

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.015

rh-GH 在促进大鼠创面愈合中的作用研究 *

王克甲 李小强 韩 夫 计 鹏 胡大海[△]

(空军军医大学附属第一医院烧伤与皮肤外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:通过在大鼠背部创面周围局部注射 rh-GH(重组人生长激素, Recombinant Human Growth Hormone)来调控创面局部 GH(生长激素, Growth Factor)水平,观察 GH 在创面愈合中的作用,并对其可能机制进行进一步研究。**方法:**在 SD 大鼠背部制作创面,创周定期注射不同浓度 rh-GH,观察并分析创面愈合速度差异;选取 rh-GH 的最适浓度进行创周注射并定期取材,以 Western-Blot 检测创周组织中 GH 蛋白水平,并以 RT-PCR 检测创周组织中 EGF(表皮生长因子, Epidermal Growth Factor)、FGF(成纤维细胞生长因子, Fibroblast Growth Factor)、VEGF(血管内皮细胞生长因子, Vascular Endothelial Growth Factor)的表达变化。**结果:**三个注射不同剂量 rh-Gh 的实验组大鼠创面平均愈合时间由快到慢依次为 16.5 ± 1.5 天、 17.1 ± 2.9 天、 18.5 ± 1.5 天,与注射生理盐水的对照组平均愈合时间 21.7 ± 2.3 天相比均明显增快,差异有统计学意义($P < 0.05$)。创缘组织中 GH 的 Western-Blot 结果显示对照组 GH 水平在创面形成初期升高,但伤后 4 天开始 GH 表达水平即逐渐下降,而 rh-GH 注射组的 GH 水平在创面形成后逐渐升高,并维持 GH 在高表达水平。检测创周组织中 EGF、FGF、VEGF 的 RNA 转录水平,PCR 结果显示实验组各生长因子的基因转录水平在伤后 2 天起即明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**1.创伤初期创面周围组织中 GH 表达水平呈现一过性升高然后逐渐下降的过程;2.创面周围注射 rh-GH 可以提高组织中 GH 水平,并减少创面愈合时间;3.GH 可以提高皮肤组织中 EGF、FGF、VEGF 水平,间接促进创面上皮化,加快创面愈合。

关键词:创面愈合;生长激素;表皮生长因子;成纤维细胞生长因子;血管内皮细胞生长因子

中图分类号:R-33;R641 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1882-05

Research on the Role of rh-GH in Promoting Wound Healing in Rats*

WANG Ke-jia, LI Xiao-qiang, HAN Fu, JI Peng, HU Da-hai[△]

(Department of Burns and Cutaneous Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To control the level of GH in the wound area by injecting the rh-GH around the wound on the back of rats and to investigate the effects and the mechanisms of GH on wound healing. **Methods:** The wounds were made on the back of SD rats. Different concentrations of rh-GH were injected around the wounds periodically. The differences of wound healing rate were observed and analyzed to determine the optimum concentration of rh-GH. The tissue around the wound was collected for detection. The level of GH protein was analyzed by Western-Blot, and the EGF, FGF and VEGF expression were detected by RT-PCR. **Results:** The average healing time of wounds in three experimental groups with different doses of rh-Gh was 16.5 ± 1.5 days, 17.1 ± 2.9 days and 18.5 ± 1.5 days. Compared with the control group injected with normal saline, the healing rate of rh-GH group was significantly faster, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The Western-Blot of GH in wound edge tissue showed that the GH level of control group increased at the initial stage of wound, but began to decrease at 4 days after injury. The GH level of rh-GH group increased and maintained at a high stage gradually after injury. The RT-PCR results showed that the transcription level of EGF, FGF, VEGF in rh-GH group were significantly higher than that in the control group from 2 days after injury, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** 1). The expression of GH in the tissue around the wound in the early stage of trauma shows a transient increase and then a gradual decrease; 2). Injection of rh-GH around the wound can increase the level of GH in the tissue and reduce the wound healing time; 3). GH can improve the level of EGF, FGF and VEGF in skin tissue, indirectly promote wound epithelization and accelerate wound healing.

