

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00259

两种促进烫伤小鼠愈合的融合肽

方 晨, 郭葆玉*

第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**观察设计合成的两种融合肽对小鼠烫伤的疗效。**方法:**针对烫伤经历炎症反应、感染、而后细胞增殖修复的特点,选择相应的氨基酸序列人工合成两种融合肽 M-T α 1 和 M-T508,将其应用于深 II 度烫伤的小鼠模型上,观察愈合情况。同时,为了在微观领域证实愈合情况,选择了 6 个检测指标,包括:利用免疫组化方法检测烫伤皮肤组织中 I 型胶原、血管内皮生长因子(VEGF)、增殖细胞核抗原(PCNA)和细胞角蛋白(CK)的表达;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测烫伤小鼠血清中 TNF- α 的含量变化和伊文思蓝(Evans blue)染色检测烫伤皮肤组织中血管通透性的改变。**结果:**两组用药组比对照组创伤愈合时间提前 1 周左右;免疫组化结果显示两组用药组第 10 天 I 型胶原、VEGF、PCNA 和 CK 都呈阳性表达,而同时相的对照组各个指标则是阴性结果。烫伤组织 TNF- α 的 ELISA 检测和血管通透性的 Evans blue 检测则印证了我们所合成的融合肽有抗炎、抗渗作用。**结论:**设计合成的两种融合肽对烫伤小鼠均有明显加快愈合的作用。

[关键词] 融合肽;电烧伤;伤口愈合;免疫组织化学

[中图分类号] R 644 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)03-0259-07

Two fusion peptides promote healing of scalded mice

FANG Chen, GUO Bao-yu*

Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the therapeutic effect of 2 artificially synthesized fusion peptides on scalded mice. **Methods:** Two new fusion peptides, M-T508 and M-T α 1, were synthesized based on amino acid sequences selected according to the characteristics of scald (including 3 stages: inflammation, infection and repair by cell proliferation). The 2 peptides were applied for second degree scald burn in mice and the healing of the scald burn was observed. The expression of I collagen, vascular endothelial growth factor (VEGF), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and cytokeratin (CK) was detected by immunohistochemical staining. Serum TNF- α concentration was determined by ELISA in the animals and the blood vessel permeability was analyzed by Evans blue staining. **Results:** The healing periods of scald burns in the 2 peptide groups were 1 week earlier than that in the control group. Immunohistochemical results showed that the expression of collagen I, VEGF, PCNA and CK was all positive in the 2 peptide groups 10 days after scald and negative in the control group. Examination of blood vessel permeability and serum TNF- α concentration in the M-T α 1 and M-T508 groups showed that the 2 fusion peptides had anti-inflammation and anti-infiltration effects in scalded mouse. **Conclusion:** The synthesized fusion peptide M-T α 1 and M-T508 can promote the healing of scald burns in mice.

[KEY WORDS] fusion peptides; electric burns; would healing; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3): 259-265]

烫伤是平时常见的外伤,其发生率约为外科住院患者的 3%~5%。烫伤不仅造成皮肤的毁损,而且会引起严重的全身性反应,尤其是大面积烫伤,全身反应甚为剧烈,可出现各系统器官的代谢紊乱和功能失调,称之为“烫伤病”。一般烫伤病程经历 3 个时期:休克期、急性感染期、修复期。各期有其不同的特点,但相互间联系紧密并有重叠,并非绝对的

截然分开。我国普遍采用三度四分法,即根据皮肤烫伤的深浅分为:浅 I 度、浅 II 度、深 II 度、III 度。烫伤治疗存在着创面疼痛、进行性坏死、易感染、瘢痕愈合等四大难题。治疗烧烫伤的药物亦是针对这四个问题进行研究的,分为中药和西药两大类,中药对烫伤的治疗作用在于抗菌、收敛、生肌、清热、消肿和止痛等药用疗效;而西药在于消炎、抗感染、生肌、促

[收稿日期] 2007-09-06 **[接受日期]** 2007-10-23

[作者简介] 方 晨, 硕士生. E-mail: www.fran_chen@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070398. E-mail: byguo1632000@yahoo.com.cn

