

负载重组人表皮生长因子的人工真皮 对大鼠创面修复中细胞凋亡的影响

李 腾¹, 刘梦想¹, 王东方², 陈 磊^{1*}

¹石河子大学第一附属医院骨科中心, 新疆 石河子

²石河子大学病理系, 新疆 石河子

收稿日期: 2025年4月16日; 录用日期: 2025年5月9日; 发布日期: 2025年5月20日

摘 要

目的: 探讨负载重组人表皮生长因子的人工真皮在大鼠创面修复中对创面组织细胞凋亡的影响。方法: 采用浸渍法制备负载Rh-EGF的人工真皮。随机将12只SPF级雄性SD大鼠分为两组, 每组6只, 适应性喂养1周后, 于SD大鼠背部建立创面模型。联合组施加浸渍Rh-EGF的人工真皮, 人工真皮组则应用生理盐水浸渍的人工真皮。通过TUNEL/DAPI双荧光染色法对大鼠创面组织进行细胞凋亡评估, 分别对凋亡细胞数量和总细胞数量进行定量分析, 最终计算得出细胞凋亡率。结果: 与人工真皮组相比, 试验组的细胞凋亡率显著减少($P < 0.01$)。结论: 负载重组人表皮生长因子的人工真皮可减轻SD大鼠创面修复过程中的细胞凋亡。

关键词

创面修复, 人工真皮, 重组人表皮生长因子, 细胞凋亡

Effect of Artificial Dermis Loaded with Recombinant Human Epidermal Growth Factor on Apoptosis in Rat Wound Repair

Teng Li¹, Mengxiang Liu¹, Dongfang Wang², Lei Chen^{1*}

¹Orthopaedic Center, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi Xinjiang

²Department of Pathology, Shihezi University, Shihezi Xinjiang

Received: Apr. 16th, 2025; accepted: May 9th, 2025; published: May 20th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the effect of artificial dermis loaded with recombinant human epidermal

*通讯作者。

文章引用: 李腾, 刘梦想, 王东方, 陈磊. 负载重组人表皮生长因子的人工真皮对大鼠创面修复中细胞凋亡的影响[J]. 临床医学进展, 2025, 15(5): 1081-1087. DOI: 10.12677/acm.2025.1551469

growth factor on apoptosis of traumatic tissue cells in rat wound repair. Methods: Artificial dermis loaded with Rh-EGF was prepared by impregnation method. Twelve SPF-grade male SD rats were randomly divided into two groups of 6 rats each, and the trauma model was established on the back of SD rats after 1 week of adaptive feeding. Artificial dermis impregnated with Rh-EGF was applied to the experimental group, while saline-impregnated artificial dermis was applied to the control group. Apoptosis was assessed by TUNEL/DAPI dual fluorescence staining of rat traumatic tissues, and the number of apoptotic cells and the total number of cells were quantified, respectively, and the apoptosis rate was finally calculated. Results: Compared with the control group, the apoptosis rate of the test group was significantly reduced ($P < 0.01$). Conclusion: Artificial dermis loaded with recombinant human epidermal growth factor can reduce apoptosis during wound repair in SD rats.

Keywords

Wound Healing, Artificial Dermal, Recombinant Human Epidermal Growth Factor, Apoptosis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

皮肤创面修复是一个复杂的生物学进程, 涵盖炎症反应期、细胞增殖期及组织重塑期三个动态阶段[1]。细胞凋亡作为一种程序性死亡方式, 通过清除受损细胞和调控修复细胞数量, 在保护组织的正常代谢与更新以及维持组织稳态中发挥关键作用[2]。慢性创面或呈现异常修复状态的创伤, 常常伴随着细胞凋亡过程的失调现象, 导致参与修复的细胞大量丢失[3]。随着修复细胞数量的减少, 创面愈合所需的各种生理活动无法正常开展, 进而使得创面愈合进程显著延迟, 不仅延长了患者的痛苦周期, 还增加了感染等并发症的发生风险[4]。传统敷料其主要功能在于为创面提供一个相对隔离的物理屏障, 避免外界细菌、灰尘等污染物的侵入, 在一定程度上保护了创面[5]。但遗憾的是, 它们仅仅停留在物理防护层面, 缺乏对细胞生物学行为的有效干预能力, 难以对细胞凋亡过程进行调控, 无法阻止慢性创面或异常修复状态下细胞凋亡的失调[6]。近年来, 组织工程中的人工真皮因其三维支架结构和功能化修饰潜力, 成为创伤修复领域的研究热点[7]。

