

辐射损伤小鼠皮肤缺损模型愈合评价

柏书博, 王国栋, 王 良, 徐正耘, 吴 洋*

第二军医大学长征医院口腔科, 上海 200003

[摘要] **目的** 建立小鼠不同全身辐射剂量合并皮肤缺损模型, 研究全身辐射对皮肤创面愈合的影响, 探讨其病理生理学变化。**方法** 采用180只雌性昆明种小鼠, ^{60}Co γ 射线一次性均匀照射4、6、8 Gy, 照后30 min内, 于小鼠背部制作1.5 cm×1.5 cm方形全层皮肤缺损伤口, 构建不同全身放射剂量合并皮肤缺损动物模型($n=50$), 以单纯皮肤缺损作为对照组($n=30$), 各组动物于伤后3、5、7、10、14 d分别处死6只, 取伤口全层皮肤组织, 组织病理学检查伤口区炎细胞、成纤维细胞、新生毛细血管数量的变化; 应用图像分析系统定量分析未愈合伤口残余面积, 统计14 d内各组动物存活率及体质量变化。**结果** 6 Gy放创组7 d和14 d的存活率分别为75%和55%, 8 Gy放创组7 d时存活率仅33%, 至10 d全部死亡。伤后14 d内, 随辐射剂量的增加, 放创组体质量较伤前降低程度愈加明显。全身辐射对皮肤创面愈合延迟随辐射剂量增加而加重: 6、8 Gy放创组2 d与对照组相比残余面积增大($P<0.01$), 4 Gy放创组伤后8 d与对照组相比残余面积增大, 差异有统计学意义($P<0.05$)。H-E染色显示: 与对照组相比, 放创组小鼠伤口早期炎症反应受抑, 成纤维细胞和新生毛细血管数量增多明显滞后, 肉芽组织形成延迟, 上皮覆盖滞后。**结论** 6 Gy ^{60}Co γ 射线全身放射合并皮肤缺损的动物模型可为放创复合伤难愈合机制的研究和早期的实验治疗提供研究平台。

[关键词] 放创复合伤; 伤口愈合; 动物模型; 皮肤

[中图分类号] R 641

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)08-0840-05

Evaluation of wound healing of skin defect in mice with radiation injury

BAI Shu-bo, WANG Guo-dong, WANG Liang, XU Zheng-yun, WU Yang*

Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To establish mouse models of total body irradiation (TBI) with different doses of ^{60}Co γ radiation combined with skin defect, so as to investigate the influence of TBI on wound healing and the pathophysiological changes in combined radiation injury and skin defect. **Methods** A total of 180 female Kunming mice were irradiated with a single dose of 4, 6 or 8 Gy ^{60}Co γ ray. Within 30 min after irradiation, a full thickness square wounds (1.5 cm×1.5 cm) was made on the back of mice to establish animal models of TBI combined with skin defect ($n=50$), another 30 mice with pure skin defect were used as controls ($n=30$). Mice in each group were sacrificed on the 3rd, 5th, 7th, 10th and 14th day after injury, each time 6 mice, and the full thickness wounds were harvested. Histological method was used to evaluate the changes of inflammatory cells, fibroblasts and new blood capillaries in the wounds. Image analysis system was used to analyze the areas of the residual wounds. The survival rates and body weight changes of mice within 14 days were analyzed in all groups. **Results** On the 7th and 14th day after injury, the survival rates of mice in the 6 Gy group were 75% and 55%, respectively. While in the 8 Gy group the survival rate of mice was only 33% on the 7th day, and all the animals died by the 10th day. Within 14 days after injury, the body weight loss of mice demonstrated an increasing tendency with the increase of radiation doses (4, 6, and 8 Gy groups). TBI delayed wound healing in mice with the increase of irradiation dose. The unhealed areas in the 6 and 8 Gy groups were larger than that in the control group on the 2nd day ($P<0.01$), and that in 4 Gy group was significantly larger than that in the control group on the 8th day ($P<0.05$). H-E staining showed that the early inflammatory responses were inhibited, the increase of fibroblasts and new capillaries were greatly delayed, and the granulation tissue formation and reepithelialization were slowed down in the TBI group compared with the simple wound group. **Conclusion** Animal models of TBI with 6 Gy ^{60}Co γ -ray combined with skin defect can serve as a platform to study the mechanism of difficult healing and early treatment of radiation injury combined with skin defect.

