

张百荣,李梦秋,范华娜,等. 慢性皮肤溃疡大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 392-399.

Zhang BR, Li MQ, Fan HN, et al. Rat models of chronic skin ulcers: a comparative study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 392-399.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.012

慢性皮肤溃疡大鼠模型的比较研究

张百荣^{1#}, 李梦秋^{1#}, 范华娜¹, 沈志滨¹, 尹永芹¹, 陶曙红¹, 郑芳昊², 陈艳芬^{1*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2. 佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

【摘要】 目的 采用不同方法构建大鼠慢性皮肤溃疡模型,通过多种指标比较评价不同模型的差异和各自特征。**方法** 大鼠随机分为4组,在建立全层皮肤缺损的开放性创面基础上施加不同因素,分别为:皮肤缺损组(皮损组)、皮肤缺损+激素干扰组(皮损+激素组)、皮肤缺损+激素干扰+菌感染组(皮损+激素+菌组)、皮肤缺损+异物组(皮损+异物组);实验期间测量大鼠的体重,观察其活动状态及创面愈合情况,第14天取材,进行溃疡组织局部病理形态学观察,并检测免疫器官脏器指数、血液白细胞水平、肉芽组织中羟脯氨酸(Hyp)、总蛋白和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。**结果** 实验期间各组大鼠体重没有显著性差异,造模后皮损组大鼠创面愈合较快,皮损+激素组的“难愈”现象维持时间相对较短,皮损+异物组前期新生肉芽颜色灰白,但后期肉芽生长速度较快,而皮损+激素+菌组创面出现黄脓、肉芽组织生长速度较慢的特征;病理形态学观察显示,皮损+激素+菌组、皮损+异物组的炎症细胞浸润现象明显;与皮损组比较,其他3个模型组表现出脾指数增加、白细胞水平增加、创面组织羟脯氨酸含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而且皮损+激素+菌组的总蛋白含量明显降低($P < 0.05$),TNF- α 含量明显增加($P < 0.05$)。**结论** 在全层皮肤切除基础上叠加不同干预因素后,大鼠皮肤溃疡的愈合速度不同程度减慢,其中又以皮损+激素+细菌模型病理特征较稳定、持续时间长,可作为慢性难愈性皮肤溃疡的首选模型;皮损+激素、皮损+异物模型可能更适合短期难愈创面的有关研究,后者还可用于观察创面早期单纯肉芽生长情况的实验。

【关键词】 慢性皮肤溃疡模型;大鼠;比较研究;糖皮质激素;金黄色葡萄球菌;异物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0392-08

Rat models of chronic skin ulcers: a comparative study

ZHANG Bairong^{1#}, LI Mengqiu^{1#}, FAN Huana¹, SHEN Zhibin¹, YIN Yongqin¹, TAO Shuhong¹,
ZHENG Fanghao², CHEN Yanfen^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China.
2. Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000)
Corresponding author: CHEN Yanfen. E-mail: xwnai@163.com

【Abstract】 Objective To establish rat models of chronic skin ulcers by various methods and compare the differences and characteristics of the different models through various indexes. **Methods** Male SD rats were randomly divided into four groups and treated with various factors after creating a wound surface by removing back skin: skin defect, hydrocortisone (skin excision + hydrocortisone intervention), hydrocortisone plus bacterial interference (skin excision + hydrocortisone + bacterial intervention), and implantation of a foreign body (skin excision + embedded foreign body) groups. The body weight and wound healing of rats were measured each day and the wound state was observed. Materials were drawn from all groups at 14 days after the operation to assess histological changes, the immune organ index, blood leukocyte level, hydroxyproline (Hyp), total protein, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) content in the skin ulcer. **Results** No significant difference in

[基金项目] 佛山市军民融合及可持续发展科技项目(2018AG100091)。
Foshan Military-Civilian Integration and Sustainable Development Technology Project(2018AG100091)。
[作者简介] 张百荣(1998—),男,硕士研究生,研究方向:中药药效评价与应用研究。Email: 1653481437@qq.com;
李梦秋(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药药效评价与应用研究。Email: 786514668@qq.com。
#共同第一作者
[通信作者] 陈艳芬(1977—),女,教授,研究方向:中西医结合药理研究方法及动物模型研究,中药药效评价及作用机制研究。
Email: xwnai@163.com

