



图 31 人胃溃疡, 治疗前。



图 32 人胃溃疡, GIC 治疗后痊愈。



图 33 人十二指肠球部溃疡, 治疗前。



图 34 人十二指肠球部溃疡, GIC 治疗后痊愈。

成体干细胞原位再生修复深度烧伤创面的研究 ——在第十九届夏威夷国际烧伤会议上的报告

徐荣祥¹, 许增禄²

【摘 要】 目的 利用深度烧伤创面的残存皮下组织细胞的皮肤干细胞再生潜能进行培植, 实现皮肤全层功能器官的原位全部再生。方法 以成人深度烧伤为研究对象, 以人体原位角蛋白 19 型表皮干细胞作为皮肤干细胞标志, 以人体原位未传代的组织切片连续跟踪皮肤全层原位再生复制全过程。结果 1、烧伤后残存的皮下组织细胞可转化为皮肤干细胞 2、原位成体干细胞可再生复制全层皮肤器官 3、成体干细胞再生复制皮肤全层器官是同由人体再生潜能和人为调控共同完成 4、成体干细胞再生复制皮肤全层器官已成功用于特大面积、特重烧伤的临床治疗。结论 利用成体干细胞原位再生复制修复创面是从临床实践获得的成果, 为人类提供了保障健康长寿的生命技术、方法和物质, 使人们从对干细胞的研究从单细胞生命活动的探索阶段, 直接跨入了生命体实际应用阶段, 开辟了再生医学的新领域。

【关键词】 成体干细胞 再生 原位 创面修复 烧伤 MEBT/MEBO

【中图分类号】 Q253 ; R644 ; R45 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726(2002)02-0071-07

[作者单位] 1. 北京光明中医烧伤创疡研究所, 北京 100053。

2. 北京协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005。

万方数据

Studies on Repairing Deep Burn Wounds by Regeneration of Adult Stem Cells in vivo and in situ XU Rong - xiang ,
XU Zeng - lu . Beijing Guangming Chinese Medicine Institute for Burns , Wounds and Ulcers , Beijing 100053 , China

【Abstract】Objective : To achieve functional full - thickness skin regeneration in vivo and in situ by culturing adult stem cells converting from potential histocytes in viable subcutaneous tissues of deep burn wound. **Methods :** Adult patient with deep burns was enrolled in the study. Using keratin type 19 (K - 19) epidermal stem cells as markers of skin stem cells , we synchronously and continually tracked the entire process of the regeneration and repair of full - thickness skin in vivo and in situ through microscopic examination of the tissue sections from the burn wounds. **Results :** (1) Subsequent to burns , the adult tissue cells in residual viable subcutaneous tissues could be reconverted into adult stem cells. (2) Adult stem cells had potentials to regenerate and duplicate full - thickness skin. (3) The aforementioned regeneration and duplication were accomplished by the collaborative efforts of body regenerative potentials and contrived regulations. (4) The technology of regeneration and duplication of full - thickness skin by adult stem cells has been in successful clinical application for treating extremely extensive and deep burns. **Conclusion :** We discovered the way to repair and regenerate skin by cultivating stem cells in vivo and in situ from clinical practices and results in organ regeneration of the skin in deep burn patients , which provided an innovative life technology , method and composition for good health and longevity. The discovery advanced stem cell research from exploring vital activity of a single cell into actual application field for human being , and thereby opened a new realm of regenerative medicine.

【Key words】 Adult stem cells ; Regeneration ; in vivo and in situ ; Wound healing ; Burns ; MEBT/MEBO

【CLC number】 Q253 ;R644 ;R45 **【Document code】** A **【Article ID】** 1001-0726(2002)02-0071-07

目前 ,科学家们在干细胞的研究上不断的获得成绩 ,总结世界的研究报道 ,其干细胞研究方法有三大类 ,其一是胚胎或成体干细胞体外组织培植移植技术研究系统 ;其二是体外胚胎或成体干细胞的单细胞培植移植技术研究体系 ;其三是体内干细胞原位组织培植技术研究体系。前两者的医学目标是通过移植体外培植的干细胞或组织器官 ,达到治疗器官组织损伤性疾病的目的 ;后者是作者发明建立的技术研究体系 ,医学目标是通过激活和调动器官组织原位局部的干细胞潜能 ,原位再生组织和器官 ,直接再生修复和修补损伤的组织器官 ,达到治疗器官组织损伤的目的。本文介绍在深度烧伤创面上如何原位培植表皮角蛋白 19 型干细胞的技术程序情况。

