

丝素胶原蛋白复合支架联合富血小板血浆修复皮肤损伤

刘继超, 赵金龙, 于洋

<https://doi.org/10.12307/2023.416>

投稿日期: 2022-04-27

采用日期: 2022-06-15

修回日期: 2022-08-21

在线日期: 2022-09-20

中图分类号:

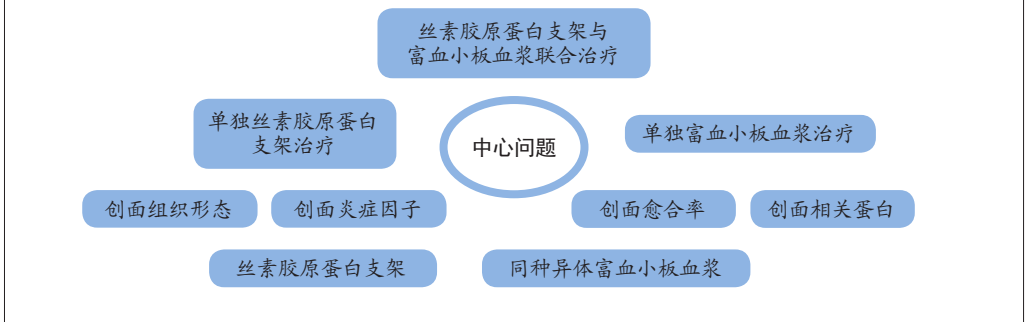
R459.9; R318.08; R622+1

文章编号:

2095-4344(2023)25-03971-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 丝素胶原蛋白支架复合富血小板血浆对损伤皮肤的修复作用



文题释义:

富血小板血浆: 是自体全血经过2次离心后获得的富含生长因子的浓缩血小板的血浆, 其所含血小板浓度为全血的4倍以上, 并且含有多种组织修复需要的生长因子, 可促进组织再生与创面愈合。

胶原: 是动物细胞外基质中最重要的纤维蛋白, 是一种适合细胞生长、黏附与分化的天然基质, 其是机体皮肤创面愈合的基础, 为促进创面愈合的关键因素。

摘要

背景: 胶原与丝素蛋白复合构建的组织工程支架, 在皮肤、神经、血管、骨、软骨等组织工程领域应用广泛。富血小板血浆是血液经过2次离心获得的血小板浓缩物, 含有多种组织修复需要的生长因子, 可促进组织再生与创面愈合。

目的: 观察丝素胶原蛋白支架复合富血小板血浆在皮肤创面愈合中的作用。

方法: 分别制备丝素胶原蛋白支架、SD大鼠富血小板血浆。取8周龄SD大鼠48只, 每只背部制作2个直径2 cm的全层皮肤缺损创面, 分4组处理: 空白组缺损处注射生理盐水, 单纯支架组缺损处植入丝素胶原蛋白复合支架, 富血小板血浆组创缘注射同种异体富血小板血浆, 联合组缺损处植入丝素胶原蛋白复合支架+创缘注射同种异体富血小板血浆, 每组12只。造模后检测创面愈合率、创面炎症因子水平、创面组织学观察及相关蛋白表达。

结果与结论: ①联合组造模后第7, 14天的创面愈合率大于空白组、单纯支架组、富血小板血浆组($P < 0.05$)。②联合组造模后第7, 14天的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6水平平均低于空白组、单纯支架组、富血小板血浆组($P < 0.05$)。③造模后第14天的苏木精-伊红及Masson染色显示, 空白组缺损处仅见少量的新生毛细血管与混乱排列的胶原纤维组织; 其他3组可见大量的新生毛细血管与腺体样组织, 胶原纤维排列较规律, 其中以联合组新生血管最多、腺体样组织层次更清晰、胶原纤维排列更规则。免疫组化染色显示, 空白组、单纯支架组、富血小板血浆组CD31⁺细胞密度少于联合组($P < 0.05$)。④Western blot检测显示, 相较于空白组、单纯支架组、富血小板血浆组, 联合组创面I型胶原、III型胶原、基质金属蛋白酶抑制剂1的蛋白表达升高($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶3、基质金属蛋白酶9蛋白表达降低($P < 0.05$)。⑤结果表明, 丝素胶原蛋白支架复合富血小板血浆可通过抑制炎症反应、增加微血管密度、调节细胞外基质的代谢平衡来促进皮肤创面愈合。

关键词: 丝素胶原蛋白复合支架; 富血小板血浆; 全层皮肤缺损; 皮肤损伤; 创面; 创面愈合

Silk fibroin collagen composite scaffold combined with platelet-rich plasma for repairing skin injury

Liu Jichao, Zhao Jinlong, Yu Yang

The 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Hanzhong 723000, Shaanxi Province, China

Liu Jichao, Associate chief physician, The 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Hanzhong 723000, Shaanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Tissue engineering scaffolds constructed by collagen and silk fibroin are widely used in tissue engineering fields such as skin, nerves, blood vessels, bone, and cartilage. Platelet-rich plasma is a platelet concentrate obtained by centrifuging blood twice. It contains a variety of growth factors required for tissue repair and can promote tissue regeneration and wound healing.

OBJECTIVE: To observe the effect of silk fibroin collagen scaffold combined with platelet-rich plasma on skin wound healing.