进伤口愈合和促进上皮生长等。目前较多应用抗生素类药物来预防治疗烫伤创面感染、消炎和抗菌^[1]。

随着现代科技的发展,人们越来越多地关注开发和发展多肽作为治疗疾病的药物。因其是最符合人体生物学调节规律的治疗手段,可以避免许多其他类型药物给人体带来的不良反应,药用多肽和诊断多肽试剂已引起人们的高度重视。于是我们受到启发,综合考虑:(1)TP508 促进胶原在创基聚集以及加速创面血管化、表皮细胞的增生和移行,从而加速切口和创面的愈合过程^[2]。(2) $T\alpha 1$ 具有刺激血管内皮细胞迁移,促进血管生成和伤口愈合等作用^[3]。(3)MCD 肽通过降低毛细血管通透性、阻止白细胞游走及抑制前列腺素 E2 的合成等作用来起到抗炎作用^[4],挑选它们的氨基酸序列合成 2 种融合肽 M- $T\alpha 1$ 和 M-T508,期望其能对烫伤起到加快创面愈合的疗效。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

鼠抗人细胞角蛋白(CK)单克隆抗体、鼠抗增殖细胞核抗原(PCNA)购自丹麦 Dako 公司,鼠抗人血管内皮细胞生长因子(VEGF)购自美国 Santa Cruz Biotechnology Inc, I 型胶原购自美国 Zmyde 公司, DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,免疫组化的二抗试剂盒购自华美生物工程公司,小鼠 TNF- α 定量 ELISA 试剂盒购自上海博光生物科技有限公司,伊文思蓝、重铬酸钾、无水乙醇购自上海振兴化工一厂,浓硫酸、甲醛、丙酮、柠檬酸、柠檬酸三钠、二甲苯购自上海试剂一厂,磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠购自上海新华化工厂,其余常用试剂为国产分析纯市售商品。主要实验仪器包括:3.9 mm \times 150 mm 的 C_{18} 柱(Symmetry 公司),Waters600 泵、Waters2487 检测器及 HS(V4.0)色谱数据工作站处理数据(Waters 公司,美国)。Wellscan MK3 型酶联免疫检测仪(Labsystems Dragon 公司),CS101-2A 型电热干烤箱(重庆银河实验仪器公司),BM-III 组织包埋机(湖北省医用电子仪器厂),2045 石蜡切片机(德国 Leica 公司),光学显微镜、成像系统、摄像系统(奥林巴斯公司),-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱(REVCO 公司),721 分光光度计(上海圣科仪器设备有限公司)。

1.2 两种烫伤融合肽的合成与分离纯化

由吉尔生化有限责任公司分别合成肽粗品 M- $T\alpha 1$ 和 M-T508,将合成的 2 种融合肽粗品分别溶于 10 ml 无菌 Milli-Q 水中,分 2 ml 依次进样进行 HPLC 纯化。流动相 A 是含 0.1% 三氟乙酸(TFA)的 Milli-Q 水,流动相 B 是含 0.1% 三氟乙酸(TFA)的乙腈。用流

动相 A 将体系平衡后,在 35 min 内以 1 ml/min 的流速线性梯度洗脱,收集活性峰成分,将各个活性峰收集液混匀,每管 2 ml 分装,冷冻干燥后即得融合肽样品。

1.3 烫伤小鼠动物模型的制备及动物分组

健康昆明种小鼠 90 只(第二军医大学实验动物中心提供),雌雄各半,体质量 20~25 g,随机分为空白对照组(组 I, $n=30$)、M- $T\alpha 1$ 组(组 II, $n=30$)和 M-T508 组(组 III, $n=30$)。致伤前小鼠背部约 2 cm \times 3 cm 面积的区域剪毛,生理盐水清洗后,涂抹脱毛剂脱毛,饲养 24 h。烫伤前乙醚轻度麻醉 2~3 min,恒温恒压电烫仪(80 \pm 2) $^{\circ}$ C,10 s,在小鼠背部皮肤建立直径为 2.5 cm 的深 II 度烫伤模型。清创后,即日起分别于各组小鼠创面涂抹受试药物:组 I 涂抹生理盐水 100 μ l/只;组 II 涂抹 500 μ g M- $T\alpha 1$ /只;组 III 涂抹 500 μ g M-T508/只;每天 1 次,连续给药 21 d,记录伤口的反应情况。

1.4 创伤皮肤组织石蜡切片的制备

在烫伤后 1、3、5、7、10、14 和 21 d,将烫伤小鼠每组取 2 只拉颈处死,剪下创面皮肤浸入 10% 甲醛 PBS 溶液中固定 72 h 待用。载玻片及盖玻片置于酸性溶液中浸泡 24 h,蒸馏水冲洗,烤箱烘干,载玻片上涂上多聚赖氨酸阴干备用。前述经 10% 甲醛 PBS 溶液固定后的烫伤皮肤组织,由石蜡包埋,记录编号。在石蜡切片机上切片,直径约为 4 μ m,每个标本切片 8 张。

