

# 皮肤诱导再生材料的研究进展与挑战

马 列<sup>1</sup>, 高长有<sup>1</sup>, 李明忠<sup>2</sup>, 白 伦<sup>2</sup>, 沈家骢<sup>1</sup>

(1. 浙江大学高分子科学与工程学系 教育部高分子合成与功能构造重点实验室, 浙江 杭州 310027)

(2. 苏州大学 现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215021)



高长有教授

**摘 要:** 烧伤、机械创伤等导致的皮肤缺损及功能丧失是常见的临床难题之一。介绍了皮肤缺损修复的研究背景和皮肤修复材料的发展历史。通过对国内外原位诱导皮肤再生材料研究现状的分析, 总结了影响皮肤诱导再生材料性能的关键科学问题, 即原位诱导血管化与原位诱导细胞迁移, 并归纳介绍了相应的材料设计与改性方法。最后根据皮肤诱导再生材料存在的不足对未来皮肤诱导再生材料的研究与发展进行了展望。

**关键词:** 生物材料; 皮肤缺损; 诱导再生; 血管化; 细胞迁移

**中图分类号:** R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2010)09-0034-12

## Progress and Challenges of Skin Induced-Regeneration Materials

MA Lie<sup>1</sup>, GAO Changyou<sup>1</sup>, LI Mingzhong<sup>2</sup>, BAI Lun<sup>2</sup>, SHEN Jiacong<sup>1</sup>

(1. MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(2. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou 215021, China)

**Abstract:** Skin defect is one of the serious surgical problems. The research background and history of skin regenerating materials are summarized in this review. Particularly, the recent progress in skin induced-regeneration materials is introduced. Angiogenesis and cell migration are emphasized as the key issues determining the result of skin regeneration. Finally, the possible breakthrough in future is envisaged by analyzing the challenges remained in the skin induced-regeneration materials.

**Key words:** biomedical materials; skin defect; induced-regeneration; angiogenesis; cell migration

### 1 皮肤修复材料的研究背景与发展历程

皮肤是人体最大的器官, 由表皮、真皮和皮下组织等构成, 并含有附属器官(汗腺、皮脂腺、毛囊)以及血管、淋巴管、神经等(图1)<sup>[1]</sup>。皮肤可避免机体内水分和电解质的丧失, 保护机体免受外界环境中的辐射以及化学物质、细菌和病毒的直接危害, 调节体内水分和其它物质的平衡, 调节体温并感知外界信息的作用<sup>[2-3]</sup>。然而, 大面积暴露于外部环境的皮肤组织时刻可能受到损伤, 其中烧伤、机械创伤以及慢性疾病导致的溃疡(如糖尿病)是造成皮肤缺损及功能丧失的主要

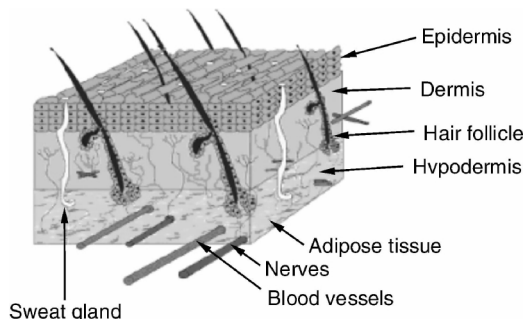


图1 皮肤结构示意图

Fig. 1 Schematic illustration of skin structure

原因。据世界卫生组织(WHO)估计, 中国每年约有 $9 \times 10^6$  烧伤病人。大面积烧伤、皮肤慢性溃疡、皮肤癌以及白癜风、糖尿病性溃疡、褥疮等可以通过皮肤移植来治疗的各种疾病都需要有足够的皮肤进行修复, 全国每年需要进行皮肤移植的病例大约在 $3.2 \times 10^6$  人次以上。

收稿日期: 2008-12-01

基金项目: 国家973计划项目(2005CB623902); 浙江省科技计划重点项目资助(2007C23014)

通信作者: 高长有, 男, 1966年生, 教授

传统的皮肤修复材料包括敷料、异种皮移植、异体皮移植和自体皮移植等。迄今为止, 自体皮移植仍然是临床治疗全层皮肤缺损最有效的方法。然而对于大面积烧伤患者, 往往存在供皮部位不足的问题, 需要经过多次移植才能治愈。因此开发出能有效促进创面愈合与皮肤组织再生的皮肤修复产品具有重要的意义。

根据皮肤的结构, 皮肤修复材料可依次分为表皮替代物、真皮替代物和全层皮肤替代物。1975年, Rheinwald和Green首先实现了表皮细胞的体外大量扩增<sup>[4]</sup>, 使表皮层的移植成为可能<sup>[5]</sup>; 1981年, O'Connor首次成功地实现了体外培植的自体表皮细胞膜片在皮肤创面的移植<sup>[6]</sup>。该方法的最大优点在于通过一小块自体皮肤就可以在体外培植大面积的表皮膜片, 以用于创面移植。

对于全层皮肤缺损患者, 表皮膜片移植的治愈效果非常有限。在缺少真皮层的情况下, 移植的表皮膜片易发生脱落和产生水疱, 而且愈合过程常伴随疤痕的增生和严重的收缩。因此, 真皮层在创面愈合过程中起着非常重要的作用, 真皮层的存在能大大减少愈合部位的疤痕产生, 降低创面的收缩程度, 并且提高其愈合速度<sup>[8]</sup>。随着生命科学、材料科学以及医学的发展, 组织工程化真皮得到快速发展。其中Advanced Tissue Sciences公司生产的Dermagraft<sup>®</sup>是具有代表性的组织工程真皮。将新生儿包皮成纤维细胞种植于聚乙醇酸/聚乳酸(PGA/PLA)网状支架中, 并于体外培养2~3周, 从而在PGA/PLA网状支架中形成含有胶原、GAG、纤维粘连蛋白和各种生长因子的真皮基质, 最大程度地仿生模拟真皮组织再生的三维空间结构<sup>[7,9]</sup>。临床实验显示, 应用Dermagraft<sup>®</sup>治疗慢性糖尿病患者足部溃疡的愈合速度明显快于传统的覆盖物。

既有表皮又有真皮的全层组织工程化皮肤由Bell等<sup>[10]</sup>研究成功, 在其工作的基础上, 一种名为Apligraf<sup>®</sup>的全层组织工程皮肤已经被美国食品药品监督管理局(FDA)批准应用。Apligraf<sup>®</sup>无论在外形、生物性能以及代谢行为方面都与人体皮肤组织相近, 而且由于其表皮层缺少朗格罕氏细胞(Langerhans's Cell), 其免疫原性非常弱<sup>[11]</sup>。目前, Apligraf<sup>®</sup>在糖尿病致的下肢溃疡和静脉性下肢溃疡<sup>[12]</sup>、新生儿表皮松懈症<sup>[13]</sup>、烧伤创面、皮肤切除导致的缺损等方面得到了广泛的应用。

近年来, 皮肤修复再生材料的研究在我国也逐渐引起人们的重视, 国内多家高等院校、科研院所与医疗机构也相继在组织工程化人工皮肤的研究中进行了卓有成效的探索与尝试, 取得了积极的成果。上海第九人民医院的曹谊林<sup>[14]</sup>以PGA为主要材料, 复合患者自体细胞,

研制了一种组织工程化皮肤。马建标等<sup>[15]</sup>以壳聚糖为主要材料, 开发了能促进人成纤维细胞生长的海绵状人工真皮。第四军医大学的金岩<sup>[16]</sup>利用人成纤维细胞和表皮细胞在胶原凝胶中的复合种植, 成功构建了一种Apligraf<sup>®</sup>的组织工程双层皮肤替代物。张其清等<sup>[17]</sup>采用胶原凝胶构建了一种凝胶型人工真皮, 胎儿真皮成纤维细胞在凝胶真皮中增殖速度快, 活性高, 分泌细胞外基质丰富。

## 2 原位诱导皮肤再生材料的研究进展

由于组织工程化皮肤存在种子细胞来源、免疫源性以及储存、运输等困难, 至今仍未获得大规模的应用。近年来, 随着再生医学的发展, 原位诱导再生的思想逐步得到认同和重视。皮肤的原位诱导再生是指不添加任何细胞, 仅凭材料自身的特性(如孔结构、化学组成、特异性蛋白位点以及活性信号等)达到原位诱导创面细胞及血管长入、分泌细胞外基质、重构皮肤的结构和功能的目的, 实现皮肤再生。

最早的皮肤诱导再生材料是由Burke和Yannas等在上世纪80年代初研制成功, 并于1996年成为商品化的产品——Integra<sup>®</sup> (Integra Life Sciences)<sup>[18]</sup>。Integra<sup>®</sup>由两层结构组成, 其真皮部分主要是由戊二醛交联的胶原/6-硫酸软骨素共沉淀物构建的三维多孔支架组成, 通过多孔支架引导创面区成纤维细胞的长入和细胞外基质的分泌来形成血管化的再生真皮组织(图2)。临床应用的结果显示, Integra<sup>®</sup>诱导再生的真皮组织具有典型的乳突状结构和网状结构, 而且愈合创面无疤痕组织增

