

# 慢性难愈合创面动物模型的研究进展

李文华<sup>1</sup>, 刘 筱<sup>1</sup>, 周雯婷<sup>1</sup>, 杨 敏<sup>1</sup>, 曾娟妮<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙, 410005)

[关键词] 慢性难愈合创面; 动物模型; 综述; 学术性

[中图分类号] RR269. 32, R965. 1

[文献标识码] A

DOI: 10. 16808/j. cnki. issn1003 - 7705. 2018. 08. 103

慢性难愈合创面是指因多种外界或内在因素引起经治疗 1 个月以上愈合进展缓慢或仍未愈合的创面, 主要包括创伤性溃疡、糖尿病溃疡、压疮、动静脉溃疡、癌性溃疡及感染

性溃疡等<sup>[1]</sup>。该疾病由于多种复杂的内外因素综合作用, 致使创面存在持续的感染及慢性炎症而迁延难愈, 所以在实验中动物模型应体现这一特点。因此, 不断改进慢性难愈

[25] Sharma RD, Raghuram TC, Rao NS. Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes [J]. Eur J clin nutr, 1990, 44(4): 301 - 306.

[26] 周吉银, 江明金, 周世文, 等. 葫芦巴调脂有效成分及其作用机制研究概述[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 157 - 160.

[27] 麦紫欣, 关东华, 林敏霞, 等. 膳食纤维降血脂作用及其机制的研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2011, 18(1): 11 - 16.

[28] Yousefi E, Zareiy S, Zavoshy R, et al. Fenugreek: A therapeutic complement for patients with borderline hyperlipidemia: A randomised, double - blind, placebo - controlled, clinical trial [J]. Advances in Integrative Medicine, 2016(12): 2.

[29] Ilavenil S, Arasu MV, Lee JC, et al. Trigonelline attenuates the adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3 - L1 cells [J]. Phytomedicine, 2014, 21(5): 758 - 765.

[30] 孙国栋, 李新霞, 李琳琳, 等. 葫芦巴提取物化学成分含量测定及体外抗氧化研究[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(6): 772 - 776.

[31] Naidu MM, Shyamala BN, Naik JP, et al. Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds [J]. LWT - Food Science and technology, 2011, 44(2): 451 - 456.

[32] 卢芙蓉, 秦铀, 沈霖, 等. 葫芦巴提取物对肾病综合征大鼠肾损伤的保护作用[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(6): 281 - 284.

[33] 史江华, 李多伟, 逢敏杰, 等. 葫芦巴研究新进展[J]. 西北药学杂志, 2007, 22(3): 153 - 155.

[34] Xue W, Lei J, Li X, et al. Trigonella foenum graecum seed extract protects kidney function and morphology in diabetic rats via its antioxidant activity [J]. Nutrition Research, 2011, 31(7): 555 - 562.

[35] Kuhlmann CRW, Schaefer CA, Kosok C, et al. Quercetin - induced induction of the NO/cGMP pathway depends on  $Ca^{2+}$  - activated  $K^{+}$  channel - induced hyperpolarization - mediated

$Ca^{2+}$  - entry into cultured human endothelial cells [J]. Planta medica, 2005, 71(6): 520 - 524.

[36] Mukthamba P, Srinivasan K. Hypolipidemic influence of dietary fenugreek (Trigonella foenum - graecum) seeds and garlic (Allium sativum) in experimental myocardial infarction [J]. Food & function, 2015, 6(9): 3117 - 3125.

[37] 兰卫, 高晓黎, 毛新民. 葫芦巴药理作用的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(5): 335 - 336.

[38] Kheirandish R, Azari O, Shojaeepour S. Protective effect of Fenugreek (Trigonella foenum graecum) seed extract on experimental reflux esophagitis in rat [J]. Iranian Journal of Veterinary Surgery, 2013, 8(2): 49 - 56.

[39] Ramesh H P, Srinivasan K. Isolation of galactomannan - rich endosperm of fenugreek and study of its anti - diabetic influence in streptozotocin - induced diabetic rats [J]. Trends in Carb. Chem, 2004(9): 99 - 103.