1.5 免疫组化及 H-E 染色

将以上各组石蜡切片:过氧化物酶的检测后,PBS 洗涤,5 min \times 4 次;常规 ABC 法染色;蒸馏水充分洗涤终止反应;脱水、透明、中性树脂封片,H-E 染色观察组织形态。

常规石蜡切片脱蜡至水,PBS 洗涤 3 min \times 3 次;滴加 1 滴 0.3% H_2O_2 于切片上,室温反应 20 min,用 PBS 洗 3 min \times 3 次;浸入 0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸缓冲液 100 $^{\circ}$ C 10 min 抗原修复;滴加 1 滴 Ultra V block 于切片上,室温反应 5 min,PBS 洗 3 min \times 3 次;分别滴加工作浓度的鼠抗人 CK、鼠抗 PCNA、鼠抗 VEGF、I 型胶原抗体溶液各 1 滴,37 $^{\circ}$ C,1 h,PBS 洗 3 min \times 3 次;滴加 1 滴生物素化羊抗鼠 IgG 溶液,37 $^{\circ}$ C,0.5 h,用 PBS 洗 3 min \times 3 次;加 Streptavidin-HRP,37 $^{\circ}$ C,0.5 h, PBS 洗 3 min \times 4 次;DAB 染色;树脂封片,显微镜下镜检观察免疫组化结果。

1.6 ELISA 检测烫伤小鼠血清中 TNF- α 的含量

在烫伤后 1、3、5、7、10、14 和 21 d,将各组烫伤小鼠每组取 2 只,摘右眼球取血 2 ml,将所取全血标本于室温下静置 1 h,499.5 \times g,10 min,吸取上层血清收

集,置-80℃低温冰箱保存。按小鼠 TNF- α 定量 ELISA 试剂盒说明书操作,于 492 nm 处测 D 值。

1.7 伊文思蓝检测烫伤皮肤组织中血管通透性
在烫伤后 1、3、5、7、10、14 和 21 d,将各组烫伤小鼠每组取 2 只根据 0.1 ml/10 g 尾静脉注射 1%伊文思蓝溶液,30 min 后,小鼠脱颈椎致死,用直径 1.2 cm 打孔器取下等面积背部创伤蓝染皮肤,剪碎浸入 7:3 的丙酮生理盐水溶液 5 ml,24 h,499.5 \times g,10 min,取上清液在 610 nm 处测定光密度 D 值。

2 结果

2.1 2 种烫伤融合肽的分离纯化 人工合成的融合肽 M-T α 1 和 M-T508 纯度不高,通过 HPLC 将其进一步纯化,利用 HS(V4.0)色谱数据工作站提供的实时检测曲线观察样品色谱峰保留时间,收集洗出液并于峰值下降结束前停止收集,分装、冷冻干燥,得到纯度分别 99.6%和 99.4%的分离物,经质谱分析其相对分子质量 $M_w = 5\ 868.75$ 和 $M_w = 5\ 281.34$ 分别与理论相对分子质量 5 868.70 和 5 281.30 基本吻合(图 1、图 2)。

