

分类号：
学号：20222114084

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



人工真皮联合 Rh-EGF 对 SD 大鼠创面修复的影响

学位申请人 李腾

指导教师 陈磊教授

申请学位类别 专业硕士

专业名称 骨科学

研究领域 创伤骨科

所在学院 医学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

分类号：
学号：20222114084

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



人工真皮联合 Rh-EGF 对 SD 大鼠创面修复的影响

学位申请人 李腾

指导教师 陈磊教授

申请学位类别 专业硕士

专业名称 骨科学

研究领域 创伤骨科

所在学院 医学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

**Effects of Artificial Dermis Combined with Rh EGF on Wound
Repair in SD Rats**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Clinical Medicine

By

Li Teng

(Trauma and Orthopedic Surgery)

Dissertation Supervisor: Prof. Chen Lei

May,2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：李鹏

时间：2025年5月20日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：李鹏

时间：2025年5月20日

导师签名：李鹏

时间：2025年5月20日

摘要

目的: 本文旨在探讨人工真皮联合 Rh-EGF 对大鼠创面修复的影响。

方法: (1) 将人工真皮浸渍 Rh-EGF 溶液后, 使用 ELISA 法通过 Rh-EGF 酶联检测试剂盒测量人工真皮对 Rh-EGF 的吸收量及释放量。(2) 采用 CCK-8 实验检测浸渍 Rh-EGF 溶液的人工真皮与浸渍生理盐水的人工真皮对 L-929 细胞增殖的影响。(3) 将浸渍 Rh-EGF 溶液的人工真皮与浸渍生理盐水的人工真皮分别接种 L-929 细胞, 一部分荧光染色后共聚焦显微镜下拍照, 一部分喷金后电镜下拍照, 共同检测细胞粘附性。(4) 将 72 只 SD 大鼠分为四组, 在其背部建立直径为 2cm 大小的创面, 四组分别施加不同干预措施: 空白组使用常规清洁换药、Rh-EGF 组使用清洁换药后施加 Rh-EGF 溶液、人工真皮组清洁换药后在大鼠创面上缝合生理盐水浸泡过的人工真皮、联合组清洁换药后在大鼠创面上缝合 Rh-EGF 溶液浸泡过的人工真皮, 四组均常规定期换药。在 7, 14, 21 天三个时间点进行伤口拍照及伤口创面组织取材。(5) 取材后的创面后经过固定、包埋及切片后进行 HE 染色、Masson 染色及 IHC 染色。

结果: (1) 通过 Rh-EGF 酶联试剂盒测定, 我们发现人工真皮对 Rh-EGF 具有吸收及释放能力。(2) 通过 CCK-8 实验, 我们发现, 相较于浸渍生理盐水的人工真皮, 浸渍 Rh-EGF 溶液的人工真皮对 L-929 细胞的增殖具有积极作用。(3) 通过共聚焦显微镜及电镜观察种植在人工真皮上的 L-929 细胞, 荧光染色定量分析及细胞计数分析表明浸渍 Rh-EGF 溶液的人工真皮可以粘附更多的 L-929 细胞 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。(4) 通过 7, 14, 21 天的拍摄照片, 测量并计算创面剩余面积, 在三个时间点中联合组的伤口剩余面积均小于其他治疗组 (P 均 < 0.05)。(5) 将 7, 14, 21 天的取材组织切片用于 HE 染色, 光镜下拍照后测量上皮化厚度, 在三个时间点中联合组的上皮化厚度均大于其余治疗组 (P 均 < 0.05)。(6) 将 7, 14, 21 天的取材组织切片用于 Masson 染色, 光镜下拍照后测量胶原沉积面积, 在三个时间点中联合组的胶原沉积面积均大于其余治疗组 (P 均 < 0.05)。(7) 将 7, 14, 21 天的取材组织切片用于 Ki-67、TGF- β_1 、 α -SMA、VEGF 及 CD-31 抗体免疫组化染色, 光镜下拍照后测量 Ki-67 及 α -SMA 阳性区域面积百分比、TGF- β_1 及 VEGF 平均光密度及 CD31 所标记的微血管密度, 在三个时间点中联合组的 Ki-67 阳性区域面积、VEGF 平均光密度以及微血管密度均大于其余治疗组 (P 均 < 0.05)。而在 TGF- β_1 及 α -SMA 抗体免疫组化染色中, 我们发现, 仅在 7, 14 天这两个时间点 TGF- β_1 平均光密度以及 α -SMA 阳性区域面积百分比大于其余治疗组, 而在 21 天时呈现了相反趋势 (P 均 < 0.05)。

