

深Ⅱ度烫伤后小型猪皮肤愈合的组织病理学研究^{*}

邱波¹ 王艳² 郑晓霞¹ 张海静¹ 张鑫¹ 王凤乾¹ 胡建廷¹

(1. 山东省药学院, 山东省化学药物重点实验室, 济南 2501010)

(2. 山东英才学院, 济南 250104)

摘要:目的 建立猪深Ⅱ度烫伤模型, 观察皮肤在不同时间点修复的组织病理学变化。方法 通过使用恒温烫伤仪制备小型猪皮肤深Ⅱ度烫伤创面。分别在第1、3、7、14、21、28天观察皮肤创伤愈合的肉眼形态学变化并进行创面愈合率的测定, 根据皮肤组织愈合的规律及实验的可操作性, 选择性地在第1、14、28天取样, 利用HE、Masson染色及免疫组化CD31染色的方法观察皮肤在不同时间点修复的动态病理学变化。结果 通过对创面愈合率的测定, 雄性猪与雌性猪相比, 雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。烫伤后皮肤组织经不同染色方法证实损伤已累积到真皮深层, 达到深Ⅱ度烫伤的标准。在随后选择的第14天和28天, 损伤后皮肤组织分别进行了不同程度的组织修复。深Ⅱ度烫伤28d后, 小型猪皮肤已经基本愈合, 但皮肤组织还未完全成熟。除表皮各层相对成熟外, 真皮层内还未完全形成瘢痕组织。结论 雄性猪与雌性猪相比, 雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。

关键词:小型猪; 深Ⅱ度烫伤; 皮肤; 组织病理学

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0005-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.002

烫伤是外科常见的创伤性疾病, 大多数烫伤多为Ⅱ度以下的中、小面积烫伤^[1]。为了更好地研究人类皮肤烫伤这一外科常见疾病, 选择符合临床发病过程和创面主要因素的动物模型至关重要^[2-4]。研究烫伤动物模型应选用与人体结构、功能、代谢及特征相似的动物。小型猪皮肤组织结构与人类很相似^[5], 包括体表毛发的疏密、表皮厚薄、皮下脂肪层、表皮形态学和增生动力学(猪30d, 人21d), 以及皮肤烧伤后的体液和代谢变化等均非常相似, 是进行各种皮肤创伤动物模型制备的理想选择。文献报道的烫伤模型制备方法有电热烫伤和恒温恒压电烫伤, 这些方法在运用当中各有其优缺点^[6-8]。本研究参考上述烫伤方法的条件, 使用恒温烫伤仪, 将恒温烫伤仪探头于110℃下, 持续接触20s, 压力约1000g, 于巴马小型猪背部脊柱侧制备深Ⅱ度烫伤创面, 每个烫伤创面面积约为20cm²。分别在第1、3、7、14、21、28天观察皮肤创伤愈合情况, 根据皮肤组织愈合的规律及实验的可操作性, 选择在第1、

14、28天取样, 利用HE、Masson染色及免疫组化CD31染色的方法观察皮肤在不同时间点修复的动态病理学变化。

1 材料与方法

1.1 动物来源与饲养环境

巴马小型猪普通级, 12只, 雌雄各半, 4~6月龄, 平均体质量14.6kg, 体长约65cm, 体高32cm左右, 胸围55cm; 由北京实创世纪小型猪养殖基地提供, 生产许可证号: SCXK(京)2013 0008, 实验动物质量合格证号: 111014000000241, 试验前适应性饲养1周以上。

饲养条件: 巴马小型猪置不锈钢笼中于普通级环境饲养, 每笼1只。室温19~26℃, 湿度40%~70%, 日温差≤4℃, 换气次数8~10次/h, 昼夜明暗交替时间12h/12h。实验动物使用许可证号: SYXK(鲁)2014 0008。

收稿日期: 2018-08-05

^{*} 基金项目: 山东抗体类和疫苗类生物药物临床前评价公共服务平台的完善与运行(No.2015CXPT00001)

作者简介: 邱波(1983—), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向: 药物的毒性病理学。E-mail: qiubo.1983@163.com

通信作者: 胡建廷(1979—), 男, 副主任药师, 硕士, 研究方向: 药物的毒性病理学。E-mail: jiantinghu@126.com

1.2 试剂及仪器

苏木素-伊红(HE)染色液由珠海贝索生物技术有限公司提供。SP-0023 HistostainTM-Plus Kits 免疫组化试剂盒,规格:18 mL,批号:AG08164417,由北京博奥森生物技术有限公司提供。HT15-1KT Masson 染色试剂盒,规格:50 mL,批号:20170710,由美国 SIGMA-ALDRICH 公司生产。

