

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.24.003

羧甲基壳聚糖促进小鼠皮肤毛囊再生修复的组织形态学研究*

施恩¹ 张毅^{2△} 田少奇² 刘英芹³ 赵峡⁴

(1 青岛黄海学院护理与健康学院 山东 青岛 266427; 2 青岛大学附属医院 山东 青岛 266003;
3 桂林医学院生物技术学院 广西 桂林 541000; 4 中国海洋大学医药学院 山东 青岛 266003)

摘要 目的:观察羧甲基壳聚糖(CMC)促进小鼠皮肤毛囊再生修复的组织形态学结构变化,并与新生小鼠皮肤毛囊的组织形态学结构对比。**方法:**通过切除皮肤组织建立小鼠背部皮肤组织全层缺损模型,随机分为4组:CMC组、清得佳组、生理盐水组与空白对照组,除空白对照组外其余3组每天分别连续给药,第21天处死;为评估建模后小鼠皮肤毛囊组织的再生修复程度,另取新生小鼠36只,每日处死3只;应用Image J技术观察并测量各组小鼠皮肤组织创面修复率;HE染色后光镜下观察新生小鼠皮肤组织厚度、毛囊及“腺泡样”结构数量;对比分析各组小鼠模型第21天和新生小鼠皮肤毛囊的组织形态学结构。**结果:**第3天和17天各组小鼠模型皮肤创面再生修复率:CMC组为 $33.07\pm 9.52\%$ 和 $96.75\pm 2.11\%$,清得佳组为 $24.18\pm 6.14\%$ 和 $92.22\pm 0.62\%$,生理盐水组为 $21.06\pm 11.59\%$ 和 $87.38\pm 2.79\%$,空白对照组为 $8.66\pm 2.27\%$ 和 $85.15\pm 1.34\%$;采用线性模型重复度量方差分析法,对CMC组与清得佳组、生理盐水组和空白对照组小鼠皮肤创面第17天再生修复率比较存在显著性差异($F=11.970, 17.666, 8.828, P<0.05$)。新生小鼠皮肤厚度、毛囊及“腺泡样”结构数量随小鼠日龄增长而增加($r=0.983, 0.922, P<0.05$)。与新生小鼠皮肤毛囊的组织形态学结构相比,第21天CMC组、清得佳组、生理盐水组及空白对照组小鼠模型皮肤组织再生修复程度分别相当于新生小鼠皮肤毛囊发育后期、中期、初期及瘢痕组织。**结论:**CMC具有促进皮肤毛囊组织形态学结构再生修复的重要作用。

关键词:羧甲基壳聚糖;小鼠;皮肤毛囊;再生修复;组织形态学

中图分类号:R-33;R622.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)24-4614-09

Study of the Effect of Carboxymethyl Chitosan in Promoting the Regeneration of Mice Skin Hair Follicle with the Tissue Morphology*

SHI En¹, ZHANG Yi^{2△}, TIAN Shao-qi², LIU Ying-qin³, ZHAO Xia⁴

(1 Department of the Nursing and Health Institute in Qingdao Huanghai College, Qingdao, Shandong, 266427, China;

2 The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China;

3 Department of the Biotechnology Institute in Guilin Medical College, Guilin, Guangxi, 541000, China;

4 The Medical College of China Ocean University, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of the carboxymethyl chitosan (CMC) in promoting the regenerative repair of mice skin hair follicle and compare with the tissue morphology of newborn mice skin. **Methods:** First to establish the mice model of full-thickness skin defects. Then the mice models were divided into 4 groups: CMC group, Qing dejia group, NaCl group, and the blank Control group. There were 10 mice in each group. Except the mice in blank Control group, medicines were given to the mice in the other three groups accordingly until 21 day. Thirty-six newborn mice were also included into the study. The repair rate of the mice model with skin hair follicle and the development of the newborn mice skin were measured with the Image J technique. The development of the skin hair follicle was observed with HE staining technique. The regeneration repaired morphological structures of the mice models executed in the 21 day in the four groups were compared with the skin tissue morphology of newborn mice. **Results:** The regenerative repair rates of the skin defect at 3 and 17 day were $33.07\pm 9.52\%$ and $96.75\pm 2.11\%$ in CMC group, $24.18\pm 6.14\%$ and $92.22\pm 0.62\%$ in Qingdejia group, $21.06\pm 11.59\%$ and $87.38\pm 2.79\%$ in NaCl group, and $8.66\pm 2.27\%$ and $85.15\pm 1.34\%$ in blank Control group respectively. Comparing the rates in CMC group with those in the other three groups respectively, significant differences were found($F=11.970, 17.666, 8.828, P<0.05$). The development of skin thickness and the hair follicle number increase with the growth day age of newborn mice($r=0.983, 0.922, P<0.05$). Compared with the skin tissue morphology of newborn mice, the structure of the regeneration repaired skin at 21 day in CMC group, Qingdejia group, NaCl group and blank Control group equalized the late-stage of development, the mid-stage of development, the early-stage of development and the stage of scar respectively. **Conclusion:** CMC may play an important role in promoting skin regenerative repair.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81660304)

作者简介:施恩(1988-),医学硕士,助教,研究方向:创伤再生与修复,E-mail:626540442@qq.com

△ 通讯作者:张毅,E-mail:zhang.yi2000@163.com

(收稿日期:2018-03-27 接受日期:2018-04-24)

Key words: Carboxymethyl chitosan; Mice; Skin hair follicle; Regeneration repair; Tissue morphology

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R622.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)24-4614-09

前言

皮肤组织全层缺损后的再生修复不仅是创面的完全覆盖,而且还包含皮肤附属器及其生理功能^[1]。然而,在皮肤附属器中,唯有毛囊可循环再生修复,而皮脂腺、汗腺、色素和神经等均不能再生修复^[2]。因此,在皮肤组织再生修复中,毛囊的组织形态学结构成为目前唯一可作为皮肤组织再生修复后质量评估的重要指标^[3]。羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan, CMC)具有良好的水溶性和生物活性,可显著促进成纤维细胞增殖,有利于皮肤组织的再生修复,从而抑制疤痕增生,改善新生皮肤组织表现,增强再生修复后皮肤组织的抗张力度,提高皮肤组织形态学结构的再生修复质量^[4]。本研究通过揭示新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学演变过程,并据此分期作为小鼠皮肤组织再生修复的参照物和评价指标,旨在探讨 CMC 促进小鼠皮肤毛囊再生修复过程,评估小鼠皮肤毛囊再生修复的组织形态学结构,为进一步研究小鼠皮肤毛囊再生修复的组织形态学调控机制,提供重要的理论基础和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

