DOI:10.16016/j.1000-5404.201507084

人脐带间充质干细胞对小鼠皮肤创面愈合及 VEGF 表达的影响

杨化超,李 茂,黄 文 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血管外科)

[摘要] **目的** 研究人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,hUC-MSCs)对小鼠全层皮肤切除创面愈合及血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响。**方法** 采用组织块贴壁法分离培养 hUC-MSCs,流式细胞术检测细胞免疫表型,并做向成骨、成脂细胞方向分化。48 只雄性 BALB/c 小鼠采用完全随机分组方法分为 hUC-MSCs 组和 PBS 组,每组 24 只,在其背部形成一全层皮肤缺损创面模型,分别于创周注射 hUC-MSCs 悬液和 PBS 液。于 3、7、14 d 观察创面愈合情况,HE 染色观察病理学改变,免疫组织化学及 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达。**结果** 流式细胞术检测显示所培养的细胞为 hUC-MSCs,体外诱导其能向成骨、成脂细胞方向分化。hUC-MSCs 组创面愈合率在各时间点均较 PBS 组显著增高($P<0.05$)。HE 染色显示 hUC-MSCs 组创面愈合质量优于 PBS 组。免疫组化显示 hUC-MSCs 组 VEGF 在 3 d 时表达最多,7、14 d 逐渐减少,但均较 PBS 组增高。Western blot 结果显示 hUC-MSCs 组 3、7、14 d 创面 VEGF 蛋白表达显著高于 PBS 组($P<0.05$)。**结论** hUC-MSCs 可增强皮肤创面 VEGF 的表达,促进皮肤创面的修复。

[关键词] 人脐带间充质干细胞;皮肤损伤;伤口愈合;血管内皮细胞生长因子;小鼠
[中图法分类号] R329.24; R64; R977.1 [文献标志码] A

Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on skin wound healing and expression of VEGF in mice

Yang Huachao, Li Mao, Huang Wen (Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on wound healing and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) after full-thickness excision dermal wounds in mice. **Methods** hUC-MSCs were isolated from the human umbilical cord tissues from a full-term neonate by tissue explants adherent method, and then cultured and identified with flow cytometry for cellular immune phenotypes. Then the obtained hUC-MSCs were induced to differentiate into osteoblasts and adipocytes. Forty-eight male BALB/c mice were randomly divided into hUC-MSCs group and PBS group, with 24 animals in each group. The mice were injected with hUC-MSCs suspension and PBS fluid respectively around the wounds which were made as a full-thickness excision skin wounds in size of 1.5 cm on the dorsum in mice. The wound healing condition were examined in 3, 7, and 14 d after operation, and pathological changes were observed with HE staining. The protein expression of VEGF were detected with immunohistochemical assay and Western blotting. **Results** Flow cytometry results showed that the cultured cells was hUC-MSCs, and the obtained cells could be induced to osteogenic and adipogenic cells after differentiation. The wound healing rate was obviously higher at all time points in the hUC-MSCs group than the PBS group ($P<0.05$). HE staining indicated that the wound healing quality was better in the former than the latter group. Immunohistochemical assay displayed that the expression level of VEGF reached the highest in wound at 3 d, and then reduced gradually at 7 and 14 d in the hUC-MSCs group, but still significantly higher than in the PBS group. Western blot assay showed that the protein expression level of

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070255);国家临床重点专科建设项目(卫办医政函[2012]649 号)
[通信作者] 黄 文, E-mail: dhuangwen@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.012.html(2015-12-03)

VEGF was obviously higher in hUC-MSCs group than in the PBS group at 3, 7, and 14 d after operation ($P < 0.05$). **Conclusion** hUC-MSCs promote the expression of VEGF and facilitate the healing of skin wound.