重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, Rh-EGF)已被证实可以促进表皮细胞迁移与增殖, 然而该因子对细胞凋亡的调控机制尚未形成学术共识[8]。研究表明, EGF 家族可能通过 PI3K/Akt 通路抑制凋亡相关蛋白(如 Caspase-3)的表达, 但这一效应在人工真皮复合体系中的协同作用尚未阐明[9]。本研究通过构建负载 Rh-EGF 的人工真皮, 结合大鼠背部全层皮肤缺损模型, 利用 TUNEL/DAPI 双染色法定量分析创面细胞凋亡率, 旨在揭示 Rh-EGF 功能化人工真皮对创面组织凋亡的影响, 为优化创伤修复材料提供理论依据。

2. 实验仪器与材料

2.1. 实验动物

实验选取 72 只 6~7 周龄、体重 188~220 g 的雄性 SD 大鼠作为研究对象, 实验动物采购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[生产许可证号: SCXK(京) 2024-0001], 并饲养于石河子大学实验动物中心 SPF 级屏障环境[使用许可证号: SYXK(新) 2023-0003]。所有实验操作严格遵循《实验动物护理和使用指南》(第

8版)规范,且经石河子大学第一附属医院医学伦理委员会审查批准(伦理批号:A2023-153-01)。

2.2. 实验药品与医用材料

重组人表皮生长因子外用溶液(I)购自深圳华生元公司,双层人工真皮修复材料购自深圳兰度生物材料有限公司。

2.3. 主要试剂及仪器

一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(G1504)、抗荧光淬灭封片液(G1401)、蛋白酶 K (G1205)、DAPI 染色试剂(G1012)、PBS 磷酸盐缓冲液(pH 7.2~7.4)、破膜液(G1204)均购于赛维尔公司。

3. 实验方法

3.1. 浸渍法制备负载 Rh-EGF 的人工真皮

将人工真皮裁剪为直径为 2 cm 的人工真皮皮片后置入盛有 Rh-EGF 溶液的玻璃培养皿中,37℃下浸泡 30 min,使 Rh-EGF 充分浸入人工真皮中备用。另裁剪一部分直径为 2 cm 的人工真皮皮片 37℃下浸泡于生理盐水中 30 min 备用。

3.2. 动物分组与造模

将 SD 大鼠分为 2 组:人工真皮组与联合组。使用全层皮肤活检器及眼科剪在 SD 大鼠背部肩胛骨下方 2 cm 处制造一个直径为 2 cm 的创面,深达深筋膜。人工真皮组的 SD 大鼠造模后使用 3-0 缝线将浸泡过生理盐水的人工真皮完全覆盖缝合于大鼠背部创面,联合组使用 3-0 缝线将浸泡过 Rh-EGF 溶液的人工真皮覆盖大鼠背部创面并进行缝合,两组 SD 大鼠施加人工真皮后均使用纱布及弹力绷带包扎,每隔 3~4 天常规清洁换药。

3.3. 取材与包埋

在 3, 7, 14 三个时间点打开 SD 大鼠创面包扎,使用手术眼科剪沿创面边缘裁剪出创面组织,立即浸泡于 4%多聚甲醛中,常温固定 24 h~48 h 后常规脱水浸入蜡液中包埋。包埋好的蜡块修剪后留存。

3.4. SD 大鼠创面组织细胞凋亡检测

将蜡块固定于切片机进行切片后,将切片转移至恒温干燥箱中干燥 30 分钟,随后依次使用二甲苯和梯度酒精进行脱蜡处理。脱蜡完成的切片经蒸馏水水化后,将 100 μ L 蛋白酶 K 原液与 1 mL PBS 溶液混合,配制成 1 mL 蛋白酶 K 工作液。切片经轻振去除残留液体后,使用免疫组化笔沿组织外围构筑疏水屏障,滴加蛋白酶 K 工作液完全覆盖组织样本,置于 37℃恒温培养箱温育 20 分钟。后续步骤中将载玻片浸入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液,于水平摇床完成 3 次 $\times$ 5 min 的梯度漂洗。

取 1 μ L Triton X-100 原液与 1 mL PBS 溶液混合,配制 0.1% Triton 破膜液。切片经甩干处理后滴加破膜工作液覆盖组织,室温孵育 20 分钟后重复上述 PBS 漂洗流程。平衡缓冲液(Equilibration Buffer)覆盖组织室温处理 10 分钟后,根据样本量取 TUNEL 试剂盒中的 TdT 酶、dUTP 和缓冲液,按 1:5:50 的体积比混合制备反应液。将混合液覆盖组织后置于湿润培养盒中,37℃恒温孵育 1 小时。