METHODS: Silk fibroin collagen scaffolds and SD rat platelet-rich plasma were prepared separately. Totally 48 8-week-old SD rats were selected, and 2 full-thickness skin defect wounds with a diameter of 2 cm were made on the back of each rat. They were randomly divided into four groups ($n=12$). In the blank group, normal saline was injected into the defect site. Silk fibroin-collagen composite scaffolds were implanted in the defects of the simple scaffold group. The platelet-rich plasma group was injected with allogeneic platelet-rich plasma at the wound margin. In the combined group, silk fibroin-collagen composite

西安交通大学医学院附属三二〇一医院, 陕西省汉中市 723000

第一作者: 刘继超, 男, 1976年生, 汉族, 陕西省渭南市人, 副主任医师, 主要从事皮瓣和创伤修复研究。

<https://orcid.org/0000-0002-2921-6046> (刘继超)

引用本文: 刘继超, 赵金龙, 于洋. 丝素胶原蛋白复合支架联合富血小板血浆修复皮肤损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(25):3971-3976.



scaffolds were implanted in the defect site and allogeneic platelet-rich plasma was injected into the wound margin. Wound healing rate, wound inflammatory factor level, wound histological morphology and related protein expression were detected after model establishment.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The wound healing rate of the combined group on days 7 and 14 after modeling was higher than that of the blank group, the simple scaffold group, and the platelet-rich plasma group ($P < 0.05$). (2) The levels of tumor necrosis factor α and interleukin-6 in the combined group on days 7 and 14 days after modeling were lower than those in the blank group, the simple scaffold group, and the platelet-rich plasma group ($P < 0.05$). (3) On day 14 after modeling, hematoxylin-eosin staining and Masson staining showed that only a few new capillaries and disordered collagen fiber tissue were seen at the defect site of the blank group. A large number of new capillaries and glandular tissue were observed in the other three groups. Collagen fibers were arranged more regularly, among which the combined group had the most new blood vessels, the glandular tissue layers were clearer, and the collagen fibers were arranged more regularly. Immunohistochemical staining displayed that the density of CD31⁺ cells in blank group, simple scaffold group and platelet-rich plasma group was lower than that in combined group ($P < 0.05$). (4) Western blot assay results showed that, compared with the blank group, the simple scaffold group, and the platelet-rich plasma group, the protein expression levels of type I collagen, type III collagen, and matrix metalloproteinase inhibitor 1 in the wound were increased in the combined group ($P < 0.05$), and the protein expression levels of matrix metalloproteinase 3 and matrix metalloproteinase 9 decreased ($P < 0.05$). (5) It is concluded that fibroin collagen scaffold combined with platelet-rich plasma can promote wound healing by inhibiting inflammatory response, increasing microvascular density and regulating the metabolic balance of extracellular matrix.

Key words: silk fibroin collagen composite scaffold; platelet-rich plasma; full-thickness skin defect; skin injury; wound surface; wound healing

How to cite this article: LIU JC, ZHAO JL, YU Y. Silk fibroin collagen composite scaffold combined with platelet-rich plasma for repairing skin injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(25):3971-3976.

0 引言 Introduction

皮肤是人体最大的器官,覆盖于全身,完整的皮肤不仅可保持人体体液平衡,还可以阻挡病原微生物的侵袭,防止机械性、物理性与化学性损害,发挥免疫学与代谢功能。皮肤组织极易受到伤害,当损伤面积较小时,创伤可以触发皮肤的修复程序,通过自身周边的健康皮肤移行来达到愈合;但当损伤面积较大时,修复程序启动后不能通过自身周边的健康皮肤移行来达到愈合,将导致外界病原体入侵、机体水分大量丢失、体温调节机制紊乱等^[1-3],因此,修复大面积皮肤损伤至关重要。

近些年来,随着皮肤组织工程学与再生医学的发展,目前已成功构建了多种组织工程化皮肤替代物^[4-7],在慢性创面损伤、组织创伤、皮肤溃疡等方面取得了一定的成果。胶原是动物细胞外基质中最重要的纤维蛋白,是一种适合细胞生长、黏附与分化的天然基质,其是机体皮肤创面愈合的基础,为促进创面愈合的关键因素^[8-10]。作为一种天然的高分子纤维蛋白,丝素蛋白具有良好的生物相容性、透氧性、低免疫原性等优点,可促进角质形成细胞与成纤维细胞的增殖^[11-12]。将胶原与丝素蛋白复合构建的组织工程支架,在皮肤、神经、血管、骨、软骨等组织工程领域应用广泛。

富血小板血浆是血液经过2次离心获得的血小板浓缩物,含有多种组织修复需要的生长因子,可促进组织再生与创面愈合^[13-16]。此次实验以SD大鼠背部创面为模型,观察胶原丝素胶原蛋白支架联合富血小板血浆治疗皮肤创面的效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,多组间比较进行方差分析,两两比较进行t检验。

1.2 时间及地点 实验于2010年9月至2021年12月在西安交通大学医学院完成。

1.3 材料

1.3.1 主要材料 桑蚕丝(四川宁南);聚乙二醇(江苏德纳化学股份有限公司);Tris缓冲液(北京伊诺凯科技有限公司);戊巴比妥钠(北京智杰方远科技有限公司);肿瘤坏死

