

文章编号:1673-0062(2017)02-0084-06

重组人角质细胞生长因子 2 在伤口愈合及 毛发再生方面的影响

马 丽¹, 喻翠云², 刘格莎^{1*}

(1.成都远睿生物技术有限公司,四川 成都 610213;2.南华大学 药学与生物科学学院,湖南 衡阳 421001)

摘 要:探寻重组人角质细胞生长因子 2(rh-KGF2)和易孚(EGF 为主要的药品)对 SD 大鼠烫伤创面愈合方面效果的差异,同时探寻重组人角质细胞生长因子 2(rh-KGF2)和米诺地尔在毛发再生方面效果的差异.通过建立大鼠的自身对照模型,左侧形成深Ⅱ°烫伤创面,右侧涂抹脱毛膏脱毛.通过连续 4~6 周,每日 1 次对烫伤创面和脱毛区域采用涂抹的方式对伤口给药.在此过程中对大鼠的一般状态、体重、烫伤愈合效果以及新生毛长及毛重进行观察.通过分析得出的结论为:rh-KGF2 在伤口愈合方面和毛发再生方面有良好的效果.

关键词:重组人角质细胞生长因子 2;重组人表皮细胞生长因子;伤口愈合;毛发再生
中图分类号:R965.2;R644 **文献标志码:**B

The Effects of Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor 2 on Wound Healing and Hair Regeneration

MA Li¹, YU Cui-yun², LIU Ge-sha^{1*}

(1.Chengdu Farwits Biotechnology Co., Ltd., Chengdu, Sichuan 610213, China; 2.School of Pharmaceutical and Biological Science, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: In order to explore the effects of recombinant human keratinocyte growth factor 2 (rh-KGF2) and Yi Fu (EGF) on the wound healing of SD rats, and to explore the differences between the effect of rh-KGF2 and Minoxidil on hair regeneration of SD rats, the self-control rat models were established, whose left side has a deep second degree burn wound and the right side hair was removed using depilatory creams. The wounds were constantly given different drugs every day for 4~6 weeks. During this process, the general condition, body weight, scalds in rats and the healing effects of new hair length and weight of the rats were observed and analyzed. At last, it is concluded that the recombinant human keratinocyte

收稿日期:2017-04-17

作者简介:马 丽(1980-),女,成都远睿生物技术有限公司业务发展部总监,主要从事新药临床研究和新药研发的质量控制.E-mail:maxiaohan@farwits.com. * 通讯作者:刘格莎,E-mail:316772027@qq.com.

growth factor 2 has a good effect on wound healing and hair regeneration.
key words:rhKGF-2;EGF;wound healing;hair regeneration

角质细胞生长因子-2(KGF-2)又称成纤维细胞生长因子-10(FGF-10),是人体内自然存在的一种具有生物活性的碱性蛋白,它最先是 1997 年 Emoto 等首先从人的肺中分离出的具有肝素结合特异性的单链多肽^[1],由 215 个氨基酸组成,理论相对分子质量为 26 000.KGF-2 主要在肺、心、皮肤、脑、前列腺等器官中表达,是胚胎期肢体、肺、前列腺及性腺器官的形成和生长所必需的生长因子^[2-3].研究表明,KGF-2 对皮肤及粘膜损伤有促进愈合的作用^[4-5],能够促进神经细胞生长和血管的形成^[6],同时对晚期非小细胞癌症患者的吞咽困难有改善的作用^[7],并且能够促进毛发的再生^[8].众所周知,现有的表皮细胞生长因子类药品(如:易孚)在促进伤口愈合方面也有较好的疗效^[9],而米诺地尔是目前市面效果较好的治疗斑秃的药品^[10],对本研究拟定通过实验来进一步比较 rh-KGF2 与易孚(EGF 类产品)在大鼠伤口愈合以及米诺地尔在毛发再生方面的效果.

