

橡皮生肌膏对实验猪创面模型愈合的影响及创面模型制备动物品种选择

郭晶¹, 孙巍巍², 王一鸣¹, 戴睿¹, 朱朝军³, 孙旭³, 张朝晖³

(1 天津中医药大学, 天津 300163; 2 天津康复疗养中心, 天津 300100; 3 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250)

[摘要] **目的:** 观察橡皮生肌膏对小型巴马香猪创面模型的影响, 初步观察橡皮生肌膏对实验猪创面中 VEGF-Notch 信号通路的影响, 比较实验猪和啮齿类动物创面愈合的区别, 探讨创面模型制备选择实验猪的合理性。 **方法:** 在 4 只小型巴马香猪背部共制备 48 个疮面, 分为 2 组, 分别为康惠尔水凝胶组和橡皮生肌膏组, 术后 d0, d7, d14 进行拍照, 使用 Image J 软件测量创面面积, 计算创面愈合率, 记录创面愈合时间, HE 染色观察病理变化情况, 免疫组织化学法检测创面组织中 VEGF-Notch 信号通路相关因子的表达情况。 **结果:** 橡皮生肌膏能够促进实验猪的创面愈合、提高创面愈合率、缩短愈合时间。橡皮生肌膏能够促进 VEGF-Notch 信号通路相关因子的表达。 **结论:** 橡皮生肌膏能够促进小型巴马香猪创面模型的愈合, 可能与影响 VEGF-Notch 信号通路有关, 实验猪在生理和病理方面更趋近于人类, 未来可能成为创面模型制备的精准模型。

[关键词] 橡皮生肌膏; 小型巴马香猪; 创面模型制备; VEGF-Notch 信号通路

[中图分类号] R965.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)18-1899-06

Effect of Xiangpishengji Ointment on wound healing of experimental pig and consideration on animal breed selection for wound model development

GUO Jing¹, SUN Wei-wei², WANG Yi-ming¹, DAI Rui¹, ZHU Chao-jun³, SUN Xu³, ZHANG Zhao-hui³

(1 Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300163, China; 2 Tianjin Rehabilitation and Nursing Center, Tianjin 300100, China; 3 The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300250, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Xiangpishengji Ointment on the wound surface model of small Bama pigs, preliminarily observe the effect of Xiangpishengji Ointment on the VEGF-Notch signaling pathway in the wound surface of experimental pigs, compare the difference in wound healing between experimental pigs and rodents, and explore the rationality of selecting experimental pigs for the development of wound surface model. **Methods:** A total of 48 sores were prepared on the back of 4 small Bama pigs and divided into 2 groups, namely the Conwell hydrogel group and the Xiangpishengji Ointment group. Photos were taken on the 0, 7 and 14 days after surgery. Image J software was used to measure the wound area, calculate the wound healing rate, record the wound healing time, and observe the pathological changes with HE staining. The expression of VEGF-Notch signaling pathway related factors in wound tissue was detected by immunohistochemistry. **Results:** Xiangpishengji Ointment could promote the wound healing of experimental pigs, improve the wound healing rate, shorten the healing time, and promote the expression of VEGF-Notch signaling pathway related factors. **Conclusion:** Xiangpishengji Ointment can promote the healing of small Bama pig wound model, which may be related to the influence on VEGF-Notch

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目(2019YFC1709303)

[作者简介] 郭晶,女,博士研究生,主要从事疮疡、伤口类疾病的临床和基础研究。E-mail:guoj94520@126.com。

[通讯作者] 张朝晖,男,教授,主任医师,主要从事中西医结合治疗糖尿病足、疮疡及周围血管病的研究。E-mail:zzh45@aliyun.com。

signaling pathway. Experimental pigs are more similar to humans than rats in physiological and pathological aspects, and may become an accurate model for wound healing exploration in the future.