Key words: Wound healing; Growth factor; EGF; FGF; VEGF

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R641 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1882-05

前言

在临床上常见各种皮肤软组织损伤,主要包括外伤、手术等急性创面以及糖尿病足、褥疮等慢性创面。创面愈合包含多

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81501684)

作者简介:王克甲(1986-),本科,主治医师,主要研究方向:烧伤与创面愈合的分子生物学研究,

电话:029-84775298, E-mail: zaitianyifang000@126.com

[△] 通讯作者:胡大海,教授,博士生导师,主要研究方向:危重烧伤病理生理机制的细胞分子生物学研究, E-mail: hudhai@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2018-01-31 接受日期:2018-03-23)

个病理生理进程,需要多种炎症因子和生长因子的调节,也需要角质形成细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞等多种细胞的参与^[12]。如何能促进创面愈合一直是国内外学者的研究重点。因此,通过深入了解创面愈合的机制进行进一步的研究,探索促进创面愈合的新途径是目前急需解决的重大临床问题之一。

重组人生长激素^[3,4]是人类基因工程技术生产的生长激素类药物。生长激素有促进生长发育、改善危重患者机体蛋白质代谢等功能^[5,6],目前已有注射用重组人生长激素进入临床,用于治疗生长激素缺乏症、烧伤或创伤后高代谢状态、脓毒症等疾病。在基础研究方面,有研究证实,rh-GH可以促进烧伤创面愈合、有利于成纤维细胞的增殖和角质形成细胞的迁移等等^[7,8]。但是以往针对 rh-GH 的研究主要集中在 GH 缺乏疾病的治疗^[9,10]、重大创伤后机体蛋白质代谢^[11]、烧伤创面治疗^[12]等等,对 GH 和创面愈合的研究相对较少。同时对于 GH 和创面的关系多数停留在临床效果观察的方面,有必要更深一步探讨 GH 和创面愈合的关系。因此,本实验拟通过动物实验观察对比使用 rh-GH 与否对创面愈合的影响,并检测创周组织中 EGF、FGF、VEGF 以研究 rh-GH 对创面局部生长因子水平的影响。希望通过本实验能够丰富 rh-GH 对创面愈合过程的理论研究,为更进一步的机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠来自空军军医大学实验动物中心。重组人生长激素购自美国 ScienCell 公司。戊巴比妥钠来自美国 Sigma 公司。兔抗大鼠 GH 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司。小鼠抗大鼠 β -actin 多克隆抗体、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、反转录反应试剂盒、SYBR Green 荧光定量试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司。大鼠血清白蛋白 elisa 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。RIPA 强裂解液购自碧云天生物技术有限公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 220-250 g。饲养条件:温度 25-28 °C,湿度 40%-50%,适应性饲养一周后用于实验。动物实验符合国家技术委员会《实验动物管理条例》。SD 大鼠背部以硫化钠脱毛 24 h 后,腹腔内注射 1%苯巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,在大鼠背部中央切除 2×2 cm² 全层皮肤制作创面。40 只 SD 大鼠以随机数字表法分为 4 组(3 个实验组、1 个对照组),实验组采用“四点注射法”在创面周围注射 rh-GH 溶液 1 mL,3 个实验组注射剂量分别为 0.2 IU/kg、0.4 IU/kg、0.6 IU/kg,对照组在大鼠背部创面周围注射生理盐水 1 mL。记录并比较创面愈合率直至创面完全愈合。

