

两种2型糖尿病小鼠溃疡创面愈合比较

韩延忠¹, 王玉芝², 刘如华³, 沈娟^{1,3*}

(1. 广东药科大学基础学院药用生物活性物质研究所, 广州 510006; 2. 广州军区广州总医院, 广州 510006;
3. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 510006)

【摘要】目的 比较目前常用的基因自发突变2型糖尿病小鼠 C57BL/6J-db/db 和 STZ 诱导的 C57BL/6J 小鼠的溃疡创面愈合特征, 为应用稳定的糖尿病小鼠溃疡模型进行相关动物实验研究提供依据。**方法** 建立糖尿病小鼠溃疡模型, 统计 0、3、5、7、10、14 d 小鼠创面动态愈合率及愈合时间; 7、14 d 取组织, HE 染色和 Masson 染色, 免疫组化 (CD31 和 PCNA) 观察创面病理组织变化; 荧光定量测定愈合相关因子 collagen-III α 、 α -SMA 的基因表达。**结果** 基因突变 db/db 小鼠较 STZ 诱导小鼠的创面愈合时间显著延迟, 由 (16.6 \pm 0.8) d 延长至 (20.2 \pm 1.3) d ($P < 0.001$); db/db 组较 STZ 组肉芽组织生长缓慢, 新生上皮长度不足、胶原沉积紊乱, 创面愈合较差; 7 d, db/db 组的 CD31 和 PCNA 显著性低表达 ($P < 0.01$); 7、14 d, db/db 组基因上调量的倍数明显低于 STZ 组。**结论** 两种糖尿病小鼠创面均出现愈合延迟, 但基因突变糖尿病 db/db 小鼠相比于 STZ 诱导组小鼠在创面愈合延迟的程度上和愈合难易程度上, 更适合进行糖尿病溃疡创面的研究。

【关键词】 2型糖尿病小鼠; 难愈性创面; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0006-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.08.002

Comparison of wound healing in two mouse models of type 2 diabetes

HAN Yan-zhong¹, WANG Yu-zhi², LIU Ru-hua³, SHEN Juan^{1,3*}

(1. Institute of Pharmaceutical Bioactive Substances, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510006; 3. School of Life Science & Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To compare the characteristics of ulcer wound healing in current commonly used C57BL/6J-db/db mouse models of spontaneous gene mutation-induced type 2 diabetes and in C57BL/6J mice with diabetes induced by streptozotocin (STZ), and to provide a basis for related experimental studies on diabetic ulcer in animal models. **Methods** To establish the mouse models of diabetic ulcer wound, observe the healing time and calculate the wound healing rate at 0, 3, 5, 7, 10, 14 days. Tissue samples were collected at days 7 and 14. HE and Masson staining, and immunohistochemistry (CD31 and PCNA) were used to observe the pathological changes of the wound tissues. Gene expressions of collagen-III α , fibronectin and α -SMA were detected by fluorescent quantitative analysis. **Results** The wound healing time of db/db mice was significantly delayed compared with the STZ mice, which was extended from 16.6 \pm 0.8 d to 20.2 \pm 1.3 d ($P < 0.001$). Compared with the STZ group, the growth of granulation tissue in the db/db group was slow, the length of newly formed epithelium was insufficient, the collagen deposition was disordered, and the wound healing was poor. At 7 days, the expression of CD31 and PCNA was significantly lower in the db/db group ($P < 0.01$),

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81502520)。

[作者简介] 韩延忠 (1991 -), 男, 硕士研究生, 专业: 中药学。E-mail: yanzhong0208@sina.com

[通讯作者] 沈娟 (1981 -), 女, 副教授, 研究方向: 糖尿病难愈创面。E-mail: shenjuan0412@126.com

and at 7 and 14 days, the increase of collagen-III α and α -SMA genes up-regulation was significantly lower in the db/db group than in the STZ group. **Conclusions** Both the two types of diabetic mice show delayed wound healing. However, compared with the STZ-induced diabetic mice, the gene mutation db/db mice are more suitable for studies of diabetic ulcer wound healing as regarding the extent of the delay and the degree of difficulty of wound healing.

