

胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料的制备 及其对小型猪烫伤创面全层皮肤缺损的修复研究*

黄爱宾¹ 郭 瑞¹ 徐少骏² 马 列^{1**} 高长有^{1**}

(¹教育部高分子合成与功能构造重点实验室 浙江大学高分子科学与工程学系 杭州 310027)

(²杭州师范大学临床医学院 杭州 310036)

摘 要 制备了一种胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料,并以小型猪为模型,考察了其对烫伤全层皮肤缺损的修复性能.首先合成了磺化羧甲基壳聚糖,并对其结构进行了表征.制备了胶原-磺化羧甲基壳聚糖多孔支架,采用扫描电子显微镜(SEM)研究了磺化羧甲基壳聚糖含量对支架微结构的影响.随着磺化羧甲基壳聚糖含量的增大,胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架从纤维结构向片状结构转化,且支架的孔径相对变大.采用体外成纤维细胞培养实验证明胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架无明显细胞毒性.进一步将胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架与硅橡胶膜复合,构建具有双层结构的皮肤再生材料.以小型猪为模型,评价了其对深度烫伤创面的修复性能.大体观察和组织学分析结果显示,胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料具有更快的血管化性能,且经该材料处理的创面能有效支持薄自体皮片的移植成活,实现深度烫伤创面的全层修复.

关键词 磺化羧甲基壳聚糖,胶原,皮肤再生材料,烫伤,血管化

大面积暴露于外部环境的皮肤组织,易由于烧伤、机械创伤以及慢性溃疡而形成缺损或功能丧失.我国每年有近400万各类皮肤缺损患者需要治疗^[1,2].其中,深度烫(烧)伤创面的治疗一直是临床亟待解决的难题之一.迄今为止,自体皮移植仍然是临床治疗全层皮肤缺损最有效的方法.然而,对于大面积烫(烧)伤患者,往往存在供皮部位不足等问题,极大地限制了自体皮移植的应用范围^[3].近年来,随着组织工程技术和再生医学的发展,开发出具有原位诱导再生性能的皮肤再生材料已经成为可能^[4].本文通过对皮肤双层结构的模拟,设计了一种具有模拟表皮层和真皮层双层结构的皮肤再生材料.其中胶原-壳聚糖多孔支架层模拟真皮结构,以诱导创面细胞长入,硅橡胶膜模拟表皮层,达到隔离外界环境、避免细菌侵入和防止水分蒸发等作用^[5].

大量研究表明,皮肤再生材料血管化速度慢是导致其移植成功率低的主要原因.因此,加快血管化速度,缩短创面缺血时间,提高移植成功率是皮肤再生材料设计的关键.目前,加快血管化的方法包括,复合促血管生物活性因子或功能DNA,血管内皮细胞预种植以及支架材料预血管化

等^[6].研究表明,带磺酸基团的分子与肝素类似,具有与碱性成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)等生物活性因子特异性结合的能力.因此,本文在胶原-壳聚糖/硅橡胶双层皮肤再生材料研究的基础上,通过对羧甲基壳聚糖的磺酸化改性,赋予皮肤再生材料原位捕获生物活性因子的特性,提高其生物活性,以实现皮肤再生材料的快速血管化,获得一种具有良好烫(烧)伤创面愈合性能的新型皮肤再生材料.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

牛腱胶原采用酶消化与酸抽提的方法从牛腱中提取^[7].*O*-羧甲基壳聚糖($M_n = 0.8 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$, 80%取代度)购于青岛海普公司,硅橡胶膜(医用级, 150 μm 厚度)购于上海信诚公司,有机硅黏合剂(医用级)购于广州标美化工有限公司.戊巴比妥钠为Sigma-Aldrich(美国)公司产品,速眠新II购于解放军军事兽医研究所.巴马小型猪购于上海农科院实验动物中心(许可证号SYXK(沪)2004-0004).戊二醛(25%水溶液)和浓硫酸购于国药集团上海化学试剂有限公司.