[Key words] combined radiation-trauma injury; wound healing; animal models; skin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8): 840-844]

[收稿日期] 2011-03-11

[接受日期] 2011-07-18

[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] 柏书博, 硕士生. E-mail: run_726@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885944, E-mail: oralwuyang@gmail.com

放创复合伤主要见于放疗以及核辐射损伤等合并创伤的患者,其突出的问题是正常创面愈合的过程往往受到抑制,导致创面愈合延迟或经久不愈,成为“难愈性创伤”。慢性难愈伤口的长期存在增加了局部感染的机会,也影响了局部组织的结构和功能^[1-2]。建立稳定性高、重复性好、标准化的放创复合伤动物模型,是研究放创复合伤创面修复的重要基础,有利于更科学、更确切的认识放创复合伤伤后机体各系统及局部创面的发展演变规律。目前国内文献报道的放创复合伤动物模型较多,但在放射剂量、动物死亡率统计、创面延迟愈合程度认识方面差异较大^[2-5],缺乏统一的标准模型。因此,本实验用昆明种小鼠建立4、6、8 Gy ⁶⁰Co γ 射线全身辐射合并皮肤缺损模型,通过对创面残余面积与病理学研究,旨在为今后进一步研究放创复合伤难愈机制及针对性的治疗建立一种重复性好、标准化的放创复合伤动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组 本实验采用180只SPF级健康昆明种小鼠,雌性,体质量18~20 g,由第二军医大学实验动物中心提供,所用小鼠经上海市实验动物管理委员会批准,质量和使用条件均符合一级标准。将实验动物随机分为单纯皮肤缺损组(单伤组, $n=30$)和4、6、8 Gy ⁶⁰Co γ 射线全身辐射合并皮肤缺损组(放创组, $n=50$)。

1.2 动物模型的建立 (1)单伤组:小鼠经腹腔注射75 mg/kg戊巴比妥钠麻醉后,固定,并用8%硫化钠背部脱毛,清洁背部,待干燥后于无菌条件下在小鼠背部致1.5 cm \times 1.5 cm方形全层皮肤缺损伤口,创面不予缝合,以无菌纱布包扎伤口,伤后小鼠自由饮食,不进行治疗,每笼5只饲养;(2)4、6、8 Gy放创组:参照我们前期的动物全身辐射研究方法^[6],将小鼠按4、6、8 Gy ⁶⁰Co γ 射线进行一次性全身辐射,建立辐射损伤动物模型。再采用与单伤组相同方法致背部创口,伤后处理同单伤组。每组动物均隔日更换敷料。

1.3 取材 各组动物分别在伤后第3、5、7、10、14天随机选取每组存活的动物各6只,严格无菌条件下,用75 mg/kg戊巴比妥钠经腹腔过量麻醉致死。分别取小鼠背部创伤边缘皮肤组织,置于甲醛溶液中固定,进行脱水,石蜡包埋。常规切片后行H-E染色,光镜下行病理形态学观察。

1.4 动物存活率测定 记录伤后14 d内每组存活

动物和死亡动物数量。

1.5 伤口残余面积和动物体质量测定 各组动物称质量作为原始体质量,致伤后2 h用消毒的透明膜贴于创面,沿创缘划线将动物创面大小描印在透明膜上,然后用Image Pro plus v1.5图像分析系统测量创面面积作为伤口原始面积。伤后第2、4、6、8、10、12、14天同样方法测伤口残余面积和体质量,残余面积百分率(%)=残余面积/原始面积 \times 100%,伤后体质量占伤前百分率(%)=每时相点体质量/原始体质量 \times 100%。

1.6 伤口炎细胞、成纤维细胞及新生毛细血管数量的测定 每张切片显微镜(400 \times)高倍视野下随机选取伤口真皮组织5个视野,直接计数炎细胞、成纤维细胞和新生毛细血管数量,每张切片结果均取其平均值。