【Key words】 Type 2 diabetes mice; Refractory wound; Animal model

糖尿病溃疡是糖尿病的常见并发症之一^[1],是目前临床治疗性的难题,也是当前创伤医学的研究热点之一^[2,3]。针对糖尿病溃疡的药物研究,在临床上具有广泛的应用前景和重要的社会意义^[4]。因此选择稳定、重复性强的糖尿病溃疡的动物创面模型是该类药物研究与评价的一个重要问题。

小鼠遗传背景清楚,基因组测序已全部完成,易于饲养,成本较低,是实验室研究的理想动物模型。瘦素受体基因缺陷导致的 db/db 小鼠和采用高脂饲料加链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠创面模型已被国内外研究者广泛应用于糖尿病溃疡创面愈合的实验研究,然而,却未对这两种典型的糖尿病小鼠创面模型的愈合特点及愈合生物学特征的差异进行比较、分析和研究。

因此,本研究将比较 II 型糖尿病 C57BL/6J-db/db 和 STZ 诱导的 C57BL/6J 小鼠的溃疡创面愈合进程、病理组织学特征及创伤修复相关基因表达水平等方面的差异,为进一步开展糖尿病溃疡创面愈合的实验研究提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 30 只,雄性,体重 20 ~ 22 g,6 ~ 8 周龄,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004],随机分为正常组 15 只和糖尿病组 15 只。C57BL/6J-db/db 糖尿病小鼠 15 只,雄性,体重 50 ~ 55 g,7 ~ 8 周龄,由南京大学-南京生物医药研究院提供[SCXK(苏)2015-0001]。以上动物均在广东药科大学动物中心 SPF 级饲养间饲养[SYXK(粤)2012-0125]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂

链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒、增殖细胞核抗原(PCNA)一抗及二抗、血小板内皮细胞黏附分子(CD31)一抗及二抗,均购自碧云天生物技术公司;Collagen-III α 基因序列:上游引物(5'→3') ACGTAAGCACTGGTGGACAG,下游引物(5'→3') AGCTGCACATCAAC

GACATC、 α -SMA 基因序列:上游引物(5'→3') TGTGCTGGACTCTGGAGATG,下游引物(5'→3') GAAGGAATAGCCACGCTCAG)基因引物,购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;动物组织总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)反转录试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版(SYBR Green)试剂盒均购自天根生化科技有限公司;其它试剂均用国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 STZ 诱导的 II 型糖尿病小鼠模型的建立

正常组小鼠和 db/db 组小鼠喂以基础饲料,糖尿病(STZ)组小鼠喂以高脂饲料,持续 4 周后,STZ 组小鼠禁食 12 h,腹腔注射 STZ 40 mg/kg,连续注射 5 d,继续饲喂高脂饲料,注射 7 d 后测量随机血糖,血糖值大于 16.67 mmol/L 的个体被认定为 2 型糖尿病小鼠^[5-7]。

1.3.2 2 型糖尿病小鼠溃疡创面模型的建立

正常组、db/db 组、STZ 组共 36 只小鼠,按 0.015 mL/g 计算用量,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,麻醉后背部剃毛消毒,无菌条件下在背部正中两侧用无菌手术剪各剪一个 0.8 cm 的圆形创面,深至筋膜,无菌纱布包扎,小鼠单笼饲养。

1.3.3 创面图像采集和组织取材

分别在 0、3、5、7、10、14 d 时,数码相机采集图像,使用 Adobe Photoshop CS 2.0 软件对采集的创面定焦图像进行统一标准裁,并用 Image J 软件统计未愈合的创面面积,创面愈合率(%)=(初始创面面积-残余创面面积)/初始创面面积 × 100%,并统计完全愈合时间。在第 7、14 天时,随机处死每组的 6 只小鼠,统取小鼠左侧创面处皮肤用 4% 多聚甲醛固定,经石蜡包埋,切片。小鼠右侧创面处皮肤采用 RNA 试剂盒提取 RNA, -80℃ 保存。

1.3.4 HE 染色

按苏木素伊红(HE)染色试剂盒的说明书,分别将正常组、STZ 组、db/db 组小鼠在第 7、14 天的皮肤石蜡切片进行常规脱蜡脱水并染色,显微镜下观察创面组织学与胶原沉积的变化。