选择 6~8W 性成熟 SPF 级 KM 小鼠 76 只,重约 25~30 g/只。将 5% 水合氯醛 0.1 mL/kg 分布注入 40 只小鼠腹腔内,麻醉成功后,固定小鼠脱去背部皮毛,圆形标记,消毒皮肤,切剪圆形皮肤组织全层,深达筋膜,避免损伤肌层,制造直径约 2.0 cm 的圆形皮肤组织全层缺损模型。将小鼠分为每笼 5 只进行适应性喂养 2~3 d,食用固体饲料,室温保持在 20~25℃,相对湿度为 45%~52%。将 36 只 KM 雌雄小鼠按 2:1 比例合笼,并给予标准动物饲料喂养。雌雄小鼠交配后,翌日雌性小鼠见阴道有白色栓即判定为妊娠第 1 d,并立即将雌鼠分笼单独饲养 19~21 d 至分娩。从小鼠出生当天开始采集标本至第 12 d,每天处死 3 只,分别编号。本实验严格遵循实验动物福利伦理原则。

1.2 实验方法

将 40 只 KM 小鼠随机分为 4 组:CMC 组(造模 + CMC, n=10),将 CMC 粉剂(中国海洋大学)加 0.9% 氯化钠溶液配置成 10% CMC 凝胶;清得佳组(造模 + 清得佳, n=10),清得佳凝胶(英国施乐辉药业公司);生理盐水组(造模 + 生理盐水, n=10),0.9% 氯化钠溶液(青岛华仁药业股份有限公司);空白对照组(造模, n=10)。按 0.1 mL/cm² 给药,皮肤组织缺损处均匀涂抹创面,早晚各 1 次,连续 21 d。分别于术后第 1~17 天观察创面愈合状态并拍照记录。第 21 天将 40 只小鼠全部予以处死取材,编号标记。将 36 只已被处死的新生小鼠切取其背部皮肤组织及 40 只小鼠再生修复后的皮肤组织标本用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚 4 μm, HE 染色,光学显微镜下放大 100~200 倍观察。

1.3 观察与测量

观察新生小鼠第 1~12 天皮肤颜色、皱褶、透明度、毛发生

长等变化;观察小鼠和新生小鼠皮肤毛囊的组织形态结构,并摄像记录;随机选择 3 个不同视野观察统计毛囊及“腺泡样”结构数量;对比分析小鼠模型第 21 天和新生小鼠皮肤毛囊的组织形态学结构。采用 Image J 技术测量 36 只新生小鼠皮肤发育厚度,取其平均值,单位:μm;根据均值计算 3 只新生小鼠皮肤厚度均值及标准差,连续测量 12 天。应用 Image J 技术测量 40 只小鼠皮肤造模后第 1、3、5、7、9、11、13、15、17 天伤口面积,计算创面修复率 = 100 × (0 天缺损面积 - n 天缺损面积) / 0 天缺损面积^[5]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用率表示,各组小鼠创面修复率比较采用线性模型重复度量方差分析,新生小鼠日龄与皮肤厚度及毛囊发育的相关性,采用 Pearson 法直线回归分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生小鼠皮肤组织发育厚度的演变过程

新生小鼠出生天数与皮肤组织发育厚度的关系见表 1。小鼠出生后当天皮肤组织最薄仅为 405.37 ± 26.6 μm,颜色呈肉红色,有细纹皱褶,松弛,菲薄,透明度较高;第 2 天皮肤组织透明度明显下降,皮肤组织增厚,皱褶变浅;第 3 天皮肤组织颜色变浅,松弛度下降,透明度继续下降;第 4 天皮肤组织颜色、松弛度及透明度均无明显变化;第 5~7 天皮肤组织厚度生长速度明显加快,皮肤组织颜色变浅,皱褶数量减少、凹陷变浅趋于平坦;第 7 天皮肤组织厚度达峰值 2369.57 ± 34.06 μm(图 1);第 8~9 天皮肤组织再次变薄,呈粉红色;第 10~12 天皮肤组织厚度增厚,并趋向稳定,表面见白色毛发生长(图 2-5)。由图 6 表明:皮肤组织发育厚度随新生小鼠日龄增长而逐渐增厚,其演变过程为相互依存的正相关性,所有散点均呈线性上升趋势(r=0.922, P < 0.001)。

2.2 新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学及其分期

新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学演变过程:由基板毛球(hair bulb, HB)形成到毛干(hair shaft, HS)长出,并在表皮层形成完整肉眼可见的毛发。本研究根据新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学特点,并参考 Ralf Paus 分期标准^[6],将其分为 4 期(图 7)。皮肤毛囊发育初期(1~4 天):第 1 天,皮下表皮角质细胞表皮的基底和位于基底上方细胞层可观察到少许形态结构不完整,边界清晰的“核样”聚集结构,即基板毛球;第 2 天,真皮成纤维细胞数量增多,并接近表皮厚度,密集上皮细胞与间叶细胞交互,基板角质细胞从表皮基底膜下移,形成毛乳头(dermal papilla, DP),并观察到少许“腺泡样”结构;第 3 天,毛胚芽发育成更加突出和扩大,上皮细胞增殖,在真皮基底层表皮角质细胞形成膨大的毛球,并出现真皮根鞘,真皮深层及皮下组织为脂肪组织及胶原纤维和弹性纤维交织排列;第 4 天,形成更多膨大的毛球,毛乳头呈球形,真皮根鞘覆盖整个真皮

层。皮肤毛囊发育中期(5~7天):第5天,毛囊生长速度加快,毛球增大的近端部分突出,内根鞘(inner root sheath, IRS)在毛乳头周围形成毛发矩阵;第6天,毛球增多,真皮内根鞘伸入表皮层形成毛根,真皮根鞘分化形成外根鞘(outer root sheath, ORS),可见黑色素颗粒形成,椭圆形毛乳头松散一致性,形成完全封闭的毛发矩阵,“腺泡样”结构明显增多,可见个别毛干;第7天,毛乳头继续变薄、变细、变长,内根鞘延伸到深层。皮肤

毛囊发育后期(8~9天):第8-9天,毛乳头几乎完全被毛母质所包围,毛管、毛干逐渐形成,毛干顶端通过毛管长出内根鞘,内根鞘进入毛发深层,形成更多毛根。皮肤毛囊发育成熟期(10~12天):毛干生长最长,深达皮下组织真皮层,毛干通过毛管向上生长并穿过表皮层形成肉眼可见的完整毛发。表明第10天,新生小鼠皮肤毛囊发育进入成熟期,并趋向稳定。

表 1 新生小鼠出生天数与皮肤组织发育厚度的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relations between newborn mice born days thickness of skin tissue development($\bar{x} \pm s$)

Born of Days	No.1 Skin Thickness (μm)	No.2SkinThickness (μm)	No.3 Skin Thickness (μm)	Average Skin Thickness (μm)
1	389.90	383.40	442.80	405.37 \pm 26.60
2	945.30	947.80	888.20	927.11 \pm 27.25
3	843.60	797.30	782.47	807.79 \pm 26.04
4	777.75	813.66	624.40	738.60 \pm 82.07
5	1502.63	1394.10	1430.95	1442.56 \pm 45.06
6	1741.20	1635.89	1695.10	1690.73 \pm 43.10
7	2403.59	2323.02	2382.10	2369.57 \pm 34.06
8	1685.27	1695.50	1849.34	1743.37 \pm 75.05
9	2003.45	1996.78	1960.98	1987.07 \pm 18.65
10	2186.55	2059.40	2097.64	2114.53 \pm 53.26
11	2291.33	2423.10	2377.15	2363.86 \pm 54.61
12	2436.70	2373.84	2387.45	2399.33 \pm 27.00

