

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.22.003

碱性成纤维细胞生长因子对激光烧伤大兔皮肤愈合的影响分析*

董高宏¹ 孟安锋^{2△} 王小霞¹ 刘涛¹ 吕雅洁¹

(1 空军军医大学唐都医院皮肤科 陕西 西安 710038; 2 宝鸡市人民医院整形美容科 陕西 宝鸡 721000)

摘要 目的:探讨碱性成纤维细胞生长因子对激光烧伤大兔皮肤愈合的影响分析。**方法:**通过热辐射仪激光灼烧对大兔耳朵进行烧伤处理,根据实验需求,将其随机分为三组:对照组,bFGF组,bFGF+DAPT组。通过ImageJ软件测量伤口面积和疤痕组织的厚度,并定期计算残余伤口面积率和疤痕指数。通过组织学分析大兔伤口愈合的新血管生成量。通过蛋白印迹分析Notch1、Jagged1和Hes1的蛋白表达。通过免疫荧光分析愈合后的皮肤中 α -SMA,Col I和Col III的相对蛋白水平。**结果:**bFGF组较对照组的疤痕指数降低($P<0.05$),bFGF+DAPT组较bFGF组疤痕指数升高($P<0.05$)。bFGF组较对照组的愈合面积增加($P<0.05$),bFGF+DAPT组较bFGF组愈合面积降低($P<0.05$)。与对照组相比,bFGF组的愈合时间明显缩短,较低的残余伤口面积和较低的疤痕指数($P<0.05$),而bFGF+DAPT组表现出明显的愈合延迟和较高的疤痕指数($P<0.05$)。bFGF组较对照组的新血管生成量增加($P<0.05$),bFGF+DAPT组较bFGF组心血管生成量减少($P<0.05$)。bFGF组较对照组的肉芽组织平均厚度增加,表皮间隙的闭合百分比升高($P<0.05$),bFGF+DAPT组较bFGF组肉芽组织平均厚度增加、表皮间隙的闭合百分比减少($P<0.05$)。H&E染色进行组织学分析发现,与对照组和bFGF+DAPT组相比,bFGF组出现明显的再上皮化和新血管形成,愈合效率较高($P<0.05$)。bFGF组较对照组Notch1、Jagged1和Hes1的蛋白表达升高($P<0.05$),bFGF+DAPT组较bFGF组Notch1、Jagged1和Hes1的蛋白表达降低($P<0.05$)。bFGF组较对照组 α -SMA,Col I和Col III的蛋白表达降低($P<0.05$),bFGF+DAPT组较bFGF组表达升高($P<0.05$)。**结论:**bFGF可以通过促进ESC的增殖并通过激活Notch1/Jagged1途径抑制其向肌成纤维细胞(Myofibroblasts,MFB)的分化加快伤口愈合,减少疤痕形成。

关键词:碱性成纤维细胞生长因子;肌成纤维细胞;Notch1/Jagged1;激光烧伤;伤口愈合

中图分类号:R-33;R644 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)22-4211-06

Analysis of the Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on the Skin Healing of Laser Burned Rabbits*

DONG Gao-hong¹, MENG An-feng^{2△}, WANG Xiao-xia¹, LIU Tao¹, LÜ Ya-jie¹

(1 Department of Dermatology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Plastic Surgery, Baoji People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 721000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of basic fibroblast growth factor on the skin healing of laser burned rabbits. **Methods:** The rabbit ears were burned by laser burning with a thermal radiometer. According to the needs of the experiment, they were randomly divided into three groups: control group, bFGF group, bFGF + DAPT group. The wound area and scar tissue thickness are measured by ImageJ software, and the residual wound area rate and scar index are calculated regularly. Histological analysis of the amount of new angiogenesis in the wound healing of rabbits. The protein expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 was analyzed by Western blot. The relative protein levels of α -SMA, Col I and Col III in the healed skin were analyzed by immunofluorescence. **Results:** The scar index of the bFGF group was lower than that of the control group ($P<0.05$), and the scar index of the bFGF + DAPT group was higher than that of the bFGF group ($P<0.05$). Compared with the control group, the healing area of the bFGF group was increased ($P<0.05$), and the healing area of the bFGF + DAPT group was lower than that of the bFGF group ($P<0.05$). Compared with the control group, the healing time of the bFGF group was significantly shorter, with a lower residual wound area and a lower scar index ($P<0.05$), while the bFGF + DAPT group showed obvious delayed healing and a higher scar index ($P<0.05$). The amount of neovascularization in the bFGF group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and the amount of cardiovascular production in the bFGF + DAPT group was lower than that in the bFGF group ($P<0.05$). Compared with the control group, the average thickness of granulation tissue in the bFGF group increased, and the closure percentage of epidermal space increased ($P<0.05$). Compared with the bFGF group, the average thickness of granulation tissue in the bFGF + DAPT group increased, and the closure percentage of epidermal space decreased ($P<0.05$). H&E staining for histological analysis showed that compared with the control group and bFGF + DAPT group, the bFGF group had obvious re-epithelialization and

* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2017JM8136)

作者简介:董高宏(1973-),男,本科,主治医师,研究方向:皮肤性病学,电话:13572427833, E-mail: DGHtdpfk73822@163.com

△ 通讯作者:孟安锋(1976-),男,本科,副主任医师,研究方向:整形与美容,电话:13571161109, E-mail: menganfeng0508@163.com

(收稿日期:2021-03-07 接受日期:2021-03-31)

new blood vessel formation, and the healing efficiency was higher ($P<0.05$). The protein expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in the bFGF group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and the protein expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in the bFGF + DAPT group was lower than that in the bFGF group ($P<0.05$). The protein expression of α -SMA, Col I and Col III in the bFGF group was lower than that in the control group ($P<0.05$), and the expression in the bFGF + DAPT group was higher than that in the bFGF group ($P<0.05$). **Conclusion:** bFGF can promote the proliferation of ESC and inhibit its differentiation into myofibroblasts (MFB) by activating the Notch1/Jagged1 pathway to accelerate wound healing and reduce scar formation.

Key words: Basic Fibroblast Growth Factor; Myofibroblasts; Notch1 / Jagged1; Laser Burns; Wound Healing

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R644 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)22-4211-06

前言

烧伤是常见的临床疾病,会给患者带来极大的身心伤害,理想的伤口愈合应保护伤口免受细菌感染并提供潮湿的愈合环境,同时具有生物相容性并可以促进修复细胞的增殖,迁移,组织重塑和其他过程^[1]。伤口愈合通常涉及多阶段过程和多种细胞类型。伤口愈合的研究表明,某些生长因子的功能异常在非愈合伤口中起作用^[2]。这些发现指导了先进的生物工程技术考虑使用外源制备的生长因子和细胞因子。疤痕是伤口愈合的最常见并发症之一,不仅使患者陷入毁容,功能受损以及身心痛苦,而且使他们成为家庭和社会的沉重负担。已被广泛证实,疤痕的主要原因是缺乏 ESC 和 MFB 的过度增生 ESC 位于表皮基底层和毛囊口中,具有很强的增殖和分化潜能^[3]。在生理条件下,ESC 保持皮肤的正常结构和功能,并通过增殖,迁移和分化来修复损伤^[4]。从理论上讲,所有皮肤病变都可以通过 ESC 修复,但是,在严重的皮肤附属物损坏(例如毛囊和汗腺损伤)的情况下,缺乏毛发和汗腺的疤痕组织很普遍^[5]。疤痕中的 ESC 数量低于正常皮肤,而 MFB 则更高,这种现象暗示 ESC 的增殖减少和异常分化可能是疤痕形成的重要原因^[6]。ESC 的增殖和分化主要取决于干细胞生态位的调控,包括生长因子,细胞外基质和信号传导途径等^[7]。其中,由 Jagged1 介导的 Notch 途径起着重要的作用^[8]。我们之前的研究发现,激活 Notch1 / Jagged1 途径可以促进 ESC 增殖并抑制细胞向 MFB 分化^[9]。多年的临床观察表明 bFGF 可以促进伤口愈合并减少疤痕形成,但如何调节 ESC 的增殖和分化以及可能的分子机制仍不清楚。在我们先前的研究中,我们发现 bFGF 可以促进 ESC 增殖并抑制细胞向 MFB 分化。这些效果与 Notch1 / Jagged1 途径一致。因此,我们进行了这项研究,以确定 bFGF 是否可以通过激活 Notch1 / Jagged1 途径来调节 ESC 的增殖和分化,并最终促进伤口愈合和减少疤痕形成。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(胎儿,年龄:1-3 天,体重:8-10 g,等级:SPF)和新西兰兔(雌性,年龄:8-10 周,体重:2-2.5 kg,等级:清洁)从中山大学实验动物中心获得,并按照医学部伦理委员会的规定保持在标准条件下。