1.3.5 免疫组化观察 CD31 和 PCNA 的表达变化

在第 7、14 天的三组皮肤石蜡切片常规脱蜡脱水,免疫组化实验方法参照^[8],其中分别附 PCNA 鼠源多克隆一抗及辣根过氧化氢酶标记的山羊抗兔 IgG,CD31 兔源多克隆一抗及辣根过氧化氢酶标记的山羊抗小鼠 IgG,CD31 定位于血管内皮细胞,以内皮细胞出现棕黄色染色为阳性,显微镜 200 倍镜下,各切片均选择视野左、中、右三个部位,每个视野互不重叠,用 Image J 软件进行光密度分析,计算 PCNA、CD31 的表达量。

1.3.6 荧光定量 PCR 检测 collagen-III α 、 α -SMA mRNA 基因的表达变化

Real-time PCR 反应 20 μ L 体系:上下游引物 (10 μ M) 各 0.6 μ L, 2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase-free dd H₂O 7.8 μ L。按试剂盒说明书设置预变性和 PCR 扩增条件上机检测,系统自动分析显示 Ct。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 统计学软件进行分析,实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间样本的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 创面愈合率

5 d, STZ 组创面结痂,伤口填补收缩,而 db/db 组 7 d 才出现创面肉芽组织,伤口收缩。14 d, 正常组已愈合, STZ 组上皮大部覆盖,未完全愈合, db/db 组瘢痕收缩不完全,未愈合,如图 1 所示。STZ 组与 db/db 组的创面愈合率有显著性差异 (3 ~ 10 d, $P < 0.001$)。db/db 组与 STZ 组比较创面愈合时间显著性延迟,由 (16.6 \pm 0.8) d 延长至 (20.2 \pm 1.3) d ($P < 0.001$)。因此,db/db 组相比于 STZ 组的创面愈合更为缓慢、稳定。如图 2 所示。

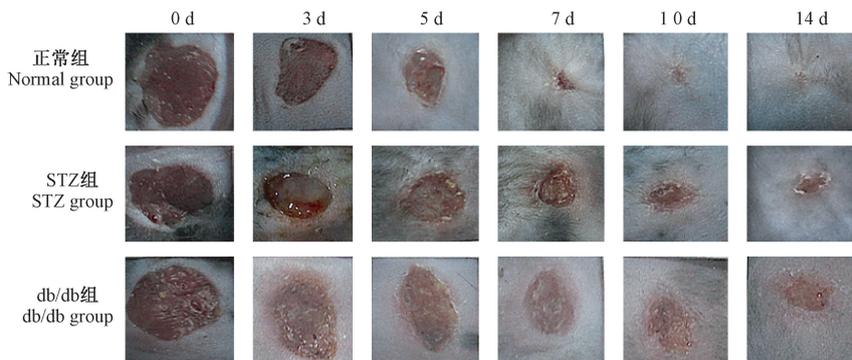
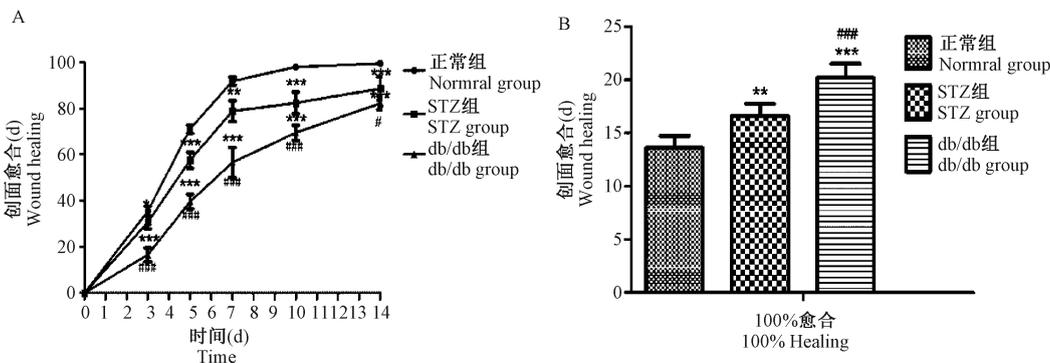