the body weight of rats in each group was found during the experimental period. The skin wounds of rats in the skin defect group healed faster, the symptom duration of chronic skin ulcers in the hydrocortisone group was shorter, and the color of granulation tissues in the implantation of the foreign body group was gray in the early stage, but the granulation grew faster in the later stage, while the hydrocortisone plus bacterial interference group had yellow pus in wounds and slow growth of granulation tissue. Pathomorphological observation showed severe inflammatory cell infiltration in hydrocortisone plus bacterial interference and implantation of foreign body groups. Moreover, compared with the skin defect group, the model groups showed increases in the spleen index, leukocyte level, and hydroxyproline content in wound tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and in the skin lesion + hormone + bacteria group, total protein content was decreased obviously ($P < 0.05$), while TNF- α content was increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** After applying various intervention factors based on full-thickness skin resection, the healing speed of rat skin ulcers was slower than that of simple skin resection. Among them, the pathological characteristics of the skin lesion + hormone + bacteria model were more stable and long lasting. It can be used as the preferred model of chronic refractory skin ulcers, whereas the skin excision + hydrocortisone intervention and skin excision + foreign body embedded models may be more suitable to study short-term refractory wounds, and the embedded foreign body can be used to observe the growth of simple granulation in the early stage.

【Keywords】 chronic skin ulcers model; rat; comparative study; glucocorticoid; *staphylococcus aureus*; foreign body
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

皮肤作为人体最大的器官,保护机体内各种器官和组织免受外界环境中机械性、物理性、化学性和生物性等有害因素的损伤,但同时也容易由各种内、外因素引起皮肤疾患^[1]。皮肤溃疡是临床的常见病、多发病,指各种原因引起的局部皮肤组织缺损,创口暴露容易感染,尤其是慢性皮肤溃疡长期不能愈合或易复发,治疗比较棘手,严重影响患者的生活质量,并带来一定的社会负担^[2-3],临床上亟需更多安全、有效、经济的治疗方式及药物的研究开发^[1,4]。优质的动物模型是开展皮肤病病因病机及治疗药物研究的重要工具,由于慢性皮肤溃疡的病因及发病机制不尽相同,虽有多种动物造模方法供研究选择^[5],但与人体慢性皮肤溃疡过程仍然有一定差距,且不同模型之间缺乏横向比较,难以为研究者选择合适的动物模型提供参考。因此,为了建立操作便捷且创面愈合速度较慢的皮肤溃疡模型,本研究在全层皮肤切除模型的基础上叠加不同处理条件,如细菌感染、激素干预、埋置异物等,多因素模拟皮肤溃疡病症,并从动物体征、创面愈合情况、炎症等病理变化、局部组织生化指标等综合比较各模型的特点,构建符合临床病理特征的慢性难愈性皮肤溃疡模型,以期对相关研究提供实验动物模型方法学借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

28 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 200 ~

240 g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2018-0002】。于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养【SYXK(粤)2017-0125】,饲养环境室温为 24 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 光照、12 h 黑暗循环饲养,喂食普通饲料,自由进食、饮水。实验内容和过程符合广东药科大学实验动物中心动物伦理审查委员会批准。(审批号:gd pulacCVF2017103)。

1.1.2 实验菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,临床菌株, MSSA23),由广东莱恩医药研究院赠与。

1.1.3 主要试剂与仪器

注射用氢化可的松琥珀酸钠(HSS),批号:011910032,天津生物化学制药有限公司;4%多聚甲醛溶液,批号:70110900,广州赛国生物科技有限公司;白细胞稀释液,批号:20201215,Phygene;羟脯氨酸试剂盒,批号:20210108,南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白浓度试剂盒,批号:P0012,上海碧云天生物技术有限公司;Rat TNF- α Elisa 试剂盒,批号:GR2021-06,武汉基因美生物科技有限公司。

分析天平(SHIMADZU,日本);医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);全自动酶标仪(BioTek Instruments,美国);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);病理切片机(上海莱卡仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

大鼠适应性饲养 3 d,造模前 1 d 进行大鼠背部脱毛。28 只大鼠按照体重随机分组:皮肤缺损组

(皮损组)、皮肤缺损+激素干扰组(皮损+激素组)、皮肤缺损+激素干扰+菌感染组(皮损+激素+菌组)、皮肤缺损+异物组(皮损+异物组),每组 7 只。

造模方法:首先,所有大鼠建立全层皮肤缺损的开放性创面模型,麻醉后用直径为 20 mm 的塑料瓶盖在造模区(腰椎正中偏上)标记造模面积,乙醇棉球皮肤消毒,沿标记线剪去皮下组织至肌筋膜,止血。皮肤缺损组不做其他处理;皮肤缺损+激素干扰组在创面模型建立后,即刻予以氢化可的松琥珀酸钠单次肌肉注射,剂量为 80 mg/kg^[6-7];皮损+激素+菌组在筋膜下注入 1 mL(每毫升 10 亿个)金黄色葡萄球菌悬液,3 层医用纱布覆盖创面,即刻单次肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠,剂量为 80 mg/kg^[8];皮肤缺损+异物组在皮肤剪开后,将 1 个内径为 20 mm,高度 5 mm,长度约 63 mm 的硅胶管埋入背部,深达肌筋膜深层^[9],造模时放置硅胶管于造模区域皮下,使用手术缝线将皮肤与硅胶管进行对角固定,一共固定 4 处。待大鼠自然苏醒后分笼饲养至实验结束。