[**Key words**] human umbilical cord mesenchymal stem cells; skin injury; wound healing; vascular endothelial growth factor; expression; mice

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070255) and the National Clinical Key-discipline Construction Program of China(2012-649). Corresponding author: Huang Wen, E-mail: dhuangwen@hotmail.com

创伤、烧伤、慢性溃疡等造成大面积皮肤缺损,常形成难以愈合的创面,严重影响患者健康及生活质量。干细胞移植治疗作为一种新型的治疗手段为组织损伤修复带来了希望。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,hUC-MSCs)是来源于脐带沃顿胶的一类成体干细胞,具有较强的增殖能力及多向分化能力,较之其他来源的间充质干细胞存在取材无创、含量丰富、避免伦理争议、免疫原性更低等优点[1-2]。作为一种新型的种子细胞已成为干细胞移植研究领域的热点之一。近年研究显示,hUC-MSCs 可以向受损组织归巢,并有效促进肺、肾、肝、脊髓等组织损伤的修复[3-6]。血管内皮细胞因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是一种高度保守的同型二聚体糖蛋白,具有广泛调节血管再生、促进损伤创面愈合的作用[7]。hUC-MSCs 能否通过影响 VEGF 的表达从而促进皮肤创面的修复,目前尚不清楚。本实验拟将 hUC-MSCs 移植于小鼠皮肤损伤创面模型,观察其对皮肤创面修复和 VEGF 表达的影响,为 hUC-MSCs 治疗皮肤创面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

脐带标本来源于重庆医科大学附属第一医院产科健康婴儿脐带组织,排除细菌、病毒、支原体等感染,无梅毒、艾滋病等传染病,经产妇及家属知情同意。健康雄性 8 周龄 BALB/c 小鼠 48 只,体质量 20~25 g,SPF 级,由重庆医科大学实验动物研究中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)20120001。DMEM/F12 培养基、胎牛血清、链霉素、青霉素均购自 Gibco 公司,人脐带间充质干细胞成骨、成脂诱导分化试剂盒购自 Cyagen 公司,小鼠抗人 CD29-FITC、CD44-PE、CD90-PE、CD43-PE、CD45-FITC 购自 BD 公司,VEGF 抗体购自碧云天生物技术有限公司,β-actin 单克隆抗体和 HRP 标记羊抗兔二抗购自北京康为世纪生物技术公司,PV 二步法免疫组化试剂盒和山羊血清封闭液购自北京中杉金桥公司。

1.2 hUC-MSCs 的分离与培养

取足月剖宫产健康婴儿脐带标本 10~20 cm,置于 DMEN/F12 培养基中,4 ℃保存运输至实验室。于超净工作台内取出脐带标本,将其剪成约 5 cm 长小段,PBS 液反复冲洗以去除表面残留的血液。仔细剔除外膜及脐动静脉,取脐带沃顿胶(Wharton's jelly),用 PBS 液反复漂洗干净,剪为约 1 mm^3 大小的小块,接种于 25 cm^2 塑料培养瓶。添加 DMEM/F12 培养液(含 10% 胎牛血清、链霉素 100 g/L、青霉素 100 U/mL),置于饱和湿度、37 ℃、5% CO_2 培养箱中静置培养。3~5 d 后首次半量换液,以后每 3 天更换培养液。待细胞长至 80%~90% 融合时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化,按 1∶2 或 1∶3 比例传代,扩增培养,培养至第 2 代将细胞冻存用于后续研究。取生长良好的第 3~5 代细胞,消化后 PBS 洗涤 3 次,PBS 重悬细胞,调整细胞数为 1×10^7/mL 备用。

1.3 细胞表面标志物测定

取生长良好的第 3 代细胞,2.5 g/L 胰蛋白酶(0.02% EDTA)消化后 PBS 洗涤 3 次,加入荧光标记抗体,4 ℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD29、CD43、CD90、CD45、CD44 的表达。

1.4 成骨成脂方向诱导分化

取生长状态良好的 3~5 代细胞,消化离心后制成细胞悬液,按 $2\times10^4/cm^2$ 接种于 6 孔板中,24 h 后待细胞完全贴壁,更换诱导培养液。成骨方向分化:以成骨诱导分化培养液培养,间隔 2~3 d 更换新鲜培养液,连续培养 3 周,4% 多聚甲醛固定,茜素红染色。成脂方向分化:弃去培养液,加入成脂诱导液 A 继续培养,3 d 后更换为成脂诱导液 B,24 h 后更换为成脂诱导液 A,重复 4~5 次后,4% 多聚甲醛固定,作油红 O 染色。