[40] 何焱, 王继双, 张鹏, 等. 薯蓣皂苷元药理作用及其机制研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(19): 2759 - 2765.

[41] Li F, Fernandez PP, Rajendran P, et al. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer letters, 2010, 292(2): 197 - 207.

[42] Sharma N, Suresh S, Debnath A, et al. Trigonella seed extract ameliorates inflammation via regulation of the inflammasome adaptor protein, ASC [J]. Frontiers in bioscience (Elite edition), 2017(9): 246.

[43] Rao PU, Sesikeran B, Rao PS, et al. Short term nutritional and safety evaluation of fenugreek [J]. Nutrition research, 1996, 16(9): 1495 - 1505.

[44] Narasimhamurthy K, Viswanatha S, Ramesh BS. Acute and subchronic toxicity assessment of debitterized fenugreek powder in the mouse and rat [J]. Food and chemical toxicology, 1999, 37(8): 831 - 838.

(收稿日期: 2017 - 08 - 14)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81503585)

第一作者: 李文华, 女, 2015 级硕士研究生, 研究方向: 中医肛肠外科

通讯作者: 曾娟妮, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医肛肠外科, E - mail: 575826199@ qq. com

合创面造模方法并建立与临床溃疡面一致的动物模型,对中药促愈机制的研究十分重要。本文将对以上各类慢性创面动物造模方法的最新进展作如下综述。

## 1 慢性难愈合创面动物模型的选择

动物选用应遵循选用与人结构、功能、代谢及疾病相似的实验动物<sup>[2]</sup>。兔、狗、猪、鼠是较常用的模型动物。狗、兔在大样本实验中成本高,特别是狗的性情难以操控,因此都很少被选择作为研究对象。猪的皮肤结构、上皮再生性和人体皮肤最为相似,但由于其存在价格高、体积大、可重复性低等缺点,所以难以普及。慢性实验时,可选择年幼、体质量较小、更经济、操控性更强的鼠类替代,大鼠对炎症反应灵敏,可作为慢性创面的首选实验对象,国内通常选用SD大鼠或wister大鼠制作溃疡创面模型<sup>[3]</sup>。中国地鼠经培育症状体征及体内生化水平都类似于2型糖尿病,可作为糖尿病疮疡动物模型的最佳选择。因雌性大鼠的生理周期特性及妊娠可能使实验受到干扰,一般选择雄性大鼠或雌雄各半。

## 2 各类型慢性创面模型的制作方法

**2.1 创伤性溃疡** 近些年实验研究中该类慢性难愈合创面造模多采用皮肤切除+激素法<sup>[4-6]</sup>。具体制作:大鼠适应性喂养1周,使用水合氯醛或盐酸氯胺酮腹腔麻醉后,在正中偏上的背部做一个直径2cm(可选择硬币或瓶盖)标识,常规备皮并无菌消毒,切开标记处的全层皮肤至筋膜层,最后肌内注射一定量的醋酸氢化可的松。此类模型虽在实验中使用较广,较易操作,但缺乏一个可靠的成功检测标准。如感染是慢性创面的普遍特征,国内研究证实,慢性创面中病原菌检测阳性率达81.03%,主要为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌<sup>[7]</sup>,然而在实验中普遍未应用病原菌的检测标准,因而很难推测模型创面是否与临床上难愈合创面一致。

