

胶原蛋白-壳聚糖复合纳米纤维膜用于皮肤缺损的修复**

余丕军^{1,2}, 王露萍³, 郭 好³, 陈 炜³, 莫秀梅⁴

Repair of skin defect with collagen-chitosan compound nanofiber membrane

Yu Pei-jun^{1,2}, Wang Lu-ping³, Guo Yu³, Chen Wei³, Mo Xiu-mei⁴

Abstract

BACKGROUND: Studies *in vitro* have confirmed that collagen-chitosan (80:20) compound nanofiber membranes have excellent mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. However, there are few researches *in vivo* about the materials.

OBJECTIVE: To observe the effect of collagen-chitosan compound nanofiber membranes on repair of full-thickness skin defect on the back of Sprague Dawley (SD) rats.

METHODS: Thirty SD rats with full-thickness skin defects on the back were divided into two groups randomly by lottery method. SD rats treated with collagen-chitosan (80:20) compound nanofiber membrane and oily gauzes on the defects were taken as the experimental group, while those treated with oily gauzes only as the control group. The defects of all rats were fixed with dry gauze bandage at the margin of outer packaging.

RESULTS AND CONCLUSION: The wounds healed basically in the experimental group at 14 days after the repair; hematoxylin-eosin staining showed that the numbers of capillaries were reduced and the content of fibers was increased. While in the control group, wound healed irregularly, and the wound was larger than that in the experimental group; hematoxylin-eosin staining showed that there were more obvious dilated capillaries and a large number of inflammatory cells. The above results indicated that collagen-chitosan compound nanofiber membrane is superior to ordinary gauze in promoting the tissue repair and wound healing of skin defects.

Yu PJ, Wang LP, Guo Y, Chen W, Mo XM. Repair of skin defect with collagen-chitosan compound nanofiber membrane. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(51): 9561-9564. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 体外实验证实: 胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜具有优异的生物力学性能、生物相容性和生物可降解性。但目前缺乏此材料在体内方面的研究。

目的: 观察胶原蛋白-壳聚糖复合纳米纤维膜修复 SD 大鼠背部全层皮肤缺损创面的作用。

方法: 30 只 SD 大鼠制备背部全层皮肤缺损创面后随机抽签法分为 2 组, 实验组用胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜覆盖后, 用油纱及干纱布包扎并创缘外缝线打包固定; 对照组仅用油纱及干纱布包扎并创缘外打包固定。

结果与结论: 修复后 14 d 实验组创面已基本对合, 干痂; 苏木精-伊红染色显示创面毛细血管数量减少, 纤维含量增多。对照组创面对合不整齐, 创面较实验组大; 苏木精-伊红染色显示毛细血管数量较多, 扩张明显, 大量炎性细胞浸润。提示胶原蛋白-壳聚糖复合纳米纤维膜较普通纱布敷料能更好的促进创伤修复、愈合。

关键词: 胶原蛋白; 壳聚糖; 复合纳米纤维膜; 皮肤缺损; 创伤修复

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.51.015

余丕军, 王露萍, 郭好, 陈炜, 莫秀梅. 胶原蛋白-壳聚糖复合纳米纤维膜用于皮肤缺损的修复[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(51):9561-9564. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

皮肤具有保护机体内环境并维持其稳定的作用和功能, 皮肤烧伤、创伤后治疗的最终目标就是促进创面愈合, 重建或恢复皮肤屏障功能。创面愈合的基本过程包括止血、炎症反应、细胞增殖、伤口收缩、组织的重塑等^[1], 上述过程都需要符合细胞生长的微环境, 任何影响这些过程和环境的因素都会影响创面愈合。性能优良的生物敷料既可暂时起到皮肤屏障功能的部分作用, 保护伤口, 防止水分与体液从创面蒸发和流失, 防止污染, 同时又可加速皮肤附件形成的再生上皮化过程, 有效减轻患者的疼痛, 为新皮生长提供一个有利于创面愈合的环

境。因此寻找和制造理想的生物敷料是创伤修复研究的重要任务之一。实验将胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜作为一种生物敷料用于SD大鼠背部全层皮肤缺损创面, 进行该材料促进皮肤缺损修复的动物实验研究。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010-02/10在国家组织工程中心, 上海市组织工程研究重点实验室完成。

材料: 胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜来自东华大学化学工程学与生物工程学院生物材料与组织工程学实验室^[2-4], 经环氧乙

¹College of Clinical Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China;

²Department of Anesthesiology, the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; ³the Eighth People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200235, China;

