

· 脏器并发症 ·

小鼠深 II 度烫伤创面模型建立及创面缺氧情况检测

张月 白晓智 芦帅 李娜 王耘川 李小强 胡晓龙 胡大海



【摘要】 目的 建立稳定的小鼠深 II 度烫伤创面模型并了解创面缺氧情况。 方法 (1) 取 80 只体质量为 (20.0 ± 1.0) g 的雄性 BALB/c 小鼠, 将自制蒸汽烫伤仪喷头垂直置于小鼠背部表面直径为 2 cm 环形模具中心上方约 2 cm 处, 用稳定的 92 °C 蒸汽致伤 2、4、6、8 s (每种致伤时间 20 只小鼠) 制作烫伤模型。伤后即刻肉眼观察创面大体情况。于伤后 0、12、24、48 h 分别切取 5 只各致伤时间小鼠皮肤样本, HE 染色行组织学观察, 筛选深 II 度创面致伤时间及取材时间。(2) 另取 5 只 BALB/c 小鼠, 按照前述方法与筛选致伤时间制成深 II 度烫伤创面模型, 伤后 72 h 用免疫组织化学染色法观察皮下组织缺氧情况。取 20 只 BALB/c 小鼠, 按随机数字表法分为 2 组: 正常对照组 5 只, 不行处理; 深 II 度烫伤组 15 只, 按照前述方法与筛选致伤时间制成深 II 度烫伤创面模型。伤后 72 h 采用激光多普勒经皮氧分压仪检测创面中心、创面边缘和创面周边正常皮肤皮下氧含量, 每个检测部位 5 只小鼠; 正常对照组小鼠行相同检测。对数据进行单因素方差分析。 结果 (1) 伤后即刻, 各种致伤时间小鼠创面苍白干净, 无渗出。(2) 组织学观察显示, 烫伤深度随着致伤时间和取材时间的延长逐渐加深, 至伤后 24 h 趋于稳定。烫伤 4 s 小鼠伤后 24 h 皮肤真皮深层受损, 毛囊残留, 呈现深 II 度烫伤病理结果。(3) 伤后 72 h, 小鼠深 II 度烫伤创面可见派莫硝唑高密度染色, 创面边缘部位染色最明显。深 II 度烫伤组小鼠创面中心、创面边缘、创面周边正常皮肤皮下氧分压相近, 分别为 (36.2 ± 3.2) 、 (37.0 ± 1.4) 、 (37.4 ± 2.7) mm Hg ($1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$, $F = 74.705$, $P > 0.05$), 均显著低于正常对照组的 (53.1 ± 2.4) mm Hg (F 值分别为 82.377、91.375、100.531, P 值均小于 0.05)。 结论 采用体质量为 (20.0 ± 1.0) g 的雄性 BALB/c 小鼠, 经 92 °C 蒸汽烫伤 4 s, 24 h 后可建立相对稳定的深 II 度烫伤创面模型。深 II 度烫伤创面为缺氧环境, 创面边缘部位缺氧最明显。

【关键词】 烧伤; 模型, 动物; 缺氧

Reproduction of a mouse model of deep partial-thickness scald and determination of hypoxia in the wound ZHANG Yue, BAI Xiao-zhi, LU Shuai, LI Na, WANG Yun-chuan, LI Xiao-qiang, HU Xiao-long, HU Da-hai. Burn Center of PLA, Department of Burns and Cutaneous Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: HU Da-hai, Email: hudhai@fmmu.edu.cn, Tel: 029-84775298

【Abstract】 Objective To reproduce a stable mouse model of deep partial-thickness scald and to determine the hypoxia status in the wound. **Methods** (1) A homemade scald-producing apparatus with constant steam (92 °C) emission was used to reproduce scald injury on the back (2 cm in diameter) in 80 male BALB/c mice for different duration (2, 4, 6, and 8 s), with 20 mice for each scald duration. The nozzle was aligned perpendicularly to the back of mice, 2 cm above the skin surface. The gross condition of wound was observed with naked eyes immediately after injury. Skin samples of 5 mice with different burn duration were harvested 0, 12, 24, and 48 h after scald for histopathological observation with hematoxylin and eosin staining, to screen the scalding time and time for biopsy of scalded skin to determine proper scalding time for the experiment. (2) Model of deep partial-thickness scald was reproduced with the desired scalding time as shown in the preliminary experiment in another 5 BALB/c mice. The hypoxia status in subcutaneous tissue was observed with immunohistochemical staining 72 h after scald. Another 20 BALB/c mice were divided into normal control group ($n = 5$, without scald) and deep partial-thickness scald group ($n = 15$, scalded for a suitable duration as determined in the preliminary experiment) according to the random number table. The subcutaneous oxygen content in wound center, the margin of the wound, and the normal skin adjacent to the wound was detected with laser Doppler transcutaneous oxygen tension 72 h after scald, with 5

