

皮肤瘢痕动物模型制备规范（草案）

中华中医药学会中药实验药理专业委员会

摘要：皮肤瘢痕是由各种创伤引起的正常皮肤组织的外观形态和组织病理改变的统称，是人体创伤修复过程中伴发产物。现皮肤瘢痕动物模型多为病理性模型，以西医指标为主。基于对皮肤瘢痕中西医临床病症特点分析及对现有动物模型大量实验研究，形成皮肤瘢痕动物模型制备规范（草案）。

关键词：皮肤瘢痕；动物模型；规范；草案；病症特点

中图分类号：R965.1 文献标志码：A 文章编号：0253-2670(2018)01-0058-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.007

Specification for preparation of skin scar animal model (draft)

The Chinese Medicine Pharmacology Experiment Professional Committee of China Association of Chinese Medicine

Abstract: Skin scar is a general term for the change of appearance of normal skin tissue and histopathological manifestations caused by a variety of trauma, which is a natural part of the wound healing process. The animal model of skin scar is mostly pathological model based on Western medicine indexes. According to the characteristics of skin scars clinical manifestations of traditional Chinese medicine and Western medicine and a large number of experimental studies on existing animal models, the following specifications for preparation of skin scar animal model (draft) were formed.

Key words: skin scar; animal model; specification; draft; characteristics of clinical symptoms

瘢痕是各种创伤后所引起的正常皮肤组织的外观形态和组织病理学改变的统称，虽然是人体创伤修复过程中必然产物，但生长超过一定的限度，就会发生各种并发症，影响患者的生活质量。本规范（草案）重点讨论皮肤损伤修复后产生的瘢痕，通过建立一种量化的瘢痕动物模型评价标准，降低使用瘢痕动物模型实验过程中实验者主观因素对模型判定的影响，使模型评价及药效观察更加便捷准确。

1 造模动物^[1]

现用于制备皮肤瘢痕模型的动物有裸鼠、家兔、大鼠、小型猪等，常用的是裸鼠、家兔和大鼠。一般选用成年动物，雌雄各半或单一雄性，小型猪一般选用单一雌性。

2 造模方法^[2-4]

2.1 耳局部切皮制备家兔皮肤瘢痕模型^[5]

2.1.1 原理 皮肤切开，使局部皮肤中角质形成细胞过度增角质化，可模拟皮肤瘢痕局部表现。

2.1.2 方法 成年家兔，雌雄各半，体质量 2.0~2.5 kg，家兔耳缘静脉 iv 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)，

麻醉后同侧耳腹面均手术切除直径为 10~15 mm 的全层皮肤，刮除软骨膜。每耳两处，各创面间隔 15 mm 以上，创面暴露，待创面上皮化后 20 d，皮肤瘢痕增生形成，制备成兔耳皮肤瘢痕模型。本模型持续不少于 3 周。

2.2 烫伤制备巴马小型猪皮肤瘢痕模型^[6]

2.2.1 原理 使用温控烫伤仪，对动物皮肤进行一定时间烫伤，创面愈后可形成烫伤性皮肤瘢痕。

2.2.2 方法 巴马小型猪，雌性，体质量 10~15 kg，使用特制温控烫伤仪，待温度升高至预设温度 100 ℃左右，使烫头垂直并紧压目标皮肤，持续接触皮肤 20 s，致伤，待其伤口自然愈合，可形成烫伤性皮肤瘢痕模型。本模型持续不少于 3 周。

2.3 免疫缺陷品系裸鼠移植人源性皮肤制备小鼠瘢痕模型^[7-8]

2.3.1 原理 在免疫缺陷裸鼠背部移植人源性皮肤瘢痕，待伤口愈合，可模拟皮肤瘢痕外部表现。

2.3.2 方法 单纯 T 淋巴细胞缺陷裸鼠，雄性，体质量 18~22 g。将人源性皮肤瘢痕标本（来源为医

收稿日期：2017-10-19

基金项目：国家“十一五”支撑计划（2008BAI53B09）；国家中医药管理局中医药标准化专项（2017-149-11）

院内瘢痕切除手术、经患者知情同意后的离体瘢痕组织)切割成2 cm×2 cm×0.25 cm见方的小块,生理盐水浸润备用。裸鼠ip 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后固定,去除裸鼠背部2 cm×2 cm全层皮肤,将已修剪备用的皮肤瘢痕标本移植于上,对称均匀吻合间断缝合4~6针,打包加压包扎。本模型持续不少于4周。

2.4 背部全层皮肤缺损制备大鼠瘢痕模型^[9]

