

· 难愈创面的研究 ·

# 糖尿病大鼠深 II 度烫伤创面新生血管形成障碍的研究

乔亮 王志勇 韦俊 原博 金曙雯 花兰女 廖镇江 史济湘 陆树良



**【摘要】** 目的 了解有糖尿病基础的机体烫伤后,创面新生血管化程度与创面难以愈合的关系。方法 将 SD 大鼠分成对照组和以链脲佐菌素诱导的糖尿病组,每组 50 只。2 组大鼠均造成 20% TBSA 的深 II 度烫伤,于伤后即刻及 1、3、7、14 和 21 d 取创面组织,行组织学观察评分,并计算创面愈合率;同时采用免疫荧光双标记法检测创面组织的新生血管化程度及血管内皮细胞数量。结果 糖尿病组大鼠创面组织评分及创面愈合率均低于对照组;糖尿病组大鼠各时相点新生血管化程度较对照组明显降低(伤后 7 d,糖尿病组为  $12.00 \pm 1.40$ ,对照组为  $60.00 \pm 3.00$ ,  $P < 0.01$ )。2 组大鼠各时相点创面血管内皮细胞数量差异不明显,但糖尿病组大部分血管内皮细胞未形成功能性微血管。结论 糖尿病深 II 度烫伤难愈创面虽血管内皮细胞增殖活跃但仍血供不良,其机制与功能性微血管形成障碍有关。

**【关键词】** 烧伤; 糖尿病; 新生血管化,病理性; 内皮细胞; 难愈创面

**Study of neovascularization disturbance in deep partial-thickness scald in rats with diabetes mellitus** QIAO Liang, WANG Zhi-yong, WEI Jun, YUAN Bo, JIN Shu-wen, HUA Lan-nv, LIAO Zhen-jiang, SHI Ji-xiang, LU Shu-liang. Department of Burns, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, P. R. China

Corresponding author: LU Shu-liang, Email: sltu@sh163.net, Tel: 021-64675394

**【Abstract】** Objective To study the relationship between the degree of neovascularization and non-healing wounds in scalded rats with diabetic mellitus. Methods Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group(C, n = 30, with treatment of isotonic saline) and streptozocin (STZ)-induced diabetic group(D, n = 30, with treatment of STZ), and then they were inflicted with 20% TBSA deep partial thickness scald. Wound specimens were harvested immediately after scald and on 1, 3, 7, 10, 14, 21 post scald days (PSD) to observe histological changes, and wound healing rates were calculated. Degree of neovascularization in wound (labeled with blue microsphere) and the quantity of vascular endothelial cells (labeled with red CD31) were also measured by double-labeling immuofluorescence. Results Compared with those in C group, Wound healing rate and histological value scores were lowered, and the degree of neovascularization was abated markedly at each time point. The degree of neovascularization in D group ( $12.00 \pm 1.40$ ) was obviously lower than that in C group on 7 PSD ( $60.00 \pm 3.00$ ,  $P < 0.01$ ). There was no obvious difference in the number of vascular endothelial cells in both groups, however, the majority of endothelial cells had not formed functional capillaries in D group. Conclusion Vascular endothelial cell can proliferate actively with poor blood supply in diabetic nonhealing with deep partial-thickness scald wounds, but it is still poor in blood supply due to lack of functional capillaries.

**【Key words】** Burns; Diabetes mellitus; Neovascularization, pathologic; Endothelial cell; Non-healing wound

创面难愈是糖尿病常见并发症之一,创面血供不良是常见的病理现象<sup>[1]</sup>。以往研究认为,创面血供不足是创缘残存的血管管腔狭窄或堵塞所致。不可否认,这是引起溃疡创面的易发因素,但创面形成后是否有新生血管发生障碍,值得深入探讨。相关研究表明,糖尿病皮肤创面中存在新生血管内皮

细胞数量不足或者功能低下,与其增殖能力下降和凋亡增加有关<sup>[2]</sup>;糖尿病创面形成后,组织缺氧诱导内皮细胞增殖能力增强,功能亢进<sup>[3]</sup>。以往对创面血管化的研究,多采用表面抗原 CD31 标记血管内皮细胞后以阳性细胞计数的方法来代表新生血管发生情况,虽在一定程度上反映了新生血管内皮细胞的增殖能力<sup>[4]</sup>,但不能直观地反映其构建状况及功能。为此笔者对糖尿病难愈创面新生血管的形成进行了研究,希望有助于更深入地了解难愈创面血管化障碍的发生机制。