1 实验部分

1.1 仪器与材料

电子天平(德国西门子);小型动物气体麻醉机(瑞士罗氏).rhKGF-2 冻干粉(白色粉末,成都远睿生物技术有限公司);氯化钠注射液(无色澄明液体,昆明南疆制药有限公司);EGF(易孚,桂林华诺威基因药业有限公司),米诺地尔溶液(四川美大康华康药业有限公司).健康合格 SD 大鼠 18 只,雄性,由北京华阜康生物科技有限公司提供,购入时 6~8 周龄,个体体重 180~220 g;分组时 8~10 周龄,体重为 320~340 g.

1.2 实验方法

1.2.1 各组 SD 大鼠一般形态和体重观察

观察所有大鼠外观体征、一般行为活动、精神状态、腺体分泌、呼吸状态、粪便性状、生殖器、死亡等情况及其它表现.在分组前、给药前和解剖前各测定一次所有大鼠的体重.

1.2.2 不同的治疗方法对 SD 大鼠烫伤愈合效果的检测

将所有健康 SD 大鼠随机分为 6 组,分别是米诺地尔组,EGF 组,L-KGF 组(rhkgf-2 低剂量组),M-KGF 组(rhkgf-2 中剂量组),H-KGF 组(rhkgf-2 高剂量组),0.9%(质量分数)NaCl 组.详

见表 1.

表 1 动物分组情况表
Table 1 Animal grouping table

组别	动物数	动物编号
米诺地尔	3	1M0101、1M0102、1M0103
EGF	3	2M0101、2M0102、2M0103
L-KGF	3	3M0101、3M0102、3M0103
M-KGF	3	4M0101、4M0102、4M0103
H-KGF	3	5M0101、5M0102、5M0103
0.9%NaCl	3	6M0101、6M0102、6M0103

注:动物编号的首位数字代表组别,1、2、3、4、5、6 分别代表米诺地尔组,阳性对照组(EGF 组),rhkgf-2 低剂量组(药物剂量为 100 UI/mL),rhkgf-2 中剂量组(药物剂量为 200 UI/mL),rhkgf-2 高剂量组(药物剂量为 400 UI/mL),阴性对照组(0.9%生理盐水组).第二位字母代表性别(M 为雄性),3、4 位数字代表动物笼号,5、6 位数代表动物个体序列号.

依据前期的文献数据,拟定的实验剂量设计详见表 2.表 2 中 EGF 的用量为现在市面上现有产品的常规临床使用量,因为考虑到 KGF2 目前还没有产品上市,因此我们设置了较低的剂量,主要是为了探寻 KGF2 的最低起效量,并为本单位接下来开展一系列的研究来奠定基础.

表 2 剂量设计表
Table 2 Dose schedule table

组别	药量	给药途径	给药浓度 /(mg·mL ⁻¹)
米诺地尔	1 mL	涂抹	2%
EGF	0.1 g	涂抹	5 000 UI/g
L-KGF	40 μL	涂抹	100 UI/mL
M-KGF	40 μL	涂抹	200 UI/mL
H-KGF	40 μL	涂抹	400 UI/mL
0.9%NaCl	40 μL	涂抹	0.9%(质量分数)

麻醉选用异氟烷吸入麻醉,待 SD 大鼠进入麻醉状态后俯卧,选择距离背部脊柱两侧相等的区域剃毛.完成剃毛后进行术区消毒(新洁尔灭,75%酒精,碘伏,75%酒精).左侧区域用沸水(97℃~100℃)连续接触皮肤 10 s,形成直径为 1 cm 的圆形深Ⅱ°烫伤创面,以造成 SD 大鼠的深Ⅱ°烫伤模型;右侧涂抹脱毛膏脱毛,以造成 SD 大鼠的脱毛模型.将给药当天定义为试验第 1 天,采用局部外用涂抹的

方式进行给药,每日 1 次,连续给药 40 d.每日观察 1 次,记录并统计烫伤创面结痂率和瘢痕率.测量用药过程中伤口面积并计算烫伤创面结痂率和瘢痕率[烫伤创面结痂率(%)=(当日结痂面积/初始结痂面积)×100%;瘢痕率(%)=(瘢痕面积/初始结痂面积)×100%].

