

分类号：
学 号：20172313002

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

博 士 学 位 论 文



胶原蛋白分泌调控对驴皮伤口无瘢痕愈合的 作用机制研究

学 位 申 请 人	王艳萍
指 导 教 师	谷新利 教授
申请学位门类级别	农学博士
学 科、专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物生产与疾病防控
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

分类号：
学号：20172313002

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

博士学位论文



胶原蛋白分泌调控对驴皮伤口无瘢痕愈合的 作用机制研究

学位申请人	王艳萍
指导教师	谷新利 教授
申请学位门类级别	农学博士
学科、专业名称	畜牧学
研究方向	动物生产与疾病防控
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

**Study on the mechanism of collagen secretion regulation on scar free
healing of donkey skin wounds**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Agriculture

By

Wang Yanping

(Animal Production and Disease Control)

Dissertation Supervisor: Prof. Gu Xinli

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

本人所呈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：王艳萍

时间：2025 年 5 月 25 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：王艳萍

时间：2025 年 5 月 25 日

导师签名：谷8181

时间：2025 年 5 月 25 日

摘要

皮肤成纤维细胞分泌的胶原蛋白在伤口愈合过程中具有重要作用，而胶原蛋白分泌速度过快导致其异常排列可使伤口愈合处形成病理性瘢痕，如增生性瘢痕或萎缩性瘢痕。驴皮是生产阿胶的唯一原料，驴皮内的成纤维细胞活跃，能分泌大量的胶原蛋白，但研究发现，驴皮伤口愈合后其表皮无肉眼可见的瘢痕。故推测在驴皮伤口愈合时，胶原蛋白合成的速度被抑制，使其有足够的时间进行有序排列，最终呈现其表面无肉眼可见瘢痕形成的现象，本研究通过体外、体内试验对相关机制进行探究，为驴皮伤口无痕愈合相关机制研究提供科学资料。

方法：

(1) 采集新疆驴皮伤口愈合 0、7、17、105 天（对照组、炎症期、肉芽期、重塑期）的组织样本。通过转录组测序（Illumina HiSeq）和 iTRAQ 标记的蛋白质组学技术，筛选差异表达基因（DEGs）及蛋白，利用 KEGG 富集分析确定调控驴皮伤口愈合的关键基因及信号通路。

(2) 通过组织块贴壁法培养驴皮真皮成纤维细胞，经形态学观察、3 种染色方法（Masson、HE、免疫组化）、CCK-8 增殖检测及流式细胞术，对细胞的基本特征进行鉴定，建立驴皮真皮成纤维细胞的体外培养体系。

(3) 构建 *CHRD* 和 *NOG* 基因慢病毒过表达载体（OE-*CHRD*、OE-*NOG*）及 shRNA 干扰载体（sh-*CHRD*-1、sh-*NOG*-1），转染体外培养的驴皮成纤维细胞，利用 CCK-8、划痕实验、RT-qPCR 和 Western blot 等技术，系统分析二者对细胞增殖、迁移及伤口愈合相关基因表达的调控作用，阐明 *CHRD* 和 *NOG* 基因通过 TGF- β 信号通路调控驴皮成纤维细胞胶原代谢及伤口愈合的分子机制。

(4) 构建基因 *PTEN* 和 *RASSF8* 基因慢病毒过表达载体（OE-*PTEN*、OE-*RASSF8*）与 shRNA 干扰载体（sh-*PTEN*-3、sh-*RASSF8*-2），利用 CCK-8 法、平板克隆形成及划痕试验评估细胞增殖与迁移能力，并分别利用 RT-qPCR、Western blot 技术，检测 *PTEN* 和 *RASSF8* 基因通过 PI3K-AKT 信号通路对驴皮成纤维细胞分泌功能及伤口愈合的调控作用。

(5) 在驴背部建立圆形创口模型，局部注射过表达质粒（OE-*CHRD*、OE-*RASSF8*），结合动态愈合率观测、HE/Masson/免疫荧光染色及 RT-qPCR 技术，在动物模型上探究 *CHRD* 和 *RASSF8* 基因分别通过调控 TGF- β /Smad 以及 PI3K/AKT 信号通路对驴皮伤口愈合及瘢痕形成的影响。

