

文章编号:1004-7220(2015)02-0148-06

# 压力下角质形成细胞与成纤维细胞共培养 对细胞增殖及胶原合成的影响

刘 阳<sup>1</sup>, 安美文<sup>1</sup>, 芦 莹<sup>2</sup>, 陈凌峰<sup>1</sup>, 茹孟洁<sup>1</sup>

(1. 太原理工大学 应用力学与生物医学工程研究所, 山西省材料强度与结构冲击重点实验室, 太原 030024;

2. 山西大医院 放疗科, 太原 030032)

**摘要:**目的 研究压力下人角质形成细胞(human keratinocytes, HKC)和人成纤维细胞(human fibroblasts, HFB)的三维共培养对细胞增殖及胶原蛋白合成的影响。方法 将HKC与HFB分别接种于壳聚糖-明胶支架2 d后,将气-液界面诱导分化1 d后的HKC-壳聚糖-明胶复合物与HFB-壳聚糖-明胶复合物共培养12 h,3.4 kPa气体压力加载24 h,并以压力单独培养、无压力单独培养或无压力共培养作为对照。HE染色观察细胞在支架中的分布及生长情况,MTT法测定细胞增殖情况,羟脯氨酸试剂盒测定上清液中的胶原含量。结果 HE染色发现,HKC与HFB均可以在壳聚糖-明胶支架上正常增殖成片;3.4 kPa压力或共培养均可以促进HKC增殖和胶原合成,抑制HFB增殖及胶原合成。结论 压力及共培养是影响HKC与HFB增殖及胶原蛋白合成的重要因素,研究结果为手术切除瘢痕后移植组织工程表皮结合压力法治疗增生性瘢痕的可能机制提供参考。

**关键词:**角质形成细胞;成纤维细胞;细胞增殖;胶原蛋白;压力

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.02.148

## Effects of keratinocytes/fibroblasts co-culture under pressure on cell proliferation and collagen synthesis

LIU Yang<sup>1</sup>, AN Mei-wen<sup>1</sup>, LU Ying<sup>2</sup>, CHEN Ling-feng<sup>1</sup>, RU Meng-jie<sup>1</sup> (1. Shanxi Key Lab of Material Strength & Structural Impact, Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. Radiotherapy Department, Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan 030032, China)

**Abstract: Objective** To investigate effects of 3D co-culture of human keratinocytes (HKC) and human fibroblasts (HFB) under pressure on cell proliferation and collagen synthesis. **Methods** The HKC and HFB were planted on chitosan-gelatin scaffolds, respectively, for 2 d. The HKC-chitosan-gelatin complex (3D HKC) was cultured at air-liquid interface for 1 d to induce differentiation, and then co-cultured with the HFB-chitosan-gelatin complex (3D HFB) for 12 h. 3.4 kPa pressure was applied on the co-culture group for 24 h. The group of single culture with pressure, the group of single culture without pressure and the group of co-culture without pressure were used as control. HE staining was used to observe distribution and growth of HKC and HFB on chitosan-gelatin scaffolds. MTT method was used to test proliferation of HKC and HFB. Hydroxyproline kit was used to observe collagen concentration of the supernatant fluids. **Results** HE staining showed that HKC and HFB could grow confluent on chitosan-gelatin scaffolds;3.4 kPa pressure or co-culture both could promote the HKC proliferation and collagen synthesis, while restrain the HFB proliferation and collagen synthesis. **Conclusions** Pressure and co-culture play an important role in HKC and HFB proliferation and collagen synthesis. This research finding provides some reference for exploring the therapeutic mechanism of hyperplastic scar from clinical operation of resecting scar by transplanting tissue-engineered skin to the wound and then combined with pressure treatment.