1.7 统计学处理 应用SPSS 11.0软件将所有实验数据进行统计学分析,动物存活率比较采用Kaplan-Meier法;伤口炎细胞、成纤维细胞及新生毛细血管数量、创面残余面积百分率和体质量变化的比较先进行方差齐性检验,再进行单因素方差分析,数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 动物存活率 由图1可见,随辐射剂量的增加,6、8 Gy放创组存活率降低,伤后7 d,6、8 Gy组为75%和33%,8 Gy放创组动物10 d内全部死亡。伤后14 d,单伤组动物全部存活,4 Gy放创组存活率为96%,而6 Gy放创组存活率仅55%,低于单纯创伤组($P<0.01$)。

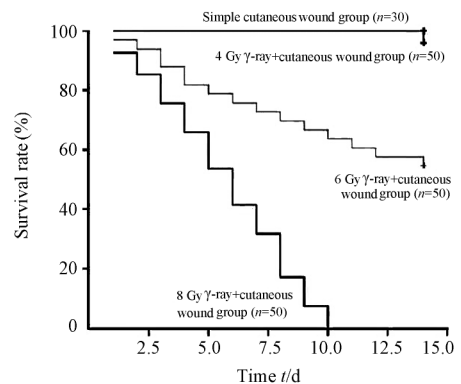


图1 14 d内各组动物存活率(%)的比较

Fig 1 Comparison of survival rates in all groups within 14 d

2.2 动物体质量变化 由图2可见,单伤组和放创组伤后2 d体质量即开始降低,放创组降低随辐射剂量的增加而加重,8 Gy放创组伤后8 d仅为69%;其后,单伤组很快恢复至伤前水平以上,放创组体质量

虽也缓慢增长,但伤后 14 d 仍未恢复到伤前水平。

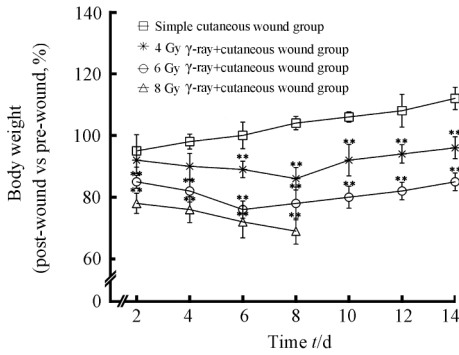


图 2 14 d 内各组动物体质量变化的比较
Fig 2 Comparison of body weight changes in all groups within 14 d

$\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs simple cutaneous wound group

2.3 伤口残余面积 由表 1 可见,伤后 2 d,单伤组和 4 Gy 放创组有所减小,而 6、8 Gy 放创组伤后 2 d 与单伤组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。伤后 4 d,各组残余面积均呈减小趋势,但放创组随辐射剂量的增加,残余面积明显增大并始终大于单伤组。伤后 8 d,4 Gy 放创组与单伤组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。伤后 14 d,单伤组仅剩 9.87%的创面未愈合,而 4、6 Gy 放创组仍有 20.62%、38.39%的创面未愈,8 Gy 放创组 10 d 内因全部死亡缺少数据。

2.4 伤口炎细胞计数 由图 3A 可见,单伤组伤后 3 d 炎细胞数据即开始增加,伤后 5 d 达峰值,伤后 7 d 明显减少。放创组炎细胞数量增加滞后于单伤组,伤后 3 d 与单伤组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),4、6 Gy 放创组分别在伤后 7、10 d 达峰值,比单伤组滞后 2~5 d。

表 1 14 d 内各组动物创面残余面积率的比较

Tab 1 Comparison of residual wound area in all groups within 14 d

(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after injury t/d							
	1	2	4	6	8	10	12	14
A	92.25±6.53	80.36±7.24	71.93±8.19	56.32±10.25	42.86±10.91	27.45±15.10	23.45±1.57	9.87±5.39
B	94.00±2.01	81.19±3.22	73.01±4.24	60.15±4.19	46.78±3.11*	33.43±2.81*	29.86±2.51**	20.62±3.82*
C	96.00±3.54	90.43±6.55**	78.51±8.90**	67.23±10.98**	54.40±9.44**	45.39±7.08**	42.28±4.94**	38.39±12.06**
D	99.00±0.93	96.48±11.13**	84.01±13.29**	67.61±8.59**	59.11±4.67**	-	-	-