结果：

(1) 驴皮伤口组织测序数据质量符合试验要求，样本表达的基因数总共为 28,504 个，其中已知的基因数量为 28,116 个，预测的新基因数量为 388 个；上调蛋白总共 1071 个，两组织间平均 178 个；下调蛋白 317 个，平均 53 个。转录组学结果揭示，愈合早期（7 天）差异基因（DEGs）数量最多，显著富集于炎症相关基因（*IL-6*、*TNF- α* ）及胶原合成基因（*COL1A1*、*MMP-1*）的 TGF- β /Smad 与 PI3K-AKT 信号通路上。蛋白质组学分析进一步验证了转录组趋势，多组学联合分析表明，TGF- β /Smad 通路中 *CHRD*、*NOG* 及 PI3K-AKT 通路中 *PTEN*、*RASSF8* 基因在各愈合阶段表达差异显著（ $P < 0.05$ ），预示这些基因及信号通路可能抑制胶原蛋白的合成速度，以调控驴皮伤口的无瘢痕愈合进程。

(2) 体外培养的驴皮成纤维细胞呈典型长梭形，生长曲线呈“S”形（对数期群体倍增时间约 24 小时），免疫组化证实 Vimentin 阳性（纯度 >95%），流式分析显示 S 期细胞占比 28.73%，表明细胞活性与增殖能力良好。

(3) 过表达 *CHRD* 显著抑制驴皮成纤维细胞的增殖与迁移（ $P < 0.05$ ），并下调 *TGF- β 1*、*COL1A1*、*COL3A1* 及炎症因子（*IL-6*、*TNF- α* ）的基因与蛋白的表达（ $P < 0.01$ ），同时上调抗纤维化因子 *Smad7*（ $P < 0.01$ ）。干扰 *CHRD* 则呈现相反效应，表明其通过抑制 TGF- β /Smad3 通路活性减少胶原沉积。*NOG* 基因过表达对胶原合成影响较小，提示 *CHRD* 靶向调控 TGF- β 通路在瘢痕愈合过程中作用更为重要。

(4) 过表达 *PTEN* 和 *RASSF8* 显著抑制驴皮成纤维细胞增殖（ $P < 0.01$ ）及迁移能力。同时下调 PI3K-AKT 通路关键分子（*AKT1*）、促纤维化基因（*COL1A1*、*COL3A1*、*VEGF*、*MMP-1*）和纤维连接蛋白（FN）的表达（ $P < 0.01$ ），并上调基质金属蛋白酶抑制剂 *TIMP-1*（ $P < 0.01$ ）；对 *PTEN* 和 *RASSF8* 基因进行干扰后则与上述结果相反。其中，*RASSF8* 通过抑制成纤维细胞过度活化及胶原代谢失衡，为靶向优化驴皮伤口愈合过程、减少病理性瘢痕形成提供了关键分子依据。

(5) 动物试验结果显示，过表达 *CHRD* 在愈合早期（7-35 天）显著延缓创面闭合速率（ $P < 0.05$ ），但至 105 天时愈合率与对照组无显著差异（ $P > 0.05$ ），且表皮厚度（ $45.4 \pm 5.1 \mu\text{m}$ ）接近正常皮肤（ $41.5 \pm 4.3 \mu\text{m}$ ），胶原纤维排列有序，瘢痕形成显著减少。分子机制表明，过表达 *CHRD* 通过抑制 TGF- β 通路（下调 *TGF- β 1*、*Smad3* 及胶原蛋白 *COL1A1*、*COL3A1*，上调 *Smad7*），阻断成纤维细胞过度活化及胶原异常沉积。相比之下，过表达 *RASSF8* 虽抑制 PI3K-AKT 通路并降低胶原合成，但其调控效果较弱（胶原残留量更高、排列松散）。

结论：

(1) 通过整合转录组学、蛋白质组学及功能实验，初步揭示了驴皮无瘢痕愈合的分子机制。

关键基因*CHRD*、*NOG*（对应TGF- β 通路）和*PTEN*、*RASSF8*（对应PI3K-AKT通路）通过抑制胶原合成速度、优化其排列从而协同调控伤口愈合进程。

（2）体外成功培养了驴真皮成纤维细胞；过表达*CHRD*显著抑制成纤维细胞增殖与迁移，并下调胶原相关蛋白（*COL1A1*/*COL3A1*）表达，同时激活Smad7负反馈环路；*RASSF8*过表达则通过拮抗PI3K/AKT通路抑制成纤维细胞活性并调控细胞外基质稳态（上调TIMP-1、抑制MMP-1）。

