

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.023

以羊膜为载体体外培养大鼠角膜缘干细胞的实验研究*

胡 蓉,高 杰,梁雅茹,黄 悦,李 红,苏 敏[△]
(贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵阳 550004)

[摘要] **目的** 比较角膜缘干细胞(LSCs)在不同羊膜上的生长情况,寻求 LSCs 体外培养的最佳载体。**方法** 取健康剖宫产孕妇胎盘的羊膜组织,分别制备保留上皮的新鲜羊膜、去除上皮的新鲜羊膜和冷冻羊膜。消化法分离大鼠 LSCs 后将其按相同浓度分别种植于 3 种事先准备好的羊膜载体和无载体孔中,分为 4 组。实验 1 组:保留上皮的新鲜羊膜组;实验 2 组:去除上皮的新鲜羊膜组;实验 3 组:去除上皮的冷冻羊膜组;对照组:无羊膜载体组。4 组细胞分别作细胞凋亡检测,p63、PCNA 免疫荧光检测,检测阳性细胞计数。**结果** 培养第 3 天,3 个实验组培养的细胞排列紧密,融合形成单层,其中可见大小不等的团块状集落,细胞大小基本一致,多呈圆球形或卵圆形。对照组培养的细胞排列相对稀疏,基本融合,形成单层,可见散在的、大小不等的桑葚样细胞集落,集落细胞的生长特征及形态特点与实验组相似。实验组的细胞凋亡率均低于对照组,p63 阳性率和 PCNA 阳性率均高于对照组($P<0.01$),尤以实验 1 组变化最为明显($P<0.01$)。**结论** 羊膜载体有利于体外培养大鼠 LSCs 的扩增,保留上皮的新鲜羊膜能更好地维持体外培养 LSCs 的特性,是体外角膜缘干细胞培养的理想载体。

[关键词] 角膜缘;干细胞;羊膜;染色与标记;角膜;细胞凋亡;p63;PCNA

[中图分类号] R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)23-3233-04

An experimental study of cultivating rat limbal stem cells in vitro on amniotic membrane*

Hu Rong, Gao Jie, Liang Yaru, Huang Yue, Li Hong, Su Min[△]

(Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To search the optimal substrate of limbal stem cells(LSCs) cultured in vitro and provide experimental basis for LSCs transplantation. **Methods** The amniotic membranes of placenta from healthy pregnant women were obtained after caesarean section, the intact fresh amniotic membrane, the denuded fresh amniotic membrane and the denuded frozen amniotic membrane were prepared. There were 4 groups in the experiment: the experimental group 1 (the intact fresh amniotic membrane group), the experimental group 2 (the denuded fresh amniotic membrane group), the experimental group 3 (the denuded frozen amniotic membrane group) and the control group (the amniotic membrane free group). One hundred and twenty SD rats were used in this experiment. The cells of 4 groups were detected by cell apoptosis(TUNEL method), immunofluorescence of p63 and PCNA. The positive rates were analysed with the statistical methods. **Results** On the 3th day, the cultured cells of 3 experimental groups spreaded tightly and fused to a monolayer. There were many big clones clustered and the cells were spherical or oval with the same size. The cultured cells of the control group spreaded less tightly and fused to a monolayer as well. There were some small clones clustered and the cells were similar to the experimental groups. Experimental groups had less apoptosis positive cells and most cells were p63 and PCNA positive, while the control group had more apoptosis positive cells and less p63 and PCNA positive cells. The cell apoptosis rates of three experimental groups were lower than those of control group, the positive rates of their p63 and PCNA were higher than those of control group ($P<0.01$). The changes of the experimental group 1 were the most obvious ($P<0.01$). **Conclusion** Three different amniotic membranes are all helpful for rat LSCs culture in vitro. Moreover, the cells cultured on the intact fresh amniotic membrane were maintained with better characteristics. So the intact fresh amniotic membrane is considered to be the optimal substrate.