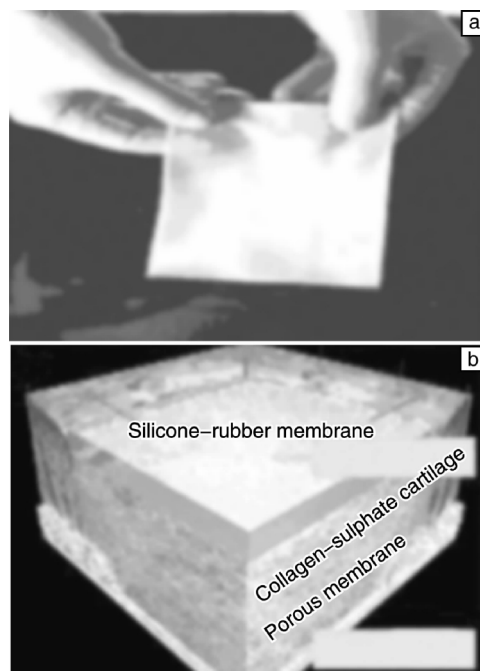


图2 Integra的大体形貌(a)和结构特征(b)

Fig. 2 Macroscopic shape (a) and microstructure (b) of the Integra

生<sup>[19]</sup>。该产品于 1996 年获得了 FDA 临床使用的许可, 欧洲和加拿大等国家和地区的卫生部门也在同年批准该产品可临床使用。

Integra 因不含活细胞, 贮存、运输简单, 无传染疾病的风险。一般认为<sup>[20-21]</sup>, Integra 在体内起了一个再生模板的作用, 其独特的孔径结构和组成限制成纤维细胞向肌成纤维细胞分化, 从而抑制瘢痕创面形成。其中, GAG 成分可降低胶原免疫原性, 减轻炎症反应促进血管化形成。也有学者认为, Integra 通过预先减轻和阻断炎症愈合过程而达到再生愈合过程。

Alloderm 是一种商品化的脱细胞真皮基质, 也具有原位再生皮肤缺损的功能, Kopp<sup>[22]</sup> 经过对 67 例烧伤患者多中心对照实验证实, 该产品的应用效果相当于薄的自体初厚移植物加上异体真皮基质或是相当于单独移植自体初厚皮片。Callcut<sup>[23]</sup> 认为 Alloderm 具有可立即使用、易消毒和储存、成活率高等优点。

我国在皮肤诱导再生材料领域已开展多年的研究, 但是目前多数仍处于实验研发阶段, 尚无商业化产品。浙江大学高长有、马列<sup>[24-25]</sup> 等通过对皮肤双层结构的仿生模拟, 研制了一种胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料(图 3)。该皮肤诱导再生材料的多孔支架层以细胞外基质(ECM)主要成分——胶原为原料, 同时添加具有良好抗菌、促进伤口愈合以及促进上皮细胞生长性能的天然生物材料——壳聚糖, 起到诱导真皮再生的作用。硅橡胶层则作为临时表皮层起到隔离外界环境、避免细菌侵入及防止水分蒸发的作用。该皮肤诱导再生材料具有原位使用、原位诱导、避免种子细胞使用的局限性和安全隐患等特点。

该皮肤诱导再生材料在细胞毒性、致敏性、刺激性、热原性、溶血率、遗传毒性以及亚慢性毒性等 7 个指标均达到国家三类医疗器械的标准, 具有良好的生物

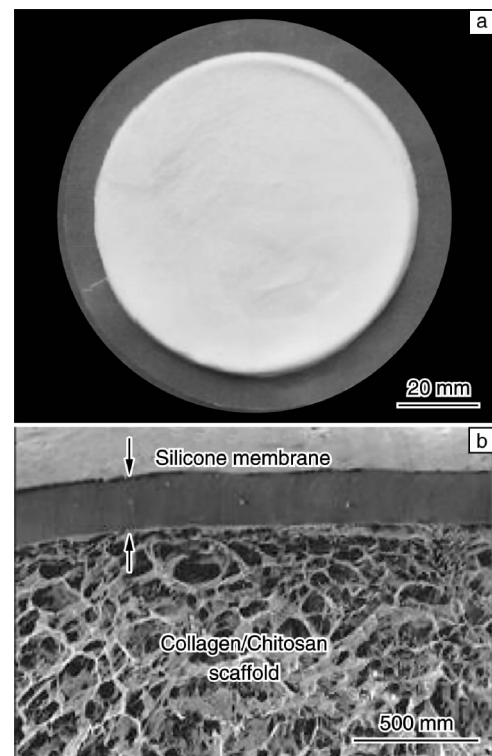


图 3 胶原-壳聚糖/硅橡胶双层支架的宏观形貌(a)和显微结构(b)

Fig. 3 Macroscopic morphology (a) and microstructure (b) of collagen-chitosan/silicone-rubber bilayer scaffold

安全性。以巴马小型猪为动物模型, 评价了该材料的原位诱导皮肤再生性能。结果显示, 再生材料不引起明显炎症反应, 移植 7 d 后即可观察皮肤成纤维细胞的诱导长入。28 d 后可见大量成纤维细胞长入和血管生成, 能有效降低创面肉芽组织增生。移植成功率达 94%, 证明所研究的材料能有效诱导真皮的再生, 控制挛缩, 提高创面愈合速度, 增加创面愈合后皮肤的弹性、柔软性及机械耐磨性, 降低疤痕组织的形成。真皮再生后移植表皮, 发现 2 周后表皮也成活了, 从而实现了全厚皮缺损修复(图 4)。

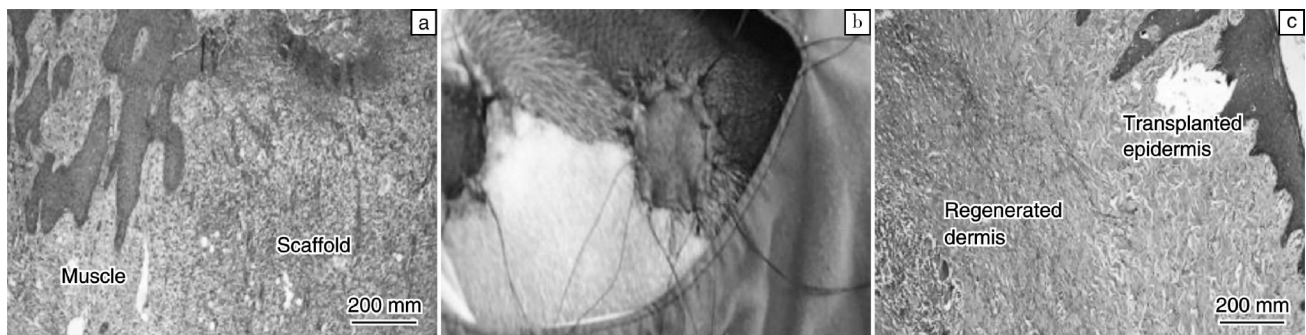


图 4 皮肤诱导再生材料修复全厚皮缺损的组织切片图: (a) 真皮再生材料移植 2 周后的组织切片图, (b) 再移植超薄皮片的大体观察图, (c) 超薄皮片移植 2 周后的组织切片图

Fig. 4 Histological section during full thickness skin loss repaired by skin induced-regeneration material: (a) histological section of a collagen-chitosan scaffold after transplantation for 2 weeks on pig skin, (b) gross view of the wound during the ultra-thin grafting, and (c) histological section of after ultra-thin derma grafting for 2 weeks

苏州大学李明忠、白伦等以蚕丝蛋白为材料<sup>[26-27]</sup>, 研制了一种蚕丝蛋白皮肤再生材料。该皮肤再生材料由上层(“表皮”层)和下层(“真皮”层)组成, 其中“真皮”层是由冷冻干燥法制备的孔径为 30 ~ 100  $\mu\text{m}$  的再生丝素蛋白多孔材料, “表皮”层是经过改性的合成高分子膜。该蚕丝蛋白皮肤再生材料适用于深度烧伤创面真皮组织的修复重建。移植到真皮缺损创面后, “真皮”层能诱导成纤维细胞、血管内皮细胞等修复细胞长入, 引导真皮组织的再生, 在真皮形态和功能修复过程中蚕丝蛋白皮肤再生材料的“真皮”层逐步被降解吸收; “表皮”层能防止细菌侵入和体液大量流失, 为真皮形态和功能的修复营造良好的环境, 同时由于上层具备良好的力学性能, 可满足临床手术操作和人体正常活动的需要。对蚕丝蛋白皮肤再生材料的生物学性能进行的一系列检测结果表明, 蚕丝蛋白皮肤再生材料无细胞毒性、致敏性、刺激性、抗原性、遗传毒性及亚慢/亚急性毒性, 具有良好的生物相容性。体内实验证明, 该材料与创面组织黏附良好, 成纤维细胞、血管内皮细胞等组织修复细胞能够沿多孔丝素材料孔隙迁入并向内生长, 真皮层多孔丝素材料的血管化速度快, 炎性细胞浸润少, 新生真皮的组织形态与正常真皮相似。