（3）体内模型验证，过表达*CHRD*基因可通过“延缓修复-有序重塑”机制延缓早期胶原合成速率，但至105天时，伤口愈合率与对照组无差异，且其胶原排列、表皮厚度接近正常皮肤，其显著减少了瘢痕形成。

本研究系统探究了驴皮伤口通过“减速修复”平衡胶原合成速度与排列的机制，为驴皮胶原蛋白的合成机理及临床靶向抑制病理性瘢痕提供了理论依据。

关键词：驴；皮肤伤口；胶原蛋白；成纤维细胞；瘢痕

Abstract

Collagen secreted by dermal fibroblasts plays a crucial role during wound healing. However, excessive collagen secretion may disrupt its normal orderly arrangement, leading to pathological scars such as hypertrophic or atrophic scars. Donkey skin, the sole raw material for producing the traditional medicine Ejiao, contains highly active fibroblasts that secrete abundant collagen. However, studies have revealed no visible scars on healed donkey skin wounds. This study hypothesized that collagen synthesis rates are inhibited during donkey skin wound healing, allowing sufficient time for orderly collagen alignment, thereby minimizing scar formation. This study investigates the underlying mechanisms through *in vitro* and *in vivo* experiments, providing scientific data for understanding the scar-free healing mechanisms in donkey skin wounds.

Methods:

(1) Tissue samples from Xinjiang donkey skin wounds at healing stages 0, 7, 17, and 105 days (control, inflammatory phase, granulation phase, remodeling phase) were collected. Transcriptome sequencing (Illumina HiSeq) and iTRAQ-based proteomics were employed to screen differentially expressed genes (DEGs) and proteins. KEGG enrichment analysis identified key genes and signaling pathways regulating wound healing.

(2) Donkey dermal fibroblasts were cultured using the tissue explant adherence method. Morphological observation, triple staining (Masson, HE, immunohistochemistry), CCK-8 proliferation assay, and flow cytometry were used to characterize the cells and establish an *in vitro* culture system for donkey dermal fibroblasts.

(3) Lentiviral overexpression vectors (OE-CHRD, OE-NOG) and shRNA interference vectors (sh-CHRD-1, sh-NOG-1) were constructed and transfected into fibroblasts. CCK-8, scratch assay, RT-qPCR, and Western blot were applied to analyze effects on proliferation, migration, and expression of wound healing-related genes, elucidating CHRD/NOG-mediated TGF- β pathway regulation of collagen metabolism.

(4) Lentiviral overexpression (OE-PTEN, OE-RASSF8) and shRNA interference (sh-PTEN-3 sh-RASSF8-2) vectors were constructed and transfected into fibroblasts. Their regulatory effects on fibroblast function and wound healing via the PI3K/AKT pathway were evaluated through CCK-8, colony formation, scratch assays, RT-qPCR, and Western blot.

(5) Circular wound models on donkey backs were injected with OE-CHRD or OE-RASSF8 plasmids. Dynamic healing rates, HE/Masson/immunofluorescence staining, and RT-qPCR were used to assess the roles of CHRD and RASSF8 in scarless healing via TGF- β /Smad and PI3K/AKT pathways *in vivo*.

Results:

(1) Sequencing data showed high quality, with 28,504 genes (28,116 known, 388 novel) and 1,071

upregulated/317 downregulated proteins. Transcriptomics revealed peak DEGs at day 7, enriched in inflammatory (*IL-6*, *TNF- α*) and collagen synthesis-related genes (*COL1A1*, *MMP-1*) via TGF- β /Smad and PI3K/AKT pathways. Proteomics confirmed these trends, with *CHRD*, *NOG* (TGF- β /Smad) and *PTEN*, *RASSF8* (PI3K-AKT) showing stage-specific differential expression ($P < 0.05$), suggesting their roles in suppressing collagen synthesis to enable scarless healing.

(2) Cultured fibroblasts exhibited spindle-shaped morphology, an "S"-shaped growth curve (doubling time ~24 h), >95% vimentin positivity, and 28.73% S-phase cells, confirming high purity and viability.