1.2.2 观察指标

(1)一般体征:造模后,每日观察并记录各组大鼠的体重、进食量、饮水量、损伤部位局部温度等。

(2)创面愈合率及外观观察:造模次日起,每日观察大鼠创面愈合情况,计算愈合率。创面溃疡愈合率(%)=(原始创面面积-第 n 天创面面积)/原始创面面积×100%,使用 NIH Image J 图像分析软件测量创面面积^[7],计算创面愈合率,参考文献并进行调整,大鼠皮肤溃疡外观评分细则如下^[10],3 个指标的评分之和为各大鼠的综合评分:a:溃疡面颜色,0 分:红润;2 分:暗红;4 分:灰白;6 分:紫黑;b:溃疡皮损表面分泌物及气味,0 分:无分泌物;2 分:少量,略带腥味;4 分:中等量,腥味明显;6 分:大量,腥秽恶臭;c:新生肉芽组织生长情况,0 分:生长迅速;2 分:生长较快;4 分:生长缓慢;6 分:无生长。

(3)病理组织学观察:模型建立后第 14 天,麻醉大鼠,剪取每只大鼠约 3~5 cm² 创面肉芽组织,生理盐水清洗后,4%多聚甲醛溶液固定。经过不同浓度乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片;脱蜡后以苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin)染色,中性树脂胶封片,常规光镜观察(100×)溃疡创面炎性细胞、肉芽组织、胶原纤维、新生血管生长等病理变化。

(4)大鼠白细胞水平:大鼠眼眶采血,移液枪吸取 20 μL 血液,加入 0.38 mL 白细胞稀释液,立即反

复吹打混匀血液,后滴加到计数板上,在光学显微镜下计数。

(5)免疫器官脏器指数:摘取大鼠胸腺及脾脏,精密称重并计算脏器指数。脏器指数计算公式如下:胸腺指数(%)=胸腺重量(g)/大鼠体重(100 g);脾脏指数(%)=脾脏重量(g)/大鼠体重(100 g)。

(6)ELISA 法检测溃疡组织 TNF-α 水平:剪取新生肉芽组织,生理盐水清洗后,转至-20℃保存;择日取肉芽组织制备 10%匀浆液,按照 TNF-α 试剂盒进行检测,计算肉芽组织中 TNF-α 含量。

(7)生化法测定组织总蛋白和 Hyp 含量:取肉芽组织制备 10%匀浆液,按照 BCA 蛋白试剂盒进行检测,计算肉芽组织中总蛋白含量。采用碱水解法测定 Hyp,严格按试剂盒说明书操作,计算肉芽组织中 Hyp 含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本间的比较采用单因素方差分析,根据方差齐性检验,方差齐及不齐时分别使用 LSD 法和 Tamhane's T2 分析。 $P < 0.05$ 说明差异具有显著性, $P < 0.01$ 说明差异极具显著性。

2 结果

2.1 大鼠体征变化

造模后第 1 天,各组大鼠体重有所下降,进食量减少,出现尾冷、蜷卧等症状,但随后各组大鼠体重逐渐上升,造模期间各组大鼠体重之间无统计学差异(见图 1A)。造模期间,各组大鼠进食量均无明显差异;而在造模前 7 d,皮损+激素+菌组大鼠饮水量相对其他 3 组上升(见图 1B)。动物体内发生感染性炎症时,机体温度可能会升高,因此,与其他 3 组比较,造模前 7 d 皮损+激素+菌组大鼠的局部体温相对较高,但统计无显著差异(见图 1C)。

2.2 皮肤溃疡外观评分和愈合率变化

造模后,皮损组大鼠创面红润,分泌物较少,愈合速度快。皮损+激素组创面色泽暗,愈合速度略低于正常组。皮损+激素+菌组大鼠创面在第 1~4 天表现出干燥、凹陷症状,第 5 天开始出现黄脓,肉芽组织生长速度慢。皮损+异物组前 3 d 新生肉芽湿润,第 4 天开始肉芽颜色灰白,第 8 天开始肉芽生长速度加快,创面红润平整。评分结果如图 2A,各组创面愈合情况如图 2B。