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.03.012

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院全军烧伤中心, 烧伤与皮肤外科

通信作者: 胡大海, Email: hudhai@fmmu.edu.cn, 电话: 029-84775298

mice in each region. Data were processed with one-way analysis of variance. **Results** (1) The wound of mice with different scald durations was pale, clean, and no exudate was observed right after injury. (2) The burn depth developed gradually along with the scalding time and sample harvesting time, and it became stable 24 h after scalding. A deep partial-thickness injury was observed in the dermis of mice scalded for 4 s and harvested 24 h after scald, and it was shown that the external hair sheath was still present, and it was determined to be a deep partial-thickness scald. (3) Dense staining of pimonidazole (hypoxia) was found in deep partial-thickness scald wound 72 h after scald, especially in the marginal zones of the wounds. The partial oxygen pressure in the wound center, wound margin, and normal skin around the wound was respectively (36.2 ± 3.2) , (37.0 ± 1.4) , (37.4 ± 2.7) mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), showing no statistically significant difference among them ($F = 74.705$, $P > 0.05$), but they were significantly lower than that of the control group [(53.1 ± 2.4) mm Hg, with F values respectively 82.377, 91.375, 100.531, P values all below 0.05]. **Conclusions** Deep partial-thickness scald model can be reproduced in (20.0 ± 1.0) g male BALB/c mice by scalding with 92 °C hot steam for 4 s, and the depth of wound becomes stable 24 h after scalding. Hypoxia can be found in the scalded wounds, especially in the marginal zones of the wounds.

【Key words】 Burns; Models, animal; Anoxia

动物烫伤模型在烧伤创面愈合修复机制的研究及表面药物或敷料的研发中起着至关重要的作用,因此需要建立一种简单易行且稳定可靠的烫伤模型。本研究通过自制烫伤仪,对相近体质量小鼠皮肤致伤不同时间,伤后不同时间取材,观察其致伤后皮肤烫伤深度的发展变化,从而建立相对稳定的小鼠深Ⅱ度烫伤创面模型。此外,有研究显示缺氧环境对创面愈合起着关键性作用^[1-2],然而其在烫伤创面发挥何种作用尚不明确。本文在稳定的深Ⅱ度烫伤模型基础上,运用免疫组织化学及激光多普勒经皮氧分压法检测烫伤创面缺氧情况,为研究缺氧调控烫伤创面愈合的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂与仪器来源

105 只体质量为 (20.0 ± 1.0) g 的雄性清洁级 BALB/c 小鼠,由第四军医大学实验动物中心提供。戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司,异氟烷购自河北九派制药有限公司,缺氧检测试剂盒购自美国 HPI 公司,兔生物素-链霉亲和素-过氧化物酶免疫组织化学检测试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。小动物吸入麻醉机购自美国 Matrix 公司,SP-CT/218T 型蒸汽挂烫机购自上海旭博公司,FSX100 型智能生物图像导航仪购自日本 Olympus 公司,PeriFlux System 5000 型激光多普勒经皮氧分压仪购自瑞典 Perimed 公司。

1.2 烫伤模型制备与创面致伤时间筛选

1.2.1 模型制备及大体观察 (1)自制蒸汽烫伤仪:拔掉 SP-CT/218T 型蒸汽挂烫机喷头,暴露导气管,将容积为 50 mL、开口直径为 3 cm 的耐热塑料离心管开口端对接导气管,纱布固定组成简易喷头(以蒸汽不从接口处漏出为准),于离心管封闭端用剪刀