A: Simple cutaneous wound group; B: 4 Gy ⁶⁰Co γ -ray+cutaneous wound group; C: 6 Gy ⁶⁰Co γ -ray+cutaneous wound group; D: 8 Gy ⁶⁰Co γ -ray+cutaneous wound group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Group A; -: There was no survival animal on the 10th day

2.5 伤口成纤维细胞计数 由图 3B 可见,单伤组伤后 7 d 达峰值,而后开始减少,放创组成纤维细胞数量增加明显滞后于单伤组,6、8 Gy 放创组伤后 3 d 与单伤组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),4、6 Gy 放创组分别在伤后 10、14 d 达峰值,比单伤组滞后

3~7 d。

2.6 伤口新生毛细血管计数 由图 3C 可见,放创组新生毛细血管数量增加滞后于单伤组,4、6、8 Gy 放创组在伤后 3~5 d 与单伤组相比差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

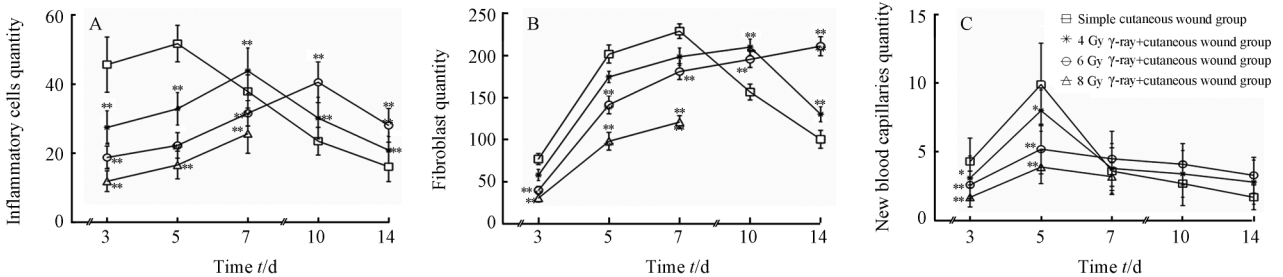


图 3 14 d 内各组动物伤口炎细胞(A)、成纤维细胞(B)和新生毛细血管(C)计数的比较

Fig 3 Comparison of inflammatory cells (A), fibroblasts (B) and new blood capillaries (C) between wound in all groups within 14 d

$\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs simple cutaneous wound group

2.7 伤口愈合组织病理学观察 (1)伤后 3 d,单伤

组伤口渗出明显,内含有大量的中性粒细胞及单核

巨噬细胞,创面底部散在肉芽组织,可见成纤维细胞和新生毛细血管组成的条索状结构;放创组随辐射剂量增大创面渗出减少,坏死组织增多,血管结构遭到破坏并有小灶状出血发生(图 4A)。(2)伤后 7 d,单伤组伤口炎症反应减弱,肉芽组织增多、增厚,成纤维细胞含量丰富,排列趋于有序,并出现少量纤维细胞,伤口周围新生表皮细胞开始向创面中心生长(图 4B);4 Gy 放创组创面肉芽组织层较薄,新生毛细血管少见,创面底部有出血。6、8 Gy 放创组创面

覆盖少量坏死组织,底部组织中可见炎细胞浸润,散在肉芽组织形成,成纤维细胞排列紊乱,伤口周围未见表皮细胞增生(图 4C)。(3)伤后 14 d,单伤组创面已接近愈合,创面组织中以纤维细胞为主,排列有序,已演变为较成熟的纤维组织;4 Gy 放创组创面内肉芽组织增多增厚,新生表皮细胞逐渐覆盖创面但尚未完全愈合;6 Gy 放创组创面少量炎细胞浸润,成纤维细胞和新生毛细血管含量丰富,新生上皮薄,表皮细胞生长缓慢(图 4D)。

