

# 中医病证相符的糖尿病慢性皮肤溃疡 大鼠造模方法初探

李媛<sup>1</sup>, 赵光明<sup>1</sup>, 董建勋<sup>2</sup>, 路广林<sup>1</sup>, 张旭辉<sup>1</sup>, 王乐平<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010)

**【摘要】** 目的 观察不同造模方法致糖尿病大鼠慢性皮肤溃疡创面形态及愈合时间的影响。方法 50只SD大鼠随机分为5组: 皮肤缺损组(QS组: 剪皮), 糖尿病组(DM组: STZ + 剪皮), 糖尿病加金黄色葡萄球菌组(DMJJ组: STZ + 剪皮 + 金葡菌), 糖尿病加激素组(DMJS组: STZ + 剪皮 + 激素注射), 糖尿病加激素加异物组(DMYW组: STZ + 剪皮 + 激素注射 + 异物埋置)。糖尿病模型稳定后每周测量血糖1次, 每日称量体重、观察疮面情况、测量创面面积。12 d后处死, 石蜡包埋肉芽组织观察其组织病理形态。结果 DMJJ组前5d愈合速度快于其余组( $P < 0.01$ ); DMYW组的愈合时间延长, DMYW组愈合率显著偏低, 与其余组比较有统计学意义( $P < 0.01$ )。造模12 d其余组愈合率无统计学差异, DMYW组愈合率显著低于其余组( $P < 0.01$ )。结论 注射激素大鼠表现出中医“阴证”证型特点, 糖尿病加激素注射加异物埋置复合因素造模法能使大鼠创面表现出与临床相似的“阴证”证型特点。

**【关键词】** 慢性皮肤溃疡; 阴证; 糖尿病大鼠; 模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0063-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.012

## Exploration of the establishment of a rat model of chronic diabetic skin ulcer simulating the traditional Chinese syndrome

LI Yuan<sup>1</sup>, ZHAO Guang-ming<sup>1</sup>, DONG Jian-xun<sup>2</sup>, LU Guang-lin<sup>1</sup>, ZHANG Xu-hui<sup>1</sup>, WANG Le-ping

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010)

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of different modeling methods on the wound morphology and healing time of chronic skin ulcers in diabetic rats. **Methods** SD rats ( $n = 50$ ) were randomly divided into five groups, 10 rats in each group: skin defect group (group QS: dermal deficiency), diabetes group (group DM: STZ injection + skin excision), diabetes plus *Staphylococcus aureus* group (group DMJJ: STZ injection + skin excision + bacterial infection), diabetes plus hydrocortisone group (group DMJS: STZ injection + skin excision + hydrocortisone intervention) and diabetes plus hydrocortisone and implantation of foreign body group (DMYW group: STZ injection + skin excision + hydrocortisone intervention + foreign body embedded). The rats were measured for body weight and wound healing every day, and blood glucose after stable diabetes once a week. The rats were sacrificed 12 days later and the skin lesions were examined by histopathology. **Results** The healing rate of the DMYW group was significantly slower than that in the other groups ( $P < 0.01$ ). At 12 days after modeling, the healing rate of the DMYW group was significantly lower than that of the remaining groups ( $P < 0.01$ ), while the healing rates were not significantly different among the remaining groups. **Conclusions** The modeling method of DMYW group can show skin wounds similar to the clinical characteristics of “Yin syndrome”, and the addition of

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81072808);北京市教育委员会科技计划项目(No. KM201110025023);北京市高层次卫生技术人才学科带头人项目(No. 2011-2-14)。

**【作者简介】** 李媛(1988-),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治周围血管疾病及慢性皮肤溃疡的研究。

**【通讯作者】** 董建勋,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医外治技术应用规范化研究及中医药防治周围血管疾病的临床与基础研究, E-mail: jxdong188@sina.com

foreign body implantation significantly prolongs the rat skin healing time.