1.1.2 实验动物 ESC 的分离和培养 从新生 SD 大鼠皮肤的背面分离出 ESC。简而言之,从胎儿 SD 大鼠的背部采集皮肤样品,并将其切成片(约 $0.3 \times 0.3 \text{ cm}^2$)。在 4°C 的 PBS 中的

0.5%Dispase II(17105041; Gibco)中孵育过夜后,将表皮薄片与真皮小心分离,并在 0.25%的胰蛋白酶(25200-056; Gibco)中于 37°C 消化 20 分钟。收集快速粘附的细胞,并在 37°C 的 5% CO_2 中于 K-SFM 培养基中培养。当培养物达到 70-80%汇合时,细胞被消化并以 1:2 的比例传代。将 SD 大鼠的 ESC 重新分为 bFGF (10 ng/mL, PHG0264; Gibco), bFGF+DAPT (20 $\mu\text{mol/L}$, ab120633; Abcam, UK), DAPT 分别是 bFGF 受体和 Notch 信号转导的特异性抑制剂。

1.1.3 大兔烧伤模型及处理 为了研究 ESC 在疤痕中的功能,采用了兔耳疤痕模型。灼伤是由 Gubler-Kochetygov 热辐射仪造成的。在烧伤创面诱导后第 5 天开始对其进行治疗。对照(未经治疗的)动物被允许自愈。受伤前,每 12 小时四次向 10 只新西兰兔(8-10 周大)腹膜内注射 50 mg/kg 5- 溴脱氧尿苷,以鉴定 ESC。施加到耳朵的剃毛皮肤上的燃烧板的温度为 800°C ,接触时间为 3 s,伤口的大小为 24 cm^2 。在全开式麻醉下(2-4 mL 的 0.1%溶液静脉注射)进行伤口处理。直至伤口闭合。

1.1.4 实验分组 根据实验要求,将兔子随机分为三组:对照组(激光灼伤伤口只进行消毒处理,允许被自愈),bFGF 组(每天分别向伤口施用 bFGF(10 ng/mL), bFGF + DAPT 组(每天向兔子伤口施用 bFGF, 10 ng/mL+ DAPT, 20 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2 实验方法

1.2.1 伤口愈合及疤痕指数分析 期间记录伤口的愈合时间,对伤口进行拍照,使用国立卫生研究院 ImageJ 软件测量伤口面积和疤痕组织的厚度,并定期计算残余伤口面积率和疤痕指数。剩余伤口面积率的计算公式为:残余伤口面积率 = [(第 n 天面积)/(第 0 天面积)] $\times 100\%$ ($n=0, 10, 15, 30$)。疤痕指数的计算公式为:疤痕指数 = [(疤痕厚度 - 相邻正常皮肤的厚度)/(相邻正常皮肤的厚度)] $\times 100\%$ 。收集第 0、10、15、和 30 天的伤口组织并将其分成中心两半:一半用于组织学分析和免疫荧光分析,另一半在液氮中快速冷冻用于蛋白质分析。

1.2.2 组织学分析 收集所有样品和伤口组织,并在 4%的多聚甲醛中固定过夜。酒精脱水并包埋参数后,使用 Leica RM2235 旋转切片机将样品切成 5 毫米的切片。通过连续两次浸入二甲苯中使切片脱脂,用浓度递减的乙醇进行水合。在 Leica DMI 6000 B 自动荧光显微镜或 Leica M205 FA 立体显微镜下观察了用 Masson 三色(MTC)和 picrosirius 红(PSR)染色的切片。在 Leica DMI 6000 B 自动荧光显微镜下通过交叉偏振镜观察到双折射胶原蛋白的图像。使用图像 J(1.6.0-24, 美国国立卫生研究院)进行图像分析和数据收集