1.2.2 Western-Blot 检测 实验组及对照组于创后第 0、3、6、9、12、15 天每组各处死 5 只大鼠,留取两组创面相同部位创缘全层皮肤,宽约 2 mm,液氮速冻。研钵中研碎组织转 EP 管中,每管加入含 1% PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液 400 μ L,混合均匀后冰上裂解 30 min。以 4 °C 12000 rpm 离心 10 min,吸取上清液 400 μ L 转入新的 EP 管中。BCA 试剂盒进行蛋白定量后,每个蛋白样本中加入 1/4 体积 5× 蛋白上样缓冲液,100 °C 煮样 10 min,冷却后 -20 °C 冰箱保存。配置 10%分离胶,每孔加样量

为 50 μ g,浓缩胶 90 V、分离胶 110 V 直至电泳结束。湿转法于冰浴下 100 V 将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),随后将 PVDF 膜置于 TBST 配制的 6%脱脂奶粉溶液中室温封闭 2 h,再以 TBST 洗涤后放入一抗,4 °C 冰箱过夜。以 TBST 洗涤 PVDF 膜 5 min×3 次,再放入 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗中,37 °C 条件下孵育 1 h,再以 TBST 洗涤 5 min×3 次。配置 ECL 化学发光检测试剂,在凝胶成像系统内发光并分析。

1.2.3 合成 cDNA、实时定量 PCR 皮肤组织中提取 RNA 并定量,进行反转录,反应体系如下:dNTP Mix 4 μ L,Primer Mix 2 μ L,RNA Template 2 μ g,5× RT Buffer 4 μ L,DTT 2 μ L,Hi-FiScript 1 μ L,RNase-Free Water 补足 20 μ L。反应条件为 42 °C 15 min→85 °C 5 min。反应完毕后将合成的 cDNA 以双蒸水稀释 10 倍。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L:2× UltraSYBR Mixture 10 μ L,Forward Primer 0.5 μ L,Reverse Primer 0.5 μ L,cDNA 4 μ L,dd-H₂O 5 μ L。反应条件:95 °C 10 min→95 °C 15 s→60 °C 1 min,融解曲线分析 40-45 个循环。以 GAPDH 为内参,采用比较 Ct 法计算目的基因表达差异,每个样品设置 3 个复孔,实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 GAPDH、EGF、FGF、VEGF 引物序列

Table 1 Primer sequence of GAPDH, EGF, FGF and VEGF

Primer	Sequence
GAPDH-Forward	5'-GCCACAATCAAGGCTGAGCAT-3'
GAPDH-Reverse	5'-ATGGTCGTGAAGGCGCCAGTA-3'
EGF-Forward	5'-GGGACTTGTGCCGGTAAGTA-3'
EGF-Reverse	5'-CTTAAGCAAACACGCACACC-3'
FGF-Forward	5'-AGTTGGTATGTGGCACTGAA-3'
FGF-Reverse	5'-GTATAGCTTTCTGCCCAGGTC-3'
VEGF-Forward	5'-GGCAGCTTGAGTTAAACGAAC-3'
VEGF-Reverse	5'-TGGTGACATGGTTAATCGGTC-3'

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验方法使用单因素方差分析及两样本 t 检验。当 P<0.05 为差异有统计学意义,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 注射 rh-GH 对大鼠创面愈合的影响

观察 SD 大鼠背部创面愈合过程显示,control 组创面完全愈合需要 21.7±2.3 天,0.2 IU/kg rh-GH 组需要 18.5±1.5 天,0.4 IU/kg rh-GH 组 17.1±2.9 天,0.6 IU/kg rh-GH 组 16.5±1.5 天。经统计学分析,与 control 组相比,注射 rh-GH 后创面愈合时间缩短,差异有统计学意义(P<0.05)。但是在 rh-GH 不同剂量组之间比较,愈合时间并没有统计学差异(P>0.05)(图 1)。选取 0、2、4、7、14 天低剂量组与对照组的创面照片进行比较,可以看出 rh-GH 注射组的创面愈合速度明显快于对照组,且差异有统计学意义(图 2,图 3)。计算愈合面积后发现在各时间点实验组创面积均明显小于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),进一步证明了 rh-GH 可以促进创面愈合。