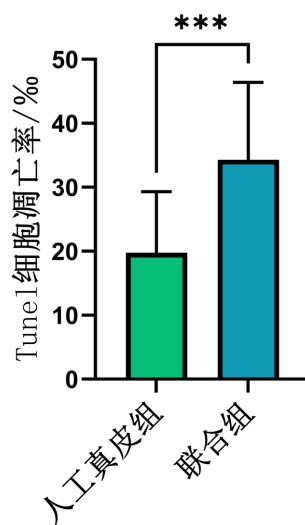
经 PBS 完成 3 $\times$ 5 min 梯度漂洗后,滴加 DAPI 染色液于避光条件下室温温育 10 分钟。经 PBS 终末漂洗及离心脱水处理后,采用抗淬灭封片剂完成封片。荧光显微镜参数设定:DAPI 激发波长 330~380 nm (紫外光),发射波长 420 nm (蓝色荧光);488 荧光素激发波长 465~495 nm (发射波长 515~555 nm,绿色荧光)。

3.5. 统计学方法

所有统计分析均使用 SPSS 20.0 软件完成。符合正态分布的计量资料以均值 $\pm$ 标准差表示, 偏态分布数据采用中位数进行描述。两组正态分布数据的比较采用独立样本 t 检验, 多组间差异分析则应用单因素 ANOVA。对于非正态分布或方差不齐的数据, 则采用非参数秩和检验。统计显著性设定为 $P < 0.05$ 。数据可视化通过 GraphPad Prism 9.5 实现。

4. 结果

凋亡细胞在荧光显微镜下呈现出鲜明的绿色, 如图 1 所示, 人工真皮组显微图像显示 TUNEL 阳性信号密度显著高于联合组, 具体表现为人工真皮组观测视野内密集分布的绿色荧光标记, 而联合组仅可见稀疏的阳性信号, 图 1 中的染色图片直观体现了两组间细胞凋亡水平的差异性。我们借助统计学分析方法, 计算得出人工真皮组 SD 大鼠创面组织细胞的凋亡率为 $19.76\% \pm 9.57\%$, 联合组 SD 大鼠创面组织细胞的凋亡率 $34.30\% \pm 12.08\%$ 。如图 2 所示, 进一步的数据分析结果中可以确切得出, 联合组的细胞凋亡率相较于人工真皮组有显著减少的趋势($P < 0.01$)。我们以直观的图表形式, 清晰地呈现出两组细胞凋亡率的对比, 有力地证实了这一结论。



注: $**P < 0.01$ 。

Figure 1. TUNEL/DAPI staining of traumatic tissues of SD rats in each group under 400 $\times$ fluorescence microscope

图 1. 400 倍镜荧光显微镜下各组 SD 大鼠创面组织 TUNEL/DAPI 染色情况

5. 讨论

在本次研究中, 我们构建了大鼠全层皮肤缺损模型, 采用手术方式在大鼠背部创建大小一致、深度精准的全层皮肤缺损创口, 以模拟现实中严重皮肤创伤情境。并且我们通过浸渍法, 以物理吸附的方式在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下将人工真皮与 Rh-EGF 结合。通过在创面上应用负载 Rh-EGF 的人工真皮, 同时设置人工真皮组对比, 探讨该联合方案对创面修复过程中细胞凋亡的影响。结果表明, 负载 Rh-EGF 的人工真皮可显著降低大鼠创面修复过程中的细胞凋亡率。这一发现与既往研究提示的 EGF 家族抗凋亡特性一致, 但其作用机制可能因人工真皮体系的介入而更具复杂性。

人工真皮为双层结构, 上层由高分子材料制成, 能阻菌、透气、防水, 防止外界细菌侵入, 维同时持皮肤呼吸与水分平衡; 下层以胶原蛋白等生物活性材料构建三维多孔构造, 利于血管长入输送营养,