[Key words] limbus corneae; stem cells; amnion; staining and labeling; corneae; cell apoptosis; p63; PCNA

正常角膜表面由角膜上皮细胞覆盖,表层上皮细胞不断脱落死亡,同时基底层的细胞不断增殖以取代表层上皮细胞。角膜上皮的完整性依赖于这一动态平衡过程。体外培养的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)移植被认为是目前针对眼表疾病最有前景的治疗方法之一^[1-3]。大量实验表明羊膜是 LSCs 体外培养的良好底物,是干细胞体外培养和临床移植研究的首选载体^[4-6]。卢建民等^[7]研究报道,将人羊膜上皮细胞移植到兔角膜缘干细胞缺乏性功能障碍(LSCD)模型眼上可抑制新生血管,减轻角膜混浊。以羊膜为载体的 LSCs 体外培养

方法的建立,目前主要集中在新鲜羊膜或低温冷冻保存羊膜的使用。对于何种羊膜载体在 LSCs 培养中更有利于 LSCs 的生长目前尚需进一步研究。故本研究拟探讨用不同羊膜为载体体外培养 LSCs 的方法,比较 LSCs 在不同羊膜上的生长情况,以期寻求 LSCs 体外培养的最佳载体,为最终实现以体外培养的 LSCs 移植提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 健康清洁级 SD 大鼠,体质量 200~500 g,

* 基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(黔省专合字[2012]41 号);贵州省科技厅-贵阳医学院联合基金(黔科合 LG 字[2012]026 号)。 作者简介:胡蓉(1980—),副教授,博士,主要从事干细胞基础与应用方面研究。 [△] 通讯作者,E-mail:summ30@163.com。

雌雄不限,由贵州医科大学实验动物中心提供,生产许可证:SCXK(黔)2012-0001。孕妇胎盘,产前进行母体血清学检查,排除一切传染性疾病的感染,由贵州医科大学附属医院提供,并通过伦理委员会批准。

1.1.2 仪器与试剂 DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司,0.25% Trypsin-0.01% 乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国 Hyclone 公司,兔多克隆抗体 p63 购自北京博奥森生物技术公司,小鼠单克隆抗体 PCNA、细胞凋亡检测试剂盒、免疫荧光试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,细胞培养板购自美国 Costar 公司,CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司,倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 羊膜载体的制备 取行剖宫产的健康孕妇的胎盘,无菌条件下,钝性分离获取羊膜,浸泡在含青链霉混合液(1:1)的磷酸盐缓冲液(PBS)中 20 min。上皮面向上贴附于无菌硝酸纤维素膜上,修剪成 2.5 cm×2.5 cm 的小块。(1)羊膜保存:将部分羊膜置于 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 细胞培养液中浸泡备用,4℃ 保存,于取材后 12 h 内使用。将剩余羊膜按培养基和甘油 1:1 混合的溶液浸泡,4℃ 冰箱中放置 20 min,转-80℃ 冰箱保存 2 个月,待使用时取出迅速置于 37℃ PBS 中解冻 1 min,冲去表面甘油,PBS 水化 30 min 后去上皮。(2)羊膜去上皮:含 0.25% 胰蛋白酶、0.01% EDTA 的消化液 37℃ 消化 45 min,细胞刮刀刮除上皮细胞,倒置镜下确认上皮细胞全部清除,上皮面朝上置于 24 孔培养板内于 37℃ 孵箱中干燥待用。

1.2.2 LSCs 的分离与培养 取新鲜大鼠角膜缘组织,眼科剪将组织反复剪碎至 1 mm² 大小,消化液 37℃ 消化 20 min,加适量 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基反复吹打至单细胞悬液,离心去上清液。适量培养液重悬细胞,计数后以 1.5×10⁵/cm² 的密度分别接种于平铺 24 孔培养板中,分为 4 组:有新鲜的保留上皮的羊膜为实验 1 组;新鲜的去除上皮的羊膜为

实验 2 组;经冷冻保存的去除上皮的羊膜及无羊膜载体的为实验 3 组;无羊膜载体组为对照组。37℃ 5%CO₂ 培养,培养液每 2~3 天更换 1 次,每日用倒置相差显微镜观察细胞的生长状况并拍照记录。

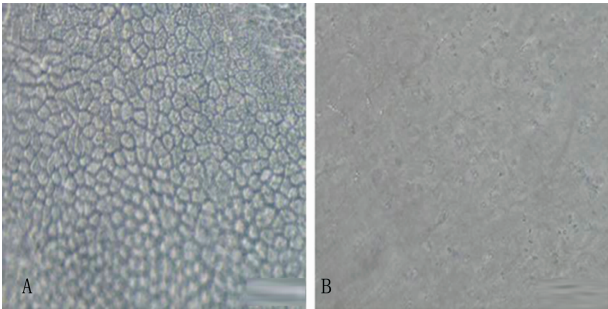
1.2.3 细胞凋亡苏木素-伊红(HE)染色检测 取分组培养第 5 天的 LSCs,按照武汉博士德生物工程有限公司提供凋亡检测试剂盒说明书操作。