水平剪一直径为 0.5 ~ 1.0 cm 的圆(此为蒸汽出口)。(2)取 80 只小鼠,用 10 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射(50 mg/kg)麻醉,剃去背部长毛,100 g/L 硫化钠脱毛。(3)脱毛 24 h 后,以异氟烷为麻醉剂,用吸入麻醉机麻醉小鼠。将直径为 2 cm 的耐热塑料环形模具置于待烫部位,使蒸汽仅接触环内皮肤。挂烫机预热 1 min,待蒸汽温度稳定在 92 °C,将简易喷头垂直置于环形模具中心上方约 2 cm 处,致伤 2、4、6、8 s。每种致伤时间 20 只小鼠,伤后即刻腹腔注射生理盐水抗休克,裸眼观察创面大体情况。

1.2.2 深Ⅱ度创面致伤时间及取材时间筛选

分别于伤后 0 h(伤后即刻)及伤后 12、24、48 h,用 100 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射(500 mg/kg)处死各种致伤时间小鼠 5 只。切取全层皮肤样本(2.0 cm × 0.5 cm,正常皮肤与烫伤皮肤比例为 1:1)。40 g/L 多聚甲醛固定,常规处理后切片,HE 染色,智能生物图像导航仪观察组织形态。以达到皮肤表皮全层及真皮深层损伤,而皮肤附件结构健存为深Ⅱ度损伤判定标准^[3]。

1.3 深Ⅱ度烫伤创面缺氧检测

1.3.1 皮下组织缺氧情况 另取 5 只小鼠,按照 1.2 中方法与筛选出的致伤时间(4 s),制成深Ⅱ度烫伤创面模型。伤后 72 h,腹腔注射哌莫硝唑 60 mg/kg,90 min 后,切取全层皮肤样本 2.0 cm × 0.5 cm(正常皮肤与烫伤皮肤比例为 1:1),40 g/L 多聚甲醛固定后行免疫组织化学染色。切片常规处理,经体积分数 10% 山羊血清封闭 30 min 后,滴加缺氧检测试剂盒内的抗哌莫硝唑抗体(稀释比为 1:1000),4 °C 过夜,兔抗小鼠多克隆抗体(稀释比为 1:1000)处理,DAB 显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。智能生物图像导航仪下观察哌莫硝唑染色的阳性区域。

1.3.2 皮下氧含量测定 另取 20 只小鼠,按随机数字表法分为 2 组:正常对照组 5 只,不行处理;深 II 度烫伤组 15 只,按照 1.2 中方法与筛选出的致伤时间(4 s)制成深 II 度烫伤创面模型。伤后 72 h 采用激光多普勒经皮氧分压仪检测创面中心、创面边缘和创面周边正常皮肤皮下氧含量,每个检测部位 5 只小鼠。正常对照组小鼠行相同检测。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

伤后即刻,各种致伤时间小鼠创面均呈圆形,直径为 2 cm,创面苍白、干净,创缘与周围正常皮肤界限明显,无渗出。见图 1。



图 1 烫伤 4 s 小鼠伤后即刻创面苍白干净,无渗出

2.2 深 II 度创面致伤时间及取材时间筛选

伤后 0 h,烫伤 2 s 小鼠皮肤表皮浅层坏死,烫伤

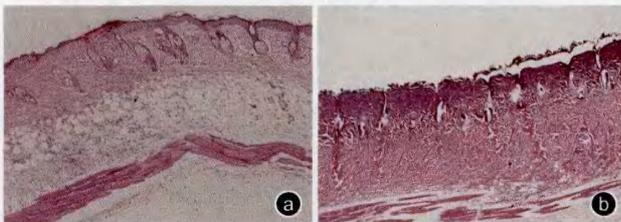


图 2 各种致伤时间小鼠伤后 0 h(伤后即刻)皮肤组织病理学观察 HE × 40。a. 烫伤 2 s 小鼠表皮浅层坏死; b. 烫伤 4 s 小鼠表皮深层受损; c. 烫伤 6 s 小鼠真皮浅层受损; d. 烫伤 8 s 小鼠真皮深层坏死