1.5 小鼠皮肤创面模型制备

将 48 只健康雄性 BALB/c 小鼠采用完全随机分组方法分为 2 组:hUC-MSCs 组、PBS 组,每组 24 只。实验小鼠经腹腔内注射 10% 水合氯醛(0.003 mL/g)麻醉,麻醉满意后剃去背部毛,75% 酒精局部消毒,用无菌眼科剪在其背部形成一直径约 1.5 cm 皮肤全层损伤创面,深及筋膜,无菌纱布止血。造模成功后拍照记录,3 M 透明敷贴包扎。造模后 2 h 内 hUC-MSCs 组于创周多点注射 100 μL 细胞悬液(约 1×10^6 个),PBS 组相同部位注射等量无菌 PBS 缓冲液。术后放回鼠

笼单笼饲养,自由饮食。

1.6 创面愈合率测定

术后3、7、14 d数码相机记录各组创面愈合情况,Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测量创面面积,计算创面愈合率。

创面愈合率=[(原始创面面积-当前时间点测量面积)/原始创面面积]×100%

1.7 HE染色

分别于术后3、7、14 d每组选取4只小鼠,麻醉后取创面新生皮肤组织及周围少许正常皮肤,用4%多聚甲醛固定1 d,梯度脱水,石蜡包埋,4 μm连续切片,常规苏木精-伊红染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察新生皮肤病理学改变。

1.8 免疫组化检测VEGF表达

组织切片脱蜡至水,用0.01 mol/L的枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复15 min,室温自然冷却后3% H_2O_2孵育10 min阻断内源性过氧化物酶,PBS洗5 min×3次。山羊血清37 ℃封闭30 min,滴加兔抗鼠VEGF抗体(抗体稀释1∶100)4 ℃孵育过夜。37 ℃复温1 h,加试剂1孵育20 min,PBS洗5 min×3次,再加试剂2孵育20 min,PBS洗5 min×3次,DAB显色,镜下观察显色效果,苏木精复染胞核、脱水、透明和封片,显微镜下观察拍照。

1.9 Western blot检测VEGF蛋白表达

术后3、7、14 d每组选取4只小鼠,经麻醉后取创面新生皮肤组织及周围少许正常皮肤。加入RIPA裂解液(含1% PMSF)冰上充分匀浆。4 ℃离心收集上清液,ABC法测定总蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,滴加VEGF兔抗鼠抗体(抗体稀释1∶300)和β-actin兔抗鼠抗体(抗体稀释1∶1 000)4 ℃孵育过夜,PBST漂洗5 min×3遍,HRP标记羊抗兔二抗(抗体稀释1∶5 000)37 ℃孵育1 h,PBST漂洗5 min×3遍,滴加ECL化学发光液,凝胶成像系统显影,Quantity One软件半定量分析。

1.10 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件,多组比较行单因素方差分析,两组间比较采用t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUC-MSCs的原代培养

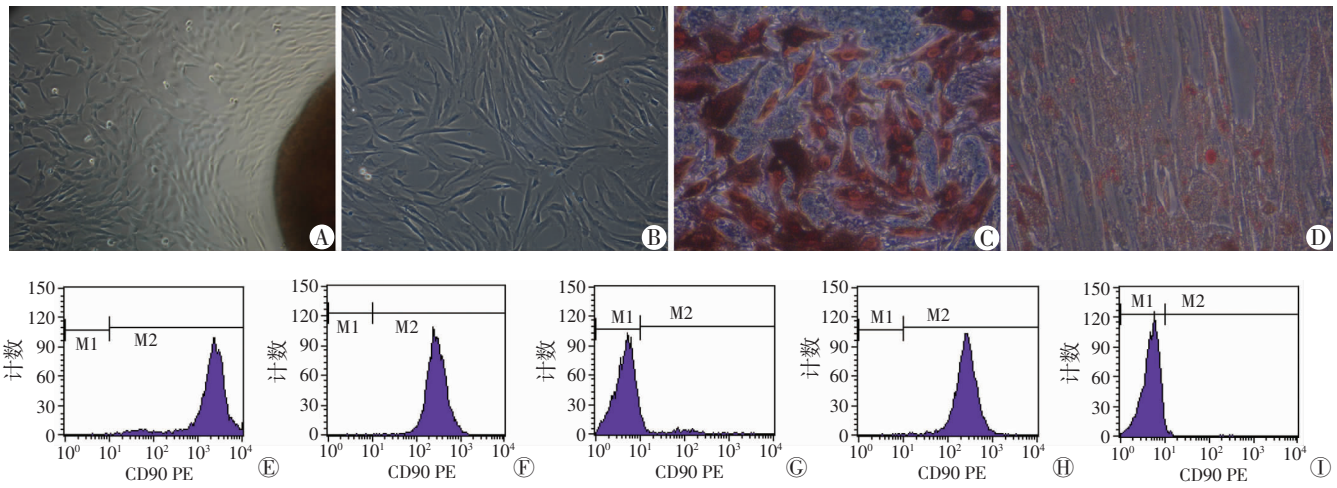
原代培养第10天可见组织块周围有大量贴壁细胞爬出,细胞大小不一,呈短棒状或多角形(图1A)。待生长达80%融合时消化、去除组织块、传代。传至第3代时,细胞形态逐渐变为较均一的长梭形,类似成纤维细胞,呈漩涡状生长,胞浆丰富,细胞核明显(图1B)。