什么叫原位干细胞培植 ? 原位干细胞是指 :体内组织器官局部存在的干细胞和具有干细胞潜能的特殊组织细胞。其特点是存在于成体器官组织中 ,可转化为更原始和增殖能力的细胞 ,可直接在器官组织中再生为具有与原组织相同功能和结构的器官组织 ,其组织与原有器官组织再生为一体。实现这一原位组织修复技术的技术称原位干细胞培植技术。

一、材料与方法

1. 研究病例选择 :有全厚皮深度烧伤创面的、年龄大于 25 岁的患者。(1)干细胞标记实验创面 :下肢深度烧伤。(2)临床重复创面 :面部深度烧伤。(3)临床扩大实验 :大面积深度烧伤患者。

2. 临床技术 :伤后采用无损伤性液化排除坏死皮肤组织和原位创面活组织培养技术(MEBT)。

3. 外用细胞培植物质 :选用创面全营养培养基(MEBO - 2)。

4. 取材 :按全厚皮烧伤创面的再生愈合程序 ,定期于烧伤早期(伤后 2 小时内 ,治疗前。取材后立即行 MEBT 和 MEBO - 2 治疗)以及伤后 24 小时、第 4 天、7 天、14 天、21 天和 28 天 ,分别取创面活组织和创面周围未烧伤区皮肤活组织。每一份标本均分为两部分 ,一部分立即液氮保存 ,OCT 包埋 ,恒冷箱冰冻切片 ;另一部分福尔马林固定 ,石蜡包埋、切片。

5. 干细胞标记实验方法 :选角蛋白 19 型表皮干细胞作为特异阳性干细胞。冰冻切片用 10 % 马血清孵育 ;1 :20 小鼠抗人角蛋白 19 型单克隆抗体孵育 ;7.5 μ g/ml 生物素化的马抗小鼠 IgG 抗体孵育 ;10 μ g/ml 荧光素—抗生物素蛋白 DCS 孵育 ;甘油封片。对照染色切片不加第 1 抗体。Olympus 反射式荧光显微镜观察 ,ASA 400 KODAK 胶卷照相。

6. 石蜡切片 HE 染色 ,镜检 ,照相。

二、结 果

1. 干细胞标记实验创面 :连续跟踪烧伤创面角蛋白 19 型表皮干细胞表达的研究发现 ,烧伤早期(伤后 2 小时内 ,治疗前)的创面和未烧伤皮肤组织 ,均未查见角蛋白阳性的 19 型表皮干细胞 ,病理检查示表皮和真皮全层坏死。伤后 24 小时则查见有 19 型表皮干细胞表达 ;第 7 天开始增多 ,向高峰发展 ,

皮下组织间质细胞开始增殖。第 14、21 天角蛋白 19 型表皮干细胞表达达高峰,同时组织学观察见形成真皮的组织向皮肤深层方向移动,形成表皮的组织向皮肤表层移动,形成其它皮肤附件的细胞群逐渐定位成形。而后角蛋白 19 型表皮干细胞表达逐渐减少,到第 28 天降到最低点。同时,创面第 28 天基本愈合,真皮、表皮修复完全(见图 1-11)。

2. 面部深度烧伤重复实验 (1) 面部烧伤半小时(年龄 58 岁),立即取创面活组织检查为全厚皮坏死(见图 12-13)。(2) 立即行 MEBT 疗法,将皮肤耕耘至深部活组织,外涂 MEBO-2,使 MEBO-2 直接渗入到创面下活组织(见图 14-15)。(3) 无损伤液化排除坏死皮肤层(见图 16)。(4) 继续培养创面活组织,创面下活组织组织学显示呈皮肤干细胞增殖生长状态(见图 17-18)。(5) 继续培植创面,见与创面基底生理连接的正常结构皮肤从创面中透出(见图 19-20)。(6) 继续培植 50 天,面部正常结构的皮肤原位完全再生(见图 21),原位干细胞原位复制皮肤完成。