* 2008-09-26 收稿, 2008-11-07 修稿. 国家重点基础研究发展规划(项目号 2005CB623902)、浙江省科技计划(项目号 2007C23014)和国家杰出青年基金(基金号 50425311)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: liema@zju.edu.cn; cygao@mail.hz.zj.cn

1.2 磺化羧甲基壳聚糖的合成及表征

称取 O-羧甲基壳聚糖 5 g 加入含有 30 mL 98% H_2SO_4 的 250 mL 圆底三口瓶中,冰水浴中搅拌 30 min,机械搅拌速度 800 r/min. 将黏稠液倒入 100 mL 三蒸水中,再用 500 mL 无水乙醇沉淀 沉淀

物经砂芯漏斗过滤后放入透析袋,透析冻干即得磺化羧甲基壳聚糖(反应式见图 1). 合成的磺化羧甲基壳聚糖的结构分别采用 Thermoelectron 公司的 NEXUS 型傅立叶红外光谱仪 (FTIR) 和 Bruker 公司 AV 600 核磁共振谱仪 (NMR) 进行表征.

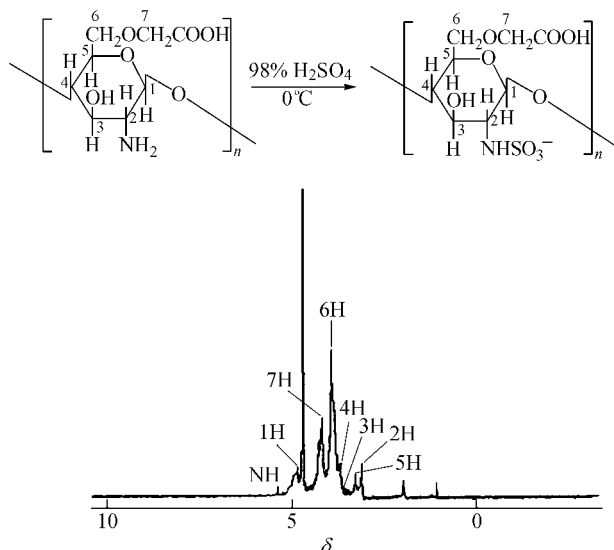


Fig. 1 Synthesis and ^1H -NMR spectrum of sulfonated carboxymethyl chitosan

1.3 胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架的制备

将牛腱胶原和磺化羧甲基壳聚糖分别溶于 30 g/L (pH = 2.78) 的乙酸溶液中,搅拌均匀形成浓度为 5 g/L 的胶原溶胀液和磺化羧甲基壳聚糖溶液. 将二者按体积比 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 和 5:5 比例混合,经真空脱泡处理后以每孔 2 mL 注入 6 孔培养板中,于 -20°C 下冷冻 2 h 后,冻干 24 h. 进一步采用 0.25% 戊二醛 4°C 下对胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架交联处理 24 h,反复漂洗,再冷冻-冻干,即获得磺化羧甲基壳聚糖比例不同的胶原-磺化羧甲基壳聚糖多孔支架. 支架的微结构采用扫描电子显微镜 (SEM, Cambridge stereoscan) 进行表征.

1.4 体外细胞毒性评价实验

胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架的细胞毒性采用支架浸提液体外细胞培养实验进行表征. 实验所用成纤维细胞来源于包皮组织,基本的过程为,将包皮组织的真皮部分剪成 0.5 mm^3 大小的组织块,加入 10 mL 1 mg/mL 的 I 型胶原酶溶液,并放入 37.5°C , 5% CO_2 培养箱中消化 5 h,消化液离心-洗涤两遍后,配制浓度为 80 万/mL 的细胞悬液,并种植于 9 cm 培养皿中,置于 37.5°C , 5% CO_2 的培养箱中培养,期间每 3 天换液.

胶原-壳聚糖支架和胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架经 75% 乙醇浸泡 2~3 h 后,用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 反复漂洗以去除残留的乙醇. 将消毒好的支架浸于完全培养液 (DMEM + 10% 小牛血清 + 100 单位/mL 青霉素/链霉素),并置于 37°C , 5% CO_2 的培养箱中 24 h,即获得支架浸提液. 以上述浸提液为培养液,将 100 μL 浓度为 3×10^5 cells/mL 的人成纤维细胞种植于 96 孔培养板中,分别于培养 1 天、3 天、5 天和 7 天后测定细胞的 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐) 活性,以纯的完全培养液为对照.