**Key words:** Keratinocytes; Fibroblasts; Cell proliferation; Collagen; Pressure

收稿日期:2014-06-04; 修回日期:2014-07-03

基金项目:国家自然科学基金项目(11372208), 山西省自然科学基金项目(2013011002-4)。

通信作者:安美文,教授, E-mail:meiwen\_an@163.com。

在皮肤伤口愈合过程中会形成不同程度的瘢痕,以人皮肤成纤维细胞的过度增生和胶原蛋白的过度沉积为特征<sup>[1]</sup>,严重影响患者的身体和心理健康。对于功能部位深Ⅱ度创伤形成的增生性瘢痕,临床上多采用手术方法彻底切除增生性瘢痕,移植组织工程表皮膜片覆盖创面,伤口愈合后进行压力治疗,该治疗方法具有一定的治愈效果<sup>[2-4]</sup>。但是临床上手术切除瘢痕后移植表皮及结合压力法治疗增生性瘢痕的具体机制尚不明确,故有必要对其进行更深入全面的研究。本课题组通过将细胞与壳聚糖-明胶支架进行复合培养,体外构建压力下人表皮角质形成细胞(human keratinocytes, HKC)与人真皮成纤维细胞(human fibroblasts, HFB)的三维共培养体系,分析压力及共培养在 HKC 与 HFB 调控细胞增殖和胶原合成中的作用。

## 1 实验方法

### 1.1 材料

壳聚糖(Chitosan)(药用级别,脱乙酰度 99%,青岛瑞长化学试剂有限责任公司);明胶(G-2500, Sigma 公司,美国);戊二醛(分析纯,上海试剂公司);硼氢化钠和氢氧化钠(天津市富禄化工试剂厂);Dispase II (4942078001, Roche 公司,瑞士);胶原酶 II (Collagenase II) (C6885, Sigma 公司,美国);胰蛋白酶(T4648, Sigma 公司,美国);EDTA (E8040, Solarbio 公司,北京);无钙镁 PBS (0694, Solarbio 公司,北京);DMEM 高糖培养基 (SH30022. 01B, Hyclone 公司,美国);胎牛血清(16000-044, Gibco 公司,美国);人角质形成细胞培养基 K-SFM (17005, Gibco 公司,美国)。MTT (M5655, Sigma 公司,美国);DMSO (D2650, Sigma 公司,美国);羟脯氨酸测试盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 壳聚糖-明胶支架制作

采用真空冷冻干燥方法制作壳聚糖-明胶支架<sup>[5-8]</sup>,其中壳聚糖与明胶的比例为 1:1,0.4% 戊二醛溶液加入壳聚糖-明胶溶液中,2 次真空冷冻干燥后,将支架以 25 kGy 的  $\gamma$  射线辐射支架 24 h 灭菌,进行无菌保存。

### 1.3 细胞提取及培养

取汉族成人包皮环切术后的皮肤组织(由山西大医院提供,患者具有知情权),经消毒后去除皮下

组织,0.2% Dispase II 4℃ 隔夜消化分离表-真皮,胰酶消化法提取 HKC,用 K-SFM 培养基培养 HKC;采用 0.25% II 型胶原酶消化法提取原代 HFB,培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,具体细胞提取步骤与鉴定方法见参考文献[9-12]。

### 1.4 气体压力装置设计

可控压应力密闭容器的工作原理是:将 95% 空气、5% CO<sub>2</sub> 的混合气体经 0.22  $\mu$ m 滤器过滤后充入密闭容器中,通过控制储气罐上的气体流量计及密闭容器上的进、出气口开关,使密闭容器内的气体压力稳定在实验需要设定的压力值,通过密闭容器上方的压力表显示容器内的气体压力。实验时,将种植有细胞的器皿放入密闭容器中,然后将密闭容器放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱里,无压力对照组放进同一个 CO<sub>2</sub> 培养箱<sup>[12-13]</sup>。