⁴College of Chemical Engineering and Biological Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China

Yu Pei-jun★, Master Physician, College of Clinical Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China; Department of Anesthesiology, the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China
yupeijun82@163.com

Correspondence to: Chen Wei, Professor, Chief physician, the Eighth People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200235, China
drchenwei@163.com

Correspondence to: Mo Xiu-mei, Professor, College of Chemical Engineering and Biological Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China
xmm@dhu.edu.cn

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China, No. 2008AA03Z305*

Received: 2011-07-14
Accepted: 2011-10-21

¹ 江苏大学临床医学院, 江苏省镇江市 212013; ² 上海交通大学医学院附属第九人民医院麻醉科, 上海市 200011; ³ 上海市第八人民医院, 上海市 200235; ⁴ 东华大学化工与生物工程学院, 上海市 201620

余丕军★, 男, 1982年生, 四川省广元市人, 汉族, 2011年江苏大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事整形外科、皮肤组织工程的研究。yupeijun82@163.com

通讯作者: 陈炜, 教授, 主任医师, 上海市第八人民医院, 上海市 200235 drchenwei@163.com

通讯作者: 莫秀梅, 教授, 东华大学化工与生物工程学院, 上海市 201620 xmm@dhu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)51-09561-04

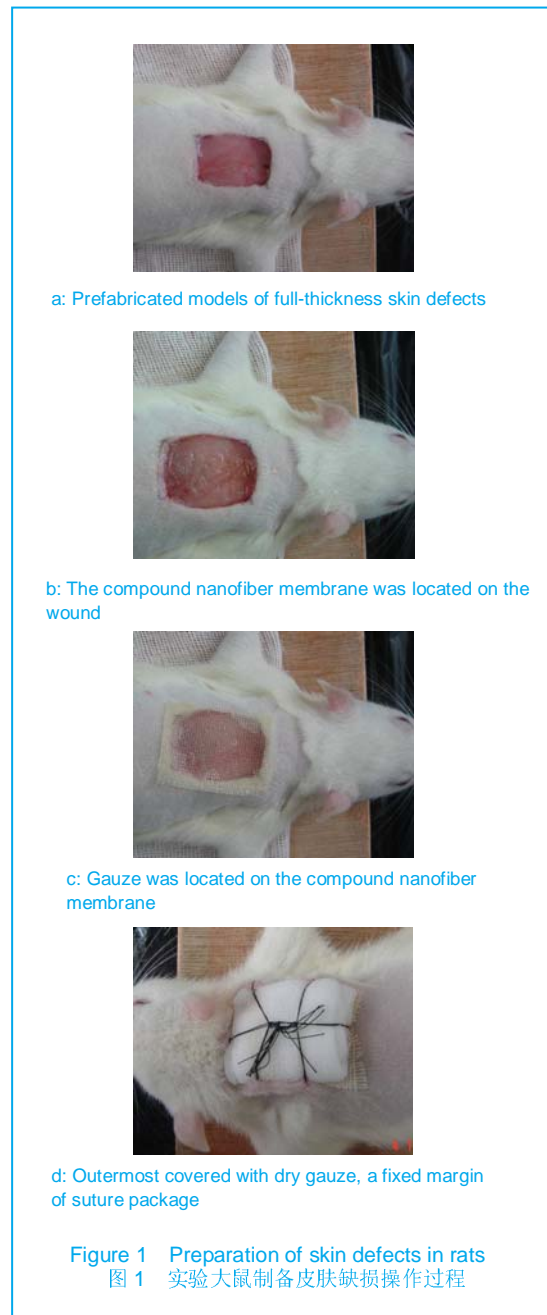
收稿日期: 2011-07-14
修回日期: 2011-10-21 (20110114001/WL-L)

烷灭菌, 灭菌后室温放置^[5]。动物实验前将生物材料放置在适量生理盐水中软化、剪切成 2.0 cm×1.5 cm 备用。

出生 60 d 的雌性 SD 大鼠 30 只, 体质量 200 g 左右, 由中科院斯莱克实验动物中心提供; 动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。

实验方法:

模型制备及干预分组: 将 SD 大鼠麻醉(10%水合氯醛, 3 mL/kg)、固定后, 在其颈胸交界背部造成 2.0 cm×1.5 cm 全层皮肤缺损区域; 随机抽签法分为两组, 每组 15 只, 实验组用胶原蛋白-壳聚糖复合纳米纤维膜覆盖后, 用油纱及干纱布包扎并创缘外缝线打包固定; 对照组仅用油纱及干纱布包扎并创缘外打包固定, 见图 1。