因子 α Elisa检测试剂盒、白细胞介素6 Elisa检测试剂盒(上海杏宜生物科技有限公司);兔抗鼠CD31抗体(广州万孚生物技术股份有限公司);滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(上海泽叶生物科技有限公司);I型胶原、III型胶原、基质金属蛋白酶3、基质金属蛋白酶9、基质金属蛋白酶抑制剂1抗体(北京博尔迈生物技术有限公司);苏木精-伊红与Masson染色试剂盒(南京生航生物技术有限公司);低速离心机、高速离心机(广州吉迪仪器有限公司);光学显微镜(OLYMPUS,日本);紫外可见分光光度计(青岛聚创世纪环保有限公司)。

1.3.2 实验动物 雄性SD大鼠54只,8周龄,体质量220-260g,购自西安交通大学医学院,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2018-001。其中6只用于制备富血小板血浆,剩余48只用于全层皮肤缺损造模。动物实验获得西安交通大学医学院伦理委员会批准。

1.4 实验方法

1.4.1 制备丝素胶原蛋白复合支架 ①将一定量的桑蚕丝置入浓度0.5%的无水碳酸钠溶液中,90℃煮沸30min×3次;烘干,置入摩尔比为1:2:8的CaCl₂·CH₃CH₂OH·H₂O三元溶液中2h;自然冷却后8000r/min离心10min,取上清液;将上清液放入透析袋中,置于流动自来水中透析2d;置于去离子水中透析1d;置入40%聚乙二醇中12h,制得丝素蛋白溶液,于4℃温度下保存。②剔除新鲜牛腱周围的肌肉、脂肪及筋膜等组织,以三蒸水反复冲洗3次;置于-20℃冰箱保存,直到跟腱变硬,将其切成小碎块;置入碳酸钠溶液中浸泡2h,以蒸馏水漂洗5次,晾干;将小碎块研成粉末,置于-20℃冰箱保存;将牛腱组织与胃蛋白酶按10:3的质量比加入乙酸溶液中,置于4℃冰箱内搅拌5d;随后去除胃蛋白酶,制备牛腱组织匀浆液,3000r/min离心15min,收集上清,置入0.05mol/L Tris缓冲液中1d;收集沉淀,置入含胃蛋白酶的醋酸溶液中,取上清液,置入3.5mol/L NaCl溶液中,获取沉淀,去离子水透析5d,获得胶原蛋白溶液。③按质量比2:1将丝素蛋白溶液与胶原蛋白溶液混合,充分搅拌均匀;将混合溶液真空冷冻干燥后,无水乙醇浸泡

24 h; 置入 0.5% NaOH 溶液中 1 d, 去离子水浸泡 30 min, 制得丝素胶原蛋白复合支架。25 kGy ^{60}Co 灭菌后, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下保存备用。

1.4.2 制备富血小板血浆 取 SD 大鼠 6 只, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (0.2 mL/kg) 后, 将大鼠固定后备皮、消毒, 用含 1 mL 柠檬酸钠抗凝剂的注射器, 以注射的方式从每只大鼠心脏中抽取 10 mL 全血, 将血液与抗凝剂混匀, 分装于离心管内, 5 mL/管, 取 1 mL 用于检测全血血小板浓度; 将剩余的血液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $200\times g$ 离心 15 min 后, 液体分为 3 层, 上层为上清液, 中间为白细胞层 (富含血小板), 下层为红细胞; 吸取上清液与中间层, 置于新的离心管内, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $500\times g$ 离心 10 min, 液体分为 2 层, 上层上清液为贫血小板血浆, 下层为富血小板血浆, 吸取上清液弃掉, 剩下的即为富血小板血浆。取 0.2 mL 用于检测血小板浓度。

1.4.3 皮肤创面制作与实验分组 取 SD 大鼠 48 只, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 背部脱毛后固定于手术操作台上, 背部皮肤消毒后, 利用直径 2 cm 的皮肤打孔器在大鼠背部两侧制作全层皮肤缺损创面。造模后, 采用随机数字表法分 4 组处理, 每组 12 只: 空白组缺损创面注射 0.6 mL 的生理盐水, 单纯支架组缺损创面植入丝素胶原蛋白复合支架, 富血小板血浆组创缘注射 0.6 mL 的富血小板血浆, 联合组缺损创面植入丝素胶原蛋白复合支架, 随后创缘注射 0.6 mL 的富血小板血浆。最后, 使用无菌纱布覆盖包扎创面, 定期更换纱布。术后大鼠饲养于 SPF 级环境中, 自由饮食饮水, 12 h 明暗交替循环。

1.4.4 创面愈合情况 造模后第 0, 7, 14 天, 观察创面愈合情况, 并拍照, 利用 Image J 软件, 设定好标尺, 在需要测量的创面上进行创面边缘勾画, 每只动物测量 5 次, 求平均值, 计算创面愈合率。创面愈合率 = (创面初始面积 - 创面当前面积) / 初始面积 $\times 100\%$ 。