### 1.5 实验分组

压力共培养体系的构建步骤如下:将壳聚糖-明胶支架(干燥支架为直径 5 mm、高度 2 mm 的圆柱体),分别用 K-SFM 及 DMEM 培养基 37℃ 浸泡隔夜。所使用的 HKC 与 HFB 均为第 4 代生长状态良好且处于对数增殖期的细胞,将 HKC 与 HFB 分别以  $3 \times 10^5$  个/支架的密度接种于支架,用 K-SFM 培养基培养 HKC-壳聚糖-明胶复合物(HKC 复合物),用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 HFB-壳聚糖-明胶复合物(HFB 复合物)。

HKC 复合物浸没在培养液中培养 2 d,换液后,加入适量培养液,使 HKC 复合物上端 1 mm 部分暴露在 CO<sub>2</sub> 培养箱中,进行气-液界面培养 1 d 后,将 HKC 复合物和 HFB 复合物放入 96 孔板中共培养 12 h(其中先将 HFB 复合物放置于 96 孔板中,再将 HKC 复合物放置于其上层进行培养),以含 1% 胎牛血清的 1:1 体积比例混合的 DMEM 与 K-SFM 为培养液,以同等条件下单独培养的 HKC 复合物及 HFB 复合物作为对照组。取部分 HKC 与 HFB 共培养复合物、单独培养 HKC 复合物和单独培养 HFB 复合物进行 3.4 kPa 气体压力处理 24 h,以同等条件培养 24 h 的无压力共培养、无压力单独培养 HKC 和无压力单独培养 HFB 为对照组。

因此,将细胞增殖实验分为 8 组:①3.4 kPa 压力单独培养 HKC 组,②3.4 kPa 压力单独培养 HFB 组,③3.4 kPa 压力共培养上层 HKC 组,④3.4 kPa

压力共培养下层 HFB 组,⑤无压力单独培养 HKC 组,⑥无压力单独培养 HFB 组,⑦无压力共培养上层 HKC 组,⑧无压力共培养下层 HFB 组。

可收集 6 组上清液:①3.4 kPa 压力单独培养 HKC 组,②3.4 kPa 压力单独培养 HFB 组,③3.4 kPa 压力共培养组,④无压力单独培养 HKC 组,⑤无压力单独培养 HFB 组,⑥无压力共培养组。

### 1.6 HE 染色法观察细胞在支架上生长状态

取 8 组的组织块, PBS 溶液冲洗 2 遍, 经过固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡、复水、苏木素染色、75% 盐酸乙醇-1% 稀氨水反蓝、伊红染色、梯度酒精脱水、透明、中性树脂封片、烤片, 在显微镜下观察细胞在支架中的生长和分布情况, 并用冷成像 CCD 系统 (Image-Pro 5.1, Olympus 公司, 日本) 拍照。

### 1.7 MTT 法测定细胞增殖情况

在各组每孔培养液中加入 20  $\mu\text{L}$  MTT (5 g/L), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 4 h 后, 吸走上清液, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 15 min 至结晶物完全溶解, 每孔取样 100  $\mu\text{L}$ , 用酶联免疫检测仪 (Thermo 公司, 美国) 在 490 nm 波长下测定各组吸光值 OD。上述试验均重复 5 次 ( $n=5$ )。

### 1.8 羟脯氨酸比色法测定胶原蛋白分泌量

收集各组上清液, 每组重复 3 孔, 严格按照试剂盒操作说明书测定各组上清液中羟脯氨酸在 550 nm 处的吸光值。羟脯氨酸含量间接反映各组上清液中胶原蛋白的含量, 计算公式为:

$$\text{羟脯氨酸含量} = \frac{\text{测度管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times (\text{标准管含量} \times \text{水解液总体积}) / \text{取样量}$$

其中, 以含 1% 胎牛血清 1:1 体积比例混合的 DMEM 与 K-SFM 培养液作为空白对照。

### 1.9 统计学处理

实验数据以均数  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 19.0 统计分析软件以单因素方差分析数据, 检测各组之间是否存在差异, 两两比较采用最小显著差异法 (LSD),  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 细胞在支架上的生长情况