### 3 皮肤原位诱导再生的关键科学问题与材料设计

#### 3.1 原位诱导血管化

皮肤的首要功能是将机体组织与外界环境隔绝, 起到保护屏障的作用。当皮肤大面积丧失时, 可能导致残疾以致死亡。创伤修复处理的首要目标是使伤口快速闭合, 其次是重建具有功能的、形态结构完善的皮肤组织。伤口愈合是一个复杂的生物过程, 包括炎症、有丝分裂、血管新生、细胞外基质的合成和重塑<sup>[28]</sup>。一般情况下, 皮肤修复过程中, 早期植入的皮片主要依靠吸收创面渗出的血浆进行营养, 但很快新生的毛细血管就与皮片内原有的血管网沟通, 建立移植皮肤赖以成活的血液循环系统。人工构建皮肤诱导再生材料不具备血管化结构, 移植后的成活率不如活体皮肤。因此, 如何实现皮肤诱导再生材料的快速血管化是决定皮肤诱导再生性能的关键。

研究显示, 皮肤组织的修复过程往往是多种细胞协同作用的结果, 而细胞的增殖迁移以及细胞外基质分泌等行为需要通过生长因子、激素等活性因子的信号调控来实现。基于再生医学中“原位诱导再生”思想的新一代皮肤再生材料的功能发挥更是离不开这些“活性诱导因子”。因此, 复合各类活性因子的皮肤支架有望克服传统皮肤再生材料“活性”不足、血管化速度慢的缺点。

需要指出的是, 这些活性因子除了上面所提的生长因子和激素外, 还包括活性多肽序列以及具有编码特定蛋白质功能的基因。

##### 3.1.1 偶联活性多肽

活性多肽通常指的是包含在细胞外基质组分中的特定多肽序列。这些序列往往能与细胞膜表面某些糖蛋白受体发生特异性作用, 调控细胞的黏附、生长、迁移等行为。大量研究工作致力于活性多肽杂化表面的构建以及活性多肽复合支架的制备, 并考察其对皮肤修复过程相关细胞的影响。

RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)多肽已被证明是增进细胞黏附的有效配体。Olbrich 等<sup>[29]</sup>发现成纤维细胞在含有 RGD 的玻璃表面的黏附率提高, 但迁移速度下降。这对于活性多肽复合支架的设计有所启发, 因为皮肤组织的修复往往需要成纤维细胞向支架内部的大量迁移侵入。材料表面的 RGD 密度是影响细胞迁移行为的重要因素。目前在材料中引入 RGD 序列的常用方法有两种: ①在材料表面固定 RGD 多肽序列; ②人工合成含 RGD 支链的聚合物。

有研究发现, 培养基质中的蚕丝蛋白组分有促进成纤维细胞增殖的作用。Hiromi Yamada 等<sup>[30]</sup>采用胰酶消化、色谱分离、氨基酸测序的实验方法证明: 蚕丝蛋白中具有生物活性的区域是重链靠近 N 端的两个多肽序列 VIITDSGNE 和 NINDFDED。这两种多肽序列在促进细胞增殖方面具有协同作用。因此, 人工合成的这两种多肽可作为活性位点整合到皮肤再生材料中, 赋予材料更好的修复与再生性能。

##### 3.1.2 复合生长因子

生长因子是一类与细胞行为有关的信号物质。皮肤再生过程的血管化、胶原基质分泌以及表皮层的重建等过程都与生长因子的种类、分泌量及其分布有关。将生长因子及其载体系统与皮肤支架相结合的研究思想已被众多科学家所认可, 近来涌现出诸多报道。所涉及的因子种类包括: 碱性(酸性)成纤维细胞生长因子(bFGF(aFGF))、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGF)以及转化生长因子 TGF- $\beta$  等; 负载方法包括物理吸附、化学固定、微载体复合等。微载体的引入是为了克服生长因子易失活、在体内半衰期短的不足, 载体体系可以实现对生长因子的保护并满足特定部位对因子剂量和作用时间的需求。

bFGF 是体内有效的血管形成因子之一, 它对于新生血管形成过程中的多个环节如毛细血管基底膜降解、内皮细胞迁移增生、胶原合成、小血管腔形成等均有明显促进作用, 对于感染伤口、烧伤创面等的治疗有着重要的作用。Katsuya Kawai 等<sup>[31]</sup>以乳液法制得平均粒径

为  $40\ \mu\text{m}$  的多孔明胶微球, bFGF 灌注吸附在明胶微球中。复合 bFGF 的明胶微球悬液注射到商品化的胶原真皮支架中(图 5)。进一步体内实验结果证明:微球起到了控释生长因子的作用,使得 bFGF 的有效释放可持续 10 d,进而促进了成纤维细胞的增殖和新生血管的形成。韩春茂等利用肝素对血管生成素的特异性结合作用,将血管生成素固定于肝素化改性的胶原/壳聚糖真皮支架上。动物体内埋植实验显示,结合了血管生成素的真皮支架能更快地实现血管化(图 6)。

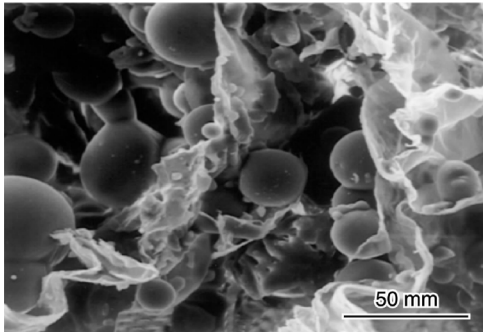


图 5 含明胶微球的人工真皮 SEM 照片

Fig. 5 SEM image of artificial skin having gelatin microspheres

### 3.1.3 复合功能基因

生长因子虽然具有效果直接、显著等优点,但是由于生长因子活性半衰期短,稳定性差,在体内易受环境温度以及各种酶的作用而丧失活性。体内直接使用生长因子还存在剂量难以精确控制、易出现短期局部高剂量释放,进而引发创面癌变等问题。

近年来,随着基因治疗新技术的发展,将基因治疗技术与组织工程技术相结合,通过基因体外或者原位转染以获得高活性支架的研究思想已经逐步获得认可和重视。这一类组织工程支架被称为基因活性支架(Gene-Activated Matrix),是目前组织工程支架研究中的重要发展方向之一。针对皮肤修复与再生的问题,通过将编码各种活性因子的基因与组织工程皮肤支架复合,利用愈合过程中创面细胞有丝分裂活跃的特点,在移植过程中原位转染创面细胞,从而原位表达活性因子,可实现对创面修复再生过程的调控。鉴于裸 DNA 稳定性差,在传输过程中易被降解和清除的特点,组织工程中基因治疗的关键在于设计和制备具有高稳定性和高转染效率的基因传递系统。

John W. Tyrone 等<sup>[32]</sup>将表达 PDGF-BB 的质粒 DNA 负载到胶原支架上,以免耳背溃疡为模型进行研究。研究表明, DNA 有效转染了侵入支架的细胞并表达了 PDGF-BB,促进了粒状组织的形成、创面表皮的生长以及创面的闭合。Angela Kim 等<sup>[33]</sup>采用 PDGF 质粒与透明质酸溶液混合冻干的方法得到复合 DNA 的真皮再生

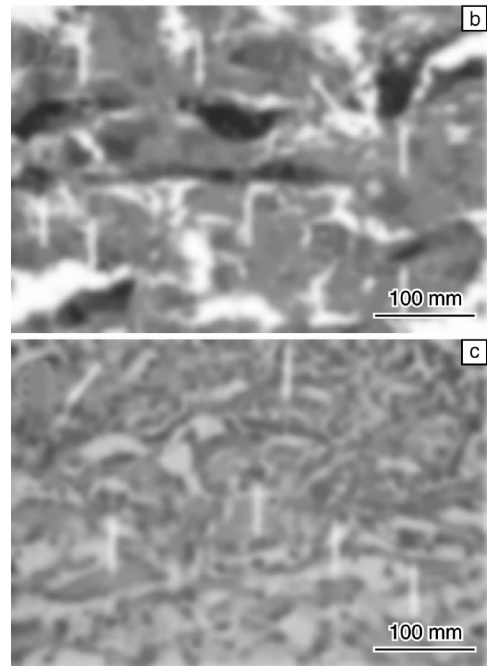
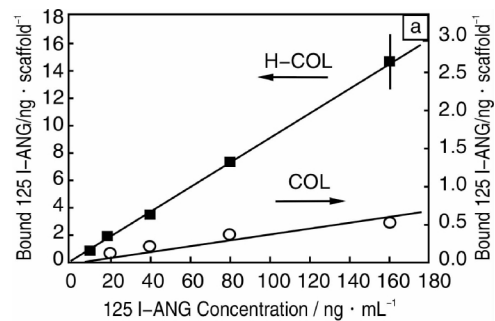


图 6 肝素接枝真皮支架的血管生成素结合量与浓度的关系(a), 肝素化改性(b)和未改性支架(c)的体内血管化性能比较(箭头表示血管)

Fig. 6 Relationship between the concentration of angiogenin and its binding capacity on the heparin modified collagen-chitosan scaffold (a), angiogenesis of the heparin modified (b), and unmodified collagen-chitosan (c) scaffolds after embedded for 2 weeks. arrows expressing blood vessels