**2.2 糖尿病溃疡** 糖尿病是发病率较高、危害性较大的全球第3大疾病,后期并发症多,糖尿病病足、糖尿病创面经久不愈,不仅给患者身心造成双重的痛苦,还耗费了高昂的医疗费。近年较常用的糖尿病创面造模方法是:链脲佐菌素(STZ)诱导致糖尿病模型+全层皮肤缺损法<sup>[8-13]</sup>。SPF级Wistar大鼠高糖高脂饲料喂养1周后,禁食12h,腹腔注射STZ(60mg/kg),3d后每天测定大鼠的血糖,采用尾部静脉血测定,7d后若大鼠的非空腹血糖大于16.7mmol/L即可认为糖尿病模型制作成功;再制作创面:大鼠于盐酸氯胺酮腹腔麻醉后,在正中偏上的背部两侧各做一个直径2cm的圆形标记,备皮及消毒,手术剪切开皮肤深达筋膜层,造成皮肤缺损创面;最后在造模区接种金黄色葡萄球菌。付小兵等<sup>[14]</sup>认为在大鼠背部创面涂以标准的金黄色葡萄球菌106/g组织,就可以观察到创面愈合延迟现象。在此造模的过程中应该注意创面最好选择背部,面积约为2cm×2cm大小,以免过大超过大鼠耐受范围;血糖至少16.7mmol/L以上,过低不符合糖尿病体征,过高易致大鼠死亡。该方法使用链脲佐菌素(STZ)对胰岛素造成不同程度的破坏,使胰岛素分

泌相对不足或绝对不足而建立糖尿病模型<sup>[15]</sup>。STZ具有对组织毒性小、动物存活率高等特点,被国内外广泛应用于构建糖尿病模型中。此种造模有严格的程序及检测标准,首先复制出糖尿病大鼠,再建立创面模型,能体现出临床糖尿病难愈合创面体征,但具体流程繁琐,操作较难,且整体造模成本高。

**2.3 压疮** 压疮即褥疮,常发生于老年、瘫痪致使长期卧床的患者中,骨隆突是疾病多发部位<sup>[16]</sup>。压疮动物模型的制作方法较多,根据形成机制分类包括缺血损伤模型、缺血-再灌注模型、细菌感染型模型。在缺血-再灌注模型中,因局部组织长时间受压使毛细血管血流阻断,造成局部缺血缺氧而产生代偿反应,当局部血运恢复后,由于钙超载、氧自由基爆发、炎性因子等作用,使受损的组织器官损失进一步加重<sup>[17]</sup>。该模型最符合临床发病机制及疾病特征。缺血-再灌注压疮造模方法:使用水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,于后肢背侧备皮,将大鼠置于木板,呈仰卧位固定四肢,使压强为30kPa的磁铁或压力装置施压于双侧后肢膝关节小腿骨隆突处局部皮肤。该模型制作采用缺血-再灌注损伤原理,每个循环中,包括2h的缺血期和30min的再灌注期,3个循环/d,连续2d<sup>[18]</sup>。当受压部位出现红、肿、热等炎症反应,继发有红斑、水泡、溃疡时可认为造模成功。该模型方法符合临床压疮发生实际情况,可操作性强,成本不高,可供动物压疮实验参考。

**2.4 感染性溃疡** 感染是造成创面迁延难愈的重要因素。病理性炎症反应的持续存在被认为是感染性创面难愈的病理机制之一<sup>[19]</sup>。实验中常采用:皮损法+涂菌法<sup>[20-23]</sup>:水合氯醛腹腔麻醉大鼠后,备皮,消毒,在大鼠的背部脊椎两侧各做一个直径2cm的圆形标记,切开全层皮肤并深达筋膜层,创面充分止血后种植一定浓度的大肠杆菌或金黄色葡萄球菌,3d后创面附有脓性分泌物,渗液较多,皮缘红肿,皮温升高,即可认为造模成功。该种模型制作方法简单,成本低,成功率较高,可广泛应用于感染性创面的实验研究。

**2.5 动静脉溃疡** 动静脉溃疡动物模型建立技术难度较高,故研究多集中在临床观察与应用。如静脉性溃疡首先需要复制出静脉曲张的动物模型,再制作溃疡创面,由于静脉曲张发病机制复杂,因此现尚未探索出一个成功可靠的模型标准。癌性溃疡是由于肿瘤晚期癌细胞转移到体表皮肤,造成皮肤创面难以愈合,该类动物模型由于造模成本高、技术难度大,暂未有可供参考的动物模型。该两种溃疡的模型制作有待研究者继续摸索。中医学的中药外用对创面愈合具有独特的优势<sup>[24]</sup>,诸如养阴生肌、回阳生肌等是外科的重要治则,临床中在其指导下根据不同的证型选择药物。对于中医药的实验研究来说,若是不能建立与疾病证候特点相对应的动物模型,很难保证药物深入研究的可行性及疗效评价的精准,因此,在难愈合创面领域探索出一个准确、高效的中医证型的动物模型十分重要。