1.2.4 免疫荧光细胞化学染色检测 取分组培养第 5 天的 LSCs,免疫荧光细胞化学染色检测 p63 和 PCNA 的表达。实验严格按照说明书操作,空白对照以 PBS 代替一抗。

1.3 统计学处理 所有数据均用 SPSS17.0 统计软件进行处理和作图。在 4 组的每一张玻片上各取 3 个视野计数阳性细胞个数和阴性细胞个数(每组 10 张玻片),计算出细胞阳性率,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,4 组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

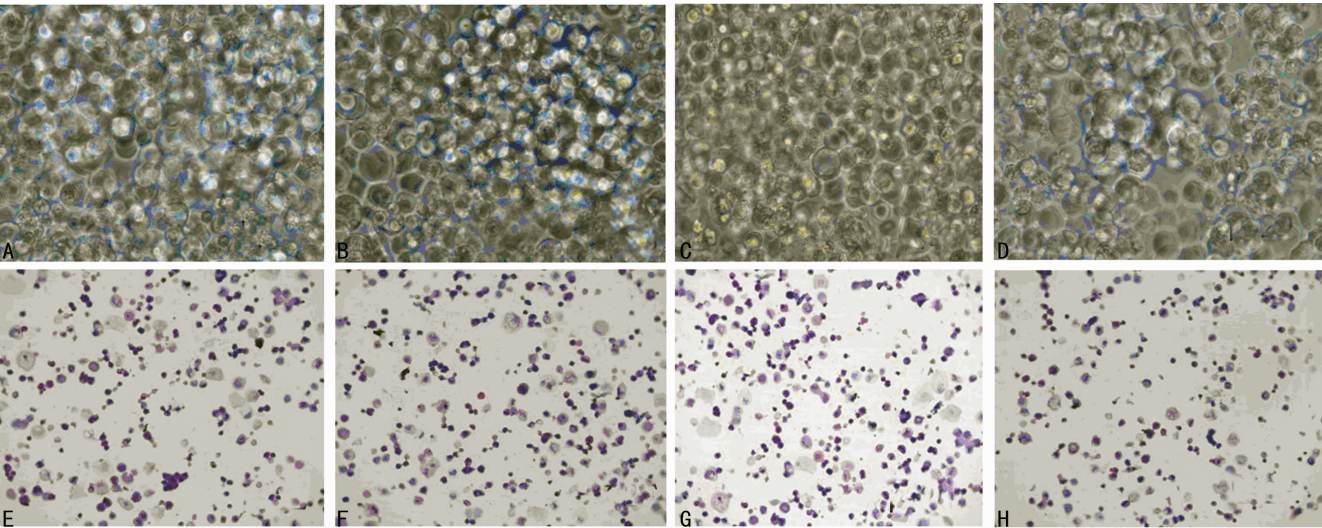
2 结 果

2.1 羊膜载体的制备 倒置显微镜观察,保留上皮的羊膜上皮细胞呈立方形,小而密,覆盖整个表面(图 1A)。去除上皮的羊膜表面未见细胞成分,可见基底膜网状纤维,纵横交错,见图 1B。



A:保留上皮的羊膜;B:去除上皮的羊膜。

图 1 羊膜载体制备结果(×200)



A:实验 1 组病理切片;B:实验 2 组病理切片;C:实验 3 组病理切片;D:对照组病理切片;E:实验 1 组 HE 染色;F:实验 2 组 HE 染色;G:实验 3 组 HE 染色;H:对照组 HE 染色。

图 2 SD 大鼠 LSCs 体外细胞培养结果(×400)