基金项目:国家自然科学基金(30471784,30570705,30600645)  
作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科  
通讯作者:陆树良,Email:sltu@sh163.net,电话:021-64675394

## 1 材料与方 法

### 1.1 模型制作

**1.1.1 糖尿病大鼠模型** 将 SD 大鼠(复旦大学动物实验部)按完全随机化法分为对照组和糖尿病组,每组 50 只。糖尿病组大鼠于实验前禁食 24 h,实验时经腹腔注射 25 g/L 戊巴比妥钠麻醉后固定于无菌手术板上。经腹腔一次性快速注射以无菌枸橼酸-枸橼酸钠镁液配制的 20 g/L 链脲佐菌素(STZ, pH 值 4.5, 65 mg/kg)。对照组注射等渗盐水。2 组大鼠单笼喂养,定量饮水并常规饲养 14 d。糖尿病组大鼠注射前及注射后每周经尾静脉采血,用 One-Touch 血糖检测仪(美国强生公司)测定其血糖水平,称体质量。若诱导前血糖水平小于 8.9 mmol/L,诱导后血糖水平大于或等于 11.2 mmol/L,体质量明显下降,即作为糖尿病模型。对症状较重的糖尿病大鼠,腹腔注射胰岛素 1~4 U/d,使其血糖维持在 16.7 mmol/L 左右,以降低死亡率。

**1.1.2 大鼠烫伤模型** 参照文献[5],将对照组及糖尿病组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后脱毛。于脱毛后 24 h,将大鼠固定于有洞的木板上,背部从洞中露出并浸入 80 °C 热水中,对照组浸烫 6 s、糖尿病组浸烫 5 s,均造成 20% TBSA 深 II 度烫伤创面(经病理切片证实)。烫伤后立即经腹腔注射乳酸林格液 5 mL 复苏。并分别于伤后即刻及 1、3、7、14、21 d 处死大鼠,切取创缘全层皮肤组织标本,用体积分数 10% 甲醛溶液固定后石蜡包埋。

### 1.2 检测指标

**1.2.1 创面愈合率** 于伤后 1、3、7、14、21 d 观测各组大鼠创面愈合情况。在透明纸上按大鼠创缘描画,将图像扫描并用 Osiris 4.19 软件分析。以伤后 24 h 第 1 次测量的创面面积为烫伤初始面积,计算创面愈合率。创面愈合率 = (烫伤初始面积 - 各时相点创面面积) ÷ 烫伤初始面积 × 100%。

**1.2.2 组织学观察及评分** 于各时相点处死大鼠,取创面组织标本制成 5 μm 厚的切片,行 HE 和 Masson 染色,每个标本取 3 个连续视野于光学显微镜下观察。组织学变化评分标准<sup>[6]</sup>如下:1~3 分,没有或者仅有少数细胞聚集,无肉芽组织和上皮细胞爬行;4~6 分,未成熟的肉芽组织中炎性细胞占多数,仅有少量成纤维细胞、毛细血管或者胶原沉积,极少的上皮细胞迁移;7~9 分,已形成中厚肉芽组织,炎性细胞或者成纤维细胞占多数,胶原纤维沉积增加,新生血管分布广泛,轻至中度上皮迁移;10~12 分,厚肉芽组织,以血管纤维化和广泛胶原

沉积为主,局部上皮完全覆盖创面。

**1.2.3 创面新生血管化程度** 于大鼠处死前 15 min 实施麻醉,打开腹腔,游离腹主静脉。按文献[7]方法处理,将直径 0.2 μm 的蓝色荧光微球(美国 Invitrogen 公司)与磷酸盐缓冲液(PBS)以 1:6 体积比稀释后,用微量注射器针头穿刺腹主静脉,缓慢注射 3 mL (>5 min)。荧光微球注射后让大鼠存活 15 min,随即处死切取创缘全层皮肤组织,置于液氮中。包埋,固定,冰冻切片(厚度 10 μm),荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)下观察(激发光波长 365 nm,发射光波长 415 nm)。对切片图像进行扫描,运用 SPOT 软件(美国 Dignostiinstruments 公司)对创面荧光强度进行准确计算,将所得吸光度值作为衡量创面血管化的指标。