1.2.3 蛋白质提取和蛋白质印迹分析 用 ProteoPrep® 总蛋白

提取试剂盒 (PROTOT-1KT; Sigma) 提取大鼠 ESC 或兔组织的总蛋白,并用 BCA 分析试剂盒 (23225; Pierce) 测定蛋白浓度。在 4℃, 14,000× g 下离心 15 分钟后,将上清液转移至新的试管中。将不同组中等量的总蛋白上样以进行蛋白质印迹分析。在 200 mA 下将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, 美国) 上 1 h。一抗 (1:500) 在 4℃ 孵育过夜,二抗 (1:5000) 在室温下孵育 2 h。在 ECL 底物 (美国皮尔斯) 中孵育后,通过将 PVDF 膜暴露于放射自显影胶片 (日本,柯达) 来拍摄图像。抗 Notch1 抗体 (NB100-105H), 抗 Jagged1 抗体 (NB600-450) 和抗 Hes1 抗体 (NB600-594) 购自 NOVUS Biologicals (USA), 靶蛋白的定量 western 印迹测量值通过每次印迹中源自相同样品的 GAPDH 的相应测量值进行归一化。一式三份进行独立实验。

1.2.4 免疫荧光分析 用 PBS 洗涤后,将每组的切片在 10% 山羊血清 (16210064; Gibco) 中于 37℃ 封闭 30 分钟。为了进行双重标记,添加了两个兼容的小鼠抗一抗的主要抗体:抗 BrdU (1:250, ab8152; Abcam) 和抗 α -SMA (1:200, ab7817; Abcam), 抗胶原 I (1:1000, ab90395; Abcam), 抗胶原蛋白 III (1:500, ab6310; Abcam), 抗锯齿 1 (1:500, ab89663; Abcam), 兔抗

Notch1 (1:500, ab128076; Abcam) 和抗 -Hes1 (1:100, ab119776; Abcam)。在 4℃ 孵育过夜后,将切片用 3% BSA / PBS 洗涤,并与以下二抗孵育 1 小时:用 Alex Fluor 488 (1:200, ab150113; Abcam) 标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊用 Alex Fluor 594 (1:200, ab150116; Abcam) 标记的抗小鼠 IgG。用荧光显微镜 (日本 OLYMPUS) 记录切片。

1.3 统计分析

用 PRISM5.0 软件 (GraphPad, CA, USA) 分析数据。除非另有说明,否则值表示为平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD)。对照组和实验组之间的表达差异比较是通过 Student t 检验进行的。使用单向方差分析 (ANOVA) 比较多个组之间的差异,进行 Bonferroni 事后检验进行成对比较。所有统计分析均使用 SPSS 19.0 软件 (SPSS, 芝加哥, 伊利诺伊州, 美国) 进行, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 bFGF 降低大兔疤痕指数

bFGF 组较对照组的疤痕指数降低 ($P < 0.05$), bFGF + DAPT 组较 bFGF 组疤痕指数升高 ($P < 0.05$)。 (表 1)。

表 1 大兔疤痕指数比较

Table 1 Comparison of Large Rabbit Scar Index

Groups	15 d	30 d
Control group	2.64 $\pm$ 0.35	2.43 $\pm$ 0.33
bFGF group	1.35 $\pm$ 0.18	1.21 $\pm$ 0.15
bFGF + DAPT group	2.26 $\pm$ 0.29	2.15 $\pm$ 0.25
F	12.337	11.025
P	0.032	0.014

2.2 伤口闭合的定量分析

伤口闭合定量分析表示为伤口愈合面积相对于初始伤口面积的百分比,比较第 10 d、15 d、30 d 的伤口愈合情况, bFGF 组较对照组的愈合面积增加 ($P < 0.05$), bFGF + DAPT 组较

bFGF 组愈合面积降低 ($P < 0.05$), 如图 1 所示。

与对照组相比, bFGF 组的愈合时间缩短, 较低的残余伤口面积和较低的疤痕指数 ($P < 0.05$), 而 bFGF + DAPT 组表现出明显的愈合延迟和较高的疤痕指数 ($P < 0.05$), (表 2)。

表 2 伤口闭合的定量分析

Table 2 Quantitative Analysis of Wound Closing (%)

Groups	10 d	15 d	30 d
Control group	18.37 $\pm$ 3.49	26.24 $\pm$ 4.28	46.05 $\pm$ 5.72
bFGF group	35.06 $\pm$ 5.19	67.15 $\pm$ 6.39	92.34 $\pm$ 11.35
bFGF + DAPT group	22.42 $\pm$ 4.11	41.62 $\pm$ 5.83	71.25 $\pm$ 7.35
F	13.045	11.283	9.126
P	0.013	0.027	0.004

