

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250557

· 论 著 ·

## 透明质酸增强的压电左旋聚乳酸膜构建组织工程皮肤促进细胞增殖及划痕修复

宋健<sup>1</sup>, 王健<sup>1,2</sup>, 陈晓<sup>1,2</sup>, 盛世豪<sup>1</sup>, 周启荣<sup>1</sup>, 张浩<sup>1</sup>, 苏佳灿<sup>1,2\*</sup>

1. 上海交通大学医学院附属新华医院骨科, 上海 200092

2. 上海大学转化医学研究院, 上海 200444

**[摘要]** **目的** 采用透明质酸 (HA) 增强的压电左旋聚乳酸 (PLLA) 纳米纤维膜构建组织工程皮肤模型, 探索其在模拟表皮-真皮结构、支持细胞生长及促进创面愈合方面的作用。**方法** 用静电纺丝技术制备 PLLA 纳米纤维膜, 并对膜一侧浸涂 HA 以制备具有亲水性及细胞黏附能力的 PLLA/HA 膜。将人永生表皮角质形成细胞 HaCaT 接种于 PLLA/HA 膜不含 HA 侧、人皮肤成纤维细胞 (HDF) 接种于含 HA 侧, 通过细胞形态观察、荧光染色等方法评价细胞在不同区域的黏附、生长情况。另在 12 孔板中培养 HaCaT 细胞, 待单层细胞铺满后进行划痕处理, 随后分为空白对照组、PLLA/HA 膜对照组及组织工程皮肤模型组, 比较不同处理方法对 HaCaT 细胞迁移能力的影响。**结果** 浸涂 HA 的 PLLA 膜 (PLLA/HA 膜) 表面亲水性明显增强 (表现为接触角变小, 与 PLLA 膜相比  $P < 0.01$ ), 并促进了 HaCaT 细胞与 HDF 的黏附与增殖。HaCaT 细胞和 HDF 均能在 PLLA/HA 膜的两侧均匀铺展, 且细胞形态良好、活性高。划痕实验结果显示, 组织工程皮肤模型组细胞的划痕愈合率高于 PLLA/HA 膜对照组 ( $P < 0.01$ ) 和空白对照组 ( $P < 0.01$ )。**结论** 基于静电纺丝技术制备的 PLLA/HA 膜不仅具备良好的生物相容性, 还具有促进皮肤组织再生的潜力。使用该材料联合双细胞共培养可成功构建结构分层明确的组织工程皮肤模型, 为皮肤修复、药物筛选和疾病研究提供了可靠的实验基础。

**[关键词]** 组织工程皮肤; 压电材料; 左旋聚乳酸; 透明质酸; 伤口愈合

**[引用本文]** 宋健, 王健, 陈晓, 等. 透明质酸增强的压电左旋聚乳酸膜构建组织工程皮肤促进细胞增殖及划痕修复 [J]. 海军军医大学学报, 2026, 47 (4): 504-510. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250557.

### Hyaluronic acid-enhanced piezoelectric poly(L-lactic acid) membranes for constructing tissue-engineered skin to promote cell proliferation and scratch wound repair

SONG Jian<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao<sup>1,2</sup>, SHENG Shihao<sup>1</sup>, ZHOU Qirong<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, SU Jiacan<sup>1,2\*</sup>

1. Department of Orthopedics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

2. Institute of Translational Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444, China

**[Abstract]** **Objective** To construct a tissue-engineered skin model using hyaluronic acid (HA)-enhanced piezoelectric poly(L-lactic acid) (PLLA) nanofibrous membranes, and to explore its roles in mimicking the epidermal-dermal structure, supporting cell growth, and promoting wound healing. **Methods** PLLA nanofibrous membranes were fabricated using electrospinning, and HA was dip-coated on one side of the membranes to prepare PLLA/HA membranes with hydrophilicity and cell adhesion. Human immortalized epidermal keratinocytes (HaCaT cells) were seeded on the HA-free side of the PLLA/HA membranes, and human dermal fibroblasts (HDFs) were seeded on the HA-containing side. Cell adhesion and growth on different surfaces were evaluated by cell morphology observation and fluorescence staining. In addition, HaCaT cells were cultured in 12-well plates until a confluent monolayer formed, followed by scratch wounding. The cells were then divided into blank control group, PLLA/HA membrane control group, and tissue-engineered skin model group. The effects of different treatments on the migration ability of HaCaT cells were compared. **Results** The surface hydrophilicity of the HA-dip-coated PLLA membranes (PLLA/HA membranes) was significantly enhanced (indicated by a decreased contact angle,  $P < 0.01$  vs PLLA membranes), and the adhesion and proliferation of HaCaT cells and HDFs were

[收稿日期] 2025-08-20 [接受日期] 2026-01-06

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (82230071), 上海市科技创新行动计划实验动物研究领域项目 (23141900600). Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (82230071) and Laboratory Animal Research Project of Shanghai Scientific and Technological Innovation Action Plan (23141900600).