3. 临床扩大实验:原位培植皮肤技术治疗烧伤,在全身系统外科治疗的配合下,已成为重要可靠的大面积烧伤治疗技术。现展示大面积烧伤治疗所获的再生新皮肤的实体状态(见图 22-30)。

三、讨 论

(一) 原位表皮干细胞研究实验论证说明

1. 角蛋白 19 型表皮干细胞:多种研究一致认为,人的皮肤中的表皮基底细胞、毛囊、腺体中均存在表皮干细胞,有的接近成体细胞,有的仍具有较原始的分化能力,如毛囊中的干细胞。从而人们把这些干细胞按其原始分化能力和角蛋白的表达类型,分多种类型。公认的事实,在正常皮肤中,存有小于角蛋白 16 型的表皮干细胞。而本课题选定的角蛋白 19 型表皮干细胞,是皮肤器官组织胚胎形成中的表皮干细胞,在皮肤形成成体器官后,表皮干细胞不再表达为 19 型。所以,本课题选角蛋白 19 型作为表达检查干细胞具有特异性,以区分其他表皮干细胞。排除其他表皮干细胞的干扰。本实验证明,用同样的方法检查未烧伤区皮肤组织,未查见角蛋白 19 型表皮干细胞。以此说明实验设计的可靠性。

2. 活检组织处理方法:由于本实验为原位干细胞实验,不能用细胞传代的方法进行细胞检查鉴定,因细胞传代则无法证明原位细胞的特性,也就是说,万方数据

对传代细胞的鉴定不能代表原位细胞的鉴定,两者有质的区别。本实验采取对活检组织立即冰冻、阻止细胞传代的方法,有其特异的准确性,细胞标本真实,活检组织的表达与原位细胞一致。

(二) 原位培植方法说明

本实验采取的是一种在烧伤后直接在活组织原位培植表皮干细胞的方法,实现其方法有三个关键环节,其一、设法尽快在烧伤后将干细胞培养基送到原位;其二、是如何尽快无损伤清除影响表皮干细胞再生的坏死皮肤;其三、如何在创面上原位培植干细胞再生皮肤。这三大技术是培植原位干细胞的关键,也是外科医生的技术实施水平体现。由于这些技术是专项的临床应用操作技术,将在另一专题中分别介绍。

(三) MEBO-2 的说明

MEBO-2 是专门用于培养皮肤的产品,全由营养物质组成,具有激活和诱导具有干细胞潜能的细胞增殖的作用,具有调节表皮干细胞和成纤维细胞再生增殖的作用;具有创造创面生理微环境的作用;具有营养保护创面的作用;他是一种由多种天然成分组成的组合物。目前仍在商业秘密阶段。

(四) 角蛋白 19 型表皮干细胞表达规律

从本实验结果表明,全厚皮肤烧伤坏死后,残存于皮下组织中的具有表皮干细胞潜能的某些组织细胞,可被激活和诱导成角蛋白 19 型表皮干细胞,而新出现的角蛋白 19 型干细胞在创面愈合过程中增殖活跃,在创面修复的高峰期,其量也达高峰;而在愈合后期,其量逐渐减少,很可能是 19 型表皮干细胞已向成体型细胞转化,形成组织所至。在组织切片检查中证实了这一规律。关于角蛋白 19 型干细胞被激活和被诱导的机制及基因表达研究,也将另行报道。

(五) 原位表皮干细胞培植技术的科学价值和评价

人体皮肤是最大、功能最多、含器官组织最多的器官,原位角蛋白 19 型表皮干细胞的培植成功,不仅给深度烧伤的治疗提供了保守治疗的新方法,而且给人体原位组织器官的原位干细胞再生技术创出了一条新路。但是本实验仅报道了表皮干细胞的培植情况,而皮肤器官中的多种细胞组织的培植情况尚待继续报道和研究。