(3) OE-CHRD significantly inhibited fibroblast proliferation/migration ($P < 0.05$), downregulated TGF- β 1, COL1A1, COL3A1, IL-6, and TNF- α ($P < 0.01$), and upregulated Smad7 ($P < 0.01$). CHRD knockdown reversed these effects, indicating its role in suppressing collagen deposition via TGF- β /Smad3 inhibition. OE-NOG showed weaker collagen regulation, highlighting CHRD's superior anti-scarring potential.

(4) OE-PTEN and OE-RASSF8 suppressed fibroblast proliferation/migration ($P < 0.01$), downregulated *AKT1*, *COL1A1*, *COL3A1*, *VEGF*, *MMP-1*, and fibronectin ($P < 0.01$), and upregulated TIMP-1 ($P < 0.01$). RASSF8 exhibited stronger ECM remodeling effects, providing a molecular basis for scar reduction.

(5) The results of animal experiments show that OE-CHRD delayed early wound closure (7–35 days, $P < 0.05$) but achieved comparable healing rates to controls by day 105 ($P > 0.05$). Epidermal thickness ($45.4 \pm 5.1 \mu\text{m}$) and collagen alignment resembled normal skin ($41.5 \pm 4.3 \mu\text{m}$), with minimal scarring. Mechanistically, OE-CHRD inhibited TGF- β 1/Smad3/COL1A1/COL3A1 and upregulated Smad7. OE-RASSF8 reduced collagen synthesis but showed weaker regulation (higher residual collagen, disorganized fibers).

Conclusions:

(1) Integrated multi-omics and functional assays revealed that key genes (*CHRD*, *NOG* in TGF- β ; *PTEN*, *RASSF8* in PI3K-AKT) suppress collagen synthesis rates and optimize alignment to enable scarless healing in donkey skin.

(2) In vitro, OE-CHRD inhibited fibroblast proliferation/migration, downregulated collagen genes, and activated Smad7. OE-RASSF8 antagonized PI3K/AKT to suppress fibroblast activity and balance ECM homeostasis (upregulating TIMP-1, suppressing MMP-1).

(3) In vivo, OE-CHRD delayed the early collagen synthesis rate through a "delayed repair-ordered remodeling" mechanism. However, by day 105, the wound healing rate showed no difference compared to the control group, while collagen arrangement and epidermal thickness approached normal skin levels, and it significantly reduced scar formation.

This study systematically investigated the mechanism by which donkey skin wounds balance collagen synthesis speed and arrangement through "decelerated repair," providing a theoretical basis for understanding the synthesis mechanism of donkey skin collagen and offering clinical targets for targeted inhibition of pathological scarring.

Key words: Donkey; skin Wound; Collagen; Fibroblasts; Scar

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	IV
主要缩写词表.....	X
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究的目的与意义.....	1
1.2 胶原蛋白对伤口愈合的作用.....	1
1.3 伤口的愈合过程及瘢痕的形成机理.....	2
1.3.1 伤口的愈合过程的步骤.....	2
1.3.2 伤口愈合的主要调控通路.....	4
1.3.3 炎症期伤口愈合的过程.....	5
1.3.4 肉芽增殖期伤口愈合的影响因素.....	8
1.3.5 重塑期伤口愈合过程.....	10
1.4 伤口愈合过程中抑制胶原蛋白合成的相关基因.....	12
1.4.1 脊索调节蛋白.....	12
1.4.2 头蛋白.....	14
1.4.3 磷酸酯酶与张力蛋白同源缺失基因.....	14
1.4.4 Ras 相关结构域家族 8.....	16
1.5 转录组学和蛋白质组学的应用.....	17
1.6 研究内容.....	18
1.6.1 驴皮伤口愈合各阶段组织的转录组学分析.....	18
1.6.2 驴皮伤口愈合各阶段组织的蛋白组学分析.....	19
1.6.3 在体外培养驴真皮成纤维细胞中, 验证差异基因及相关信号通路对驴皮伤口愈合相关基因的影响.....	19
1.6.4 在驴皮伤口模型中, 验证差异表达基因对伤口愈合的影响.....	19
1.7 技术路线图.....	20
第 2 章 驴皮伤口愈合各阶段组织的转录组学分析.....	21
2.1 前言.....	21
2.2 材料与方法.....	21
2.2.1 试验动物.....	21
2.2.2 试验试剂和仪器.....	22