1.2.3 不同的治疗方法对 SD 大鼠毛发再生方面的效果的检测

在 28 d 时,取所有存活大鼠右侧脱毛区给药部位最长 10 根的新生毛发测定长度,并刮取给药部位新生毛称重.

1.2.4 对 SD 大鼠瘢痕厚度和毛囊再生方面的病理学检测

根据体重以戊巴比妥钠麻醉(腹腔注射 60 mg/kg,可根据动物健康状况调整剂量),全面观察大鼠的外观形态后,腹主动脉放血安乐死,对其进行大体解剖观察.剖检烫伤区局部组织,大体观察,并取烫伤区域及周围皮肤及皮下筋膜、肌肉组织保存于福尔马林固定液中.另外,当大体观察发现明显病变时,按组织病理学技术标准操作对该组织进行取材、脱水、石蜡包埋、切片及苏木精—伊红染色后,进行显微镜观察其瘢痕厚度和毛囊再生情况.

1.3 统计学处理

体重、烫伤创面愈合率、瘢痕率、新生毛长及毛重等定量指标采用均数±标准误描述,样本数小于 3 时,直接列出个体数据,该组数据不进行统计学比较.

定量指标先采用 LEVENE 检验进行方差齐性检验,当方差齐时($P>0.05$),则采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学检验;当方差不齐时($P\leq 0.05$),则采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验(K-W 法)进行统计分析.当单因素方差分析显示差异有统计学意义时($P\leq 0.05$),则采用 Dunnett's t 检验(Dunnett 法)对组间差异进行比较;当单因素方差分析显示差异无统计学意义时($P>0.05$),则统计分析结束.当 Kruskal-Wallis H 秩和检验显示差异有统计学意义时($P\leq 0.05$),则采用 Mann-Whitney U 检验(M-W 法)对组间差异进行比较;当 Kruskal-Wallis H 秩和检验显示差异无统计学意义时($P>0.05$),则统计分析结束.

组间差异比较在各剂量组与对照组之间进行.

所有检验均为双侧检验 $\alpha=0.05$.所有的统计分析,采用 SPSS 软件进行.

2 结果与讨论

2.1 各组 SD 大鼠一般形态和体重观察结果

各组入选的 SD 大鼠在试验过程中,所有动物进水进食正常,活动正常.手术造模后各组动物均正常进水进食及自发活动,未见明显异常.在本试验条件下,各组 SD 大鼠在分组前、给药前、解剖前体重无明显影响(表 3).

表 3 各组 SD 大鼠在试验不同时间点体重

Table 3 The weights of SD rats in each group at different times during the experiments (g)

组别	分组前	给药前	解剖前
米诺地尔	210.28±3.74	331.48±6.48	481.27±11.99
EGF	214.64±2.12	343.73±7.58	465.64±17.92
L-KGF	210.77±3.42	330.80±5.97	449.21±17.85
M-KGF	210.88±2.89	335.62±5.07	452.64±2.24
H-KGF	210.87±4.31	334.94±7.83	449.72±19.10
0.9%NaCl	212.19±1.41	338.58±4.29	436.49±5.73

2.2 不同的治疗方法对 SD 大鼠烫伤愈合效果的检测结果

2.2.1 烫伤结痂率

每日观察发现,烫伤后结痂情况在给药第 5 d 稳定下来,因此将给药第 5 d 所测结痂面积作为本次试验的原始结痂面积.从图 1 可见在 5 至 15 d 时,H-KGF 组烫伤结痂率低于 0.9%NaCl 组;米诺地尔组、EGF 组、L-KGF 组和 M-KGF 组烫伤结痂率与 0.9%NaCl 组无显著差异($P>0.05$)(图 1).