[作者简介] 宋健, 硕士生. E-mail: jian\_song@sjtu.edu.cn

\*通信作者 (Corresponding author). E-mail: drsujiacan@163.com

promoted. Both HaCaT cells and HDFs could spread uniformly on both sides of the PLLA/HA membranes with favorable cell morphology and high viability. The results of the scratch assay showed that the scratch closure rate in the tissue-engineered skin model group was significantly higher than that in the PLLA/HA membrane control group ( $P<0.01$ ) and the blank control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The electrospun PLLA/HA membranes not only exhibit good biocompatibility but also have potential in promoting skin tissue regeneration. This material combined with bicellular co-culture can be used to successfully construct a tissue-engineered skin model with a well-defined stratified structure, providing a reliable experimental basis for skin repair, drug screening, and disease research.

[ **Key words** ] tissue-engineered skin; piezoelectric material; poly(*L*-lactic acid); hyaluronic acid; wound healing

[ **Citation** ] SONG J, WANG J, CHEN X, et al. Hyaluronic acid-enhanced piezoelectric poly(*L*-lactic acid) membranes for constructing tissue-engineered skin to promote cell proliferation and scratch wound repair[J]. Acad J Naval Med Univ, 2026, 47(4): 504-510. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250557.

烧伤、慢性创面和感染等造成的皮肤损伤广泛存在,尤其在老年人群和糖尿病患者中其发病率逐年升高,严重时可导致患者组织坏死、功能缺失甚至死亡<sup>[1-2]</sup>。现有的皮肤修复材料多以生物敷料或组织移植为主,存在结构单一、功能重建不足等问题,难以完全模拟天然皮肤的各种功能<sup>[3-4]</sup>。组织工程皮肤是通过组织工程技术形成的三维多细胞结构,其可复制皮肤的主要结构和功能,但当前的组织工程皮肤往往存在构建结构不完整、耗时长、费用高等不足,难以应用于大面积皮肤缺损<sup>[5-6]</sup>。

近年来,静电纺丝技术合成的生物压电材料因可构建仿生纳米结构支架而广泛应用于组织工程领域<sup>[7]</sup>。压电材料能够将机械刺激转化为微弱电信号,通过模拟皮肤伤口处的生物电环境调节细胞行为,促进细胞迁移、增殖及组织再生<sup>[8-9]</sup>。左旋聚乳酸(poly(*L*-lactic acid), PLLA)作为一种可降解高分子材料,具备良好的力学强度和成膜性能,但其表面疏水性限制了细胞的黏附与扩展<sup>[10]</sup>。透明质酸(hyaluronic acid, HA)具有良好的亲水性与生物相容性,是改善材料表面性质的常用手段<sup>[11]</sup>。本研究通过静电纺丝技术制备 PLLA 纳米纤维膜,并在其一侧浸涂 HA 以增强亲水性,随后将人永生化表皮角质形成细胞 HaCaT 与人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblast, HDF)分别接种于膜的两侧,模拟天然皮肤结构,构建表皮-真皮双细胞协同的三维组织工程皮肤模型。该模型不仅结构明确、细胞功能良好,还结合了压电特性和 HA 特性,可在体外模拟早期创面修复的微环境,为皮肤修复材料开发及相关疾病研究提供新的策略和仿生学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及仪器 人永生化表皮角质形成

细胞系 HaCaT、HDF、胰蛋白酶、青霉素-链霉素混合液、无血清细胞冻存液[赛百慷(上海)生物技术股份有限公司]; DMEM、FBS(美国 ThermoFisher Scientific 公司); 钙黄绿素 AM(calcein-AM)/PI 细胞双染试剂盒、CCK-8 试剂盒、Triton X-100 通透液、4% 多聚甲醛固定液、DAPI 染色液(上海碧云天生物技术有限公司); 六氟异丙醇、HA(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); PLLA(深圳聚生生物科技有限公司); 静电纺丝设备 E05(佛山轻子精密测控技术有限公司); 扫描电子显微镜(德国 Zeiss 公司); 接触角测量仪(德国 Dataphysics 公司); 显微镜(德国 Leica 公司)。

### 1.2 实验细胞培养

HaCaT 细胞采用含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素混合液的高糖型 DMEM 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中常规培养,当细胞密度达到 90% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液进行消化并按 1:4 比例传代培养,培养基每 2~3 d 更换一次。HDF 采用含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素混合液的低糖型 DMEM 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养,当细胞密度达到约 80% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液进行消化并按 1:3 比例传代培养,培养基每 2~3 d 更换一次。实验均选用第 3~6 代细胞。

