺失组织的内在血管,可以通过显微外科手术将组织移动到缺陷中。但在文献中,用皮肤覆盖的工程化组织的组合还没有得到广泛报道。显微外科手术现在是日常临床生活的重要组成部分,可以在移植、再植和皮瓣手术中获得优异的结果,但其在优化、修改和创新仍然是当代社会的重要问题。

迄今为止,显微外科研究的不可替代的主力仍是动物模型,因为在大鼠中进行的实验性皮瓣模型适用于涉及生理学、神经再支配以及皮瓣的设计和功能的的研究,而它们能提供与临床情况精确相似的条件。文献中的实验模型设计的数量与各种组织瓣相关,例如包含皮肤、肌肉、骨骼或神经的组织瓣。另外,已经出现了多种所谓的复合皮瓣,其包括一种以上组织结构的转移,例如肌皮瓣、骨肌瓣、神经皮肤瓣、筋膜皮肤瓣、神经肌肉皮肤或骨肌皮瓣等^[8]。由于这些技术受到血管系统解剖学的限制,外科医生开始预制皮瓣:将确定组织的血液供应输送到自体显微手术产生的椎弓根,以便随后将其作为游离皮瓣转移。有研究建立了一个包含生物材料和全层皮肤覆盖的预制复合皮瓣的实验模型来研究支架预制、全层皮肤移植覆盖和组织自由移植,此外,还研究了在受体部位转移的复合皮瓣的功能完整性,最终成功建立了用于预制复合皮瓣外科转移的临床模型^[9]。同时,该实验证明,可持续优化移植皮瓣活力的策略可能是有效的,即在今后的研究中可对即将到来的缺血状态进行预处理或进行延迟。另外,在组织由支架到皮肤是否代表了血管形成过程的恶化这一问题中,研究人员认为支架和皮肤覆盖之间的接触可能起决定性作用。然而,支架或者皮肤接触是动物术后活动和活动过程中的伴随现象。尽管如此,在未来的实验中可以尝试更为细致的固定,如组织胶或其他方式的缝合,以最大限度地减少这种问题。就血管形成而言,皮瓣预制涉及一定程度的不可预测性,因此需要继续成为未来实验研究的重点,直到它能够更成功地整合到临床常规

的标准中去。

EPCs 已被用于改善缺血皮瓣的血运重建,但效果不佳。体外冲击波疗法 (extracorporeal shock - wave therapy, ESWT) 是一种新的治疗方法,它是物理学和医学相结合的一种新技术,因其基本无不良反应被称为是骨科疾病的绿色疗法。ESWT 可有效治疗骨折不愈合、肌腱炎和骨无菌性坏死,还被用于治疗心脏病学中的心绞痛和缺血性心力衰竭等缺血性疾病。ESWT 是一种有前景的非侵入性血管生成方式,虽然冲击波治疗的确切机制尚不确定,但一些研究表明,冲击波治疗可以显著上调趋化因子和血管生成细胞因子的表达,还可以通过上调内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和 VEGF 的表达以及转化生长因子 - β (transforming growth factor - beta, TGF - β) 的表达来促进糖尿病伤口愈合并避免大鼠游离皮瓣坏死^[10]。有研究对 EPCs 植入联合 ESWT 对动物模型中缺血性皮瓣存活的复合作用进行了探讨,在大鼠背部制作缺血性皮瓣并相应地进行治疗,术后定期测量皮瓣的血流量,比较皮瓣成活率^[11]。结果显示,在改善大鼠缺血性皮瓣的存活中,EPC 和 ESWT 的联合治疗优于单独的 EPC 或 ESWT 处理。单独使用 EPC 或 ESWT 处理可以为长宽比低于 2:1 的大鼠皮瓣提供保护,而使用 EPC 和 ESWT 的双重治疗对于大鼠中长宽比高于 2:1 的皮瓣是有效的。然而,该结果基于动物模型,人的真皮结构与大鼠不同,因此该技术的临床应用还有待进一步研究。