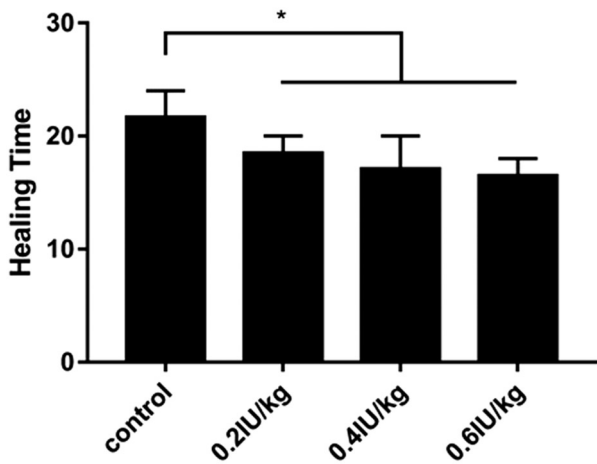


图1 对照组和各rh-GH实验组大鼠创面愈合天数

Fig. 1 The healing time of control group and rh-GH groups in rats

Note: Compared with the control group, the healing time of the rh-GH group is accelerated obviously (* $P < 0.05$, $n = 10$), but there is no statistically significant differences in the healing time between the rh-GH groups.

2.2 大鼠创周组织中 GH 蛋白水平变化

设置低剂量 rh-GH 注射组 and 对照组, 在第 0、2、4、7、14 天处死大鼠并于创缘取材, 提取组织蛋白并行 Western-Blot 实验, 结果显示生理盐水注射组及 rh-GH 注射组的 GH 水平在伤后 4 d 内均呈逐渐升高趋势, 但对照组 GH 水平随后逐渐下降, 而 rh-GH 注射组仍维持在高水平(图 4, 图 5)。

2.3 大鼠创周组织中 EGF、FGF、VEGF 基因转录变化

设置低剂量 rh-GH 注射组 and 对照组, 在第 0、2、4、7、14 天处死大鼠并于创缘取材, 提取 RNA 行 RT-PCR 实验, 结果显示大鼠背部全层皮肤缺损后, EGF、FGF 和 VEGF 的基因转录水平均明显高于对照组, 对照组和实验组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)(图 6)。

3 讨论

创面愈合是在多种细胞及细胞因子共同调控下完成的复杂过程。在临床上, 创面愈合主要分为炎症反应、上皮化及创面收缩、胶原沉积及重塑这三个相互影响而不可分割的过程^[13],

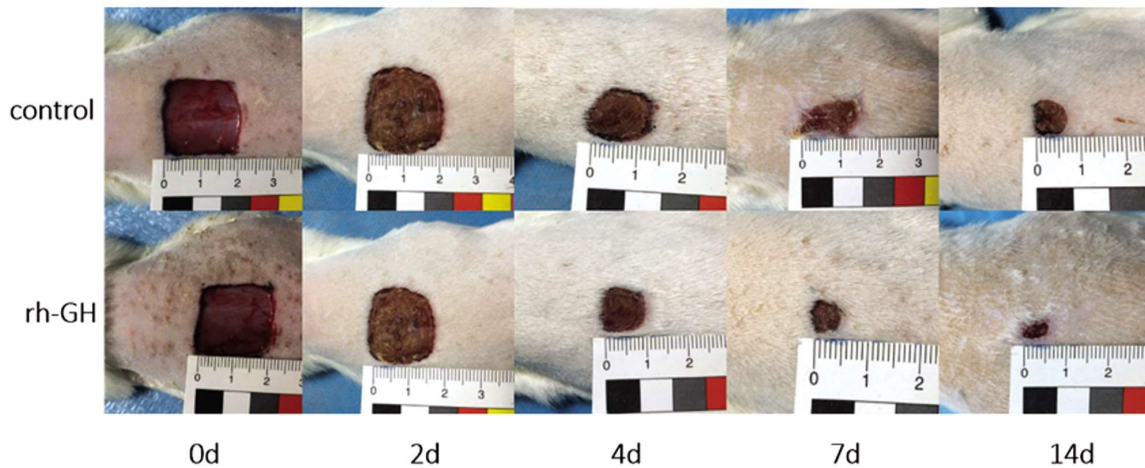


图2 对照组和 rh-GH 组各时间点创面愈合情况对比

Fig. 2 Contrast of wound healing in the control group and rh-GH group at each time point