结论: 本研究证明了人工真皮联合 Rh-EGF 在 SD 大鼠创面修复中的积极作用, 通过体内与体外验证揭示了人工真皮联合 Rh-EGF 在细胞增殖、创面血管再生、创面组织细胞生长及抑制瘢痕再生等多方面的积极作用; 为后续人工真皮联合 Rh-EGF 在临床中的应用提供了初步依据, 具有重要的临床意义。

关键词：人工真皮；Rh-EGF；血管化；纤维化；创面修复

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of artificial dermis compounded with Rh-EGF on wound repair in rats.

Methods: (1) After the artificial dermis was impregnated with Rh-EGF solution, the uptake and release of Rh-EGF from the artificial dermis was measured by Rh-EGF enzyme-linked assay kit using ELISA. (2) CCK-8 assay was used to detect the effect of artificial dermis impregnated with Rh-EGF solution versus saline impregnated artificial dermis on the proliferation of L-929 cells. (3) The artificial dermis impregnated with Rh-EGF solution and the artificial dermis impregnated with saline were inoculated with L-929 cells, and one part of them was photographed under a confocal microscope after fluorescent staining, and one part of them was photographed under an electron microscope after spraying with gold, to jointly detect the cell adhesion. (4) Seventy-two SD rats were divided into four groups, and wounds with a diameter of 2 cm were established on their backs, and different interventions were applied to each of the four groups: iodine-vapor disinfection in the blank group, Rh-EGF solution was applied after iodine-vapor disinfection in the Rh-EGF group, saline-soaked artificial dermis was stitched over the wounds of the rats after iodine-vapor disinfection in the artificial dermis group, and Rh-EGF solution was stitched over the wounds of the rats after iodine-vapor disinfection in the combined group. EGF solution-soaked artificial dermis was sutured on the rat trauma after iodine-vapor disinfection in the dermis group and Rh-EGF solution-soaked artificial dermis in the combined group. Wound photographs and wound tissue sampling were performed at three time points: 7, 14 and 21 days. (5) After fixation, embedding, and sectioning, the sampled wounds were subjected to HE staining, Masson staining, and IHC staining.

Results: (1) By Rh-EGF enzyme-linked kit assay, we found that artificial dermis has the ability to absorb and release Rh-EGF. (2) By CCK-8 assay, we found that the artificial dermis scaffold impregnated with Rh-EGF solution had a positive effect on the proliferation of L-929 cells compared with the artificial dermis scaffold impregnated with saline. (3) The L-929 cells planted on the artificial dermal scaffolds were observed by confocal microscopy and electron microscopy, and the quantitative analysis of fluorescence staining and cell counting analysis showed that the artificial dermal scaffolds impregnated with Rh-EGF solution adhered to more L-929 cells ($P < 0.01$, $P < 0.05$). (4) The remaining area of the wound was measured and calculated by taking photographs at 7, 14, and 21 days, and the remaining area of the wound in the combined group was smaller than that in the other treatment groups at all three time points (all $P < 0.05$). (5) Tissue sections taken at 7,14,21 days were used for HE staining, photographed under light

microscope and epithelialization thickness was measured, and the epithelialization thickness of the combined group was greater than the rest of the treatment groups at all three time points ($P < 0.05$). (6) Tissue sections taken at 7,14,21 days were used for Masson staining, and collagen deposition area was measured after photographing under light microscope, and the collagen deposition area of the combined group was larger than the rest of the treatment groups at all three time points ($P < 0.05$). (7) Tissue sections taken on days 7,14 and 21 were used for immunohistochemical staining with antibodies against Ki-67, TGF- β_1 , α -SAM, VEGF and CD-31, and the percentage of Ki-67 and α -SAM positive area, the average optical density of TGF- β_1 and VEGF, and the density of the microvessels labeled with CD31 were measured after photographs were taken under the light microscope, and the percentage of Ki-67 positive area, TGF- β_1 and VEGF mean optical density and CD31-labeled microvessel density. The percentage of Ki-67 positive area, VEGF mean optical density, and microvessel density were greater than those of the remaining treatment groups (all $P < 0.05$). As for immunohistochemical staining with TGF- β_1 and α -SAM antibodies, we found that the mean optical density of TGF- β_1 and the percentage of α -SAM-positive area were greater than that of the rest of the treatment groups only at the time points of 7 and 14 days, whereas the opposite trend was observed at 21 days.