1.4.5 创面炎症因子水平 造模后第 3, 7 天, 每组随机取 3 只大鼠, 创面取材, 采用 Elisa 法检测肿瘤坏死因子 α 与白细胞介素 6 的表达。方法为: 称取创面组织标本 0.5 mg, 加入 500 μL 的 PBS, 置于匀浆器中匀浆, $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 20 min, 收集上清, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取出试剂盒中的 96 孔板, 分标准品孔、空白孔与待测样品孔, 标准孔加入不同浓度的标准品溶液, 空白孔加入蒸馏水, 待测样品孔加入待测样品与检测的抗体, 混匀后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。洗涤后, 除空白孔外其余各孔加酶标液, 置于湿盒内于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h, 随后依次进行洗板、显色、终止反应等步骤, 最后在 450 nm 波长处读取各孔的吸光度值。

1.4.6 创面组织形态观察 造模后第 14 天, 麻醉后处死实验大鼠, 创面取材, 多聚甲醛固定后制备石蜡切片, 脱蜡后分别进行苏木精-伊红与 Masson 染色, 观察创面肉芽组织生长及胶原纤维合成情况。

1.4.7 创面 CD31 免疫组化染色 取创面组织石蜡切片, 以 PBS 冲洗 3 次 $\times 5\ \text{min}$; 加入体积分数 3% H_2O_2 室温孵育

10 min, 再次以 PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次; 滴加 5% 牛血清白蛋白室温孵育 10 min, 随后加入兔抗鼠 CD31 抗体 (稀释比例为 1 : 200), 置于湿盒内 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h; 再次以 PBS 冲洗 3 次 $\times 5\ \text{min}$, 滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (稀释比例为 1 : 500), 置于湿盒内 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 再次以 PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, DAB 显色, 随后依次进行苏木精染色、脱水透明及封固, 镜下观察。

1.4.8 创面 Western blot 检测 利用 Western blot 检测创面 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白 9、基质金属蛋白酶抑制剂 1 蛋白表达。将创面组织剪碎, 加入组织裂解液后匀浆、冰浴, 30 min 后将裂解液移至离心管内, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min, 将制取的上清液分装于新的离心管内, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 BCA 方法检测组织样本蛋白浓度。依据组织样本蛋白浓度确定总蛋白上样量为 40 μg , 向蛋白样品中加入 $5\times$ 蛋白上样缓冲液, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min; 配制分离胶、上样、转膜, 向转好的膜加入封闭液中, 室温孵育 1 h; 加入稀释的一抗 (I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白 9、基质金属蛋白酶抑制剂 1, 稀释比例分别为 1 : 200、1 : 500、1 : 1 000、1 : 500、1 : 3 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h; 回收一抗, 以 TBST 清洗 5 min $\times 3$ 次; 加入稀释的二抗 (稀释比例为 1 : 2 000), 室温孵育 30 min, 以 TBST 清洗 5 min $\times 4$ 次; 最后, 加入 ECL 显影液, 利用凝胶成像仪对条带进行成像。

1.5 主要观察指标 各组大鼠皮肤创面愈合率、炎症因子水平、组织形态及相关蛋白表达。

1.6 统计学分析 所有统计分析均使用软件 SPSS 25.0 进行, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较进行方差分析, 两两比较进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经西安交通大学医学院生物统计学专家审核。

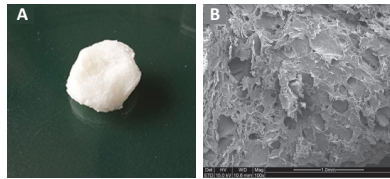
2 结果 Results

2.1 丝素胶原蛋白复合支架的形貌 实验制备的丝素胶原蛋白复合支架的大体观与微观形貌, 见图 1, 扫描电镜下可见不规则的多孔结构与大量的交通孔, 孔与孔之间相互连通。

2.2 富血小板血浆制备情况 此次实验制备的富血小板血浆中的血小板浓度是 $945.34\times 10^9\ \text{L}^{-1}$, 为全血血小板浓度 ($205.46\times 10^9\ \text{L}^{-1}$) 的 4 倍以上, 获得了合格的富血小板血浆制品。

2.3 各组大鼠创面愈合率 造模后, 所有大鼠状态良好, 各组大鼠造模后各时间点的创面大体图片, 见图 2。随着造模时间的延长, 各组大鼠创面逐渐减小, 单纯支架组、富血小板血浆组、联合组造模后第 7, 14 天的创面愈合率均大于空白组 ($P < 0.05$), 联合组造模后第 7, 14 天的创面愈合率大于单纯支架组、富血小板血浆组 ($P < 0.05$), 见表 1, 见图 3。

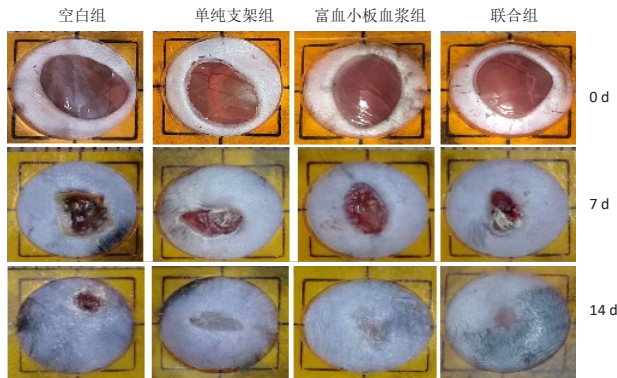
2.4 各组大鼠创面炎症因子表达 随着造模时间的延长, 各组创面组织内肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 水平有所降低 ($P < 0.05$)。造模后第 3, 7 天, 单纯支架组、富血小板血浆组、联合组创面组织内肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 水平低于