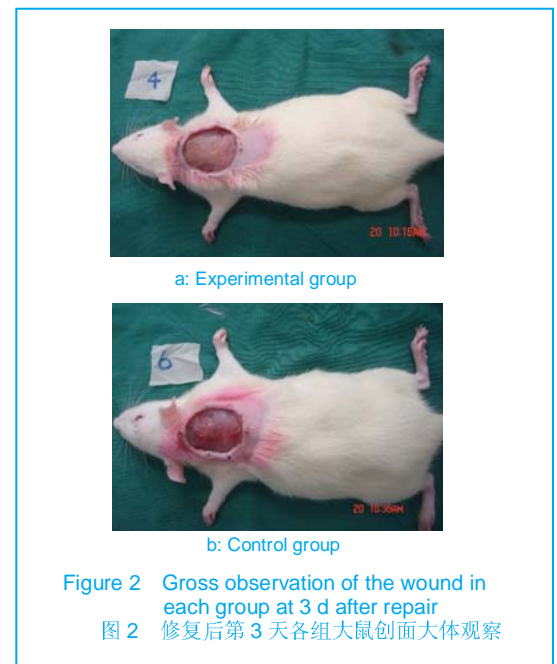
指标检测: 修复后 SD 大鼠分笼饲养, 分别于第 3, 7, 14 天在每组中随机抽取 5 只观察创面情况(数码相机 Nikon), 并取背部创面组织标本行苏木精-伊红染色观察(Olympus 显微镜, 日本)。

主要观察指标: 各组动物创面修复后 3, 7, 14 d 大体观察及创面组织苏木精-伊红染色情况。

2 结果

各组动物创面大体观察及创面组织苏木精-伊红染色情况:

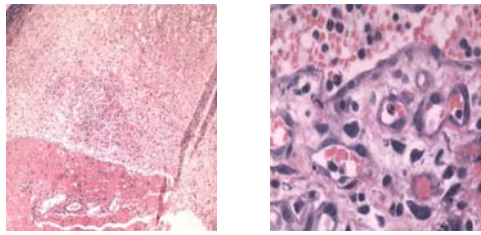
修复后第 3 天: 各组动物健康状况良好; 创面红润, 渗出较多, 渗出液颜色淡红, 纱布辅料被浸湿, 创缘略收缩; 实验组材料较完整, 与创面黏合紧密; 对照组创面干净, 渗出较少, 创缘收缩不明显, 见图 2。



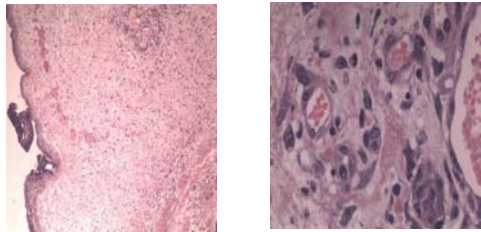
苏木精-伊红染色后显微镜下见有少量坏死组织, 毛细血管增多、扩张, 毛细血管内充血, 大量炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主, 两组炎症反应无明显差别, 见图 3。

修复后第 7 天: 各组动物健康状况良好; 创面红润, 渗出较多, 渗出液淡红, 有感染迹象; 实验组材料大多比较完整, 创面面积与第 3 天相比缩小; 对照组创面结痂, 创面收缩较明显, 见图 4。

苏木精-伊红染色后显微镜下见创缘有大量上皮细胞向创面中心爬行, 毛细血管扩张、充血, 大量纤维蛋白渗出, 炎性细胞浸润明显, 以中性粒细胞、淋巴细胞为主, 见图 5。



a: Experimental group (x40) b: Experimental group (x400)



c: Control group (x40) d: Control group (x400)

Figure 3 Hematoxylin-eosin staining of the tissue sections of wound in each group at 3 d after repair
图3 各组创面修复第3天组织切片苏木精-伊红染色



a: Experimental group

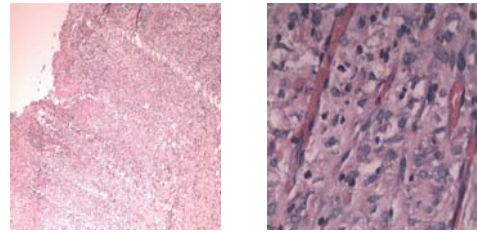


b: Control group

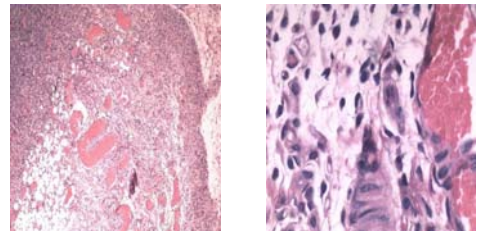
Figure 4 Gross observation of the wound in each group at 7 d after repair
图4 修复后第7天各组大鼠创面大体观察