1.5 胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料对烫伤创面的修复实验

1.5.1 皮肤再生材料的制备 将生物相容性良好的有机硅橡胶黏剂(广州标美医用有机硅公司)以 10 mg/cm^2 的量均匀涂覆在厚度为 100~150 μm 的医用级硅橡胶薄膜表面,再将其与直径为 3 cm,厚度为 2 mm 的胶原-磺化羧甲基壳聚糖(8:2)多孔支架复合,制备具有双层结构的胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料. 动物移植实验前,采用 75% 乙醇浸泡和梯度无菌 PBS 置换的方法对皮肤再生材料进行消毒.

1.5.2 烫伤创面修复实验 以巴马小型猪为

动物模型,将直径 2.5 cm 的圆柱形铜块在 100℃ 水浴箱中加热至 99℃,然后持续放置于猪背部两侧 70 s,造成猪皮肤Ⅲ度烫伤^[8].烫伤 48 h 后,创面切痂至有出血的正常组织(脂肪或肌肉).把消毒好的双层皮肤再生材料平整放入切痂创面,依次覆盖 0.25% AgNO₃ 纱布和聚维酮碘纱布,并用医用纱布包扎固定.皮肤再生材料移植 2 周后,打开包扎敷料,揭下硅橡胶膜,取出移植样本,采用 HE 染色技术进行组织学表征.皮肤再生材料的血管化能力采用 VEGF 和 CD34 免疫组化染色实验进行评价.其基本过程为,将组织块用 4% 中性低聚甲醛缓冲液 4℃ 下固定 48 h,石蜡包埋切片,分别依照 VEGF 和 CD34 免疫组化检测试剂盒的步骤进行检测.染色标本在显微镜下观察,阳性信号为棕黄色.每个样本随机统计 5 个 100 倍视野的阳性信号,进行统计分析.

为了考察皮肤再生材料的全层皮肤重建能力,切取猪薄自体皮片,植入经皮肤再生材料处理 2 周后的烫伤创面,经常规加压固定,3 周后观察移植成活情况,并进行组织学分析.

2 结果与讨论

2.1 磺化羧甲基壳聚糖的结构分析

磺化羧甲基壳聚糖的结构采用¹H-NMR 进行了表征(图 1).结合文献^[9],由低场至高场依次为 5.3 (—NH₃⁺—, —NH—); 4.87 (1H, —CH—); 4.32 (7H, —OCH₂COOH, CH₂); 3.87 (6H, —CH—); 3.83 (4H, —CH—); 3.78 (3H, —CH—); 3.74 (5H, —CH—); 3.07 (2H, —CH—); 2.09 和 1.03 (原来壳聚糖中少部分未脱乙酰化部分—COCH₃, CH₃).¹H-NMR 中 $\delta = 5.3$ 处的峰证明了磺化改性的成功.

图 2 比较了壳聚糖,羧甲基壳聚糖和磺化羧甲基壳聚糖的红外谱图.由图可见,1655 cm⁻¹ 和 1596 cm⁻¹ 处为壳聚糖典型的酰胺谱带,1078 cm⁻¹ 和 1030 cm⁻¹ 为壳聚糖中 C—O 的伸缩振动(图 2a).1610 cm⁻¹ 和 1415 cm⁻¹ 的峰分别对应羧甲基壳聚糖分子中 COO⁻ 的反对称伸缩振动和对称伸缩振动(图 2b).图 2(c)为磺化羧甲基壳聚糖的红外谱图,其中 1740 cm⁻¹ 和 1636 cm⁻¹ 为 C=O 伸缩振动峰,1112 cm⁻¹ (S=O) 和 617 cm⁻¹ (S—O) 为 —SO₃H 的伸缩振动峰,证明羧甲基壳聚糖磺化改性成功^[10].

本文未采用 SO₃-DMF 等传统磺化方法,而是

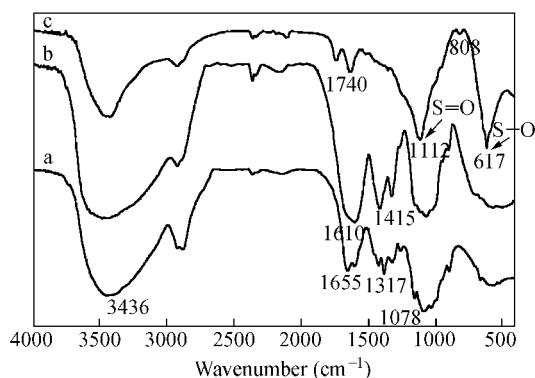


Fig. 2 FTIR spectra of chitosan (a), carboxymethyl-chitosan (b) and sulfonated carboxymethyl-chitosan (c)

采用浓硫酸低温处理的方法.该方法的可行主要是由于羧甲基改性破坏了壳聚糖的半结晶性和较强的氢键相互作用,从而比纯壳聚糖更易进行反应.此外,由于没有采用 DMF 等有机溶剂,该方法更有利于产物的分离纯化.