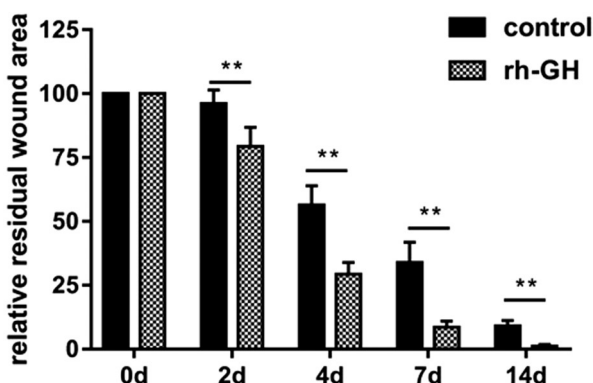


图3 对照组和 rh-GH 组各时间点相对剩余伤口面积对比

Fig.3 Contrast of residual wound area at each time point in control group and rh-GH group

Note: The relative residual wound area (residual wound area / initial wound area) of rh-GH group is significantly smaller than that of the control group, and the difference is statistically significant (** $P < 0.01$, $n = 5$).

而角质形成细胞增殖和迁移、血管内皮细胞增殖、创面收缩等在创面愈合中发挥了至关重要作用, 但是其具体调控机制众说纷纭, 许多学者亦在不断寻找关键靶点。我们知道, 创面愈合过程中需要多种激素调节及细胞因子的参与^[14,15], 在这些影响因素中激素的作用无疑是具有针对性的, 其中 GH 的促生长作用则最为显著^[16]。在既往的研究中发现, GH 具有增加肌肉重量、促进脂肪分解等作用^[17-19], 还可以通过激活生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 以及增加胰岛素样生长因子 (Insulin-like Growth Factor, IGF) 的表达增加骨骼肌葡萄糖摄取和减少肝脏糖异生^[20]。同时在动物和细胞培养研究以及临床数据均表明, rh-GH 可以促进伤口愈合^[21,22]。比如在一项关于烧伤患者应用 rh-GH 的临床实验中显示, rh-GH 可以使成人和儿童的烧伤创面和供体部位更快愈合^[23], 另一项研究中发现, rh-GH 可以使咽喉大鼠模型的创面胶原形成和上皮化水平升高, 加速咽喉的闭合^[24]。在本试验中, 当大鼠背部创面制作完成后, 连续监测大鼠创面周围组织中 GH 水平, 发现对照组 GH 水平有升高趋势, 与上述研究中的观点相一致。实验中, 实验组应用