2.4.1 原理 皮肤全层缺损愈合后成纤维细胞过度增生,黑色素沉积,形成皮肤瘢痕。

2.4.2 方法 成年Wistar大鼠,雄性,体质量180~200 g,ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,麻醉后去除背部毛,在脊柱两侧各制备一个直径为1.8 cm的圆形全层皮肤缺损创面,暴露创面,保持垫料卫生。第2~3天创面可结痂,7 d可形成皮肤瘢痕模型。本模型持续不少于3周。

3 观测指标

3.1 表观指标

皮肤瘢痕动物模型的主要表观指标:皮肤瘢痕色泽,皮肤瘢痕厚度,皮肤瘢痕血管分布,皮肤瘢痕柔软度等,模型建立后可见局部组织增厚变硬,突出皮面,潮红充血,色素沉着等。

表观指标在皮肤瘢痕临床诊断中占有重要地位,也应是皮肤瘢痕模型是否制备成功的核心指标,权重系数0.6。

3.2 病理指标

皮肤瘢痕动物模型制备成功后,可见局部皮肤瘢痕深部胶原纤维的增厚,排列不规则,或呈波状形,或缠绕成绳索状。

局部组织病理指标是皮肤瘢痕病理变化的直接反映,是直接相关指标,权重系数0.3。

3.3 生化指标

部分皮肤瘢痕动物模型制备成功后会有生化指标如I型胶原含量升高的变化。生化指标是模型发生、发展、康复过程的机体反应,有一定价值,但特异性不高,是间接相关指标,权重系数0.1。

4 备注

本制备规范(草案)介绍的是与皮肤瘢痕中西医结合临床病症特点吻合度较高且应用较多的动物模型。还有一些犬皮肤瘢痕模型、豚鼠皮肤瘢痕模型等,因应用较少,或与临床病症特点吻合度较低,未纳入本制备规范(草案)。

5 皮肤瘢痕动物模型制备规范(草案)起草说明

5.1 造模动物

动物皮肤瘢痕的发病机制与人差异不大。但由于动物的毛皮解剖特点、皮脂成分和寄生菌群等与人类差别较大^[10],现有皮肤瘢痕动物模型仅能模仿皮肤瘢痕的某些临床特点。现用于复制皮肤瘢痕模型动物有裸鼠、家兔、大鼠、小型猪等。

5.2 饲养环境^[11]

动物饲养环境应符合《GB 14925—2010 实验动物环境与设施》《实验动物管理条例》《实验动物国家标准》《关于善待实验动物的指导性意见》《中华人民共和国动物保护法》等要求,符合相应标准及等级动物饲养环境的要求。

5.3 造模原理及评价依据

关于皮肤瘢痕的病因病机目前尚无明确结论,一般认为主要与以成纤维细胞为主的细胞成分过度增殖和以胶原为主的细胞外基质过度沉积等因素有关。现有动物模型多是模拟临床的某些表现。常用的有损伤动物局部全层皮肤,造成深度创伤痊愈后,可较好模拟皮肤瘢痕的形成和发展的外部表现;或采用一定温度的温控装置烫伤皮肤造成一定程度的烫伤损伤,模拟烫伤后的皮肤瘢痕形成等。

现有皮肤瘢痕动物模型是病理性模型,主要体现的是西医临床指标,动物模型的评价也以西医标准为主,中医标准为参考。西医标准依据的是目前通行的《现代瘢痕学》中的诊断标准^[12]:①突出皮面,形状不规则,高低不平,潮红充血,质地实韧;②有灼痛和搔痒感,于环境温度增高,情绪激动,或进食辛辣刺激性食物时症状加剧;③增生往往延续数月或几年后才逐渐发生退行性变化,表现为突起高度减低,颜色转暗,充血消退,变软;④有些最终可以平复,痛痒症状也大为减轻或消失;⑤好发于损伤深度仅及真皮的创伤,如深2度度烧伤和植皮手术中供皮创面较深等情况,偶尔亦见于较深的创伤和手术切口。

5.3.1 兔耳局部切皮制备兔耳皮肤瘢痕模型^[13]

(1)原理:兔耳全层皮肤受损伤后,愈合过程中,局部皮肤中角质形成细胞过度增生角化,出现黑色素沉积等一系列病理变化,可模拟皮肤瘢痕局部表现。(2)与临床指标吻合情况:符合西医指标①②③④,吻合度≥80%。(3)注意事项:应注意软骨膜是否剔除干净,可能的感染及使用抗生素对模型的影响。兔耳皮肤瘢痕模型侧重于皮肤瘢痕模型角

化异常的特点，多用于角质溶解药物的筛选。

5.3.2 巴马小型猪制备烫伤性皮肤瘢痕模型^[14]

(1) 原理：使用温控烫伤仪，在一定的温度下，对动物皮肤进行一定时长的烫伤，可形成程度均一的烫伤，创面愈合后可形成烫伤性皮肤瘢痕。(2) 与临床指标吻合情况：符合西医指标①②③④，吻合度 $\geq 80\%$ 。(3) 注意事项：应注意烫伤仪温度应恒定，每次烫伤的时间及强度应做到精确控制，避免损伤不一致，且应注意可能的感染及使用抗生素对模型的影响。