2.2 hUC-MSCs表面标志物检测

原代培养的第3代细胞经流式细胞仪检测细胞表面抗原,结果显示细胞高表达CD29、CD44、CD90,阴性表达CD43、CD45,表明所培养的细胞为hUC-MSCs(图1E~I)。

2.3 hUC-MSCs成骨成脂方向诱导分化

hUC-MSCs成骨诱导21 d后,胞浆及细胞外基质中可见大量黑色颗粒样物质,经茜素红染色成红色(图1C)。成脂诱导14 d后,胞浆中可见圆形脂滴形成,油红O染色呈红色(图1D)。表明hUC-MSCs可向成骨、成脂细胞方向分化。



A:hUC-MSCs原代培养第10天(×100);B:培养至第3代的hUC-MSCs(×100);C:hUC-MSCs成骨分化(茜素红染色 ×200);D:hUC-MSCs成脂分化(油红O染色 ×200);E~I:hUC-MSC表面标志物测定(E:CD90;F:CD29;G:CD34;H:CD44;I:CD45)

图1 hUC-MSCs分离培养、鉴定及诱导分化

2.4　hUC-MSCs 对皮肤创面愈合率的影响

术后第 3 天 hUC-MSCs 组创面愈合率为(21.02 ± 5.00)%,PBS 组创面愈合率为(15.90 ± 4.48)%。第 7 天 hUC-MSCs 组创面愈合率为(55.76 ± 12.38)%,PBS 组创面愈合率为(41.99 ± 10.39)%。第 14 天 hUC-MSCs 组创面愈合率为(91.54 ± 3.35)%,PBS 组创面愈合率为(79.66 ± 4.99)%。hUC-MSCs 创面愈合率在各时间点均明显高于 PBS 组创面愈合率,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

2.5　hUC-MSCs 对皮肤创面组织学的影响

HE 染色显示术后第 3 天时 hUC-MSCs 组创面新生肉芽组织较厚且可见大量成纤维细胞,而 PBS 组新生肉芽组织较薄且成纤维细胞较 hUC-MSCs 组少。第 7 天时 hUC-MSCs 组可见较多微血管增生,肉芽组织进一步增厚,而 PBS 组微血管密度相对较小。第 14 天时 hUC-MSCs 组创面新生表皮相对较厚且分层清楚,毛囊增生较活跃,成纤维细胞逐渐减少;而 PBS 组创面新生表皮相对较薄且层次不甚清楚,毛囊增生较不活跃,仍有较多成纤维细胞浸润(图 3)。