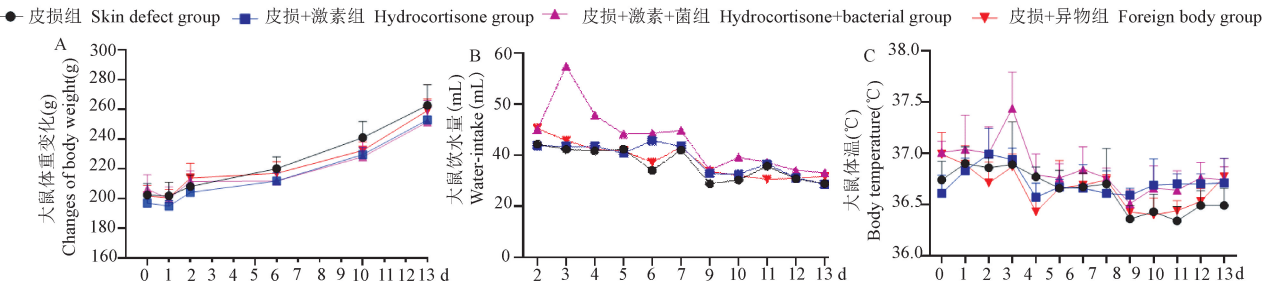
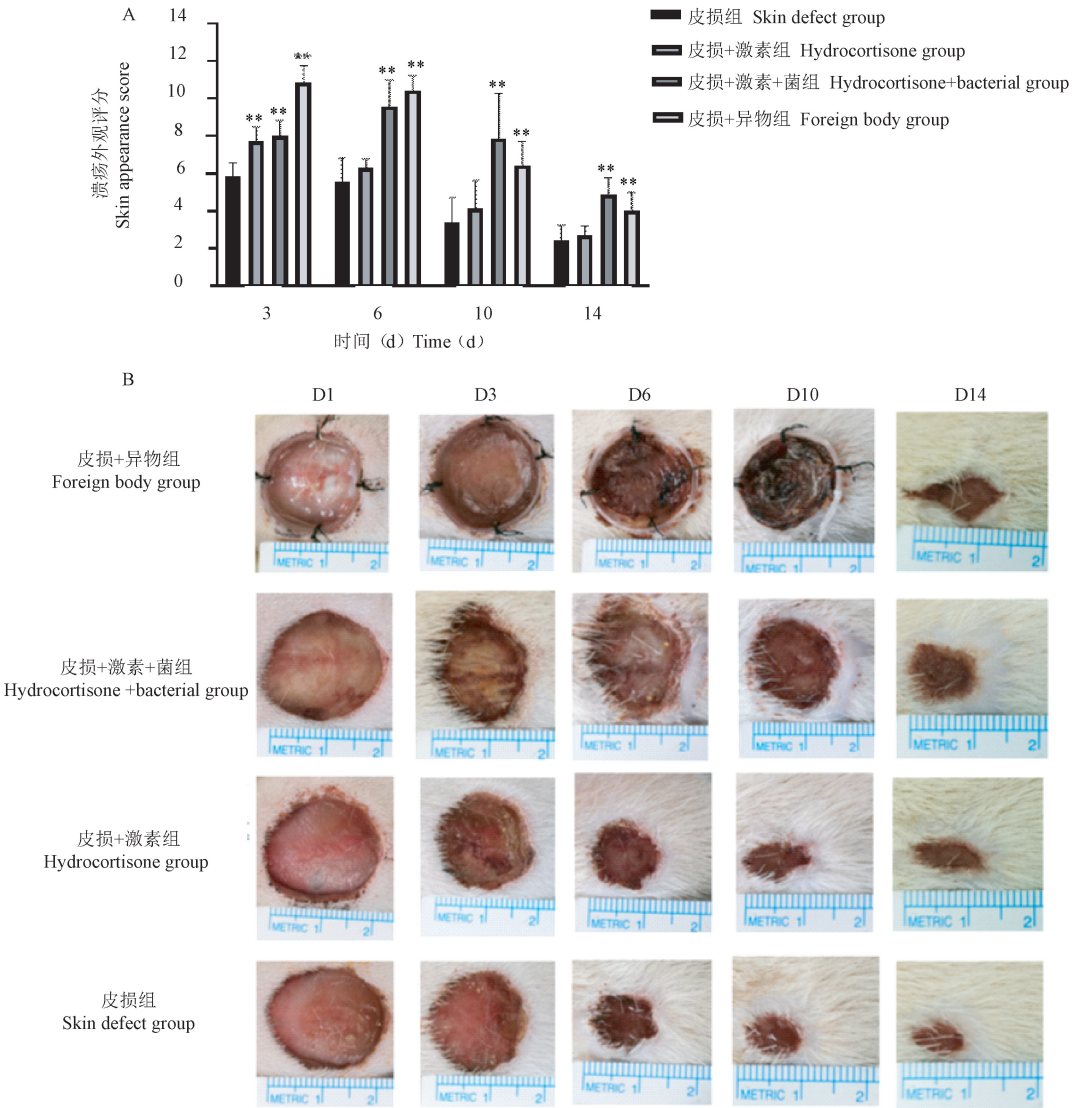


图 1 大鼠体征变化($n = 7$)
Figure 1 Changes in physical signs of rats($n = 7$)



注:与皮肤缺损组相比, ** $P < 0.01$ 。
图 2 大鼠创面愈合变化情况($n = 7$)