5.3.3 免疫缺陷品系裸鼠人源性皮肤瘢痕模型

(1) 原理：在免疫缺陷裸鼠背部移植人源性皮肤瘢痕，待伤口愈合，可模拟皮肤瘢痕外部表现。(2) 与临床指标吻合情况：该模型较为特殊，符合西医指标①②③④，吻合度 $\geq 80\%$ 。但由于皮肤瘢痕组织来源于人源，但就其组织病理状态而言，其与临床吻合度 $\geq 85\%$ 。(3) 注意事项：应注意动物与人源性组织之间排异反应对皮肤瘢痕组织生长的影响。

5.3.4 大鼠背部全层皮肤缺损皮肤瘢痕模型^[15]

(1) 原理：皮肤全层缺损愈合后成纤维细胞过度增生，黑色素沉积，形成皮肤瘢痕。(2) 与临床指标吻合情况：符合西医指标①②③④，吻合度 $\geq 80\%$ 。

(3) 注意事项：应注意可能的感染及使用抗生素对模型的影响。常作为促进伤口愈合、抑制皮肤瘢痕产生的药物的筛选。

5.4 观测指标

5.4.1 表观指标 I 级指标（核心指标），皮肤瘢痕①多发于损伤深度仅及真皮的损伤，或深度烧伤的创面愈合后；②皮肤瘢痕突出表面，外形不规则，高低不平，潮红充血，质实韧；③皮肤瘢痕有灼痛及瘙痒感；④III 度烧伤创面植皮后在皮片四周缝合处也常见网状增生性皮肤瘢痕，或任何经缝合后的切口皮肤瘢痕。

表观指标变化是皮肤瘢痕最直接的判定标准，模型建立后局部皮肤组织增厚变硬，突出皮面，潮红充血，色素沉着，或有灼痛和搔痒感，于环境温度增高，情绪激动，或进食辛辣刺激性食物时症状加剧等。根据表观指标的特点，可对表观指标进行半定量积分，更有利于模型的判断；评分标准为目前通行的温哥华皮肤瘢痕评分量表^[16]，见表 1。表观指标是皮肤瘢痕临床诊断的重要依据，也应是皮肤瘢痕动物模型制备成功与否判定的核心指标，指标权重系数 0.6^[17]。

表 1 皮肤瘢痕动物模型主要表观指标的分级

Table 1 Grading of main visual indicators of skin scar animal models

分级	指标			
	皮肤瘢痕色泽	皮肤瘢痕厚度	皮肤瘢痕血管分布	皮肤瘢痕柔软度
0	皮肤颜色与身体其他部分比较，近似正常	正常	正常肤色与身体其他部分近似	正常
1	色泽较浅	大于 0~1 mm	肤色偏粉红	柔软的（在最少阻力下皮肤能变形的）
2	混合色泽	大于 1~2 mm	中等肤色偏红	柔顺的（在压力下能变形的）
3	色泽较深	大于 2~4 mm	肤色呈紫色	硬的（不能变形的，移动呈块状，对压力有阻力）
4	色泽很深	大于 4 mm	肤色深于紫色	弯曲（组织如绳状，皮肤瘢痕伸展时会退缩）

更为严重的皮肤瘢痕甚至会出现挛缩，即皮肤瘢痕永久性缩短引致残废与扭曲。在以上评分标准中，分数越高说明皮肤瘢痕越重，反之，则轻。应注意必须采用专用玻片按压皮肤瘢痕 2 s 后观察。

5.4.2 病理指标 II 类指标（直接相关指标），皮肤瘢痕动物模型局部皮肤病理变化是模型成功与否的直接证据，模型制备成功后，取模型处皮肤组织，镜检可见局部皮肤成纤维细胞增殖，胶原纤维增多增粗，致密并排列紊乱，期间有少量炎性细胞等。

皮肤瘢痕局部皮肤病理变化分级参考标准为“—”：皮肤组织正常，组织结构完整；“+”：成纤维细胞增殖，胶原纤维增多增粗，致密并排列紊乱，

期间有少量炎性细胞；“++”：成纤维细胞明显增殖，胶原纤维明显增多增粗，致密并排列紊乱，期间有炎性细胞；“+++”：成纤维细胞大量增殖，胶原纤维明显增多增粗，十分致密并排列紊乱，期间有较多炎性细胞。

病理学观察可以准确、直接、客观说明皮肤瘢痕的具体情况，权重系数 0.3。

5.4.3 生化指标 III 类指标（间接相关指标），生化指标如 I 型胶原含量等与皮肤瘢痕模型的成功与否密切相关，是模型发生、发展、康复过程的机体反映，有一定价值，但特异性不高，是间接相关指标，权重系数 0.1。