支架,并对支架进行了交联处理。研究表明, DNA 从 HA 支架中的释放动力学依赖于 DNA 的负载量以及支架的交联程度;支架起到了对 DNA 的保护与控释作用。质粒有效转染了细胞并分泌 PDGF; PDGF 可有效促进人真皮成纤维细胞(HDFs)的增殖。

表皮生长因子(EGF)对于表皮细胞的生长和增殖具有重要意义。它可强力促进表皮细胞增殖,并刺激其分化成熟,从而推动伤口再上皮化;同时还可以促进内皮细胞和成纤维细胞的迁移。Jan Jeroen Vranckx 等<sup>[34]</sup>以商业化的载体 lipofectin 将编码人表皮生长因子(hEGF)的质粒转染到同种异体角胚细胞中进行体外培养,形成大量表达 hEGF 的细胞悬液。该细胞悬液作为外源性

的 hEGF“供应仓库”直接注射或与支架结合后植入创面。实验表明, 创面修复过程得到有效促进。Chen 等<sup>[35-36]</sup>将可表达 PDGF 的基因质粒与透明质酸凝胶复合, 通过从凝胶中释放, 在创面区原位转染成纤维细胞, 提高了成纤维细胞的 PDGF 的表达水平, 达到促进纤维组织形成, 加快血管化和表皮化的目的。

### 3.1.4 药物及多种活性因子的协同作用

抗菌药物可减少创面感染, 为皮肤组织的修复提供良好环境。多肽、生长因子、基因等多种活性因子在组织修复与再生过程的各个阶段发挥不同的调控作用, 并可能呈现协同效应。因此, 将药物及多种因子复合应用到皮肤再生材料中, 有望提高皮肤修复与再生的质量。

Katsuko Furukawa 等<sup>[37]</sup>通过多种药物及外源活性因子的添加(胰岛素、氟美松、抗坏血酸、bFGF 等), 在体外成功构建了具有高成纤维细胞密度的真皮支架, 形成了高密度细胞聚集体。PCR 实验表明, 若将这类由外源性因子诱导形成的细胞聚集体培养在可降解的聚合物

支架中, 相比低细胞密度的支架, 可表达更高水平的 TGF- $\beta$ 3, 有利于缺损真皮的修复。

Sung Ran Hong<sup>[38]</sup>将抗生素 Silver sulfadiazine (AgSD) 和表皮生长因子 EGF 共同负载到明胶/透明质酸支架中, 以小鼠为动物实验模型, 研究这两类活性物质的加入对修补缺损皮肤创面修复的作用。以单克隆抗体 PC10 对 PCNA 进行免疫组化染色, 以研究上皮细胞的增殖。研究表明, 抗生素和 EGF 的协同作用可有效降低免疫反应并促进受损皮肤的修复。但是 EGF 的促表皮生长的活性在一周以后即丧失。因此, 一种起到缓释作用的生长因子载体显得十分必要。

Heathe Waldeck<sup>[39]</sup>以 RGD 修饰 Gelatin, 同时复合角细胞生长因子(KGF), 并利用光引发聚合在创面原位形成具有生物活性的 IPN 支架。小鼠全层皮肤缺损模型研究证明: 该活性材料体系在创伤修复早期起到抑制收缩的作用, 更好地诱导了细胞外基质重建和新生组织血管化(图 7 中 NV 为新生血管, E 为表皮)。

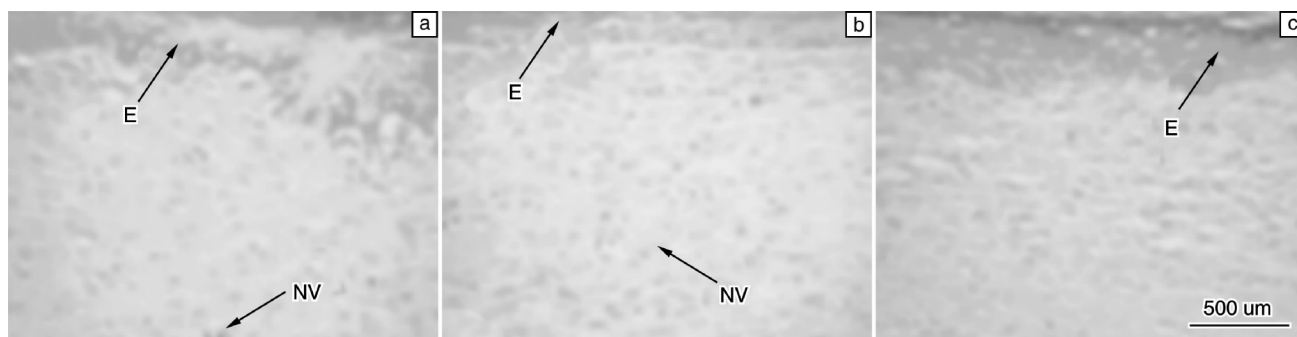


图 7 移植 3 周后的 HE 切片图: (a) RGD 修饰的 IPN + KGF 界面, (b) 未改性的明胶 IPN 界面, (c) 传统敷料界面

Fig. 7 Photo micrographs of (a) RGD modified IPN+KGF interface, (b) unmodified gelatin IPN interface, and (c) conventional dressing interface (region directed with NV expressing new grown blood vessel, region directed with E expressing epidermis)

## 3.2 原位诱导细胞迁移

### 3.2.1 皮肤创伤修复的过程与机理

皮肤创伤的修复是一个复杂有序、高度协调的过程, 每个阶段都受到机体精确的调控。目前认为, 创伤修复是多种修复细胞和生长因子共同参与, 并与细胞外基质相互作用的动态过程。其中, 修复细胞包括了成纤维细胞(Fibroblast)、血管内皮细胞(Vascular Endothelium Cell)以及巨噬细胞(Macrophage)、白细胞(Leucocyte)等炎症细胞<sup>[40]</sup>, 而生长因子则有 PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, bFGF、类胰岛素生长因子(IGF)、角质细胞生长因子(KGF)和神经生长因子(NGF)等等<sup>[41-42]</sup>。

皮肤损伤修复初期, 局部发生炎症反应, 血小板和红细胞数量增加, 血栓形成。炎症部位产生大量的细胞因子, 这些因子作为化学趋化剂选择性地介导中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞先后向炎症部位迁移, 发生区域性聚集, 起到吞噬清创、产生蛋白酶、释放生长因子

和抗原加工等作用<sup>[43]</sup>。

修复的中期(约 3 d 后), 内皮细胞先迁移到受损部位形成新生血管。接着血小板、炎症细胞和活化了的血管内皮细胞会释放生长因子, 如 TGF- $\beta$ , EGF, FGF 和促纤维化细胞因子(如 IL-1 和 TNF- $\alpha$ )等, 这些因子能诱导成纤维细胞逐渐向创伤中心迁移, 形成肉芽组织。此外, 生长因子还可以通过抑制胶原酶等的活性, 减少细胞外基质的降解, 促进细胞外基质, 如 I 型胶原、纤维连接蛋白等的大量分泌和合成, 填补组织缺损<sup>[44]</sup>。

创伤愈合最后的过程(约两周后)是组织改建。成纤维细胞在多种细胞因子的诱导作用下, 大量转换为收缩表型, 即肌成纤维细胞(Myofibroblast, MFb), 并通过成纤维细胞表面的整合素调节 ECM, 即通过其伪足的伸出、回缩而收缩其周围的胶原基质, 使伤口发生收缩。另一方面, 成纤维细胞通过分泌基质金属蛋白

(Matrix Metalloproteinases, MMPs) 及其组织抑制剂 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMPs) 来调控旧胶原的降解和新胶原的重排和沉积<sup>[44]</sup>。

由创伤修复过程可知, 细胞迁移是关系创伤修复效果的关键细胞行为之一。因此, 赋予材料原位诱导和调控细胞迁移的性能, 是实现材料原位诱导皮肤再生的重要途径。

### 3.2.2 细胞迁移的运动机理与调控因素

细胞的运动是一个由细胞骨架、细胞膜和信号传导系统共同参与的相当复杂的过程。通常来讲, 细胞迁移是一个往复循环的过程, 每个周期可以分成细胞前端突出、伪足与基底的粘着、细胞体收缩和前移、细胞尾部释放四个步骤。

在均匀的环境中, 细胞呈现无规行走。而将细胞置于一个不对称的环境, 如化学或物理信号梯度中时, 细胞膜和细胞骨架会重新排布, 显示出极化的状态, 细胞的前端与后端差异显著<sup>[45]</sup>。在化学引诱剂的浓度梯度中, 细胞膜表面的受体出现前多后少的分布状况, 梯度信号因此而被放大并固定在细胞上<sup>[46-47]</sup>。沿着梯度, 细胞与基底配体浓度高的一端结合的更牢, 于是在一个细胞长度范围内, 细胞头尾两端粘附力的差异驱动着细胞向高浓度一端爬移<sup>[48]</sup>。这种细胞能够感知固定在表面的趋化因子的浓度差异而发生迁移的能力称为趋触性 (haptotaxis)。此外, 大量的研究表明, 细胞同样可以响应于物理机械信号梯度而发生迁移, 如粗糙度或表面硬度 (durotaxis)。随着基底的模量增加, 细胞铺展得更好, 所受牵引力也随之增大, 引导了细胞往模量高的方向迁移。