【Key words】 Skin ulcer, model; Yin Syndrome; Diabetes mellitus; Rats

慢性皮肤溃疡是中医外科常见病、多发病,而糖尿病皮肤溃疡是其中一种,均有反复发作、长期不愈的特点,大大加重了患者心理负担及经济负担,严重影响患者的生活质量。中药在促进创面愈合方面有显著疗效。目前外用药物治疗慢性皮肤溃疡的动物实验研究中,多数是基于西医“病”来建立模型的,模型缺少中医理论体系的指导,使得实验中外用药治疗慢性皮肤溃疡的药证不一。本课题组已有对慢性皮肤溃疡动物模型的前期研究<sup>[1-2]</sup>基础,为了找出与临床糖尿病慢性皮肤溃疡阴证证型表现一致的大鼠模型,本实验对四种糖尿病溃疡模型造模方法进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 50 只,6~7 周龄,雄性,体重 200~220 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。饲养及无菌手术在中国中医科学院中药研究所屏障动物实验设施内进行【SYXK(京)2008-0023】。温度 20~22℃,相对湿度 40%~60%,12 h 光照、12 h 避光循环饲养。

#### 1.1.2 试剂与仪器

链脲佐菌素(STZ,货号:S0130),柠檬酸、柠檬酸钠,均购自上海前尘生物科技有限公司;氢化可的松注射液(浓度 5g/L),购自天津金耀氨基酸有限公司;金黄色葡萄球菌( $3 \sim 5 \times 10^{12}/L$ ),ATCC29213,由北京中医药大学基础医学院病原系免疫学教研室提供。血糖仪及其配套试纸(均为罗氏公司产品,德国)。光学显微镜(Olympus,日本),照相机(Nikon D3200,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及模型制备

50 只大鼠随机分为 5 组:皮肤缺损组(QS 组)、糖尿病组(DM 组)、糖尿病加菌组(DMJJ 组)、糖尿病加激素组(DMJS 组)、糖尿病加激素加异物组(DMYW 组),每组 10 只。

糖尿病模型:适应性喂养 3 d 后,实验前令 50 只大鼠禁食不禁水 12 h,称量体重。临用前配置浓度为 0.1 mol/L、酸碱度 pH4.2~4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,配制浓度为 1% STZ 的溶液,冰浴放

置。根据大鼠体重, QS 组注射等剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;后 4 组每只腹腔注射 STZ 55 mg/kg,在注射 STZ 后 72 h 测量随机非空腹血糖,成模标准为随机血糖大于 16.7 mmol/L,糖尿病成模率达 100%。皮肤溃疡模型:糖尿病成模两周后开始造皮肤溃疡模型,溃疡模型前 3 d 给予 DMJS 组及 DMYW 组大鼠连续 3d 经股部肌肉注射氢化可的松每只 20 mg/kg;造溃疡模型当天用 4% 水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉,再用电推将大鼠背部长毛脱去,面积约 4cm×4cm。在脱毛区用直径为 2.5 cm 的圆形塑料环标记造模区域,在无菌条件下剪去造模区全层皮肤,深达筋膜。DMJJ 组在筋膜下喷洒金黄色葡萄球菌(每只 1 mL), DMYW 组将与缺损皮肤相同大小的塑料环(外环直径 2.8 cm×2.8 cm,内环直径 2.5 cm×2.5 cm)缝于溃疡边缘固定。所有大鼠均用三层医用纱布覆盖,肤色胶布“丰”形固定。每日换纱布 1 次,连续观察 12 d。

#### 1.2.2 样本收集与处理

溃疡模型 12d 后禁食不禁水 12 h,称取禁食后体重,用 4% 水合氯醛 1 mL/100g 麻醉大鼠,腹主动脉取血,处死大鼠后,剪下创面处新生组织,4% 多聚甲醛分组固定。

#### 1.2.3 观测指标

(1)观察一般情况:每日观察各组大鼠行为活动、疮面形态、粪便性状等有无异常。(2)注射 STZ 后 24、72 h,以后每周测随机血糖 1 次。(3)创面愈合情况:用透明塑料薄膜勾勒创面边缘以记录创面面积,计算创面愈合率。创面愈合率=(初始面积-未愈合面积)/初始面积×100%

#### 1.2.4 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件系统进行统计,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,体重、血糖、面积愈合率采用重复测量的方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血糖变化情况

QS 组大鼠饮食量适中,糖尿病大鼠均表现出多饮、多食、多尿现象,72h 后除 QS 组外,血糖均高于 16.7 mmol/L,之后两周均能维持高血糖水平(见图 1)。