### 1.3 材料合成及表征

#### 1.3.1 PLLA 纳米纤维膜的制备

将分子量 80 000 的 PLLA 按照 13% (质量/体积百分比) 溶解于六氟异丙醇中,在室温下磁力搅拌至少 12 h 以充分溶解形成均匀的纺丝前驱液。将溶液装入 10 mL 一次性注射器中,连接金属针头并安装于静电纺丝装置。设定纺丝参数如下:正高压电压为 +7.53 kV,负高压电压为 -2.41 kV;注射泵供液速度为 0.55 mL/h;收集距离为 15 cm;接收装置

采用旋转鼓轮形式,鼓轮转速控制为手动移动速度 30 cm/min,以保证纤维在轴向均匀沉积。整个过程在室温(25±2)℃、相对湿度 40%~50%的环境中进行。纺丝完成后,所得 PLLA 纳米纤维膜过夜自然干燥以去除残留溶剂。

1.3.2 PLLA 膜的 HA 浸涂改性处理 为了改善 PLLA 膜的亲水性并提升其细胞黏附性能,用 HA 对膜表面进行单侧浸涂处理。将 HA 按照 1% (质量/体积百分比)溶于无菌去离子水中制备 HA 溶液。将溶液浸涂铺盖在 PLLA 膜表面的一侧,确保覆盖均匀,放置于 37℃培养箱中孵育 1 h。将膜取出后去除表面多余溶液并置于 37℃恒温培养箱中过夜干燥,使 HA 牢固附着于 PLLA 膜表面。

1.3.3 PLLA 膜表面接触角测定 为评估 PLLA 膜及其 HA 改性后的表面亲水性,采用接触角测量仪对膜的静态水接触角进行测定。测试前将膜裁剪为大小 1 cm×1 cm 的贴片,平整贴附于干净玻璃载片上。在室温(25±2)℃环境下,使用加液系统垂直滴加 4 μL 去离子水于膜表面,自动定时采集图像进行分析,总采集时长为 90 s,图像采集间隔时间为 15 s。接触角通过图像分析软件进行自动拟合,分析算法采用椭圆拟合法(elliptical fitting)。每种膜片随机选取 3 个样本,分别测量接触角并取其平均值用于后续统计分析。

#### 1.4 材料生物相容性验证

1.4.1 活/死细胞双染色 对 PLLA 膜和 PLLA/HA 膜紫外照射 2 h 进行灭菌处理,随后将已灭菌的 2 种膜裁剪成大小为 1 cm×1 cm 的贴片,分别加入含 10% FBS 的完全培养基中,按照提取剂体积与材料面积 1 mL/cm<sup>2</sup> 的比例配制浸提工作液,37℃恒温分别孵育 24、48 和 72 h 取上清,即为材料浸提液。将 HDF 接种于 24 孔板,待细胞贴壁稳定后,吸除原有培养基,换用对应组别的材料浸提液继续培养 24 h,随后进行活/死细胞双染色:按试剂说明书配制活/死细胞双染色工作液(钙黄绿素 AM 与 PI 混合)并作用于细胞 30 min,然后用 PBS 轻洗,置于荧光显微镜下观察。绿色荧光表示活细胞,红色荧光表示死细胞。

1.4.2 CCK-8 检测 将灭菌后的 PLLA 膜和 PLLA/HA 膜剪裁为直径约 6 mm 的小圆片,分别贴附于 96 孔板孔底。每孔接种 5×10<sup>3</sup> 个 HaCaT 细胞,每组设 3 个重复孔。分别在培养 24、48 和 72 h 后加入

10 μL CCK-8 工作液,继续 37℃孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度值(D 值),计算细胞增殖活性。

#### 1.5 组织工程皮肤培养及表征

1.5.1 组织工程皮肤构建与培养 将灭菌后的 PLLA/HA 膜裁剪成大小为 1 cm×1 cm 的片状,分别放置于 12 孔板中。将 1×10<sup>5</sup> 个 HaCaT 细胞接种于 PLLA/HA 膜的 PLLA 侧,将 HDF 以同样密度接种于膜的 HA 侧,注意接种均匀。细胞接种后,将培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中静置孵育 2~3 h,使细胞充分附着。孵育结束后,沿培养孔壁缓慢加入完全培养基,每孔约 2 mL,避免冲刷细胞。随后将培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,以观察和检测组织工程皮肤的形态、生长状态及细胞活性。