2.2.3 试验方法	22
2.3 结果与分析	25
2.3.1 驴皮伤口组织样 GC 含量分布	25
2.3.2 驴皮伤口组织样数据质量汇总	26
2.3.3 驴皮伤口组织样本间相关性	26
2.3.4 驴皮伤口组织样参考基因组比对	27
2.3.5 驴皮伤口组织样品中基因表达量的分布	28
2.3.6 驴皮伤口组织样 KEGG 富集分析	31
2.4 讨论	32
2.5 小结	33
第 3 章 驴皮伤口愈合各阶段组织的蛋白质组学分析	35
3.1 前言	35
3.2 材料与方法	35
3.2.1 试验动物	35
3.2.2 试验试剂和仪器	36
3.2.3 试验方法	36
3.3 结果与分析	39
3.3.1 驴皮伤口组织样蛋白浓度测定	39
3.3.2 驴皮伤口组织样 SDS-PAGE 电泳检测	40
3.3.3 驴皮伤口组织样 iTRAQ 标记与质谱鉴定结果	41
3.3.4 驴皮伤口组织样生物信息学分析	42
3.4 讨论	50
3.5 小结	51
第 4 章 驴皮真皮成纤维细胞的体外培养及鉴定	52
4.1 前言	52
4.2 材料和方法	52
4.2.1 样本的收集	52
4.2.2 主要试剂	53
4.2.3 主要仪器	53
4.2.4 试验方法	54
4.3 结果与分析	56
4.3.1 驴皮成纤维细胞的形态学观察	56
4.3.2 驴皮成纤维细胞的鉴定	56
4.3.3 驴皮成纤维细胞生长曲线绘制	57

4.3.4 驴皮成纤维细胞的活力鉴定	58
4.4 讨论	59
4.4.1 组织块贴壁法培养原代细胞	59
4.4.2 纯化、鉴定原代成纤维细胞	59
4.5 小结	60
第5章 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 基因通过 TGF- β 信号通路对驴皮伤口愈合相关 基因表达的影响	61
5.1 前言	61
5.2 材料与方法	62
5.2.1 试验材料	62
5.2.2 试验方法	63
5.3 结果与分析	72
5.3.1 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 基因过表达载体的鉴定与测序	72
5.3.2 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 基因干扰载体的鉴定与测序	73
5.3.3 慢病毒滴度测定	74
5.3.4 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 过表达和干扰慢病毒载体的筛选及验证	75
5.3.5 过表达和干扰 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 对驴皮成纤维细胞增殖的影响	76
5.3.6 过表达和干扰 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 对驴皮成纤维细胞迁移的影响	77
5.3.7 过表达和干扰 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 对伤口愈合相关基因 mRNA 水平的影响	79
5.3.8 过表达和干扰 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 对伤口愈合关键蛋白表达的的影响	80
5.4 讨论	81
5.4.1 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 对驴皮成纤维细胞增殖、迁移的影响	81
5.4.2 <i>CHRD</i> 、 <i>NOG</i> 对驴皮伤口愈合及瘢痕形成相关基因表达的影响	83
5.5 小结	84
第6章 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 基因通过 PI3K/Akt 信号通路对驴皮伤口愈合相关基因表达的影响	85
6.1 前言	85
6.2 材料与方法	85
6.2.1 试验材料	85
6.2.2 试验方法	86
6.3 结果与分析	90
6.3.1 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 基因过表达载体的鉴定与测序	90
6.3.2 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 基因干扰载体的鉴定与测序	91
6.3.3 慢病毒滴度测定	92
6.3.4 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 过表达和干扰慢病毒载体的筛选及验证	93
6.3.5 过表达和干扰 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 对驴皮成纤维细胞增殖的影响	94