**1.2.4 创面毛细血管内皮细胞数量** 将上述冰冻切片用 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min 后避光保存。PBS 冲洗切片,滴加甲醛,于 -20 °C 固定 5 min。再用 PBS 冲洗 3 次,5 min/次,10 g/L 牛血清白蛋白室温封闭 1 h,加入 100 倍稀释的小鼠抗 CD31 抗体,于 4 °C 过夜。用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入 100 倍稀释的抗小鼠异硫氰酸荧光素抗体,室温下孵育 1 h。最后用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,用体积分数 5% 丙三酮封片。选择激发光波长 450~490 nm,于荧光显微镜下观察。

通过 Spot 软件的 merge 功能,拟合上述作双标染色的同一标本切片得到的不同波长荧光图像,确定各组大鼠创面功能性微血管的新生程度。

### 1.3 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SAS 6.12 统计软件行方差分析。

## 2 结果

致伤后因部分大鼠死亡,全程参与实验的大鼠每组各有 30 只。

### 2.1 创面愈合率

烫伤后糖尿病组大鼠各时相点的创面愈合率均低于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 2 组大鼠创面愈合率的比较(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	伤后时间(d)				
		1	3	7	14	21
对照组	30	1.5 ± 0.3	20.9 ± 3.7	38.3 ± 4.0	59.4 ± 4.2	81.2 ± 2.5
		1.3 ± 0.3	13.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	24.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	31.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	38.4 ± 2.6 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$

### 2.2 创面组织学观察和评分

糖尿病组大鼠深 II 度烫伤创面炎性细胞浸润缓慢、持久,坏死组织脱落慢且不明显;创面愈合明显延迟(伤后 21 d 均未愈合);伤后 3、7、14 和 21 d 创面组织评分均低于对照组大鼠 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 2 组大鼠创面组织评分比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	伤后时间(d)					
		即刻	1	3	7	14	21
对照组	30	1.10 ± 0.11	1.57 ± 0.20	2.67 ± 0.20	4.53 ± 0.30	9.01 ± 0.40	11.24 ± 0.30
		1.02 ± 0.10	1.22 ± 0.20	1.83 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.82 ± 0.30 <sup>b</sup>	5.23 ± 0.40 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$

### 2.3 创面新生血管化程度

从伤后各时相点所取创面切片的蓝色荧光强度分析,糖尿病组大鼠创面新生血管化程度较对照组明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3,图 1。

表 3 2 组大鼠创面新生血管化程度比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	伤后时间(d)					
		即刻	1	3	7	14	21
对照组	30	1.00 ± 0.10	8.50 ± 0.50	35.00 ± 1.50	60.00 ± 3.00	72.00 ± 3.40	68.00 ± 3.20
		0.80 ± 0.10	1.00 ± 0.10 <sup>a</sup>	7.00 ± 0.80 <sup>a</sup>	12.00 ± 1.40 <sup>a</sup>	15.00 ± 2.10 <sup>a</sup>	17.00 ± 1.80 <sup>a</sup>