2.2 大鼠 LSCs 的培养体外生长特征 倒置镜观察,培养第 3 天,实验 1 组(图 2A)、实验 2 组(图 2B)、实验 3 组(图 2C)3 个

实验组培养细胞排列紧密,融合形成单层,单层之间可见大小不等的团块状集落,细胞大小基本一致,多呈圆球形或卵圆形,

其中实验 2 组和实验 3 组的细胞集落均多于实验 1 组的细胞集落,但二者的死细胞数比实验 1 组多。对照组(图 2D)培养细胞排列相对稀疏,基本融合形成单层,可见散在的、大小不等的桑葚样细胞集落,集落细胞生长特征及形态特点与实验组相似,死细胞明显比 3 个实验组的死细胞多。HE 染色观察 4 组培养细胞的形态特征:实验 1 组(图 2E)、实验 2 组(图 2F)、实验 3 组(图 2G)3 个实验组的 LSCs 数量均相对较多,对照组(图 2H)细胞数较少,4 组培养细胞的形态基本相同,均呈椭圆形或不规则形。

2.3 免疫荧光细胞化学检测 各组 p63 蛋白及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达 培养第 5 天,3 个实验组中均有大多数细胞呈 p63 阳性反应(细胞核发出橙黄色荧光的细胞则为 p63 阳性细胞),而 p63 阳性细胞则为 LSCs。实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组的 p63 阳性率均高于对照组(图 3)。细胞核发出橙黄色荧光的细胞则为 PCNA 阳性细胞,3 个实验组中均有大多数细胞呈 PCNA 阳性反应。实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组的 PCNA 阳性率均高于对照组(图 4)。实验 1 组与实验 2 组的 p63、PCNA 阳性性表达率比较,差异有统计意义($P<0.01$);实验 1 组与实验 3 组的 p63、PCNA 阳性性表达率比较,差异有统计意义($P<0.01$);实验 2 组与实验 3 组的 p63、PCNA 阳性性表达率比较,差异无统计意义($P>0.05$),见图 3、4。

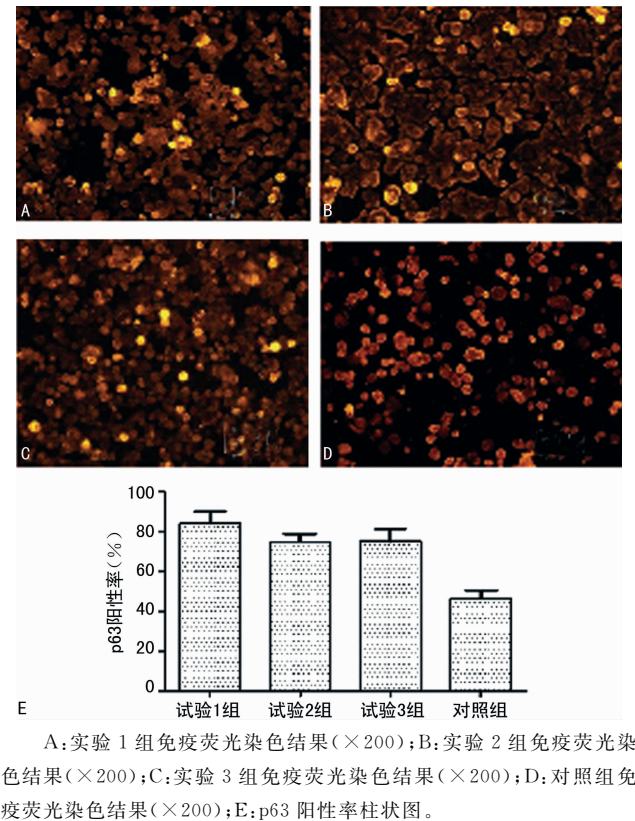


图 3 SD 大鼠 LSCs 中 p63 免疫荧光染色结果

2.4 细胞凋亡检测 各组细胞的凋亡率 培养第 5 天,3 个实验组中均有少数细胞呈细胞凋亡阳性反应,细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性,即发生凋亡的细胞。实验 1 组细胞凋亡率为(21.63 $\pm$ 2.76)%、实验 2 组细胞凋亡率为(31.21 $\pm$ 2.50)%、实验 3 组细胞凋亡率为(30.49 $\pm$ 4.01)%,而对照组细胞凋亡率为(54.60 $\pm$ 5.21)%。与对照组比较,实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组均细胞凋亡数量减少($P<0.01$)。实验 3 组与实验 2 组细胞凋亡率均高于实验 1 组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 5。