图 1 小鼠创面愈合变化

Fig. 1 Changes of wound healing in the mice



注:(A)正常小鼠、STZ 诱导的糖尿病小鼠、db/db 小鼠在术后 0、3、5、7、10、14 d 时创面愈合率;(B)各组 100% 创面愈合的时间。STZ 组和 db/db 组分别与正常组小鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;db/db 组与 STZ 组小鼠比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.001$ 。

图 2 创面愈合率和愈合时间

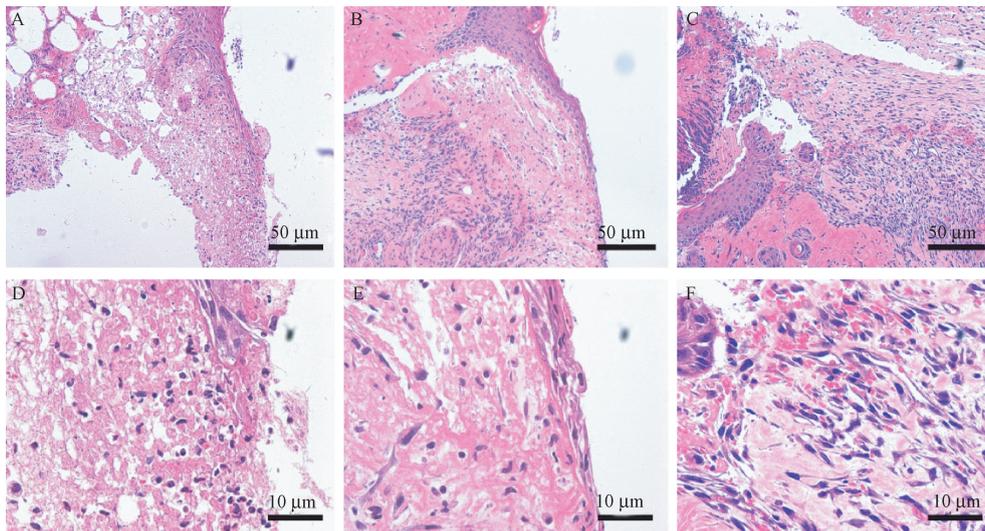
Note. (A) Wound healing rate from three groups (normal mice and diabetic mice induced by STZ, db/db mice) each at 0, 3, 5, 7, 9 and 14 days after surgery; (B) 100% wound healing time in each group; Compared with the normal group mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; The db/db mice group compared with STZ group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Fig. 2 Wound healing rate and healing time in the mice

2.2 创面 HE 染色结果

7 d, db/db 组较 STZ 组, 中性粒细胞和单核细胞浸润明显, 无成纤维细胞出现, 红细胞极少, 肉芽组织不明显, 胶原纤维排列混乱且间质疏松, 正常组含有大量成纤维细胞、红细胞, 并伴有炎性细胞

存在, 已明显看到肉芽组织。14 d, db/db 组相比于 STZ 组仍有大量炎性细胞存在且间质疏松, 胶原纤维排列较为混乱, 愈合较差, 正常组胶原纤维紧密, 上皮完整覆盖, 创面已愈合。如图 3、图 4 所示。