1.5.2 鬼笔环肽细胞骨架染色 为观察 HaCaT 细胞与 HDF 在 PLLA/HA 膜两侧的黏附与铺展情况,将合成的组织工程皮肤模型培养至第 3 天进行鬼笔环肽细胞骨架染色。取出组织工程皮肤模型,使用 PBS 清洗 3 次以去除残余培养基。随后使用 4% 多聚甲醛固定液室温固定 10 min,再次用 PBS 清洗 3 次。使用 0.1% Triton X-100 通透液于室温透膜 10 min,继续用 PBS 清洗 3 次。将提前配制好的鬼笔环肽染色工作液滴加于组织工程皮肤两侧表面,避光孵育 30 min。随后使用 DAPI 染色液(1 μg/mL)对细胞核复染 5 min,最后用 PBS 清洗去除多余染液。染色完成后将组织工程皮肤模型转移至玻片上,封片并置于荧光显微镜下观察。红色荧光代表 F 肌动蛋白(F-actin)细胞骨架结构,蓝色荧光代表细胞核。

1.5.3 HA 引入对细胞增殖的促进作用验证 为验证 HA 的引入是否促进了细胞黏附增殖,将 HaCaT 细胞和 HDF 分别接种于 PLLA 膜和 PLLA/HA 膜的 HA 侧,以比较 2 组材料对细胞生长的影响。将 PLLA 膜与 PLLA/HA 膜分别裁剪为大小 1 cm×1 cm 的片状,置于 12 孔板中。分别将 HaCaT 细胞和 HDF 以 1×10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种于膜上,每种细胞类型与膜材料组合均设 3 个重复孔。细胞接种后,将培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中静置孵育 2~3 h,随后每孔缓慢加入 2 mL 完全培养基,避免扰动细胞。培养至第 3 天,使用活/死细胞双染色工作液进行染色,避光作用于细胞 30 min, PBS 清洗

后置于荧光显微镜下观察。

**1.6 体外愈合实验** 采用 HaCaT 细胞划痕实验验证 PLLA/HA 组织工程皮肤模型在体外促进皮肤细胞迁移及创面愈合的作用。将 HaCaT 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 12 孔板,培养至细胞单层长满(约 90% 融合)后,使用无菌 200  $\mu$ L 枪头在孔中央垂直刮出一条均匀划痕。刮痕后轻柔吸除培养液,使用 PBS 清洗 2~3 次以去除浮游细胞和碎片,设空白对照、PLLA/HA 膜对照及组织工程皮肤模型 3 组:空白对照组未加入任何膜材料,仅继续培养细胞;PLLA/HA 膜对照组在细胞层上方加入 PLLA/HA 膜;组织工程皮肤模型组则加入预培养 3 d 的 PLLA/HA 膜组织工程皮肤。各组划痕后继续在 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,随后使用显微镜拍摄划痕区域图像,记录细胞迁移及划痕愈合情况。通过 ImageJ 软件测量划痕初始宽度与培养 24 h 时的残余宽度,计算愈合率,以评价组织工程皮肤模型对 HaCaT 细胞迁移与创面愈合能力的影响。

**1.7 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 10 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

**2.1 组织工程皮肤支架合成及鉴定** 基于静电纺丝技术成功制备了 PLLA 纳米纤维膜,所得膜质地柔软,表面均匀,支架形态规整;扫描电子显微镜观察到其纤维排列均匀、结构连续,无明显珠状缺陷,直径分布一致(图 1A)。使用 1% HA 溶液对 PLLA 膜表面进行浸涂改性处理,通过水接触角测试评估材料表面亲水性,结果显示 PLLA 膜表面接触角较大,表现为疏水性;经 HA 浸涂改性处理即刻和 60 s 的 PLLA/HA 膜接触角均变小(与 PLLA 膜相比,均  $P < 0.01$ ),亲水性增强(图 1B)。结果表明 HA 浸涂处理能够有效改善 PLLA 膜的表面润湿性能,为后续细胞黏附与生长提供了更优微环境。

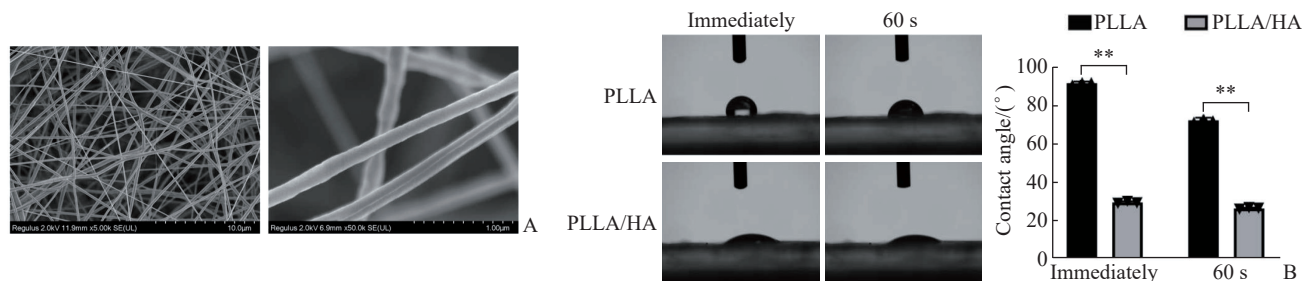


图 1 PLLA 膜及 PLLA/HA 膜的形貌及表面性能表征

Fig 1 Morphology and surface properties of PLLA and PLLA/HA membranes

A: Scanning electron microscopic images of PLLA membrane; B: Water contact angle measurement showing enhanced hydrophilicity of PLLA/HA membrane immediately and 60 s after HA dip-coating modification.  $**P < 0.01$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . PLLA: Poly(L-lactic acid); HA: Hyaluronic acid.