### 3.2.3 梯度表面的设计

梯度材料是指材料的化学组成、物理结构或拓扑形

貌在空间上发生连续变化的一种材料。在皮肤损伤修复过程中, 血小板和巨噬细胞释放的 PDGF 在组织中形成浓度梯度, 作为化学引诱剂和促有丝分裂剂诱导真皮成纤维细胞侵入创口的纤维蛋白凝块中并大量增殖<sup>[49-50]</sup>。梯度材料将诱导因子以共价键形式梯度固定于皮肤再生材料表面, 从而达到在体外模拟生物体细胞微环境的目的, 实现成纤维细胞、内皮细胞的原位诱导迁移和皮肤组织的再生。

#### (1) 化学信号梯度

再生医学中的化学信号梯度材料通常是指材料表面所固定的生物大分子的浓度的梯度, 包括细胞外基质蛋白、各类生长因子和活性多肽, 如 RGD。细胞通过细胞膜表面的  $\alpha v \beta 1$  整合素与基底所固定的配体特异性结合, 感受到这种浓度的变化, 并引发一系列的信号传导途径而发生迁移。

**RGD 浓度梯度** 众所周知, RGD 序列是增进细胞粘连的有效配体, 因而可在生物材料表面引入 RGD 序列。引入 RGD 序列的方法常可分为两类: ①在材料表面直接固定 RGD 肽序列<sup>[51-53]</sup>; ②形成聚合物-RGD 肽链杂化分子<sup>[54-56]</sup>。Catherine 用程序控制的注射泵将丙烯酸溶液和丙烯酸-RGD 溶液以设定的比例梯度混合, 注入石英器皿, 紫外光交联得到 RGD 浓度梯度水凝胶。在这种梯度表面种植成纤维细胞, 细胞定向规整排列, 80% 的细胞与梯度方向的夹角小于  $20^\circ$ 。而在 RGD 的均匀表面上, 细胞在各个方向上的无规排列<sup>[55]</sup>。Solitaire 在 PEG-RGD 的浓度呈梯度变化的 PEG 水凝胶表面也观察到了同样的结果。人真皮成纤维细胞沿着梯度方向排列, 且随着培养时间增长, 细胞的取向更加规整。更为重要的结果是在 RGD 梯度表面, 细胞的沿着梯度向浓度高的一端迁移的距离远大于均匀表面<sup>[56]</sup> (图 8)。

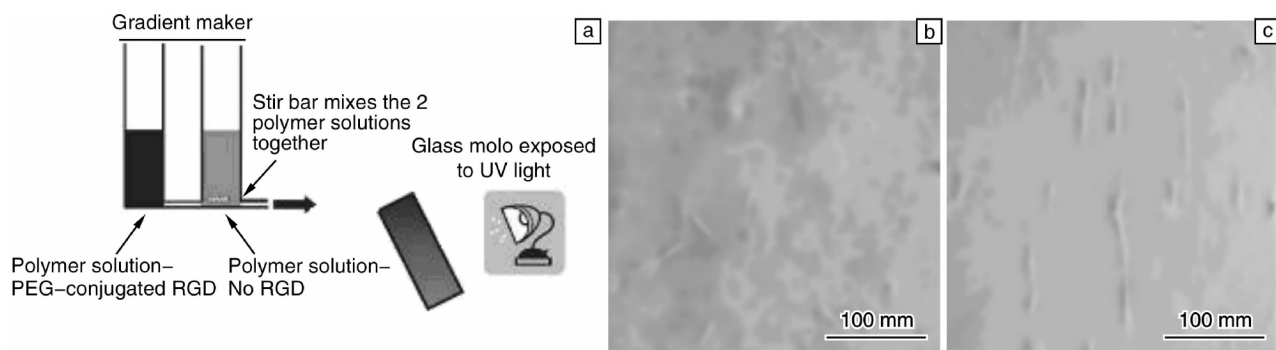


图 8 梯度 RGD 水凝胶的制备示意图(a), RGD 均一水凝胶表面的成纤维细胞(b), 梯度水凝胶内取向的成纤维细胞(c)

Fig. 8 Gradient hydrogels were formed using a gradient maker as depicted above in combination with a peristaltic pump (a), More fibroblasts were aligned on hydrogel surfaces with a 0-1 gradient of tethered RGD (indicated by arrow) (c) than on hydrogel surfaces containing RGD at a constant concentration (b)

**细胞外基质浓度梯度** 细胞膜表面存在着一种跨膜糖蛋白— $\alpha \beta$  整合素, 可以识别细胞外基质成分并与之

结合。整合素有很多种类, 可以与不同的配体特异性结合。ECM 中的蛋白质就是通过整合素连接到细胞内骨



架蛋白如肌动蛋白等, 并将信息传导到细胞内, 调控细胞的行为<sup>[57-59]</sup>。纤维粘连蛋白中含有 RGD 的位点, 能与细胞膜表面的整合素  $\alpha_5\beta_1$  和  $\alpha_v\beta_1$  结合<sup>[60]</sup>, 而胶原能与  $\alpha_2\beta_1$  结合<sup>[61]</sup>, 从而介导细胞的迁移。Rico 等人用微流体通道产生层粘连蛋白的浓度梯度表面<sup>[62]</sup>, 以及层粘连蛋白(LN)和 I 型胶原的复合梯度<sup>[63]</sup>。对于内皮细胞而言, 提高 LN 的浓度并不一定能增加细胞的运动性, 而是在适中的浓度时达到最大的迁移速率。因为, LN 浓度低时, 细胞锚着的位点少, 得不到足够大的牵引力。但是当表面 LN 密度高的时候, 细胞铺展良好, 前端与后端的锚着力没有明显差异, 细胞的运动也就失去了方向性。另一方面, 提高梯度的变化斜率, 对内皮细胞的迁移速率也没有明显的影响。

**生长因子浓度梯度** 迄今为止, 很多的研究表明, 以共价键形式固定于材料上的生长因子仍能够保持较高的活性<sup>[64-65]</sup>。常用的生长因子有表皮生长因子(EGF)<sup>[64,66]</sup>, 成纤维生长因子(FGF)<sup>[67]</sup>和血管内皮生长因子(VEGF)<sup>[68]</sup>等。以 EGF 为例, EGF 可以诱导非迁移性的细胞转化为迁移性细胞, 甚至可以激活某些整合素来促进迁移。如癌细胞表面的整合素  $\alpha_v\beta_5$  只能介导细胞的粘附而不参与细胞在玻纤蛋白上的迁移, 但是通过 EFG 的激活, 细胞不但可以在玻纤蛋白上进行迁移, 而且其在胶原基质上的运动性不受影响。Liu<sup>[68]</sup>等人利用电解法, 即通过金的氧化还原控制硫醇的吸附和脱附, 产生硫醇的浓度梯度。利用羧基固定纤连蛋白或 VEGF。然后在产生的 FN、VEGF 以及两者的复合梯度表面种植牛动脉内皮细胞, 24h 后结果表明无论是纤连蛋白还是 VEGF, 或是两者结合的梯度表面, 细胞的运动性均

要强于均匀表面。细胞在 VEGF 的梯度表面比在 FN 梯度表面运动性增加了两倍, 而在两者结合的梯度表面比在 VEGF 的梯度表面细胞运动性又增加了两倍。

## (2) 物理机械信号梯度

调控细胞响应的生物材料界面的研究集中于表面化学和拓扑图案。直到最近几年, 科学家们的研究发现材料表面的机械性能——模量也能影响细胞的行为<sup>[69-71]</sup>。制备模量梯度材料最直接的方法就是控制不同位置的交联密度, 因此, 从化学组成来讲, 它实质上是指交联剂的浓度梯度。而目前绝大部分的表面模量梯度都是选用聚丙烯酰胺(PAAM)为基底, 双官能度的丙烯酸胺为交联剂。

Nadia 等人采用微流体技术产生双官能度的丙烯酸胺浓度梯度溶液, 在紫外光照射下原位交联成凝胶, 得到模量梯度材料<sup>[69]</sup>。在材料表面接枝一层 I 型胶原后种植血管平滑肌细胞, 发现细胞在硬度高的区域铺展良好, 而在软的区域, 细胞形态更接近圆形。用高分辨率显微镜观察, 发现细胞骨架亦存在差异, 前者细胞内的 F-肌动蛋白微丝结构精细, 而后者的细胞骨架杂乱无章排列。因此, 细胞的粘附行为受表面模量的调控, 更趋向于在硬的区域粘附, 其数量也从硬的一端向软的一端逐渐减少。Chun - Min Lo 等制备了一种两段式的表面, 在软、硬的交界处有一段 50 ~ 100  $\mu\text{m}$  宽的梯度过渡区域。在其上培养 3T3 成纤维细胞 15 h 后, 用显微镜记录细胞运动。若细胞最初种于软端, 则能够沿着梯度穿越边界而到达硬端, 但是, 如果细胞最初处于硬的一端, 细胞则会停留在硬端, 无法穿越边界到达软端(图9)。