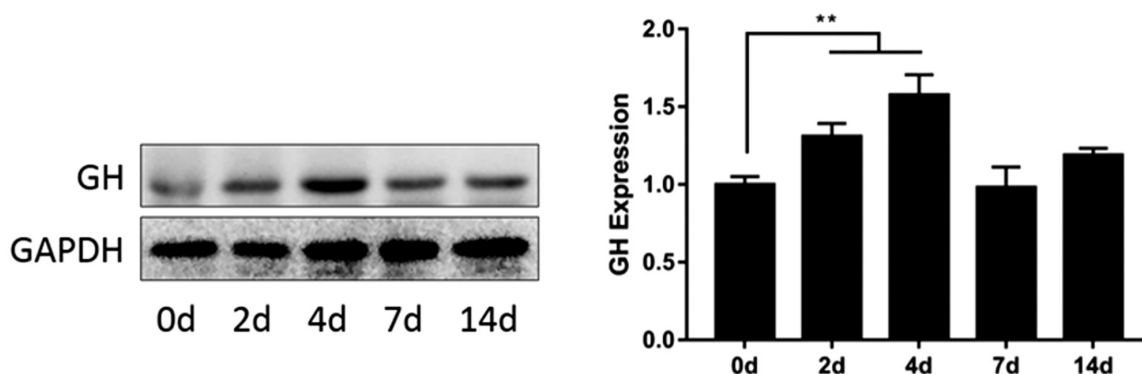


图4 对照组各时间点创周组织中 GH 水平变化

Fig. 4 GH level of the tissue around the wound at each time point in control group

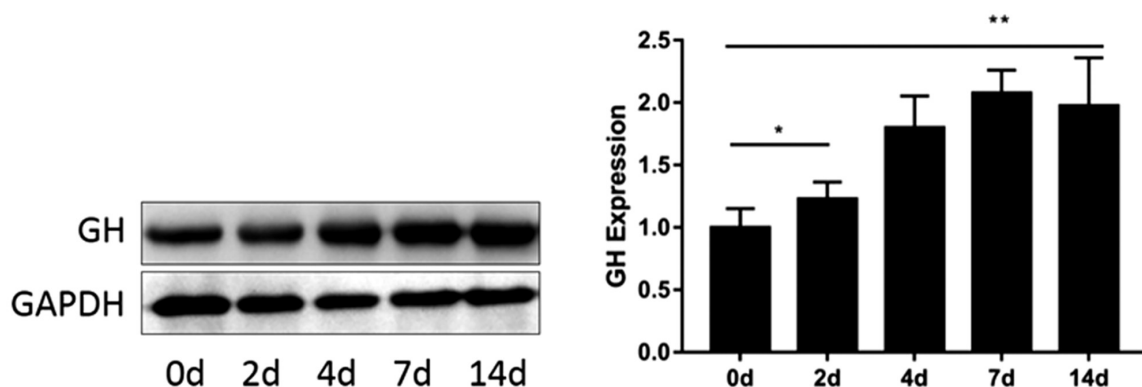
Note: The protein level of GH by Western-blot, relative GH/GAPDH ratios were determined by Image J densitometric analysis (** $P < 0.01$, $n = 5$).

图5 rh-GH 组各时间点创周组织中 GH 水平变化

Fig. 5 GH level of the tissue around the wound at each time point in rh-GH group

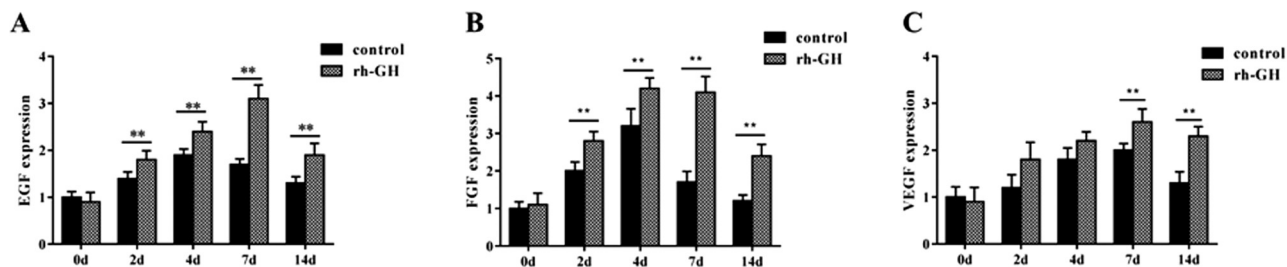
Note: The protein level of GH by Western-blot, relative GH/GAPDH ratios were determined by Image J densitometric analysis (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$).