[Key words] Xiangpishengji Ointment; small bama pig; wound model preparation; VEGF-Notch signal pathway

橡皮生肌膏起源于《疡科纲要》中的“象皮膏”，功效为“生肌收口，并治金疮止血”^[1]。此时的“象皮膏”中含有轻粉，去毒化腐之力较强，且含有象皮血肉有情之品，生肌收口作用明显，后世的生肌象皮膏多由此转化而来。随着药物的临床使用经验增多，“橡皮生肌膏”多用于生肌长皮，所以药方中不再含有轻粉，去腐之力减弱。进入现代，“橡皮生肌膏”见于《临床骨科学·创伤分册》，主治慢性难愈性皮肤溃疡、褥疮、各种皮肤缺损等证，药物组成为象皮 10 g、血余炭 15 g、当归 15 g、龟板 5 g、生地黄 25 g、炉甘石粉 30 g、生石膏粉 50 g、麝香 10 g、黄蜡 120 g、香油 1 500 g，后逐步演变发展成现在常见的成药——橡皮生肌膏，由象皮（制）、血余炭、地黄、龟甲、当归、炉甘石、石膏、蜂蜡等 8 味中药组成。方中象皮（制）效专力猛血，生肌凉血；血余炭凉血去瘀长肉，《医学衷中参西录》记载其“能化瘀血，生新血，有似三七，……使血管流通最有斯效”；煅石膏收湿止血、生肌敛疮；炉甘石止血消肿，收湿除烂；当归养血生肌、治疗痈疽疮疡，血旺则肉长；蜂蜡止痛生肌、续绝伤；龟甲滋阴血，补肾壮骨；地黄滋肾、补阴、养血、填精髓，全方共奏祛瘀止痛，养血生肌之功。本实验观察橡皮生肌膏对小型巴马香猪创面模型的影响，并探讨创面模型制备选择实验猪的合理性。

材料与方

1 实验动物

7 月龄实验小型猪（小型巴马香猪，以下简称实验猪）4 只，雄性，体重（25 ± 5）kg，合格证书号：120904210100010626，购自天津市蓟县百农实验动物繁育科技有限公司，许可证号：SCXK2020-0002。饲养在温度 28 ℃、湿度（RH）72% 的环境中，喂养饲料为仔猪浓缩饲料 529（天津市圆鼎饲料有限公司），自由进食水。适应性喂养 7 d 后开始实验。动物实验符合天津中医药大学实验动物伦理委员会制定的动物实验标准，伦理编号：TCM-LAEC2021182。

2 试剂

康惠尔水凝胶敷料[国药监械（进）字 2009 第 3642610 号]；橡皮生肌膏（天津达仁堂京万红药业有

限公司，国药准字 Z12020345）。VEGF, Notch1, Delta-like ligand4（DLL4）抗体购自 Proteintech 公司。

3 仪器

500B 全自动数字切片扫描系统（PRECICE 公司）；酷视特 ekare insight 三维伤口测量记录系统 V1.7.5（北京大熊伟业医药科技有限公司）。

4 实验分组和药物

将 4 只小型巴马香猪分成 2 组：对照组使用康惠尔水凝胶敷料换药治疗，观察组使用橡皮生肌膏换药治疗。

5 创面模型制备

实验猪在标准饲料中适应性喂养 7 d 后，禁食 12 h（饮水保持正常），采用盐酸赛拉嗪注射液（拜特速眠新）联合咪达唑仑注射液各 0.05 mL·kg⁻¹ 肌肉注射麻醉，将实验猪的背部剃光并脱毛，去除所有残留的毛发并标记位置，10% 新洁尔灭消毒剂消毒后，沿背部正中中线两侧 10 cm 处用手术刀依次造成大小为 2 cm × 0.5 cm 的长条形伤口，实验猪背部双侧共造成 12 个创面，创面间隔为 10 cm，沿脊柱中线对称分布（见图 1）。去除所有表皮、真皮、皮下组织、浅筋膜和深筋膜。术后 6 ~ 12 h，实验猪创面平整，未出现寒战、高热（即肛温 ≥ 40 ℃）、尿少、呼吸急促、萎靡少动等不适，表明皮肤创面模型制备成功，造模后均单独饲养。



图 1 实验猪创面造模整体情况

6 换药方法

康惠尔水凝胶和橡皮生肌膏均匀涂抹于创面，使用面积与创面面积相当，两组均使用无菌纱布和黏性绷带包扎。

7 观察指标

7.1 一般情况 分别于干预 d 0, d 7, d 14 对实验猪进行称重, 观察实验猪的精神状态、进食情况、毛发色泽、二便等一般情况。

7.2 创面愈合情况 ① 观察创面愈合情况: 包括创面新生肉芽组织和分泌物情况。② 在术后 d 0, d 7, d 14 固定距离处垂直于伤口拍摄图片, 使用 Image J 软件测量创面面积, 计算两组实验猪创面愈合率。公式如下: 创面愈合率 = (原始创面面积 - 未愈合创面面积) / 原始创面面积 × 100%。③ 创面愈合时间: 从药物干预创面起, 以创面完全上皮化时间为愈合的判定标准, 记录创面愈合时间。