YLS-5Q 台式超级温控烫伤仪,由济南益延科技发展有限公司生产。

1.3 方法

分别在烫伤后第 1、3、7、14、21、28 天观察皮肤创伤愈合的肉眼形态学变化并进行创面愈合率的测定。创面愈合率的测定方法为在巴马小型猪烫伤后第 1、3、7、14、21、28 天,分别对创面进行拍照,用 ImageJ 图像分析系统测算创面愈合残留面积(newarea at interval time, AI)与愈合面积百分率(healing rate, HR), $HR = (AO - AI) / AO \times 100\%$, AO (original incisional area) 为烫伤后第 1 天创面面积^[9]。选择在第 1、14、28 天的皮肤创面上分别切取约 1.5 cm×1.0 cm×1.0 cm 的皮肤组织,经 10% 甲醛液固定进行常规脱水、包埋、石蜡切片、HE 染色,并根据说明书步骤分别进行免疫组化 CD31 染色和

Masson 染色^[10]。

1.4 统计方法

采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计分析。定量指标采用均数±标准差描述。用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学检验;差异有统计学意义时($P \leq 0.05$),所有检验均为双侧检验 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 创面大体观察

烫伤制备后,创面呈现与烫伤探头形状相同的圆形,创面发白,无光泽,偶见轻微出血,烫伤创面与周围组织界限明显,略低于周围正常皮肤,质地较软,无渗出及分泌物。烫伤后第 1 天至 7 天,烫伤表面逐渐由白色转变为暗红色,无异味及分泌物,质地逐渐变硬,多数创面形成焦痂,触之皮革感。第 7 天至第 14 天,烫伤创面全部形成灰色焦痂,创面面积有收缩趋势,有少量创面焦痂部分脱落,脱落后皮肤呈粉红色,触之柔软。烫伤第 14 天至 28 天,烫伤伤口逐渐脱痂,完成再上皮化,脱痂后皮肤多数呈暗红色,少数与正常皮肤颜色相同。创面处有毛发生长。图 1 A-F 分别为烫伤后第 1、3、7、14、21、28 天后的肉眼形态学观察。

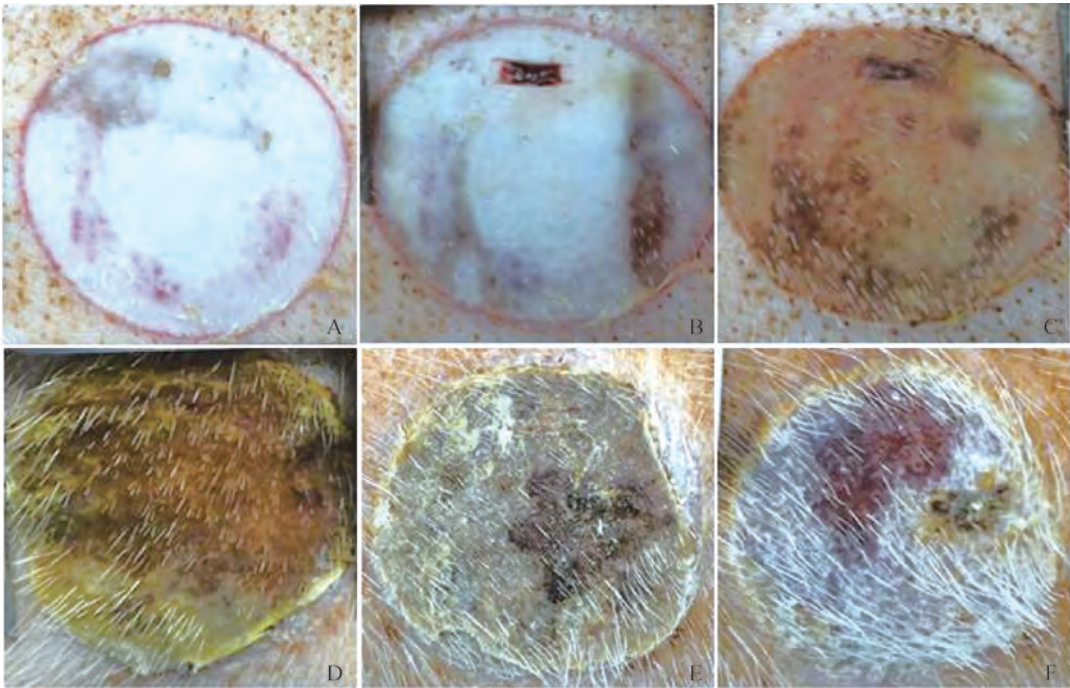


图 1 小型猪背部皮肤烫伤后不同时期的肉眼形态学观察

Fig. 1 The gross morphology of skin wound healing of Minipig after deep second degree burn at different times