修复后第14天: 各组动物健康状况良好; 创面干净, 干痂, 无渗出, 创缘收缩明显, 创面无感染迹象; 实验组动物在切取的创面标本中可见创面上方有材料残留; 对照组创面修复情况较实验组差, 见图6。

苏木精-伊红染色后显微镜下见毛细血管扩张、充血明显, 毛细血管数量较前期减少, 代之以纤维含量增多, 排列较整齐, 炎性细胞浸润较前期减少, 以淋巴细胞、中性粒细胞等为主, 对照组炎性细胞浸润尤甚, 见图7。

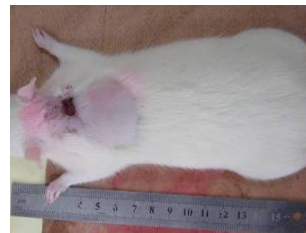


a: Experimental group (x40) b: Experimental group (x400)



c: Control group (x40) d: Control group (x400)

Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of the tissue sections of wound in each group at 7 d after repair
图5 各组创面修复第7天组织切片苏木精-伊红染色

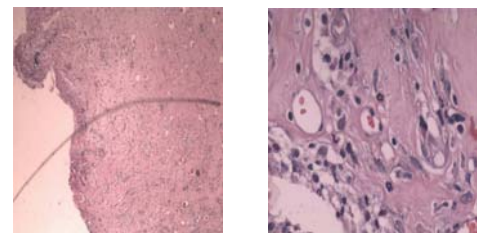


a: Experimental group

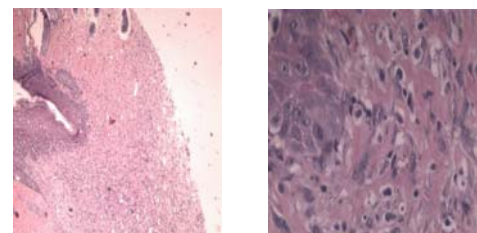


b: Control group

Figure 6 Gross observation of the wound in each group at 14 d after repair
图6 修复后第14天各组大鼠创面大体观察



a: Experimental group (x40) b: Experimental group (x400)



c: Control group (x40) d: Control group (x400)

Figure 7 Hematoxylin-eosin staining of the tissue sections of wound in each group at 14 d after repair
图7 各组创面修复第14天组织切片苏木精-伊红染色

3 讨论

纳米生物技术是国际生物技术领域的前沿和热点问题, 纳米复合生物材料以其优良的组织细胞相容性、力学性能、适当的孔径在生物医学工程领域得到了广泛的应用^[6]。理想的创伤敷料应当具有以下特点: ①良好的生物相容性。②良好的亲和性, 能均匀、紧密地黏附在创面上。③形成良好的透水、透气功能, 使伤口保持高湿、微酸、低氧环境。④阻止细菌侵入和抑菌。⑤控制和吸收创面渗液。⑥保持、促进肉芽和上皮组织正常生长, 促使创面愈合, 不留瘢痕。⑦具有一定的机械强度、柔软、不产生变形^[7]。胶原是哺乳动物体内含量最多的蛋白质, 它具有生物相容性好、易降解、低抗原性的特性, 是组织工程支架中广泛使用的一种生物材料^[8]。然而单纯的胶原降解速度快、机械强度小, 不能很好的促进受损组织的再生。壳聚糖由在自然界广泛分布的甲壳素经脱乙酰化处理制得, 属于天然生物可降解材料, 具有良好的生物相容性和生物安全性等特点^[9-10]。还可通过早期诱导胶原合成而抑制创面收缩^[11]。但壳聚糖成膜后降解时间较长, 为了缩短降解时间, 将壳聚糖与生物相容性好, 易降解的胶原按一定比例混合, 可在一定程度上改善其性能, 弥补其各自的缺点^[12-13]。再通过胶联处理, 制备胶原-壳聚糖多孔材料, 研究表明, 此种生物材料适合表皮细胞、真皮成纤维细胞的迁移和生长, 可以作为一种构建组织工程皮肤的良好支架材料^[14]。实验将纳米高分子材料胶原蛋白-壳聚糖(80:20)按此比例共混合成纳米复合生物材料作为促进创伤修复、愈合的生物敷料。通过对实验动物的大体情况和创面组织苏木精-伊红染色观察, 表明胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合生物材料生物相容性较好, 黏附性好, 力学性能优越, 适合表皮细胞生长和爬行, 对SD大鼠创伤修复有明显的促进作用; 对照组由于仅有纱布敷料覆盖, 多在早期结痂, 创面渗出物积于痂下, 有感染迹象, 影响了创面的修复, 苏木精-伊红染色于修复后14 d还能见到大量的炎性细胞浸润。最后对实验组动物创伤修复综合情况与对照组相比, 胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜作为一种新型生物敷料在促进创伤愈合方面表现出了更强劲的优势。