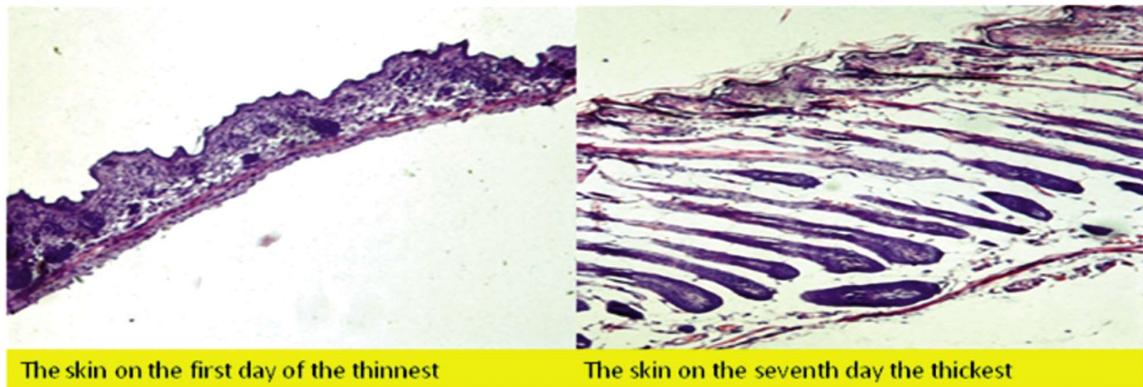


图 1 新生小鼠第 1 d 和第 7 d 皮肤组织发育的厚度变化(HE \times 100)

Fig.1 The thickness change in the skin tissue development of newborn mice on 1 d and 7 d (HE \times 100)