皮肤瘢痕动物模型 I、II、III 类指标可参照文献法,均按整体为 1 进行各自的量化积分,同一类的指标如表观指标(I 类)是由皮肤瘢痕色泽、皮肤瘢痕厚度、皮肤瘢痕血管分布、皮肤瘢痕柔软度等多项指标组成的,目前是按同一贡献度计算的;如观察的表观指标有 4 项,积分时各项小指标均为 1/4,该指标最高分值为 1/4。如具体每一类指标中有特殊重要的指标,可参照指标分类时的权重,再对同一类指标中的小指标进行不同的权重分类。II、III 类指标的计算同此。

每一类指标造模后的总积分,乘以相应指标的权重,将 3 类指标积分相加,即皮肤瘢痕动物模型制备的总积分。按上述方法计算,兔耳局部切皮制备兔耳皮肤瘢痕模型总积分为 0.805,巴马小型猪制备烫伤性皮肤瘢痕模型总积分为 0.7,免疫缺陷品系裸鼠源性皮肤瘢痕模型总积分为 0.94,大鼠背部全层皮肤缺损皮肤瘢痕模型总积分为 0.685。皮肤瘢痕动物模型制备成功率相对高,每次造模可能会出现不同的总积分,为保证每次制备皮肤瘢痕动物模型的基本一致,建议总积分可以有 20%左右的偏差,以此作为评价皮肤瘢痕动物模型成功与否的标准。所得总积分大于 0.5,可认为该模型制备成功。本草案所采用的计算方法及所得总积分可供参考,研究者可根据模型不同制备方法对所观测指标总积分计算方法作适当调整。

5.5 说明

本草案及起草说明中的权重系数提示的仅是该类指标在皮肤瘢痕模型制备及判定中的重要性,不是绝对的。研究者可根据具体皮肤瘢痕模型防治的实验,适当进行调整。

表观指标、病理指标所采用的分类方法,可能因在不同的皮肤瘢痕模型中采用标准不一致,分类也会有所差异;所列生化指标也可能未全面涵盖皮肤瘢痕相关的所有指标。上述观察指标及分类仅供参考,研究者可根据具体皮肤瘢痕模型实验研究的特点对其进行调整或另行设定,并应尽量将单纯的定性描述转变成可量化或半量化的指标,以提高判定的可控性。

(起草人:苗明三,张旭,白明)

参考文献

- [1] 苗明三. 实验动物与动物实验技术 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997.
- [2] 苗明三. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [3] 陈奇, 张伯礼. 中药药效研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [4] 苗明三, 白明. 中药外用药理实验技术规范(草案) [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4): 128-131.
- [5] 焦亚, 祁永军, 宫红敏, 等. 稳定病理性瘢痕模型的建立 [J]. 感染、炎症、修复, 2017, 18(1): 12-17.
- [6] 黎丁菱, 高彦晨, 农晓琳. 硅酮凝胶对小型猪瘢痕模型血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中国当代医药, 2017, 24(3): 123-125.
- [7] 胡艳阁, 郝健, 张迪, 等. 溴结构域蛋白 4 特异性抑制剂 JQ-1 对人增生性瘢痕的影响 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2017, 37(7): 924-929.
- [8] 张雪, 兰东, 宁淑华, 等. A 型肉毒毒素对增生性瘢痕成纤维细胞的抑制作用及机制 [J]. 重庆医学, 2017, 46(5): 580-582.
- [9] 张密霞, 王景文, 张德生, 等. 京万红软膏对烫伤及创伤大鼠创面愈合、瘢痕形成的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 3007-3010.
- [10] 王灿, 苗艳艳, 苗明三. 中医药动物实验研究的再思考 [J]. 中医学报, 2015, 30(4): 548-550.
- [11] 实验动物环境与设施 GB14925-2010 [S]. 2010.
- [12] 蔡景龙. 现代瘢痕学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [13] 时军, 张小灵, 郭波红, 等. 双丹脂质体凝胶抑制兔耳瘢痕增生的作用及机制研究 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 84-87.
- [14] 宋强, 雍海溟. 维甲酸对增生性瘢痕动物模型生物性状的影响 [J]. 中国美容医学, 2015, 24(10): 38-42.
- [15] 门斯烨, 杨成城, 薛雾松, 等. 中医药防治术后瘢痕形成研究进展 [J]. 河南中医, 2015, 35(8): 2006-2008.
- [16] 温从吉, 傅士博, 周仁鹏, 等. 机械张力诱发小鼠增生性瘢痕的实验研究 [J]. 组织工程与重建外科杂志, 2014, 10(3): 145-148.
- [17] 马瑞雪, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法—综合权重法 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 569-572.