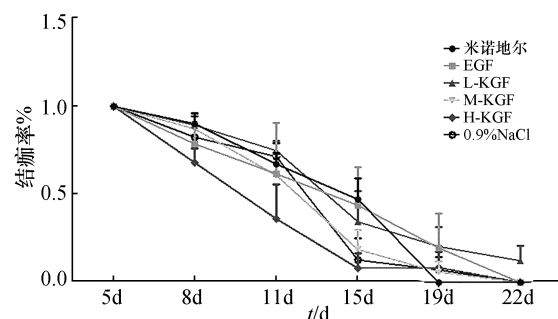


图 1 各组 SD 大鼠的烫伤结痂率

Fig.1 Burn scar rates of SD rats in each group

2.2.2 烫伤瘢痕情况

图 2 为各组大鼠的瘢痕外观图.从图中可以看出,H-KGF 组在第 10 d 时瘢痕已经愈合,肉眼观察不到瘢痕组织,而其他组在第 10 d 时均有瘢痕.

痕存在.在第 21 d 时,M-KGF 组和 EGF 组也通过肉眼观察不到瘢痕组织的存在,而 L-KGF 组、米诺地尔组以及阴性对照组均还能观察到瘢痕组织的存在.由此可见在本实验条件下的高剂量组的促进烫伤伤口愈合的能力强于其他组,并且时间明显短于其他组.这是由于 KGF-2 在体外对成纤

维细胞生长无刺激作用,但在体内能促进成纤维细胞生长和肉芽组织形成,而且可能是通过刺激另外某些生长因子如血小板衍生生长因子 AB、转化细胞生长因子 α 等分泌间接作用于成纤维细胞、血管内皮细胞等途径实现的^[11].

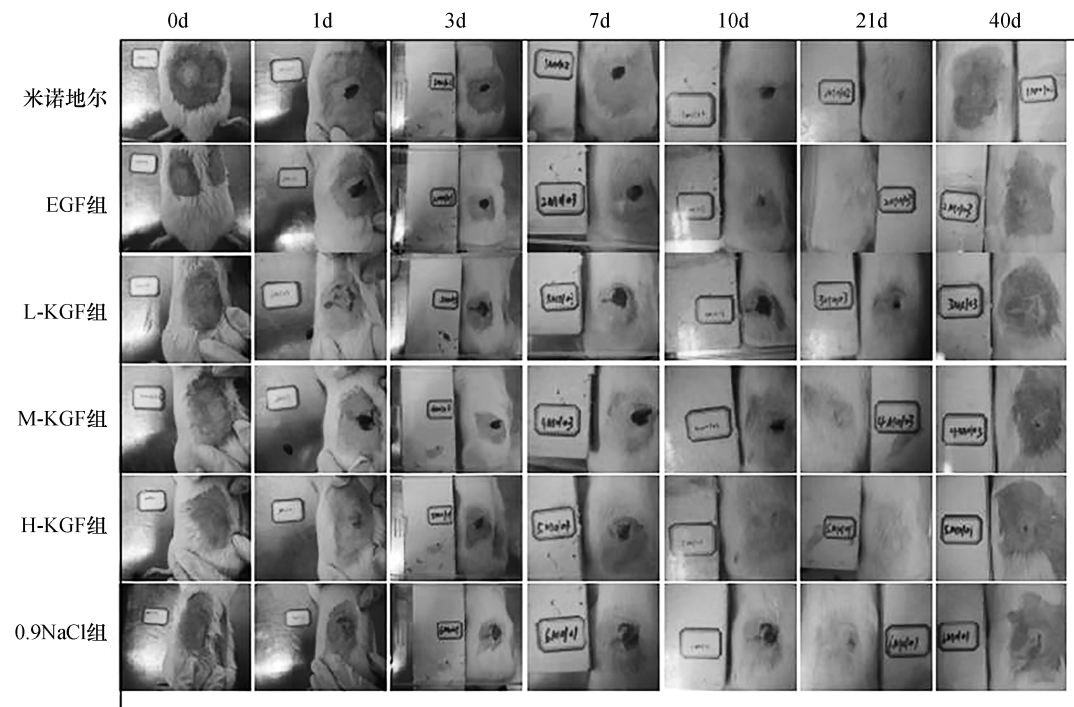


图 2 各组 SD 大鼠的瘢痕外观图
Fig.2 Scar appearances of SD rats in each group

2.3 不同治疗方法对 SD 大鼠毛发再生的检测结果

如表 3 所示,给药第 28 d 时,测量米诺地尔组和 H-KGF 组再生毛发的毛长,均能得出其显著长于质量分数 0.9%NaCl 组的毛长($P<0.05$).虽然从表 3 的数据中可以得出 H-KGF 组再生毛重与质量分数 0.9%NaCl 组间无显著差异,但是米诺地尔组并不能促进创面的毛发再生.

