

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00009

γ射线全身照射降低小鼠切割伤愈合伤口撕裂强度

王国栋¹, 王良¹, 柏书博¹, 刘新元², 吴洋^{1*}

1. 第二军医大学长征医院口腔科, 上海 200003
2. 第二军医大学校务部卫生处, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨不同放射剂量全身放射对小鼠切割伤口愈合撕裂强度的影响。**方法** 采用⁶⁰Coγ射线一次性均匀照射4、6或8 Gy, 照后30 min内, 全层切开小鼠背部正中皮肤, 构建不同剂量全身放射+切割复合伤动物模型($n=20$), 以小鼠单纯切割伤作为对照组($n=10$)。各组动物于伤后第10天分别处死, 取伤口处全层皮肤组织, 利用生物力学方法分析伤口皮肤组织撕裂强度, 并结合组织病理学方法综合评价伤口愈合情况。**结果** 复合伤组小鼠伤口随照射剂量增加, 撕裂强度降低明显。10 d时, 4 Gy组伤口撕裂强度为(114.26±0.29) g, 与单纯切割伤组[(117.12±1.86) g]相比差异无统计学意义, 而6 Gy组[(91.87±1.96) g]和8 Gy组伤口撕裂强度[(55.26±2.64) g]均低于单纯切割伤组($P<0.05$)。H-E染色显示, 与单纯切割伤组相比, 复合伤组小鼠伤口胶原纤维排列无序, 组织疏松, 成纤维细胞增殖较少。**结论** 放射损伤延缓伤口愈合, 全身放射+切割复合伤时伤口撕裂强度随放射剂量增高而降低。

[关键词] 全身照射; 撕裂强度; 伤口愈合

[中图分类号] R 641 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0009-03

Total body γ-irradiation decreases wound breaking strength during wound healing in rats

WANG Guo-dong¹, WANG Liang¹, BAI Shu-bo¹, LIU Xin-yuan², WU Yang^{1*}

1. Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Hygiene Division, Department of Administrative Affairs, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of total body irradiation with different doses of ⁶⁰Coγ on wound breaking strength during wound healing in rats. **Methods** Rats were exposed to ⁶⁰Coγ radiation at dosages of 4, 6, and 8 Gy. Within 30 min after irradiation, full thickness skin wounds were made on the shaved back of rats to establish animal models of irradiated-trauma injury plus skin wounds ($n=20$), and non-irradiated rats with pure incision injury were used as controls ($n=10$). The rats were sacrificed at day 10 after treatment, and the full thickness skin wounds were harvested. Bio-mechanics method and histopathology examination were used to evaluate the wound breaking strength and histological features after healing. **Results** The wound breaking strength of model groups were greatly retarded with the increase of irradiation doses. Statistical results showed that on day 10 the wound breaking strength values were significantly different between 4 Gy group [(114.26±0.29) g] and control group [(117.12±1.86) g, $P>0.05$], and the wound breaking strength values of 6 Gy group [(91.87±1.96) g] and 8 Gy group [(55.26±2.64) g] were significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). H-E staining showed that the wounds in the irradiation trauma groups had looser and disorder collagenous fiber and less fibroblast proliferation than control group. **Conclusion** Radiation injury may result in delayed wound healing, and the wound breaking strength decreases with the increase of irradiation dose in model of irradiation injury plus full thickness skin wounds.

[Key words] whole-body irradiation; breaking strength; wound healing

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1):9-11]

伤口愈合问题是一个古老而悠久的外科问题, 随着现代医学的进步, 对于单纯创伤的伤口愈合及治疗已有了较为明确的认识, 而放射损伤与创伤合并后, 其创面或伤口愈合较单纯创伤远为复杂和困难, 从而成为“难愈性创伤”^[1]。因此, 如何促进这类

损伤的愈合已成为现代创伤学关注的焦点^[2]。本研究拟利用电离辐射合并局部创伤建立放射复合伤模型, 探讨不同放射剂量全身照射对伤口撕裂强度的影响, 为进一步探讨放射复合伤的难愈机制及寻找有效的促进伤口愈合措施提供实验基础。

[收稿日期] 2010-10-09

[接受日期] 2010-12-28

[基金项目] 上海市自然科学基金(09ZR1410600). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai(09ZR1410600).