2.2 创面愈合率

对不同时间点的创面进行拍照,用 ImageJ 图像分析系统测算创面愈合残留面积 (newarea at interval time,AI) 与愈合面积百分率 (healing rate,HR),巴马小型猪背部皮肤烫伤后不同时期的愈合率见表 1。由表 1 可见,雄性猪与雌性猪相比,雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。

2.3 组织病理学

烫伤皮肤分别经 HE、Masson、CD31 染色方法进行组织病理学检查,图 2A-C 显示损伤已经累积到真皮深层,达到深Ⅱ度烫伤的标准。图 2D-L 显示烫伤后皮肤组织分别在第 14 天和第 28 天修复的组织病理学变化。具体组织病理学变化见图 2。

表 1 巴马小型猪背部皮肤烫伤后不同时期的愈合率

Table 1 Healing rate at different periods after burn on the skin of Ba-Ma Minipig's back

烫伤天数	性别	愈合率/%
第 3 天	♀	2.970± 1.352
	♂	3.503± 2.788
第 7 天	♀	7.312± 1.540
	♂	7.642± 2.170
第 14 天	♀	19.992± 3.417
	♂	13.570± 4.397
第 21 天	♀	36.691± 7.865
	♂	60.965±19.776
第 28 天	♀	76.169±15.302
	♂	92.408± 4.814