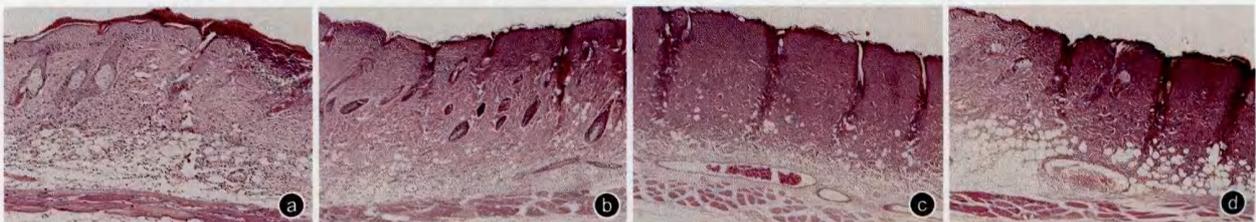


图 3 各种致伤时间小鼠伤后 24 h 皮肤组织病理学观察 HE × 40。a. 烫伤 2 s 小鼠表皮全层坏死; b. 烫伤 4 s 小鼠伤及真皮深层; c. 烫伤 6 s 小鼠皮肤全层坏死; d. 烫伤 8 s 小鼠皮肤全层坏死

4 s 小鼠受损部位达到表皮深层,烫伤 6 s 小鼠真皮浅层受损,烫伤 8 s 小鼠致伤深度达到真皮深层,见图 2。伤后 12 h,损伤处于发展阶段,同一致伤时间不同样本之间病理学结果存在差异。伤后 24 h,烫伤 2 s 小鼠表皮坏死脱落,部分真皮细胞充血、水肿,白细胞浸润,胶原纤维离散肿胀;烫伤 4 s 小鼠皮肤表皮细胞核固缩深染,真皮深层受损,胶原纤维融合红染均质状,皮肤附件毛囊残留,呈现深 II 度烫伤病理结果;烫伤 6、8 s 小鼠皮肤全层及皮下组织皮肤附件完全破坏,分界不清,血管内红细胞崩解,伤至肌肉层,见图 3。伤后 48 h,各致伤时间小鼠皮肤烫伤病理表现与伤后 24 h 相近。综合以上结果,筛选出烫伤 4 s 为深 II 度创面致伤时间,伤后 24 h 为取材时间。

2.3 深 II 度烫伤创面皮下组织缺氧情况

伤后 72 h,小鼠深 II 度烫伤创面可见哌莫硝唑高密度染色,创面边缘部位染色最明显。见图 4。



图 4 小鼠深 II 度烫伤创面伤后 72 h 缺氧情况(棕黄色)免疫组织化学染色。a. 创面边缘部位染色密度高 哌莫硝唑 × 40; b. 为图 4a 方框部分放大图 哌莫硝唑 × 100

2.4 深 II 度烫伤创面皮下氧含量测定

正常对照组小鼠背部皮下氧分压为 (53.1 ± 2.4) mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)。伤后 72 h,深 II 度烫伤组小鼠创面中心、创面边缘、创面周边正常

皮肤氧分压相近,分别为(36.2 ± 3.2)、(37.0 ± 1.4)、(37.4 ± 2.7) mm Hg ($F = 74.705$, $P > 0.05$),均显著低于正常对照组(F 值分别为82.377、91.375、100.531, P 值均小于0.05)。

3 讨论

目前,建立体表烧(烫)伤动物模型有以下几种方法:溴钨灯光辐射及闪光粉致动物体表烧伤、凝固汽油燃烧或开水致动物体表烧伤、磷烧伤及蒸汽烫伤。前3种方法不能使烧伤创面深度保持一致,对烧伤周边部位皮肤防护困难,且模型的建立需多人协助完成^[3]。而蒸汽烫伤模型制作简单,烫伤程度和面积易控制,烫伤深度均匀,创面干净^[4-5]。本研究建立的烫伤模型与传统的烫伤模型相比,温度一致,损伤仅为热力所致,排除了重力等因素的影响,致伤时间为惟一变量。该模型稳定性高,可重复性强,适合进行各种创面药物的筛选及作用机制的研究。