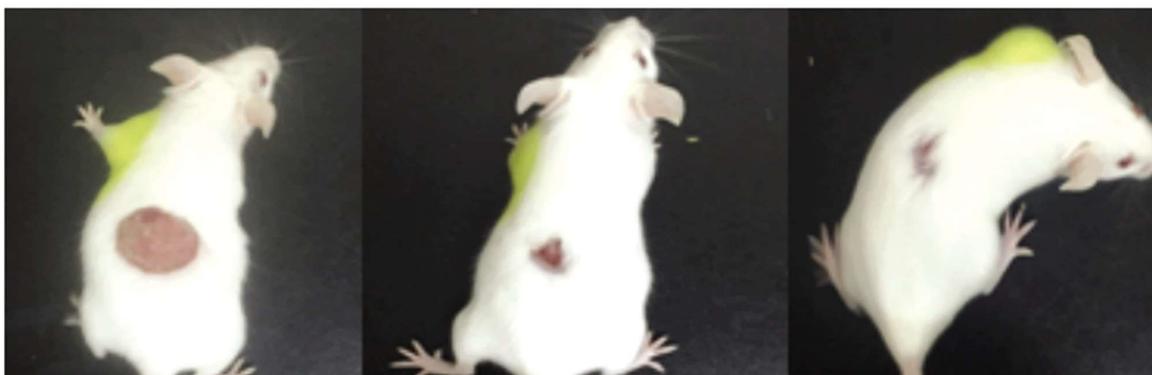


图 2 CMC 组创面修复状态:第 1 天 \rightarrow 第 7 天 \rightarrow 第 14 天

Fig.2 Wound repair in CMC group 1 d \rightarrow 7 d \rightarrow 14 d

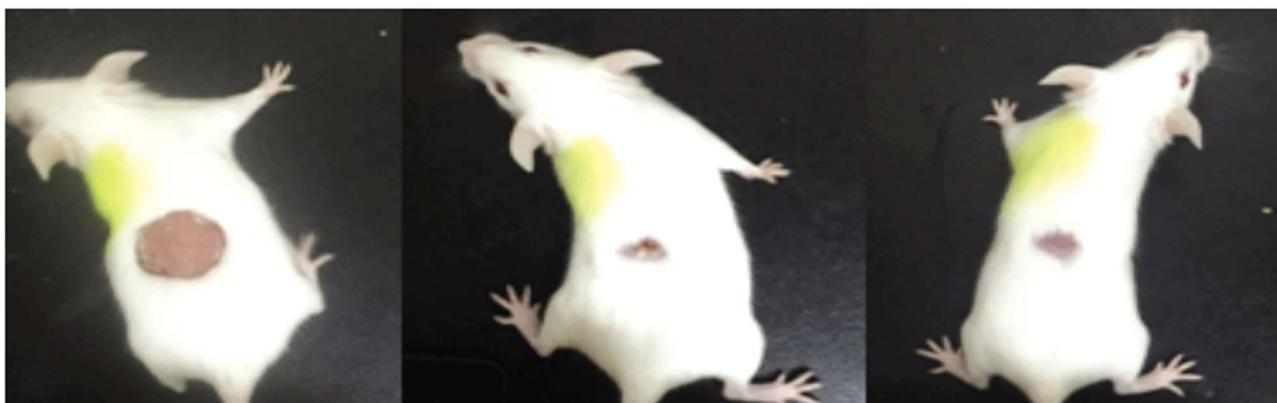


图3 清得佳组创面修复状态:第1天→第7天→第14天

Fig.3 Wound repair in QDJ group: 1 d→7 d→14 d

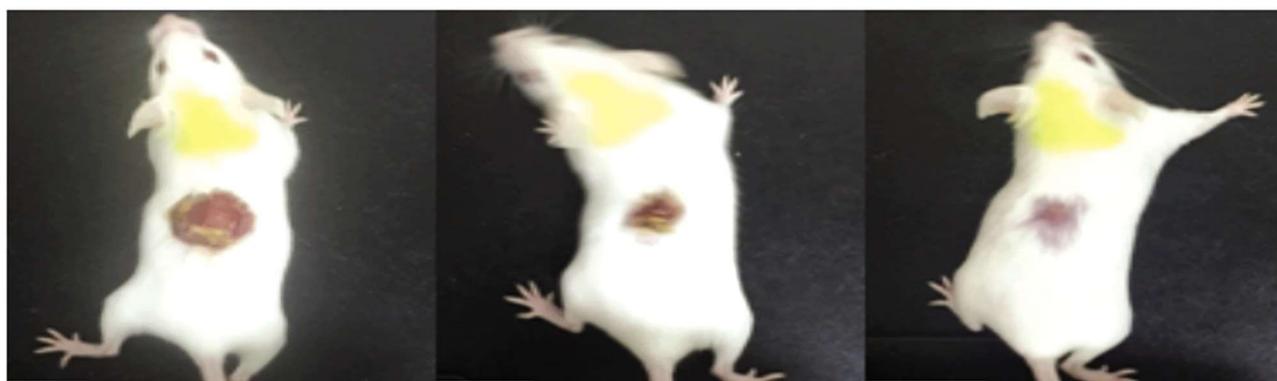


图4 生理盐水组创面修复状态:第1天→第7天→第14天

Fig.4 Wound repair in NaCl group: 1 d→7 d→14 d

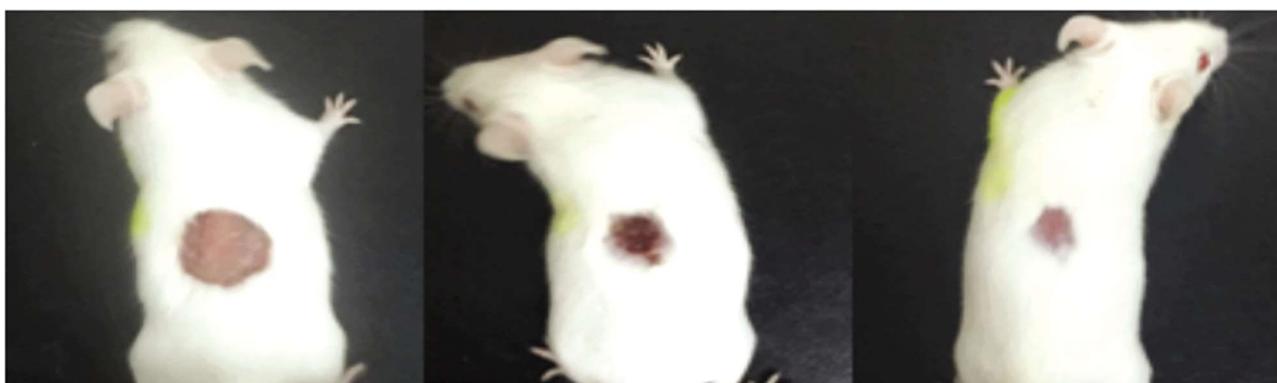


图5 空白对照组创面修复状态:第1天→第7天→第14天

Fig.5 Wound repair in blank control group: 1 d→7 d→14 d

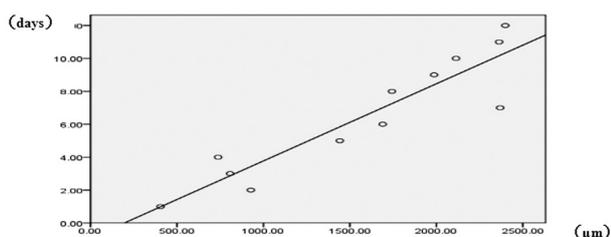


图6 新生小鼠日龄与皮肤组织发育厚度的散点图

Fig.6 Scatter plot of newborn mouse day age and the thickness of skin tissue development

2.3 新生小鼠皮肤发育的毛囊数量变化

新生小鼠皮肤毛囊由杆状毛根及其末端膨大毛球组成。本研究将具有杆状毛根结构的附属器计数为毛囊,而其余尚不能确定为毛囊结构统称“腺泡样”结构,如球状、空泡、囊泡状结构等。“腺泡样”结构为皮肤组织发育过程中皮肤附属器,如毛囊、皮脂腺、汗腺等。新生小鼠第1~12天,毛囊及“腺泡样”结构数量均逐日增加(表2),由图8表明:皮肤毛囊及“腺泡样”结构数量随新生小鼠日龄增长而增多,与皮肤组织厚度基本一致,是一种相互依存的正相关,所有散点均呈直线性上升趋势($r=0.983, P<0.001$)。第1天,仅观察到少许边界清晰“腺泡样”聚集结构,即基板毛球,毛根尚未发育;第2天,开始出现毛囊,毛囊发育早期与中期比较,毛囊及“腺泡样”结构数量均迅速增多。

表明毛囊发育中期以后(第 8 天后),毛囊数量趋于相对稳定状态,增幅不明显;但“腺泡样”结构数量在第 8 天后有明显增长。在新生小鼠皮肤毛囊发育过程中,发现“非同步”现象,即在显

微镜同一视野中,均有毛囊及“腺泡样”结构聚集区出现(图 9),表明在同一部位相邻皮肤发育进程也存在差异。

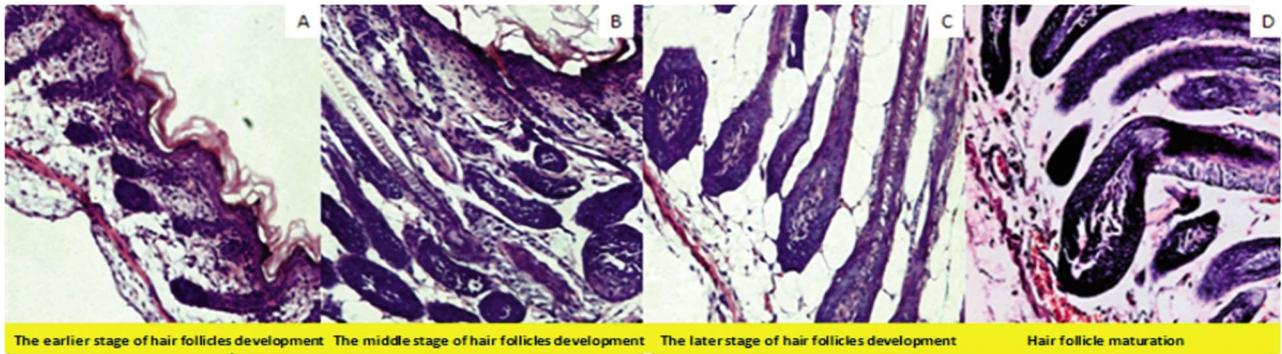


图 7 新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学分期(A.毛囊发育初期,B.毛囊发育中期,C.毛囊发育后期,D.毛囊发育成熟期,HE× 200)

Fig.7 Hair follicle development stage of newborn mouse skin tissue morphology (a. the earlier stage of hair follicles development, b.the middle stage of hair follicles development c. the later stage of hair follicles development, d. hair follicle maturation, HE× 200)

表 2 新生小鼠出生天数与皮肤毛囊发育数量的关系

Table 2 Relations in the number between newborn mouse born days and skin hair follicle growth

Born of Days	Hair Follicle Number (a)	“acnius-like” (a)	Hair Follicles and the Total Number of “acnius-like” (a)
1	0	7	7
2	5	13	18
3	6	15	21
4	8	19	27
5	17	12	29
6	17	16	33
7	17	22	39
8	14	28	42
9	24	16	40
10	27	23	50
11	23	27	50
12	29	30	59

Annotation: The data for every 3 mice skin biopsy under random three mirror view of hair follicle mean (HE× 100).