2.4 不同治疗方法对 SD 大鼠瘢痕厚度和毛囊再生的病理学检测结果

2.4.1 瘢痕厚度

从表 4 中的数据可以看出,M-KGF 组和 H-KGF 组烫伤瘢痕皮肤厚度显著低于 0.9%NaCl 组($P<0.05$);EGF 组、L-KGF 组和 M-KGF 组烫伤瘢痕厚度低于 0.9%NaCl 组.M-KGF 组烫伤瘢痕真皮厚度显著低于 0.9%NaCl 组($P<0.05$);EGF 组、L-KGF 组和 H-KGF 组烫伤瘢痕厚度低于 0.9%

NaCl 组.有研究认为,外用 KGF-2 能促进角质形成细胞的增殖,刺激伤口周围上皮细胞的再生、分化和迁移,但对成纤维细胞和内皮细胞则无直接作用,因此可以减轻伤口愈合过程中的瘢痕组织形成^[12].

表 4 各组 SD 大鼠的新生毛长及毛重
Table 4 The hair length and gross weight of SD rats in each group

组别	毛长/cm	毛重/(g · cm ⁻²)
米诺地尔	2.63±0.18 *	0.15±0.07
H-KGF	2.23±0.13 *	0.09±0.03
0.9%NaCl	1.77±0.03	0.08±0.04

注:米诺地尔组和 H-KGF 组新生毛长显著长于 0.9%NaCl 组 (* $P<0.05$)

表 5 各组 SD 大鼠的瘢痕厚度
Table 5 Scar thickness of SD rats in each group

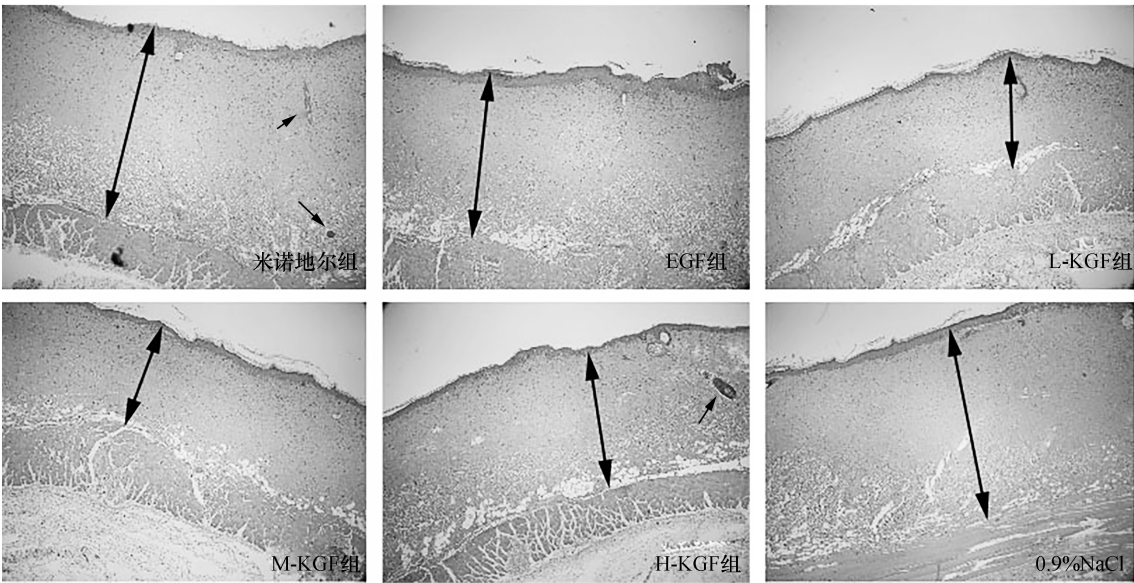
组别	瘢痕皮肤厚度 (PI)	瘢痕表皮厚度 (PI)	瘢痕真皮厚度 (PI)
米诺地尔	2 596.36±333.97	120.31±16.45	2 476.05±318.59
EGF	2 012.74±135.10	151.18±30.50	1 911.96±172.69
L-KGF	2 019.34±106.60	114.09±10.86	1 905.25±97.84
M-KGF	1 551.38±179.89 *	103.04±8.94	1 448.34±188.17 *
H-KGF	1 758.08±132.65 *	111.42±7.85	1 646.66±136.66
0.9%NaCl	2 390.57±171.86	180.42±39.29	2 210.16±142.40