注:表中数据为吸光度值;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$

### 2.4 创面毛细血管内皮细胞数量

以 CD31 标记的红色荧光强度反映创面血管内皮细胞数量,将伤后各时相点 2 组大鼠创面的该指

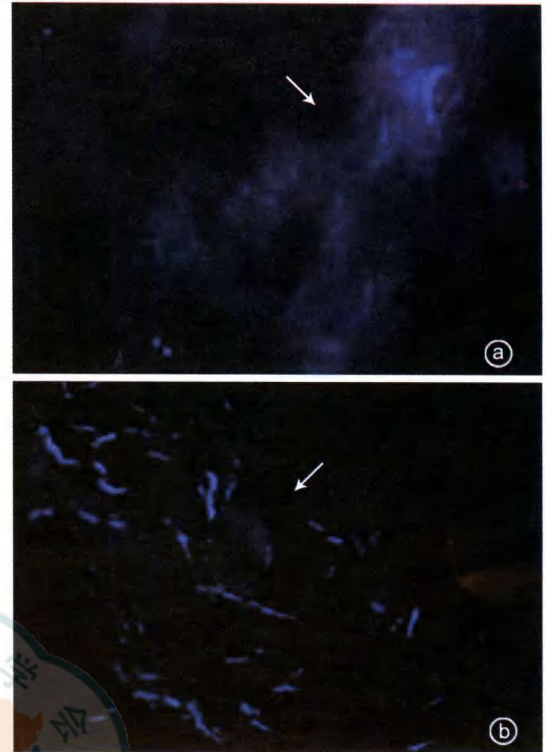


图 1 伤后 7 d 2 组大鼠创面新生血管化程度(箭头所指为创缘) 荧光显微镜 × 20。a. 糖尿病组大鼠创面; b. 对照组大鼠创面

标进行比较,差异不明显。但将同一切片的红、蓝色荧光拟合后,糖尿病组大鼠创面切片上 CD31 标记的血管内皮细胞中,仅少数细胞周围有代表新生血管化的蓝色荧光微球。而对照组 CD31 标记的血管内皮细胞周围几乎均有蓝色荧光微球。见图 2。

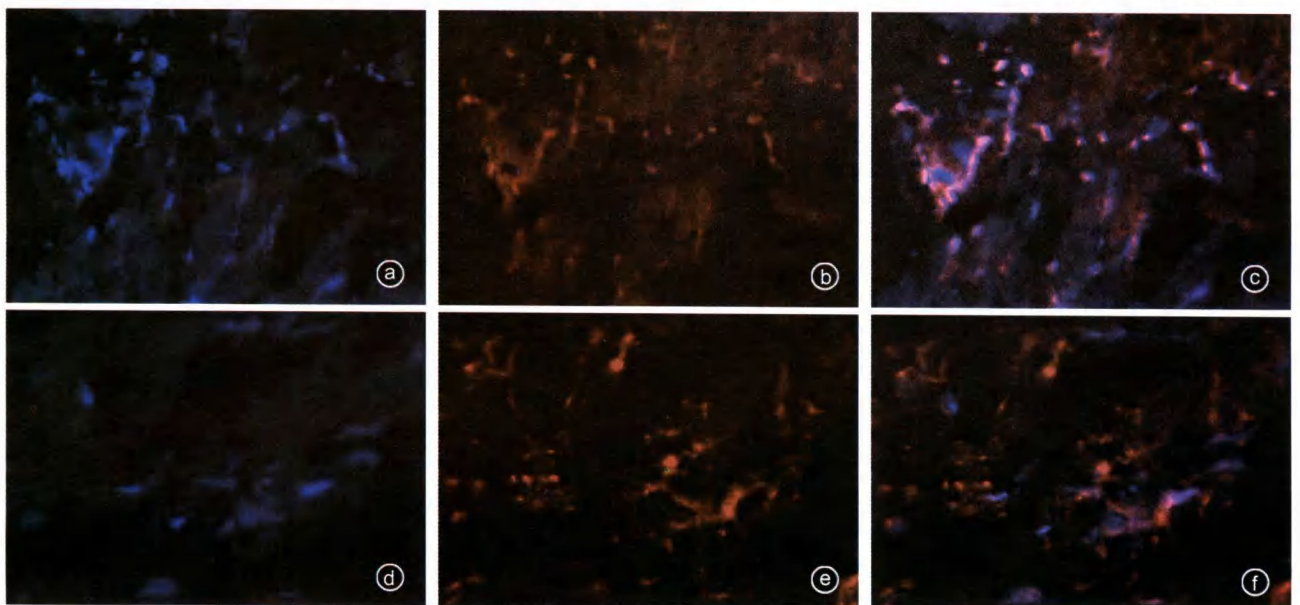


图 2 伤后 14 d 2 组大鼠创面血管的表达情况 荧光显微镜 × 20。蓝色荧光微球标记创面新生血管化程度,CD31 红色荧光标记创面血管内皮细胞数量,红、蓝光拟合后代表创面功能性微血管分布情况;a、b、c. 对照组大鼠创面;d、e、f. 糖尿病组大鼠创面

### 3 讨论

血管化低下或者供血不足是糖尿病合并创面难愈的特征,临床上常见到糖尿病患者创面缺乏新鲜肉芽组织<sup>[8]</sup>。新生血管是肉芽组织的主要成分,给创伤区域提供营养并运输代谢产物,在创面愈合过程中扮演重要角色<sup>[9]</sup>。新生血管缺乏,可能导致创面难愈或者不愈。