Conclusions: This study demonstrated the positive effects of artificial dermis combined with Rh-EGF in wound repair in SD rats, and the in vivo and in vitro validation revealed the positive effects of artificial dermis combined with Rh-EGF in cell proliferation, wound blood vessel regeneration, wound tissue cell growth, and inhibition of scar regeneration; this study provides a preliminary basis for the subsequent application of artificial dermis combined with Rh-EGF in the clinic, which is of important clinical significance.

Key words: Artificial dermis; Rh-EGF; Angiogenesis; Fibrosis; Wound repair

目录

摘要.....	I
Abstract	III
中英文缩略表.....	VII
第1章 引言.....	1
第2章 材料与方法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.1.1 细胞株.....	3
2.1.2 实验小鼠.....	3
2.1.3 主要仪器与试剂耗材.....	3
2.2 实验方法.....	6
2.2.1 ELISA 分析人工真皮对 Rh-EGF 的吸收释放.....	6
2.2.2 L-929 成纤维细胞的培养与传代.....	8
2.2.3 细胞增殖实验.....	9
2.2.4 细胞粘附实验.....	10
2.2.5 动物造模与取材.....	11
2.2.6 组织包埋与切片.....	12
2.2.7 HE 染色.....	13
2.2.8 Masson 染色.....	13
2.2.9 IHC 染色.....	14
2.2.10 统计学分析.....	15
第3章 结果.....	16
3.1 人工真皮对 Rh-EGF 的吸收与释放.....	16
3.2 人工真皮联合 Rh-EGF 对 L-929 成纤维细胞增殖的影响.....	16
3.3 人工真皮联合 Rh-EGF 对 L-929 成纤维细胞粘附的影响.....	17
3.3.1 共聚焦显微镜观察粘附在人工真皮上的 L-929 细胞, 对比细胞粘附性..	17
3.3.2 电镜观察粘附在人工真皮上的 L-929 细胞, 对比细胞粘附性.....	18
3.4 不同干预措施对创面愈合率的影响.....	19
3.5 不同干预措施对创面上皮化的影响.....	21
3.6 不同干预措施对创面组织胶原沉积的影响.....	23
3.7 不同干预措施对创面组织细胞增殖的影响.....	25

3.8 不同干预措施对创面组织纤维化的影响	27
3.8.1 不同干预措施对创面组织 TGF- β_1 生成的影响	27
3.8.2 不同干预措施对创面组织肌成纤维细胞生成的影响	28
3.9 不同干预措施对创面组织血管生成的影响	31
3.9.1 不同干预措施对血管内皮生长因子生成的影响	31
3.9.2 不同干预措施对创面组织肉芽组织生成的影响	33
第 4 章 讨论	36
第 5 章 结论	39
文献综述	40
参考文献	49
致 谢	61
作者简介	62

中英文缩略表

英文缩写	英文全名	中文译名
Rh-EGF	Recombinant human epidermal growth factor	重组人表皮生长因子
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附剂测定
SD	sprague dawley	斯普拉-道来
HE	hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色
FESEM	Field emission scanning electron microscopy	场发射扫描电子显微镜
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒
DAPI	6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
PBS	phosphate buffer salin	磷酸缓冲液
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
TGF- β_1	Transforming growth factor-beta 1	转化生长因子- β_1
α -SAM	Myofibroblast marker Alpha smooth muscle actin	α -平滑肌肌动蛋白
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
CD31	Blood vessel marker Platelet endothelial cell adhesion molecule-1	血小板内皮粘附分子
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化
SPSS	Statistical Product and Service Solutions	统计产品与服务解决方案

第1章 引言

随着现代社会的进步,由创伤和其他因素引起的难以愈合的创面已成为重要的全球健康问题^[1]。如果创面在一个月之内未能及时有序地达到解剖和功能的修复,损伤则会发展为慢性创面^[2],具有治疗难度大、治疗周期长、费用高等特点,给全世界的患者和医疗保健系统带来了巨大的负担,严重影响患者身心健康和生活质量,同时耗费了医疗卫生服务系统巨大的资源浪费^[3]。