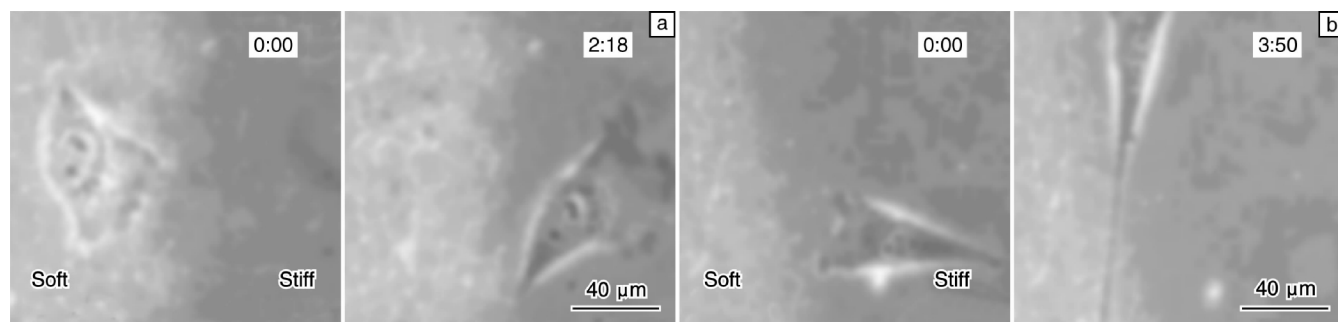


图9 3T3 成纤维细胞在硬度梯度表面的迁移: (a) 细胞种在软的一端, 最终穿越边界进入硬端; (b) 细胞种在硬端, 最终无法穿越梯度边界

Fig. 9 Movements of National Institutes of Health 3T3 cells on substrates with a rigidity gradient: (a) a cell moved from the soft side of the substrate toward the gradient and (b) a cell can not move from the stiff side of the substrate toward the gradient

## 4 皮肤再生材料存在的问题与展望

目前, 皮肤原位诱导再生材料只能实现真皮组织的诱导再生, 无法实现表皮层和真皮层同时的诱导再生,

更缺少正常皮肤所具有的毛囊、汗腺、皮脂腺、神经以及黑色素细胞等附属成分。近年来, 应用组织工程技术构建含有附属器官的皮肤正成为研究热点。Wu 等将真皮毛囊鞘成纤维细胞种植于胶原凝胶, 成功诱导再生出



类毛囊结构<sup>[72]</sup>。Tai-Horng Young<sup>[73]</sup>等通过真皮乳头细胞(dermal papilla cells)自聚集的方法,在 poly(ethylene-co-vinyl alcohol)膜上成功制备了类球体的微组织(图 10),体内试验发现该微组织可在一定程度上诱导毛囊的再生(图 10)。Berthod 等在胶原/壳聚糖多孔支架中添加层粘连蛋白(Laminin),复合种植成纤维细胞和角质细胞,移植于裸鼠背部,120 d 后发现,添加了层粘连蛋白的支架中,新生神经的数量是对照组的 7 倍<sup>[74]</sup>。Neil 等在经化学改性的材料表面实现了黑色素细胞和皮肤角质细胞的共培养,可望在修复皮肤缺损的同时,解决色素缺乏的问题<sup>[75]</sup>。金岩等以包皮组织作为细胞源,采用消化法获得角朊细胞、成纤维细胞和黑色素细胞,采用自行设计的组织工程皮肤培养系统,构建了含黑色素细胞的组织工程皮肤。实验结果表明,所构建的组织工程皮肤结构完整,层次清晰,表皮细胞和成纤维细胞活力良好<sup>[76]</sup>。

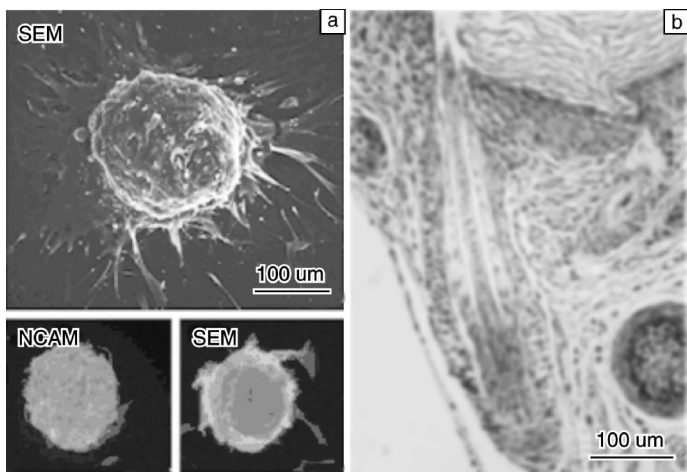


图 10 体外制备的类毛囊体以及该类毛囊体在体内实验中的组织观察

Fig. 10 Morphology of the dermal papilla microtissue (a) and histology of induced hair follicle in the patch assay (b)

是否能够通过原位诱导再生的方法,实现具有全结构和全功能的皮肤组织的再生?皮肤原位诱导再生材料可能具有同时诱导、调控多种细胞行为的性能吗?生命体通过干细胞分裂来实现细胞的更新及保证持续生长。随着干细胞研究尤其是成体干细胞研究的快速发展,干细胞为采用组织工程技术构建人体组织、器官提供充足可靠的细胞来源已成为可能,这也将成为干细胞应用的一个主要方向。

Hu Kuikui<sup>[77]</sup>等将表皮干细胞(epidermal stem cells)复合的皮肤支架进行体内移植研究,发现复合了表皮干细胞的皮肤支架可促进皮肤缺损修复,并减少瘢痕的形成。Christelle Coraux 等<sup>[78]</sup>证明胚胎干细胞可在体外分化为角质细胞,并发现复合了胚胎干细胞的皮肤支架能

发展出与真正皮肤非常相近的结构。Qi Shaohai 等<sup>[79]</sup>制备了复合有异种真皮、表皮干细胞和真皮毛乳头细胞的组织工程皮肤,发现该组织工程皮肤可得到更厚的表皮,并可以减少瘢痕的产生。Elaine F. Kung 等<sup>[80]</sup>,将人的内皮祖细胞与组织工程皮肤支架相复合,获得了可诱导微管再生的组织工程皮肤(图 11)。

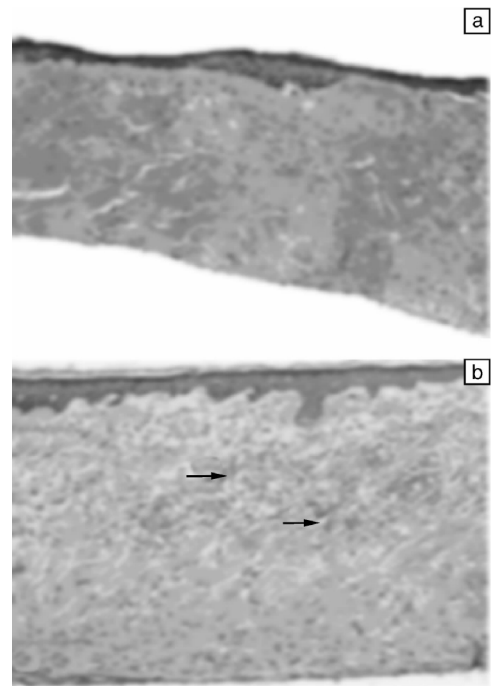


图 11 未复合(a)与复合(b)内皮祖细胞的组织工程皮肤的组织分析

Fig. 11 Histological evaluation of human skin substitutes (HSSs) seeded with EPCs (b) after 2 weeks in vivo ( $\times 200$ ). The HSSs without seeding was used as a control (a)

此外,已有研究发现,干细胞复合可以实现附属器官的再生。Ju Linxie 等<sup>[81]</sup>将制备一种复合表皮干细胞和成纤维细胞的组织工程皮肤。经移植试验发现,该组织工程皮肤可诱导生成与完整皮肤在形态学上非常相近真皮和表皮。Yi Lin 等<sup>[82]</sup>将由 ES 分化而来的表皮干细胞与组织工程皮肤支架相复合,移植于老鼠后,发现此组织工程皮肤可诱导生成类毛囊结构与腺状结构。

因此,结合干细胞技术和原位诱导再生思想,原位诱导皮肤再生材料未来发展的方向是:通过调节材料的微结构、仿生组成、表面特异性位点以及活性信息的复合等手段,赋予材料原位动员、原位捕获、诱导迁移以及分化调控特定干细胞的性能,仿生构建干细胞体内分化的微环境,诱导干细胞的定向分化,实现具有全结构和功能的皮肤组织原位诱导再生。