2.2 磺化羧甲基壳聚糖的含量对支架微结构的影响

支架的微结构是影响皮肤再生材料再生修复性能的关键因素之一.图 3 描述了添加不同比例磺化羧甲基壳聚糖对支架微结构的影响.结果显示,不论添加多少比例的磺化羧甲基壳聚糖,采用冷冻-冻干法制备的支架都具有一定的多孔结构.值得注意的是,随着磺化羧甲基壳聚糖添加比例的增加,支架的结构和孔径也逐步变化.当磺化羧甲基壳聚糖的比例为 10% 时,支架主要由一些纤维状结构组成,支架的孔径也相对较小(图 3a).随着磺化羧甲基壳聚糖比例的提高,孔的数量相对减少,孔径尺寸相应增加,而且支架逐步由纤维状结构向片状结构转换(图 3b ~ 3e).可能的原因是磺化羧甲基壳聚糖比牛腱胶原具有更好的水溶性,而且不具有胶原蛋白的纤维结构,具有较强的成膜性能.因此,随着磺化羧甲基壳聚糖比例的增加,支架主要以片状结构形成的大孔结构为主. Ring 等比较了 3 种不同孔径支架的体内血管化行为,发现具有较大孔径的支架血管化充分,更利于创面的再生修复^[11].

2.3 胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架的细胞毒性

图 4 描述了成纤维细胞在完全培养液、胶原-壳聚糖支架和胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架的浸提液中的 MTT 活性随培养时间的变化关系.通过比较成纤维细胞在 3 种培养液中的增殖活性,评

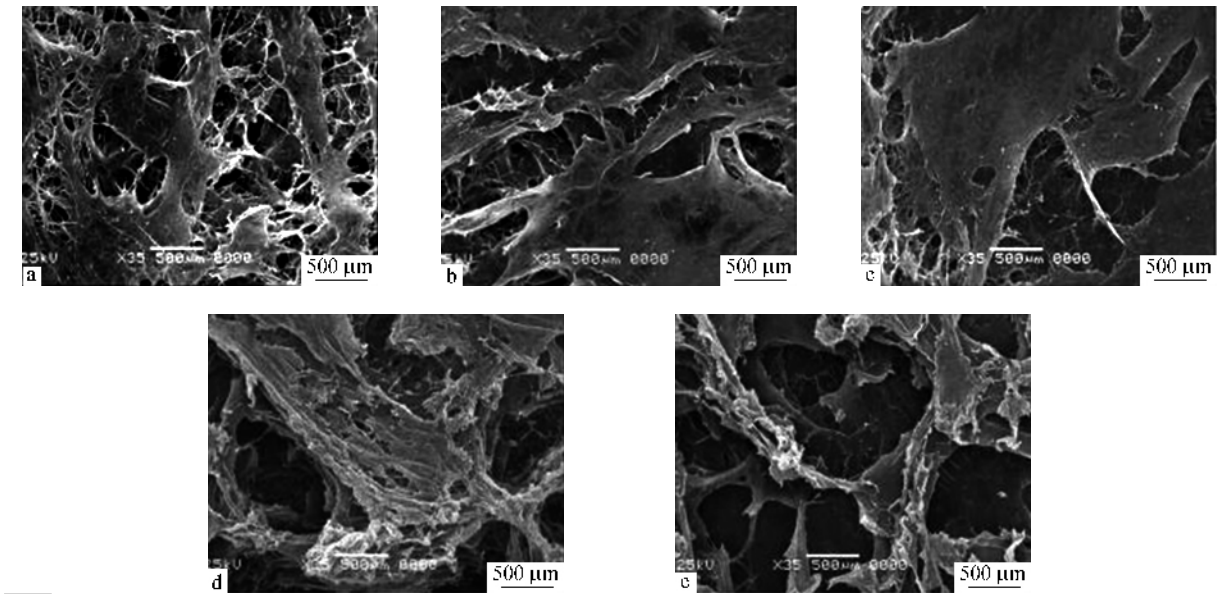


Fig. 3 SEM images of collagen/sulfonated carboxymethyl chitosan porous scaffolds with a weight ratio of (a) 9:1, (b) 8:2, (c) 7:3, (d) 6:4 and (e) 5:5

价胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架的细胞毒性. 由图 4 可知,成纤维细胞在 3 种培养液中的 MTT 活性均随培养时间的延长而增加,且成纤维细胞在不同培养液中的 MTT 活性无显著性差异. 在假设支架中单个细胞具有相同细胞活性的前提下,胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架中的细胞活性与细胞的数量具有正线性相关性. 基于以上的假设,由图 4 可知支架中的成纤维细胞随培养时间的延长而不断扩增,表现出良好的增殖能力,证明胶原-磺化羧甲基壳聚糖支架具有良好的细胞相容性,无明显细胞毒性^[12].

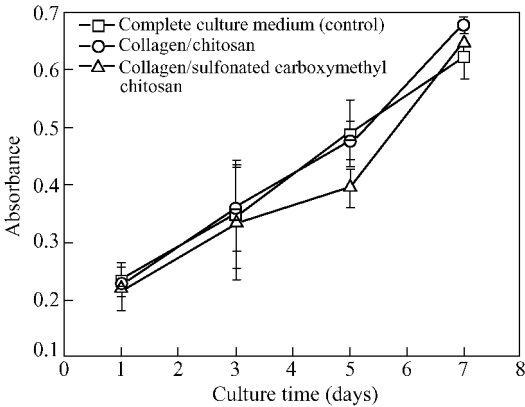


Fig. 4 The cytoviability of fibroblasts as a function of culture time Cells were cultured in the collagen-sulfonated carboxymethyl chitosan porous scaffolds Values are mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Mariappan 等研究了成纤维细胞在胶原-磺化壳聚糖复合支架中的黏附行为,证明复合支架能

支持成纤维细胞的黏附与生长,无明显的细胞毒性^[13]. Chen 等报道了一种以羧甲基壳聚糖与胶原为材料的创面敷料,该创面敷料能有效促进伤口的愈合^[14].

2.4 胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶膜皮肤再生材料的烫伤创面修复性能

开展皮肤再生材料创面修复评价实验,必须有效控制创面修复实验中的细菌侵入和水份过量蒸发等问题. 因此,通过对皮肤双层结构的仿生模拟,构建了一种具有真皮-表皮双层结构的胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶双层皮肤再生材料. 前期的研究证明,胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料可有效地修复一般创伤创面^[15]. 然而该材料在烫伤创面却难以实现血管化,创面修复性能非常弱. 可能的原因是,创伤创面的微血管网络破坏程度较轻,未深及真皮深层血管,且创面清洁;而对于严重的烫伤创面,尽管经过切痂处理,但由于其深层血管网络遭到严重破坏,且其创面经历渐进性坏死过程,愈合机理与创伤创面也不尽相同^[16]. 为了拓展胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料的创面适用范围,提高该材料在烫伤、烧伤创面的血管化速度,通过将壳聚糖替换为磺化羧甲基壳聚糖,引入磺酸基团,模拟肝素分子结构,使其具有捕获并保护成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)等生物活性因子的能力,刺激内皮细胞的增殖和迁移,从而提高皮肤再生材料的血管化能力^[17, 18].

图 5 比较了胶原-壳聚糖/硅橡胶与胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶两种皮肤再生材料的烫伤创面修复性能. 大体观察的结果显示, 胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料在移植 2 周后, 创面仍以尚未血管化的白色支架为主, 只能在支架边缘观察到颜色变化(图 5a). 对于胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料, 创面大部分区域已变红

润, 但仍然能够观察到支架的存在(图 5b). 组织学分析结果显示, 植入 2 周后在胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料处理的创面未发现新生血管(图 5c). 经胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶膜材料处理的创面组织切片中可观察到许多新生血管, 证明该皮肤再生材料在创面已实现了较充分的血管化, 具有较强的血管化能力(图 5c).