注:n=12, $\bar{x}\pm s$ Note:n=12, $\bar{x}\pm s$

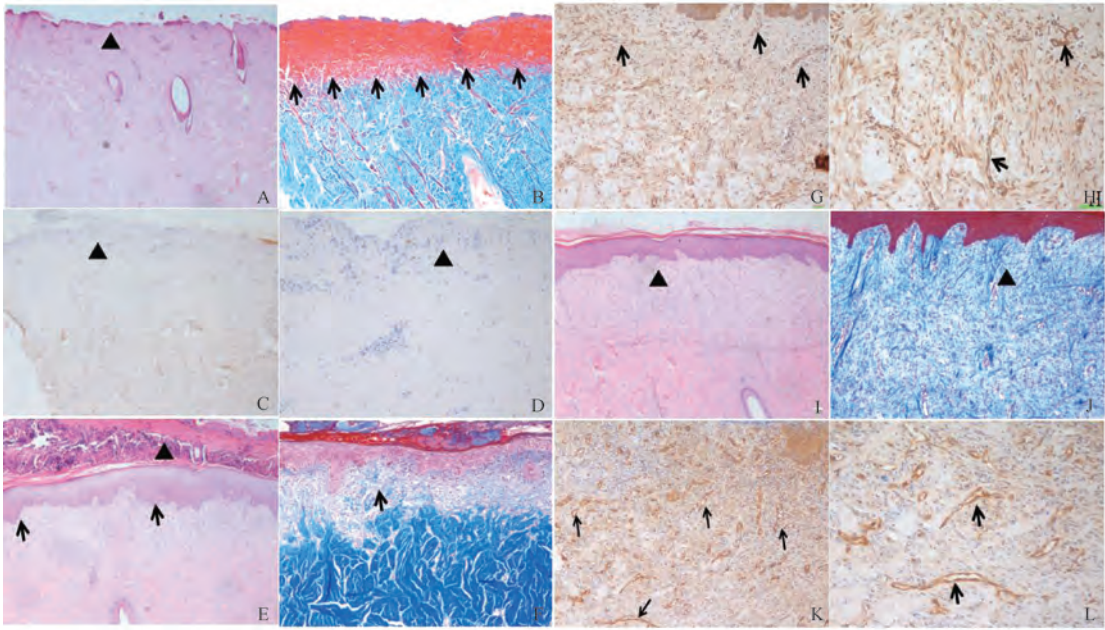


图 2 巴马小型猪深Ⅱ度皮肤烫伤后的病理组织学观察

注:A:烫伤第 1 天:创面表皮全层变性坏死脱落(三角形所示),真皮深层呈凝固性坏死。(HE,×40);B:真皮层内胶原纤维肿胀变性呈均质红染条索状(箭头所示)。(Masson 染色,×100);C:真皮深层显示未见标记的血管内皮细胞(三角形所示)。(CD31 染色,×100);D:图 C 高倍镜下观察(三角形所示)。(HE,×200);E:烫伤第 14 天:创面由新生表皮覆盖,表皮局灶性上皮岛增生(箭头所示),还可见表皮上方的结痂(三角形所示)。(HE,×40);F:真皮深层内有少量淡染的胶原纤维(箭头所示)。(Masson 染色,×100);G:烫伤第 14 天:创面有少量血管(箭头所示)。(CD31 染色,×100);H:图 G 的高倍镜下观察(箭头所示)。(HE,×200);I:烫伤第 28 天:创面完全由新生表皮覆盖(三角形所示),真皮深层内含有较多的肉芽组织。(HE,×40);J:真皮深层内有多量淡染的胶原纤维(三角形所示)。(Masson 染色,×100);K:烫伤第 28 天,创面有大量血管(箭头所示)。(CD31 染色,×100);L:图 K 的高倍镜下观察(箭头所示)。(HE,×200)

Fig. 2 Histopathological observation on skin wound healing of minipig after deep second degree burn

Note: A:On the first after burn,The epidermis show degeneration, necrosis and exfoliation (triangle), dermal manifeste as coagulative necrosis. (HE,×40); B:Collagen fibers in the layer of the dermis show swelling and degeneration, stained homogene ous red dyed cords(arrow). (Masson,×100); C:CD31 staining showed there is no blood vessel(triangle) (CD31 staining,×100); D:Higher magnification of FigureC (triangle). (HE,×200); E:On the 14th post burn, the wound covered with the newly grown epithelium, epithelial islands hyperplasia (arrow)and scab(triangle). (HE,×40); F:A small amount of lightly stained collagen fibers in the deep dermis (arrow). (Masson,×100); G: On the 14th, a little of blood vessel can be seen in the wound. (CD31,×100); H:Higher magnification of FigureG (arrow). (HE,×200); I:On the 28th, The wound is completely covered by the new epidermis(triangle), the more granulation tissue is present in the deeper layer of the dermis. (HE,×40); J:Lightly stained collagen fibers in the deep dermis (triangle). (Masson,×100); K: On the 28th, a great many blood vessel can be seen in the wound. (CD31,×100); L:Higher magnification of FigureK(arrow). (HE,×200)

3 讨论

皮肤创伤愈合包括各种组织的再生和肉芽组织增生、瘢痕组织形成的复杂组合,表现出各种过程的协同作用。而不同层次和深度的皮肤烫伤引起的组织细胞变性坏死,会决定创面的修复方式,并直接影响皮肤的预后^[11]。对于人的皮肤来说:如Ⅰ度烫伤因为基底细胞健在,无需特殊治疗,不影响预后,无疤痕;浅Ⅱ度烧伤累积表皮全层和部分真皮浅层乳头层,真皮层中的毛囊、汗腺和皮脂腺等附属器健在,2周内可以自愈;而深Ⅱ度烧伤累积到真皮深层,真皮层中还有部分的毛囊、汗腺和皮脂腺等附属器健在,需要3~5周才能康复。

本试验通过对烫伤创面的组织学检查,证实损伤已经累积到真皮深层,建立了猪深Ⅱ度烫伤模型。随后观察深Ⅱ度烫伤的皮肤在不同时间点修复的病理学变化。肉眼形态学观察,烫伤后第1天至7天,烫伤表面逐渐由白色转变为暗红色,无异味及分泌物,质地逐渐变硬,多数创面形成焦痂,触之皮革感。第7天至第14天,烫伤创面全部形成灰色焦痂,创面面积有收缩趋势,有少量创面焦痂部分脱落,脱落后后的皮肤呈粉红色,触之柔软。烫伤第14天至28天,烫伤伤口逐渐脱痂,完成再上皮化,脱痂后皮肤多数呈暗红色,少数与正常皮肤颜色相同。创面处有毛发生长。愈合率结果显示,雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。组织病理学变化显示,烫伤后第1天,烫伤早期时创面表皮全层变性坏死脱落,真皮深层组织呈凝固性坏死,坏死组织内的胶原纤维经Masson染色染为橘红色,也未见标记的血管内皮细胞。烫伤后第14天,以肉芽组织增生为主。创面基本由新生表皮覆盖,表皮中局灶性上皮岛增生,皮肤附件修复良好。真皮深层中可见新生的肉芽组织及少量的胶原纤维