二、内皮祖细胞在组织工程皮肤构建中的意义

组织工程皮肤替代品是治疗急性和慢性皮肤伤口的合理治疗选择。自 1975 年人类表皮角质形成细胞的成功分离和培养以来,组织工程皮肤 (tissue - engineered skin, TES) 已经从表皮替代品发展到含有不同种子细胞的全层皮肤^[12]。根据其解剖结构,皮肤替代产品可分为细胞上皮自体移植、工程化真皮替代物和工程化的真皮 - 表皮复合替代物。所有这些产品已成为临床治疗大面积全层皮肤缺损的前瞻性措施。

由于内皮源性细胞直接参与血管形成,因此,在 TES 等效物中,传递内皮源性细胞仍然是增强新生血管形成最系统的方法。此外,不同种子细胞与 EPCs 之间的相互作用可能通过血管生成和 (或) 血管发生促进 TES 的血管化。通过在体外共培养胶原海绵中的真皮成纤维细胞和 EPCs,形成具有分支结构的复杂血管网络。在后续的研究中证实成纤维细胞可

以相互作用,并支持 EPCs 的迁移、生存和网络形成^[13]。而有研究表明,含有真皮成纤维细胞的无支架双层 TES 与真皮微血管 EPCs 在培养多天后可以形成毛细血管样结构^[14]。此外,这种血管形成过程与角质形成细胞、成纤维细胞和 ECs 之间的相互作用有关。然而,为了进一步促进 EPCs 的临床应用,需要克服其体外扩增能力有限、免疫原性强等缺点。

当前,不同的实验室和公司正在开发不同的方法,一些人造皮肤等价物已经商业化,许多其他方法也在开发中^[15]。根据 TES 解剖结构的复杂性,其构造可分为单层替代品和双层替代品。在体外培养和扩增人角质形成细胞的基础上,通过各种方式开发了多种自体表皮替代物来替代再上皮化。表皮替代物的应用直接缓解了皮肤活检的不足^[16]。然而,这种培养的上皮自体移植物的临床整合是不可预测的,主要依赖于创面床的情况,而不是最终分化的角质形成细胞。此外,由于缺乏真皮而导致的挛缩力学性能差和发育不良也是表皮替代物的问题。这就对开发真皮替代品提出了进一步的要求。真皮层提供的机械稳定性和弹性可以防止创面收缩和瘢痕增生。对于全层烧伤,必须连续应用真皮当量和表皮当量,以便在应用表皮层前形成合适的营养和免疫环境。大量非细胞化真皮替代物主要由异体真皮基质或合成材料产生,可刺激自体 EPCs 和成纤维细胞向内生长,帮助移植后缺损区域形成真皮结构,而由人类新生儿成纤维细胞组成的一些具有生物活性的真皮替代物自发地显示出血管形成、表皮化以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的形成方面的益处。双层皮肤替代品结合表皮和真皮两层,在组织学上模拟正常皮肤的结构。如果不考虑经济因素,目前与单层产品比较,表皮/真皮复合 TES 是皮肤修复的最佳治疗方案。

在皮肤组织工程中,实质与基质的相互作用对表皮形成过程中组织结构和功能的规划具有指导意义,人们普遍认为成纤维细胞对上皮形态学的诱导作用是通过细胞-细胞相互作用和 ECM 分泌介导的,由于多种种子细胞类型之间的相互作用,表皮/真皮替代物表现出更强的创面闭合和角质化能力。而除了临床上可用的 TES 外,人们还在探索优化的 3D 构建体以修复皮肤组织^[17]。皮肤生物学的最新进展强调了表皮形态发生过程中细胞-细胞相互作用的重要性。特别是皮肤组织工程领域的进步极大地促进了对体外表皮形态发生的认识,从而重建了高度复杂和