注:M-KGF 组、H-KGF 组瘢痕厚度显著低于 0.9%NaCl 组 (* $P<0.05$);PI 是像素 pixel 的缩写,1 个像素约为 352.7 μm 。

2.5 毛囊再生

从瘢痕的组织切片中可以看出,米诺地尔组和 H-KGF 组的瘢痕组织中有明显的毛囊结构,EGF 组、L-KGF 组、M-KGF 组和 0.9%NaCl 组无明显的毛囊结构,说明 rhKGF2 具有能够促进受损皮肤的毛囊新生的作用,而 EGF 在此实验中则并

没有表现出具有促进毛囊新生的功能。目前,有研究推测,rhKGF2 促进毛发生长的机制是由于刺激毛囊干细胞、毛母质细胞的增殖与分化,并在一定程度上刺激毛囊上皮细胞的增殖与分化,从而促进毛囊的新生与成熟^[8]。



(注:↔表示皮肤厚度;→表示新生毛发结构)

图 3 SD 大鼠的瘢痕组织切片 (HE:10X40)

Fig.3 Scar tissue sections of SD rats

3 结 论

随着医学美容行业的发展,越来越多的人倾向于通过不同的医学美容手段来改善自己不足的方面,而其中的皮肤激光美容科患者多为手术、外伤、烧烫伤或各种激光损伤所致皮肤创伤患者,根据损伤创面、部位、程度和类型等的情况不同,患者创面修复和愈合效果也存在一定差异^[11]。近年来一些生长因子在创面修复中也发挥重要作用,

比如:在炎症反应阶段,血小板释放血小板衍生生长因子(PDGF)、EGF、TGF- β 等,调控炎症细胞的趋化和活化;在细胞增殖阶段,成纤维细胞分泌 FGF-2、PDGF、EGF、TGF- β 和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)等,调控细胞趋化、活化、增殖、分化和移行,最终完成创面修复^[12-13];在瘢痕形成和伤口愈合阶段,KGF-2 作为成纤维细胞生长因子家族中的一员,能快速的促进上皮细胞的再生、分化和迁移,并且但对成纤维细胞和内皮细胞无直

接作用,因此能够抑制伤口愈合过程中瘢痕组织的形成^[14-17]。

本研究证实 rhKGF-2 能促进大鼠烫伤创面的愈合,且 H-KGF 组 (rhKGF-2 的浓度为 400 UI/mL) 的效果优于其他组,主要表现是在本试验条件下,给药 5 d、8 d、11 d、15 d 和 19 d 时, H-KGF 组烫伤结痂率低于 EGF 组;给药 40 d, H-KGF 组烫伤瘢痕率低于 EGF 组,说明 H-KGF 在烫伤伤口结痂及愈合方面的治疗效果优于 EGF。同时, M-KGF、H-KGF 组烫伤瘢痕皮肤厚度和 M-KGF 组烫伤瘢痕真皮厚度均显著低于 0.9% NaCl 组,显示了运用 KGF-2 在烫伤伤口愈合后的瘢痕形成方面的效果相比于生理盐水具有一定的优势。