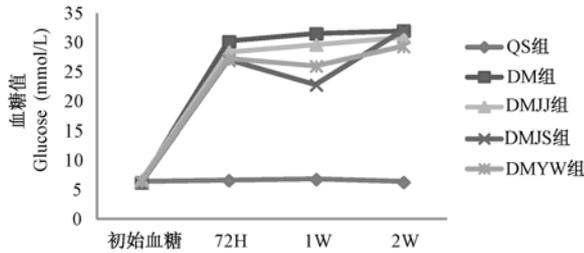


图 1 各组血糖变化趋势

Fig. 1 Trends of changes of blood glucose in the rats of each group

2.2 大鼠体重变化

造模前各组大鼠体重无差异,造模后分组及时

表 1 糖尿病大鼠体重变化情况 ( $\bar{x} \pm s$ , g)

Tab. 1 Body weight variation of the diabetic rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	数量 Number	初始体重 Initial body weight	溃疡 5 d 5 days after ulcer modeling	溃疡 11 d 11 days after ulcer modeling
QS 组	10	219.01 ± 2.91	277.45 ± 16.10	315.07 ± 20.44
DM 组	10	221.57 ± 3.29	235.29 ± 9.79 <sup>▲</sup>	271.32 ± 8.91 <sup>▲</sup>
DMJJ 组	10	220.03 ± 2.84	226.12 ± 8.01 <sup>▲</sup>	259.68 ± 10.18 <sup>▲</sup>
DMJS 组	9	220.44 ± 3.10	226.87 ± 8.13 <sup>▲</sup>	258.18 ± 17.86 <sup>▲</sup>
DMYW 组	8	219.64 ± 2.66	229.94 ± 12.20 <sup>▲</sup>	268.53 ± 11.41 <sup>▲</sup>

注: ▲与缺损组比较  $P < 0.01$

Note: Compared with the QS group  $P < 0.01$

表 2 大鼠创面愈合率 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

Tab. 2 Healing rates of skin ulcer in the rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	数量 Number	溃疡 1 d 1 days after ulcer modeling	溃疡 3 d 3 days after ulcer modeling	溃疡 5 d 5 days after ulcer modeling	溃疡 9 d 9 days after ulcer modeling	溃疡 11 d 11 days after ulcer modeling
QS 组	10	16.44 ± 1.56	45.31 ± 7.81	60.38 ± 5.32	86.61 ± 3.96	89.58 ± 2.73
DM 组	10	12.13 ± 9.2	40.78 ± 6.29	58.85 ± 5.33	83.28 ± 2.39	86.07 ± 2.56
DMJJ 组	10	45.67 ± 9.3 <sup>*</sup>	59.95 ± 10.1 <sup>*</sup>	67.76 ± 6.89 <sup>*</sup>	80.11 ± 4.99	86.19 ± 5.86
DMJS 组	9	8.48 ± 6.72 <sup>*</sup>	37.38 ± 7.14 <sup>*</sup>	52.51 ± 5.25 <sup>*</sup>	78.69 ± 3.93	87.48 ± 2.55
DMYW 组	8	0.35 ± 12.2 <sup>*</sup>	4.06 ± 14.45 <sup>*</sup>	23.47 ± 10.48 <sup>*</sup>	51.20 ± 24.2 <sup>*</sup>	58.51 ± 22.58 <sup>*</sup>

注: 与 QS 组比较,  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the QS group,  $P < 0.01$ .

2.4 大鼠一般情况及创面情况

QS 组、DM 组、DMJJ 组整体状态较好,活动灵敏,激素组及异物组大鼠整体状态较差,体重增长不明显,蜷缩、尾冷,多尿,少食,大便稀溏、腥臭。

在整个愈合过程中, QS 组创面愈合初期肉芽色泽鲜红,表面湿润,有少量血及浆液渗出,愈合过程中痂皮形成少,新生组织与周边皮肤等高; DM 组创面愈合初期肉芽色红而不鲜,至愈合中后期肉芽组织色暗红,常见有黑褐色痂皮覆盖; DMJJ 组创面愈合初中期表面有黄色脓稠污浊分泌物分布,皮缘有痂皮生成,后期痂皮呈黑褐色,挤压后从痂皮间有清稀组织液渗出; DMJS 组创面愈合初期分泌物清稀色白,分泌物下肉芽组织色淡,中后期可见肉芽组织色泽晦暗,痂皮形成较少; DMYW 组创面愈合初期分泌物清稀,光白板亮,肉芽组织被分泌物遮盖,中后期