[作者简介] 王国栋, 硕士, 主治医师. E-mail: wgd_ren@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885944, E-mail: oralw@online.sh.cn

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 第二军医大学实验动物中心提供的 SPF 级昆明种小鼠 70 只,体质量(20 ± 2) g,雄性[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2007-0003号;使用许可证号:SYXK(沪)2007-0003号]。所用小鼠经上海市实验动物管理委员会批准。将实验动物随机分为单纯切割创伤组($n=10$)和不同剂量全身放射(4、6、8 Gy)+切割复合伤组($n=20$)。

1.2 小鼠全身放射实验方法 参照 Jagetia 等^[2]的方法,将小鼠装入有机玻璃盒内(10 只/盒),用⁶⁰Co γ 射线辐照源(第二军医大学辐照中心提供)同时进行照射,吸收剂量率 0.85 cGy/min,根据分组分别进行 4、6、8 Gy 剂量全身一次性均匀照射。

1.3 小鼠切割伤模型建立 全部小鼠(单纯创伤组不进行照射、复合伤组于照射后 30 min 内)以 75 mg/kg 戊巴比妥钠(上海化学试剂公司,进口分装)行腹腔麻醉,并用 8% 硫化钠(上海化学试剂一厂,分析纯)背部脱毛,清洁背部,待干燥后于无菌条件下在小鼠背部正中作一 3.5 cm 的纵行切口,切开皮肤、皮下全层,充分止血后用 0 号线将皮肤伤口间断缝合,针距 0.6 cm 左右,以无菌纱布包扎伤口,动物置于单笼饲养,隔日换药,7 d 后拆线。

1.4 皮肤撕裂强度及组织病理学检测 伤后第 10 天,随机选取每组存活的实验动物各 10 只,严格无菌条件下,用 75 mg/kg 戊巴比妥钠 0.4 ml 经腹腔麻醉后放血处死。所有实验动物于背部伤口同一位置,避开针眼以 0.5 cm 的宽度分别切取 3 块皮肤全层组织条,其中 2 块组织条立即固定于万能材料测试仪(EZ20 型,英国 LLOYD 公司)上进行伤口撕裂强度检测,牵张力加载速率为 0.5 mm/min,撕裂强度值由计算机自动输出。对同一伤口 2 块组织条所测指标平均后记为该伤口撕裂强度。另外 1 块组织条置于 10% 中性缓冲甲醛溶液中固定,石蜡包埋,常规切片后行 H-E 染色。

1.5 统计学处理 伤口撕裂强度结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件包,将所有实验结果进行方差齐性检验,根据检验结果对伤口撕裂强度采用完全随机秩和检验,并对原始数据进行排秩,用转化后的秩号进行单因素方差分析,组内比较行 LSD 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 动物模型的建立 60 只小鼠经不同放射剂量照射后动物活动及进食、水情况良好,无明显放射反

应。随后对所有动物进行切割伤口制备,术中、术后无明显出血,术后正常进食、进水。4 d 起,6 Gy 和 8 Gy 组部分实验动物出现体质量减轻、伤口渗出明显、轻微感染、活动减少。于 5 d 开始,出现死亡,至 10 d 时,6 Gy 组和 8 Gy 组死亡率分别为 20% (4/20)、35% (7/20),剩余动物生理状态良好,创面无明显感染。对照组和 4 Gy 组所有动物全部存活,创面愈合良好,无明显感染。

2.2 H-E 染色结果 对照组被覆鳞状上皮完全再生,皮肤附属结构完整,成纤维细胞和新生毛细血管含量丰富,成纤维细胞排列趋于有序,组织致密;而 4 Gy 组表皮层角化过度,鳞状上皮增生,真皮层内毛囊消失,新生上皮薄;6 Gy 组和 8 Gy 组伤口处炎细胞浸润带较宽,肉芽组织层薄、形态结构欠佳,成纤维细胞数量减少,毛细血管扩张,胶原纤维排列紊乱,其中以 8 Gy 组尤为明显(图 1)。