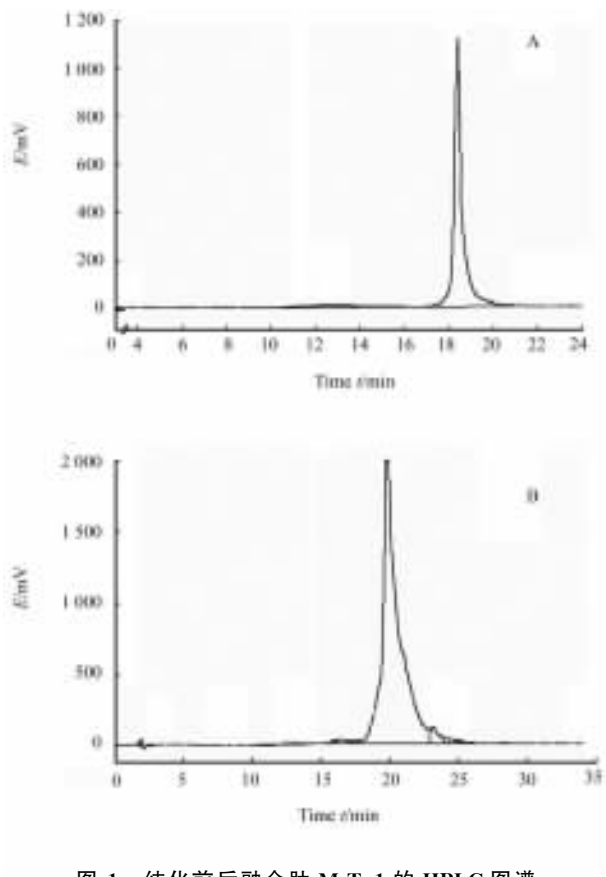


图 1 纯化前后融合肽 M-T α 1 的 HPLC 图谱
Fig 1 HPLC spectrum of synthetic peptide M-T α 1
A: Purified M-T α 1; B: Crude M-T α 1

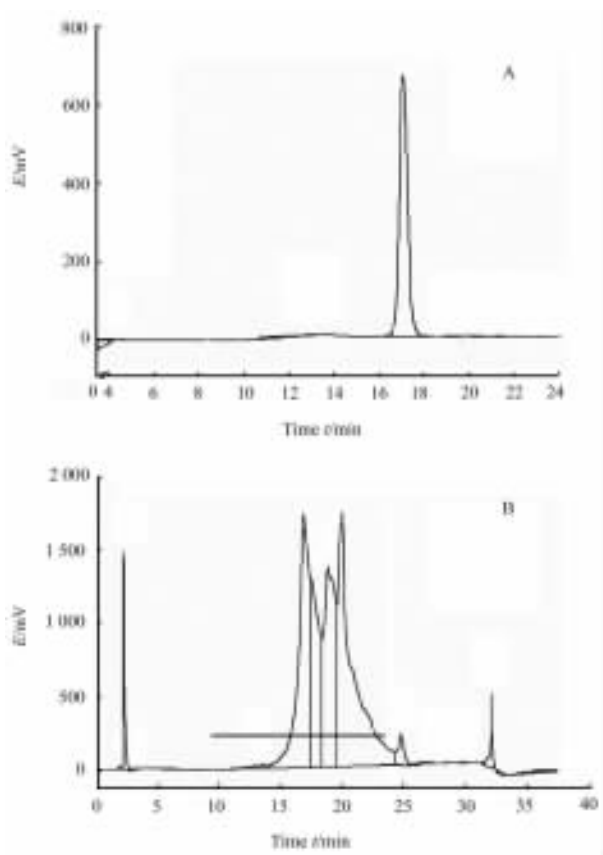


图 2 纯化前后融合肽 M-T508 的 HPLC 图谱
Fig 2 HPLC spectrum of synthetic peptide M-T508
A: Purified M-T508; B: Crude M-T508

2.2 H-E 染色及免疫组化结果分析 皮肤从外到内是由表皮、真皮和皮下组织三层构成,皮肤烫伤的深浅可分为浅 I 度、浅 II 度、深 II 度、III 度。图 3A 可以看到烫伤已经深至真皮网状层,可以大体判断为深 II 度烫伤。其特点是除表皮、全部真皮乳头层烧毁外,还伤及真皮网状层,但位于真皮深层的毛囊及汗腺等皮肤附件深部结构仍健在。水疱皮破裂或去除腐皮后,创面呈白中透红,红白相间或可见细小栓塞的血管网,创面渗出多、水肿明显,由于神经末梢部分被毁导致痛觉迟钝。镜下见坏死的真皮胶原纤维肿胀、融合,原纤维结构消失;有些附件轮廓尚能辨认;痂下组织明显充血、水肿;在坏死层和存活组织之间有白细胞浸润带,伤后 12 h 出现,此后日趋明显(图 3B)。

烫伤组织 M-T α 1 组和 M-T508 组第 14 天创面愈合 H-E 染色。创面愈合需要经过坏死组织清除、脱落或痂皮下愈合等过程,由残存的毛囊、汗腺等附属器的上皮细胞逐步生长使创面上皮化,一般需要

18~24 d左右。而本实验用药后 14 d 烫伤创面已经愈合,表皮组织细胞修复,细胞组织形态恢复接近正常,深层细胞边界清楚,接近正常皮肤形态(图 4A、4B)。未用药组第 14 天创面恢复期的 H-E 染

色与前面用药组相比,其愈合进程比较慢,皮肤形成薄的表皮层,伴有结缔组织少量肉芽生成,深层皮肤组织有血管增生,开始向正常皮肤的细胞结构改变,深层细胞坏死变性也相对变少(图 4C)。