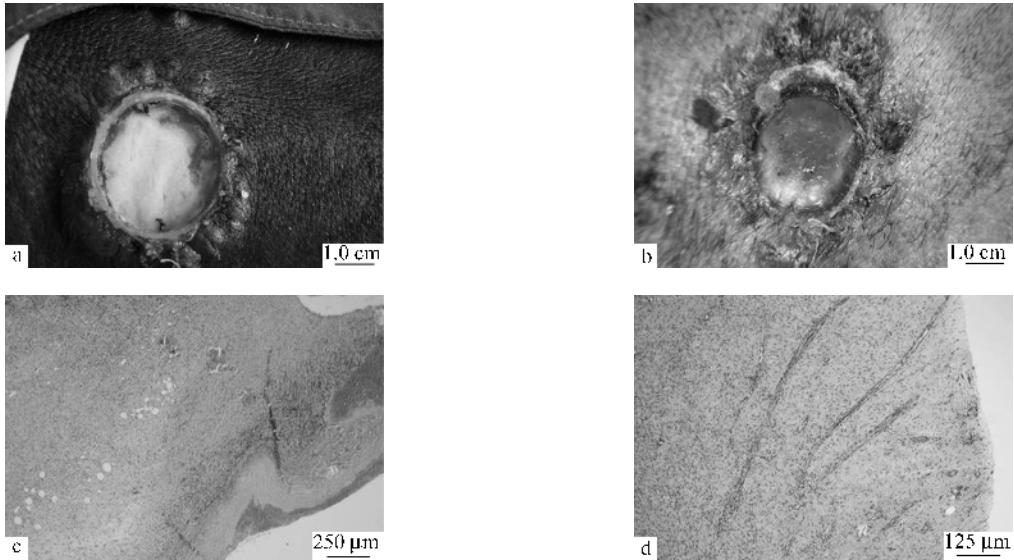


图 5 胶原-壳聚糖/硅橡胶与胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶两种皮肤再生材料烫伤创面修复性能. 大体观察的结果显示, 胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料在移植 2 周后, 创面仍以尚未血管化的白色支架为主, 只能在支架边缘观察到颜色变化(图 5a). 对于胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料, 创面大部分区域已变红

VEGF 是一种心源性碱性多肽, 可特异性刺激血管内皮细胞的增殖, 与创面愈合有密切的关系. 图 6 比较了胶原-壳聚糖/硅橡胶和胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶双层皮肤再生材料植入 2 周后的 VEGF 表达行为. 胶原-壳聚糖/硅橡胶组的 VEGF 阳性信号数为 (3.3 ± 1.4) /视野(图 6a), 而胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶组的 VEGF 阳性信号数为 (10.4 ± 1.6) /视野(图 6b), 具有显著的差异 ($P < 0.05$). CD34 是一种相对分子质量为 11×10^4 的糖基化跨膜蛋白, CD34 内皮细胞抗原在毛细血管、小血管内皮细胞呈稳定强阳性, 是目前公认敏感性高、特异性强的血管内皮细胞标记物, CD34 的表达能够反映新生血管的生成程度. 从 CD34 免疫组化结果可见, 胶原-壳聚糖/硅橡胶组的 CD34 阳性信号数为 (7.7 ± 1.9) /视野(图 7a), 而胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶组的 CD34 阳性信号数远高于胶原-壳聚糖/硅橡胶组, 达到 (20.4 ± 2.7) /视野(图 7b). VEGF 与 CD34 免疫组化染色结果都证明胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料具有更强的血管化能力.

在真皮修复研究的基础上, 通过薄自体皮片移植实验, 比较经不同材料修复创面的全层皮肤再生性能. 对于胶原-壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料, 由于其难以在烫伤创面实现血管化, 无法为移植的薄自体皮片提供养分, 进而导致薄自体皮片移植失败. 图 8 分别为薄自体皮在胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶处理的创面上移植 2 周后的大体形貌和组织切片图. 由图可见, 薄自体皮片移植后创面平整, 无明显收缩, 组织学照片中可观察到明显乳突状结构, 证明薄自体皮片移植成功, 并且与再生真皮间形成了紧密的连接(图 8a, 8b).