图注：A 为大体观；B 为微观形貌，扫描电镜下可见不规则的多孔结构与大量的交通孔，孔与孔之间相互连通

图 1 | 丝素胶原蛋白复合支架的大体观与微观形貌

Figure 1 | General view and microscopic morphology of fibroin collagen composite scaffold



图注：随着造模时间的延长，各组大鼠创面逐渐减小，至 14 d 时，联合组基本愈合

图 2 | 造模后各时间点各组大鼠创面大体图片

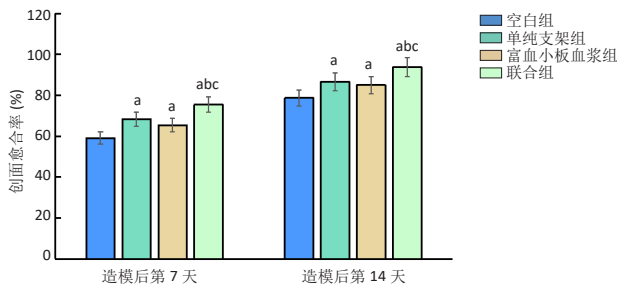
Figure 2 | General images of rat wound in each group at each time point after modeling

表 1 | 造模后不同时间点各组大鼠创面愈合率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 | Comparison of rat wound healing rates in each group at each time point after modeling

组别	造模后第 7 天	造模后第 14 天
空白组	59.12±2.28	78.65±6.84
富血小板血浆组	68.28±6.47 ^a	86.52±5.77 ^a
单纯支架组	65.37±8.29 ^a	84.97±4.98 ^a
联合组	75.38±10.21 ^{abc}	93.75±3.05 ^{abc}
F 值	33.54	21.29
P 值	0.000	0.000

表注：与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与富血小板血浆组比较，^b $P < 0.05$ ；与单纯支架组比较，^c $P < 0.05$



图注：与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与富血小板血浆组比较，^b $P < 0.05$ ；与单纯支架组比较，^c $P < 0.05$

图 3 | 各组大鼠创面愈合率

Figure 3 | Wound healing rate of rats in each group

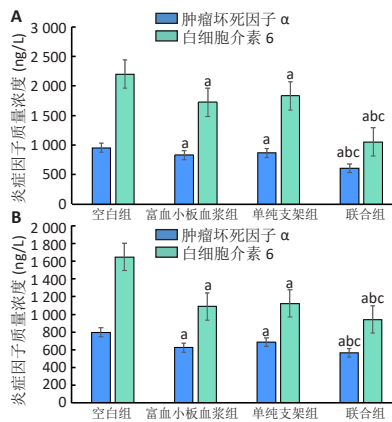
空白组 ($P < 0.05$)，联合组创面组织内肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 的表达均低于单纯支架组、单富血小板血浆组 ($P < 0.05$)，见表 2，见图 4。

表 2 | 造模后各组大鼠创面组织炎症因子的表达 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Table 2 | Expression of inflammatory factors in wound tissues of rats in each group after modeling

组别	造模后第 3 天		造模后第 7 天	
	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 6	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 6
空白组	954.84±12.65	2 201.56±241.96	797.44±25.81	1 648.29±388.21
富血小板血浆组	829.66±21.47 ^a	1 725.53±69.37 ^a	624.33±42.65 ^a	1 088.73±28.99 ^a
单纯支架组	865.31±33.54 ^a	1 832.72±70.33 ^a	686.24±44.91 ^a	1 123.96±87.16 ^a
联合组	606.19±20.17 ^{abc}	1 052.38±56.84 ^{abc}	564.98±87.46 ^{abc}	942.55±69.78 ^{abc}
F 值	22.76	19.82	16.50	21.89
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

表注：与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与富血小板血浆组比较，^b $P < 0.05$ ；与单纯支架组比较，^c $P < 0.05$

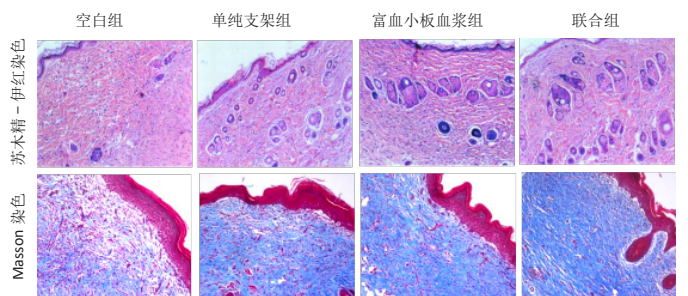


图注：A 为造模后第 3 天结果，B 为造模后第 7 天结果。与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与富血小板血浆组比较，^b $P < 0.05$ ；与单纯支架组比较，^c $P < 0.05$

图 4 | 造模后各组大鼠创面组织炎症因子的质量浓度

Figure 4 | Mass concentrations of inflammatory factors in wound tissues of rats in each group after modeling