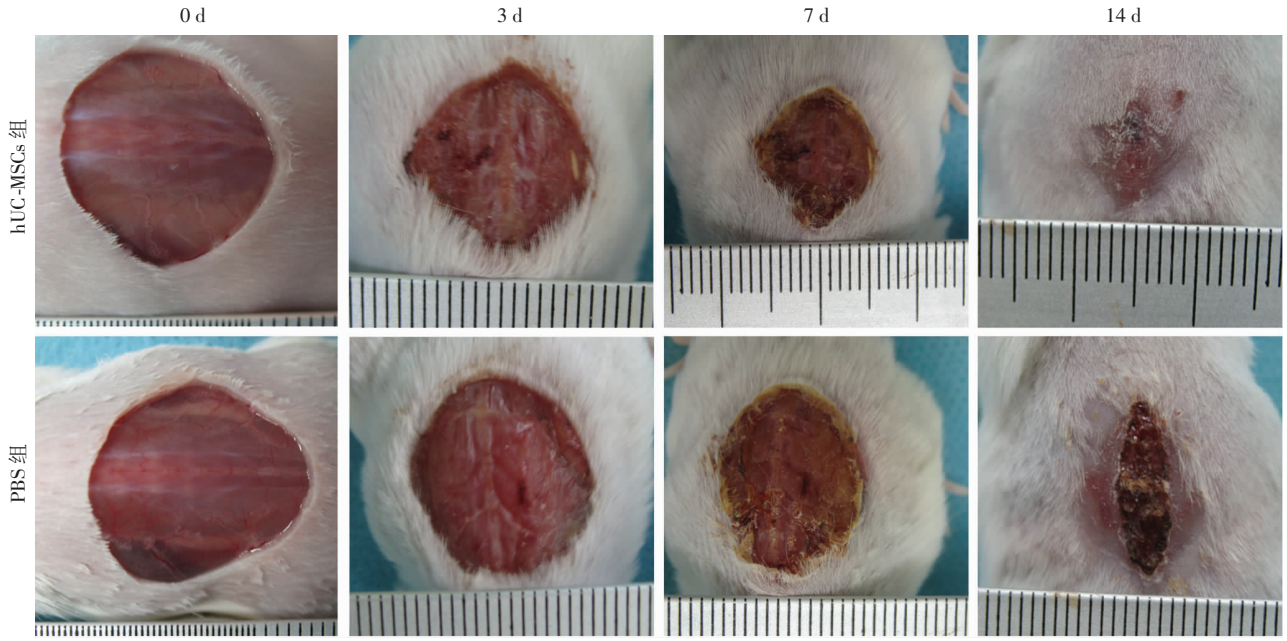


图 2　术后不同时间各组小鼠皮肤创面愈合情况

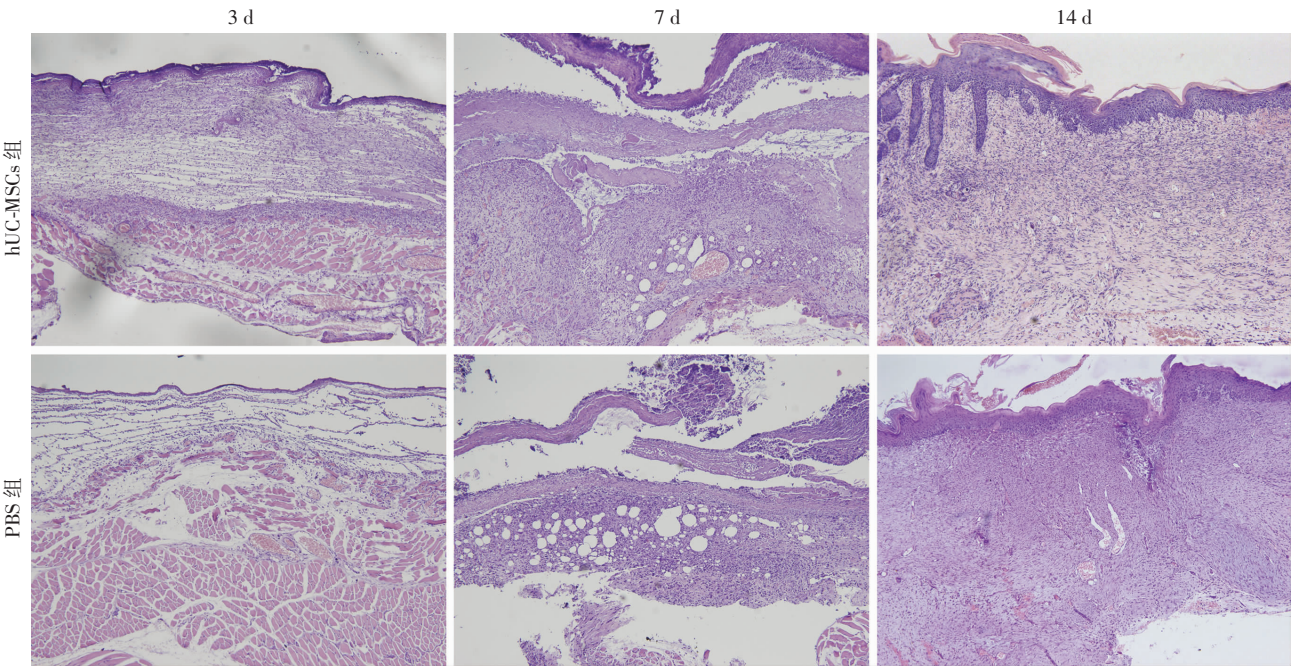


图 3　术后不同时间各组小鼠皮肤创面组织学观察　(HE ×100)