7.3 创面组织苏木精-伊红染色 (HE) 在术后 d 0, d 7, d 14 切取实验猪创面组织, 10% 多聚甲醛固定, HE 染色, 观察表皮、真皮、胶原纤维等情况。

7.4 免疫组织化学法 比较实验猪创面组织中 VEGF-Notch 信号通路相关因子的表达情况。

8 统计方法

用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行处理, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料的组间比较符合正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并用 LSD 进行检验后多重比较, 不满足上述条件的数据选择非参数检验。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1 实验猪的一般情况

在整个实验过程中, 实验猪的进食状态正常, 饮水、二便情况良好, 未出现尿少、体重减轻、发热等情况, 其中一只实验猪出现红色皮疹, 经处理后好转, 且未再复发。

2 创面情况

2.1 创面大体观察 对照组创面换药后分泌物量较少, 观察组换药后创面可见脓稠拉丝状分泌物, 肉芽颜色鲜活, 在整个愈合过程中, 创面未形成明显痂皮。观察组创面愈合后未见明显瘢痕, 愈合后的创周皮肤与对照组相比, 更加平整光滑, 弹性较好。

2.2 创面面积 术后 d 0, 两组的创面面积分别为 (1.04 ± 0.12) 和 (1.08 ± 0.09) cm^2 , 经统计不具有统计学差异 ($P > 0.05$), 组间可以进行比较; 术后 d 7, 对照组创面面积为 (0.68 ± 0.08) cm^2 , 观察组为 (0.43 ± 0.08) cm^2 , 两组的创面面积有统计学差异 ($P < 0.05$); 术后 d 14, 对照组创面面积为 $(0.39 \pm$

$0.04)$ cm^2 , 观察组为 (0.14 ± 0.12) cm^2 , 两组的创面面积有统计学差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组实验猪创面面积比较

组别	创面面积/ cm^2		
	d 0	d 7	d 14
观察组	1.08 ± 0.09	0.43 ± 0.08^a	0.14 ± 0.12^a
对照组	1.04 ± 0.12	0.68 ± 0.08	0.39 ± 0.04

与对照组相比, a: $P < 0.05$

2.3 创面愈合率 经观察计算术后 7 d, 观察组的创面愈合率为 $(59.96 \pm 9.62)\%$, 对照组为 $(34.04 \pm 7.66)\%$, 两组的创面愈合情况有统计学差异 ($P < 0.05$), 术后 d 14, 观察组的创面愈合率为 $(65.74 \pm 26.62)\%$, 对照组为 $(42.24 \pm 6.62)\%$, 两组的创面愈合情况有统计学差异 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 两组实验猪创面愈合率比较

组别	创面愈合率/%	
	d 7	d 14
观察组	59.96 ± 9.62^a	65.74 ± 26.62^a
对照组	34.04 ± 7.66	42.24 ± 6.62

与对照组相比, a: $P < 0.05$

2.4 创面愈合时间 经统计, 观察组的平均创面愈合时间为 (14.33 ± 1.03) d, 对照组的平均创面愈合时间为 (19.50 ± 1.05) d, 二者统计具有统计学意义 ($P < 0.05$), 观察组的平均愈合率比对照组提前 5 d 左右, 见图 2。