2.5 各组大鼠创面组织形态观察结果 苏木精-伊红染色及 Masson 染色后镜下可观察到，空白组缺损部位仅见少量的新生毛细血管与混乱排列的胶原纤维组织，未见明显的腺体样组织；单纯支架组、富血小板血浆组、联合组均可见大量的新生毛细血管与腺体样组织，胶原纤维排列较规律，其中以联合组新生血管最多、腺体样组织层次更清晰、胶原纤维排列更规则，见图 5。



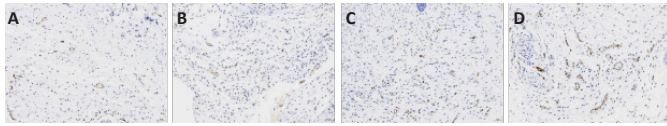
图注：空白组缺损部位仅见少量的新生毛细血管与混乱排列的胶原纤维组织，未见明显的腺体样组织；单纯支架组、富血小板血浆组、联合组均可见大量的新生毛细血管与腺体样组织，胶原纤维排列较规律，其中以联合组新生血管最多、腺体样组织层次更清晰、胶原纤维排列更规则

图 5 | 造模后第 14 天各组大鼠创面形态学观察 ($\times 200$)

Figure 5 | Morphological observation of rat wound surface in each group on day 14 after modeling ($\times 200$)

2.6 各组大鼠创面免疫组化染色结果 4 组大鼠创面组织均可见 CD31 阳性表达，但分布存在一定的差异，见图 6。空白组、单纯支架组、富血小板血浆组、联合组创面 CD31⁺ 细胞密度依次为 (20.28±5.25)，(31.68±4.27)，(36.72±45.89)，

(44.28 ± 3.54) 个/ mm^2 , 4 组间 CD31⁺ 细胞密度比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 并且单纯支架组、富血小板血浆组、联合组创面 CD31⁺ 细胞密度高于空白组 ($P < 0.05$), 联合组高于单纯支架组、富血小板血浆组 ($P < 0.05$)。

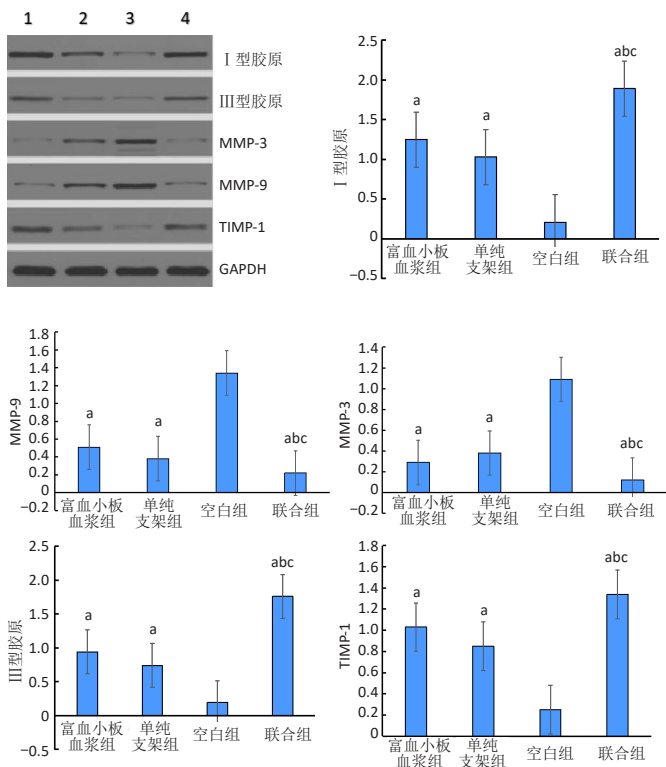


图注: A-D 分别为空白组、单纯支架组、富血小板血浆组、联合组。4 组大鼠创面组织均可见 CD31 阳性表达, 但分布存在一定的差异, 空白组最少, 联合组最多

图 6 | 造模后第 14 天各组大鼠创面 CD31 免疫组化染色 (x100)

Figure 6 | Immunohistochemical staining for CD31 of rat wound in each group on day 14 after modeling (x100)

2.7 各组大鼠创面相关蛋白表达 Western blot 检测结果显示, 相较于空白组, 单纯支架组、富血小板血浆组、联合组创面 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶抑制剂 1 的蛋白相对表达升高 ($P < 0.05$), 单纯支架组、富血小板血浆组、联合组创面基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 9 蛋白相对表达降低 ($P < 0.05$); 相较于单纯支架组、富血小板血浆组, 联合组创面 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶抑制剂 1 蛋白相对表达升高 ($P < 0.05$), 联合组创面基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 9 蛋白相对表达降低 ($P < 0.05$), 见图 7。



图注: 1 代表富血小板血浆组, 2 代表单纯支架组, 3 代表空白组, 4 代表联合组; MMP 为基质金属蛋白酶, TIMP-1 为基质金属蛋白酶抑制剂 1。与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与富血小板血浆组比较, ^b $P < 0.05$; 与单纯支架组比较, ^c $P < 0.05$

图 7 | 造模后 14 天各组大鼠创面相关蛋白表达

Figure 7 | Expression of wound-related proteins in each group on day 14 after modeling