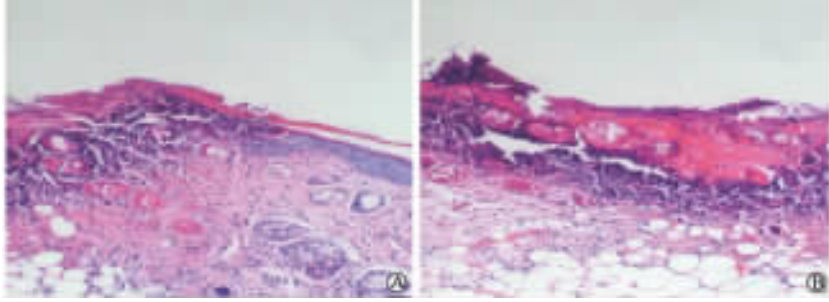


图 3 烫伤皮肤组织 H-E 染色

Fig 3 H-E staining of scald skin tissue

A: The boundary of scald skin and normal skin; B: The panorama of deep II degree scald skin. Original magnification: ×100



图 4 烫伤皮肤组织第 14 天恢复 H-E 染色

Fig 4 H-E staining of scald skin tissue after 14 days

A: M-T α 1 group; B: M-T508 group; C: Comparison group. Original magnification: ×100

烫伤组织第 10 天 M-T α 1 组和 M-T508 组 I 型胶原免疫组化图可见,两组用药组都出现了成纤维细胞

呈棕黄色, I 型胶原的阳性表达(图 5A、5B); 烫伤组织未用药组 I 型胶原免疫组化为阴性结果(图 5C)。

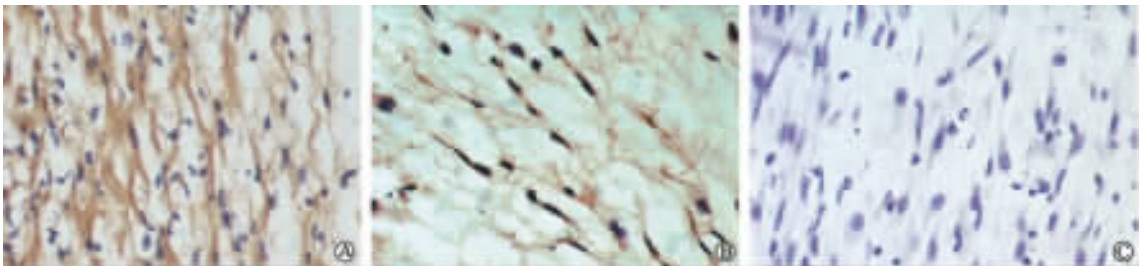


图 5 烫伤皮肤组织第 10 天 I 型胶原免疫组化

Fig 5 Immunohistochemical staining of I collagen in scald skin after 10 days

A: M-T α 1 group; B: M-T508 group; C: Comparison group. Original magnification: ×400

烫伤组织第 10 天 M-T α 1 组和 M-T508 组 VEGF 免疫组化图可见,新生血管的 VEGF 阳性表

达(图 6A、6B);烫伤组织未用药组为阴性结果(图 6C)。

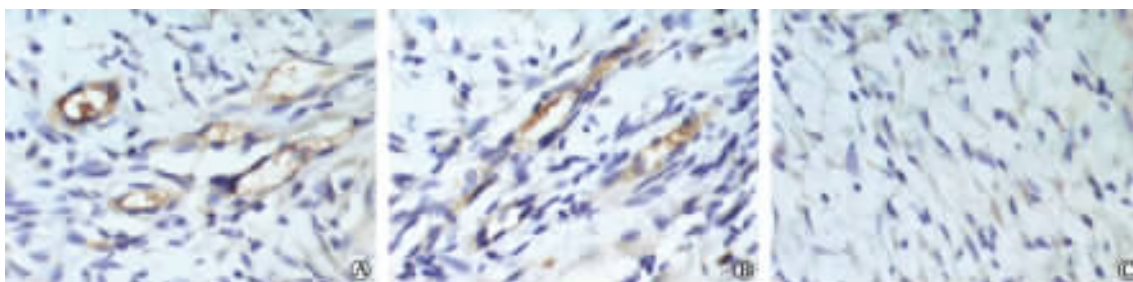


图 6 烫伤皮肤组织第 10 天 VEGF 免疫组化

Fig 6 Immunohistochemical staining of VEGF in scald skin after 10 days

A: M-T α 1 group; B: M-T508 group; C: Comparison group. Original magnification: $\times 400$