对各组石蜡切片进行 HE 染色, 观察细胞在支架中的生长及分布情况 (见图 1)。支架呈红色, HKC 及 HFB 细胞核内的染色质与胞质内的核糖体等呈蓝紫色。图 1(a) ~ (d) 中各组 HKC 围绕壳聚

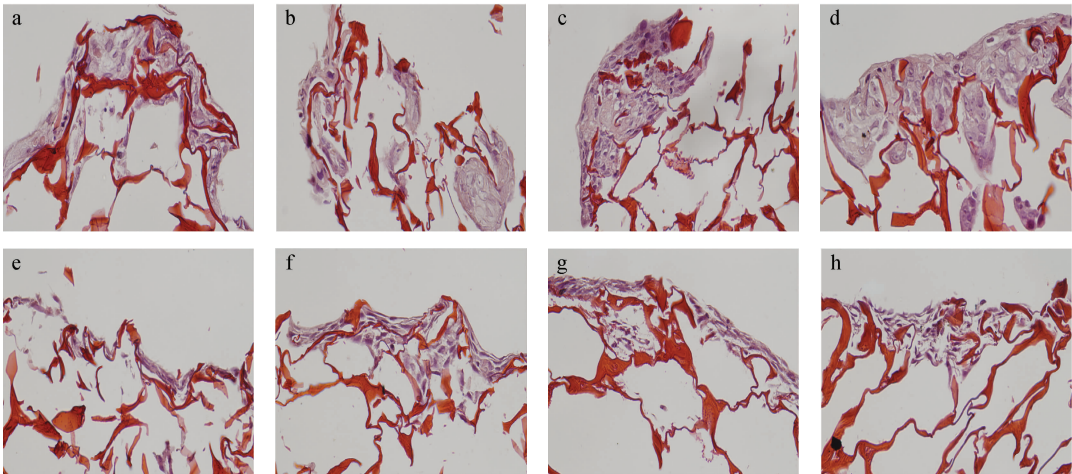


图 1 各组 HKC 和 HFB 切片的 HE 染色 (a) 无压力单独培养 HKC, (b) 无压力共培养 HKC, (c) 3.4 kPa 压力单独培养 HKC, (d) 3.4 kPa 压力共培养 HKC, (e) 无压力单独培养 HFB, (f) 无压力共培养 HFB, (g) 3.4 kPa 压力单独培养 HFB, (h) 3.4 kPa 压力下共培养 HFB

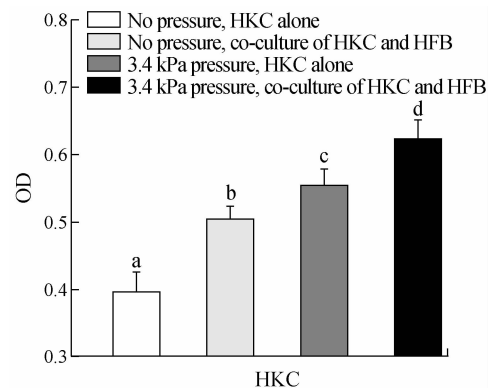
Fig. 1 HE staining of HKC and HFB in each group (a) Culture of HKC alone without pressure, (b) Co-culture of HKC and HFB without pressure, (c) Culture of HKC alone with 3.4 kPa pressure, (d) Co-culture of HKC and HFB with 3.4 kPa pressure, (e) Culture of HFB alone without pressure, (f) Co-culture of HFB and HKC without pressure, (g) Culture of HFB alone with 3.4 kPa pressure, (h) Co-culture of HFB and HKC with 3.4 kPa pressure

糖-明胶支架的孔洞生长, HKC 铺展状态良好, 呈圆形、三角形和多边形生长, 与单层生长的 HKC 状态一致, 且在壳聚糖-明胶支架中生长的 HKC 可聚集成片, 呈多层生长, 逐渐与支架融合。图 1(e) ~ (h) 中各组 HFB 亦围绕壳聚糖-明胶支架的孔洞生长, 呈典型的长梭形排列, 与单层生长的 HFB 状态一致, 且在壳聚糖-明胶支架上的 HFB 可聚集成束, 逐渐与支架融合, 说明本实验制作的壳聚糖-明胶支架适合用于培养 HKC 与 HFB, 且各组中 HKC 与 HFB 的生长状态良好。