2.8 支架组织相容性 由创面组织学检测可知, 丝素胶原蛋白支架具有良好的组织相容性。

3 讨论 Discussion

支架是组织工程皮肤的重要组成部分。胶原是细胞外基质的重要成分, 在皮肤中具有一定的力学强度, 可有效缓解外界机械压力, 在生物医学中应用广泛。胶原是真皮组织的重要组成部分, 其占真皮干质量的 70%–80%, 主要成分为 I 型胶原、III 型胶原蛋白, 故而, 在构建皮肤组织工程中多采用胶原作为主要支架材料。丝素蛋白是从蚕丝中分离出来的天然高分子纤维蛋白, 具有良好的理化性能与机械性能、良好的韧性与可塑性, 同时其还含有缩氨酸成分, 可促进皮肤组织成纤维细胞的增殖与分化, 可促进创面的愈合。因此, 胶原与丝素蛋白是构建组织工程皮肤的较理想材料。CUI 等^[17]采用冷冻干燥法制备了胶原丝素蛋白支架, 通过一系列检测证实该支架具有良好的孔隙率、保水性、热稳定性和生物相容性, 可促进细胞的增殖、黏附与分化, 可作为皮肤组织工程支架材料。李青等^[18]以丝素胶原蛋白支架为载体负载氧化锌纳米粒, 动物实验证实该复合支架可有效抑制创面炎症反应, 促进皮肤创面修复。综上, 此次实验采用冷冻干燥法制备了丝素胶原蛋白支架, 应用于大鼠皮肤创面修复。

富血小板血浆是自体全血经过 2 次离心后获得的富含生长因子的浓缩血小板的血浆, 其所含血小板浓度为全血的 4 倍以上^[19]。此次实验应用的富血小板血浆中的血小板浓度是 $945.34 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 为全血血小板浓度 ($205.46 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$) 的 4 倍以上, 获得了合格的富血小板血浆制品。所以, 富血小板血浆是自体生长因子的制品之一, 而生长因子主要来源于血小板, 血小板在止血、血管形成、组织修复等过程中具有重要作用。当血小板被激活后, 可释放多种生物活性生长因子^[20-21], 例如: 血小板衍生生长因子, 转化生长因子、表皮生长因子、血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、纤维母细胞生长因子及胰岛素生长因子等, 发挥抑制炎症反应、促进微循环的建立、加速创面的修复的作用, 这些生长因子在组织修复中具有重要的临床意义。

创面的愈合过程需要经历炎症、增殖与塑形 3 个过程^[22], 其中炎症阶段是愈合的基础。人体中产生的各种炎症因子可以破坏或者促进组织的愈合。白细胞介素 6 与肿瘤坏死因子 α 均为促炎症因子^[23-24]。有研究发现, 急性创面中肿瘤坏死因子 α 与白细胞介素 6 的浓度显著升高^[25]; 如果人体内释放过量的肿瘤坏死因子 α 与白细胞介素 6, 将导致局部组织坏死, 抑制组织修复进程。也有研究发现, 创面渗液增加与渗液中白细胞介素 6 浓度升高是造成创面延迟愈合的重要因素。此次实验利用 Elisa 法检测创面组织内肿瘤坏死因子 α 与白细胞介素 6 的浓度, 结果显示: 皮肤创面造模后的白细胞介素 6 与肿瘤坏死因子 α 水平显著升高, 而丝素胶原蛋白支架、富血小板血浆都可以明显降低创面组织内肿瘤坏死因子 α 与白细胞介素 6 的水平, 二者联合应用时降低两种炎症因子浓

度的作用优于单一治疗方法，有利于创面愈合。

创面的病理形态学观察结果显示，未进行治疗的创面新生血管与胶原纤维形成非常有限，而经过丝素胶原蛋白支架、富血小板血浆治疗后，创面的血管形成与胶原纤维均明显增加，并且二者联合应用时的新生血管形成与胶原纤维数量均进一步增加，说明丝素胶原蛋白支架联合富血小板血浆可促进创面的愈合。CD31 又称为血小板-内皮细胞黏附分子，存在于血小板、中性粒细胞、单核细胞和某些类型的 T 细胞表面及内皮细胞间紧密连接处，参与白细胞的迁移、血管生成和整合素的激活。在免疫组化染色中，CD31 主要用于证明内皮细胞组织的存在，用于评估血管生成。此次实验免疫组化染色结果证实，丝素胶原蛋白支架、富血小板血浆均可促进创面新生血管的形成，并且二者联合作用时的新生血管形成更加明显。作者分析：丝素胶原蛋白支架为细胞增殖与分化提供了三维结构空间，而富血小板血浆被激活后释放出大量的生物活性因子，这些因子进一步相互协调，进一步促进细胞的增殖与分化，改善创面局部微环境，促进创面愈合。

基质金属蛋白酶是参与细胞外基质降解的主要蛋白酶类，在创面愈合、血管形成等正常生理过程中，参与基质蛋白的细胞外降解与分解，促进细胞穿越基底膜。细胞外基质与创面成纤维细胞、角质形成细胞的增殖与迁移以及毛发再生等具有密切的关系，细胞外基质的变化与重构、基质降解酶及其抑制酶的共同作用是创面修复的关键。基质金属蛋白酶组织抑制剂可特异性抑制基质金属蛋白酶活性，正常生理情况下，二者之间维持着良好的动态平衡。Western blot 检测结果显示，丝素胶原蛋白支架、富血小板血浆治疗可以降低创面基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 9 蛋白的表达，提高基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 蛋白的表达，说明二者可以调整基质金属蛋白酶与基质金属蛋白酶组织抑制剂之间的平衡，提高创面愈合质量，并且丝素胶原蛋白支架与富血小板血浆联合应用时的创面愈合更快、更好。

