

· 综 述 ·

# 干细胞与原位培植干细胞再生皮肤文献复习

张 向 清

【关键词】 干细胞 ; 原位 ; 再生皮肤 ; MEBT/MEBO

【中图分类号】R253 【文献标识码】A 【文章编号】1001-0726(2001)03-0203-04

正值世界各国都热中于体外培养干细胞时刻,我国烧伤学者徐荣祥教授已在烧伤患者身上成功地完成了原位培植干细胞再生皮肤技术<sup>[1-8]</sup>,较好的解决了长期困扰烧伤医学发展的难题。顾名思义,原位培植干细胞是让干细胞在烧伤创面原部位分裂、增殖;复制皮肤是说按原来的皮肤样式重新制做。即这种方法既不需要对干细胞进行分离,也不需要干细胞在体外定向诱导,更无需移植培养皮肤的手续,一切都在烧伤病人创面上进行。为加深理解该项技术的理论和技术要点,本文作者对干细胞和皮肤组织体外培养及原位干细胞皮肤再生相关性强的文献进行了全面复习与综合,探讨原位干细胞皮肤再生技术在烧伤临床中的重大意义。

## 一、对干细胞的认识

1. 对干细胞的早期认识 :提到干细胞还得从造血干细胞说起。造血干细胞主要存在于每个儿童和成人的骨髓中,而循环血液中含量甚少。造血干细胞的作用在于它不断地向人体补充红细胞、白细胞和血小板等。因为这些细胞都是人体生命所必需的,但又都是有限的,所以必需由造血细胞经常不断地补充。可以想象,假如一个人没有干细胞的存在,他将无法生存<sup>[1]</sup>。根据造血干细胞动力学估算,一个健康成人每天生成约  $11.5 \times 10^{10}$  个中性粒细胞,  $20 \times 10^{10}$  个红细胞,  $12 \times 10^{10}$  个血小板。这些血细胞的总和约重 200g,即健康成人每年新生的血细胞相当于他的体重<sup>[2]</sup>。然而,对造血细胞起源的初始认识并不这样,历史上曾长期存在着“一元论”、“二元论”、“三元论”及“多元论”之争。自从 1961 年 Till 和 McCulloch 第一次证实了造血干细胞的存在之后,这场争论才有所平息。Till 和 McCulloch 的动物实验研究证实,给纯系小鼠致死量射线照射后不久,血细胞急剧减少,两周左右因感染死亡,小鼠的脾脏变的菲薄。如果从尾静脉给受试动物注射同系正常小鼠的骨髓有核细胞  $10^5$  个,8 天~10 天后脾脏出现脾结节,或称脾集落(spleen colony)。同时证实了脾集落中存在具有自我复制能力和多向分化能力的细胞,而各系血细胞来源于同一种造血干细胞。每一个脾集落由一个造血干细胞分化、增殖而成,即一个脾集落就是一个造血干细胞的克隆<sup>[9]</sup>。研究者将造成脾集落的干细胞称为脾集落形成单位(colony forming unit-spleen, CFU-S),它是多能干细胞。

2. 对干细胞认识上的飞跃:在造血干细胞发现之后的 40 年里,人们不仅对造血干细胞的造血功能进行了更深入的研究,如造血微环境的基本功能、造血细胞的调控和因子调控、造血微环境改变与疾病,以及造血干细胞的体外扩增;同时对干细胞的非造血功能研究也有了进一步发展,因此必须重新认识干细胞。目前认为,干细胞是一种未充分分化且又尚不成熟的细胞,它具有再生各种组织脏器和人体的潜在功能,医学界称之为“万用细胞”。据此人们将人体干细胞分两种类型:一种是全能干细胞,可直接克隆人体;另一种是多能干细胞,可直接复制各种脏器和修复组织<sup>[7]</sup>。所谓全能干细是指精子使卵子受精后所产生的一种具有形成完整有机体能力的单细胞。如果把受精后最初几小时之内的这些细胞的任何一个送入女性子宫内,均有可能发育成胎儿。由此可见,受精卵的潜能是完全的,它在子宫内可以发育成胎儿,即人体的各种细胞。所谓多能干细胞是指全能干细胞经过分化后所产生的专门化的细胞。以受精卵为例,大约在受精后的第 4 天,全能细胞开始专门化,形成一个中空环形体,称之为胚细胞,其表层为细胞外层;内为中心环形,含有一个细胞丛,称为内细胞群并继续发展。假如这种细胞是在子宫内发育形成的,可形成人体所有组织。但是单纯培