2.3 bFGF 刺激伤口组织中的血管生成

bFGF 组较对照组的新血管生成量增加 ($P < 0.05$), bFGF + DAPT 组较 bFGF 组新血管生成量减少 ($P < 0.05$)。 (表 3)。

2.4 bFGF 促进肉芽组织的形成和上皮再形成

术后第 15 天评估大兔耳朵伤口中心的肉芽组织厚度和伤口表皮间隙的闭合百分比, bFGF 组较对照组的肉芽组织平均

厚度增加, 表皮间隙的闭合百分比升高 ($P < 0.05$), bFGF + DAPT 组较 bFGF 组肉芽组织平均厚度增加、表皮间隙的闭合百分比减少 ($P < 0.05$)。H&E 染色进行组织学分析发现, 与对照组和 bFGF+DAPT 组相比, bFGF 组出现明显的再上皮化和新血管形成, 愈合效率较高 ($P < 0.05$)。箭头代表血管, 圆圈代表炎性细胞, 星形代表表皮, 菱形代表胶原纤维, 矩形代表成纤维细

胞,椭圆形代表水肿。(图 2,表 4)。
 2.5 bFGF 增强 ESCs Notch1 / Jagged1 信号转导的表达
 bFGF 组较对照组 Notch1、Jagged1 和 Hes1 的蛋白表达升

高 ($P<0.05$),bFGF + DAPT 组较 bFGF 组 Notch1、Jagged1 和 Hes1 的蛋白表达降低($P<0.05$)。(表 5)。

表 3 各组不同时间点伤口组织中的血管生成比较
 Table 3 Comparison of angiogenesis in wound tissue at different points in time

Groups	10 d	15 d	30 d
Control group	11.43± 2.65	26.42± 4.13	49.35± 5.83
bFGF group	28.47± 4.15	52.84± 6.39	127.38± 14.25
bFGF + DAPT group	18.62± 2.85	37.63± 4.94	72.01± 7.66
F	12.152	11.745	9.318
P	0.031	0.015	0.003

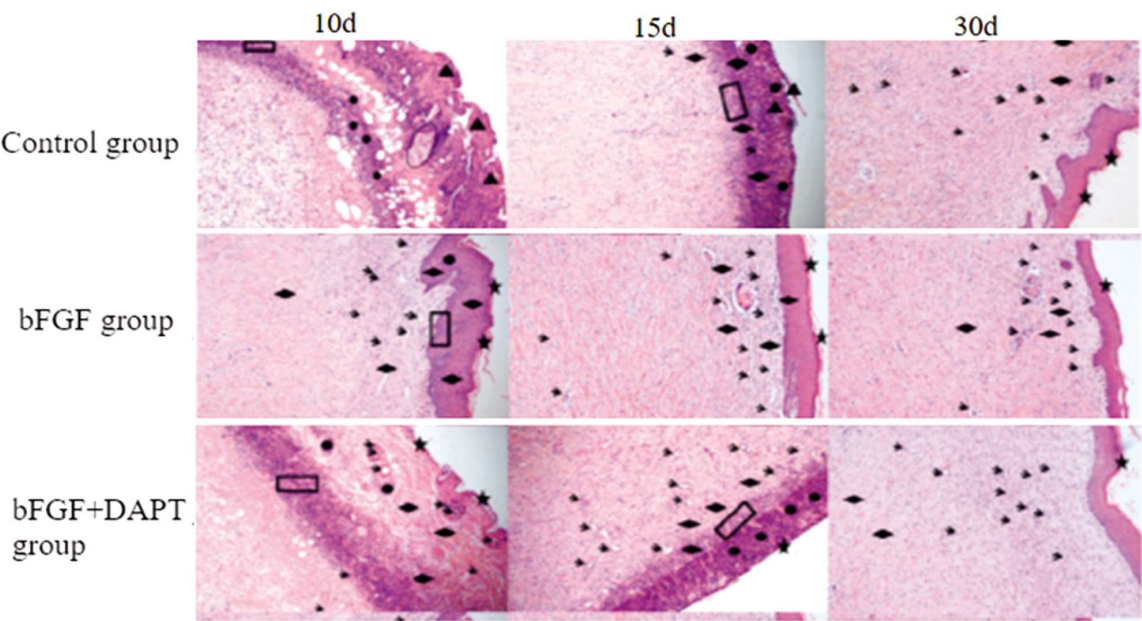


图 2 H&E 染色
 Fig.2 H&E staining

表 4 肉芽组织厚度和上皮再形成能力检测
 Table 4 Detection of granulation tissue thickness and epithelial recapacity