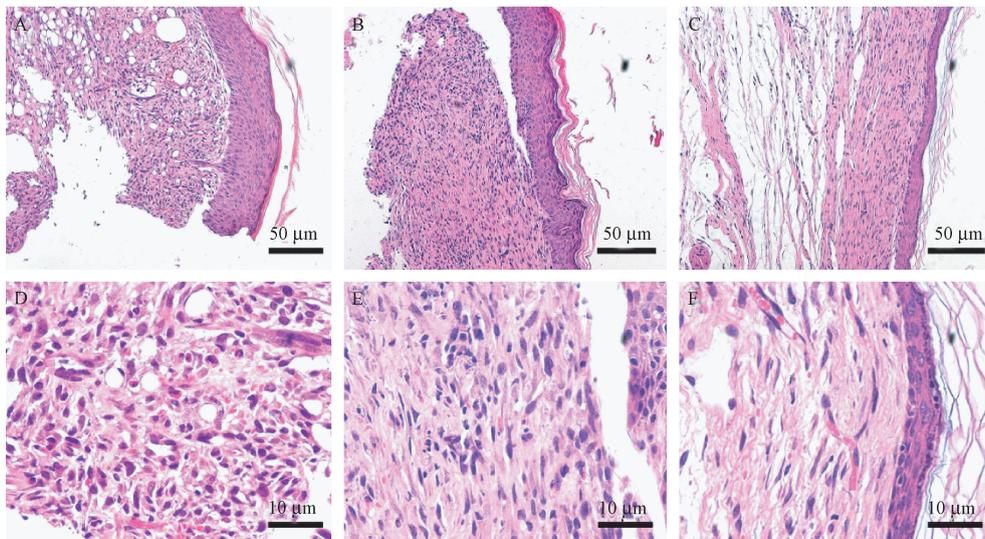


注: (A, D) db/db 小鼠; (B, E) STZ 诱导的糖尿病小鼠; (C, F) 正常小鼠在术后 7 d 时创面组织 HE 染色。

图 3 小鼠 7 d 时创面 HE 染色

Note. A, D: db/db mice; B, E: STZ-induced diabetic mice; C, F: Normal mice.

Fig. 3 Histology of the wound surface in mice at 7 days after surgery. HE staining



注: (A, D) db/db 小鼠; (B, E) STZ 诱导的糖尿病小鼠; (C, F) 正常小鼠在术后 14 d 时创面组织 HE 染色。

图 4 实验小鼠 14 d 各组创面 HE 染色

Note. A, D: db/db mice; B, E: STZ-induced diabetic mice; C, F: Normal mice.

Fig. 4 Histology of the wound surface in mice at 14 days after surgery. HE staining

2.3 抗体 CD31 和 PCNA 的表达结果

新生血管密度(CD31 抗体标记)和细胞增殖核抗原(PCNA)的多少是创面的修复的重要指标。7 d, db/db 组 (0.45 ± 0.06)% 较 STZ 组 (0.68 ± 0.06)% 新生血管密度更低 ($P < 0.01$), 如图 5、图 6 所示; 并且, db/db 组 (4.10 ± 0.60)% 较 STZ 组 (5.84 ± 0.64)% 的 PCNA 显著性的低表达 ($P < 0.01$), 如图 7、图 8 所示。可见, db/db 组的创面修复能力要显著低于 STZ 组。

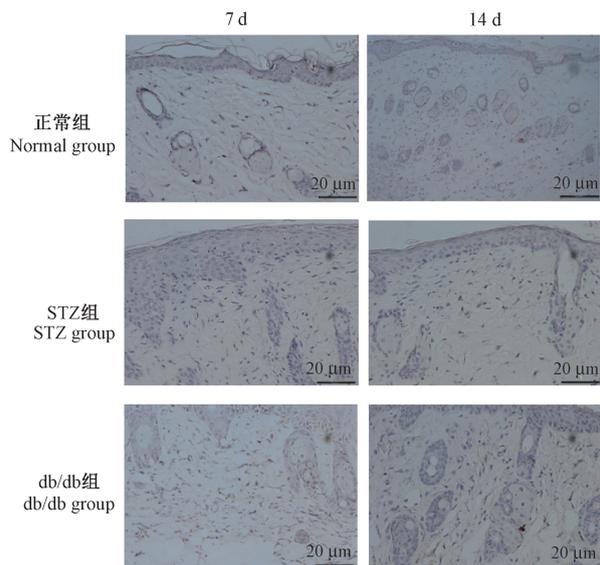
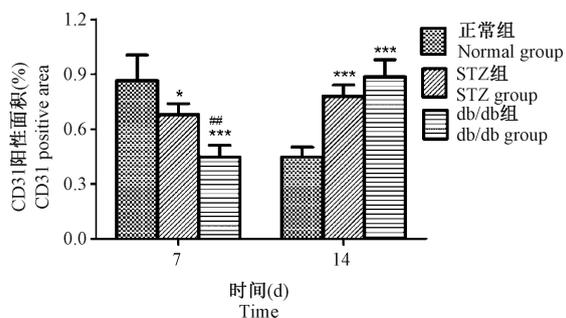


图 5 CD31 抗体免疫组化染色 (Bar = 20 μm)

Fig. 5 Comparison of neovasculture formation in the skin of db/db and STZ-induced diabetic mice. CD31 antibody immunohistochemical staining



注: 与正常组小鼠比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;

db/db 组与 STZ 组小鼠比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 CD31 抗体阳性表达面积百分比

Note. Compared with the normal mice,

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; db/db mice

compared with STZ-treated mice, ## $P < 0.01$.