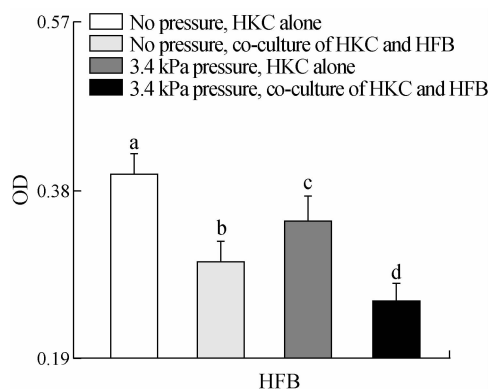
## 2.2 各组细胞的增殖情况

OD 值代表活细胞的数量, OD 值增大, 表明活细胞数量增多; 反之, OD 值减小, 表明活细胞数量减少。各组中细胞在 490 nm 波长下的 OD 值如图 2 所示。各组中 HKC 的 OD 数值具有统计学差异。相较于无压力单独培养 HKC 组, 无压力共培养组中 HKC 的 OD 值明显增大 ( $P < 0.05$ ), 说明无压力下 HKC 与 HFB 共培养可以促进 HKC 增殖; 相较于无压力单独培养 HKC 组, 3.4 kPa 压力下单独培养 HKC 的 OD 值明显增大 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力可以促进 HKC 增殖; 相较于无压力单独培养 HKC 组, 3.4 kPa 压力下共培养 HKC 的 OD 值明显增大 ( $P < 0.05$ ), 且明显大于 3.4 kPa 压力下单独培养和无压力共培养组中 HKC 的 OD 值 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力共培养 HKC 可以明显促进 HKC 增殖[见图 2(a)]。

各组中 HFB 的 OD 数值具有统计学差异。相较于无压力单独培养 HFB 组, 无压力共培养组中 HFB 的 OD 值明显减小 ( $P < 0.05$ ), 说明无压力下 HFB 与 HKC 的共培养可以抑制 HFB 增殖; 相较于无压力单独培养 HFB 组, 3.4 kPa 压力下单独培养 HFB 的 OD 值明显减小 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力可以抑制 HFB 增殖; 且无压力共培养组中 HFB 的 OD 值明显小于 3.4 kPa 压力下单独培养 HFB 的 OD 值 ( $P < 0.05$ ); 相较于无压力单独培养 HFB 组, 3.4 kPa 压力下共培养 HKC 的 OD 值明显减小 ( $P < 0.05$ ), 且明显低于 3.4 kPa 压力下单独培养和无压力共培养组中 HFB 的 OD 值 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力共培养可以明显抑制 HFB 增殖[见图 2(b)]。



(a) HKC



(b) HFB

图 2 各组细胞增殖情况比较 (a ~ d 为两两比较具有统计学差异)  
Fig. 2 Comparison of cell proliferation in each group (a) HKC, (b) HFB

## 2.3 各组上清液中胶原蛋白分泌量

经过羟脯氨酸测试盒检测各组上清液中羟脯氨酸的含量, 间接得出上清液中胶原蛋白的浓度。各组上清液中胶原蛋白的分泌量如图 3 所示。单独培养 HFB 组上清液中胶原蛋白浓度明显高于单独培养 HKC 组 ( $P < 0.05$ ), 说明同样条件培养 HFB 合成的胶原蛋白较 HKC 合成的多; 相较于无压力单独培养 HKC 组, 3.4 kPa 压力下单独培养 HKC 上清液中胶原蛋白浓度明显升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力可以促进 HKC 对胶原蛋白的合成; 相较于无压力单独培养 HFB 组, 3.4 kPa 压力下单独培养 HFB 组上清液中胶原蛋白浓度明显降低 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力可以抑制 HFB 对胶原蛋白的合成; 无压力共培养组上清液中胶原蛋白浓度高于无压力单独培养 HKC 组, 低于无压力单独培养 HFB 组 ( $P < 0.05$ ), 3.4 kPa 压力共培养组上清液中胶原蛋