**2.2 组织工程皮肤支架生物相容性验证** 将 PLLA 膜、PLLA/HA 膜分别与含 10% FBS 的完全培养基孵育 24、48 和 72 h 后,取上清作为浸提液用于 HDF 的间接培养。培养 24 h 后进行活/死细胞双染色,结果显示用 3 个时间点浸提液培养的各组细胞均以绿色荧光为主,形态完整、密度均匀,红色荧光较少(图 2A)。定量分析结果表明,不同时间点浸提液培养的各组间细胞存活率差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ,图 2B)。结果提示无论 PLLA 膜还是 PLLA/HA 膜,在 72 h 内均不会释放明显对细胞有害的成分,整体表现出良好的生物安全性。

随后采用 CCK-8 法检测不同支架材料对细胞增殖活性的影响。将 HaCaT 细胞直接接种于 PLLA 膜、PLLA/HA 膜及对照组中,分别于培养 24、48、72 h 后检测细胞增殖活性。结果显示,在 24 h 时,3 组间细胞增殖活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),提示短时间内 2 种支架材料对细胞增殖活性影响有限;在 48 h 时,PLLA/HA 组细胞增殖活性较对照组略有升高( $P < 0.05$ ),而 PLLA 组与对照组、PLLA 组与 PLLA/HA 组间差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );至 72 h 时,3 组细胞增殖活性差异进一步扩大,PLLA 组和 PLLA/HA 组

均高于对照组 ( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ ), 且 PLLA/HA 组亦高于 PLLA 组 ( $P<0.05$ ) (图 2C)。结果表明, 随着培养时间的延长, PLLA 与 PLLA/HA 支