PCNA 免疫组织化学常作为细胞增殖参数, PCNA 阳性细胞为核着色,呈棕黄色偏心分布,弥漫性细胞质染色见于有丝分裂期或血管内皮细胞。烫

伤组织第 10 天 M-T α 1 组和 M-T508 组 PCNA 免疫组化图可见 PCNA 阳性表达(图 7A、7B)。烫伤组织未用药组 PCNA 免疫组化图为阴性(图 7C)。

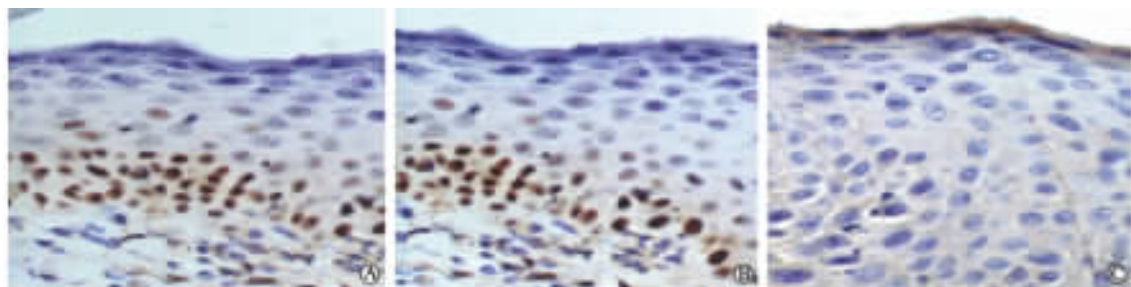


图 7 烫伤皮肤组织第 10 天 PCNA 免疫组化

Fig 7 Immunohistochemical staining of PCNA in scald skin after 10 days

A: M-T α 1 group; B: M-T508 group; C: Comparison group. Original magnification: $\times 400$

CK 阳性是胞质型,即阳性颗粒主要分布于细胞质,通常表现为弥散性分布,烫伤组织第 10 天 M-T α 1 组和 M-T508 组 CK 免疫组化图可见 CK 阳性

表达(图 8A、8B)。烫伤组织未用药组 CK 免疫组化图为阴性(图 8C)。

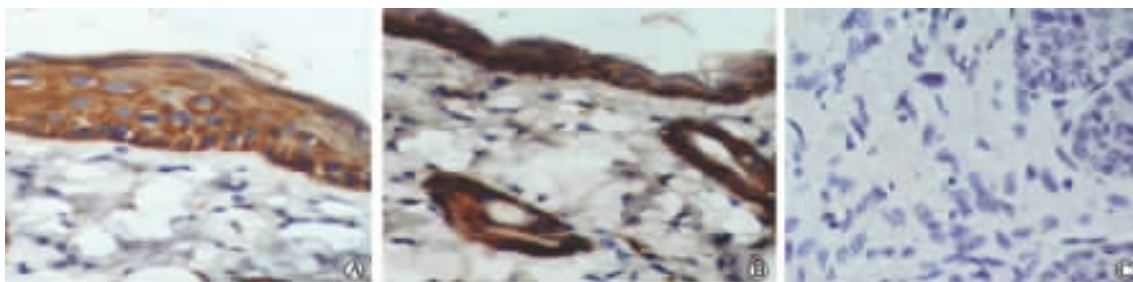


图 8 烫伤皮肤组织第 10 天 CK 免疫组化

Fig 8 Immunohistochemical staining of CK in scald skin after 10 days

A: M-T α 1 group; B: M-T508 group; C: Comparison group. Original magnification: $\times 400$

2.3 ELISA 检测烫伤小鼠血清中 TNF-α 的含量

图 9 可见融合肽 M-Tα1 组和 M-T508 组在组织恢复早期第 1~3 天 TNF-α 浓度有所上升,第 5 天 TNF-α 浓度有明显的下降,说明烫伤始期炎症反应强烈,但在 M-Tα1 和 M-T508 作用下表现为缓慢下降,表明 M-Tα1 和 M-T508 对烫伤组织炎症反应有抑制作用。而未用药组所测 TNF-α 浓度在烫伤早期持续上升,直到 1 周后才开始缓慢的下降,这在愈合时相上落后于用药组。与对照组自然愈合相比, M-Tα1 和 M-T508 在烫伤组织中起到抗炎的作用,对提前创面的愈合时间有所帮助。