3 结论

合成了磺化羧甲基壳聚糖, 核磁共振谱和傅立叶红外光谱证明了磺酸基团的引入. 随着磺化羧甲基壳聚糖含量增大, 胶原-磺化羧甲基壳聚糖多孔支架从纤维结构向片状结构转化, 且支架的孔径相对变大. 胶原-磺化羧甲基壳聚糖多孔支架可有效促进成纤维细胞的增殖, 具有良好的细胞相容性. 小型猪烫伤创面修复实验证明, 胶原-磺

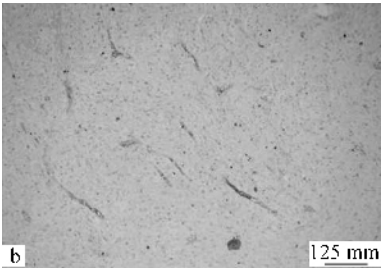
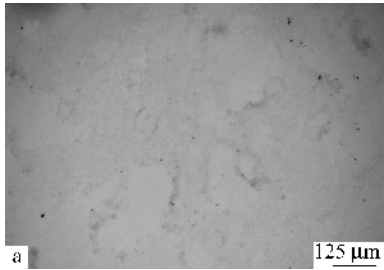


图 6 VEGF 免疫组织化学染色 of 的 scald 伤口 after 植入 of 胶原-壳聚糖/硅酮膜 dermal equivalent (a) 和 胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅酮膜 dermal equivalent (b) for 2 weeks

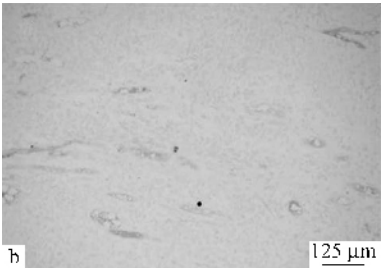
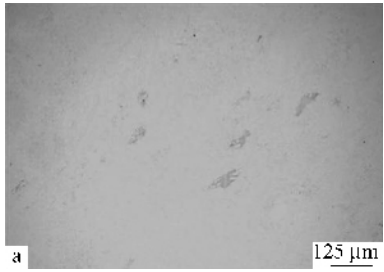


图 7 CD34 免疫组织化学染色 of 的 scald 伤口 after 植入 of 胶原-壳聚糖/硅酮膜 dermal equivalent (a) 和 胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅酮膜 dermal equivalent (b) for 2 weeks

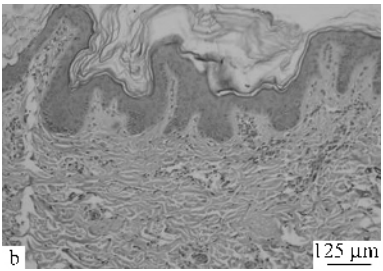
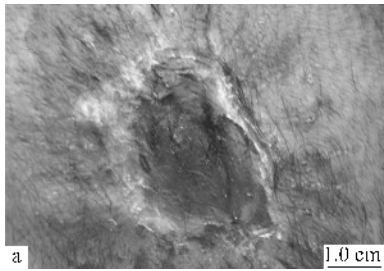


图 8 Macroscopic appearance (a) and histological examination (b) of 的 scald 伤口 after 植入 of 胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅酮膜 dermal equivalent for 2 weeks and transplantation of thin split-thickness skin graft for another 3 weeks

化羧甲基壳聚糖/硅橡胶皮肤再生材料可有效诱导创面真皮层的再生,具有良好的血管化能力.经该材料诱导再生的真皮组织能有效支持薄自体皮片的移植成活,实现深度烫伤创面的全层修复.上

述结果证明,胶原-磺化羧甲基壳聚糖/硅橡胶是一种具有良好血管化能力和创面再生性能的皮肤再生材料,具有广阔的应用前景.

REFERENCES

1 Cao Yilin(曹谊林). Chinese Journal of Aesthetic Medicine(中国美容医学),2005,14(2) 134 ~ 135
2 Fu Xiaobing(付小兵),Cheng Biao(程颢). Chinese Journal of Trauma(中华创伤杂志),2005,21(1) 40 ~ 44
3 MacNeil S. Nature,2007,445(7130) 874 ~ 880
4 Stupack D G,Cheresh D A,Science,2002,119 7Pe7
5 Shi Y C, Ma L, Zhou J, Mao Z W, Gao C Y. Polym Adv Technol,2006,16(11-12) 789 ~ 794
6 Steinstraesser L, Ring A, Bals R, Steinau H U, Langer S. Ann Plast Surg,2006,56(1) 93 ~ 98
7 Ma L, Gao C Y, Mao Z W, Shen J C, Hu X Q, Han C M. J Biomater Sci Polym Ed,2003,14(8) 761 ~ 774
8 Hebda P A, Flynn K J, Dohar J E. Wounds,1998,10(3) 33 ~ 96
9 Hiral S, Odan H, Nakajima A. Polymer Bull,1991,26 37 ~ 91
10 Tu Mei(屠美), Zou Han(邹翰). Journal of Jin University(Natural Science)(暨南大学学报(自然科学版)),1999,20(5) 78 ~ 83
11 Ring A, Langer S, Homann H, Kuhn C, Schmitz I, Steinau H, Drücke D. Burns,2006,32 35 ~ 41