Fig. 6 The percentage of CD31 positive expression area

2.4 荧光定量 PCR 检测 Collagen-III α 、 α -SMA mRNA 基因的表达

Collagen-III α 和 α -SMA mRNA 基因的表达上调水平与愈合修复水平正相关。荧光定量 PCR 结果显示, 各组创面组织 7 d 到 14 d 的 Collagen-III α mRNA 表达水平均上调, 其中 STZ 组基因表达量呈 5 倍量上调, db/db 组基因表达量呈 2 倍量上调, 上调的倍数显著低于 STZ 组。因此, db/db 组愈合效果明显低于 STZ 组, 如表 1 所示。7 d, STZ 组和 db/db 组的 α -SMA mRNA 的表达量都显著低于正常组, 均较正常组愈合缓慢; 14 d, STZ 组基因表达量呈多倍量上调, 显著高于 db/db 组的上调倍数, 因此 db/db 组比较 STZ 组的创面愈合效果较差。

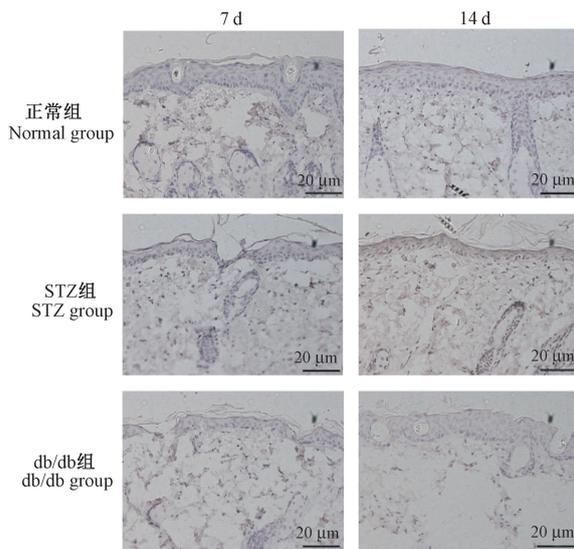


图 7 PCNA 抗体免疫组化染色

Fig. 7 PCNA expression in the mouse wound skin. Immunohistochemical staining.

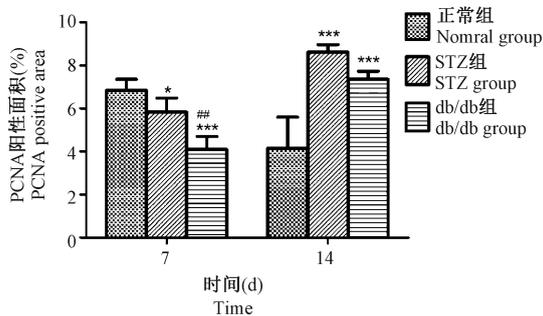
表 1 溃疡创面 Collagen-III α mRNA 的表达结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Expression of collagen-III α mRNA in the wound of diabetic mice

组别 Groups	7 d	14 d
正常组 Normal group	0.93 ± 0.05	1.41 ± 0.49
STZ 组 STZ group	0.24 ± 0.05 ***	1.05 ± 0.15
db/db 组 db/db group	3.55 ± 0.27 ****	6.45 ± 0.32 *****

注: 与正常组小鼠比较, *** $P < 0.001$; db/db 组与 STZ 组小鼠比较, **** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the normal group, *** $P < 0.001$; The db/db group compared with STZ group, **** $P < 0.001$.



注:与正常组小鼠比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; db/db 组与 STZ 组小鼠比较, ## $P < 0.01$ 。

图 8 PCNA 抗体阳性表达面积百分比

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; The db/db group compared with STZ group, ## $P < 0.01$.