本实验采用 STZ 成功诱导速发型糖尿病大鼠模型<sup>[10]</sup>。再将大鼠背部制成深 II 度烫伤创面,结果观察到,糖尿病组大鼠创面在伤后 14、21 d 愈合率明显低于对照组,且伤后 21 d 光学显微镜下见糖尿病组大鼠创面不能自行愈合。笔者改进了对糖尿病大鼠深 II 度烫伤模型的观察方法,将荧光微球注入其体内参与血液循环,镜下观察到创面微血管循环的荧光微球。相关文献表明,直径 0.2  $\mu\text{m}$  荧光微球能到达最小直径的微血管,且不会渗出到血管外。因此采用荧光微球注射法能直观地反映创面的血液循环,同时也反映了新生血管的管腔形成情况<sup>[7]</sup>。利用荧光微球对大鼠深 II 度烫伤模型创面血管化进行动态观察,可见糖尿病创面在愈合过程中新生血管化程度较对照组显著降低。这一结果与以往多普勒血流探测器所检测的研究结果<sup>[11]</sup>相吻合,再次证实糖尿病难愈创面存在血管化低下的现象。血管化低下的直接后果是创面血供不足,亦是造成创面难愈的重要原因。

内皮细胞增殖、分化、迁移最终融合成初级血管网;这种初级血管网随即进入重塑过程,通过出芽、分支、向不同方向生长、支持细胞募集等最终发展为成熟的脉管系统。在足量的血管内皮细胞存在的情况下,形成具有功能性的微血管,对血管化进程来说更具有意义。笔者通过对同一创面的免疫荧光双标记荧光微球(蓝色)和 CD31(红色)共表达的比较,观察到糖尿病组大鼠烫伤创面中,仅有少数 CD31

标记的血管内皮细胞周边可见代表血管化的蓝色荧光微球,表明大部分新生血管内皮细胞尚未形成具有功能性的微血管;而对照组大鼠创面中,CD31 标记的血管内皮细胞周围几乎都能见到蓝色荧光微球,说明其新生血管内皮细胞能形成大量功能性的微血管。上述现象表明,糖尿病深 II 度烫伤创面存在血管形成障碍。

### 参考文献

- [1] Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1249 - 1259.
- [2] Laing T, Hanson R, Chan F, et al. The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of impaired diabetic wound healing: a novel therapeutic target? *Med Hypotheses*, 2007, 69(5): 1029 - 1031.
- [3] Martin A, Komada M, Sane D. Abnormal angiogenesis in diabetic mellitus. *Med Res Rev*, 2003, 23(2): 117 - 145.
- [4] Suh W, Kim KL, Kim JM, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. *Stem Cells*, 2005, 23(10): 1571 - 1578.
- [5] 林炜栋, 陆树良, 青春, 等. 糖尿病大鼠深二度烫伤创面 VEGF 和 bFGF 的表达规律及其与创面微血管密度的关系. *中华医学杂志*, 2003, 83(19): 1702 - 1704.
- [6] Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, et al. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am J Pathol*, 2002, 161(1): 97 - 104.
- [7] Springer ML, Ip TK, Blau HM. Angiogenesis monitored by perfusion with a space-filling microbead suspension. *Mol Ther*, 2000, 1(1): 82 - 87.
- [8] Frykberg RG. Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *Am Fam Physician*, 2002, 66(9): 1655 - 1662.
- [9] Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, 2003, 9(6): 685 - 693.
- [10] Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 2005, 366(9498): 1736 - 1743.
- [11] Esposito C, Fasoli G, Platin AR, et al. Long-term exposure to high glucose up regulates VCAM-induced endothelial cell adhesiveness to PBMC. *Kidney Int*, 2001, 59(5): 1842 - 1849.

(收稿日期: 2007-08-27)

(本文编辑: 赵敏、张红)

## 中华烧伤杂志特约审稿专家名单

(按姓氏笔画排序)

于 冶	马 兵	王广庆	王凤君	王甲汉	王达利	王凌峰	石富胜	刘小龙	刘洪琪
刘 群	吕国忠	朱雄翔	祁少海	张丕红	李叶扬	李孝建	杨顺江	杨晓东	沈余明
陈华德	陈 旭	陈国贤	陈 炯	易 东	林 才	罗向东	郑庆亦	胡大海	荣新洲
夏培元	贾晓明	郭 力	郭光华	梁自乾	黄 勇	曾元临	谢尔凡	谢立华	路 卫
雷 晋	谭 谦	潘云川	薛晓东						