白浓度高于 3.4 kPa 压力单独培养 HKC 组, 低于 3.4 kPa 压力单独培养 HFB 组 ( $P < 0.05$ ), 说明 HKC 与 HFB 共培养可以调节细胞对胶原蛋白的合成, 且使共培养组胶原蛋白的浓度低于单独培养 HFB 组; 3.4 kPa 压力共培养组上清液中胶原蛋白浓度低于无压力共培养组 ( $P < 0.05$ ), 说明 3.4 kPa 压力可以抑制 HKC 和 HFB 共培养细胞对胶原蛋白的合成。

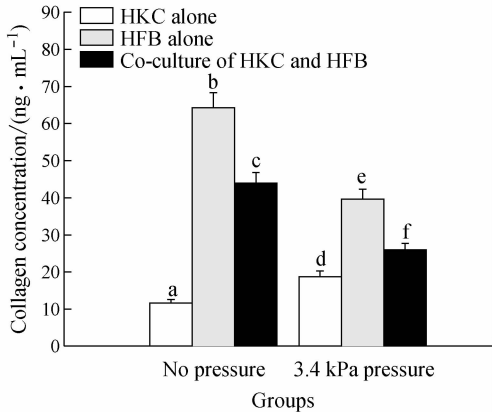


图3 胶原蛋白浓度比较(a~f为两两比较具有统计学差异)

Fig. 3 Comparison of collagen concentration

### 3 讨论

皮肤增生性瘢痕形成的显著特征是:成纤维细胞的持续增生使胶原蛋白等细胞外基质过度沉积,进而导致皮肤真皮纤维化的形成。单纯一种治疗方法可能达不到预期的治疗效果,故临床上多采用几种方法结合的方式治疗增生性瘢痕;其中,采用手术疗法彻底切除增生性瘢痕,再移植组织工程表皮薄片,并结合压力法治疗增生性瘢痕是常用的治疗方法。人体皮肤表皮毗邻真皮,在治疗增生性瘢痕中具有重要作用,临床手术切除增生性瘢痕后,在伤口部位覆盖表皮膜片可以有效地抑制增生性瘢痕的形成<sup>[14]</sup>。临床实践证明,每天施加 3.4 kPa 左右的压力 18~24 h 直至瘢痕成熟,治疗增生性瘢痕的有效率可达 60%~85%<sup>[15-16]</sup>。由于个体差异,临床上手术切除瘢痕后表皮移植结合压力治疗增生性瘢痕的具体机制尚不明确。

本研究在构建 3.4 kPa 气体压力 HKC 与 HFB 三维共培养体系的基础上,研究压力以及共培养对 HKC、HFB 增殖和胶原蛋白合成的影响。HE 染色发现, HKC 与 HFB 均在支架上生长良好, 3.4 kPa

压力可以促进 HKC 增殖,抑制 HFB 增殖,与以往研究中“间歇性垂直应力可以促进皮肤 HKC 增殖及气体压力可以抑制单层培养 HFB 增殖”的结果一致<sup>[17-18]</sup>。HKC 与 HFB 无压力共培养可以促进 HKC 增殖,抑制 HFB 增殖,与以往研究中“用单层 HFB 作为滋养层可以促进 HKC 增殖,及 HKC 与 HFB 共培养可以抑制 HFB 增殖”的现象相吻合<sup>[13]</sup>。3.4 kPa 压力 HKC 与 HFB 共培养可以明显促进 HKC 增殖,抑制 HFB 增殖,且 3.4 kPa 压力单独培养 HKC 24 h 时对 HKC 增殖的促进作用大于无压力共培养对 HKC 增殖的促进作用。相较于 3.4 kPa 压力单独培养 HFB 24 h 时对 HFB 的抑制作用,无压力共培养抑制 HFB 增殖的作用更为明显。