养宫内细胞群中的任何一个细胞,它不能而且无法形成人体内所能发现的每一类型的细胞,即不能形成一个生物体。道理很简单,因为它无法生长胚盘以及人体宫内发育所需的支持组织,能生长胚盘和支持组织的物质是胚细胞的细胞外层。因此说,这些内细胞群细胞是多能性的,它能产生许多类型的细胞,如造血干细胞产生红细胞、白细胞和血小板;皮肤干细胞能产生各种类型的皮肤细胞等,但它不能产生胎儿发育所需的全部类型的细胞<sup>[10]</sup>。

3. 干细胞具有潜在的医学应用价值:由于干细胞是一种未充分分化尚不成熟的细胞,它有继续分化的潜能,故医学应用前景广阔。在条件合适的情况下,它可能是多能细胞,可以全部分化形成整个生命体。一般认为,只有从早期胚胎上取到的胚胎干细胞才具备这种原始分化功能。根据人类所掌握的知识,受精卵在母体子宫内经过连续分裂约 10 天左右,形成一个囊泡状结构的胚胎。在胚泡内有一个细胞群,约含 100 个属于最原始的细胞。这 100 个细胞就是未来发育成人体组织的基本细胞—胚胎干细胞。对胚胎干细胞进行分离和通过适当调控,能使每个细胞都具有发育成人体组织的所有 210 种细胞的能力<sup>[11]</sup>。自 1999 年开始,研究人员都注意到干细胞具有这种非凡的潜能,它不仅仅是一种不成熟的细胞,完全有能力成为各种不同的组织,同时也可用于治疗疾病。1998 年底有人宣布他们已经有办法延长细胞年轻化的时间,可将人体胚胎细胞和胎儿细胞保持在最高潜能水平,随时准备将其变成人体细胞的任何细胞,如脑细胞可变为血细胞,骨髓内细胞变为肝细胞<sup>[11]</sup>。几十年来,科学家们认识到某些类型的干细胞可潜伏在成年组织中,如骨髓和皮肤中。不久前人们还认为成年神经系统中没有干细胞,但近几年人们却从大鼠和小鼠的神经系统中分离出神经干细胞。据意大利和美国科学家报道,取自于小鼠脑中的干细胞可在血流和骨髓中居留成为成熟的血细胞。德克萨斯州的科学家发现,肌肉干细胞可变成血液细胞;其它研究报道,大鼠骨髓中的干细胞可能成为脏器细胞。事实上,一些成年组织中确实存有多能干细胞,只是尚未在成年所有组织中发现。另外,正如近年研究所表明的,成年干细胞可以按着自己的系统程序进行分化,但也可以在不同调控机制下改变其演变进程,如血干细胞可以产生皮肤细胞、肝细胞,或除血细胞之外的其它细胞,或某一种类型的血细胞<sup>[2, 10, 11]</sup>。基于上述研究,深化人类成年干细胞的研究对细胞疗法的发展有其极大的利用潜能。

## 二、原位培植干细胞再生皮肤的理论依据

1. 瘢痕愈合围绕着烧伤医学发展:烧伤是一种常见的灾害性疾病。说它是灾害有两个原因,一是几乎所有烧伤病人都由意外伤害所致,重者直接危及生命;二是因治疗不当可造成终身残疾,尤其是深度烧伤。多年来由于人们一直沿用西方干燥暴露模式治疗烧伤,故较大面积深度烧伤病人的最终结局往往是瘢痕愈合,或是毁容损貌,或是功能障碍。可能是由于瘢痕的缘故,而人们习惯地把瘢痕愈合的创面视为深度烧伤。但瘢痕形成机制非常复杂,故为何生疤并不十分清楚,而目前认为与损伤深度超过了皮肤基底层有关,因为损伤了基底层的干细胞。深度烧伤的组织病理判定指标是热力损伤已达真皮层的乳头结构,包括深 II 度和 III 度烧伤。它们又都各自分为两个级别,即深 II 度浅型与深型和浅 III 度与深 III 度。损伤深度仅在乳头层为深 II 度浅型,深至网状层为深 II 度深型。浅 III 度指表皮与真皮层完全坏死,但真皮下的浅表脂肪组织仍蕴蓄着产生干细胞的潜能,因为脂肪层内有较多脂肪隔和少许汗腺细胞;深 III 度是烧伤深度最深的损伤,它毁坏了肌肉乃至骨骼等。尽管肌肉组织也蕴蓄着产生干细胞的潜能,但严格讲这些组织已超出了皮肤范围,在治疗学上不应把肌肉、骨骼等组织烧伤视为单纯皮肤烧伤<sup>[3]</sup>。剖析深度烧伤的主要目的是让大家知道深度烧伤时具有丰富干细胞的基底层完全毁坏,再不能像浅度烧伤那样依靠基底层固有干细胞自行分化、增殖修复创面。