Fig. 8 The percentage of PCNA-positive expression area in the mouse skin wounds

表 2 溃疡创面 α -SMA mRNA 的表达结果($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 Expression of α -SMA mRNA in the skin wounds of diabetic mice

组别 Groups	7 d	14 d
正常组 Normal group	0.95 \pm 0.04	0.32 \pm 0.18
STZ 组 STZ group	0.04 \pm 0.03***	0.25 \pm 0.16
db/db 组 db/db group	0.37 \pm 0.28***#	0.69 \pm 0.40#

注:与正常组小鼠比较, *** $P < 0.01$; db/db 组与 STZ 组小鼠比较, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, *** $P < 0.01$; The db/db group compared with STZ group, # $P < 0.05$.

3 讨论

STZ 诱导的 2 型糖尿病小鼠模型与由于瘦素受体缺陷导致的先天肥胖性糖尿病 db/db 小鼠模型在国内外均有研究报道,在两种小鼠模型之上构建的糖尿病创面溃疡模型也同样均有研究应用,两种小鼠模型在一定的程度上均模拟了临床糖尿病创面溃疡难愈合的病症特点,但是两种模型的优缺点和应用价值却少有比较研究的报道。

创面愈合率和愈合时间是评价创面愈合最直观的指标之一^[9],本实验结果显示,两个糖尿病溃疡创面组较正常组具有显著性愈合缓慢,并且 db/db 组相比于 STZ 组具有显著性的愈合延迟。HE 染色组织病理观察,在创面愈合早期,炎性细胞浸润加快创面的愈合,但是在后期,尤其是 db/db 组中大量的炎性细胞阻碍了创面的愈合,与创面愈合的宏观观察一致。刘宸等^[10]研究也发现糖尿病大鼠创面中的巨噬细胞早期浸润数量较低,与创面愈合率

具有正相关性,而晚期残留巨噬细胞数量较多且与创面愈合率具有负相关性。

创面的修复伴随血管的新生来提供大量的营养物质,CD31 能够特异性标记血管内皮细胞,血管密度可作为血管新生的指标^[11,12]。PCNA 存在于细胞核中,是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,在 S 期为 DNA 复制所必需,对于细胞增殖起重要作用^[13]。研究结果发现,在创面愈合的第 7 天时,db/db 组与 STZ 组比较,CD31 和 PCNA 都具有显著性的低表达,db/db 组的创面明显更加难以愈合。

细胞外基质 (ECM) 的沉积是创面愈合修复的重要组成部分, collagen-III α 基因主要调控细胞外基质的产生。本研究发现,对于 collagen-III α 的调控, db/db 鼠的 ECM 沉积要少于 STZ^[14]。 α -SMA 是肌成纤维细胞的重要标志,肌成纤维细胞具有平滑肌细胞和成纤维细胞的特性^[15]。它广泛存在于机体各组织中,通过分泌生长因子、细胞外基质、趋化因子等物质,从而在组织损伤的修复过程中占有重要的地位^[16]。本研究发现,7、14 d, STZ 组的 collagen-III α 和 α -SMA 基因多倍量的上调, db/db 组的上调倍数显著低于 STZ 组。这初步明确了 db/db 组的愈合时间较 STZ 组延迟在基因调控方面的原因。

两种糖尿病溃疡创面模型作为经典模型均出现愈合延迟,而 db/db 小鼠相比于 STZ 诱导的糖尿病溃疡创面愈合更为缓慢,溃疡模型重复性、稳定性更高,为应用稳定的糖尿病小鼠溃疡模型进行相关动物实验研究提供依据。

参考文献:

- [1] Tzeng YS, Deng SC, Wang CH, et al. Treatment of nonhealing diabetic lower extremity ulcers with skin graft and autologous platelet gel: a case series [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013 (1): 837620.
- [2] Ji X, Jin P, Chu Y, et al. Clinical characteristics and risk factors of diabetic foot ulcer with multidrug-resistant organism infection [J]. Int J Lower Extremity Wounds, 2014, 13 (1): 64 - 71.
- [3] Catrina S, Zheng X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers [J]. Diab/Metab Res Rev, 2015, 32 (S1): 179 - 185.
- [4] Sinha R, van den Heuvel WJ, Arokiasamy P. Factors affecting quality of life in lower limb amputees [J]. Prosth Orthotics Int, 2011, 35 (1): 90 - 96.
- [5] 闵筱辉, 陈其奎, 于涛, 等. 链脲佐菌素诱导建立长期稳定糖尿病小鼠模型的给药方案研究 [J]. 中国医药导报, 2013, 10 (4): 7 - 10.