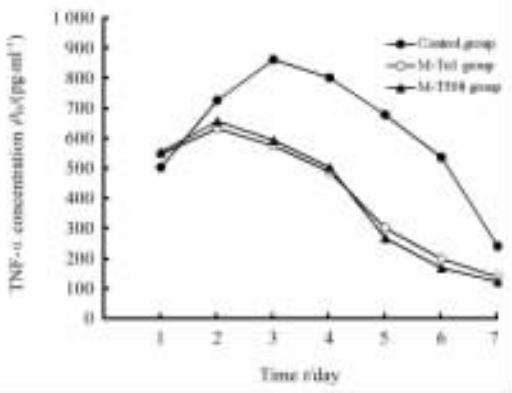


图 9 ELISA 检测烫伤小鼠血清中 TNF-α 含量的动态变化
Fig 9 ELISA examination of change of serum TNF-α concentrations in scalded mice

2.4 伊文思蓝检测烫伤皮肤组织中血管通透性

根据伊文思蓝能在血液内与白蛋白结合,循环到各脏器,从毛细血管渗透到组织间,可通过染料透过的量间接判定血管的通透性,而染料透过量与 610 nm 处测定的光密度 D 值成正比。由所测 D 值与测定时间绘制成曲线,可反映烫伤皮肤组织中血管通透性的动态变化趋势(图 10)。

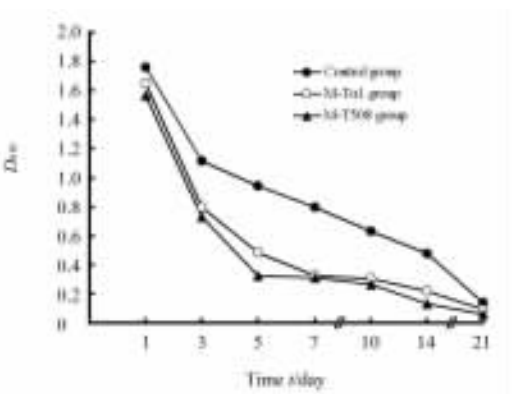


图 10 伊文思蓝检测烫伤皮肤组织中血管通透性动态变化趋势

Fig 10 Evans blue staining for dynamic change of blood vessel permeability in scalded mice

可以看到融合肽 M-Tα1 组和 M-T508 组在组织恢复早期 D 值有明显的大幅度下降,表明 M-Tα1 和 M-T508 对烫伤组织血管通透性有较明显的抑制作用,而未用药组所测 D 值则相对缓慢平滑的改变。在第 14 天 M-Tα1 组和 M-T508 组的烫伤小鼠创面已经愈合,其 D 值一直延续到第 21 天都浮动地很小;而未用药对照组的 D 值在第 14~21 天之间仍持续下降,直到第 21 天才与 M-Tα1 组和 M-T508 组趋于接近。与对照组自然愈合相比, M-Tα1 组和 M-T508 组确实能加快烫伤创面的愈合。而伊文思蓝的检测结果表明融合肽 M-Tα1 和 M-T508 具有降低毛细血管通透性的作用,在烫伤过程中可以抗渗,帮助提前愈合时间。

3 讨论

烫伤创面的修复是一个很复杂的过程,它经过互相交错的 3 个时期,即炎症期、增生期和重建期。伤后 3 d 内的炎症期血小板的裂解除了起凝血与止血作用外,还生成血小板活性因子(PAF)及血小板衍化生长因子(PDGF);同时有粒细胞和巨噬细胞的趋化作用;粒细胞还能分泌各种酶,如中性蛋白酶、弹力酶等。当创面上有病原菌和酶存在时,由于组织细胞裂解加重了创面的炎症反应,并有炎性分泌物渗出^[5]。此后,无论有无明显感染,创面要进入肉芽组织形成的增生期。此时,有大量新生的微血管组织、纤维细胞、肌纤维细胞、巨细胞、组织细胞等游移。同时血管壁在细胞因子激发下增加了渗透性,因而白蛋白、纤维蛋白进入细胞外间隙引发创面水肿,同时也促使细胞分裂增殖形成肉芽创面。增殖期的长短视个体病情差异而定,一般在 2 周左右。第三期的组织重建与修复,表现为皮肤上皮再生和真皮结缔组织形成。其主要成分为胶原纤维、弹力纤维和蛋白质和多糖结合的大分子物质的基质。