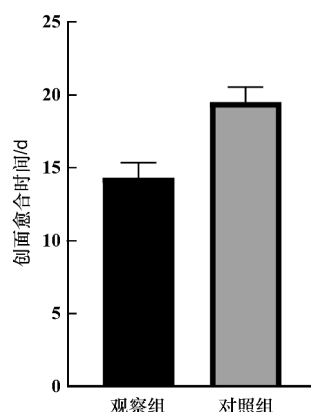
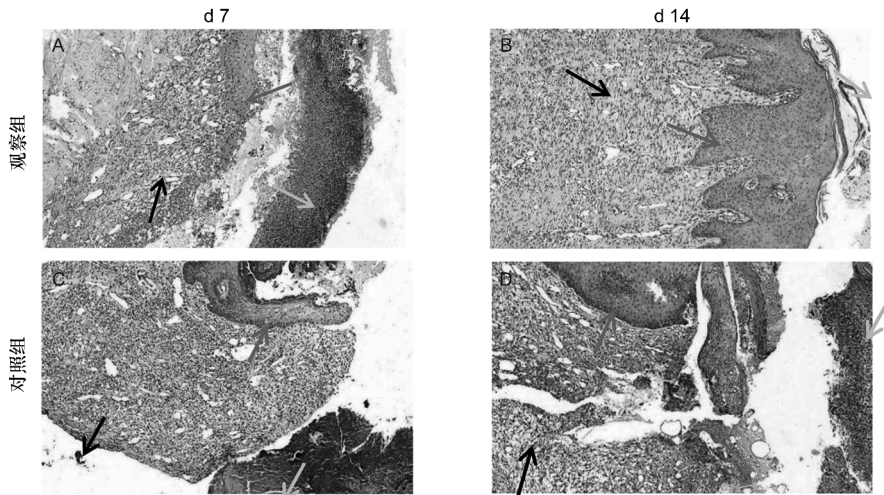


图 2 两组创面愈合时间对比

3 创面组织病理学观察

对比 d 7, d 14 观察组和对照组的 HE 染色结果,见图 3。其中对照组表面痂皮明显,缺损区修复面积较观察组小,缺损区内纤维母细胞增生,毛细血

管增多,含有大量炎细胞。观察组尚有少许痂皮残存,鳞状上皮连续覆盖于缺损区上,缺损区修复填补完整,毛细血管增多,含少量炎细胞,成纤维细胞呈束状排列。



A:图中鳞状上皮增生明显,逐步修复缺损区域表面,成纤维细胞增生,呈束状排列,填补缺损区,表面可见痂皮形成;B:图中成纤维细胞增生明显,鳞状上皮连续覆盖于缺损区上,表面可见痂皮形成;C:鳞状上皮修复较完整,成纤维细胞排列整齐,已完全填补缺损区,表面极少量残余痂皮组织;D:鳞状上皮细胞增生明显,呈修补缺损区表面趋势,纤维组织增生明显,填补部分缺损区域,痂皮组织较明显

图 3 术后 d 7 和 d 14 两组实验猪全层皮肤缺损创面 HE 染色结果 (×5; ×10)