Groups	Thesh tissue ththickness(mm)	Closing of the epidermal clearance(%)
Control group	236.58± 24.47	46.23± 5.72
bFGF group	473.19± 36.01	96.25± 7.31
bFGF + DAPT group	352.66± 28.19	68.54± 6.22
F	11.374	13.208
P	0.015	0.027

2.6 bFGF 抑制 ESC 向 MFB 的分化

bFGF 组较对照组 α -SMA, Col I 和 Col III 的蛋白表达降低 ($P<0.05$),bFGF + DAPT 组较 bFGF 组表达升高 ($P<0.05$)。(表 6)。

3 讨论

伤口愈合通常从止血开始,经历由生物力学反应驱动的三个重叠阶段,即炎症,增殖和成熟^[10]。bFGF 与其他生长因子一

起在伤口愈合中起着关键作用,bFGF 基因敲除小鼠的全厚度皮肤伤口愈合明显慢于野生型小鼠^[11]。此外,许多研究表明,bFGF 的外用促进伤口愈合。例如,一项研究发现,在使用组织支架和次生分裂厚度皮肤移植植物进行组织工程的下肢重建手术后,通过局部 bFGF 注射大大改善了皮肤硬度^[12]。相似地,与阳性对照相比,用与纤维蛋白结合肽融合的 bFGF 处理大鼠全层急性切口后,观察到肉芽增加和上皮形成加速^[13]。此外,发现 bFGF 治疗糖尿病大鼠切开伤口可将上皮形成,肉芽形成和伤

表 5 蛋白印迹分析 Notch1 / Jagged1 信号通路的表达

Table 5 Expression of Notch1 / Jagged1 Signal pathway

Group	Notch1	Jagged1	Hes1
Control group	1.16± 0.04	1.03± 0.02	1.14± 0.03
bFGF group	2.05± 0.24	2.13± 0.25	1.95± 0.22
bFGF + DAPT group	1.34± 0.06	1.17± 0.04	1.23± 0.05
F	11.427	13.015	9.681
P	0.011	0.037	0.006

表 6 免疫荧光分析

Table 6 Immunofluorescence Analysis

Groups	α -SMA	Col I	Col III
Control group	1.93± 0.18	2.01± 0.21	2.15± 0.22
bFGF group	1.24± 0.07	1.12± 0.06	1.05± 0.05
bFGF + DAPT group	1.86± 0.16	1.75± 0.15	1.83± 0.19
F	13.053	11.729	10.541
P	0.002	0.015	0.023

口断裂强度提高到非糖尿病小鼠中观察到的水平。

研究表明 bFGF 可以加速伤口愈合和平滑上皮形成,这导致人们认为 bFGF 的局部应用还可以防止创伤和烧伤中病理性瘢痕的形成^[14]。一些证据表明,bFGF 治疗还可以减少先前存在的病理性瘢痕,将人肥厚性疤痕植入裸鼠并用控释 bFGF 制剂治疗疤痕可减少疤痕的大小^[15]。羟脯氨酸含量也降低,并且观察到胶原纤维降解。因此,bFGF 在肥厚性疤痕中诱导胶原降解^[16]。在本研究中,我们证明了 bFGF 还可以通过激活 Notch1 / Jagged1 途径抑制 ESC 向 MFB 的分化,我们首先通过添加相关的抑制剂 DAPT 并敲低 Jagged1 来阻断 Notch1 / Jagged1 途径,以在体外确认我们的猜想,并使用兔耳疤痕模型进行验证,表明 bFGF 通过抑制通过 Notch1 / Jagged1 途径的 ESC 向 MFB 的分化来减少疤痕。