研究成果与临床效果图片展示

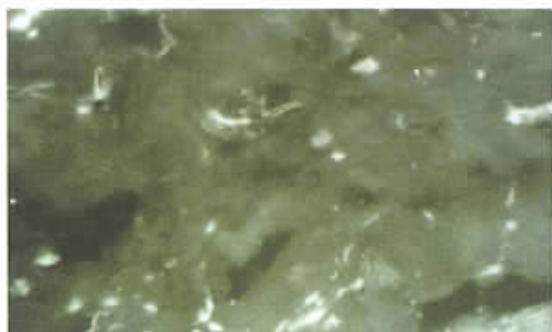


图1 未烧伤正常皮肤组织,未见角蛋白19型表皮干细胞。

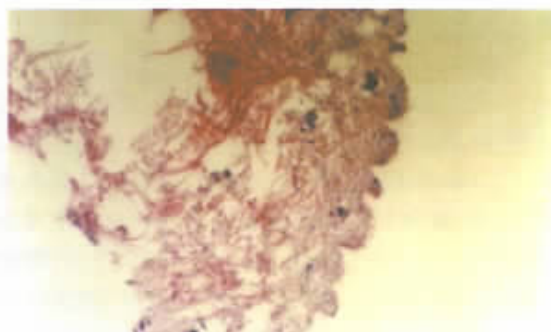


图2 病理检查示表皮和真皮全层坏死。



图3 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后24小时,可见中等程度角蛋白19型阳性细胞。

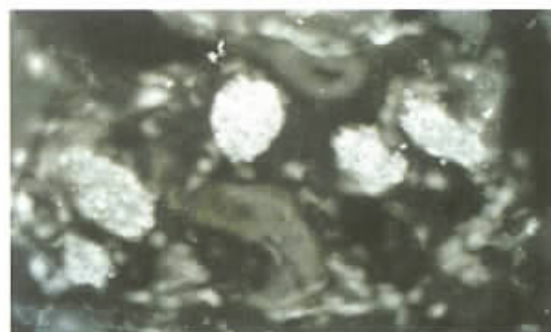


图4 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后4天,角蛋白19型阳性细胞增多。

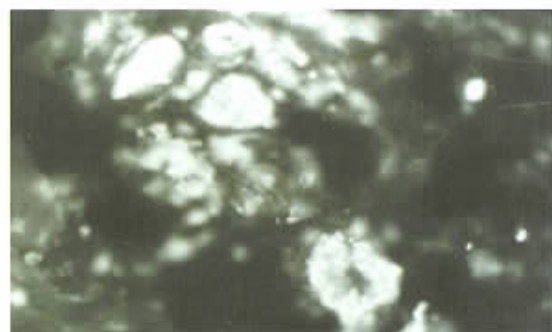


图5 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后7天,角蛋白19型阳性细胞数量达到峰值。

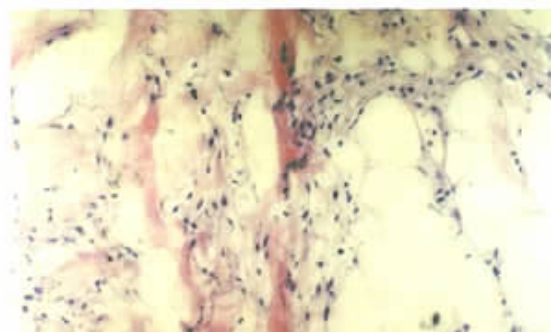


图6 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后7天,皮下组织间质细胞开始增殖。

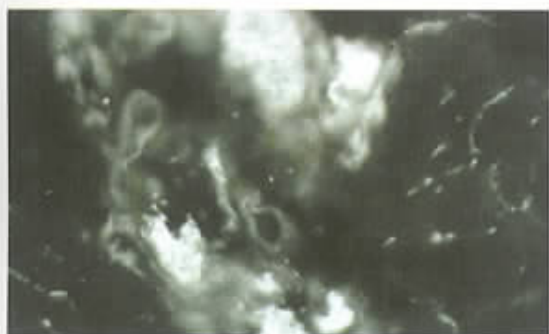


图7 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后14天,角蛋白19型阳性细胞数量达到峰值。

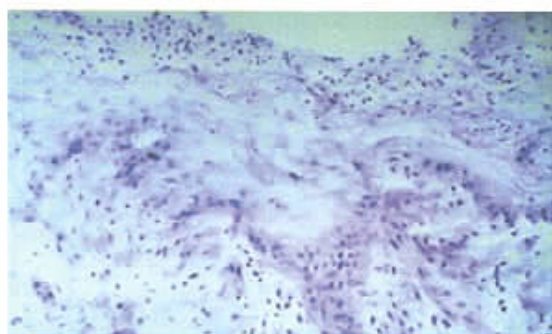


图8 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后14天,形成真皮的组织向皮肤深层方向移动,形成表皮的组织向皮肤表层移动,形成其它皮肤附件的细胞群逐渐定位成形。