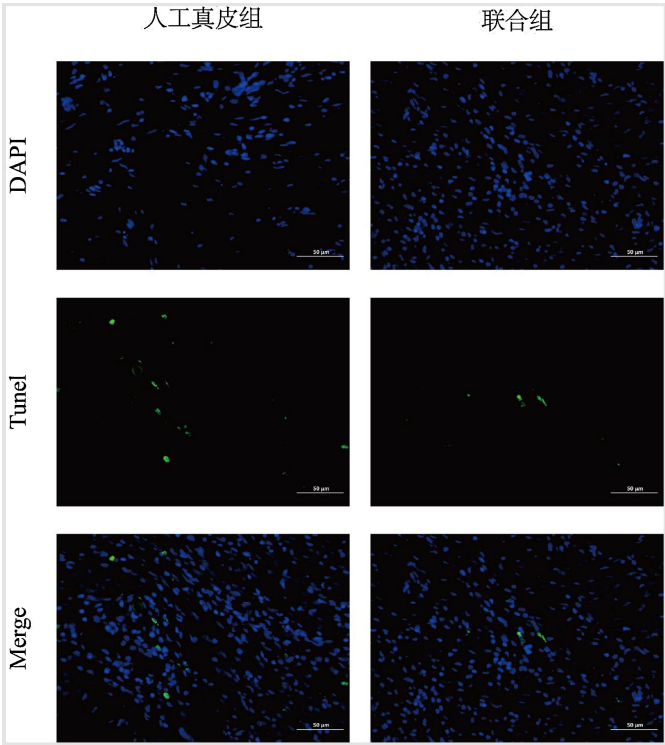


Figure 2. Comparison of apoptosis rate of traumatized tissue cells in SD rats in each group
图 2. 各组 SD 大鼠创面组织细胞凋亡率比较

方便真皮细胞附着增殖,可引导血管和真皮细胞快速长入,为细胞迁移(如成纤维细胞、内皮细胞)提供支撑,引导组织有序再生[10]。胶原支架的三维结构可以通过整合素激活 FAK 介导的信号通路改善细胞黏附,减少凋亡的发生[11]。此外,胶原降解产生的羟脯氨酸可能激活 Nrf2 通路,减轻创面局部的氧化应激水平,进一步阻断活性氧(ROS)诱导的 DNA 损伤与凋亡信号激活[12]。

表皮生长因子在细胞稳态调控中具有关键生物学功能,其对细胞凋亡有抑制效应[9]。该因子通过特异性识别细胞膜表面受体,触发精准的胞内信号级联反应[13]。其分子机制表现为双重调控模式:正向调控 Bcl-2 蛋白家族等抗凋亡因子的表达,构建内源性保护机制[14];同时抑制促凋亡因子活化,有效阻断线粒体细胞色素 C 的释放[15]。这种多靶点干预策略在维持细胞功能完整性方面发挥重要作用。

与直接局部应用 Rh-EGF 相比,人工真皮负载策略显示出独特优势。单纯生长因子易被创面蛋白酶降解导致活性丧失[16],人工真皮中的胶原支架不仅为 Rh-EGF 的缓释提供载体,其三维结构还能增强细胞黏附,进一步抑制细胞凋亡[17]。这种材料与生长因子的协同效应,可能通过改善创面局部缺氧及氧化应激状态,减少自由基诱导的 DNA 损伤,从而降低 TUNEL 阳性细胞比例。

当前支架体系仍存在降解动力学与药物释放匹配性的优化需求:材料降解速率过快易引发 Rh-EGF 突释现象,而降解过缓则导致生物利用度受限。该技术瓶颈提示需整合材料改良技术以达成控释精准化。

在临床应用转化方面,本研究存在以下值得注意的局限性:首先,TUNEL 法虽能敏感检测 DNA 断裂,但无法区分凋亡与坏死细胞,需结合 Annexin V/PI 双染或 Western blotting 法检测凋亡执行蛋白以提高特异性;其次,机制研究局限于表型观察,未来可通过通路抑制剂、或受体拮抗剂等进行功能验证。最后,凋亡抑制的“双刃剑”效应仍需审慎评估:短期适度抑制可保留角质形成细胞与成纤维细胞等修复关键细胞,加速再上皮化与基质重塑[18];但长期过度抑制可能导致成纤维细胞异常增殖及胶原沉积紊乱,增加瘢痕形成风险[19]。本研究限于仅采用造模后第 14 天的组织进行凋亡检测,未能评估远期组织

凋亡情况，未来需结合更长时间的修复周期。我们课题组将在未来进一步验证以上相关问题。

本研究初步证实 Rh-EGF 人工真皮具备凋亡调控作用，为浸渍了 Rh-EGF 的人工真皮的应用提供理论依据。我们的研究基于人工真皮与生长因子的协同效应实现对创面组织细胞凋亡的调控。在难愈性创面治疗场景中，早期凋亡干预可能有效阻断继发性组织损伤进程，但该作用仍需通过多中心临床试验进行转化验证。