Note. Compared with skin defect group, ** $P < 0.01$.
Figure 2 Changes of wounds healing of rats($n = 7$)

对大鼠创面的愈合率进行动态观察发现,与单纯皮损组相比,造模第 3 天,可观察到激素、激素+菌、异物干扰组大鼠的创面愈合率明显较低($P < 0.05$) (见表 1)。但造模第 6 天开始,激素组的愈合开始加快,创面愈合率在 6 ~ 14 d 和单纯皮损组比较均无明显

差异。而皮损+激素+菌组、异物组的愈合率与单纯皮损组比较,仍具有显著差异($P < 0.01, P < 0.05$)。结果表明不同叠加因素确实可以显著减慢大鼠皮肤溃疡的愈合速度,但尤以皮损+激素+菌组和异物组更能体现慢性难愈性皮肤溃疡模型的特点。

表 1 大鼠的创面愈合率($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)
Table 1 Wound healing rate of rats($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)

组别 Groups	D3	D6	D10	D14
皮损组 Skin defect group	16.14 $\pm$ 5.90	55.82 $\pm$ 4.32	83.56 $\pm$ 3.57	91.23 $\pm$ 2.97
皮损+激素组 Hydrocortisone group	7.29 $\pm$ 3.98 *	50.29 $\pm$ 3.88	82.83 $\pm$ 6.41	90.71 $\pm$ 4.65
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	7.27 $\pm$ 8.62 *	8.74 $\pm$ 16.52 **	54.27 $\pm$ 17.17 **	81.26 $\pm$ 7.57 *
皮损+异物组 Foreign body group	4.94 $\pm$ 6.71 *	8.46 $\pm$ 9.23 **	59.45 $\pm$ 13.57 *	82.85 $\pm$ 6.38 *

注:与皮损组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with skin defect group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

2.3 皮肤溃疡形态学观察

用 100 倍光学显微镜观察 HE 染色病理切片,结果显示:皮损组创面炎症细胞浸润较少,毛细血管含量丰富,成纤维细胞数目较多。皮损+激素组肉芽组织中炎症细胞浸润现象明显,创面结构不完整,可见新生血管。皮损+激素+菌组肉芽组织中炎症细胞浸润现象明显,创面结构不完整。皮损+异物组炎症细胞浸润现象明显,成纤维细胞数目少(见图 3)。

2.4 大鼠脏器指数

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,胸腺指数和脾脏指数其数值高低可在一定程度上反应机体免疫功能的状态。与单纯皮损组相比,模型组各组脾脏指数增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示由于慢

性炎症反应的存在可能导致这些大鼠的免疫系统处于失衡状态见表 2。

2.5 大鼠炎症反应水平

如表 3 所示,与单纯皮损大鼠相比,其余 3 组大鼠的血液白细胞水平有所增加,尤以皮损+激素组、皮损+激素+菌组大鼠比较明显。TNF- α 作为机体重要的免疫、炎症调控因子,在创伤愈合过程中发挥着重要作用。结果显示,与单纯皮损大鼠比,3 个模型组肉芽组织的 TNF- α 含量均比单纯皮损组高,且皮损+激素+菌组、皮损+异物组具有显著性差异。上述结果表明激素、细菌感染、异物等施加因素可能通过增强创面组织的炎症反应造成创面难愈,甚至可能引发全身性反应。

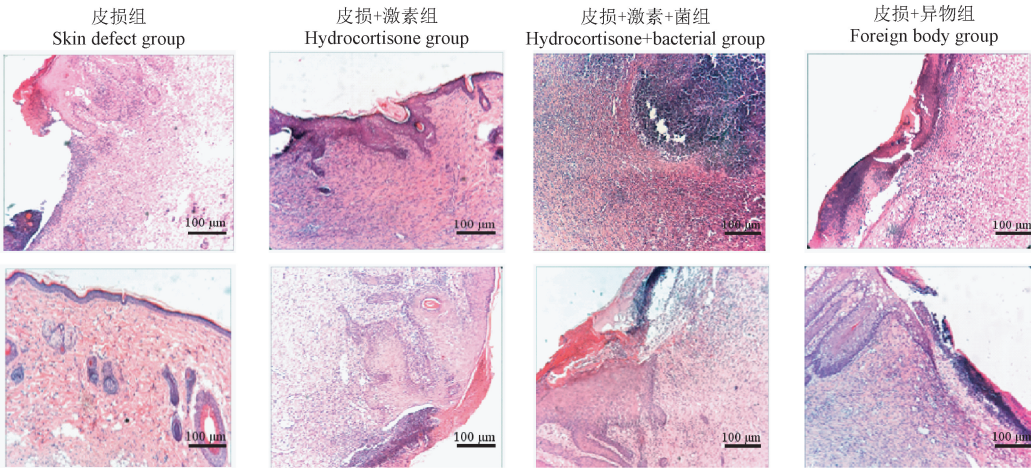


图 3 大鼠创面皮肤形态学
Figure 3 Morphology of wound skin in rats

表 2 各组大鼠免疫器官脏器指数($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)