架均能促进 HaCaT 细胞增殖, 其中经 HA 修饰后的 PLLA/HA 支架促进作用更为显著。

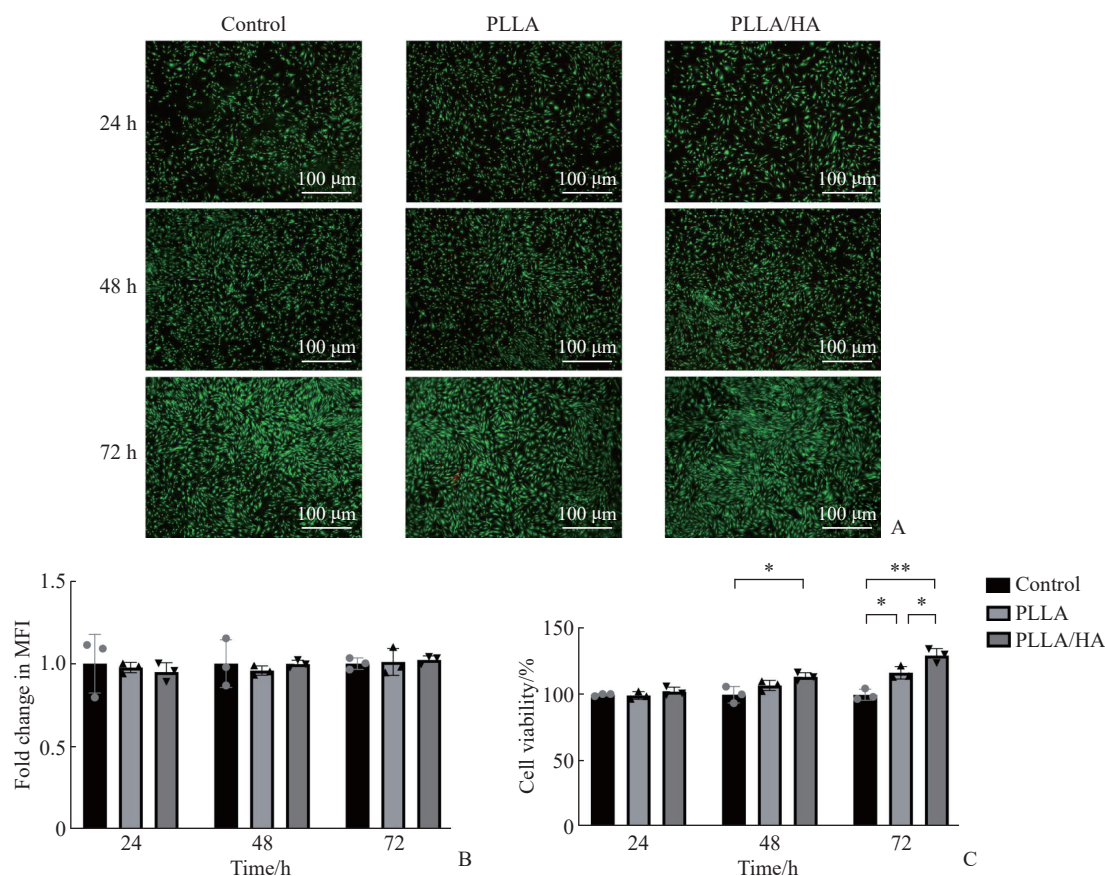


图 2 不同支架材料对 HaCaT 细胞和 HDF 生物相容性的影响

Fig 2 Effects of different scaffold materials on biocompatibility of HaCaT cells and HDFs

A: Live/dead staining of HDFs cultured in extraction of PLLA or PLLA/HA membranes; B: Quantitative analysis of fluorescence intensity for live/dead staining; C: CCK-8 assay results of HaCaT cells. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . HDF: Human dermal fibroblast; PLLA: Poly(L-lactic acid); HA: Hyaluronic acid; MFI: Mean fluorescence intensity; CCK-8: Cell counting kit 8.

**2.3 组织工程皮肤合成及培养** 将 HaCaT 细胞与 HDF 分别接种于 PLLA/HA 膜的 PLLA 侧与 HA 侧, 在 12 孔板中共培养。细胞接种后先静置孵育 2~3 h 待细胞黏附, 随后加入完整培养基继续培养。培养第 3 天, 通过鬼笔环肽细胞骨架染色观察组织工程皮肤中细胞的附着与铺展状态。结果显示, HaCaT 细胞在 PLLA 侧铺展良好, 细胞形态饱满、边界清晰, 呈铺展状排列; HDF 在 HA 侧也形成密集、规则的分布, 呈梭形或放射状排列, F 肌动蛋白细胞骨架呈红色荧光, 结构清晰、连续 (图 3A)。结果说明双细胞组织工程皮肤模型的 PLLA、HA 膜表面均有良好的细胞黏附并铺展, 支架可同时支持不同来源细胞的黏附与扩张。

为进一步验证 HA 引入是否促进细胞生长, 将

HaCaT 细胞和 HDF 分别接种于 PLLA 膜和 PLLA/HA 膜的 HA 侧, 培养至第 3 天后进行活/死细胞双染色。结果显示, PLLA/HA 膜组接种 HaCaT 细胞与 HDF 后绿色荧光信号强, 细胞密度高, 状态饱满; 而在 PLLA 膜组中, 绿色荧光信号明显弱于 PLLA/HA 膜组 (均  $P<0.05$ , 图 3B)。结果表明, HA 的引入有助于改善支架表面生物环境, 从而显著提升不同类型皮肤细胞的活性与增殖能力。

**2.4 组织工程皮肤体外愈合效果分析** 采用 HaCaT 细胞划痕实验模拟皮肤损伤模型, 以评估不同条件对皮肤损伤修复的体外促进作用。结果显示, 空白对照组划痕区域细胞迁移有限, 间隙明显; PLLA/HA 膜对照组中, 划痕宽度缩小, 表明 PLLA/HA 膜能够促进细胞向划痕区域迁移; 组织

工程皮肤模型组则表现出显著的促细胞生长作用,划痕区域接近闭合,边缘细胞排列紧密并呈拉伸状态(图4A)。定量分析结果(图4B)显示, PLLA/HA膜和组织工程皮肤模型均可促进划痕愈合,愈合率均高于空白对照组( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ ),

并且组织工程皮肤模型组愈合率高于 PLLA/HA膜对照组( $P<0.01$ )。结果提示, PLLA/HA膜本身可有效促进皮肤细胞迁移和划痕愈合,而 PLLA/HA组织工程皮肤模型在划痕修复能力上表现更为优越。