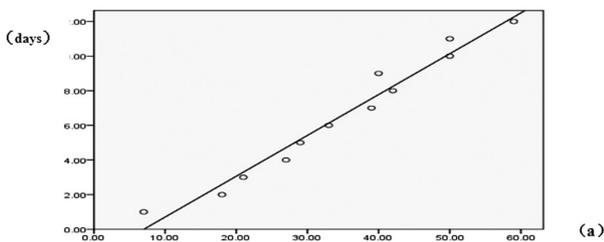


图 8 新生小鼠出生天数与毛囊发育数量的散点图

Fig.8 Scatter plot in the number between newborn mouse born days and hair follicle growth

2.4 各组小鼠皮肤组织造模创面再生修复率的对比

各组小鼠造模后不同天数的皮肤创面再生修复率的对比见表 3。每日给造模后各组小鼠拍照,应用 Image J 测量小鼠皮肤创面面积,并计算创面再生修复率。给药第 1~2 天,皮肤创面

缩小不明显;第 3 天,皮肤创面再生修复速度明显加快,以 CMC 组最显著,再生修复率高达 $33.07\pm 9.52\%$;其次为清得佳组 $24.18\pm 6.14\%$ 和生理盐水组 $21.06\pm 11.59\%$,空白对照组最差,仅为 $8.66\pm 2.27\%$ 。第 17 天,皮肤创面再生修复率达峰值,CMC 组高达 $96.75\pm 2.11\%$,清得佳组 $92.22\pm 0.62\%$,生理盐水组 $87.38\pm 2.79\%$ 和空白对照组 $85.15\pm 1.34\%$ (图 10)。采用线性模型重复度量方差分析法,对 CMC 组与清得佳组、生理盐水组和空白对照组的小鼠皮肤创面再生修复率比较存在显著性差异($F=11.970, 17.666, 8.828, P=0.006, 0.003, 0.000$)。

2.5 各组小鼠皮肤再生修复的组织形态学结构

在各组小鼠皮肤再生修复过程中,CMC 组可见皮肤组织缺损处被新生的肉芽组织所填充,新生肉芽组织中见大量胶原纤维细胞,排列整齐有序,新生毛细血管明显增多,相互交织呈网状,新生皮肤组织为菲薄的上皮组织,肉芽组织呈红色,不断

向正常结缔组织转化,并见大量毛囊及“腺泡样”结构,部分毛囊可见完整毛干。而清得佳组新生皮肤肉芽组织中胶原纤维明显增多,排列欠有序,稍显紊乱,毛细血管增多,相互交织呈网状,可见较多毛囊及“腺泡样”结构,但毛干不完整,中心处有少许瘢痕组织形成。生理盐水组和空白对照组,新生皮肤肉芽组织中胶原纤维不多,排列无序、杂乱,毛细血管稀少,多为纤维组织增生及瘢痕组织形成,仅见少许“腺泡样”结构。空白对照

组则仅见极少“腺泡样”结构,多为瘢痕组织。第 17 天各组小鼠皮肤再生修复的组织形态学结构见图 11。本研究结果表明:CMC 促进小鼠皮肤再生修复过程从皮肤创缘开始,向中心爬行延伸并完全覆盖形成表皮层,新生毛细血管减少,大量胶原纤维组织增殖沉积,最外缘出现新生皮肤毛囊等附属结构,但真皮层仍有炎性细胞浸润,再生修复期为 20 天。表明 CMC 在促进小鼠皮肤再生修复过程中发挥重要作用。

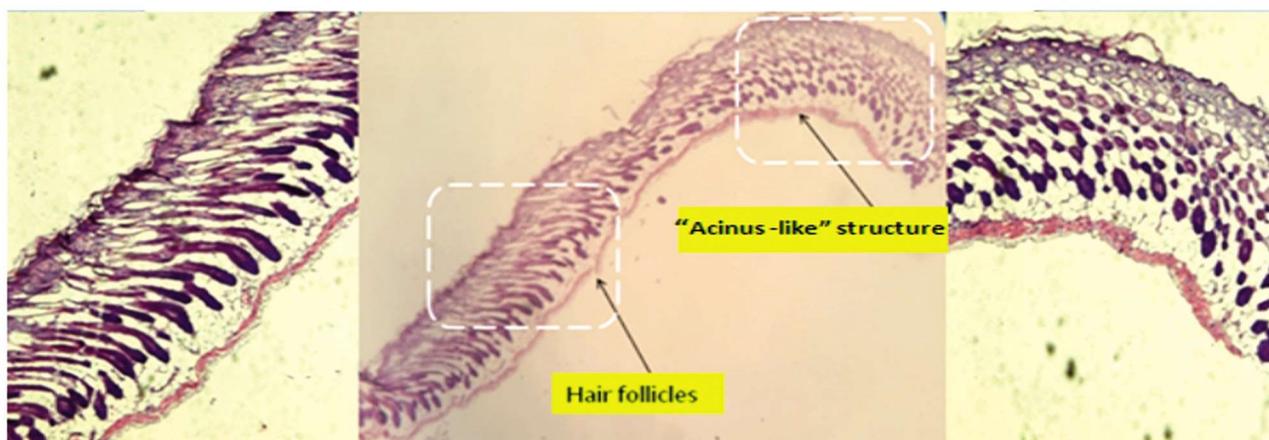


图 9 新生小鼠出生后第 5 天毛囊及“腺泡样”结构出现“非同步”现象(HE× 50)

Fig.9 Asynchronous "phenomenon of Hair follicles and " acinus-like "structure (born 5 d, HE× 50)

表 3 各组小鼠皮肤造模后不同天数创面再生修复率($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 Groups of mice made die cut back skin repair rate of different number of days($\bar{x} \pm s, \%$)

Time(days)	CMC Group	QDJ Group	NaCL Group	Blank Control Group
1	-	-	-	-
3	33.07± 9.52	24.18± 6.14	21.06± 11.59	8.66± 2.27
5	47.04± 4.71	54.18± 10.84	49.36± 10.24	18.15± 9.78
7	69.94± 10.78	83.76± 1.85	76.70± 7.45	59.26± 7.15
9	83.35± 7.37	87.32± 3.09	84.33± 2.18	79.99± 2.10
11	92.23± 3.52	91.08± 0.92	85.78± 4.12	83.15± 5.08
13	93.30± 2.58	91.36± 0.91	85.82± 4.93	83.74± 4.78
15	93.39± 3.36	91.64± 1.89	86.42± 4.46	84.54± 2.44
17	96.75± 2.11	92.22± 0.62	87.38± 2.79	85.15± 1.34

Annotation: CMC: Carboxymethyl chitosan; QDJ: Qing Dejia

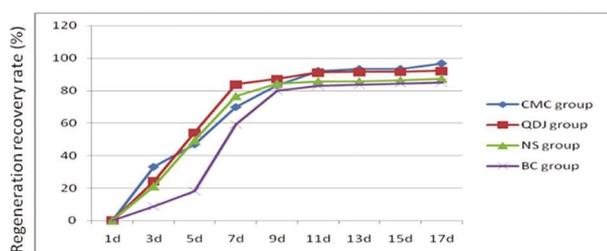


图 10 各组小鼠皮肤造模不同天数再生修复率比较

Fig.10 Compare with groups of mice made die cut back skin repair rate of different number of days