Table 2 Wound healing rate of rats($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)		
组别 Groups	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index
皮损组 Skin defect group	0.24 ± 0.04	0.37 ± 0.06
皮损+激素组 Hydrocortisone group	0.23 ± 0.03	0.50 ± 0.06 *
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	0.25 ± 0.02	0.52 ± 0.11 **
皮损+异物组 Foreign body group	0.21 ± 0.01	0.42 ± 0.14

表 3 各组大鼠炎症水平($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Inflammation level of rats($\bar{x} \pm s, n = 7$)		
组别 Groups	血 WBC 水平 (× 10 ⁹ /L) WBC levels in blood (× 10 ⁹ /L)	组织 TNF-α (pg/mL) TNF-α content in tissues (pg/mL)
皮损组 Skin defect group	10.14 ± 1.35	301.70 ± 28.89
皮损+激素组 Hydrocortisone group	15.59 ± 2.92 **	303.80 ± 23.93
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	17.25 ± 2.79 **	340.13 ± 18.02 *
皮损+异物组 Foreign body group	11.54 ± 2.33	333.11 ± 37.45 *

2.6 大鼠肉芽组织中羟脯氨酸和总蛋白含量

与单纯皮损组相比,其余 3 个模型组的创面组织羟脯氨酸、总蛋白含量均有所降低,其中尤以皮损+激素+菌组更为明显,与皮损组比较均有极显著差异($P < 0.01$)(见表 4)。

表 4 各组大鼠创面组织羟脯氨酸和总蛋白含量($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Content of hydroxyproline and total protein in wound tissue($\bar{x} \pm s, n = 7$)		
组别 Groups	羟脯氨酸 (μg/mg) Hyp (μg/mg)	总蛋白 (mg/mL) Total protein (mg/mL)
皮损组 Skin defect group	2.11 ± 0.35	5.61 ± 1.38
皮损+激素组 Hydrocortisone group	1.73 ± 0.22 *	4.46 ± 0.70 *
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	1.37 ± 0.24 **	4.02 ± 1.00 **
皮损+异物组 Foreign body group	1.47 ± 0.23 **	4.82 ± 0.61

3 讨论

临床上皮肤溃疡的发病机制复杂,通常可由外伤、感染以及糖尿病等多种原因诱发^[11],因为创面溃烂而长时间不能愈合,病程很长,往往给病人带

来很大的痛苦,因此其治疗方法的研究一直是医学研究中的热点和难点。虽然目前尚未有一种统一共识或指南治疗慢性溃疡^[12],但在基础研究中,一种合适的溃疡动物模型是首当其冲要考虑的关键问题。鉴于皮肤病理生理学的特殊性,针对皮肤溃疡模型的研究并不多,徐凝等^[5]对慢性皮肤溃疡模型进行分类归纳,认为主要分为全层皮肤切除模型和复合损伤溃疡模型,目前远不能满足实验研究的需要,而且各类模型之间缺乏横向比较,特征不清晰。考虑到糖尿病溃疡模型是复合损伤溃疡模型的一种特殊病理情况,是糖尿病动物模型的叠加效应^[5],操作稍显复杂,因此,本实验主要比较研究糖皮质激素、金黄色葡萄球菌、异物三种干预方式建立的大鼠复合损伤慢性皮肤溃疡模型。文献研究表明叠加法建立的模型与中、西医有较高的吻合度^[13],具有临床参考价值。其中,糖皮质激素能抑制蛋白质合成,造成负氮平衡,延缓肉芽组织的形成,诱发或加重感染,使伤口愈合延长及感染^[14],此外,大剂量外源性糖皮质激素造成动物的“耗竭”现象还被认为和中医的阴虚、阳虚状态想接近,因此也有学者认为此动物模型符合肾阳虚疮疡的特点;在皮肤形成创面的基础上使用不同的细菌感染,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌可以模拟伤口感染,可用于研究生物膜的形成^[15-16],且伤口被细菌感染后,皮下中性粒细胞活性被影响,动物模型表现出类似中医“阳证”疮疡特点;异物埋置能影响创伤组织的血液循环和增加物理刺激,从而延迟其愈合时间。因此在造模过程中使用这几种因素分别叠加处理,更能贴近慢性皮肤溃疡的发病机制和病理特征。