## 参考文献 References

[1] Zhang Disheng(张涤生). 组织工程学简介[J]. Chinese Jour-

- nal of Plastic Surgery (中华整形烧伤外科杂志), 1998, 3: 17.
- [2] Yang Jun(杨 军), Cao Yilin(曹谊林), Liu Wei(刘伟). 组织工程化皮肤及临床应用研究进展[J]. *Foreign Medical Sciences: Biomedical Engineering Fascicle*(国外医学: 生物医学工程分册), 2004, 27(5): 274-277.
- [3] Chai Jiake(柴家科), Sheng Zhiyong(盛志勇). 进一步重视大面积深度烧伤皮肤替代物的研究[J]. *Chinese Journal of Burns*(中华烧伤杂志), 2002, 18(2): 73-74.
- [4] Rheinwald J G, Green H. Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: the Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells[J]. *Cell*, 1975, 6: 331-343.
- [5] Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of Cultured Human Epidermal Cells into Multiple Epithelia Suitable for Grafting[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76: 5 665-5 668.
- [6] O'Conner N E, Mulliken J B, Banks Schlegel S, et al. Grafting of Burns with Cultured Epithelium Prepared from Autologous Epidermal Cells[J]. *Lancet*, 1981, 1: 75-78.
- [7] William H Eaglstein, Vincent Falanga. Tissue Engineering and the Development of Apligraf, a Human Skin Equivalent[J]. *Clinical Therapeutics*, 1997, 19(5): 894-905.
- [8] Steven T Boyce. Design Principles of Composition and Performance of Cultured Skin Substitutes[J]. *Burns*, 2001, 27: 523-533.
- [9] Marston W A. Dermagraft (R), a Bioengineered Human Dermal Equivalent for the Treatment of Chronic Nonhealing Diabetic Foot Ulcer[J]. *Expert Review of Medical Devices*, 2004, 1(1): 21-31.
- [10] Schul III J T, Tompkins R G, Burks J F. Artificial Skin[J]. *Annu Rev Med*, 2000, 51: 231-244.
- [11] Kirsner R S. The Science of Bilayered Cell Therapy[J]. *Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice*, 2005, Suppl: 6-9.
- [12] Veves A, Falanga V, Amsstrong D, et al. Graftskin, a Human Skin Equivalent is Effective in the Management of Noninfected Neuropathic Diabetic Foot Ulcers[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(2): 290-295.
- [13] Falabetla A F, Schachner L A, Valencia IC, et al. The Use of Tissue-Engineering Skin (Apligraf) to Treat a Newborn with Epidermolysis Bullosa[J]. *Arch Dermatol*, 1999, 135(10): 1 219-1 222.
- [14] Cai Xia(蔡 霞), Cui Lei(崔 磊), Liu Wei(刘 伟), et al. 组织工程技术修复皮肤缺损的动物实验[J]. *Chinese Journal of Medical Aesthetics and Cosmetology*(中华医学美容杂志), 2004, 10(6): 349-351.
- [15] Ma Jianbiao(马建标), Wang Hongjun(王红军), He Binglin(何炳林), et al. 壳聚糖与胶原或海藻酸复合物海绵的制备以及人胎儿皮肤成纤维细胞在其中的生长[J]. *Progress in Natural Science*(自然科学进展), 2000, 10(10): 896-903.
- [16] Hu Dahai(胡大海), Nie Xin(聂 鑫), Jin Yan(金 岩), et al. 人组织工程全层活性皮肤在深度烧伤创面的临床应用[J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*(第四军医大学学报), 2004, 25(3): 224-228.
- [17] Zhang Qiqing(张其清), Ma Dongrui(马东瑞), Zhang Lihai(张立海), et al. 胶原凝胶真皮构建及其性质测定[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*(中国医学科学院学报), 2002, 24(4): 373-376.
- [18] Hrabchak C, Flynn L, Woodhouse K A. Biological Skin Substitutes for Wound Cover and Closure[J]. *Expert Review of Medical Devices*, 2006, 3(3): 373-385.
- [19] Yannas I V. Studies on the Biological Activity of the Dermal Regeneration Template[J]. *Wound Repair Regen*, 1998, 6: 518-524.
- [20] Yannas I V. Models of Organ Regeneration Processes Induced by Templates[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 831(1): 280-293.
- [21] Yannas I V. Similarities and Differences between Induced Organ Regeneration in Adults and Early Foetal Regeneration[J]. *J R Soc Interface*, 2005, 2: 403-417.
- [22] Kopp J, Jeschke M G, Bach A D, et al. Applied Tissue Engineering in the Closure of Severe Burns and Chronic Wounds Using Cultured Human Autologous Keratinocytes in a Natural Fibrin Matrix[J]. *Cell Tissue Bank*, 2004, 5(2): 89-96.
- [23] Calicut R A, Schuf M J, Sioan M, et al. Clinical Experience with Alloderm: a One-Stage Composite Dermal/Epidermal Replacement Utilizing Processed Cadaver Dermis and Thin Autografts[J]. *Burns*, 2006, 32(5): 583-588.
- [24] Shi Y C, Ma L, Gao CY, et al. Collagen/Chitosan-Silicone Membrane Bilayer Scaffold as a Dermal Equivalent[J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2005, 16(11-12): 789-794.
- [25] Ma L, Shi Y C, Chen Y X, et al. In Vitro and in Vivo Biological Performance of Collagen-Chitosan/Silicone Membrane Bilayer Dermal Equivalent[J]. *Journal of Materials Science: Material in Medicine*, 2007, 18: 2 185-2 191.
- [26] Li M, Lu S, Wu Z, et al. Study on Porous Silk Fibroin Materials: 1. Fine Structure of Freeze-dried Silk Fibroin[J]. *J Appl Polym Sci*, 2001, 79: 2 185-2 191.
- [27] Li M, Wu Z, Zhang C, et al. Study on Porous Silk Fibroin Materials: 2. Preparation and Characteristics of Spongy Porous Silk Fibroin Materials[J]. *J Appl Polym Sci*, 2001, 79: 2 192-2 199.
- [28] Neil T, Bennett, Gregory S. Schultz; Growth Factors and Wound Healing: Part II. Role in Normal and Chronic Annual Conference N8[J]. *Prouts Neck Me, Etats-Unis*, 1993, 165(6): 741-750.
- [29] He S L, Yaszemski M J, Mikos A G, et al. Injectable Biodegradable Polymer Composites Based on Poly(Propylene Fumarate) Crosslinked with Poly(Ethyleneglycol)-Dimethacrylate[J].