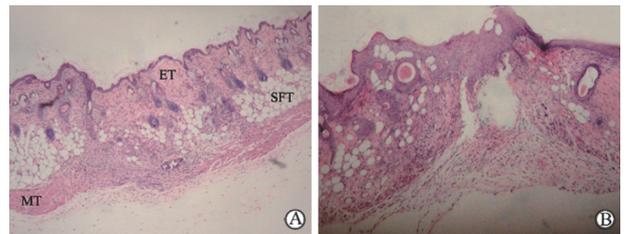


图 1 全身放射对小鼠切割伤口愈合皮肤组织病理形态的影响

Fig 1 Pathology of healing skin wounds with different doses of irradiation in rats

A: Skin wound group; B: Skin wound with 8 Gy irradiation group; ET: Epithelial tissue; MT: Muscular tissue; SFT: Subcutaneous fatty tissue. H-E staining, original magnification: $\times 20$

2.3 伤口撕裂强度检测结果 由图 2 可见,照射后,4 Gy 组伤口撕裂强度[(114.26 ± 0.29) g]略低于对照组[(117.12 ± 1.86) g],而 6 Gy 组[(91.87 ± 1.96) g]和 8 Gy 组 [(55.26 ± 2.64) g]则显著降低,以 8 Gy 组最为明显,约为对照组的 47%。照后 6 Gy 和 8 Gy 组伤口的撕裂强度均低于单纯切割伤组($P < 0.05$),而 4 Gy 组同单纯切割伤组相比差异无统计学意义。复合伤组随辐照剂量的增加,伤口的撕裂强度呈下降趋势,3 个剂量组间相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

创伤愈合是炎症细胞、修复细胞、细胞外基质以及细胞因子共同参与并高度协调、相互调控的复杂过程,任何一个环节的失控均有可能导致创面修复不良。而对于放创复合伤,由于其对造血和修复细胞的数量及功能均有影响,使创面修复延缓,从而导

致愈合延迟。因此,放创复合伤已被认为是一种重要而有代表性的难愈性创伤^[3]。

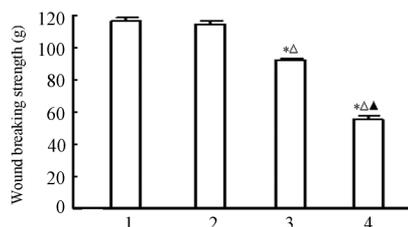


图 2 不同剂量全身放射对小鼠切割伤口愈合撕裂强度的影响

Fig 2 Comparison of wound breaking strength values in rats after different doses of irradiation

1: Skin wound group; 2: Skin wound with 4 Gy irradiation group; 3: Skin wound with 6 Gy irradiation group; 4: Skin wound with 8 Gy irradiation group. * $P < 0.05$ vs skin wound group; $\Delta P < 0.05$ vs skin wound with 4 Gy irradiation group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs skin wound with 6 Gy irradiation group. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

现有的研究表明,在创伤愈合的实验研究中,创伤模型的建立与应用至关重要,且由于放射线照射造成的伤口难愈情况与以局部修复细胞损害为主的慢性溃疡和难愈性创面有明显区别,因此其被认为是深入研究创伤难愈机制的经典模型^[3-4]。在以往放创复合伤口愈合的研究中,利用可重复性和抗感染能力强的实验动物建立的模型已被大家所认可,但由于学者们所采用的放射线种类、照射剂量、照射方式和照射时间等因素的不同,使得研究结果也不尽相同^[5-6]。冉新泽等^[6]的研究结果认为,小鼠在 8 Gy 的全身照射后,7 d 时的存活率仅为 12%,至 10 d 时全部死亡。本实验研究结果显示,小鼠经不同放射剂量的照射后,出现了不同程度的急性放射病。当复合 6 Gy 和 8 Gy 时,实验动物的死亡率分别为 20% 和 35%,伤口感染轻微。说明:(1)经不同剂量全身照射后,小鼠皮肤切割伤口愈合明显延迟,同时也体现了不同剂量全身照射所致复合伤的伤情所具有的客观规律;(2)本研究照射 8 Gy 小鼠存活率高于冉新泽等^[6]报道的原因,可能与小鼠的品系、照射剂量率、伤口制备方式以及饲养环境等的差异有关,例如,我们采用的是 SPF 级饲养环境,并发感染的程度较轻,提示我们采用 8 Gy 照射后将动物放于 SPF 级环境饲养所建立的模型,有更多动物在观察期内存活,便于更好地分析放创复合伤口的病理发展变化。