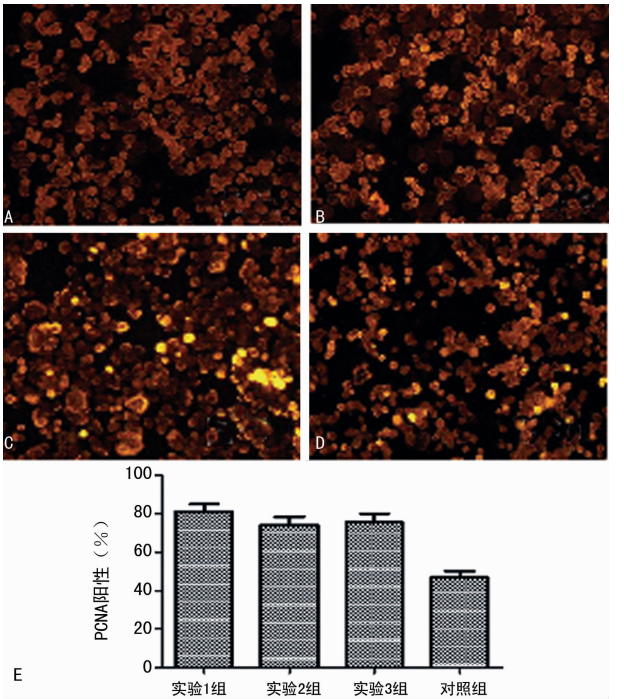


图 4 SD 大鼠 LSCs 中 PCNA 免疫荧光染色结果

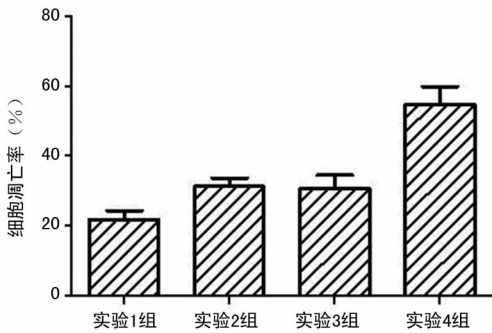


图 5 SD 大鼠 LSCs 细胞凋亡结果

3 讨 论

3.1 大鼠 LSCs 的体外培养及鉴定 LSCs 位于角膜缘上皮基底层中,其更新能够保持角膜缘上皮细胞功能和结构的完整性,对于角膜通透性至关重要。因此 LSCs 体外培养及相关分子鉴定至关重要。直到目前为止,关于 LSCs 的鉴定都是间接的。Sudha 等^[8]发现,p63 局限地位于角膜上皮边缘的基底细胞,认为 p63 是 LSCs 的标志物。Parthasarathy 等^[9]研究发现 p63 在 LSCs 中高表达,而在由于干细胞分化而来的短暂扩充细胞中不表达,认为 p63 可作为鉴定 LSCs 的标志。近年来,p63 已被广泛用作了 LSCs 的鉴定^[10-13]。

PCNA 是一种在增殖细胞中合成和表达的核内多肽,它的表达和合成与细胞周期有关,其作为 DNA 聚合酶的辅助蛋白直接参与了细胞的增殖能力,在含有增殖细胞的组织中,PCNA 呈阳性表达,故 PCNA 可间接地反映细胞的增殖状况^[14]。PCNA 阳性细胞仅局限于有增殖能力的组织,是评价细胞增殖能力的可靠指标,多用于细胞的体外培养^[15]。故本研究对 4 组细胞进行了 PCNA 免疫荧光细胞化学染色,各组中均有不同数量的细胞染色呈阳性,证明了所培养的 LSCs 具有较强的增殖能力。

3.2 最佳羊膜载体的选择 目前认为,羊膜是干细胞体外培养和临床移植研究的首选载体^[4]。Bourne 将正常人羊膜组织自内向外分为 5 层:(1)上皮细胞层;(2)基底膜;(3)致密层;(4)纤维母细胞层;(5)海绵层。在制备羊膜载体时,将绒毛膜去掉,合格的羊膜载体只包括上皮细胞层和基底膜,无血管和基质成分(如成纤维细胞、胶原和其他非细胞成分)。本实验制备的羊膜载体成分均符合体外培养载体的要求。

本研究在 3 种羊膜上培养的 LSCs 发现所得的克隆细胞团形态一致,有较高的核质比,说明 3 种培养方法均较好地保持了培养 LSCs 的干细胞特性。倒置镜观察到,羊膜载体上培养的细胞,3 d 的融合率可达到 70%,5 d 可达 100%,明显高于无载体组(第 5 天左右方可达到 70%的融合),说明在 3 种羊膜载体上培养的大鼠 LSCs 生长速度快,克隆形成率高,具有较强的增殖能力,均较无载体状态更有利于 LSCs 的体外培养。