- Biomaterials*, 2000, 21: 2 389–2 394.
- [30] Hironi Yamada, Yumiko Igarashi, Yoko Takasu, *et al.* Identification of Fibroin-Derived Peptides Enhancing the Proliferation of Cultured Human Skin Fibroblasts [J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 467–472.
- [31] Katsuya Kawai, Shigehiko Suzuki, Yasuhiko Tabata, *et al.* Accelerated Tissue Regeneration through Incorporation of Basic Fibroblast Growth Factor-Impregnated Gelatin Microspheres into Artificial Dermis[J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 489–499.
- [32] Tyrone John W, Mogford Jon E, Chandler Lois A, *et al.* Collagen-Embedded Platelet-Derived Growth Factor DNA Plasmid, Promotes Wound Healing in a Dermal Ulcer Model[J]. *Journal of Surgical Research*, 93: 230–236.
- [33] Angela Kim, Checkla Daniel M, Philip Dehazya, *et al.* Characterization of DNA-Hyaluronan Matrix for Sustained Gene Transfer[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 90: 81–95.
- [34] Vranckx Jan Jeroen, Daniela Hoeller, Velandar Patrik E M, *et al.* Cell Suspension Cultures of Allogenic Keratinocytes are Efficient Carriers for Ex Vivo Gene Transfer and Accelerate the Healing of Full-Thickness Skin Wounds by over Expression of Human Epidermal Growth Factor [J]. *Wound Rep Reg*, 2007, 15: 657–664.
- [35] Tyrone J, Mogford J, Chandler L, *et al.* Collagen-Embedded Plateletderived Growth Factor DNA Plasmid Promotes Wound Healing in a Dermal Ulcer Model[J]. *J Surg Res*, 2000, 93: 230–236.
- [36] Kim A, Chekla D, Dehazya P, *et al.* Characterization of DNA-Hyaluronic Matrix for Sustained Gene Transfer[J]. *J Cont Rel*, 2003, 90: 81–95.
- [37] Katsuko Furukawa, Takashi Ushida, Kaiko Kunii, *et al.* Effects of Hormone and Growth Factor on Formation of Fibroblast-Aggregates for Tissue-Engineered Skin[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2001, 17: 59–62.
- [38] Sung Ran Hong, Seung Jun Lee. Study on Gelatin-Containing Artificial Skin IV: a Comparative Study on the Inject of Antibiotic and EGF on Cell Proliferation during Epidermal Healing [J]. *Biomaterials*, 2001, 22: 2 777–2 783.
- [39] Waldeck Heather, Chung Amy S, Weiyuan John Kao. Interpenetrating Polymer Networks Containing Gelatin Modified with PEGylated RGD and Soluble KGF: Synthesis, Characterization, and Application in Vivo Critical Dermal Wound[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 82: 861–871.
- [40] Qu Jifu(屈纪富), Cheng Tianmin(程天民), Hao Li(郝利). 参与皮肤伤口愈合的细胞及其作用的研究进展[J]. *Modern Rehabilitation*(现代康复), 2001(5): 74–75.
- [41] Li Jing(李静). 血小板释放的生长因子与组织皮肤创伤愈合的关系[J]. *Chong Qing Medicine*(重庆医学), 2007, 36: 2 157–2 159.
- [42] Qu Jifu(屈纪富), Hao Li(郝利), Sun Wei(孙薇), *et al.* 细胞因子在创伤愈合过程中的变化及其意义的研究进展[J]. *Journal of Traumatic Surgery*(创伤外科杂志), 2003, 5: 74–76.
- [43] Wang Xiaoyun(王晓云), Chen Yulin(陈玉林). 创面愈合的免疫调控[J]. *Modern Rehabilitation*(现代康复), 2001(5): 64–65.
- [44] Yang Li(杨力), Guo Shuyong(郭树忠). 成纤维细胞与创伤修复的生物学过程[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*(中国临床康复), 2002(6): 470–471.
- [45] Affolter M, Weijer C J. Signaling to Cytoskeletal Dynamics during Chemotaxis[J]. *Dev Cell*, 2005, 9: 19–34.
- [46] Haugh J M, Codazzi F, Teruel M, *et al.* Spatial Sensing in Fibroblasts Mediated by 30 Phosphoinositides [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(6): 1 269–1 280.
- [47] Parent C A, Blacklock B J, Froehlich W M, *et al.* G Protein Signaling Events are Activated at the Leading Edge of Chemotactic Cells[J]. *Cell*, 1998, 95(1): 81–91.
- [48] Girish Kumar, Chia Chi Ho, Carlos C Co. Guiding Cell Migration Using One-Way Micropattern Arrays[J]. *Adv Mater*, 2007, 19: 1 084–1 090.
- [49] Deuel T F, Kawahara R S, Mustoe T A, *et al.* Growth Factors and Wound Healing: Platelet-Derived Growth Factor as a Model Cytokine[J]. *Annu Rev Med*, 1991, 42: 567–584.
- [50] Heldin C H, Westermarck B. Mechanism of Action and in Vivo role of Platelet-Derived Growth Factor[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79: 1 283–1 316.
- [51] MatinezbSerrano A, Fischer W, Soderscom S. *et al.* Long-Term Functional Recovery from Age-Induced Spatial Memory Impairments by Nerve Growth Factor Gene Transfer to the Rat Basal Forebrain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6 355–6 360.
- [52] Anton R, Kordower J H, Maindment N T, *et al.* Neural-Targeted Gene Therapy Ion Rodent and Primate Hemiparkinsonism [J]. *Exp Neurol*, 1994, 127: 207–218.
- [53] Snyder E Y, Taylor R M, Wolfe J H. Neural Progenitor Cell Engraftment Corrects Lysosomal Storage Throughout the MPS Mouse Brain[J]. *Nature*, 1995, 374: 367–370.
- [54] Hahn Mariah S, Taite Lakeshia J, Moon James j, *et al.* Photolithographic Patterning of Polyethylene Glycol Hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 2 519–2 524.
- [55] Kang Catherine E, Gemeinhart Ernest J, Gemeinhart Richard A. Cellular Alignment by Grafted Adhesion Peptide Surface Density Gradients[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 71A: 403–411.
- [56] DeLong Solitaire A, Gobin Andrea S, West Jennifer L. Covalent Immobilization of RGDS on Hydrogel Surfaces to Direct Cell Alignment and Migration [J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 109: 139–148.
- [57] Juliano R L, Haskill S. Signal Transduction from the Extracellular Matrix[J]. *Cell Bio*, 1993, 120: 577–585.

- [58] Schwartz M A, Ingber D E. Integrating with Integrins[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 5: 389-393.
- [59] Damsky C H, Werb Z. Signal Transduction by Integrin Receptors for Extracellular Matrix: Cooperative Processing of Extracellular Information[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1992, 4: 772-781.
- [60] Wu C Y, Fields A, Kapteijn B A E, et al. The Role of  $\alpha_4\beta_1$  Integrin in Cell Motility and Fibronectin Matrix Assembly[J]. *Cell Sci*, 1995, 108: 821-829.
- [61] Chan B M C, Matsuura N, Takada Y, et al. In Vitro and in Vivo Consequences of WA-2 Expression on Rhabdomyosarcoma Cells[J]. *Science*, 1990, 251: 1600-1602.
- [62] Gunawan Rico C, Chohan Eric R. Regiospecific Control of Protein Expression in Cells Cultured on Two-Component Counter Gradients of Extracellular Matrix Proteins[J]. *Langmuir*, 2005, 21: 3061-3068.
- [63] Gunawan Rico C, Silvestre Jonathan. Cell Migration and Polarity on Microfabricated Gradients of Extracellular Matrix Proteins[J]. *Langmuir*, 2006, 22, 4: 250-258.
- [64] Kuhl P R, Giffith Cima L G. Tethered Epidermal Growth Factor as a Paradigm for Growth Factor-Induced Stimulation from the Solid Phase[J]. *Nat Med*, 1996(2): 1022-1017.
- [65] Stefonek Tracy Jane, Masters Kristyn S. Immobilized Gradients of Epidermal Growth Factor Promote Accelerated and Directed Keratinocyte Migration[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2007, 15: 847-855.
- [66] Wang Shur Jen, Saadi Wajeeh. Differential Effects of EGF Gradient Profiles on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Chemotaxis[J]. *Experimental Cell Research* 300, 2004: 180-189.
- [67] DeLong Solitaire A, Moon James J, West Jennifer L. Covalently Immobilized Gradients of bFGF on Hydrogel Scaffolds for Directed Cell Migration[J]. *Biomaterial*, 2005, 26: 3227-3234.
- [68] Lingyun Liu, Ratner Buddy D, Sage E Helene, et al. Endothelial Cell Migration on Surfaces-Density Gradients of Fibronectin, VEGF, or Both Protein[J]. *Langmuir*, 2007: 11168-11173.
- [69] Klemke R L, Yebra M, Bayna E M, et al. Receptor Tyrosine Kinase Signaling Required for Integrin  $\alpha_5\beta_1$ -Directed Cell Motility but not Adhesion on Vitronectin[J]. *Cell Biol*, 1994, 127: 859-866.
- [70] Pelham Robert J, Jr, Wang Yu Li. Cell Locomotion and Focal Adhesions are Regulated by Substrate Flexibility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13661-13665.
- [71] Wong Joyce Y, Velasco Alan. Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-Compliant Hydrogels[J]. *Langmuir*, 2003, 19: 1908-1913.
- [72] Wu J J, Zhu T Y, Lu Y G, et al. Hair Follicle Reformation Induced by Dermal Papilla Cells from Human Scalp Skin[J]. *Archives of Dermatological Research*, 2006, 298: 183-190.
- [73] Young Tai Hong, Lee Chiao Yun, Chiu Hsien Ching, et al. Self-Assembly of Dermal Papilla Cells into Inductive Spheroidal Microtissues on Poly(Ethylene-Co-Vinyl Alcohol) Membranes for Hair Follicle Regeneration[J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3521-3530.
- [74] Caissie R, Gingras M, Champigny M F, et al. In Vivo Enhancement of Sensory Perception Recovery in a Tissue-Engineered Skin Enriched with Laminin[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 2988-2993.
- [75] Eves Paula Clare, Beck Alison J, Shard Alex G, et al. A Chemically Defined Surface for the Co-Culture of Melanocytes and Keratinocytes[J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 7068-7081.
- [76] Liu Yuan(刘 源), Jin Yan(金 岩), Wang Xinwen(王新文), et al. 构建含黑色素细胞组织工程皮肤的研究[J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*(中国修复重建外科杂志), 2003, 17(6): 501-503.
- [77] Kuikui Hu, Yucheng Dai, Qionghua Hu, et al. An Experimental Study on the Repair of Full Skin Loss of Nude Mice with Composite Graft of Epidermal Stem Cells[J]. *Burns*, 2006, 32: 416-422.
- [78] Christelle Coraux, Caroline Hilmi, Matthieu Rouleau, et al. Reconstituted Skin from Murine Embryonic Stem Cells[J]. *Current Biology*, 2003, 13: 849-853.
- [79] Qi S, Liu P, Xie J L, et al. Experimental Study on Repairing of Nude Mice Skin Defects with Composite Skin Consisting of Xenogeneic Dermis and Epidermal Stem Cells and Hair Follicle Dermal Papilla Cells[J]. *Burns*, 2008, 34: 385-392.
- [80] Kung E F, Wang F Y, Schechne J S. In Vivo Perfusion of Human Skin Substitutes With Microvessels Formed by Adult Circulating Endothelial Progenitor Cells[J]. *Dermatol Surg*, 2008, 34: 137-146.
- [81] Xie J L, Li T Z. A Study of Using Tissue-Engineered Skin Reconstructed by Candidate Epidermal Stem Cells to Cover the Nude Mice with Full-Thickness Skin Defect[J]. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, 60: 983-990.
- [82] Lin Y, Li H B, Huang J T, et al. Following the Fate of Murine Epidermal Stem Cells in a Syngeneic Dermal Equivalent in Vivo[J]. *Burns*, 2005, 31: 1007-1012.