2.6 小鼠与新生小鼠皮肤毛囊的组织形态学对比

在小鼠皮肤再生修复过程中,皮肤组织内出现毛囊及“腺泡样”结构,是皮肤组织再生修复高质量的重要标志^[7]。随机视

野显微镜下 100 倍观察小鼠皮肤再生修复后毛囊(含“腺泡样”结构)数量变化见表 4。CMC 组毛囊数平均 34.3 个,超过新生小鼠第 6 天毛囊总数 33 个;结构相当于新生小鼠毛囊发育后期。清得佳组毛囊数平均 28.1 个,相当于新生小鼠毛囊发育中期。而生理盐水组毛囊数平均 8 个,相当于新生小鼠皮肤毛囊发育初期;空白对照组毛囊数平均 1.3 个,基本为瘢痕组织(图 12)。由此可见,CMC 对小鼠皮肤组织再生修复具有重要的促进作用(图 13)。

3 讨论

3.1 新生小鼠皮肤毛囊发育的演变规律

新生小鼠皮肤发育厚度与表皮和真皮组织结构密度相关。

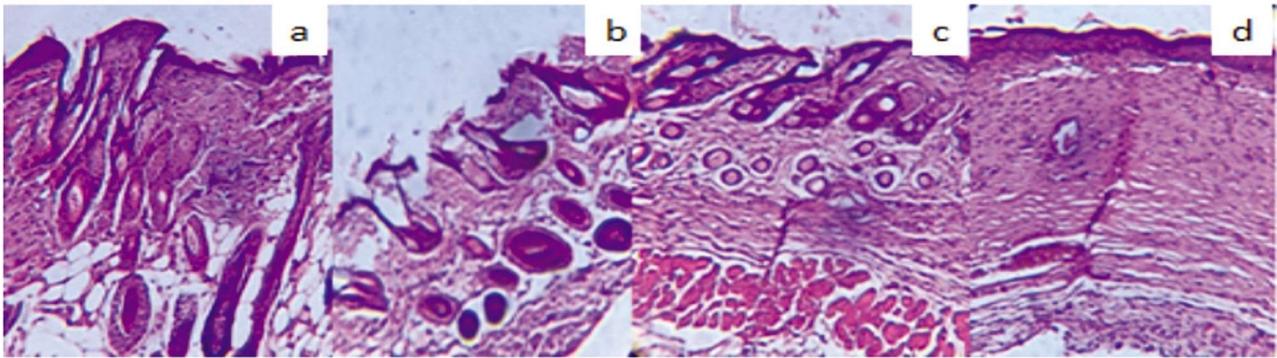


图 11 第 17 天各组小鼠皮肤再生修复的毛囊组织形态学结构(a.CMC 组,b.清得佳组,c.生理盐水组,d.空白对照组,HE× 100)

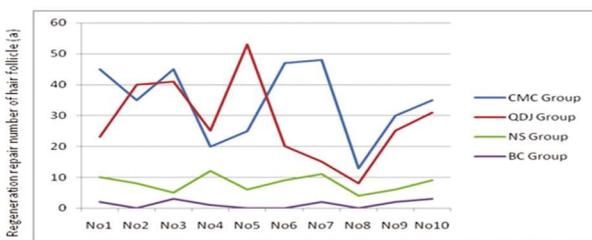
Fig.11 Morphological structure of remodeling mouse skin and hair follicles on 17 d (a.CMC group, b.QDJ group, c. NaCl group, d. Blank control group HE× 100)

表 4 小鼠第 21 天皮肤毛囊再生修复的数量变化(个)

Table 4 Changes in the number of skin hair follicle regeneration repaired in mice 21 days (a)

Mice numbering	CMC Group	QDJ Group	NaCl Group	Blank Control Group
1	45	23	10	2
2	35	40	8	0
3	45	41	5	3
4	20	25	12	1
5	25	53	6	0
6	47	20	9	0
7	48	15	11	2
8	13	8	4	0
9	30	25	6	2
10	35	31	9	3
Mean	34.3	28.1	8	1.3

Annotation: number of skin hair follicle(a); CMC: Carboxymethyl chitosan; QDJ: Qing Dejia.



Annotation: CMC: Carboxymethyl chitosan; QDJ: Qing Dejia; NS: NaCl; Bc: Blank control

图 12 各组小鼠皮肤再生修复后的毛囊数量变化

Fig.12 Groups of mice skin repair reshape the number of follicles

表皮由角质层、透明层、颗粒层、棘层和基底层等复层上皮组成。真皮位于表皮下,由致密的结缔组织构成,分为乳头层和网状层,乳头层与表皮相连形成的圆锥状隆起为真皮乳头。毛囊发育进程依赖表皮上皮细胞与真皮间叶细胞共同组成乳头细胞相互作用结果。小鼠皮肤毛囊发育在起源于胚胎期外胚层,而真皮基底层则起源于中胚层,表皮与真皮之间复杂交互,促进毛囊真皮层的内层上皮组织和外层结缔组织所包裹的一团间充质细胞构成乳头头^[8-10]。乳头是毛囊发育最重要的组

成部分, 毛囊细胞与上皮细胞通过 Wnt、TGF- β 、Notch 等多重信号传导通路的精准调控,而促进毛囊发育和自我更新的周期性生长^[11]。由于皮肤毛囊发育过程极为复杂,除小鼠本身因素外,还受取材、造模、染色等研究方法因素的影响,从而导致研究结果存在较大差异^[12]。因此,小鼠皮肤毛囊发育的自我更新和周期性生长机制,迄今尚不十分清楚,也是影响该研究发展的瓶颈^[13]。Ralf Paus 等^[6]在对小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学研究中,认为毛囊发育周期性变化的传播波可能起源于小鼠背部皮肤,为研究小鼠皮肤取材部位提供依据。本研究通过分析新生小鼠第 1~12 天皮肤毛囊发育的组织形态学演变规律,发现皮肤发育厚度与毛囊数量和结构均随新生小鼠日龄增长而增加完善,此外,我们还首次观察到“腺泡样”结构逐渐发育成毛囊或其他结构。其演变规律是一种相互依存的正相关,且存在同步性和非同步性。因此,掌握新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学的演变过程和规律,为进一步研究小鼠皮肤组织修复重塑的分子调控机制和信号传导通路奠定基础。