对于大面积皮肤软组织缺损的创面,需通过系统清创联合无菌敷料覆盖实现创面保护,同时辅以周期性创面护理以控制局部感染,当炎症控制并确认肉芽组织生长良好后,实施皮片移植术或皮瓣转移术进行组织缺损修复^[4,5]。对于软组织条件较差,骨与肌腱外露的创面直接植皮存活率低,极易造成植皮失败,且供皮部位损伤后也可能导致难以自行愈合,形成难愈性创面^[6]。皮瓣移植手术由于难度大,对器材、人员及皮瓣供区的要求较高,同时由于手术操作复杂,耗时长,甚至最终会出现皮瓣坏死,从而加重病情^[7];此外,如果皮瓣供区缺损较大,缝合张力较高可能导致供皮区域缺血坏死或瘢痕愈合,影响肢体功能^[8]。理想的创面修复不仅涉及表皮与软组织结构重建,更要求实现生理功能的全面恢复,这一目标始终是基础研究与临床实践共同追求的核心方向^[9]。从传统换药清创,到促进创面修复药物的使用,到生物工程学新的治疗方式都为创面修复和重建提供了多样化的方法^[10]。然而,目前对于创伤性难愈创面的治疗方案各异,且疗效也参差不齐^[11]。

近几十年来,以人工真皮为代表的生物支架已经成为伤口愈合的可行选择,生物支架可以提供支持细胞附着、存活、增殖和分化的三维结构,这些支架促进了有利的愈合环境,已被迅速开发用于治疗广泛的皮肤缺损和恢复生理功能^[12,13]。人工真皮的结构为胶原蛋白海绵网状支架,包含牛跟腱I型胶原、硫酸软骨素及磷酸盐缓冲液,硫酸软骨素可改善支架的孔结构和力学性能,增强抗降解性能和热力学稳定性,促进细胞粘附和增殖,磷酸盐缓冲液可维持生物活性及稳定性能。临床及动物研究证实其不仅可以帮助修复各种皮肤全层缺损及皮下联合组织,促进创面肉芽组织生长,有效地保护创面不受外界感染侵犯,并可以防止体液流失,为创面愈合提供良好的基础^[14]。人工真皮移植技术具备操作便捷性和临床应用优势显著的特征,其术后成功率维持较高水平,在实现创面有效修复的同时可降低创面感染发生率^[15]。但是在临床应用过程中仍然存在一定的不足,人工真皮术后通常需要约2周的时间来完成血管化,在此期间可能并发创面感染及血肿形成等并发症,进而影响血管化质量^[16]。

近年来研究已证实外源性的细胞因子如:重组人表皮细胞生长因子(Rh-EGF)、

重组牛碱性成纤维细胞生长因子、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等能够促进创面上皮细胞的增殖，缩短愈合时间^[17]；这其中重组人表皮生长因子（Rh-EGF）是一种广泛用于伤口治疗的细胞因子。Rh-EGF 加速伤口愈合，促进血管形成，并且增强成纤维细胞和内皮细胞的增殖^[18]。然而，作为具有短半衰期和有限局部活性的不稳定蛋白，Rh-EGF 通常需要重复及高剂量应用才能达到临床疗效^[19]。

当前组织工程材料药物负载领域发展迅速，其核心目标在于实现材料与药物的协同增效效应，为组织修复与再生开辟创新解决方案^[20]。但目前生物工程材料负载技术（如共价键合法等）通常涉及较高的时间和经济成本，这些限制因素制约了其在临床上的进步应用^[21]。相比之下，浸渍法具有操作简单的优点^[22]。

综上所述，人工真皮可覆盖创面，促进创面修复，缺点是血管化时间较长；Rh-EGF 能够促进毛细血管新生和创面再上皮化，其缺点是外用不能长时间在局部保持较高浓度。如果充分整合利用两者各自的优点，使用浸渍法将人工真皮与 Rh-EGF 相联合，能否提高 Rh-EGF 的生物利用度，并维持其在伤口部位的浓度，从而提高其治疗潜力，是否能够缩短创面肉芽组织的修复时间，创造一个更适合的创面微环境，为表皮移植提供良好的基础。鉴于此，本课题的研究旨在探讨人工真皮联合 Rh-EGF 治疗创面的可行性，通过体内体外实验探索该联合治疗方法促进创面修复的过程，为创面修复提供一种新的治疗方法，同时为该联合治疗的临床应用提供理论和实践依据。