间对体重有交互作用 ( $F = 12.762, P < 0.01$ ), 时间对体重变化有影响 ( $F = 370.938, P < 0.01$ ), 造模使 QS 组与各糖尿病组间质量不等 ( $F = 29.686, P < 0.01$ ) (表 1)。

2.3 大鼠溃疡愈合情况

不同的造模方法对愈合率有统计学差异 ( $F = 62.638, P < 0.01$ ), 表明不同的造模方法对愈合率有不同的影响。其中, 溃疡模型后 DMYW 组愈合率全程显著低于其他组别, DMJJ 组前 5 d 愈合率高于其他组。时间对愈合率有影响 ( $F = 519.803, P < 0.01$ ), 造模方法对愈合率有影响时间和造模方法对愈合率有交互作用 ( $F = 8.576, P < 0.01$ ) (表 2)。

可见肉芽组织色白或淡红而无光泽,缝线处入挤压后有清稀组织液渗出。

2.5 创面肉芽组织病理染色结果

HE 染色 (图 2, 彩插 12), 光镜显示: QS 组大鼠新生皮肤组织结构完整, 层次清晰, 新生表皮上有角质层分布, 胶原纤维细胞粗大分布不规则, 真皮层内有新生大小血管分布; DM 组有单层表皮细胞生成, 真皮层内有较细新生胶原纤维和大量炎症细胞, 无新生血管形成; DMJJ 组有多层新生表皮细胞规则分布, 组织内有组织液、血浆凝固成分及炎症细胞浸润, 有少量血管生成; DMJS 组真皮边缘无表皮生成, 组织内有少量炎症细胞及组织液浸润, 无血管生成; DMYW 组未见表皮生成, 无炎症细胞浸润, 无任何愈合倾向。

Masson 染色 (图 3, 彩插 12), 光镜下蓝色显示胶

原纤维, QS 组胶原纤维粗长, 密布且规则排列; DM 组胶原纤维较粗, 但比 QS 组少而细, 围绕炎症细胞无序排列; DMJJ 组胶原纤维短小, 零星分布于细胞间; DMJS 组胶原纤维细, 多而杂乱充斥于细胞间隙中; DMYW 组胶原纤维生成少, 细而杂乱、散在分布。

### 3 讨论

中医证候动物模型的建立与研究是联系中医基础和临床的桥梁和纽带, 是有效中药的筛选、药物作用机制深入研究的基础。目前在糖尿病慢性皮肤溃疡的临床药物研究中, 使用较多的为糖尿病加全层皮肤切除模型<sup>[3]</sup>, 但是此种动物模型局限于只能复制疾病模型, 无法反应中医的证候特点, 对中医学的研究来讲, 没有理想的中医动物模型, 药物机理的深入研究是难以进行的。

目前糖尿病模型多采用化学药物诱导法<sup>[4]</sup>腹腔注射 STZ 制备, 研究中使用较多的几种伤口模型有感染伤口、糖尿病溃疡模型<sup>[5]</sup>。本实验通过腹腔注射 STZ 法成功诱导大鼠糖尿病模型后, 在糖尿病模型基础上对单一及复合因素溃疡模型进行了比较探讨。从实验结果可以看出糖尿病组与皮肤缺损组愈合率之间无统计学差异, 原因可能由于大鼠自愈力极强, 糖尿病形成时间较短, 对血管等影响较小而使愈合率差异不大。糖尿病加菌组早期比正常组愈合快, 伤口细菌感染对组织修复存在双重性作用<sup>[5]</sup>, 即大量重度感染明显延迟愈合, 少量轻度感染能加快愈合<sup>[6]</sup>, 本次实验使用为实验室标准菌株, 致病力低下, 故大量细菌并未使伤口愈合延迟。糖尿病激素组与糖尿病异物组较正常组愈合率均明显偏低。糖皮质激素能促使皮肤衰老, 具有抗炎抗增殖作用可导致伤口愈合障碍<sup>[7]</sup>, 糖皮质激素因此被认为是一个潜在制作伤口愈合障碍模型工具<sup>[8-9]</sup>。