另外,从伤口撕裂强度的变化可以看出,10 d 时对照组的撕裂强度为 (117.12 ± 1.86) g,而实验组同对照组相比均有所下降。6 Gy 照射后,伤口撕裂强度为 (91.87 ± 1.96) g,与对照组相比下降了 22% ($P < 0.05$);8 Gy 照射后,其伤口的撕裂强度为 $(55.26 \pm$

2.64) g,仅为对照组的 47% ($P < 0.05$),提示随照射剂量的增大,伤口愈合延迟效应明显加重。这不仅反映了放创复合伤口愈合与放射剂量有着明显的剂量依赖性,也提示在放射线照射的前提下,过多的瘢痕组织替代了伤口愈合的肉芽组织形成阶段中成熟的成纤维细胞,并使胶原纤维的排列变得更加紊乱,从而表现为伤口撕裂强度的明显下降,最终导致伤口愈合延迟。同时,从 H-E 染色的结果也可以看出,随照射剂量的增大,伤口的炎症程度、新生毛细血管数量、成纤维细胞的排列情况以及组织结构层次的变化均呈现递减的趋势,这与 Hadad 和 Kiang 等^[7-8]的研究结果一致,说明辐照后,伤口的炎症反应削弱,细胞增殖受抑,细胞外基质反应减弱,从而影响肉芽组织形成及质量的好坏,最终直接导致创伤愈合的延迟。

综上所述,本研究建立的小鼠放创复合伤模型具有伤情适中、稳定性和重复性好的优点,6 Gy 的辐射剂量已造成较明显的愈合延迟,动物存活率较高,适合大规模、长时间创伤愈合实验。同时,通过放创复合伤建立的动物模型,可以直观地反映放创复合伤口愈合的难愈程度,为深入研究放创复合伤难愈的机制提供了可行的条件。本研究从伤口撕裂强度的角度,进一步说明放射损伤对伤口愈合有明显的延缓作用,且放创复合伤时皮肤创面愈合延迟与放射剂量存在明显的剂量效应关系,其具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Dantzer D, Ferguson P, Hill R P, Keating A, Kandel R A, Wunder J S, et al. Effect of radiation and cell implantation on wound healing in a rat model[J]. J Surg Oncol, 2003, 83: 185-190.
- [2] Jagetia G C, Rajanikant G K, Baliga M S, Rao K V, Kumar P. Augmentation of wound healing by ascorbic acid treatment in mice exposed to gamma-radiation[J]. Int J Radiat Biol, 2004, 80: 347-354.
- [3] Olascoaga A, Vilar-Compte D, Poitevin-Chacón A, Contreras-Ruiz J. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options[J]. Int Wound J, 2008, 5: 246-257.
- [4] Davidson J M. Animal models for wound repair[J]. Arch Dermatol Res, 1998, 290(Suppl): S1-S11.
- [5] Jagetia G C, Rajanikant G K. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of gamma-radiation[J]. J Surg Res, 2004, 120: 127-138.
- [6] 冉新泽, 程天民, 林远, 屈纪富, 徐辉, 王军平, 等. 全身放射损伤影响皮肤创伤愈合的剂量效应研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22: 149-152.
- [7] Hadad I, Johnstone B H, Brabham J G, Blanton M W, Rogers P I, Fellers C, et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 78: 888-896.
- [8] Kiang J G, Jiao W, Cary L H, Mog S R, Elliott T B, Pellmar T C, et al. Wound trauma increases radiation-induced mortality by activation of iNOS pathway and elevation of cytokine concentrations and bacterial infection[J]. Radiat Res, 2010, 173: 319-332.