图6 创周组织中 EGF、FGF、VEGF 的 mRNA 表达情况

Fig. 6 The mRNA expression of EGF, FGF and VEGF in the tissue around the wound

Note: A: The mRNA expression of EGF in the control group and rh-GH group (** $P < 0.01$, $n = 5$) B: The mRNA expression of FGF in the control group and rh-GH group (** $P < 0.01$, $n = 5$) C: The mRNA expression of VEGF in the control group and rh-GH group (** $P < 0.01$, $n = 5$).

rh-GH 的情况下,大鼠皮肤全层缺损创面周围组织 GH 水平较对照组明显增高,同时观察到大鼠背部创面的愈合过程明显加快,证实了 GH 有促进组织生长、加速创面愈合的功能。本实验有别于 rh-GH 促进烧伤创面愈合的研究在于 rh-GH 是局部注射应用。相较于全身应用,局部注射 rh-GH 可以明显提高局部组织中 GH 的浓度。

研究表明,多种细胞因子包括生长因子、淋巴因子、集落刺激因子(CSF)、转化生长因子(TGF)等均在创面愈合中发挥着作用^[25,26]。其中 EGF 主要功能为促进创面表皮细胞增殖^[27],FGF 则具有促进中胚层和外胚层来源的组织细胞如成纤维细胞、血管内皮细胞和神经细胞的存活与生长的作用^[28],VEGF 更是一种高度特异性的促进血管内皮细胞增殖的生长激素^[29]。为

探讨 GH 与这三种生长激素的分泌水平相关性,我们检测了大鼠创面模型中 EGF、FGF 和 VEGF 的水平,结果提示 rh-GH 组的三者水平相较于对照组均有不同程度的增高。对照组的 EGF、FGF、VEGF 水平在伤后表达逐渐增高,在伤后第4-7天达到表达峰值,随后逐渐下降,而 rh-GH 组中三种细胞因子的表达水平在伤后迅速升高,表达峰值延长至 7-10 天,随后虽有下降趋势,但总体水平仍远高于对照组。本实验一方面说明了 EGF、FGF、VEGF 与创面愈合有关,且表达水平与创面愈合速度呈正相关,另一方面探讨了 GH 在促进创面愈合过程中的机制,即 GH 可以通过提高 EGF、FGF、VEGF 的水平来促进组织生长,加速上皮化进程。