- [29] Wang FY, Su M, Zheng YQ, et al. Herbal prescription Chang'an II repairs intestinal mucosal barrier in rats with post-inflammation irritable bowel syndrome [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(6):708-715.
- [30] Zhang NZ, Ma L, Jun C, et al. Changes in mast cell infiltration: a possible mechanism in detrusor overactivity induced by visceral hypersensitivity [J]. *Int Braz J Urol*, 2016, 42(2):373-382.
- [31] Tang QL, Lai ML, Zhong YF, et al. Antinociceptive effect of berberine on visceral hypersensitivity in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(28):4582-4589.
- [32] Shang JJ, Yuan JY, Xu H, et al. Shugan-decoction relieves visceral hyperalgesia and reduces TRPV1 and SP colon expression [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(44):8071-8077.
- [33] He YQ, Chen Q, Ji L, et al. PKC γ receptor mediates visceral nociception and hyperalgesia following exposure to PTSD-like stress in the spinal cord of rats [J]. *Mol Pain*, 2013, 7(9):35.
- [34] 王静, 赖华梅, 诸琦, 等. 内脏高敏感大鼠肠道 5-羟色胺转运体的变化以及中药肠吉安治疗的研究 [J]. *胃肠病学*, 2008, 13(1):18-21.
- [35] 苏晓兰, 唐艳萍, 张静, 等. 温肾健脾法干预腹泻型肠易激综合征大鼠的实验研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(2):197-202.
- [36] 钦丹萍, 黄一鸣, 杨午鸣, 等. 健脾、温肾、疏肝、升清四法对 IBS 模型大鼠内脏敏感性及其胃肠激素的作用研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2011, 35(3):387-390.
- [37] 赵玉斌. 健脾解毒化浊方治疗肠易激综合征的基础及临床研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2004.
- [38] 王晓鸽. 痛泻要方治疗 IBS 文献研究及其对 PI-IBS 模型大鼠肥大细胞活化的干预机制 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [39] 朱文莲. 电针不同经穴对肠易激综合征模型大鼠脑肠轴相关神经肽的影响机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [40] 胡斌, 贺玲凤, 张蕊. 橡胶材料弹性模量数字图像相关测定法 [J]. *实验力学*, 2011, 26(2):151-157.
- [41] Goncalves L, Almeida A, Pertovaara A. Pronociceptive changes in response properties of rostroventromedial medullary neurons in a rat model of peripheral neuropathy [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(8):2188-2195.

[收稿日期]2016-11-24

(上接第 11 页)

- [6] 郑国亚, 齐佳, 刘顺梅, 等. 链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠模型的心得体会 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(6):182-185.
- [7] Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, et al. Effect of treatment of high fat fed /low dose streptozotocin-diabetic rats with lepatrilon vascular and neural complications [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668(3):497-506.
- [8] 崔白苹, 高瑾乡, 熊存全, 等. 一种简便、可靠的免疫组化双重标记新方法 [J]. *中国药理学通报*, 2015, (3):436-441.
- [9] 陈玉林, 黄康. 创面愈合的评价指标 [J]. *中国组织工程研究*, 2002, 6(8):1080-1081.
- [10] 刘宸, 章宏伟, 徐宁, 等. 糖尿病大鼠创面愈合中巨噬细胞的浸润变化 [J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(10):1033-1037.
- [11] Majchrzak K, Kaspera W, Szymaś J, et al. Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2013, 47(4):325-331.
- [12] Liu L, Qi T, Liu S, et al. ZEB1 Upregulates VEGF expression and stimulates angiogenesis in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0148774.
- [13] 刘学红, 张泳. C-fos 和增殖细胞核抗原在人胎小肠组织中的表达及意义 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(2):145-148.
- [14] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. *Nature*. 2008, 453(7193):314-321.
- [15] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(3):526.
- [16] 姜大朋, 李昭铸, 张玉波. 肌成纤维细胞在创伤愈合中的地位和作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2006, 10(13):158-160.

[收稿日期]2017-03-17