3.2 新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学分期意义

修复后的皮肤组织内不含有毛囊结构均被视为皮肤创面覆盖的假性愈合,而非真正意义上的皮肤组织形态学和功能恢

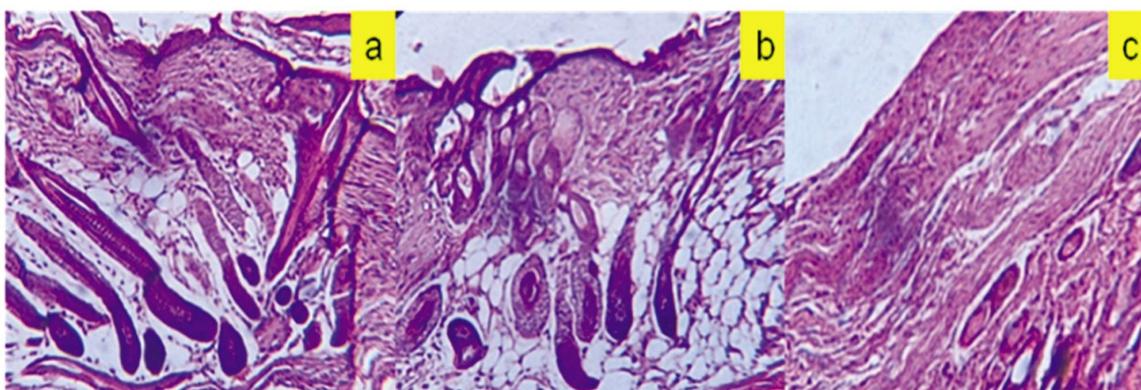


图 13 CMC 组(a)、清得佳组(b)和生理盐水处理组(c)第 21d 毛囊结构(HE× 100)

Fig.13 Hair follicles in CMC(a) and QDJ(b) and NaCl(c) groups on 21 d (HE× 100)

复^[14]。毛囊附着处内根鞘对刺激真皮毛乳头和真皮鞘细胞诱导毛囊上皮细胞分化,真皮鞘细胞是毛乳头细胞的前体细胞,具有“免疫豁免”特性,毛乳头细胞是维持毛囊再生的功能细胞^[15]。本研究新生小鼠第 4 天毛囊发育完全,真皮根鞘覆盖整个真皮层,第 5~7 天皮肤毛囊发育速度明显加快,第 7 天皮肤厚度和毛囊数量达峰值。与 Weinberg 等^[16]小鼠出生后第 4 天毛囊发育完全的研究结果一致。与张俊霞等^[17]研究小鼠出生后第 7 天皮肤毛囊发育进入快速生长期,毛囊数量显著增多,与王博等^[18]研究新生小鼠第 7 天皮肤毛囊发育达最峰的结果基本一致。Ralf Paus 等^[19]对 C57 BL/6 J 小鼠毛囊发育描述的非常详细,并将其过程分为 9 期,认为新生小鼠毛囊发育时空定位直接关系到毛发生长周期。Ralf Paus 分期对研究 C57 BL/6 J 小鼠毛囊发育的组织形态学非常有价值,但分期复杂,且不太适宜 KM 小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学分期。本研究参考 Ralf Paus 分期标准,并结合 KM 小鼠皮肤毛囊发育过程的不同时段所形成的结构特点,分为 4 期:早期(1~4 天)与 Ralf Paus 第 0~3 期基本一致。中期(5~7 天)是真皮毛乳头的发育矩阵源和循环传播地,相当于 Ralf Paus 第 4~6 期。后期(8~9 天)与 Ralf Paus 第 7 期相对应。成熟期(10~12 天)毛干通过毛管向上生长并穿过表皮层形成肉眼可见完整浓密的毛发,标志着毛囊发育进入成熟期,即 Ralf Paus 第 8 期。本研究尝试将 KM 小鼠皮肤分为毛囊发育早期、中期、后期和成熟期,虽然本分期不够成熟和完善,但却囊括了皮肤毛囊发育的全过程,且方法简单,容易识别,便于记忆、较为实用,可作为评价 KM 小鼠皮肤再生修复的组织形态学结构重要指标。

3.3 羧甲基壳聚糖促进小鼠皮肤再生修复的组织形态学结构

皮肤创面再生修复是一个极为复杂的连续动态的病理生理过程。涉及到出血、凝血、渗出、吸收、炎症反应、细胞迁移增殖分化,毛细血管再生、再上皮化,细胞外基质合成、沉积和组织重塑等一系列繁杂而协调的生理生化过程^[19]。CMC 系统纯天然、无毒、无刺激、无致敏、无免疫原,生物相容性好、可生物降解等生物活性;CMC 带有正电荷,可与带有负电荷细胞表面的神经氨基酸残基受体相互作用,可促进血小板发生凝集,导致血液凝固,因而具有很强凝血功效;可促进纤维蛋白形成,通过急性炎症反应,吸引大量多核细胞和巨噬细胞清除组织碎片和血凝块;可促进皮肤成纤维细胞及表皮角质形成细胞增殖和再生、纤维细胞迁移和肉芽组织形成,从而促进受损组织再生修

复与结构重塑;可抑制 I 型胶原纤维分泌,可有效抑制瘢痕形成,具有促进正常皮肤成纤维细胞生长和抑制瘢痕纤维形成的双重生物活性;具有广谱抗菌作用和抗感染功效,可有效防治细菌侵入创面而引起感染,有利于皮肤再生修复^[20-23]。本研究结果:CMC 组第 21 天小鼠皮肤再生修复的组织内毛囊数量与第 6 天新生小鼠相同,结构相当于新生小鼠毛囊发育后期。表明 CMC 促进小鼠皮肤毛囊再生修复与新生小鼠皮肤毛囊高度契合,对重塑小鼠皮肤毛囊的组织形态学结构具有重要促进作用。

3.4 羧甲基壳聚糖促进小鼠皮肤再生修复的应用价值

CMC 促进成纤维细胞增殖是修复皮肤的关键细胞,但其机制至今仍未完全明了。Gho 等^[24]研究表明 CMC 可在伤口处形成聚电复合物,与血清中肝素或血小板源生长因子结合,保护其免受酶降解,从而间接刺激成纤维细胞增殖。此外,还可刺激巨噬细胞吞噬伤口处的外源物,同时释放成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、表皮细胞生长因子(epidermal cell growth factor, ECGF)、转化生长因子(transforming growth factor- β 1, TGF- β)、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)等一系列生化因子,调节细胞间基质的生成,促进毛细血管形成,成纤维细胞增殖分化和细胞基质沉积;生长因子可诱导细胞的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)合成和细胞分裂^[25,26]。残存自体活性细胞通过生物学信号通路导入再生轨道,在生长因子等生物活性物质调节下,刺激同类细胞或同一胚层发育成纤维细胞、脂肪细胞和黑色素细胞等修复细胞增殖、迁移与分化状态,如:IGF 与胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins, IGFBP)刺激趋化修复细胞分裂增殖,再上皮化和肉芽组织形成;IGFBP 作为 ECM 金属锌离子蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMP)底物激活后参与胶原基质降解,促进组织形态学修复,瘢痕组织形成;血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)促进血管内皮细胞增殖、迁移和血管化;肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)可刺激成纤维细胞增殖及胶原合成, TNF 还能刺激血管再生,从而完成皮肤再生修复过程^[27]。由于 CMC 具有独特三维结构,为细胞迁移和增殖,新生毛细血管形成,细胞间基质降解重组提供了适宜的空间和微环境,有利于促炎症因子分泌^[28]。本研究第 1~2 天各组小鼠皮肤造模处于再生修复早期,诱导大量炎症细胞渗