目前,关于新鲜羊膜和保存羊膜用于眼表疾病的治疗中孰优孰劣的问题,众说纷纭。LSCs 在体内增殖分化受神经、内分泌、体液及微环境等各种因素的影响,其中各种细胞因子的作用尤为重要。许多研究表明,完整新鲜羊膜的上皮层细胞能够分泌多种生物活性分子(表皮生长因子、转化生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子等),在体外培养时,能刺激培养细胞的增殖、运动,增强黏附,并调节其分化状态^[16-20]。另外,神经生长因子还可诱导蛋白质合成、刺激免疫球蛋白 M(IgM)分泌、调节胆碱乙酰基转移酶的活性,对调节 LSCs 生存的微环境,促进其增殖具有重要作用。本研究用新鲜完整羊膜培养的 LSCs 数量最多,增殖能力最强,细胞凋亡率最低,在整个培养过程中,除培养基外,未使用其他任何促进细胞增殖的试剂,产生这一结果的原因可能与羊膜上皮细胞分泌各种细胞因子,最好地模拟了 LSCs 生长的微环境有关。

羊膜的基底膜是人体中最厚的基底膜,含有Ⅳ型胶原纤维网(ColⅣ)、层粘连蛋白(LN)和肝糖蛋白,可以为细胞黏附提供支架,引发细胞内信号转导,促进细胞增生和移行^[21]。说明去上皮的羊膜作为“移植的基底膜”,也可以为 LSCs 生长提供一种健康基质,起到增强 LSCs 的黏附,促进其移行和分化,以及防止凋亡等作用。故本研究用新鲜去上皮的羊膜作 LSCs 的体外培养,所获细胞的数量、增殖能力、凋亡率均优于无载体,提示在羊膜去上皮的情况下,羊膜基质在 LSCs 体外培养过程中也在一定程度上发挥了正面的作用。

针对冷冻去上皮羊膜培养 LSCs 的情况,研究表明,冷冻保存的羊膜中上皮分泌的各种细胞因子效价显著降低,但基底膜中含有的 ColⅣ和 LN 并无明显变化,故认为在冷冻保存羊膜中各种生物活性分子的作用很小,甚至没有作用,而发挥主要作用的是基底膜^[21]。这一观点支持了本实验冷冻去上皮羊膜组 LSCs 体外培养的结果,即由于没有羊膜上皮所分泌的各种细胞因子的作用,所获 LSCs 的数量、增殖能力均低于新鲜保留上皮的羊膜组,而凋亡率则相对增加;相关指标与新鲜去上皮羊膜组没有明显的区别,这也是没有设置冷冻保留上皮羊膜组培养的原因。

综上所述,本研究通过比较大鼠 LSCs 在保留上皮的新鲜羊膜、去除上皮的新鲜羊膜和去除上皮的冷冻羊膜上的生长情况和生物学特性发现,保留上皮的新鲜羊膜能更好地维持体外培养 LSCs 的干细胞的特性。因此,可认为保留上皮的新鲜羊膜载体更有利于大鼠 LSCs 的体外培养,是体外培养大鼠 LSCs 的理想载体,可为建立稳定的 LSCs 体外实验细胞模型,和 LSCs 进一步用于角膜损伤修复的研究奠定理论基础。