皮肤干细胞虽然主要存在于基底层,但并不是说深层皮肤中就没有分化干细胞的能力,只是量少而已,平时它休眠于皮下组织的毛囊、汗腺、脂肪隔及毛细血管周围的间充质细胞中。即然真皮及皮下组织仍有产生干细胞的潜能,深度烧伤治疗的焦点自然应是保护好这些间充质细胞,让它按着组织修复规律,指令性的启动和转化它为原始的胚胎干细胞,最终变为上皮细胞复盖创面。然而西方传统疗法没有这种功能,因其主要治则是外用某些成痂或刺激性较强的药物,让创面尽快干燥。这样不仅会诱发和加重疼痛或因皮肤脱水而损伤组织细胞,更重要的乃是所使用的外用药物都不具备保护间充质细胞的作用,更无转化干细胞的功能。故深度烧伤采用干燥暴露疗法必然是非生理性瘢痕愈合。

2. 手术疗法与体外皮肤细胞培养的缺陷: 为解脱瘢痕给烧伤病人带来的痛苦, 临床医生和细胞学家们在这方面做了不少努力, 最突出的是实行削痂或切痂植皮手术和体外细胞培养复盖创面。切、削痂手术是由外科技术派生而来的, 手术要求是在彻底切除或削除坏死组织的同时, 切除后的创面一定要有活跃出血点, 以保证移植皮肤的成活。然而多年的临床实践证明这种方法的效果并不理想, 因为切、削痂本身是一种刀伤, 它不仅仅给患者增加了二次乃至多次打击, 更重要的是把许多间充质细胞统统切掉了, 从根本上铲除了产生干细胞的源头<sup>[13]</sup>。

体外皮肤细胞培养大体分为自体与异体培养两种, 总的目的是让皮肤细胞先在体外扩增, 再移植于病人, 以解决自体皮源不足问题, 但该方法并没广泛用于临床。目前比较一致的看法是: ①在体外让表皮细胞扩增数百倍乃至数千倍至少需要一个月的时间, 临床很难实现, 因为待自体皮培养成功再行移植为时已晚; ②体外培养的细胞膜片抗感染能力弱, 新鲜创面移植成活率不到一半, 肉芽创面移植成活率更差; ③体外培养的异体皮移植后仍有排异反应, 同时还可抑制自体皮肤扩展生长<sup>[12]</sup>。当然, 体外培养绝非原位, 更不是顺应自然的修复方式。

3. 浅度烧伤实现皮肤再生的主要因素: 浅度烧伤的通俗概念是指皮肤表浅层烧伤, 它包括 I 度和浅 II 度烧伤。浅 II 度烧伤虽然损伤了大部分基底层, 但未伤及真皮层的乳头结构, 故人们又习惯地把这种烧伤视为浅度烧伤。正由于浅 II 度烧伤还存在部分健康的基底层, 而基底层又是皮肤干细胞最密集的部位, 所以皮肤浅度烧伤后基底层的固有干细胞可以不断分裂、增殖。新生的细胞向上移动, 在棘层部位再分裂 2~3 次形成表皮细胞, 如不发生感染等异常, 最终会完成损伤皮肤的再生修复, 实现无瘢痕生理愈合<sup>[13]</sup>。残存于基底层的健康干细胞就是浅度烧伤能实现皮肤再生的主要物质。其实基底干细胞时刻都进行着分裂、增殖活动, 以保障正常表皮细胞的更新。这种现象是本能的, 对多数学者来说可能是习以为常的事, 但徐荣祥却把它当成了科学的火花, 并产生了一叶知秋的预见。所以他一直在致力于烧伤湿性医疗技术(MEBT/MEBO)的研究, 在获得了大量深 II 度创面无瘢痕愈合的证据之后, 提出了原位干细胞复制皮肤的新概念<sup>[14]</sup>。原位概念的实质内容是在 MEBT/MEBO 实践中产生的, 或者说它产生于临床实践, 最终又为 MEBT/MEBO 能实现生理性愈合提供理论依据<sup>[2]</sup>。由此可见, 原位干细胞复制皮肤不仅只限于表层细胞的自然更新, 也包括浅度烧伤愈合过程, 而且是顺应于自然的修复。