6.3.6	过表达和干扰 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 对驴皮成纤维细胞迁移的影响	96
6.3.7	过表达和干扰 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 对伤口愈合相关基因 mRNA 水平的影响	98
6.3.8	过表达和干扰 <i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 对伤口愈合关键蛋白的影响	99
6.4	讨论	101
6.4.1	<i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 对驴皮成纤维细胞增殖、迁移的影响	101
6.4.2	<i>PTEN</i> 、 <i>RASSF8</i> 对驴皮伤口愈合及瘢痕形成相关基因表达的影响	102
6.5	小结	103
第 7 章	<i>CHRD</i> 、 <i>RASSF8</i> 基因对驴皮伤口创面愈合的影响	104
7.1	前言	104
7.2	材料与方法	104
7.2.1	试验材料	104
7.2.1.1	试验动物	104
7.2.2	试验方法	106
7.3	结果与分析	107
7.3.1	OE- <i>CHRD</i> 、OE- <i>RASSF8</i> 质粒注射对驴皮伤口愈合率的影响	107
7.3.2	驴皮伤口的 HE 染色	108
7.3.3	驴皮伤口的 Masson 染色	109
7.3.4	<i>CHRD</i> 、 <i>RASSF8</i> 对驴皮伤口的不同时期伤口愈合相关基因的影响	110
7.4	讨论	112
7.4.1	OE- <i>CHRD</i> 、OE- <i>RASSF8</i> 对伤口愈合速度的影响	112
7.4.2	<i>CHRD</i> 、 <i>RASSF8</i> 对伤口愈合和瘢痕形成相关基因表达的影响	112
7.5	小结	113
第 8 章	全文结论	114
第 9 章	创新点	115
	参考文献	116
	致 谢	135
	作者简介	136
	石河子大学博士研究生学位论文导师评阅表	138

主要缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
Akt	Protein Kinase B	蛋白激酶 B
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒-8
CHRD	Chordin	脊索调节蛋白
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1	I 型胶原 α 1
COL1A2	Collagen Type I Alpha 2	I 型胶原 α 2
COL3A1	Collagen Type III	III 型胶原
DNase-seq	DNase I hypersensitive site sequencing	DNase I 超敏感位点测序
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
FN	Fibronectin	纤维连接蛋白
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MMP-1	Matrix Metalloproteinase-1	基质金属蛋白酶-1
mRNA	messenger RNA	信使核糖核酸
TOR	Target of Rapamycin	雷帕霉素靶蛋白
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium	甲基噻唑基四唑
NOG	Noggin	头蛋白
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PDGF	Platelet-derived growth factor	血小板源性生长因子
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome	磷酸酯酶和张力蛋白同源缺失基因
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	定量聚合酶链
RASSF8	Ras Association Domain Family Member 8	Ras 相关结构域家族 8
smad3	smad3 protein	smad3 蛋白
smad7	smad7 protein	smad7 蛋白
TGF- β	Transforming Growth Factor- β	转化生长因子- β
TGF- β 1	Transforming growth factor-beta 1	转化生长因子 1
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1,	金属蛋白酶组织抑制剂-1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α	肿瘤坏死因子- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子

第 1 章 绪论

1.1 研究的目的是与意义

皮肤作为机体抵御外界损伤的第一道生理屏障，其再生修复过程涉及精密有序的细胞动态调控与细胞外基质（ECM）重塑的复杂平衡^[1-2]。皮肤受到深度创伤后，成纤维细胞的功能异常活化会引发 I/III 型胶原蛋白代谢比例失调及其空间排列紊乱，这种病理改变常常会成为病理性瘢痕^[3]，给患者带来严重的心理负担，故对瘢痕形成机制的研究，是医学领域亟待解决的难题。虽然胎儿无瘢痕愈合模型为揭示理想修复机制提供了重要线索，但受限于生物伦理规范与组织样本稀缺致其分子调控机制尚未完全阐明^[4-5]。值得注意的是，成年哺乳动物普遍呈现瘢痕修复为主导的创伤应答模式，这一进化现象提示胶原代谢的精准调控网络仍有待深入探索。

作为传统药材阿胶生产的专属原料，驴皮呈现出独特的“高胶原合成-无瘢痕愈合”生物学悖论：其成纤维细胞的 I 型胶原分泌能力可达人类皮肤同源细胞的 3 倍以上，但在全层皮肤缺损修复过程中却能维持 ECM 有序重构，最终实现无肉眼可见瘢痕的优质愈合^[6]。这种生物学矛盾提示，驴皮可能会进化形成其特有的基因调控网络，通过时序性调控胶原合成速率与空间构想实现 ECM 代谢的动态平衡。现有研究多集中于驴皮胶原的生化特性，而对其分子调控机制——特别是 TGF- β /Smad、PI3K/Akt 等关键通路中基因的时空表达模式及表观遗传调控——仍缺乏系统性研究。