Sabine 等<sup>[19]</sup>研究发现,在伤口愈合过程中 HKC 与 HFB 之间存在着相互调控作用,对细胞外胶原蛋白合成具有明显的调节作用。本研究发现,3.4 kPa 压力可以促进单独培养的 HKC 对胶原蛋白的合成,抑制单独培养的 HFB 对胶原蛋白的合成。HKC 与 HFB 无压力共培养组合成的胶原蛋白浓度低于无压力单独培养 HFB 组的浓度,高于无压力单独培养 HKC 组的浓度。3.4 kPa 压力 HKC 与 HFB 共培养可以明显抑制胶原蛋白的合成。这可能是临床上彻底切除增生性瘢痕组织后,移植组织工程化膜片结合压力法治疗瘢痕可以使表皮不断增厚,实现再上皮化和真皮基质不断降解变薄,促进瘢痕快速愈合的可能机制。

以往研究发现,压应力对皮肤真皮细胞和表皮细胞的增殖及细胞外基质合成具有一定的影响。压力作用可以抑制成纤维细胞的生长并减少真皮细胞外基质的沉积<sup>[20]</sup>,静压力可以促进三维培养的表皮细胞增殖、分化和基底膜形成<sup>[21-22]</sup>。细胞因子在 HKC 与 HFB 胶原蛋白合成调控中发挥了重要作用。HKC 分泌的白介素-1 $\alpha$  (interleukin-1, IL-1 $\alpha$ ) 和转化生长因子- $\beta$ 1 (transfer growth factor, TGF- $\beta$ 1) 是调节成纤维细胞胶原蛋白合成的重要中介物质。其中,IL-1 $\alpha$  可明显抑制 HFB 的胶原蛋白合成<sup>[23]</sup>, TGF- $\beta$ 1 可以促进 HFB 的胶原蛋白合成<sup>[24]</sup>。同样, HFB 分泌的 TGF- $\beta$ 1 和人角质形成细胞生长因子 (keratinocyte growth factor, KGF) 可以调节 HKC 合成胶原蛋白<sup>[20,25]</sup>,外源性 TGF- $\beta$ 1 抑制 HKC 合成胶原蛋白, KGF 可以促进 HKC 合成胶原蛋白。压力刺激和细胞因子的刺激均可以激活 MAPK 及 NF- $\gamma$ B