此次实验结果显示，与单一治疗方法相比，丝素胶原蛋白支架与富血小板血浆联合应用时可通过抑制炎症反应、增加微血管密度、调节细胞外基质的代谢平衡来促进创面愈合。但是实验还存在很多不足，例如：病理组织学观察时间点较少，未来需要增加时间点来验证实验结果；缺少阳性对照；未来可考虑将富血小板血浆负载于丝素胶原蛋白支架上，观察其对创面愈合的作用。

作者贡献：刘继超进行实验设计，实验实施为刘继超，实验评估为于洋，资料收集为赵金龙，刘继超成文，赵金龙审核。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LI S, MOHAMED AH, SENKOWSKY J, et al. Imaging in Chronic Wound Diagnostics. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2020;9(5):245-263.
- [2] MONAVARIAN M, KADER S, MOEINZADEH S, et al. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019;25(4):294-311.
- [3] ZOMER HD, TRENTIN AG. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci*. 2018;90(1):3-12.
- [4] TARASSOLI SP, JESSOP ZM, AL-SABAHA A, et al. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018;71(5): 615-623.
- [5] BHARDWAJ N, CHOUHAN D, MANDAL BB. Tissue Engineered Skin and Wound Healing: Current Strategies and Future Directions. *Curr Pharm Des*. 2017;23(24): 3455-3482.
- [6] ŁABUŚ W, KITALA D, SZAPSKI M, et al. Tissue Engineering in Skin Substitute. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1345:193-208.
- [7] SUN W, GREGORY DA, TOMEH MA, et al. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1499.
- [8] KALLIS PJ, FRIEDMAN AJ. Collagen Powder in Wound Healing. *J Drugs Dermatol*. 2018;17(4):403-408.
- [9] LIN H, ZHENG Z, YUAN J, et al. Collagen Peptides Derived from *Sipunculus nudus* Accelerate Wound Healing. *Molecules*. 2021;26(5):1385.
- [10] FELICIAN FF, YU RH, LI MZ, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Chin J Traumatol*. 2019;22(1): 12-20.
- [11] NIKAM VS, PUNDE DS, BHANDARI RS. cSilk fibroin nanofibers enhance cell adhesion of blood-derived fibroblast-like cells: A potential application for wound healing. *Indian J Pharmacol*. 2020;52(4):306-312.
- [12] KULKARNI G, GUHA RAY P, BYRAM PK, et al. Tailorable hydrogel of gelatin with silk fibroin and its activation/crosslinking for enhanced proliferation of fibroblast cells. *Int J Biol Macromol*. 2020;164:4073-4083.
- [13] EMER J. Platelet-Rich Plasma (PRP): Current Applications in Dermatology. *Skin Therapy Lett*. 2019;24(5):1-6.
- [14] QIAN Z, WANG H, BAI Y, et al. Improving Chronic Diabetic Wound Healing through an Injectable and Self-Healing Hydrogel with Platelet-Rich Plasma Release. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(50):55659-55674.
- [15] GENTILE P, CALABRESE C, DE ANGELIS B, et al. Impact of the Different Preparation Methods to Obtain Autologous Non-Activated Platelet-Rich Plasma (A-PRP) and Activated Platelet-Rich Plasma (AA-PRP) in Plastic Surgery: Wound Healing and Hair Regrowth Evaluation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):431.
- [16] LOVISOLLO F, CARTON F, GINO S, et al. Platelet rich plasma-derived microvesicles increased in vitro wound healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(18): 9658-9664.
- [17] CUI B, ZHANG C, GAN B, et al. Collagen-tussah silk fibroin hybrid scaffolds loaded with bone mesenchymal stem cells promote skin wound repair in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;109:110611.
- [18] 李青, 全仁夫, 陈利红, 等. 负载纳米氧化锌丝素胶原蛋白支架修复皮肤创面 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(14):2157-2161.
- [19] HESSELER MJ, SHYAM N. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: A systematic review. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(3):834-846.
- [20] KOBAYASHI E, FLÜCKIGER L, FUJIOKA-KOBAYASHI M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353-2360.
- [21] CHOUKROUN J, GHANAATI S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018;44(1):87-95.
- [22] WILKINSON HN, HARDMAN MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*. 2020;10(9):200223.
- [23] SHEN C, YE W, GONG L, et al. Serum interleukin-6, interleukin-17A, and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2021;50(4):418-423.
- [24] KANESHIRO K, SAKAI Y, SUZUKI K, et al. Interleukin-6 and tumour necrosis factor-α cooperatively promote cell cycle regulators and proliferate rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells. *Scand J Rheumatol*. 2019;48(5):353-361.
- [25] KIM YH, YANG IJ, NGUYEN LTH, et al. Effect of Diquafosol on Hyperosmotic Stress-induced Tumor Necrosis Factor-α and Interleukin-6 Expression in Human Corneal Epithelial Cells. *Korean J Ophthalmol*. 2020;34(1):1-10.

(责任编辑: GW, ZN, ZIP)