2.6　hUC-MSCs 对皮肤创面 VEGF 表达的影响

免疫组化显示显示小鼠正常皮肤组织中 VEGF 主要表达于少数成纤维细胞及表皮细胞,呈弱阳性表达。伤后创面新生皮肤组织 VEGF 阳性细胞数明显增多,3 d 时 VEGF 主要表达于单核-巨噬细胞,7 d 时 VEGF 主要表达于血管内皮细胞以及新生表皮基底细胞,14 d 时 VEGF 主要表达于表皮基底细胞。伤后 3、7、14 d 创缘处 VEGF 持续阳性表达于表皮基底细胞,3、7 d 阳性细胞较多,14 d 时阳性细胞逐渐减少。hUC-MSCs 组创面新生皮肤组织及创缘处 VEGF 的表达在各时间点均较 PBS 组增多(图 4)。

Western blot 检测显示,hUC-MSCs 组和 PBS 组创面 VEGF 蛋白表达均在第 3 天表达较高,第 7、14 天逐渐降低。hUC-MSCs 组各时间点 VEGF 蛋白表达水平均高于 PBS 组,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5)。

3　讨论

创面修复是一个复杂而有序的生物学过程,包括止血期、炎症期、增生期、重塑期等连续的过程,涉及多种细胞、细胞因子、生长因子的参与和相互协调[8]。而组织缺氧、坏死、感染及高龄等因素可使创面延迟愈合或难以愈合,因此要达到解剖重建和功能修复仍是

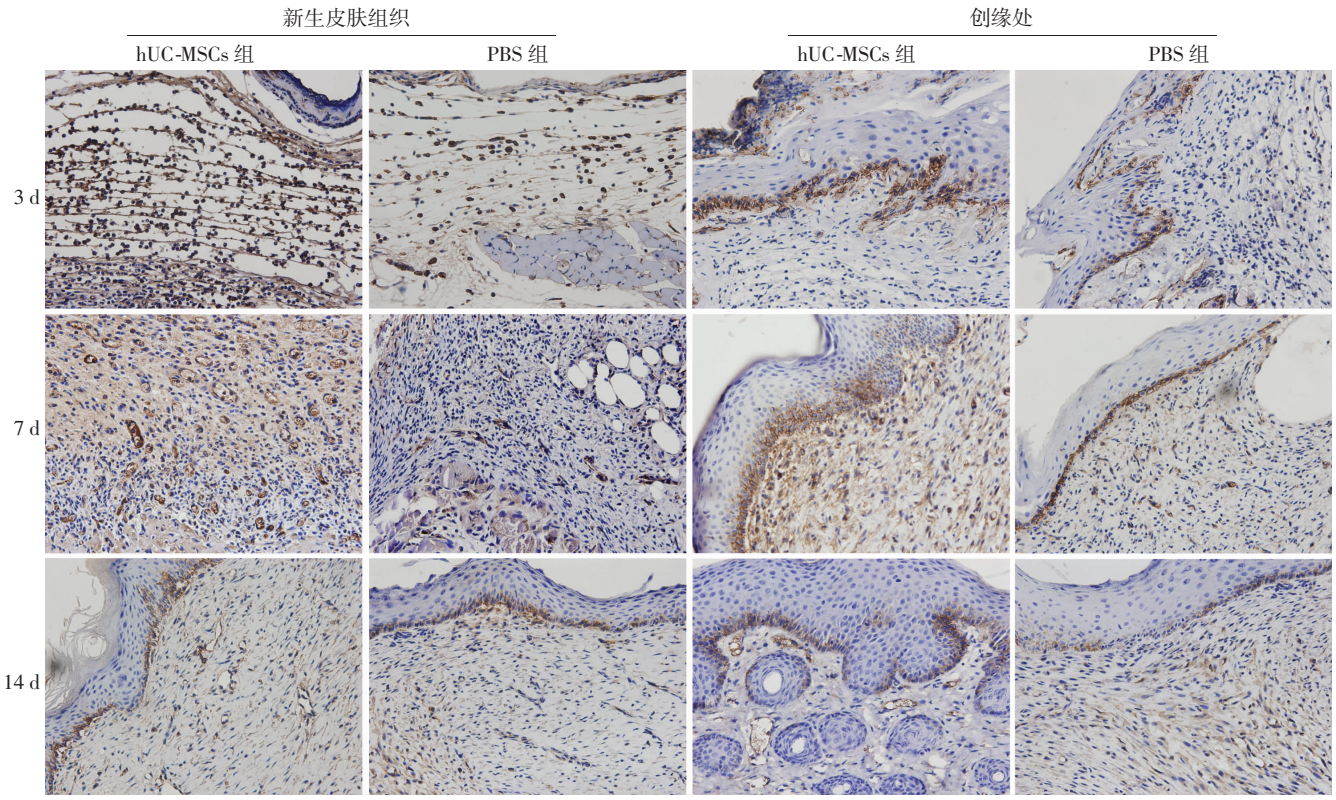
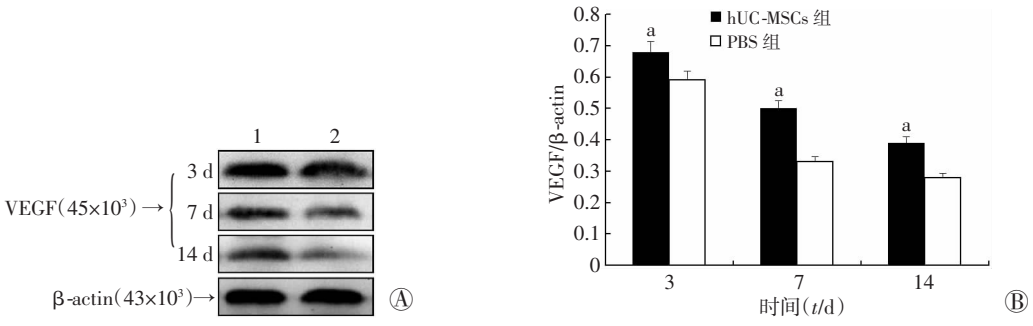