出。第3天在巨噬细胞刺激引导下,成纤维细胞迅速进入创面,并通过合成结构蛋白和分泌细胞因子加速受伤组织修复。第5~6天创面大量肉芽组织形成,肌纤维母细胞增生活跃,牵拉伤口沿其边缘及其基底部向中心延伸、爬行和迁移,创缘皮肤组织逐渐再生。第17天造模创面再生修复率均达峰值,成纤维细胞迁移和增殖,新生毛细血管形成,细胞间基质降解重组,从而促进创面再生修复,其中角质形成细胞的增殖和迁移在新生皮肤再上皮化过程扮演着至关重要角色^[20]。CMC组第3天创面再生修复速度明显加快,再生修复率高达 $33.07\pm 9.52\%$;其次为清得佳 $24.18\pm 6.14\%$ 和生理盐水 $21.06\pm 11.59\%$ 空白对照最差仅为 $8.66\pm 2.27\%$;第17天创面再生修复率达峰值,CMC高达 $96.75\pm 2.11\%$,清得佳 $92.22\pm 0.62\%$,生理盐水 $87.38\pm 2.79\%$ 和空白对照 $85.15\pm 1.34\%$ ($P<0.05$)。表明10%CMC具有粘稠性较大,可紧密地粘附在伤口处,且滞留较长时间,对角质形成细胞具有良好的细胞相容性,有利于创面再生修复。第21天CMC促进胶原纤维组织增殖,新生毛细血管网增多,创面完全覆盖,与Tanimura等^[20]报道结果一致。因此,CMC促进小鼠皮肤再生修复的组织形态学结构具有较高的应用价值。

综上所述,新生小鼠皮肤发育厚度与毛囊数量和形态结构是一种随新生小鼠日龄增长而增加完善的相互依存过程,具有同步性和非同步性的演变规律。新生小鼠皮肤毛囊发育的组织形态学分期,可作为评估CMC促进小鼠皮肤组织再生修复的重要指标。CMC对小鼠皮肤再生修复的组织形态学结构相当于新生小鼠皮肤毛囊发育后期,具有高质量促进小鼠皮肤组织再生修复的重要作用。

参考文献(References)

- [1] 王正国. 中国再生医学研究现状及展望 [J]. 中国实用内科学杂志, 2012, 32(8): 561-564
- [2] 杨维,崔占峰.组织工程皮肤发展现状[J].中国科学:生命科学, 2015, 45(5): 460-470
- [3] 施恩,刘英芹.组织工程皮肤及其附属器再生修复机制与生物学行为的研究进展[J].中国保健营养, 2017, 13(27): 93-95
- [4] 和圆,谢光银,关立平.羧甲基壳聚糖研究进展[J].浙江纺织服装职业技术学院学报, 2014, 1: 22-27
- [5] Jeremias Tda S, Machado G, Visoni SB, et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89542
- [6] Paus R, Müller-Röver S, Van Der Veen C, et al. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis[J]. J Invest Dermatol, 1999, 113(4): 523-532
- [7] Mangelsdorf S, Vergou T, Sterry W, et al. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans[J]. Skin Res Technol, 2014, (20): 147-154
- [8] 郭明锋,马杰,蔡卫林,等.皮肤附属结构构建与再生研究进展[J].中华创伤杂志, 2014, 30(1): 85-88
- [9] 陈琳,刁佳伟,刘大庆,等.小鼠皮肤表皮和真皮细胞共移植诱导毛囊再生实验研究[J].中国修复重建外科杂志, 2016, 30(4): 485-490
- [10] 张邦,张汝敏.毛乳头细胞诱导毛囊形成的研究现状[J].中国实用医药, 2009, 4(12): 231-233
- [11] 俞梦洁,夏汝山,杨莉佳.Wnt/ β 联蛋白信号通路在毛囊形成和毛发生长中的作用[J].国际皮肤性病学期杂志, 2015, 41(6): 399-404
- [12] Lefebvre S, Fliniaux I, Schneider P, et al. Identification of ectodysplasin target genes reveals the involvement of chemokines in hair development[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(4): 1094-1102
- [13] Amoh Y, Hamada Y, Aki R, et al. Direct transplantation of uncultured hair-follicle pluripotent stem (hfPS) cells promotes the recovery of peripheral nerve injury[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(1): 272-277
- [14] Cichowski A, Kawecki M, Glik J, et al. Literature review concerning cell and skin substitute cultures obtained by means of tissue engineering used in the treatment of burns [J]. Pol Przegl Chir, 2014, 86(4): 202-210
- [15] Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, et al. Novel chitin and chitosan an of ivers in biomedical applications [J]. Biot Echnol Adv, 2010, 28(1): 142-150
- [16] Weinberg WC, Goodman L, George C, et al. Reconstitution of hair follicle development in vivo: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells [J]. J Invest Dermatol, 1993, 100(3): 229-236
- [17] 张俊霞,李少伟,陈琦,等.BMP-2 和 Noggin 在新生小鼠不同部位毛囊发育中的表达[J].生物技术, 2013, 23(5): 40-45
- [18] 王博,王春生,安铁洙.小鼠皮肤及其毛囊早期发育的组织学观察[J].中国实验动物学报, 2007, 15(6): 413-415
- [19] 付小兵.慢性难愈合创面防治理论与实践[M].北京:人民卫生出版社, 2011
- [20] 杨虎,郑丽君,黄新建.壳聚糖护肤液促进大鼠伤口愈合的研究[J].中华皮肤病杂志, 2011, 44(12): 891-893
Yang Hu, Zheng Li-jun, Huang Xin-jian. Chitosan lotion to promote wound healing in rats research [J]. Chinese Dermatology Journal, 2011, 44(12): 891-893
- [21] Luther N, Darvin ME, Sterry W, et al. Ethnic differences in skin physiology, hair follicle morphology and follicular penetration [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2012, 25(4): 182-191
- [22] Eungdamrong N J, Higgins C, Guo Z, et al. Challenges and promises in modeling dermatologic disorders with bioengineered skin [J]. Exp Biol Med, 2014, 239(9): 1215-1224
- [23] Jin G, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun fibrous substrates for skin tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2011, 7(8): 3113-3122
- [24] Gho CG, Martino Neumann HA. Donor hair follicle preservation by partial follicular unit extraction. A method to optimize hair transplantation[J]. J Dermatolog Treat, 2010, 21(6): 337-349
- [25] 张璐,张燕军,苏蕊,等. Micro RNA 对皮肤毛囊发育的调控机制[J]. 遗传, 2014, 36(7): 655-660
- [26] 薛亮,刘旭盛.巨噬细胞在创面愈合中的作用研究进展[J].中华烧伤杂志, 2013, 29(1): 62-64
- [27] Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, et al. Novel chitin and chitosan an of ivers in biomedical applications [J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(1): 142-150
- [28] 李若慧,张雪,单丹彤.壳聚糖的生物相容性[J].中国组织工程研究, 2012, 16(12): 2237-2240
- [29] Al-Nuaimi Y, Baier G, Watson REB, et al. The cycling hair follicle as an ideal systems biology research model [J]. Exp Der-matol, 2010, 19(8): 707-713
- [30] Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, et al. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2011, 8: 177-187