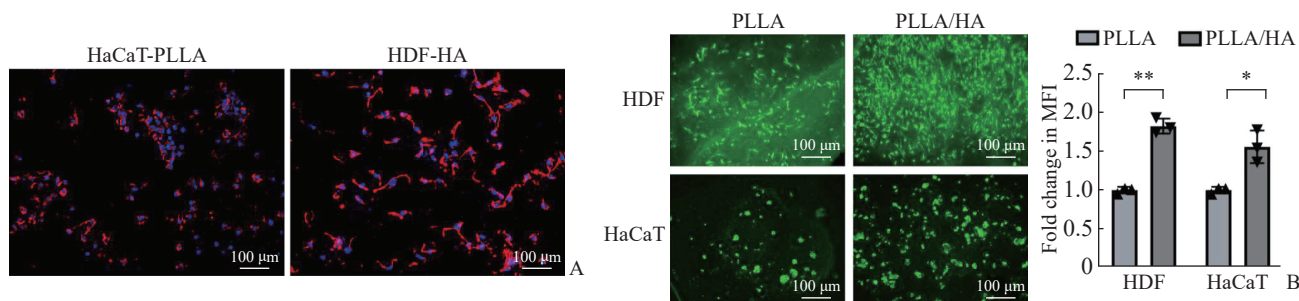


图3 PLLA/HA 支架上构建的组织工程皮肤形态及细胞黏附增殖情况

Fig 3 Morphology and cell adhesion/proliferation of tissue-engineered skin constructed on PLLA/HA scaffold

A: Phalloidin cytoskeleton staining of HaCaT cells on PLLA side (HaCaT-PLLA) of PLLA/HA membrane and HDF on the HA side (HDF-HA); B: Live/dead staining showing cell growth on PLLA and PLLA/HA membranes.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ .  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . PLLA: Poly(L-lactic acid); HA: Hyaluronic acid; HDF: Human dermal fibroblast; MFI: Mean fluorescence intensity.

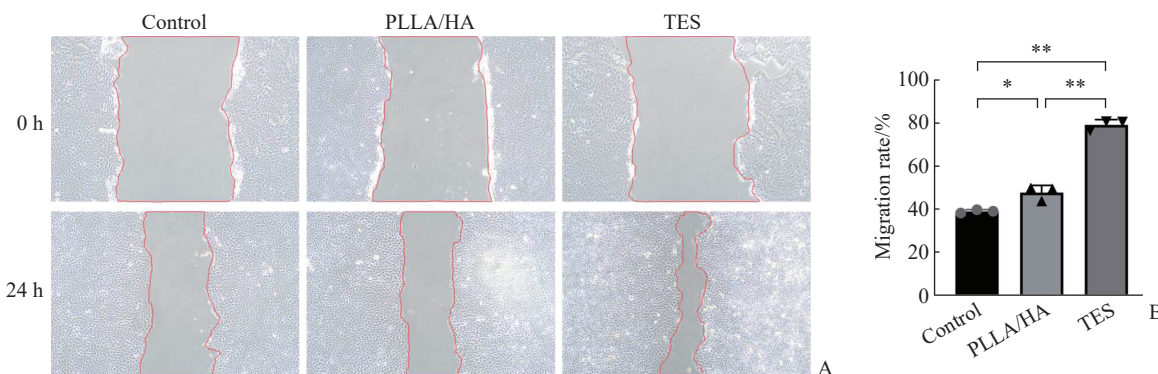


图4 PLLA/HA膜和TES模型对HaCaT细胞划痕愈合的促进作用

Fig 4 Promotion effects of PLLA/HA membrane and TES model on HaCaT cell wound healing

A: Microscopic images of scratch wounds at 0 h and 24 h; B: Quantitative analysis of cell migration rate.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ .  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . PLLA: Poly(L-lactic acid); HA: Hyaluronic acid; TES: Tissue-engineered skin.

### 3 讨论

新型生物材料在创面修复领域展现出广阔前景<sup>[12]</sup>。PLLA因其良好的生物可降解性能被广泛应用于支架材料的制备,但其本身存在亲水性差、细胞黏附性和生物活性不足等局限性,影响其在复杂创面微环境中的进一步应用<sup>[10]</sup>。本研究通过静电纺丝技术制备出结构均一的PLLA膜,并以HA浸涂对其进行改性处理,显著改善了其表面亲水性和细胞相容性,为后续组织工程皮肤构建提供了理想支架基础。

使用孵育24、48及72 h的PLLA/HA膜浸提

液培养细胞,通过活/死细胞双染色实验发现, HaCaT细胞和HDF在PLLA/HA膜浸提液中形态完整、存活率高,与空白对照组相当,表明PLLA/HA膜对HaCaT细胞和HDF具有良好的生物相容性。这提示在短期及中期培养条件下, PLLA/HA膜不会释放对细胞有害的物质,整体生物相容性良好。直接接触培养及CCK-8实验结果进一步显示,随着培养时间延长, PLLA/HA膜对HaCaT细胞增殖的促进作用逐渐显现,在培养72 h时显著高于PLLA膜及对照组,而PLLA膜虽然也能促进细胞增殖,但促增殖作用低于PLLA/HA膜。上述结果表明,引入HA不仅改善了PLLA材料的表面性质

和细胞附着环境,还能够在一定程度上增强其促进细胞生长的能力,从而为构建组织工程皮肤提供了更有利的材料基础。本研究结果与既往关于HA促进表皮细胞黏附和成纤维细胞增殖的报道<sup>[13]</sup>一致,进一步印证了HA在构建功能性创面支架中的重要作用。