在促进毛发再生方面,给药 28 d, H-KGF 组新生毛发长度长于 0.9% NaCl 组,并且在 H-KGF 组烫伤瘢痕病理切片中能够观察到有明显毛囊结构,说明 rhKGF-2 能够促进伤口的毛发再生,而相比之下,米诺地尔在促进伤口愈合方面的能力却明显逊色于 KGF2。

由于本次试验为开展药效学实验之前的预实验,实验样本量较少,因此其实验结果只能作为 KGF-2 药效学实验的一种实验结果的趋势探讨,本公司后期将开展进一步的药效学实验来探寻 KGF-2 的最佳作用浓度,而此实验的结果也能明显的得出 rhKGF-2 的促进创面的愈合和抑制瘢痕生成的效果优于 EGF。相比之下 rhKGF-2 还能够使促进创面的毛囊形成,而米诺地尔对创面的生发效果几乎没有。

参考文献:

- [1] EMOTO H, TAGASHIRA S, MATTEI M G, et al. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10[J]. J Biol Chem, 1997, 272(37): 23191-23194.
- [2] YOKOYAMA H, IDE H, TAMURA K, et al. FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis* [J]. Dev Biol, 2001, 233: 72-79.
- [3] DONJACOUR A A, THOMSON A A, CUNHA G R, et al. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate[J]. Developmental Biology, 2003, 261(1): 39-54.
- [4] 王艳峰, 邹民吉, 徐涛, 等. 角质细胞生长因子 2 突变体对小鼠放射性肠黏膜损伤的治疗研究[J]. 军事医学, 2016, 40(10): 805-808.
- [5] HAN D S, LI F, HOLT L, et al. Keratinocyte growth factor-2 (FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(5): 1011-1022.
- [6] 马雁冰, 李擎, 谢天宏, 等. 重组人角质细胞生长因子 2 基因克隆、表达、纯化与活性分析[J]. 中国处方药, 2001, 17(6): 761-765.
- [7] 阳运康, 蒋电明, 阳明明. 角质细胞生长因子促进人胚神经干细胞增殖与分化的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 27(10): 1246-1251.
- [8] 王泽, 黄鹏煌, 赵海洋, 等. 重组人角质细胞生长因子 2 对实验秃毛大鼠的毛发再生作用[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12): 1741-1746.
- [9] 吴其松. 重组人表皮生长因子对复发性口腔溃疡患儿炎性因子及免疫功能的影响[J]. 现代实用医学, 2016, 28(8): 1066-1067.
- [10] 何云贵, 梁瑞玲. 地黄生发灵及米诺地尔治疗脱发的临床研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 282-283.
- [11] SMITH P D, POLO M, SOLER P M, et al. Efficacy of growth factors in the accelerated closure of interstices in explanted meshed human skin grafts[J]. J Burn Care Rehabil, 2000, 21(1): 5-9.
- [12] XIA Y P, ZHAO Y, MARCUS J, et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation[J]. J Pathol, 1999, 188(4): 431-438.
- [13] 袁海虹, 周薇, 荣征星, 等. 重组人角质细胞生长因子 2 对大鼠皮肤烫伤的治疗作用及其可能机制探讨[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(6): 639-644.
- [14] 林玲. 重组人表皮生长因子在皮肤激光美容科的应用价值分析[J]. 中国医疗美容, 2016, 6(9): 45-47.
- [15] PINARLI F A, OKTEN G, BEDEN U, et al. Keratinocyte growth factor-2 and autologous serum potentiate the regenerative effect of mesenchymal stem cells in cornea damage in rats[J]. Int J Ophthalmol, 2014, 7(2): 211-219.
- [16] JIMENEZ P A, RAMPY M A. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds[J]. Journal of Surgical Research, 1999, 81(2): 238-242.
- [17] 缪云萍, 叶小弟, 程敏, 等. 重组人角质细胞生长因子涂膜剂对家兔损伤创面愈合的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2006, 22(2): 105-108.