目前对于 GH 的功能研究已经较为详尽,但 rh-GH 作为一

种激素类药物,其功能并不能仅限于治疗 GH 缺乏导致的侏儒症以及用于改善重症患者的蛋白质代谢等方面。本研究在观察 rh-GH 促进创面愈合的基础上加深了研究方向,探讨了 GH 在促进创面愈合中的机制,使临床上应用 rh-GH 来治疗各种复杂创面有了更充足的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Grose R, Werner S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice[J]. *Mol Biotechnol*, 2004, 28(2): 147-166
- [2] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 835-870
- [3] Jellinck PH, Quail JA, Crowley CA. Normal and recombinant human growth hormone administered by constant infusion feminize catechol estrogen formation by rat liver microsomes [J]. *Endocrinology*, 1985, 117(6): 2274-2278
- [4] Saenger PH, Mejia-Corletto J. Long-Acting Growth Hormone: An Update[J]. *Endocr Dev*, 2016, 30: 79-97
- [5] Rothenbuhler A, Esterle L, Gueorguieva I, et al. Two-year recombinant human growth hormone (rhGH) treatment is more effective in pre-pubertal compared to pubertal short children with X-linked hypophosphatemic rickets (XLHR)[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2017, 36: 11-15
- [6] Borrás Pérez MV, Kriström B, Romer T, et al. Ten years of clinical experience with biosimilar human growth hormone: a review of safety data[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 1497-1503
- [7] Lee SW, Kim SH, Kim JY, et al. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010, 63(4): e364-369
- [8] Ding J, Wirosko B, Sullivan DA. Human growth hormone promotes corneal epithelial cell migration in vitro [J]. *Cornea*, 2015, 34(6): 686-692
- [9] 朱新宇,陈晶.重组人生长激素治疗特发性矮小患儿的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(10): 884-887
Zhu Xin-yu, Chen Jing. Clinical trial of recombinant human growth hormone in the treatment of children with idiopathic short stature[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2017, 33(10): 884-887
- [10] Zueger T, Lohrer H, Egger A, et al. Regulation of fuel metabolism during exercise in hypopituitarism with growth hormone-deficiency (GHD)[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2016, 29: 39-44
- [11] Binnerts A, Swart GR, Wilson JH, et al. The effect of growth hormone administration in growth hormone deficient adults on bone, protein, carbohydrate and lipid homeostasis, as well as on body composition[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1992, 37(1): 79-87
- [12] 田方圆,吴斌,徐琰,等.重组人生长激素治疗成年重度烧伤患者有效性和安全性的系统评价[J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(9): 568-573
Tian Fang-yuan, Wu Bin, Xu Ting, et al. Systematic evaluation on effectiveness and safety of recombinant human growth hormone in treating adult patients with severe burn[J]. *Chin J Burns*, 2017, 33(9): 568-573
- [13] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration[J]. *Nature*, 2008, 453(7193)
- [14] Rieger S, Zhao H, Martin P, et al. The role of nuclear hormone receptors in cutaneous wound repair [J]. *Cell Biochem Funct*, 2015, 33(1): 1-13
- [15] Mendoza Mari Y, Fernández Mayola M, Aguilera Barreto A, et al. Growth Hormone-Releasing Peptide 6 Enhances the Healing Process and Improves the Esthetic Outcome of the Wounds [J]. *Plast Surg Int*, 2016, 2016: 4361702
- [16] Harvey S. Growth hormone and growth? [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 190: 3-9
- [17] Lima ARR, Pagan LU, Damatto RL, et al. Effects of growth hormone on cardiac remodeling and soleus muscle in rats with aortic stenosis-induced heart failure[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 83009-83021
- [18] Urban RJ. Growth hormone and testosterone: anabolic effects on muscle[J]. *Horm Res Paediatr*, 2011, 76(Suppl 1): 81-83
- [19] Braun LR, Feldpausch MN, Czerwonka N, et al. Fibroblast growth factor 21 decreases after liver fat reduction via growth hormone augmentation[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2017, 37: 1-6
- [20] Kim SH, Park MJ. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human [J]. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2017, 22(3): 145-152
- [21] Messias de Lima CF, de Araújo Vieira LF, de Carvalho Wanderley LA, et al. Topical Growth Hormone Accelerates Wound Healing in Mice[J]. *Wounds*, 2017, 29(12): 387-392
- [22] Cui T, Jimenez JJ, Block NL, et al. Agonistic analogs of growth hormone releasing hormone (GHRH) promote wound healing by stimulating the proliferation and survival of human dermal fibroblasts through ERK and AKT pathways [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(33): 52661-52672
- [23] Breederveld RS, Tuinebreijer WE. Recombinant human growth hormone for treating burns and donor sites [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, (9): CD008990
- [24] Kucuk N, Sari M, Midi A, et al. Effectiveness of Recombinant Human Growth Hormone for Pharyngocutaneous Fistula Closure[J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2015, 8(4): 390-395
- [25] Grellner W, Madea B. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation [J]. *Forensic Sci Int*, 2007, 165: 150e154
- [26] Tanikawa AA, Grotto RM, Silva GF, et al. Platelet-derived growth factor A mRNA in platelets is associated with the degree of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2017, 50(1): 113-116
- [27] Choi SM, Lee KM, Kim HJ, et al. Effects of structurally stabilized EGF and bFGF on wound healing in type I and type II diabetic mice [J]. *Acta Biomater*, 2018, 66: 325-334
- [28] Okada K, Kojima K, Okumoto K, et al. A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances FGF-2-induced skin wound healing in mice[J]. *Thromb Res*, 2017, 157: 7-8
- [29] Pandey AK, Singhi EK, Arroyo JP, et al. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease[J]. *Hypertension*, 2018, 71(2): e1-e8