创新的 3D 皮肤等效物,模仿人体皮肤的组织结构和功能,包括毛囊、毛细血管网、感觉神经支配、脂肪组织和色素生产^[18]。随着伤口愈合机制的逐步深入,细胞的合理组合及其在创面愈合中的相互作用可能是永久性 TES 构建的出路^[19]。

三、展 望

目前,大多数 TES 只能作为皮肤创伤愈合的临时替代品。缺乏及时的血液供应和免疫排斥反应的激活是阻碍同种异体 TES 永久整合的两个主要问题。有证据表明, TES 中所含的大部分细胞在移植后 1 个月内无法存活^[20]。这种临时性质,无论替代品是可降解的还是必须去除的,都使得 TES 主要用作覆盖物,而不是真正的有机再生器。然而,有理由相信,随着皮肤生物学、材料科学和工程技术的发展, TES 最终将具有与自体皮肤移植相同结构和功能的治疗效果。

参考文献

- Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science (Washington DC), 1997, 275(5302):964-966
- Kalender G, Kornberger A, Lisy M, et al. Kinetics of circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing carotid artery surgery [J]. Therapeut Clin Risk Manage, 2016, 12(14):1841-1847
- Emontzpohl C, Simons D, Kraemer S, et al. Isolation of endothelial progenitor cells from healthy volunteers and their migratory potential influenced by serum samples after cardiac surgery[J]. J Visualiz Exp Jove, 2017, 2017(120):55192
- Huan Z, Lixing Q, Yao S, et al. Basic fibroblast growth factor enhances cell proliferation in the dentate gyrus of neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage[J]. Neurosci Lett, 2018, 673:67-72
- Zbinden A, Browne S, Altiok EI, et al. Multivalent conjugates of basic fibroblast growth factor enhance in vitro proliferation and migration of endothelial cells[J]. Biomater Sci, 2018, 6(5):1076-1083
- Ge Q, Zhang H, Hou J, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms[J]. Mol Med Rep, 2017, 17(1):1667-1675
- Sobolmlejska G, Miziamalarz A, Musiol K, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in children with brain tumours[J]. Adv Clin Exp Med, 2017, 26(4):571-575
- Nicoli F, Orfaniotis G, Lazzeri D, et al. The latissimus dorsi-groin-lymph node compound flap: a comprehensive technique with three features including skin coverage, restoration of motor function, and prevention of upper limb lymphedema[J]. Microsurgery, 2016, 36(8):689-694

(下转第 27 页)

- 13 Kaczmarek M, Lagiedo M, Masztalerz A, *et al.* Concentrations of SP - A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non - small cell lung cancer[J]. Immunobiology, 2018, 223(2): 200 - 209
- 14 曹慧玲,刘师兵,刘晓冬,等. 支气管肺癌黏膜 Cath D、SP - A 和 GLUT - 1 的表达及临床意义[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(3): 70 - 73
- 15 Beck J, Miller MA, Frank C, *et al.* Surfactant protein A and napsin A in the immunohistochemical characterization of canine pulmonary carcinomas: comparison with thyroid transcription factor - 1[J]. Vet Pathol, 2017, 54(5): 767 - 774
- 16 Jin L, Liu Y, Wang X, *et al.* Immunohistochemical analysis and comparison of napsin A, TTF1, SPA and CK7 expression in primary lung adenocarcinoma[J]. Biotech Histochem, 2018, 93(5): 364 - 372
- 17 Kaczmarek M, Lagiedo M, Masztalerz A, *et al.* Concentrations of SP - A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non - small cell lung cancer[J]. Immunobiology, 2018, 223(2): 200 - 209
- 18 Jie L, Li XY, Zhao YQ, *et al.* Genotype - phenotype correlation in Chinese patients with pulmonary mixed type adenocarcinoma: relationship between histologic subtypes, TTF - 1/SP - A expressions and EGFR mutations[J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(3): 176 - 181
- 19 Wang K, Ju Q, Cao J, *et al.* Impact of serum SP - A and SP - D levels on comparison and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta - analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(23): e7083
- 20 Chen F, Lu X, Shu X, *et al.* Predictive value of serum markers for the development of interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis: a comparative and prospective study[J]. Intern Med J, 2015, 45(6): 641 - 647
- 21 Takahashi F, Miura E, Shibukawa K, *et al.* Monitoring with serum SP - A, SP - D, and KL - 6 in a patient with interstitial pneumonia complicated with ANCA - associated glomerulonephritis [J]. CEN Case Rep, 2014, 3(1): 5 - 9
- 22 Bonella F, Costabel U. Biomarkers in connective tissue disease - associated interstitial lung disease[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2014, 35(2): 181 - 200
- 23 Liang S, Li N, Heizhati M, *et al.* What do changes in concentrations of serum surfactant proteins A and D in OSA mean? [J]. Sleep Breath, 2015, 19(3): 955 - 962
- 24 Lu D, Abulimiti A, Wu T, *et al.* Pulmonary surfactant - associated proteins and inflammatory factors in obstructive sleep apnea[J]. Sleep Breath, 2018, 22(1): 99 - 107