12 Wu Bangyao(吴邦耀),Luo Zhuojing(罗卓荆),Meng Hao(孟浩),Hu Xueyu(胡学昱),Zhang Yongguang(张永光),Li Mo(李沫). BME&Clin Med(生物医学工程与临床), 2007,11(6): 420 ~ 425

13 Mariappan M R,Alas E A,Williams J G,Prager M D. Wound Repair Regen,1999,7: 400 ~ 406

14 Chen R N,Wang G M,Chen C H,Ho H O,Sheu M T. Biomacromolecules,2006,7: 1058 ~ 1064

15 Ma L,Shi Y C,Chen Y X,Zhao H G,Gao C Y,Han C M. J Mater Sci Mater Med,2007,18: 2185 ~ 2219

16 Middelkoop E, van den Bogaerd A J, Lammec E N, Hoekstra M J, Brandsma K, Ulrich M M W. Biomaterials,2004,25: 1559 ~ 1567

17 Lamalice L,LeBoeuf F,Huot J. Circ Res,2007,100: 782 ~ 794

18 Ferretti A,Boschi E,Stefani A,Spiga S,Romanelli M,Lemmi M,Giovannetti A,Longoni B,Mosca F. Life Sci,2003,73(15): 1985 ~ 1994

PREPARATION OF COLLAGEN-SULFONATED CARBOXYMETHYL
CHITOSAN/SILICONE MEMBRANE BILAYER DERMAL EQUIVALENT
AND ITS APPLICATION IN THE TREATMENT OF SCALDS OF PORCINE SKIN

HUANG Aibin¹, GUO Rui¹, XU Shaojun², MA Lie¹, GAO Changyou¹

⁽¹⁾ Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Ministry of Education,
Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)
⁽²⁾ College of Clinical Medical, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036)

Abstract A dermal equivalent applied in the treatment of scalds has been attracting much attention. We report here the fabrication of a bilayer dermal equivalent (BDE) composed of collagen-sulfonated carboxymethyl chitosan (SCC) porous scaffold and silicone membrane, and its application for accelerating the healing of skin scalds in a Bama miniature pig model. Firstly, the SCC was synthesized, and its chemical structure was characterized by FTIR and ¹H-NMR. Then the effect of the ratio of the SCC on the microstructure of the collagen-SCC porous scaffolds was investigated. Sheet-like structure and bigger pores in the scaffolds appeared gradually along with the increase of the SCC amount. *In vitro* culture of human fibroblasts proved that the scaffold facilitated the proliferation of cells, confirming that it can function as a physical template with good cytocompatibility. Two kinds of BDEs, *i. e.* collagen-chitosan/silicone membrane (BDE1) control and collagen-SCC/silicone membrane (BDE2), were used to repair skin scalds of Bama miniature pigs. The healing process of both BDEs was studied by macroscopic observation and H&E staining. Immunohistochemical staining of VEGF and CD34 were performed to investigate the angiogenesis ability of these two kinds of BDEs. The results showed that compared to the BDE1, the BDE2 had a stronger ability to enhance the angiogenesis of the skin equivalent and the regeneration of the dermal layer. Transplantation of split-thickness skin graft was further carried out on the regenerated dermal layers. Results showed that only the scalds treated by the BDE2 had the ability to support the restoration of full-thickness skin. All these results demonstrate that the BDE2 with the SCC and collagen as the major component has better effect on accelerating the healing of scalds than that of the BDE1 with collagen and chitosan as the major component. One can also conclude that the sulfonated carboxymethyl chitosan, which is more structurally similar as heparin, should take the main role for the better repair results.

Keywords Sulfonated carboxymethyl chitosan, Collagen, Dermal equivalent, Scald, Angiogenesis