判定烧伤深度的方法有通过组织学染色检测;通过热成像采集动物或人体红外辐射,并转换为数字信号,形成伪色彩热图;活体染色病变区域;多普勒血流探测仪监测动物或人体组织微循环血流灌注量的改变等,其中组织学检测被认为是检验烧伤深度的金标准^[6-7]。本实验结合 HE 染色,观察到烫伤深度具有随着时间的发展逐渐加深的趋势。伤后 12 h,损伤处于发展阶段,同一致伤时间不同样本之间病理学结果存在一定差异。至伤后 24 h,烫伤深度趋于稳定,同一致伤时间样本的病理结果基本保持一致。伤后 48 h 的病理学结果与伤后 24 h 比较差异不明显。由于致伤时间、温度等诸多可变因素均可影响动物的致伤程度,建立模型时须严格控制,在确保动物体质量相近的前提下,脱毛完全,致伤时间、温度保持一致,致伤面积相同。本烫伤模型适用于动物小面积烫伤。在烫伤过程中给予小鼠异氟烷吸入麻醉,小鼠在伤后即可苏醒,避免了因戊巴比妥腹腔注射麻醉对小鼠呼吸抑制造成的死亡。

创面愈合包括炎性细胞浸润、上皮与肉芽组织再生、ECM 重塑和细胞迁移 4 个过程^[8]。细胞迁移又主要受 2 种细胞外物质调控,一是 ECM,二是可溶性生长因子。近年来,缺氧被认为是调控细胞迁移的第 3 种因素^[9],但其在烫伤创面发挥何种作用尚不明确。相关文献指出,烫伤部位的缺氧程度于伤后第 3 天达到顶峰^[10]。哌莫硝唑可稳定结合于缺氧细胞中,因此,本研究使用缺氧检测试剂盒定位烫

伤小鼠缺氧部位,结果证实深 II 度烫伤创面为缺氧环境。此外,采用激光多普勒经皮氧分压仪检测小鼠伤后 72 h 皮下氧含量,对缺氧环境进行定量分析。仪器的探头为直径 1 cm 的圆形结构,检测结果为该探头下区域皮下氧分压。通过检测比较小鼠创面中心、创面边缘及创面周边正常皮肤皮下氧分压值,显示 3 个部位无明显差异($P > 0.05$)。这可能与小鼠背部皮肤面积有限,但探头较大,测量的 3 个部位位置接近,且探头检测结果为片状区域而非某一点氧分压值有关。因此,在今后对小鼠缺氧情况的研究中,可选择小鼠创面周边正常皮肤的氧分压来代表小鼠烫伤创面皮下氧分压,这样可避免探头较长时间压迫创面所造成的伤害,同时减轻烫伤部位表皮和真皮坏死形成的痂皮组织对结果的影响。

创面修复是一个连续、精密、复杂的生物学过程,受多种因素调控,缺氧仅为众多因素中的一种^[10-11]。本实验初步建立了稳定的小鼠深 II 度烫伤创面模型,证实烫伤创面的缺氧部位和程度,但关于其上下游分子及作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Shah JB. Correction of hypoxia, a critical element for wound bed preparation guidelines: TIMEO₂ principle of wound bed preparation. *J Am Col Certif Wound Spec*, 2011, 3(2):26-32.
- [2] Eisenbud DE. Oxygen in wound healing: nutrient, antibiotic, signaling molecule, and therapeutic agent. *Clin Plast Surg*, 2012, 39(3):293-310.
- [3] 陈意生,史景泉,程天民,等. 现代烧伤病理学. 北京:化学工业出版社,2008:558-563.
- [4] Wu XW, Spies M, Chappell VL, et al. Effect of bombesin on gut mucosal impairment after severe burn. *Shock*, 2002, 18(6):518-522.
- [5] 姚庆君,贾赤宇,陈璧,等. 一种大鼠蒸气烫伤模型的建立. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(3):168-170.
- [6] Heimbach D, Engrav L, Grube B, et al. Burn depth: a review. *World J Surg*, 1992, 16(1):10-15.
- [7] Monstrey S, Hoeksema H, Verbelen J, et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. *Burns*, 2008, 34(6):761-769.
- [8] Kagawa S, Matsuo A, Yagi Y, et al. The time-course analysis of gene expression during wound healing in mouse skin. *Leg Med (Tokyo)*, 2009, 11(2):70-75.
- [9] Li W, Li Y, Guan S, et al. Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J*, 2007, 26(5):1221-1233.
- [10] Albina JE, Reichner JS. Oxygen and the regulation of gene expression in wounds. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(6):445-451.
- [11] Xing D, Liu L, Marti GP, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in the burn wound. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(2):205-213.

(收稿日期:2012-09-15)

(本文编辑:谢秋红)