### 三、原位培植干细胞复制皮肤的技术要点

1. 原位培植干细胞复制皮肤的技术难点: 要使深度烧伤像浅度烧伤那样能实现原位干细胞复制皮肤, 其技术难点至少有两个, 一是真皮及皮下组织中没有现成的干细胞, 需要从毛囊、汗腺及脂肪隔的间充质细胞中转化产生。根据细胞周期调控原理, 让一种细胞转化为另一种细胞必须先有一种物质启动它。二是间充质细胞转化成干细胞后还得再经过多次分裂、增殖, 形成原位干细胞的胚胎式组合, 最终变成表皮细胞。但这个过程要比固有干细胞的转化过程复杂的多, 其中最重要的一点就是仅靠几次分裂远不能达到目的, 需要连续不断地分裂、增殖。由此看来, 干细胞的转化过程也需要一种物质不断地进行催化, 否则会在分裂和向创面表层移动途中夭折<sup>[13]</sup>。

2. 促使烧伤皮肤再生的理想药物: 如上所述, 假如有一种药物能解决以上难题, 烧伤皮肤再生可能成为事实。十几年的临床和实验研究表明, 徐荣祥教授研制的湿润烧伤膏(MEBO)具有启动和转化干细胞的作用。主要佐证有三个: 一是深 II 度创面大部分能实现无瘢痕愈合, 浅 III 度创面愈合后多无功能障碍<sup>[15]</sup>。二是同一动物身上的深 II 度创面分别采用 MEBO 和磺胺嘧啶银治疗, 结果截然不同, 前者为无瘢痕愈合, 后者为瘢痕愈合。三是利用抗体角蛋白 19 型单克隆抗体生物素—抗生物素 DCS 体系间接免疫荧光技术, 准确而特异性的在 MEBO 治疗的深 II 与浅 III 度创面组织中查到残存的表皮再生干细胞。干细胞的再生过程是伤后 2 小时启动并开始分裂, 此时渗出已开始, 细胞可从中获得生物素。第 4 天几乎所有湿性液体里都布满了原始的干细胞。第 7 天创面液化逐渐成熟, 细胞生长进入高峰期, 14 天达最高峰。随之深 II 与浅 III 度创面修复完整。当表皮细胞一旦修复, 再不会查到 19 型角蛋白。这就是我们所说的干细胞的生长规律是一个从无到有, 从少到多, 再从多到少, 从少到无的过程。根据以上研究结果, 可以断定 MEBO 在干细胞再生启动过程中必

然起到重要作用,它能激活休眠状态的潜在表皮干细胞的再生,从而保障了深Ⅱ和浅Ⅲ度烧伤创面能够实现自然修复和无瘢痕愈合<sup>[6]</sup>。

关于 MEBO 能促进表皮细胞分裂、增殖的研究也在美国得了证实,只不过是体外研究,但它晚于我国的临床研究。1991 年巴巴拉进行了以下三项实验:一是利用 MEBO 进行体外细胞培养,证实了装有细胞培养液并放入上皮细胞,然后再放入 MEBO 的培养基中的上皮细胞变成了基底细胞,且生长速度非常地快;二是将成块真皮放入细胞培养液中进行培养,发现残留在真皮内的残存毛囊腺细胞及毛囊腺在 MEBO 环境中再生速度也非常地快,再生的毛囊腺和毛囊器的形状与正常原有的相同;三是对使用 MEBO 后的组织细胞再生基因工程研究证实,其中的 DNA、RNA 的数量显著增加,说明细胞分裂速度加快。尽管是体外研究,无疑也为基底层细胞在 MEBO 创造的生理湿润环境中能转化成表皮细胞提供了理论依据<sup>[21]</sup>。