4 创面组织中 VEGF, Notch1, DLL4 含量的比较

VEGF 为血管内皮生长因子,免疫组化结果显示,随着创面愈合的进程,两组 VEGF 表达强度均逐

渐增强,在治疗后 d 7 和 d 14,观察组中 VEGF 蛋白的表达强度高于对照组中 VEGF 蛋白的表达强度,详见图 4。

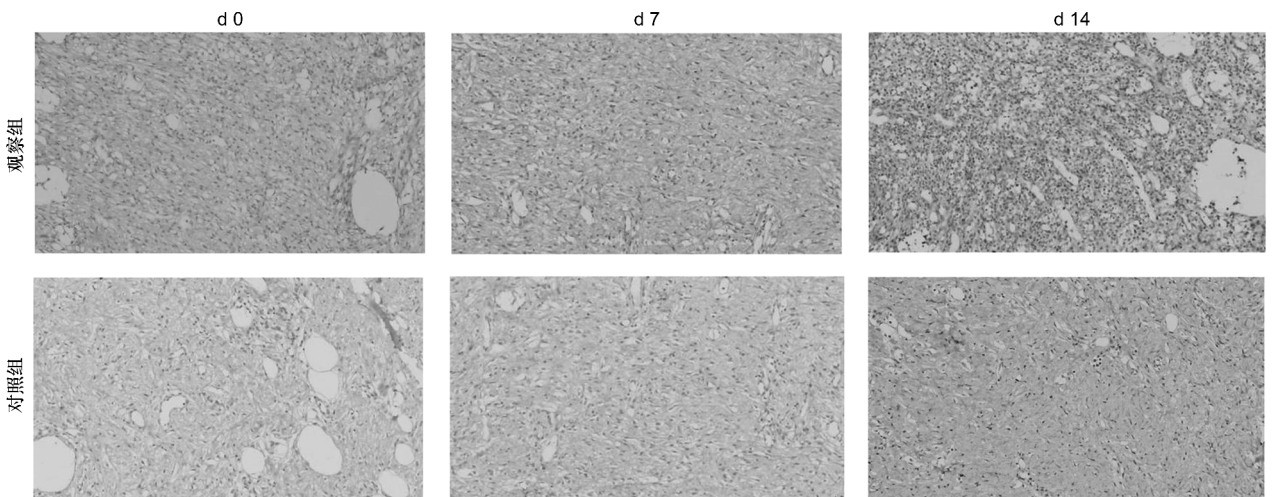


图 4 两组创面中 VEGF 的表达情况

Notch1 为跨膜受体蛋白,免疫组化结果显示,随着创面愈合的进程,两组 Notch1 表达强度均逐渐降

低。治疗后 d 7 和 d 14,观察组中 Notch1 蛋白的表达强度低于对照组中 Notch1 蛋白的表达强度,详见图 5。

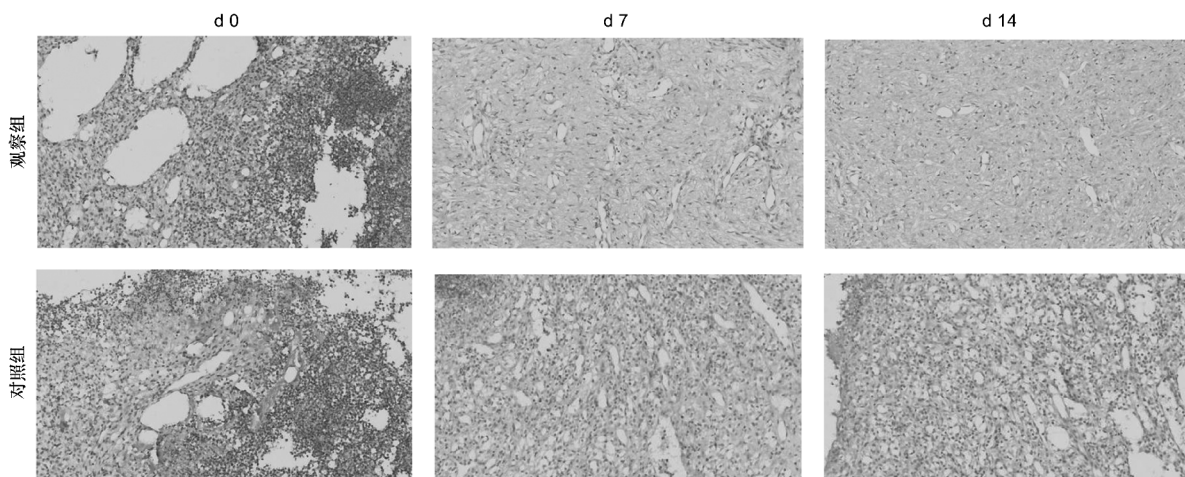


图5 两组创面中 Notch1 的表达情况

DLL4 是 Notch 信号通路的受体蛋白,免疫组化结果显示,随着创面愈合的进程,两组 DLL4 表达强度均逐渐增强。治疗后 d 7 和 d 14,观察组中 DLL4