生成,肉芽组织内血管数量相对较少。烫伤第28天,皮肤已经基本愈合。除表皮各层相对成熟外,真皮层内还含有肉芽组织及胶原纤维,肉芽组织内的血管数量及胶原纤维的含量均较烫伤后第14天增多,但该时期内皮肤组织还未完全成熟,此期内肉芽组织还是在向瘢痕组织进行转变,这一转变过程可能还需要一段时间来完成皮肤组织的完全修复。

参考文献

- [1] 钟志勇,谢超敏,严家荣,等.比较烫伤和烧伤致小型猪皮肤深二度损伤的异同[J].实验动物科学,2012,29(4):29-33.
- [2] 孙同柱,付小兵,陈伟,等.防疤烧伤膏与京万红促进烫伤创面愈合作用的比较研究[J].中国临床康复,2002,6(20):3106-3107.
- [3] 付小兵,程飏,盛志勇.创面愈合与瘢痕形成的分子学研究[J].中国临床康复,2002,6(4):464-466.
- [4] Somboonwong J, Thanamitramaness S, Jariyapongskul A, et al. Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats.[J] Journal of the Medical Association of Thailand, 2000,83(4):417-425.
- [5] 张静,赵自刚主编.医学科研方法学[M].北京:军事医学科学出版社,2008:103-104.
- [6] 付小兵,王德文.现代创伤修复学[M]北京:人民军医出版社,1999:213-233.
- [7] 施新猷.医用实验动物学[M].西安:陕西科学技术出版社,1989:64-67.
- [8] Singer A, Thode H Jr, McClain S. The effect of octylcyanoacrylate on scarring after burns. [J]. Academic Emergency Medicine,2001,8:107-111.
- [9] 李学川,郇京宁,章雄,等.猪深Ⅱ度烫伤早期磨结痂术后创面组织学改变及CK和EGFR表达[J].上海交通大学学报(医学版),2009,29(5):554-557.
- [10] 温馨蔚,崔瑜霞,余蓉.纤维结合蛋白复方制剂在创伤修复模型上的实验研究[J].华西药科学杂志,2011,26(5):463-465.
- [11] 李敏,姚梅宏,曾玲. PASM-Masson 染色法在肾穿刺活检特殊染色中的应用与体会[J].临床与实验病理学杂志, 2014,30(6): 693-694.

Histopathological Study on Skin Wound Healing of Minipig after Deep Second Degree Burn

QIU Bo¹, WANG Yan², ZHENG Xiaoxia¹, ZHANG HaiJing¹, ZHANG Xin¹, WANG Fengqian¹, HU Jianting¹
(1. Shandong Pharmaceutical Academy, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China)
(2. Shan Dong Ying Cai University, Jinan 250104, China)

Abstract: Objective To establish the model of porcine deep second degree burn and observe the histopathological changes of the skin at different time points. **Method** Use the constant temperature water bath to prepare minipig deep second degree burn. The morphological changes of the wound were observed and the healing rate was measured on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day, respectively. According to the rule of skin tissue healing and the operability of the experiment, scalded tissue was sampled on the 1st, 14th and 28th day, respectively. The histopathological changes of the skin were observed at different time points by HE, Masson staining and immunohistochemical staining with anti-CD31 antibody on the 1st, 14th and 28th day. **Result** Postburn skin tissue has accumulated into the deep dermis and is confirmed to reach the standard deep second degree burn by using the different methods. On the 14th and 28th day of the postburn, different degrees of tissue repair is performed on the damaged skin respectively. On the 28th day of deep second degree burn, the skin has basically healed, but the skin tissue has not yet fully matured. In addition to the relatively mature layers of the epidermis, the dermis has not yet fully formed the scar tissue. **Conclusion** The healing rate of male pigs is faster than female pigs. **Key words:** minipig; deep second degree burn; skin; histopathology

(上接第 4 页)

Analysis of Proficiency Testing Results of Laboratory Animals' Genetic Quality during 2011—2017

WANG Hong, WEI Jie, FU Rui, GONG Wei, XIANG Xinhua, YUE Bingfei
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective Proficiency testing (PT) during 2011—2017 were evaluated in order to find problems of laboratories and to understand the change of the testing capacity of laboratories. **Method** According to ISO/IEC 17043, six PT were carried on and the change of the testing capacity was analyzed. The capacity of all the laboratories was evaluated. **Result** Totally 57 laboratories participated in the six PT. The average satisfaction rate was 82.5%. The satisfaction rate of six PT was 60.0%, 80.0%, 90.0%, 80.0%, 90.9% and 81.8%, respectively. **Conclusion** PT can help laboratories to increase their testing capacity and strengthen the system construction of laboratory animals' quality monitoring. **Key words:** proficiency testing; laboratory animal; genetic quality evaluation