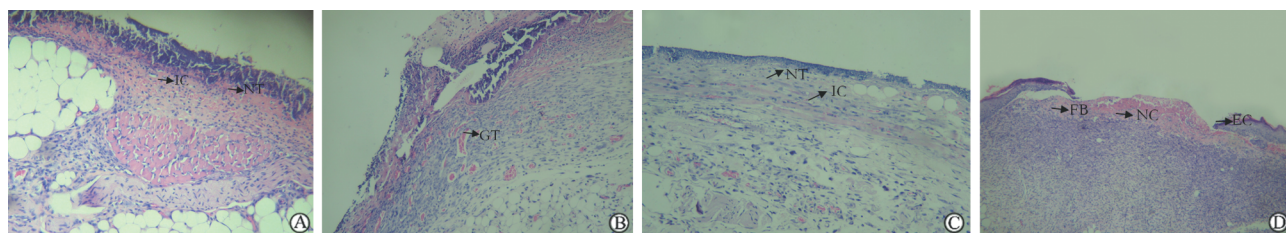


图 4 伤口愈合组织病理学观察

Fig 4 Histopathology of wound healing tissues

A: 4 Gy group on the 3rd day, necrotic tissues and inflammatory infiltrations were seen in the wound; B: Single wound group on the 7th day, granulation tissues were seen in the wound bottom; C: 8 Gy group on the 7th day, a few necrotic tissues, inflammatory infiltrations and granulation tissues were seen in the wound; D: 6 Gy group on the 14th day, many fibroblasts and new capillaries were observed in the wound; epithelial cells grew slowly. NT: Necrotic tissues; IC: Inflammatory cells; GT: Granulation tissues; FB: Fibroblasts; NC: New capillaries; EC: Epithelial cells. H-E staining, original magnification: $\times 20$

3 讨论

全身辐射损伤延缓创面愈合的机制较为复杂,现有研究表明此类难愈性创伤是以造血细胞和修复细胞数量与功能损害为关键环节的诸多愈合因素相互协同作用的结果^[7],其变化特点可能与创伤的损伤程度、辐射剂量及个体差异等因素密切相关^[2-5]。

建立理想稳定的放创复合伤动物模型是研究难愈性创伤重要的实验方法和手段。本实验根据已有的研究报告,采用 4、6、8 Gy ⁶⁰Co γ 射线全身辐射昆明种小鼠,辐射后即刻在鼠背造成皮肤缺损,以单纯缺损组为对照,通过对创面残余面积百分率比较发现:放创组残余面积始终大于单伤组,6、8 Gy 放创组伤后 2 d 起与单伤组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),4 Gy 放创组伤后早期(6 d 内)愈合延迟不明显;伤后 14 d,单伤组基本愈合,而 4、6 Gy 复合伤组仍有 20.62%、38.39% 的创面未愈合;提示创面愈合延迟随辐射剂量增加而加重。动物伤后存活率比较发现:4、6 Gy 放创组 14 d 的存活率分别为 96% 和 55%,动物存活率较高;8 Gy 放创组 10 d 内动物全部死亡。本研究 6、8 Gy 放创组 10 d 小鼠存活率

分别为 62% 和 0,低于王国栋等^[6]的报道,原因分析可能与小鼠的体质量略轻及伤口制备方式有关。动物体质量变化比较发现:放创组体质量较伤前降低,降低程度随辐射剂量增加而加重。以上结果说明本实验不同剂量全身照射与放创复合伤动物模型整体伤情之间具有客观规律性,为研究辐射损伤对创伤愈合的延迟效应提供了科学基础。

创伤后组织修复一般经历炎症反应、肉芽组织增生和新生组织重建这 3 个紧密联系的阶段,创伤愈合的关键是肉芽组织的形成及上皮化过程,而新生毛细血管化和成纤维细胞适度增殖则是肉芽组织形成的要素^[8]。对伤口主要细胞、血管定量计数分析及组织学指标检测后发现:放创组伤口炎细胞、成纤维细胞、新生毛细血管数量较单伤组都不同程度地降低,6、8 Gy 放创组伤后 3~5 d 创面的炎细胞、成纤维细胞和新生毛细血管数量均低于单伤组($P < 0.01$),与 Hadad 等^[9]的研究结果一致。炎症反应是创伤修复的启动阶段,炎细胞将伤口内的异物、细菌、坏死组织清除,释放大量细胞因子和活性物质将静止的修复细胞激活,趋化其入伤口进行增殖、分泌、分化,形成最初的肉芽组织,因此,伤口修