图 4　术后不同时间各组小鼠皮肤创面新生皮肤组织及创缘处 VEGF 的表达　(PV 二步法　×400)



A:Western blot 检测　1:hUC-MSC 组,2:PBS 组;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 PBS 组比较

图 5　Western blot 检测术后不同时间各组小鼠皮肤创面 VEGF 蛋白表达

组织修复领域需要解决的一大难题[9]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是广泛存在于骨髓、滑膜、脂肪、脐带、脐血等组织的一类成体干细胞,具有强大的多向分化潜能,可分化为软骨细胞、骨细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、角质细胞及脂肪细胞等[10-11]。近年来,随着对 MSCs 研究的深入,发现 MSCs 可向受损组织中迁移并参与损伤组织的修复再生,其机制可能与 MSCs 的增殖、多向分化、旁分泌细胞因子、免疫调节及抗炎等作用有关[12-13]。

hUC-MSCs 来源于胎儿分娩后的废弃物,来源广泛、易于分离、含量丰富、不受伦理道德及法律的限制[14]。本实验采用组织块贴壁法分离培养 hUC-MSCs,原代培养 10 d 后可见组织块周围密集分布大量梭形、多角形的贴壁细胞,连续传代培养细胞形态不发生明显变化。经流式细胞术检测显示 hUC-MSCs 高表达 CD29、CD44、CD90,阴性表达 CD34、CD45,且体外能诱导向成骨、成脂细胞方向分化,与文献报道一致[2]。后期通过建立小鼠皮肤损伤创面模型,以局部注射的方式将 hUC-MSCs 移植入小鼠皮肤创面,结果显示 hUC-MSCs 组创面愈合速度更快,创面愈合率明显增高。表明局部注射移植 hUC-MSCs 能够加快创面愈合速度,提高创面愈合率,促进损伤创面的修复。