蛋白的表达强度高于对照组中 DLL4 蛋白的表达强度,详见图 6。

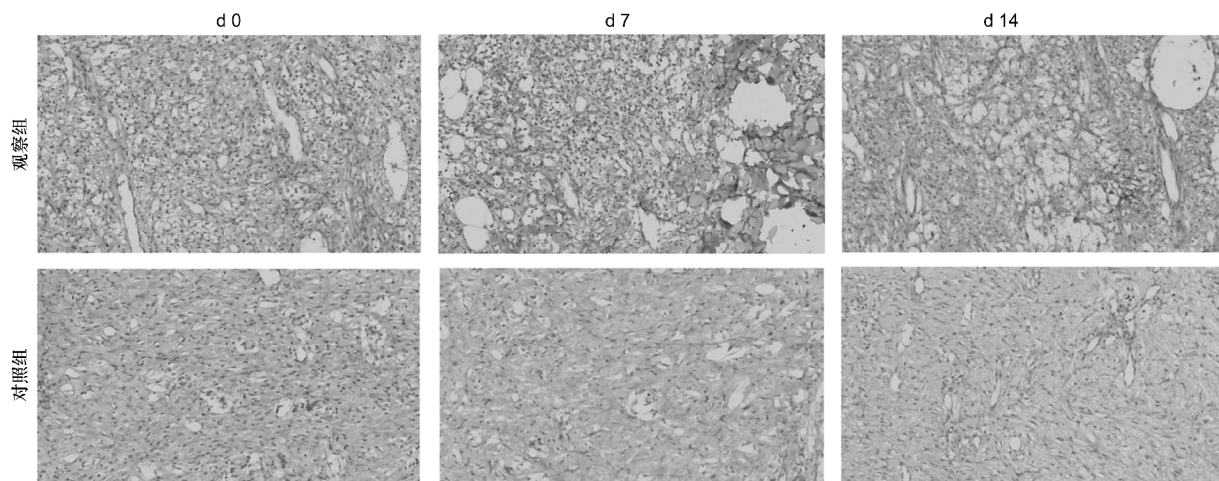


图6 两组创面中 DLL4 的表达情况

讨 论

1 实验猪和啮齿类动物创面愈合后的病理变化

目前,与创面模型相关的实验,在动物选择时大多选择兔、大鼠、小鼠等啮齿类动物,活体啮齿动物模型具有体型较小、易于控制、容易操作、价格便宜等优势。但是,从病理学角度上,啮齿类动物和大动物在创面模型的愈合过程中有很多区别,通过本次实验和以往实验的资料留存,对比其他实验动物,实验猪皮肤具备以下优势:皮肤损伤修复后填充面积较大,修复成分多样化,且成熟度高;缺损区域修复后表面覆盖连续鳞状上皮,且鳞状上皮发育良好;缺

损区域修复后可见大量新生血管。

2 创面模型动物选择的思考

追溯国内外文献,鼠类创面愈合的类型为收缩性伤口愈合,人类的创面愈合方式为再上皮化,二者不同,且鼠类横纹肌的肌腱膜发达,松弛的皮肤可以通过过度的收缩加速伤口的愈合,收缩程度超过人类皮肤^[2]。与人类毛囊不同,啮齿类动物的毛囊表皮附属物密度要高得多,有较薄的表皮和真皮,松弛的皮肤下有肉脂膜肌,在技术上很难制造出部分厚度的伤口^[3]。鼠类经常被用于烧伤模型,但其只能耐受 30% 的全身表面积烧伤,但是这种规模的烧伤不会引发人类大面积烧伤后出现的高代谢反应,人

类对烧伤的反应类似于对脓毒症的反应,鼠类对烧伤的反应属于炎症反应,免疫功能在伤口愈合中具有核心作用,啮齿类动物的先天和获得性免疫系统与人类有很大的不同,限制了大鼠模型的实用性^[4-6]。

实验猪体型较大,不易控制,但猪提供了一种理想的大型动物伤口模型,并已被广泛应用于伤口愈合研究几十年。猪皮在解剖、生理、生化和免疫学上都与人的皮肤相似^[7]。与鼠类、兔类浓密的体毛不同,猪有稀疏的体毛、厚的表皮、相似的真皮结构,皮-表皮厚度、表皮动力学、脂质成分、真皮胶原和弹性纤维的排列情况与人类皮肤更相似,并且猪和人都表现出发育良好的网状嵴、真皮乳头体和丰富的皮下脂肪组织^[8-10],猪的皮肤也与人的皮肤一样相对固定,而不像啮齿类动物或兔类的皮肤那么松弛。另外,猪真皮中血管的大小、方向和分布与人类皮肤中的血管相似。从创面愈合的方式角度看,人类和猪的部分厚度伤口愈合主要是通过再上皮化,但是啮齿类动物的创面愈合方式主要是收缩愈合^[11]。最后,从整体角度讲,与啮齿类动物相比,猪的整体生理学更加接近人类生理学,因为大多数关键器官系统在解剖和功能上是非常相似的,猪模型在预测人类的治疗方式方面比啮齿类动物具有明显优势。综上所述,使小型猪成为未来探索人类皮肤伤口愈合的精确模型^[12-15]。

3 VEGF, Notch1 和 DLL4 在创面愈合中的作用

VEGF 是近年来研究发现的促内皮生长因子,其能够促进内皮细胞增殖、增加血管的通透性、促进毛细血管的形成、改善局部创面微循环,是最重要的血管发生调节信号^[16-18]。DLL4 是 Notch 信号通路的受体蛋白,Notch1 作为 VEGF 的下游因子,与 VEGF 存在正负反馈调节,二者具有协同作用,VEGF 的升高和 Notch1 的降低能够促进创面内血管网的形成^[19]。在本实验中初步发现,橡皮生肌膏能够提高实验猪创面组织 VEGF, DLL4 的表达,降低 Notch1 的表达,这可能是其加速血管的生成及促进创面的愈合和修复的原因之一。