早在 1960 年, 上海邝安堃即已指出皮质型激素可使动物表现与阳虚临床特征基本相符——体重下降、萎靡、耐受力低下等症<sup>[10]</sup>。现代研究证明, 过量应用糖皮质激素可抑制蛋白合成, 诱发或加重感染, 使肌肉萎缩, 伤口愈合迟缓<sup>[11]</sup>。阙华发等<sup>[12]</sup>给大鼠肌肉注射醋酸氢化可的松建立难愈性创面模型, 模型组创面愈合时间较正常组明显延长 ( $P < 0.01$ )。罗玲<sup>[2]</sup>皮肤缺损后加异物埋置, 可影响创面的血液循环, 并可通过不断的机械刺激在局部形成炎症状态从而影响创面愈合。本实验对比以上多种造模方法后, 发现采用注射 STZ-皮肤缺损-激素干预-塑料环埋置复合因素造模法, 使大鼠在造模后, 表现出便溏、蜷卧、尾冷、活动减少等正气不足的整

体症状; 创面局部表现为创面分泌物清稀, 光白如板, 肉芽组织瘀黯或红而不泽等符合阴证疮疡模型的特征<sup>[1]</sup>, 且在后期基本维持此创面状态。糖尿病加激素组在早期由于免疫抑制作用, 溃疡愈合率低于同期糖尿病组, 由于氢化可的松诱导的肾阳虚模型可使下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴反馈抑制, 但肾基本无损伤, 待机体将氢化可的松代谢后, 则可反馈性的调节这种抑制, 从而使阳虚症状减轻<sup>[13]</sup>, 对伤口愈合的抑制作用亦有减轻。糖尿病加激素加异物组由于异物的加入, 愈合率显著持续低于其余各组 ( $P < 0.01$ )。异物的持续刺激能使大鼠能在创面愈合后期维持阴证溃疡状态。

本实验的局限性在于未观察 DMYW 组完全愈合所需的时间, 对于 DMYW 组完全上皮化所需要的时间还有待进一步研究。本实验结果表明糖尿病加激素加异物埋置复合因素造模能更好地维持慢性皮肤溃疡阴证模型, 造模后大鼠症状表现及愈合速度基本符合中医“阴证”模型慢性皮肤溃疡要求。

(本文图 2、3 见彩插 12。)

#### 参 考 文 献

- [1] 董建勋, 路广林, 张美吉, 等. 回阳生肌脂质凝胶促进慢性皮肤溃疡愈合的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(11):752-755.
- [2] 罗玲. 大鼠慢性体表溃疡模型的建立与朱红膏毒效关系研究 [D]. 北京中医药大学, 2011.
- [3] 李巧芬, 常柏, 李晓军, 等. 糖尿病大鼠难治性溃疡模型的复制及病理学观察 [J]. 天津中医药大学学报, 2008, 27(2):72-74.
- [4] 朱超, 朱莹莹. II 型糖尿病动物模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2):84-88.
- [5] 高富雷, 王丹茹, 张余光. 创伤愈合动物模型的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2007, 16(2):278-281.
- [6] Rojas IG, Padgett DA, Sheridan JF, et al. Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing [J]. Brain, Behav Imm, 2002, 16(1):74-84.
- [7] 付万进, 王晖, 庞玉新, 等. 皮肤创伤模型研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(2):214-218.
- [8] Goudochnikov VI. The role of glucocorticoids in aging and age-related pharmacotherapy [J]. Adv Gerontol, 2011, 24(1):48-53.
- [9] Sgonc R, Gruber J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review [J]. Gerontology, 2012, 59(2):159-164.
- [10] 卫洪昌. 对中医证型动物模型的现状分析与思考 [C]. 北京: 第七次全国中西医结合心血管病学术会议论文汇编. 2005:40-43.
- [11] 刘全忠. 糖皮质激素在皮肤科的临床用途 [J]. 中华全科医师杂志, 2007, 6(7):395-397.
- [12] 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, 6(10):1049-1053.
- [13] 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.

[收稿日期] 2013-09-01