本研究利用PLLA/HA支架构建双细胞共培养组织工程皮肤模型,实现了HaCaT细胞与HDF分别在PLLA侧与HA侧的稳定贴壁及有序分布。鬼笔环肽细胞骨架染色结果显示,2种细胞均呈良好铺展状态,说明该结构设计具有良好的组织引导性及空间组织能力。同时,通过进一步比较单纯PLLA膜与PLLA/HA膜对细胞增殖的影响,发现HA改性处理的PLLA膜可显著增强细胞增殖活性,提示该支架对构建多层组织结构具有潜力。

值得关注的是,PLLA/HA组织工程皮肤在体外创面模型中的促愈合效果得到了验证。划痕实验显示,与空白对照组相比,PLLA/HA膜能够一定程度上促进HaCaT细胞向划痕区域迁移,而PLLA/HA组织工程皮肤的促进作用最为显著,不仅显著优于空白对照组,也明显高于PLLA/HA膜对照组。这一结果提示,基于复合支架构建的PLLA/HA组织工程皮肤不仅保持了良好的生物活性,还能够部分模拟真皮-表皮组织的协同修复功能,促进表皮细胞迁移和划痕闭合,为创面早期愈合提供了有利条件。

综上所述,本研究提出了一种表皮-真皮双层组织工程皮肤构建方案,验证了基于静电纺丝技术的PLLA/HA支架在组织工程皮肤构建中的可行性,并初步证实其在促进细胞黏附、生长及体外迁移修复中的潜力。后续研究中可进一步拓展该组织工程皮肤在复杂创面模型中的应用,例如模拟慢性溃疡、糖尿病足等难愈创面,并探讨其在免疫调控、血管生成等方面的生物学效应,为发展更高效、更智能的个性化皮肤修复策略奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] ARMSTRONG D G, TAN T W, BOULTON A J M, et al. Diabetic foot ulcers: a review[J]. *JAMA*, 2023, 330(1): 62-75. DOI: 10.1001/jama.2023.10578.
- [2] YAKUPU A, ZHANG J, DONG W, et al. The epidemiological characteristic and trends of burns globally[J]. *BMC Public Health*, 2022, 22(1): 1596. DOI: 10.1186/s12889-022-13887-2.
- [3] CHOCARRO-WRONA C, LÓPEZ-RUIZ E, PERÁN M, et al. Therapeutic strategies for skin regeneration based on biomedical substitutes[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2019, 33(3): 484-496. DOI: 10.1111/jdv.15391.
- [4] SUN B K, SIPRASHVILI Z, KHAVARI P A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds[J]. *Science*, 2014, 346(6212): 941-945. DOI: 10.1126/science.1253836.
- [5] DEARMAN B L, BOYCE S T, GREENWOOD J E. Advances in skin tissue bioengineering and the challenges of clinical translation[J]. *Front Surg*, 2021, 8: 640879. DOI: 10.3389/fsurg.2021.640879.
- [6] HAXHO F, LYTVYN Y, SHELLEY A J, et al. Wound care-part II: tissue-engineered skin substitutes & other advanced wound therapies[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2025: S0190-S9622(25)02375-8. DOI: 10.1016/j.jaad.2025.06.045.
- [7] NOROUZI M, BOROJENI S M, OMIDVARKORDSHOULI N, et al. Advances in skin regeneration: application of electrospun scaffolds[J]. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4(8): 1114-1133. DOI: 10.1002/adhm.201500001.
- [8] RAJABI A H, JAFFE M, ARINZEH T L. Piezoelectric materials for tissue regeneration: a review[J]. *Acta Biomater*, 2015, 24: 12-23. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.07.010.
- [9] WU Y, ZOU J, TANG K, et al. From electricity to vitality: the emerging use of piezoelectric materials in tissue regeneration[J]. *Burns Trauma*, 2024, 12: tkae013. DOI: 10.1093/burnst/tkae013.
- [10] CAPUANA E, LOPRESTI F, CERAULO M, et al. Poly-L-lactic acid (PLLA)-based biomaterials for regenerative medicine: a review on processing and applications[J]. *Polymers*, 2022, 14(6): 1153. DOI: 10.3390/polym14061153.
- [11] MARINHO A, NUNES C, REIS S. Hyaluronic acid: a key ingredient in the therapy of inflammation[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1518. DOI: 10.3390/biom11101518.
- [12] CHOUHAN D, DEY N, BHARDWAJ N, et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: current status and advances[J]. *Biomaterials*, 2019, 216: 119267. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119267.
- [13] DING Y W, WANG Z Y, REN Z W, et al. Advances in modified hyaluronic acid-based hydrogels for skin wound healing[J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(13): 3393-3409. DOI: 10.1039/d2bm00397j.