根据创面愈合率结果显示,3 种叠加干预因素组的创面愈合速度虽然比单纯皮损组缓慢,但在本研究中发现,单用糖皮质激素对延缓大鼠创面愈合时间作用不明显,这可能和大鼠皮肤的自愈性、激素的使用剂量都有关,而异物埋置或糖皮质激素叠加细菌感染更能有效地延长创面愈合时间。实验中观察到,单纯皮损组大鼠创面红润,且恢复较快,其余 3 组部分出现黄脓、干燥、颜色灰白等现象,肉芽组织的生长速度较慢,创面愈合延长,尤以皮损+激素+菌组比较明显。病理检测结果和外观观察也比较吻合。金黄色葡萄球菌是一种临床上皮肤感染最常见的致病菌,它能够造成局部化脓感染,通过利用分泌毒素、黏附素、胞外酶等物质,对正常的

组织进行摧毁并侵入而引起感染,经常用作构建大鼠的溃疡模型^[17]。实验证明在糖皮质激素的处理基础上再叠加金黄色葡萄球菌感染,能明显延长溃疡愈合时间造成溃疡难以痊愈,是一种难愈性皮肤感染模型。也有文献表明,金黄色葡萄球菌在伤口感染时具有双重作用,小剂量感染时能够加快伤口愈合,大剂量感染时则延缓愈合,因此需要确定感染菌的浓度,避免模型的重复性差^[18]。

皮肤是机体与自然界之间的第一道屏障,创伤后,皮肤组织的完整性被破坏,正常功能也被损坏,创面修复过程也随之启动。伤口的愈合包括止血、炎症、增殖和重塑 4 个阶段,任何一个阶段出现异常,都可能导致伤口愈合时间延长^[19]。血液白细胞水平可以从宏观上反映机体炎症水平,TNF- α 作为炎症介质,主要由活跃的巨噬细胞和单核细胞分泌,具有广泛的生物学活性,在皮肤创面中的含量可以反应出体内炎症的变化情况。与单纯皮损大鼠相比,其余 3 个模型组肉芽组织的白细胞水平、TNF- α 含量有所升高,尤其以皮损+激素+菌组变化明显,统计均具有显著性差异,表明激素、细菌感染、异物等施加因素可能主要通过影响创面愈合过程中的炎症阶段造成创面难愈。皮肤创面中肉芽组织的填充是愈合的重要条件,其中存在大量的成纤维细胞和巨噬细胞。在肉芽的形成过程中由随机排列的胶原蛋白纤维构成骨架,羟脯氨酸是胶原合成的重要原料,它能间接反映胶原的含量,是较好的创面评价指标。肉芽组织的生长过程伴随着蛋白质的合成,而蛋白质的合成受细胞内基因的调控,因此肉芽组织中蛋白质的含量可反映出细胞的增殖速度,进一步反映出创面的愈合速度^[20]。与单纯皮损组相比,其余 3 个模型组的创面组织羟脯氨酸、总蛋白含量均有所降低,尤以皮损+激素+菌组更为明显。此外,在实验期间还对大鼠的体重、进食量、饮水量、局部温度进行了动态观察记录,结果显示造模期间各组大鼠体重、进食量之间无统计学差异,但皮损+激素+菌组的饮水量、局部温度在造模前 7 d 呈现偏高的趋势,这也符合中医“阳证”疮疡特点。

现代医学研究的一个重要手段是建立疾病动物模型,有利于研究人类疾病产生、发展、预防^[21]。综上,本研究结果表明,由于实验动物皮肤的自愈性,在造模后期,单纯激素的干扰并不能长时间维持难愈创面;而激素+菌的干预使动物创面脓性分

泌物较多,感染现象明显,创面维持时间可达 20 d,更符合慢性难愈性溃疡防治研究,尤其是抗感染类的药物研发;异物干预由于造模是使用塑料圆环缝合的方式进行,在前期通过限制周围正常皮肤的收缩造成难愈,创面肉芽色泽暗淡,后期随着皮肤逐渐愈合可能会出现塑料圆环的破坏,新生肉芽组织增殖较快,实验中第 10 天愈合率开始超越“皮损+激素+菌”组,因此异物埋置模型可能更适合短期难愈创面有关研究以及创面早期单纯观察肉芽生长情况的实验,上述研究结果将为皮肤疾病相关研究模型的选取及临床病因病机研究提供参考依据。在后续的工作中,还可以结合行为学指标、生化指标、病理特征、药物反证等继续探讨不同的因素对慢性皮肤溃疡病证结合动物模型的影响。

参 考 文 献 (References)