基金项目

兵团财政科技计划(2022ZD034)；天山英才医药卫生高层次人才培养计划。

参考文献

- [1] Eming, S.A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. (2014) Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation. *Science Translational Medicine*, **6**, 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- [2] Anderton, H. and Alqudah, S. (2022) Cell Death in Skin Function, Inflammation, and Disease. *Biochemical Journal*, **479**, 1621-1651. <https://doi.org/10.1042/bcj20210606>
- [3] Wu, X., Gu, R., Tang, M., Mu, X., He, W. and Nie, X. (2025) Elucidating the Dual Roles of Apoptosis and Necroptosis in Diabetic Wound Healing: Implications for Therapeutic Intervention. *Burns & Trauma*, **13**, tkae061. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkae061>
- [4] Landén, N.X., Li, D. and Stähle, M. (2016) Transition from Inflammation to Proliferation: A Critical Step during Wound Healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **73**, 3861-3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>
- [5] Dhivya, S., Padma, V.V. and Santhini, E. (2015) Wound Dressings—A Review. *BioMedicine*, **5**, Article 22. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>
- [6] Naseri, E. and Ahmadi, A. (2022) A Review on Wound Dressings: Antimicrobial Agents, Biomaterials, Fabrication Techniques, and Stimuli-Responsive Drug Release. *European Polymer Journal*, **173**, Article ID: 111293. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111293>
- [7] Balavigneswaran, C.K., Selvaraj, S., Vasudha, T.K., Iniyan, S. and Muthuvijayan, V. (2023) Tissue Engineered Skin Substitutes: A Comprehensive Review of Basic Design, Fabrication Using 3D Printing, Recent Advances and Challenges. *Biomaterials Advances*, **153**, Article ID: 213570. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213570>
- [8] Yang, Q., Zhang, Y., Yin, H. and Lu, Y. (2020) Topical Recombinant Human Epidermal Growth Factor for Diabetic Foot Ulcers: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Annals of Vascular Surgery*, **62**, 442-451. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2019.05.041>
- [9] Sun, J., Zhao, H., Shen, C., Li, S., Zhang, W., Ma, J., et al. (2022) Tideglusib Promotes Wound Healing in Aged Skin by Activating PI3K/Akt Pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, **13**, Article No. 269. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02949-2>
- [10] Hur, G., Seo, D. and Lee, J. (2014) Contracture of Skin Graft in Human Burns: Effect of Artificial Dermis. *Burns*, **40**, 1497-1503. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.08.007>
- [11] Deng, S., Li, L., Xu, S., Wang, X. and Han, T. (2021) Promotion of Gastric Tumor Initiating Cells in a 3D Collagen Gel Culture Model via YBX1/SPP1/NF- κ B Signaling. *Cancer Cell International*, **21**, Article No. 599. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02307-x>
- [12] Wu, Z., Hou, Y., Dai, Z., Hu, C.A. and Wu, G. (2019) Metabolism, Nutrition, and Redox Signaling of Hydroxyproline. *Antioxidants & Redox Signaling*, **30**, 674-682. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7338>
- [13] Shen, C., Sun, L., Zhu, N. and Qi, F. (2017) Kindlin-1 Contributes to EGF-Induced Re-Epithelialization in Skin Wound Healing. *International Journal of Molecular Medicine*, **39**, 949-959. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2911>
- [14] Hashemi, S., Sanati, P. and Rafati, A. (2025) The Inducing Effect of Epidermal Growth Factor on Acellular Dermal Matrix in a Rat Model of Skin Regeneration. *Journal of Wound Care*, **34**, 137-145. <https://doi.org/10.12968/jowc.2021.0286>
- [15] Boerner, J.L., Demory, M.L., Silva, C. and Parsons, S.J. (2004) Phosphorylation of Y845 on the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Binding to the Mitochondrial Protein Cytochrome c Oxidase Subunit II. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 7059-7071. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7059-7071.2004>
- [16] 郭丽丽, 袁晓燕, 姚康德. 血管组织工程相关生长因子的控制释放研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(4): 911-914.

-
- [17] Wang, L., Gong, J., Dan, Y., Huang, Y., Dan, N. and Dan, W. (2020) Preparation and Characterization of Antibacterial Porcine Acellular Dermal Matrices with High Performance. *ACS Omega*, **5**, 20238-20249.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01940>
- [18] Chen, G.F., Kim, H., Urao, N., *et al.* (2011) Abstract 13464: Antioxidant-1 Plays an Important Role in Wound Repair by Inhibiting Apoptotic Response and Promoting Migration and Proliferation of Endothelial Cells through Akt Phosphorylation in Wound Healing Models. *Circulation*, **124**, A13464-A.
- [19] Sarrazy, V., Billet, F., Micallef, L., Coulomb, B. and Desmoulière, A. (2011) Mechanisms of Pathological Scarring: Role of Myofibroblasts and Current Developments. *Wound Repair and Regeneration*, **19**, s10-s15.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2011.00708.x>