依据烫伤创面愈合主要包括炎症反应、细胞增殖、结缔组织形成、创面收缩和创面重新塑造等过程,我们选择 I 型胶原、血管内皮生长因子、增殖细胞核抗原、细胞角蛋白的免疫组化,酶联免疫吸附试验检测烫伤小鼠血清中 TNF-α 的含量和伊文思蓝检测烫伤皮肤组织中血管通透性这几个指标来证明我们合成的融合肽的效果。创面愈合首先表现为局部炎症反应,炎性细胞引起的炎症反应不仅为清除坏死组织和异物所必需,且同时分泌各种细胞因子,

参与细胞分化和增殖过程,启动和调控创面修复。实验中,酶联免疫吸附试验检测烫伤小鼠血清中的TNF- α 的含量和伊文思蓝检测烫伤皮肤组织中血管通透性这2个指标测试了融合肽中MCD肽序列的抗炎作用和降低血管通透性来抗渗、抗休克的作用。抗炎、抗渗本身也是有利于帮助创面愈合的,实验结果也显示出融合肽确实有这样作用,其与加快创面愈合时间及免疫组化结果都呈现一致性。其次是细胞增殖,细胞增殖主要为成纤维细胞和表皮细胞的增殖,是烫伤愈合过程关键环节。

皮肤成分中有70%是由胶原蛋白组成,皮肤和各种软组织或器官的间质中同时含有I型胶原和III型胶原,真皮层大部分由胶原蛋白及弹性蛋白(elastin)等组成^[6]。正常皮肤组织中以I型胶原为主,在组织损伤后的修复过程中,早期以III型胶原为主,而I型胶原的增多标志着后期创伤恢复的逐步成熟。

血管内皮生长因子是一种特异性作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,能诱导新生血管形成,而新生血管形成反映了烫伤创面的修复^[7]。PCNA是诱导和参与DNA合成的物质,处于增殖状态的细胞可表达PCNA。PCNA高表达提示细胞增殖旺盛^[8]。细胞角蛋白是一个多基因家族,主要在上皮细胞表达。皮肤中主要是存在于表皮层,正常附属器结构包括大小汗腺和毛囊外根鞘中也表达特异性角蛋白亚型^[9]。这些指标都是检验损伤愈合的有利证明。

本实验中,经M-T α 1和M-T508治疗的烫伤小鼠比对照组自然愈合的小鼠创面愈合时间有明显提前。对照组在21d后自然愈合,而两个用药组在14d已经愈合。同时用药组I型胶原、VEGF、PCNA、CK的免疫组化结果也显示出阳性,表明创面愈合所需的条件都在逐步成熟,而同一时相的对照组的免疫组化结果呈阴性,预示着机体还在适应烫伤刺激所造成的损害,没有进入创面恢复期,这样就在时

间上拖后了创面愈合。

于是我们得出结论:本实验中融合肽M-T α 1和M-T508确实加快了小鼠深II度烫伤愈合的进程。这对于寻找治疗烫伤新型药物提供了新的思路,也拓宽了多肽药物治疗疾病的范围。希望这对于多肽的应用和烫伤治疗的深入了解都能提供一个新的视角。

[参考文献]

- [1] 王艳玲,黄力强. 烧烫伤药物的研究进展[J]. 中华中西医杂志, 2006,7:107-109.
- [2] Ryaby J T, Sheller M R, Levine B P, Bramlet D G, Ladd A L, Garney D H. Thrombin peptide TP508 stimulates cellular events leading to angiogenesis, revascularization, and repair of dermal and musculoskeletal tissues[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006,88(Suppl 3):132-139.
- [3] Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Bonifazi P, Zelante T, De Luca A, et al. Provision of antifungal immunity and concomitant alloantigen tolerization by conditioned dendritic cells in experimental hematopoietic transplantation[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008,40:55-62.
- [4] Son D J, Lee J W, Lee Y H, Song H S, Lee C K, Hong J T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds[J]. Pharmacol Ther, 2007,115:246-270.
- [5] Moller D E. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of inulin resistance and type 2 diabetes[J]. Trends Endocrinol Metab, 2000,11:212-217.
- [6] 邓蔓菁,金岩,史俊南,何大为,聂鑫,董蕊. 胚胎面突外胚间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004,18:314-317.
- [7] Supp D M, Boyce S T. Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes[J]. J Burn Care Rehabil, 2002,23:10-20.
- [8] 葛霞,谢群,姚敏. P53、增殖细胞核抗原和 bcl-2 在皮肤外毛根鞘癌中的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2003,36:195-197.
- [9] Gho C G, Braun J E, Tilli C M, Neumann H A, Ramaekers F C. Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture[J]. Br J Dermatol, 2004,150:860-868.

[本文编辑] 尹茶