参考文献

- [1] Fan JH, Jiang H. The status of recent research on corneal preservation and some expectation[J]. Intern J Ophth, 2006(6):164-168.
- [2] 高平,刘慧霞,金伟,等.自体角膜缘干细胞移植联合羊膜遮盖治疗眼表疾病 31 例[J].武警医学,2014,25(4):387-388.
- [3] 茹香萍.角膜缘干细胞移植与羊膜移植治疗翼状胬肉[J].山西医药杂志,2010,39(4):337-338.
- [4] Rendal-Vázquez R, San-Luis-Verdes A, Yebra-Pimentel-Vilar MT, et al. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane[J]. Cell Tissue Bank, 2012, 3(7):463-471.
- [5] 杨瑞青,崔巍,高伟.羊膜联合角膜缘干细胞移植治疗眼表疾病的研究[J].疾病监测与控制,2011,5(6):321-323.
- [6] 宋淑娟,马彦秀,周翔宇.手术切除后局部应用丝裂霉素 C 联合羊膜、角膜缘干细胞移植治疗翼状胬肉的临床分析[J].中国社区医师(医学专业),2013,15(6):94-95.
- [7] 卢建民,吕秀丽,马翔.兔骨髓间充质干细胞及人羊膜上皮细胞移植治疗兔角膜缘干细胞缺损的研究[J].中华实验眼科杂志,2011,29(9):786-792.
- [8] Sudha B, Sitalakshmi G, Iyer GK, et al. Putative stem cell markers in limbal epithelial cells cultured on intact & denuded human amniotic membrane[J]. Indian J Med Res, 2008, 128(2):149-156.
- [9] Parthasarathy Arpitha NV, Muthu-Kkaruppan V. High expression of P63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells; implications on epithelial stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 10(46):3631-3636.
- [10] 魏彤心,李冰,史静华.人角膜缘干细胞的体外培养及鉴定[J].眼科研究,2010,28(5):432-435.
- [11] 齐飞,于佳欣,李若溪.人角膜缘干细胞提取方法的比较性研究[J].中国伤残医学,2015,23(8):31-33.
- [12] 李丽娜.白细胞介素-6 和人角膜缘干细胞:上皮细胞和间质组织间相互作用的中介[J].中国病理生理杂志,2011(2):292.
- [13] 刘志平,沙翔垠,王智崇,等.胚胎干细胞微环境增强人角膜缘干细胞的干性和抑制凋亡的机制[J].中华实验眼科杂志,2015,33(5):389-399.
- [14] 李红,苏敏,黄悦,等.PCNA 在新西兰大耳兔角膜及角膜缘的表达[J].局解手术学杂志,2009,18(5):297-299,303.
- [15] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation[J]. Ann Bot, 2011, 107(7):1127-1140.
- [16] Tuli SS, Liu R, Chen C, et al. Immunohistochemical localization of EGF, TGF- α , TGF- β , and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation[J]. Curr Eye Res, 2006, 31(9):709-719.
- [17] Wang Z, Peter S. Dependence of EGF-induced increases in corneal epithelial proliferation and migration on GSK-3 inactivation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 10(50):4828-4835.

种因素相互关联,不同的脱乙酰程度及相对分子质量的大小,会对其止血性、抗菌性及与炎症反应产生极大影响。低脱乙酰度的壳聚糖甚至对耐甲氧西林金葡菌有很好的抑制性^[9],而小相对分子质量的壳聚糖也会提高组织对其降解的速度^[10]。

既往的研究显示,在一定范围内,生物材料的抗菌性能与纳米银浓度呈正相关,为达到较为优秀的抗菌性能,一般需要纳米银的添加比例不低于生物材料的 1.5%^[11],而在本实验中,0.5%的 SNC 敷料已经显示出优秀的抗菌能力,考虑其为纳米银与壳聚糖的协同作用所导致的抗菌性能提升。其协同作用表现为:(1)纳米银粒子尺寸小且比表面积大,容易与细菌发生接触反应,使纳米银粒子黏附到细胞膜上,并渗入到细菌内部,在细菌细胞内部纳米银粒子通过与酶蛋白中的硫和磷发生作用,使细菌丧失酶活性,同时也会破坏细菌的呼吸链,导致细菌死亡^[12];(2)纳米银粒子在细菌细胞中可以释放银离子,从而进一步提高其抗菌能力;再次,壳聚糖上未反应的一NH₂质子化生成一NH₃⁺,能够吸附细菌表面带负电荷的分子基团而改变其细胞通透性,从而导致细菌细胞内组分如蛋白质与葡萄糖的泄露,致使细菌死亡;(3)壳聚糖复合物具有独特的网状结构,当与细菌接触时,其更易堆积在细菌细胞表面而造成细胞代谢减弱,从而抑制细菌繁殖^[13]。

现代生物敷料应该是具有良好保湿能力,不粘连新生肉芽组织,减少更换时患者的痛苦;可以促进上皮细胞再生,提高巨噬细胞及纤维母细胞活性;保持伤口清洁,减少伤口可能的细菌感染,促进伤口愈合的新型敷料。本课题组所制作的敷料,除了其优异的抗菌性外,低于1%的 SNC 模型更是无明细的细胞毒性。且在动物实验中证明本敷料相较传统敷料可以促进伤口的愈合,也能够保持伤口的湿润。综上所述,本敷料符合现代生物敷料的要求。