- [1] 王晖. 皮肤外用药物研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2017 年.
Wang H. Research methodology for topical derma medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2017.
- [2] 甘丽莉, 熊娜, 刘燕飞. 水凝胶药物支架修复皮肤创面: 临床应用可能性的挑战 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25 (22): 3578-3583.
Gan LL, Xiong N, Liu YF. Hydrogel as drug scaffold in skin wound repair: challenges of clinical application possibilities [J]. Chin J Tis Eng Res, 2021, 25(22): 3578-3583.
- [3] Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review [J]. Syst Rev, 2017, 6(1): 15.
- [4] Powers JG, Higham C, Broussard K, et al. Wound healing and treating wounds: chronic wound care and management [J]. J Am Acad Dermatol, 2016, 74(4): 607-625.
- [5] 徐凝, 吴闽枫, 段彦娟. 慢性皮肤溃疡动物模型的研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(5): 704-707.
Xu N, Wu MF, Duan YJ. Research progress of animal models of chronic skin ulcer [J]. J Basic Chin Med, 2020, 26(5): 704-707.
- [6] 朱桂松. 黄蜀葵花总黄酮对慢性难愈性创面修复作用及其效应机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2018.
Zhu GS. Research into the repair effect and mechanism of total flavone of abelmoschus manihot on chronic and refractory wound healing [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2018.
- [7] 李利青, 林也, 葛斌, 等. 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏干预 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进体表慢性难愈合创面修复的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(5): 583-590.
Li LQ, Lin Y, Ge B, et al. MEBT/MEBO promoted chronic non-healing cutaneous wound by modulating the PI3K-Akt-mTOR

- signaling pathway [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(5): 583–590.
- [8] 朱朝军, 张朝晖, 张杨, 等. 基于药疮交互作用探讨假脓长肉法对大鼠慢性皮肤溃疡肉芽物质变化的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(6): 877–881.
- Zhu CJ, Zhang ZH, Zhang Y, et al. Effects of therapy of wound pus promoting granulation tissue growth on related factors of granulation tissue in rat chronic skin ulcers based on drug-wound Interaction [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2017, 34(6): 877–881.
- [9] 席建元, 贺春辉, 左和宁, 等. 象皮生肌散对实验大鼠慢性皮肤溃疡表皮生长因子表达影响的研究 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2010, 9(4): 213–215.
- Xi JY, He CH, Zuo HN, et al. Effect of xiangpi shengji powder on the expression of epidermal growth factor on chronic skin ulcer of rat [J]. Chin J Dermat Integr Tradit West Med, 2010, 9(4): 213–215.
- [10] 陈明岭, 耿福能, 沈咏梅, 等. 康复新液治疗慢性皮肤溃疡多中心随机对照临床研究 [J]. 中医杂志, 2019, 60(15): 1308–1311.
- Chen ML, Geng FN, Shen YM, et al. A multi-center, randomize-controlled clinical trial of kangfuxin solution for patients with chronic skin ulcer [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60(15): 1308–1311.
- [11] Gomes A, Teixeira C, Ferraz R, et al. Wound-healing peptides for treatment of chronic diabetic foot ulcers and other infected skin injuries [J]. Molecules, 2017, 22(10): 1743.
- [12] Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency [J]. Int Wound J, 2016, 2(2): 5–15.
- [13] 吴瑞, 李秀敏, 苗明三. 基于中西医临床病症特点的慢性皮肤溃疡动物模型分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 782–785.
- Wu R, Li XM, Miao MS. Analysis of animal models of chronic skin ulcers based on characteristics of clinical symptoms of traditional Chinese and Western medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(4): 782–785.
- [14] 夏正坤. 糖皮质激素临床应用再认识 [J]. 医学研究生学报, 2018, 31(2): 113–117.
- Xia ZK. The recognition of clinical application of glucocorticoids [J]. J Med Postgrad, 2018, 31(2): 113–117.
- [15] Haisma EM, Rietveld MH, de Breij A, et al. Inflammatory and antimicrobial responses to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound infection model [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82800.
- [16] Serra R, Grande R, Butrico L, et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(5): 605–613.
- [17] Deng Z, Liu F, Li C. Therapeutic effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation solution against wound infection with drug-resistant bacteria in a rat model: an animal study [J]. Bone Joint Res, 2019, 8(5): 189–198.
- [18] 李媛. 糖尿病慢性皮肤溃疡阴证模型建立与回阳生肌膏对糖尿病阴证溃疡创面不同时相的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2014.
- Li Y. Establishment of Yin syndrome model of diabetic chronic skin ulcer and effect of Huiyang shengji ointment on different phases of diabetic Yin syndrome ulcer wound [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2014.
- [19] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: a cellular perspective [J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 665–706.
- [20] 房志锐, 陈璐, 李春晓, 等. 芍药苷促进糖尿病创面愈合 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(8): 1084–1091.
- Fang ZR, Chen L, Li CX, et al. Paeoniflorin accelerates diabetic wound healing [J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(8): 1084–1091.
- [21] 刘志学, 余琛琳, 蔡丽萍, 等. 人类疾病动物模型制备效果评价软件应用评测 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10): 28–32.
- Liu ZX, Yu CL, Cai LP, et al. Application evaluation of assessment software for replication effect of human disease model [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(10): 28–32.

[收稿日期] 2021-10-12