第2章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞株

小鼠成纤维细胞株 L-929 购自上海赛百慷(上海, 中国), L-929 细胞培养基为 L-929 专用培养基, 主要成分为 89% MEM 基础培养基+10%马血清+1% P/S 青霉素-链霉素, L-929 细胞传代为 1:2。

2.1.2 实验小鼠

SD 雄性大鼠, 鼠龄为 6-7 周, 体重为 (180±10) g, 购买自北京斯贝福生物技术有限公司。

2.1.3 主要仪器与试剂耗材

表 2-1 实验所用主要仪器

仪器设备名称	生产公司
超净工作台	美国 (Thermo Fisher Scientific)
倒置显微镜	中国 (北京天诺翔)
正置显微镜	日本 (Sony)
冰箱 (4℃、-20℃)	中国 (海尔)
酶标仪	美国 (Bio Rad)、美国 (Thermo Fisher Scientific)
-80℃冰箱	美国 (Thermo Fisher Scientific)
细胞培养箱	美国 (Thermo Fisher Scientific)
水平离心机	中国 (湘仪)
水浴锅	中国 (北京光明)
电热鼓风恒温干燥箱	中国 (上海博讯)
快速混匀仪	中国 (山东博客)
4℃低温离心机	美国 (Thermo Fisher Scientific)
摇床	中国 (兰杰柯)

续表 2-1 实验所用主要仪器

仪器设备名称	生产公司
磁力搅拌机	中国（厦门国仪）
精密电子天平	中国（北京赛多斯）
共聚焦显微镜	日本（索尼）
临界点干燥仪	日本（日立）
场发射扫描电子显微镜	日本（日立）
超纯水仪	中国（四川优普）
细胞计数板	中国（上海求精）
高压灭菌锅	中国（普和希）
病理切片机	中国（达科为）
组织样本石蜡包埋机	中国（孝感海阔）
免疫组化湿盒	中国（Biosharp）
镊子、止血钳、剪刀、弯盘等	中国（上海金钟）
试剂瓶（500ml）	中国（蜀牛）
解剖板	中国（北京哲成）
250ml 酒精灯	中国（辰阳）
全系列移液枪	中国（大龙兴创）
皮肤活检器（10mm）	巴基斯坦（Vaslcare）
皮肤活检器（20mm）	巴基斯坦（Vaslcare）
离子溅射仪（镀金机）	日本（日立）
电推剪	中国（科德士）
免疫组化抗原修复盒	中国（Biosharp）

表 2-2 实验所用主要药品与医用材料

药品或医用材料名称	批准文号	生产厂家
重组人表皮生长因子外用溶液（I）	国药准字 S20010038	中国（深圳华生元）
双层人工真皮修复材料	国械注准 20173461356	中国（兰度）

表 2-3 实验所用主要试剂与耗材

试剂或耗材名称	生产公司
Rh-EGF ELISA 科研试剂盒	中国（晶美生物）
NCTC clone 929 细胞专用培养基	中国（iCell）
PBS 磷酸盐缓冲液	中国（Biosharp）
0.25%胰蛋白酶	美国（Hyclone）
CCK-8 试剂	美国（APExBIO）
无血清非程序冻存液	中国（Pricella）
MEM 基础培养基	中国（iCell）
细胞培养板（96 孔）	中国（Servicebio）
细胞培养板（48 孔）	中国（Servicebio）
冻存管（2ml）	中国（Servicebio）
离心管（15ml）	中国（Servicebio）
离心管（50ml）	中国（Servicebio）
通用型组织固定液（中性）	中国（Servicebio）
无水乙醇	中国（国药试剂）
YF [®] 488 标记鬼笔环肽（绿色）	中国（UElandy）
抗荧光衰减封片剂（含 DAPI）	中国（Solarbio）
75%酒精	中国（英科医疗）
碘伏医用消毒液	中国（安其生）
二甲苯	中国（国药试剂）
曲拉通 x-100	中国（源叶）
离心管（200ul）	中国（Biosharp）
离心管（1.5ml）	中国（Biosharp）
离心管（5ml）	中国（Biosharp）
玻璃皿（75mm）	中国（志勤玻璃）
医用脱脂棉球	中国（海氏海诺）
载玻片	中国（世泰）
盖玻片	中国（世泰）
中性树脂	中国（上海懿洋）
伊红染液(醇溶)染液	中国（Biosharp）
苏木素染色液	中国（中杉金桥）