**2.6 中医证型的动物模型** 难愈性创面属于中医学“阴证

疮疡”的范畴<sup>[25]</sup>。临床上的阴证疮疡往往因迁延日久,气血极度虚弱,以致表现为创面肉芽晦暗、脓水清稀臭秽等特点<sup>[26]</sup>。笔者查阅了近几年有关阴证疮疡的文献发现,研究中中药对慢性创面影响的实验文章较多,而阴证疮疡动物模型建立的探讨文献鲜少。许多养阴药如康复新在创伤修复的实验中需建立对应证型的动物模型。但在众多的中药实验文献中,阴证疮疡建模方法不一,有单纯皮肤切开法、皮损+醋酸法等,该制作是否符合慢性疮疡的临床特点,能否反应中医阴症疮疡的证候,缺乏统一的衡量标准。参考柴政等<sup>[27]</sup>对阴证疮疡的动物模型改良方法-激素+皮损+异物法最能体现该证型的特点:激素干预-大鼠适应性喂养1周后,连续3d使用氢化可的松肌肉注射股部;皮肤破损-小鼠于造模第4天用水合氯醛麻醉后,腰椎正中部去皮,无菌消毒后,外科方法切除直径约2cm的圆形全层皮肤;异物植入-用弯钳将组织分离至筋膜层,镊子轻提起创面两侧肌筋膜,将无菌塑料环置入筋膜内,最后将其缝合。若1d后塑料环与肌肉粘连即认为符合造模标准。模型评价标准:该模型是否制作成功应从创面局部和整体两方面判断,局部创面出现疮形散漫,平坦塌陷,肉芽组织生长缓慢、颜色苍白,创面基底暗紫等特征;整体上有体毛不荣、体质量下降、纳食差、畏寒肢冷、身体蜷缩等症状,表现出中医学阴症疮疡的特点<sup>[28]</sup>。该模型症状、体征都能体现阴证疮疡的证候特点,但该方法仍存在一定争议。使用激素后下丘脑-垂体-靶腺轴的调控机制受到干预,大鼠出现相应的应激反应、对外界环境的适应能力明显下降,从而表现出肾阳虚证型的症状<sup>[29]</sup>。但又有学者提出,氢化可的松使模型动物产生耗竭虚弱的现象,出现体毛不荣、消瘦、蜷曲、少动等症是药物引起的毒性反应<sup>[30]</sup>。

### 3 小 结

综上所述,国内慢性创面基础实验研究中,因不同慢性疾病导致的创面不同,造模方法各异,标准难统一。由于人与动物的皮肤结构和生理特性存在显著差异,难以复制出完全与人类创面一致的动物模型,特别是中医证型的动物模型,临床实际中可能由多因素造成了阴证皮肤溃疡,故实验模型与临床证型存在一定的差距。另外模型制作使用的药物产生药性与毒性的双重反应也存在一定的争议,慢性创面的造模还有待于进一步完善与探讨。