VEGF 是血管内皮细胞的有丝分裂原,被认为是体内最强的血管生成因子,具有诱导内皮细胞增殖、迁移,促进血管生成的作用,与创面愈合密切相关[15-16]。VEGF 在正常皮肤组织中呈低表达状态,组织损伤后 VEGF 即反应性升高,随着创面愈合过程的进展,VEGF 水平又逐渐降低,直至恢复到正常水平[17]。研究发现,当 VEGF 的表达水平升高时,肉芽组织形成发生,表明 VEGF 可通过增加肉芽组织的形成促进创面愈合[18]。本研究中病理观察 PBS 组伤后 3 d 皮肤创面新生肉芽组织较薄,免疫组化检测 VEGF 主要表达于创面单核-巨噬细胞,Western blot 显示 VEGF 表示水平达高峰。而伤后 7 d 病理观察发现创面肉芽组织增厚且有大量新生血管形成,表明 VEGF 可能促进了创面愈合过程中肉芽组织形成和血管新生。伤后 7 d 创面组织免疫组化及 Western blot 检测发现 VEGF 主要表达于血管内皮细胞,表达量较 3 d 有所降低,表明血管内皮细胞也可通过自分泌 VEGF 从而维持创面的血管化。14 d 时创面趋于完全愈合,病理观察发现创面新生表皮逐渐覆盖创面,VEGF 主要表达于表皮基底细胞,且表达量达最低。而在创缘处 VEGF 持续阳性表达于表皮细胞,因此 VEGF 可能与创面的再上皮化以及表皮的重建有关。本研究结果与文献报道基本一致[19]。hUC-MSCs 组在 3、7 d 和 14 d 创面病理学观察情况均较 PBS 组好,且在不同时间点创面 VEGF 的表达均较 PBS 组增高,提示 hUC-MSCs 可能通过增强创面 VEGF 的表达从而促进皮肤创面的愈合,但其具体机制仍有待进一步研究。

综上所述,本实验结果表明 hUC-MSCs 局部注射治疗能加快创面愈合速度,提高创面愈合率和愈合质量,促进皮肤创面的愈合,并增强创面 VEGF 的表达。初步证实 hUC-MSCs 对皮肤创面的治疗作用,为 hUC-MSCs 用于皮肤创面的修复提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] Li X, Bai J, Ji X, *et al*. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(3): 695-704. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1821

[2] Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, *et al*. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord[J]. Cell Biol Int, 2008,32(7): 724-732. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.02.002

[3] Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury[J]. Am J Pathol, 2009, 175(1): 303-313. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080629

[4] Du T, Zou X, Cheng J, *et al*. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3): 59. DOI: 10.1186/scrt215

[5] Burra P, Arcidiacono D, Bizzaro D, *et al*. Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury[J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12: 88. DOI: 10.1186/1471-230X-12-88

[6] Hu S L, Luo H S, Li J T, *et al*. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. Crit Care Med, 2010, 38(11): 2181-2189. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181f17c0e

[7] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, *et al*. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing[J]. J Surg Res, 2009, 153(2): 347-358. DOI: 10.1016/j.jss.2008.04.023

[8] Sun B K, Siprashvili Z, Khavari P A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds[J]. Science, 2014, 346(6212): 941 - 945. DOI: 10.1126/science.1253836

[9] Guo S, Dipietro L A. Factors affecting wound healing[J]. J Dent Res, 2010, 89(3): 219 - 229. DOI: 10.1177/0022034509359125

[10] Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4): 568 - 584. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.11.001

[11] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[12] Hocking A M, Gibran N S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(14): 2213 - 2219. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.05.009

[13] Liu L, Yu Y, Hou Y, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88348. DOI: 10.1371/journal.pone.0088348

[14] Fan C G, Zhang Q J, Zhou J R. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord [J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 195 - 207. DOI: 10.1007/s12015-010-9168-8

[15] Hoeben A, Landuyt B, Highley M S, *et al*. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. Pharmacol Rev, 2004,56(4): 549 - 580. DOI: 10.1124/pr.56.4.3

[16] Brogi E, Schatteman G, Wu T, *et al*. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression[J]. J Clin Invest, 1996, 97(2): 469 - 476. DOI: 10.1172/JCI118437

[17] 夏鹏, 童文祥, 喻永敏,等. 大鼠皮肤切创愈合过程中VEGF,TGF-β1 蛋白的表达[J]. 重庆医科大学学报, 2010,35(8): 1167 - 1171.

[18] Frank S, Hübner G, Breier G, *et al*. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing [J]. J Biol Chem, 1995, 270(21): 12607 - 12613.

[19] Nogami M, Hoshi T, Kinoshita M, *et al*. Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound[J]. Med Mol Morphol, 2007, 40(2): 82 - 87. DOI: 10.1007/s00795-007-0357-8

(**收稿**:2015-07-14;**修回**:2015-09-13)

(编辑 张 维)