(收稿日期:2019 - 01 - 05)

(修回日期:2019 - 03 - 11)

(上接第 19 页)

- 9 Mandlik V, Kehr A, Jiga L, *et al.* Prefabrication and free transfer of a tissue engineered composite flap - an experimental model in the rat[J]. Clin Hemorheol Microcirculat, 2016, 64(3): 319
- 10 Antonic V, Hartmann B, Balks P, *et al.* Extracorporeal shockwave therapy as supplemental therapy for closure of large full thickness defects—Rat full - thickness skin graft model[J]. Wound Med, 2018, 20(3): 1 - 6
- 11 Zhang X, Yan X, Wang C, *et al.* The effect of autologous endothelial progenitor cell transplantation combined with extracorporeal shock - wave therapy on ischemic skin flaps in rats[J]. Cytotherapy, 2014, 16(8): 1098 - 1109
- 12 Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells[J]. Cell, 1975, 6(3): 331 - 343
- 13 Pham PV, Vu NB, Dao TT, *et al.* Production of endothelial progenitor cells from skin fibroblasts by direct reprogramming for clinical usage[J]. In Vitro Cell Deve Biol - Animal, 2017, 53(3): 1 - 10
- 14 Bi H, Jin Y. Current progress of skin tissue engineering: seed cells, bioscaffolds, and construction strategies[J]. Burns Trauma, 2013, 1(2): 63 - 72
- 15 Larouche D, Cantin - Warren L, Desgagné M, *et al.* Improved methods to produce tissue - engineered skin substitutes suitable for the permanent closure of full - thickness skin injuries[J]. BioRes Open Access, 2016, 5(1): 320 - 329
- 16 Ornelas - Flores M, García - López J, Melgarejo - Ramírez Y, *et al.* Implantation of a heterologous dermo - epidermal skin substitute in a patient with deep dermal burn that enhances biomechanical and functional recovery: case report[J]. Burns Open, 2018, 2(3): 144 - 153
- 17 Rademacher F, Simanski M, Gläser R, *et al.* Skin microbiota and human 3D skin models[J]. Exp Dermatol, 2018, 27(5): 489 - 494
- 18 Bhardwaj N, Chouhan D, Mandal BB. Tissue engineered skin and wound healing: current strategies and future directions [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(24): 3455
- 19 Komi DEA, Khomtchouk K, Maria PLS. A review of the contribution of mast cells in wound healing: involved molecular and cellular mechanisms[J]. Cli Rev Allergy Immunol, 2019, 2: 1 - 15
- 20 Boyce ST, Lalley AL. Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care[J]. Burns Trauma, 2018, 6(1): 4

(收稿日期:2019 - 03 - 22)

(修回日期:2019 - 04 - 15)