因此，本研究提出驴皮特异性基因可能通过建立“减速修复”机制，延缓胶原合成速度以促进有序排列，从而规避了瘢痕形成。为验证该假说，研究将通过转录组学和蛋白组学与功能验证，重点解析：（1）伤口愈合三期（炎症期、增殖期、重塑期）中差异表达基因如何协同抑制纤维化进程；（2）TGF- β /Smad 与 PI3K/Akt 通路核心基因调控胶原代谢的分子开关；（3）关键调控因子的靶向干预能否在成年动物体中出现无瘢痕表型。本研究将揭示驴皮伤口表面无瘢痕愈合的分子机制，通过信号通路分析验证，为开发靶向调控胶原代谢的新型疗法提供理论依据。

1.2 胶原蛋白对伤口愈合的作用

胶原蛋白是皮肤细胞外基质（ECM）的关键组分，其代谢动态与空间构象直接调控伤口修复结局。从发育生物学视角，ECM 不仅是维持组织微环境力学完整性的动态支架，为细胞提供物理支撑和信号联系，还通过整合素介导的机械-生化信号转导调控

细胞增殖、迁移及分化^[7-8]。其中，I型胶原（由基因 *COL1A1/COL1A2* 编码形成）与III型胶原（由基因 *COL3A1* 编码形成）共同有序排列构成ECM的正常骨架系统，两者的比例与空间排列直接决定组织弹性与修复质量。在正常皮肤中，I/III型胶原以约4:1的比例形成三维网状结构，其中，粗大的I型纤维（直径50-100 nm）提供主体支撑，而纤细的III型纤维（直径20-40 nm）则通过调控基质孔隙率引导细胞定向迁移与再上皮化进程^[9-10]。不同发育阶段的ECM重构特征进一步揭示了胶原时空组装的精密调控——胚胎期高III型胶原占比（30%-60%）及其三维网格状沉积赋予组织高重塑能力，而成年皮肤创伤修复过程中III型胶原比例下降（10%-20%）且纤维呈平行束状排列，这种ECM刚性化虽增强机械强度，却会导致病理性瘢痕风险：I/III型胶原比例倒置（可高达10:1）导致ECM力学各向异性丧失，异常交联的纤维束通过整合素 $\alpha 2\beta 1$ 传递产生机械应力，最终驱动肌成纤维细胞向持续活化状态转化^[11]。

在创伤修复进程中，胶原代谢呈现严格的阶段性时序调控：增殖期由 *COL3A1* 主导形成临时基质支撑细胞迁移与血管新生，其纤维疏松排列结构利于组织重塑；而重塑期则通过 *TGF- β 1/Smad3* 通路特异性上调，形成致密交联的成熟纤维^[12-13]。但在瘢痕疙瘩等病理状态下，*TGF- β 1* 的持续激活导致 *COL1A1* 表达激增（较正常升高3-5倍），而依赖 *JNK* 信号的 *COL3A1* 增幅有限，致使 I/III 型胶原比例异常升高（>8:1），触发ECM刚性增加-肌成纤维细胞活化-机械应力传导的恶性循环^[14-15]。此外，纤维连接蛋白 *FN* 通过整合素 $\alpha 5\beta 1$ 与 *COL1A1* 组装成抗降解超分子结构，使瘢痕呈现“不可逆”病理特征^[16]。

胎儿无瘢痕愈合模型揭示了胶原时空调控的黄金标准：其创伤微环境中III型胶原占比维持大于40%，并通过快速三维沉积（速率较成人快2.3倍）实现无瘢痕修复，而成人修复则因I型胶原的过度平行排列（占比>80%）陷入纤维化陷阱^[17-18]。当前临床干预主要聚焦在靶向 *TGF- β 1* 信号（如单抗、siRNA等），虽能降低胶原总量20%-30%，但难以恢复I/III型胶原的生理比例（仍>5:1），且无法纠正异常纤维构象^[19-20]。

表明单纯想抑制胶原合成并非理想策略，而重建发育期特异的“减速-有序”沉积模式可能更具治疗潜力——正如驴皮愈合模型中观察到的“高胶原合成（I型胶原产量达人类3.2倍）却无瘢痕”现象所印证，暗示其可能通过未知的分子刹车系统实现胶原代谢速率与空间排列的精准解耦^[21]。

1.3 伤口的愈合过程及瘢痕的形成机理

1.3.1 伤口的愈合过程的步骤

皮肤伤口愈合是多个生物学级联反应的过程，详细划分为止血期、炎症期、增殖