但本实验依然有一些问题尚待解决:(1)尽管选择的纳米银材料是一种目前看来较为优秀的抗菌材料,相关的研究也证实短期研究中,未见到银对生物体产生严重不良反应^[14-15],但是其长期影响仍无定论。(2)现阶段并未完全理解 SNC 敷料是如何影响伤口愈合的,其具体机制是为何。有研究提示小相对分子质量的壳聚糖可以抑制基质金属蛋白酶 2 的活性及表达,当其相对应分子质量在(3~5)×10³ 时,其可以达到最大的效应。而过量的基质金属蛋白酶 2 被认为是抑制伤口愈合的因素之一。但这只是其中一个假设,关于 SNC 敷料如何促进伤口愈合,还需要进一步研究。

总而言之,SNC 敷料符合现代新型生物敷料的基本要求,相较传统敷料有其优越性,值得临床进一步研究。

参考文献

[1] Heng MC. Wound healing in adult skin:aiming for perfect regeneration[J]. *Int J Dermatol*,2011,50(9):1058-1066.

[2] 黄书鹏,刘林奇,李乐,等.湿性愈合敷料在皮片移植供区创面愈合中的应用[J]. *重庆医学*,2014,21(8):2803-

(上接第 3236 页)

[18] Yutaka Takeuchi KM,Chris W. The roles of FGF signaling in germ cell migration in the mouse[J]. *Development*,2005,12(132):5399-5409.

[19] Tandon A,Tovey JC,Mohan RR, et al. Role of transforming growth factor Beta in corneal function,biology and pathology[J]. *Curr Mol Med*,2010,10(6):565-578.

[20] Hqi D,Jones DB. Identification of neurotrophic factors NGF,

2805.

[3] Cardinal M,Eisenbud DE,Armstrong DG, et al. Serial surgical debridement:a retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds[J]. *Wound Repair Regen*,2009,17(3):306-311.

[4] 汤京龙,徐红,郭世富,等.医用敷料分类界定的初步研究[J]. *中国药事*,2014(9):1009-1013.

[5] Ahamed MI,Sankar S,Kashif PM, et al. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles[J]. *Int J Biol Macromol*,2015(72):680-686.

[6] Shahzad S,Yar M,Siddiqi SA, et al. Chitosan-based electrospun nanofibrous mats,hydrogels and cast films;novel anti-bacterial wound dressing matrices[J]. *J Mater Sci Mater Med*,2015,26(3):136.

[7] 彭俊军,张馨,吴毅明,等.壳聚糖改性织物中原位合成银纳米粒子[J]. *高等学校化学学报*,2014,35(2):415-420.

[8] Li C,Fu R,Yu C, et al. Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings;a preclinical study[J]. *Int J Nanomedicine*,2013(8):4131-4145.

[9] Lee DS,Jeong SY,Kim YM, et al. Antibacterial activity of aminoderivatized chitosans against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Bioorg Med Chem*,2009,17(20):7108-7112.

[10] Xie H,Lucchesi L,Teach JS, et al. Long-term outcomes of a chitosan hemostatic dressing in laparoscopic partial nephrectomy[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,2012,100(2):432-436.

[11] 邹兆伟,史福军,黄宗海,等.纳米载银磷酸锆抗菌聚氨酯的抗菌性能[J]. *中国组织工程研究*,2012,16(3):405-408.

[12] Rai M,Yadav A,Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnol Adv*,2009,27(1):76-83.

[13] Shi Z,Neoh KG,Kang ET, et al. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles[J]. *Biomaterials*,2006,27(11):2440-2449.

[14] 耿健,柳大烈,张阳,等.纳米银抗菌医用敷料创面外用后纳米银在体内的分布[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2011,15(16):2915-2919.

[15] 程鹏,高萍,程琳,等.含银离子烧伤敷料的遗传毒性研究[J]. *天津药学*,2014,26(2):1-3.

(收稿日期:2016-04-09 修回日期:2016-06-29)

GDNF and their corresponding receptors TrkA,GFRα-1 as potential new markers for human corneal epithelial stem cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2007,5(48):481-485.

[21] 赵敏,鲁静,张琪,等. HGF、bFGF、ColⅣ、LN 在保存羊膜中的表达[J]. *眼科研究*,2006,24(5):514-517.

(收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-07-21)