尽管疤痕的机制尚不清楚,但迄今为止,MFB 的增生已被证实是最重要的因素。研究报道,bFGF 是体内减少 MFB 区域的有效刺激剂,大概是因为其对 α -SMA 表达的下调以及 MFB 快速诱导凋亡的作用^[17]。细胞治疗方面的最新研究还发现,bFGF 可以抑制心脏干细胞向 MFB 的分化,从而改善心肌梗塞后细胞外基质的失调^[18]。尽管这些发现表明 bFGF 可以减少 MFB 的形成,但它对 ESC 的作用仍是未知的,ESC 在伤口愈合和上皮再生中起着关键作用。在此,我们推测 bFGF 可能类似地抑制 ESC 向 MFB 的分化。在我们的体外研究中,我们检测到了 α -SMA 的表达,这是 MFB 的特异性标记,可以直接显示出 ESCs 向 MFB 的分化。同时,我们还检查了 MFB 代谢产物 Col I 和 Col III 的表达,以间接反映 ESCs 向 MFB 的分化,这与免疫荧光分析的结果一致表明,bFGF 组中 α -SMA,Col I 和 Col III 的表达低于其他组,这表明 bFGF 可以抑制 ESC 向 MFB 的分化。

已经证实,Notch1 / Jagged1 途径在干细胞中起重要作用,Hes1 阻遏物是 Notch 信号传导下游造血干细胞发育的重要调节剂^[19]。通过激活其下游基因 Hes1,Notch1/Jagged1 途径主要

促进干细胞增殖并抑制其分化^[20]。在我们以前的研究中,我们发现激活 Notch1/Jagged1 途径有助于促进 ESC 的增殖并抑制细胞的分化,这与上述 bFGF 对 ESC 的作用是一致的。因此,我们认为 bFGF 可能通过激活 Notch1/Jagged1 途径来调节 ESC。在我们目前的体外研究中,我们首先检测了每个组的 Jagged1, Notch1 和 Hes1 的表达,发现在 bFGF 组中这要比其他组高得多。作为一种 γ -分泌酶抑制剂,DAPT 可以通过阻断 NICD 的裂解来抑制 Notch 途径,这对于激活下游靶基因的转录是必不可少的,这表明 bFGF 可能主要通过激活 Jagged1 起作用。兔子的耳朵伤口模型一直是理想的模型,为了验证我们在体内的发现,我们在兔耳伤口模型上进行了动物研究,通过观察伤口愈合时间并测量伤口面积和疤痕组织的厚度,我们发现 bFGF 可以促进伤口愈合并减少疤痕,这些结果与 bFGF 在临床观察中的功能一致。众所周知,正常的皮肤组织是由表皮,真皮和皮肤附件组成的。在表皮和真皮组织的交界处,我们经常看到一个清晰的乳头状结构和基底细胞,ESCs 驻留在其中。在我们的体内研究中,我们在 30 天之内收集了不同组的组织以进行病理学检测,发现 bFGF 促进了上皮再形成,皮肤附着再生和胶原蛋白的重新分配,具有更清晰的细胞层,更多的表皮脊等。Notch1/Jagged1 通路参与调节毛囊进入真皮的研究并维持产后头发的稳态,而 DAPT 可以调节人毛囊干细胞的增殖和分化,我们发现 Notch1/Jagged1 途径在 bFGF 促进伤口愈合的过程中也起着重要作用。当我们通过 DAPT 抑制 Notch 信号通路时,bFGF 对伤口愈合的功能减弱,证实 Notch1 信号通过细胞质线粒体途径和核转录调控抑制人牙髓干细胞的凋亡。

综上所述,我们的研究显示,bFGF 可以通过促进 ESC 的增殖并通过激活 Notch1/Jagged1 途径抑制其向 MFB 的分化加快伤口愈合,减少疤痕形成。

参考文献(References)

- [1] Gao Y, Gao B, Zhu H, et al. Adipose-derived stem cells embedded in platelet-rich plasma scaffolds improve the texture of skin grafts in a