由此可见, 胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜不仅可以作为一种良好的生物敷料在皮肤烧、创伤中应用, 作为构建组织工程器官的支架、药物缓释的载体等方面也有着广阔的科学研究和临床应用前景。

4 参考文献

- [1] Trott AT. Wounds and Lacerations, Emergency Care and Closure (third edition). Pennsylvania, USA: Mosby, Inc.; 2005.
- [2] Wang PW, Chen ZG, Mo XM, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(1):5-9. 王培伟, 陈宗刚, 莫秀梅, 等. 静电纺壳聚糖/胶原蛋白复合纳米纤维的细胞相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(1):5-9.
- [3] Chen Z, Wei B, Mo X, et al. Mechanical properties of electrospun collagen-chitosan complex single fibers and membrane. Materials Science Engineering C-Materials For Biological Applications. 2009; 29(8):2428-2435.
- [4] Chen Z, Mo X, He C, et al. Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers. Carbohydrate Polymers. 2008;72(3):410-418.
- [5] Cao YL. Beijing: Kexue Chubanshe. 2007:281-282. 曹谊林. 组织工程学. 北京: 科学出版社, 2007:281-282.
- [6] Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. Int J Nanomedicine. 2006;1(1):15-30.
- [7] Zhao GJ. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(14):2701-2704. 赵广建. 几种皮肤生物敷料的生物相容性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(14):2701-2704.
- [8] Li CM, Huang YX, Huang MZ. Mingjiao Kexue yu Jishu. 2003; 23(2):57-62. 李承明, 黄雅欣, 黄明智. 明胶在创伤敷料中的应用[J]. 明胶科学与技术, 2003, 23(2):57-62.
- [9] Cao J, Sun SA, Lu FQ. Zhongguo Gonggong Weisheng. 2005; 21(3):332. 曹晶, 孙淑爱, 卢凤琦. 壳聚糖的生物学评价[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(3):332.
- [10] Liu LM, Tian KL, Fan XQ, et al. Zhongguo Haiyang Yaowu Zazhi. 2005;24(5):39-42. 刘良明, 田昆仑, 范小青, 等. 异丁基壳聚糖多功能敷料的生物安全性[J]. 中国海洋药物杂志, 2005, 24(5):39-42.
- [11] Kojima K, Okamoto Y, Kojima K, et al. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. J Vet Med Sci. 2004;66(12):1595-1598.
- [12] Huang ZL, Jiang GJ, Guo WH, et al. Zhonghua Shaoshang Zazhi. 2004;20(4):239-240. 黄治林, 姜广建, 郭万厚, 等. 透明型明胶/壳聚糖烧伤创面敷料的研制[J]. 中华烧伤杂志, 2004, 20(4):239-240.
- [13] Ma L, Gao C, Mao Z, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. Biomaterials. 2003;24(26):4833-4841.
- [14] Ma L, Gao C, Mao Z, et al. Thermal dehydration treatment and glutaraldehyde cross-linking to increase the biostability of collagen-chitosan porous scaffolds used as dermal equivalent. J Biomater Sci Polym Ed. 2003;14(8):861-874.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家科技部 863 科研基金资助项目 (2008AA03Z305)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计、实验实施为第一、二作者, 实验评估为第一作者, 资料收集为第一、二、三作者, 第一作者成文, 通讯作者审核, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 课题采用静电纺技术将胶原蛋白-壳聚糖按照不同比例混合, 通过活体外研究对不同比例共混复合材料的生物力学性能、生物相容性、生物降解性进行评估, 结果显示, 胶原蛋白-壳聚糖(80:20)复合纳米纤维膜在综合性能方面较为优越。团队也因对研发新材料和新材料的生物医学应用而获得国家科技部 863 科研基金项目的资助。