3. 烧伤湿性医疗技术与烧伤皮肤再生:烧伤湿性医疗技术(MEBT/MEBO)由烧伤湿润暴露疗法(MEBT)和湿润烧伤膏(MEBO)构成。不言而喻,该项技术的实质是“湿润”,让烧伤组织立体式暴露于生理的湿润环境中<sup>[13,14]</sup>。但这种湿润非同于水,只要对烧伤创面正规实施 MEBT/MEBO 治疗,局部环境一定是生理性湿润而不发生浸渍,因为 MEBO 是根据仿生学原理制做的,它给烧伤组织细胞提供的环境与正常相似,或者说它就是烧伤皮肤再生修复的培养基<sup>[16]</sup>。在 MEBO 为创面提供生理湿润环境的同时,烧伤坏死组织和代谢产物无损伤的由表入里地液化、排除,保障残存皮肤组织向干细胞方向转化。MEBO 在促使创面液化过程中逐渐形成一层透明膜,并与新生血管形成生理性粘着。透明膜是保障创面生理湿润和新生组织立体式修复的先决条件,所以要十分小心地保护好这层薄膜。假如去除或撕掉将有许多血液渗出,同时也损伤了许多新生细胞,生理性湿润也就无从谈起。总之,只有不间断地涂药让创面置于立体式生理性湿润环境中,才能无损伤地液化、排除坏死组织,保障干细胞的产生和转化,最终实现烧伤皮肤再生愈合。

#### 参考文献

- [1] 阎新华. 挑战科学生命前沿—解读徐荣祥和他的干细胞移植研究. 中国烧伤创疡杂志, 2001(1): 1-16.
- [2] 石天. 破解人类生命前沿科学之迷——徐荣祥与他的干细胞研究. 光明日报, 2001 年 1 月 1 日, 1 版.
- [3] 我国原位干细胞皮肤再生修复研究获得重大突破(新闻稿). 中国烧伤创疡杂志, 2000,(3) 1.
- [4] 中国烧伤科技中心. 原位干细胞皮肤再生复制研究的背景. 中国烧伤创疡杂志, 2000,(3) 5-6.
- [5] 徐荣祥. 中国烧伤皮肤再生成就. 中国烧伤创疡杂志, 2000,(3) 9-12.
- [6] 徐荣祥, 许增禄. 烧伤湿性医疗技术对皮肤再生干细胞作用的研究. 中国烧伤创疡杂志, 2000,(3) 41-43.
- [7] 谢尔凡. 烧伤皮肤再生修复的新成果. 健康报, 2001 年 2 月 6 日, 4 版.
- [8] 徐荣祥. 烧伤医疗技术蓝皮书(一卷). 中国医药科技出版社, 2000, 63-67.
- [9] 扬惠玲, 潘景轩, 吴伟康. 高级病理生理学(一版). 科学技术出版社, 1998, 212.
- [10] 干细胞读本. 中国烧伤创疡杂志, 2000(3) 18-24.
- [11] 林苏梅译. 本年度重大成果之首: 抓住年轻的希望(单行册). 中国烧伤创疡科技中心, 2000.
- [12] 黎鳌. 烧伤治疗学(二版). 人民卫生出版社, 1997, 524-536.
- [13] 张向清. 烧伤皮肤再生的核心技术—原位培植干细胞复制皮肤. 健康报, 2001 年 7 月 3 日, 4 版.
- [14] 徐荣祥. 大面积深度烧伤原位干细胞皮肤培植及系统治疗. 中国烧伤创疡杂志, 2001,(1) 20-29.
- [15] 罗成群. 烧伤烫伤皮肤再生修复已成为现实. 健康报. 2001 年 3 月 6 日, 4 版.
- [16] 王广顺. 烧伤烫伤皮肤再生修复专用品—美宝湿润烧伤膏. 健康报, 2001 年 4 月 3 日, 4 版.

(收稿日期 2001-06-01)

#### 【作者简介】

张向清(1938-),男(汉族),山东德州人,山东医科大学毕业,副院长,主任医师.