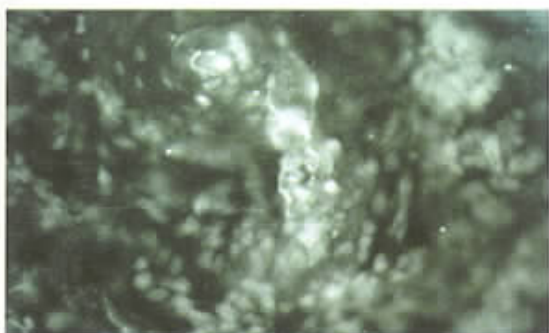


图9 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后21天,角蛋白19型阳性细胞减少。

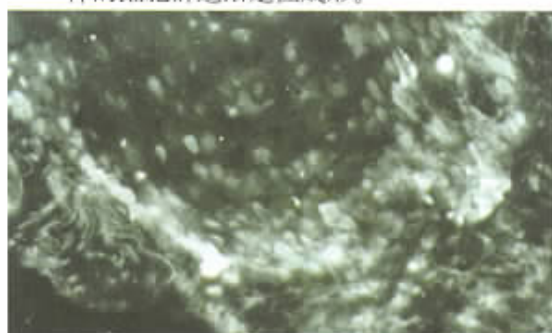


图10 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后28天,角蛋白19型阳性细胞减少。×200。



图11 经MEBT/MEBO-2治疗,烧伤后28天,创面基本愈合,真皮、表皮修复完全。



图12 男,58岁,面部汽油火焰烧伤30分钟,无渗出,无疼痛。



图13 创面活组织检查为全厚皮坏死。



图14 立即行MEBT疗法,将皮肤耕耘至深部活组织。



图 15 外涂 MEBO-2, 使 MEBO-2 直接渗入到创面下活组织。



图 17 继续培养创面活组织。



图 19 继续培植创面。



图 21 继续培植, 第 50 天, 面部正常结构的皮肤原位完全再生, 原位干细胞原位复制皮肤完成。



图 16 无损伤液化排除坏死皮肤层。

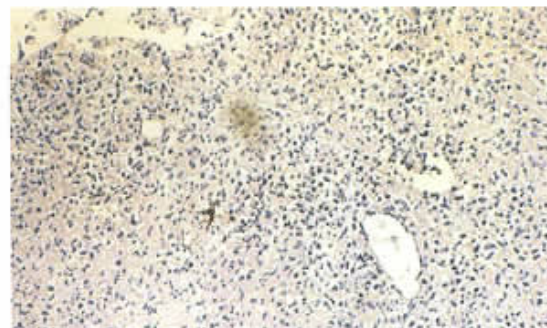


图 18 创面下活组织组织学显示呈皮肤干细胞增殖生长状态。



图 20 见与创面基底生理连接的正常结构皮肤从创面中透出。



图 22 临床扩大实验典型病例: 男, 31 岁, 柴油火焰烧伤 94%TBSA。治疗前。



图 23 经 MEBT/MEBO-2 治疗, 第 43 天愈合时的表现。



图 24 现在的表现。



图 25 深Ⅱ度创面(胸腹部)自行愈合后3年, 皮肤形态、结构、功能完全与正常皮肤相同。



图 26 深Ⅱ度、浅Ⅲ度混合度创面(左上臂内侧)自行愈合后3年, 皮肤结构大部分正常。



图 27 浅Ⅲ度创面(背部)自行愈合后3年, 皮肤结构基本正常, 无明显疤痕。



图 28 浅Ⅲ度创面(右大腿及膝关节外侧)自行愈合后3年, 少量疤痕平整柔软, 无增生, 少量色素缺失, 皮肤弹性好, 不影响功能。



图 29 深Ⅲ度创面(右大腿及膝关节外侧)自行愈合后3年, 疤痕平整柔软, 无挛缩, 不影响功能。



图30 烧伤皮肤再生医学利用成体干细胞原位培植再生皮肤器官, 已成功救治众多特大面积、特重度烧伤病人。