复启动也就决定了肉芽的形成及伤口的愈合速度。全身辐射后早期造血功能受抑,外周血中白细胞降低,尤以单核细胞和中性粒细胞所受影响为著,以致细菌和坏死组织不易被吞噬和清除,伤口感染加重。单核细胞除吞噬功能还可分泌多达上百种的细胞因子和免疫活性物质,其数量减少和功能受抑可致多种促修复细胞因子异常,从而影响成纤维细胞等组织修复细胞的数量和功能,引起伤口愈合延迟^[10]。本实验结果显示放创组有以下特点:(1)伤后早期创面渗出减少,坏死组织增多,伤口愈合启动时间比单伤组滞后约2~4 d,6 Gy放创组伤后7 d才出现较明显炎症反应,说明伤后早期炎症反应不足,伤口修复的启动阶段就存在障碍。(2)肉芽组织形成减缓、成熟度降低,如6、8 Gy放创组伤后7 d才形成散在肉芽组织。成纤维细胞是最为重要的修复细胞之一,伤后其通过大量增殖并合成分泌细胞外基质等与新生毛细血管共同形成肉芽组织,为表皮细胞覆盖伤口创造条件;多种细胞因子、细胞外基质等也可影响成纤维细胞的发育、迁移、增殖,从而影响其组织修复的能力。全身辐射对伤口成纤维细胞具有直接损伤作用,导致其增殖减少、凋亡增加,使其参与组织修复能力下降^[11]。新生毛细血管形成减缓,可造成新生肉芽组织中含氧量及其他营养成分不足,影响细胞的正常增殖与分化,使肉芽组织生长减慢,成熟趋缓^[12]。

综上所述,我们认为放创复合伤伤口愈合延迟存在明显的剂量效应关系,随辐照剂量增大而延缓效应加重,6 Gy ⁶⁰Co γ 射线全身照射合并皮肤缺损动物模型具有明显创伤愈合延迟、保持较高存活率、创面愈合过程观察便捷、实验可重复性较好的优点。本研究建立的 SPF 级昆明种小鼠(体质量 18~20 g) 6 Gy ⁶⁰Co γ 射线全身辐射合并皮肤缺损模型可为各项相关实验研究提供标准化平台,从而为放创复合伤的治疗奠定坚实基础,这同时也是我们下一步将要研究的重点。

[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] Kumar P, Jagetia G C. Modulation of wound healing in Swiss albino mice by different doses of gamma radiation[J]. *Burns*, 1995, 21: 163-165.
- [3] Jagetia G C, Rajanikant G K. Role of curcumin anaturally 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.
- [4] 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.
- [5] 冉新泽,程天民,林远,肖桃元,屈纪富,陈晓红,等.大鼠放创复合伤时皮肤创伤愈合的形态学观察[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25: 1233-1236.
- [6] 王国栋,王良,柏书博,刘新元,吴洋. γ 射线全身照射降低小鼠切割伤愈合伤口撕裂强度[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32: 9-11.
Wang G D, Wang L, Bai S B, Liu X Y, Wu Y. Total body γ -irradiation decreases wound breaking strength during wound healing in rats[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32: 9-11.
- [7] Carnevali S, Mio T, Adachi Y, Spurzem J R, Striz I, Romberger D J, et al. Gamma radiation inhibits fibroblast-mediated collagen gel retraction[J]. *Tissue Cell*, 2003, 35: 459-469.
- [8] 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.
- [9] Hadad I, Johnstone B H, Brabham J G, Blanton M W, Rogers P I, Fellers C, et al. Development of aporcine delayed wound-healing model and its use in testing an novel cell-based therapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 78: 888-896.
- [10] Pierce G F, Mustor T A. Pharmacologic enhancement of wound healing[J]. *Annu Rev Med*, 1995, 46: 467-469.
- [11] Davidson J M. Animal models for wound repair[J]. *Arch Dermatol Res*, 1998, 290(Suppl): S1-S11.
- [12] Dasgeb B, Phillips T J. Diagnostic dilemmas: osteoradionecrosis [J]. *Wounds*, 2004, 16: 291-295.

[本文编辑] 尹茶