- rat full-thickness wound model[J]. Burns, 2020, 46: 377-385
- [2] Oryan A, Alemzadeh E, Mohammadi AA. Application of honey as a protective material in maintaining the viability of adipose stem cells in burn wound healing: A histological, molecular and biochemical study[J]. Tissue Cell, 2019, 61: 89-97
- [3] Liu G, Lu P, Chen L, et al. B-cell leukemia/lymphoma 10 promotes angiogenesis in an experimental corneal neovascularization model[J]. Eye, 2018, 32: 1220-1231
- [4] Yang L, Zhang D, Wu H, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Influences Epidermal Homeostasis of Living Skin Equivalents through Affecting Fibroblast Phenotypes and Functions [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2018, 31: 229-237
- [5] Chen P, Zhang H, Zhang Q, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Reduces Permeability and Apoptosis of Human Brain Microvascular Endothelial Cells in Response to Oxygen and Glucose Deprivation Followed by Reoxygenation via the Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1)/ERK Pathway[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7191-7201
- [6] Kilic Bektas C, Kimiz I, Sendemir A, et al. A bilayer scaffold prepared from collagen and carboxymethyl cellulose for skin tissue engineering applications[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2018, 29: 1764-1784
- [7] Francisco J, Zhang Y, Jeong JI, et al. Blockade of Fibroblast YAP Attenuates Cardiac Fibrosis and Dysfunction Through MRTF-A Inhibition[J]. JACC Basic Transl Sci, 2020, 5: 931-945
- [8] Peng J, Liu R, Peng L, et al. Calcium gluconate alleviates the toxic effect of hydrofluoric acid on human dermal fibroblasts through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 16: 2921-2928
- [9] Kawanaka Y, Kawakami H, Shimizu S, et al. A Case of Pulmonary Tumor Thrombotic Microangiopathy Suggested by the Presence of Tumor Cells in Peripheral Blood [J]. Case Rep Oncol, 2020, 13: 843-848
- [10] Ouyang QQ, Hu Z, Lin ZP, et al. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112: 1191-1198
- [11] Cai J, Zhou Q, Wang Z, et al. Comparative Analysis of KGF-2 and bFGF in Prevention of Excessive Wound Healing and Scar Formation in a Corneal Alkali Burn Model[J]. Cornea, 2019, 38: 1430-1437
- [12] Oryan A, Alemzadeh E. Comparison of botulinum toxin type A and aprotinin monotherapy with combination therapy in healing of burn wounds in an animal model[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47: 2693-2702
- [13] Sharifi E, Chehelgerdi M, Fatahian-Kelishadrokhi A, et al. Comparison of therapeutic effects of encapsulated Mesenchymal stem cells in Aloe vera gel and Chitosan-based gel in healing of grade-II burn injuries[J]. Regen Ther, 2021, 18: 30-37
- [14] Zhao Y, Wang Q, Jin Y, et al. Discovery and Characterization of a High-Affinity Small Peptide Ligand, H1, Targeting FGFR2IIIc for Skin Wound Healing[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49: 1033-1048
- [15] Alemzadeh E, Oryan A. Effectiveness of a Crocus sativus Extract on Burn Wounds in Rats[J]. Planta Med, 2018, 84: 1191-1200
- [16] Yuan B, Broadbent JA, Huan J, et al. The Effects of Adipose Stem Cell-Conditioned Media on Fibrogenesis of Dermal Fibroblasts Stimulated by Transforming Growth Factor- β 1 [J]. J Burn Care Res, 2018, 39: 129-140
- [17] Lu GM, Rong YX, Liang ZJ, et al. FGF2-induced PI3K/Akt signaling evokes greater proliferation and adipogenic differentiation of human adipose stem cells from breast than from abdomen or thigh[J]. Aging, 2020, 12: 14830-14848
- [18] Mahmood R, Mehmood A, Choudhery MS, et al. Human neonatal stem cell-derived skin substitute improves healing of severe burn wounds in a rat model[J]. Cell Biol Int, 2019, 43: 147-157
- [19] Alemzadeh E, Oryan A, Mohammadi AA. Hyaluronic acid hydrogel loaded by adipose stem cells enhances wound healing by modulating IL-1 β , TGF- β 1, and bFGF in burn wound model in rat [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2020, 108: 555-567
- [20] Matsumine H, Fujimaki H, Takagi M, et al. Full-thickness skin reconstruction with basic fibroblast growth factor-impregnated collagen-gelatin sponge[J]. Regen Ther, 2019, 11: 81-87

(上接第 4206 页)

- [31] Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing [J]. Biotechnol Bioeng, 2013, 110(7): 1811-1821
- [32] Gautron AS, Juillerat A, Guyot V, et al. Fine and Predictable Tuning of TALEN Gene Editing Targeting for Improved T Cell Adoptive Immunotherapy[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 9: 312-321
- [33] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9 [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9604
- [34] Saifaldeen M, Al-Ansari DE, Ramotar D, et al. CRISPR FokI Dead Cas9 System: Principles and Applications in Genome Engineering[J]. Cells, 2020, 9(11): 2518
- [35] Li L, Ng SR, Colón CI, et al. Identification of DHODH as a therapeutic target in small cell lung cancer[J]. Sci Transl Med, 2019, 11(517): eaaw7852
- [36] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 343-345