### 参考文献

- [1] 曾鸿孟,唐乾利. 体表慢性难愈合创面的研究进展[J]. 中国烧伤创疡杂志,2016(5):340-344.
- [2] 黄文华,马居里,韩曼. 中医药实验研究中实验动物的选择与动物模型的应用[J]. 中医药学刊,2004(8):1459-1460.
- [3] 施新猷. 医学科学研究中实验动物的选择和应用[J]. 上海实验动物科学,1984(1):53-55.
- [4] 徐杰男,阙华发. 补肾填精方促进大鼠慢性难愈性创面修复愈合的作用及机制探讨[J]. 四川中医,2015(10):34-37.
- [5] 阙华发,邢捷. 补益气血方剂对大鼠慢性难愈性创面血管内皮生长因子及血管生成的影响[J]. 中西医结合学报,2008(10):1049-1053.
- [6] 孙彦辉,孙永辉,孙立虹,等. 温和灸对大鼠慢性难愈性创面组织修复微循环的影响[J]. 针刺研究,2011(5):321-326.
- [7] 张凯,朱家源,唐冰,等. 慢性创面的病原菌调查分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012(11):2455-2457.
- [8] 武红霞. 糖尿病大鼠慢性难愈合创面模型的制备[D]. 济南:山东师范大学,2010.
- [9] 曹大勇,牛希华,夏成德,等. 小鼠糖尿病全层皮肤缺损模型的建立[J]. 中华损伤与修复杂志:电子版,2015(6):490-494.
- [10] 卓桑,乔雪,陈君,等. 复方愈疡散治疗糖尿病慢性难愈性创面的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):115-119.
- [11] 张子茜,崩飞,郭树忠,等. 创愈生肌散对糖尿病大鼠模型慢性创面的治疗作用研究[J]. 中国美容医学杂志,2012,21(9):1334-1336.
- [12] 徐杰男,阙华发,唐汉钧,等. 益气化痰方促进糖尿病难愈创面血管新生的 AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B 信号通路研究[J]. 辽宁中医杂志,2016(1):154-158.
- [13] 韩旭,王新建,徐奇伟. 蜂蜡软膏对治疗缺损性慢性皮肤溃疡大鼠的实验观察[J]. 大连医科大学学报,2006(2):109-110.
- [14] 付小兵,孙同柱,盛志勇. 几种用于创伤修复研究的动物模型[J]. 中华实验外科杂志,1999(5):101-102.
- [15] 魏占英,沈丽,冯晓慧,等. 高脂饲料喂养时间和 STZ 剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响[J]. 医学研究杂志,2014,43(2):42-46.
- [16] 李妍雁,周晓兰. 国外压疮动物模型研究进展[J]. 护理学报,2015(21):23-26.
- [17] 周爱婷,江智霞. 浅谈压疮模型的制作及形成机制的研究进展[J]. 当代医药论坛,2014(2):45.
- [18] 李秀云,曹娟,唐静. 建立大鼠压疮模型模具的实验研究[J]. 护理研究,2014(19):2334-2335.
- [19] Menke NB, Ward KR, Witten TM, et al. Impaired wound healing[J]. Clinics in Dermatology,2007,25(1):19.
- [20] 张坤,丁克. 复方黄柏液对大鼠感染性创面 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达的影响[J]. 中国新药杂志,2015(19):2222-2226.
- [21] 负健,杨关根,黄常新,等. 大鼠感染性创面肉芽组织胶原代谢的改变[J]. 中国中西医结合外科杂志,2009,15(6):656-659.
- [22] 王佳雯,陆金根,曹永清,等. 姜露散对大鼠感染性创面提脓祛腐的作用及机制[J]. 世界中医药,2013(12):1467-1470.
- [23] 黄华军,余斌,林庆荣,等. 臭氧水对感染性创面抗炎修复的影响[J]. 南方医科大学学报,2010,30(3):515-518.
- [24] 郝剑,易成刚,陶谏,等. 中药治疗慢性难愈性创面的研究进展[J]. 中国美容医学杂志,2005,14(6):775-777.
- [25] 王蕴珠,代红雨,苏智慧,等. 温通法在疮疡治疗中的应用[J]. 现代中医临床,2016,23(4):58-60.
- [26] 孙玉芝,张朝辉,马静,等. 箍消托补外治法对阴证疮疡温性护场形成的作用[J]. 辽宁中医杂志,2013(9):1811-1812.
- [27] 柴政,吕延伟. 昆明种小鼠中医阴症疮疡模型的建立与探讨[J]. 辽宁中医药大学学报,2016(6):55-58.
- [28] 李曰庆. 中医外科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:16.
- [29] 肖静,何立群,高建东,等. 腺嘌呤与氢化可的松大鼠肾阳虚模型造模方法比较[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(3):77-80.
- [30] 崔晓萍,王永梅. 中医药实验动物模型的反思[J]. 陕西中医,2006,27(10):1251-1253.

(收稿日期:2017-09-07)