信号通路,参与 HKC 与 HFB 之间细胞增殖和胶原蛋白相互调控过程。在移植组织工程化膜片结合压力法治疗增生性瘢痕过程中,如何通过压力及细胞因子调控信号通路,同步实现表皮的再上皮化及真皮的恢复还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Rei O. Mechanobiology of scarring [J]. *Wound Rep Reg*, 2011, 19(S1): S2-S9.
- [2] Verhaegen PD, Van der Wal MB, Bloemen MC, *et al.* Sustainable effect of skin stretching for burn scar excision: Long-term results of a multicenter randomized controlled trial [J]. *Burns*, 2011, 37(7): 1222-2228.
- [3] Chen X, Jiang Z, Chen Z, *et al.* Application of skin traction for surgical treatment of grade IV pressure sore: A clinical report of 160 cases [J]. *Spinal Cord*, 2011, 49(1): 76-80.
- [4] Candy LH, Cecilia LT, Ping ZY. Effect of different pressure magnitudes on hypertrophic scar in a Chinese population [J]. *Burns*, 2010, 36(8): 1234-1241.
- [5] Liu Y, An MW, Qiu HX, *et al.* The affection of the vacuum freeze-dry temperature on properties of chitosan-gelatin scaffolds [J]. *J Pure Appl Microbiol*, 2013, 7: 179-184.
- [6] Liu Y, An MW, Qiu HX, *et al.* The properties of chitosan-gelatin scaffolds by once or twice vacuum freeze-drying methods [J]. *Polym-Plast Technol*, 2013, 52(11): 1154-1159.
- [7] Liu Y, An MW, Wang L, *et al.* Preparation and characterization of chitosan-gelatin/glutaraldehyde scaffolds [J]. *J Macromol Sci B*, 2014, 53(2): 309-325.
- [8] Salati A, Keshvari H, Karkhaneh A, *et al.* Design and fabrication of artificial skin: Chitosan and gelatin immobilization on silicone by poly acrylic acid graft using a plasma surface modification method [J]. *J Macromol Sci B*, 2011, 50(10): 1972-1982.
- [9] 刘阳,许卫玮,安美文,等. 不同分化的角质形成细胞对成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2013, 27(11): 1090-1095.
- [10] 李晓娜,王晓君,贺瑞,等. 力学刺激对角膜成纤维细胞碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2012, 27(1): 72-76.  
Li XN, Wang XJ, He R, *et al.* Effects of mechanical stimulation on basic fibroblast growth factor expression of corneal fibroblasts [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(1): 72-76.
- [11] 王国辉,陈维毅,谢永芳. 力学刺激对巩膜成纤维细胞增殖活性及结缔组织生长因子表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(3): 186-189.  
Wang GH, Chen WY, Xie YH. Effects of mechanical stimulation on proliferation activity and CTGF expression of sclera fibroblasts [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(1): 72-76.
- [12] 邱海霞,刘阳,安美文,等. 压力下角质形成细胞上清液对成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J]. *生物物理学报*, 2013, 29(11): 844-852.
- [13] Healey C, Forgiione P, Lounsbury KM, *et al.* A new in vitro model of venous hypertension: The effect of pressure on dermal fibroblasts [J]. *J Vasc Surg*, 2003, 38(5): 1099-1105.
- [14] 杨军,杨光辉,刘伟,等. 组织工程化表皮膜片的构建及其在增殖性疤痕治疗中的应用[J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(4): 296-298.
- [15] Shih R, Waltzman J, Evans GR. Review of over-the-counter topical scar treatment products [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2007, 119(3): 1091-1095.
- [16] Verhaegen PD, van der Wal MB, Bloemen MC, *et al.* Sustainable effect of skin stretching for burn scar excision: long-term results of a multicenter randomized controlled trial [J]. *Burns*, 2011, 37(7): 1222-2228.
- [17] Wang TW, Sun JS, Huang YC, *et al.* Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(29): 5059-5068.
- [18] Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, *et al.* Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents [J]. *Eur J Cell Biol*, 2007, 86(11-12): 731-746.
- [19] Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A. Keratinocyte-conditioned media regulate collagen expression in dermal fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(2): 340-347.
- [20] Oh SJ, Kim Y. Combined AlloDerm® and thin skin grafting for the treatment of postburn dyspigmented scar contracture of the upper extremity [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2011, 64(2): 229-233.
- [21] 鲁元刚. 复方壳多糖组织工程皮肤基底膜重建的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学博士学位论文, 2006.
- [22] 赵丹,胥春. 力学影响细胞凋亡及其信号转导机制研究进展[J]. *医用生物力学*, 2014, 29(2): 188-192.  
Zhao D, Xu C. Advances in force-affected cell apoptosis and its signal pathways [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(2): 188-192.
- [23] Wang Z, Fong KD, Phan TT, *et al.* Increased transcriptional response to mechanical strain in keloid fibroblasts due to increased focal adhesion complex formation [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 206(2): 510-517.
- [24] Xu SW, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and brosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(2): 133-144.
- [25] Chernoff WG, Cramer H, Huang S. The efficacy of topical silicone gel elastomers in the treatment of hypertrophic scars, keloid scars, and post-laser exfoliation erythema [J]. *Aesth Plast Surg*, 2007, 31(5): 495-500.