本实验结果表明,在实验猪背创面模型中,橡皮生肌膏能够有效促进创面愈合,并且其机制可能与 VEGF-Notch 信号通路相关因子的变化有关,但是具体机制还需进一步实验验证。在创面造模的动物品种选择方面,猪的皮肤缺损后愈合的病理结构与大鼠不同,猪不论在整体观察或是局部解剖上均与人

类更相似,是研究创面愈合情况及机制的精准模型,但由于实验猪的成本较高,在实际应用中可以在药物作用于啮齿类动物创面模型已知有益效果后再进一步使用,这样既能够为人类提供更好的治疗方法也能在一定程度上节约成本。

[参 考 文 献]

- [1] 张山雷. 疡科纲要: 二卷[M]. 新1版. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 68.
- [2] DORSETT-MARTIN WA. Rat models of skin wound healing: a review[J]. *Wound Repair Regen*, 2004, 12(6): 591-599.
- [3] DAVIDSON JM. Animal models for wound repair[J]. *Arch Dermatol Res*, 1998, 290(Suppl): S1-S11.
- [4] ABDULLAHI A, AMINI-NIK S, JESCHKE MG. Animal models in burn research[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(17): 3241-3255.
- [5] SEOK J, WARREN HS, CUENCA AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9): 3507-3512.
- [6] MESTAS J, HUGHES CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology[J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2731-2738.
- [7] XIAO Y, REIS LA, FERIC N, et al. Diabetic wound regeneration using peptide-modified hydrogels to target re-epithelialization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(40): E5792-E5801.
- [8] MEYER W, SCHWARZ R, NEURAND K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig[J]. *Curr Probl Dermatol*, 1978, 7: 39-52.
- [9] VARDAXIS NJ, BRANS TA, BOON ME, et al. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies[J]. *J Anat*, 1997, 190(Pt 4): 601-611.
- [10] MORRIS GM, HOPEWELL JW. Epidermal cell kinetics of the pig: a review[J]. *Cell Prolif*, 1990, 23(4): 271-282.
- [11] SULLIVAN TP, EAGLSTEIN WH, DAVIS SC, et al. The pig as a model for human wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2001, 9(2): 66-76.
- [12] PARK JU, JEONG SH, SONG EH, et al. Acceleration of the healing process of full-thickness wounds using hydrophilic chitosan-silica hybrid sponge in a porcine model[J]. *J Biomater Appl*, 2018, 32(8): 1011-1023.
- [13] TSAI HC, CHANG GR, FAN HC, et al. A mini-pig model for evaluating the efficacy of autologous platelet patches on induced acute full thickness wound healing[J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 191.
- [14] IRONS RF, CAHILL KW, RATTIGAN DA, et al. Acceleration of diabetic wound healing with adipose-derived stem cells, endothelial-differentiated stem cells, and topical conditioned medium therapy in a swine model[J]. *J Vasc Surg*, 2018, 68(Suppl 6): 115S-125S.
- [15] 孙旭, 朱朝军, 徐强, 等. 中医理论指导下的橡皮生肌膏临床合理应用[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(6): 613-616.
- [16] GANAPATHI AM, WESTMORELAND T, TYLER D, et al. Bevacizumab-associated fistula formation in postoperative colorectal cancer patients[J]. *J Am Coll Surg*, 2012, 214(4): 582-588; discussion 588-590.
- [17] ISHIBASHI S, KONDO H. Effect of intravitreal bevacizumab injection on Iris and iridocorneal angle neovascularization in neovascular Glaucoma[J]. *J UOEH*, 2015, 37(4): 299-304.
- [18] 刘衡哲, 徐佳, 文根, 等. 皮肤创面愈合过程中神经与血管的相互作用[J]. *国际骨科学杂志*, 2021, 42(1): 30-34.
- [19] 谢军, 毛玉洁, 王思宇, 等. 紫草素对大鼠慢性皮肤溃疡创面愈合及新生血管形成的促进作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(1): 39-45.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2023-04-26