

• 实验研究 •

小牛血清去蛋白注射液促进缺血皮瓣成活的实验研究

唐明杰 章程 贾亚超 孙玉强 柴益民

【摘要】 目的 探讨小牛血清去蛋白注射液对缺血皮瓣成活面积的影响及可能机制。**方法** 36只SD大鼠随机分为3组,在背部建立3 cm × 10 cm缺血皮瓣模型。分别于术后当天经腹腔注射不同药物:实验1组给予小牛血清去蛋白注射液30 mg/kg治疗,实验2组给予小牛血清去蛋白注射液45 mg/kg治疗,对照组给予等量生理盐水注射。2周后对皮瓣成活率及组织学进行检测,并对坏死边界组织成血管和凋亡相关基因进行检测。**结果** 实验1组和2组皮瓣成活率分别为62.2%±6.3%和64.9%±3.5%,均显著优于对照组的47.8%±1.7% ($P<0.01$)。实验1组和2组新生血管标记物CD31、CD34、vWF密度显著高于对照组 ($P<0.01$)。实验1组和2组凋亡指标BCL-2及BAX基因表达较对照组显著下调 ($P<0.05$),而3组中成血管基因eNOS表达无显著性差异 ($P>0.05$)。**结论** 小牛血清去蛋白注射液可下调缺血皮瓣凋亡基因表达水平,改善皮瓣缺血状态下细胞能量代谢,从而促进皮瓣新生血管生成,增加缺血皮瓣成活面积。

【关键词】 外科皮瓣;缺血;小牛血清去蛋白液;成活;能量代谢

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2021.05.012

Experimental study of deproteinized calf blood serum injection in augmenting the survival of ischemic flap

TANG Mingjie, ZHANG Cheng, JIA Yachao, SUN Yuqiang, CHAI Yimin. Department of Orthopedics, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: SUN Yuqiang E-mail: sunyq@21cn.net

【Abstract】 Objective This study aimed to investigate the efficacy and possible mechanism through which deproteinized calf blood serum injection prolongs ischemic flap survival. **Methods** Thirty-six Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups. A distally based random flap 3 cm×10 cm in size was elevated on the rats' backs. After the flap surgery, deproteinized calf blood serum injection in 30 mg/kg and 45 mg/kg doses was administered through intraperitoneal injection in groups I and II, respectively. In group III, saline was administered as a control. At 2 weeks postoperatively, the flap survival rate was calculated, and the flaps were evaluated by histological examination. The vessel distribution and apoptosis of associated genes in the flap were also investigated. **Results** The flap survival area was 62.2%±6.3% and 64.9%±3.5% in groups I and II, respectively, which was significantly greater than in group III, at 47.8%±1.7% ($P<0.01$). The density of CD31, CD 34, and vWF in the flaps was significantly higher in groups I and II compared to group III ($P<0.01$). The expression of BCL-2 and BAX decreased significantly in groups I and II compared to group III ($P<0.05$). No significant difference was found in eNOS expression among groups ($P>0.05$). **Conclusion** The deproteinized calf blood serum injection decreased the expression of apoptosis-associated genes and improved energy metabolism in the ischemic flap, resulting in better angiogenesis in the ischemic flaps and improving the survival rate.

【Key words】 Microsurgery; Ischemic; Deproteinized calf blood serum injection; Survival; Energy metabolism

带蒂皮瓣移植技术是临床常用的修复肢体组织缺损的方法。当皮瓣切取面积超过血管蒂的供血范围时,常出现因缺血造成的皮瓣部分坏死,影响皮瓣移植效果^[1]。因此,增加缺血皮瓣成活面积具有重要的研究意义^[2]。小牛血清去蛋白注射液是目前治疗缺血性脑血管病的常用药物,受其可以减轻脑组织缺血再灌注损伤^[3-4]和改善供氧、能量供应的启

发,本研究以大鼠为实验对象,观察小牛血清去蛋白注射液对皮瓣缺血坏死及皮瓣成活面积的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 缺血皮瓣模型建立

取雄性清洁级SD大鼠36只,4周龄,体质量300 g,由上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心提供。经1%戊巴比妥(1 mL/100 g)麻醉成功后,在大鼠背部设计远端蒂随意皮瓣,长3 cm,宽

10 cm, 在深筋膜下将皮瓣掀起, 彻底止血后使用 4-0 缝线将皮瓣缝回原处。

1.2 动物分组及处理

将上述大鼠随机分为 3 组, 分别于术后当天经腹腔注射不同药物, 每天 1 次, 持续给药 14 d。实验组给予不同浓度的小牛血清去蛋白注射液(奥德金, 锦州奥鸿药业有限责任公司), 其中实验 1 组给予小牛血清去蛋白注射液 30 mg/kg, 实验 2 组给予小牛血清去蛋白注射液 45 mg/kg, 而对照组给予生理盐水。所有大鼠术后单笼饲养, 正常进食和活动。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 大体观察

术后 14 d, 根据皮瓣外观、质地、针刺后出血反应判断皮瓣成活情况。标记皮瓣坏死-成活界限, 拍照后统计皮瓣存活及坏死面积, 并计算皮瓣存活率。

1.3.2 组织学检查

术后 14 d, 对坏死边界组织取材并进行 HE 染色, 观察皮肤组织结构, 利用免疫组化染色(CD31、CD34、vWF)检测血管再生情况。将标本固定于 10% 福尔马林液, 用石蜡包埋, 切成 5 μ m 厚的切片。于梯度酒精脱蜡至水, 加入枸橼酸钠进行抗原修复, 用抗 CD31、CD34 及 vWF 多克隆抗体进行标记, 并用二氨基联苯胺(DAB)显色。于光学显微镜下检查, 并比较各组结果。

1.3.3 凋亡基因及成血管基因检测

采用逆转录聚合酶链反应(PCR)技术检测凋亡基因 *BCL-2*、*BAX* 及成血管基因 *eNOS* 表达。在组织中加入 1 mL Trizol 试剂研磨彻底后, 取上清。根据说明书指示提取总 RNA。然后, 取 1 μ g RNA 样本用 Amv 逆转录酶与 oligo dt15 一起逆转录成 cDNA。使用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂(Invitrogen, USA)在 7 500 real time PCR 系统(ABI, Invitrogen, USA)完成实时定量 PCR 扩增, 检测 *BCL-2*、*BAX*、*eNOS* 等相关基因。

1.4 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 采用 ImageJ 进行图像处理。 $P < 0.05$ 时, 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

所有 SD 大鼠均成活, 无感染或死亡。术后 14 d 皮瓣坏死界限清晰, 实验 1 组和 2 组皮瓣成活率分别为 $62.2\% \pm 6.3\%$ 和 $64.9\% \pm 3.5\%$, 均显著优于对照组($47.8\% \pm 1.7\%$) ($P < 0.01$), 其中实验 1 组与实验 2 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 组织学观察

HE 和免疫组化染色显示, 实验 1 组和 2 组皮肤结构及新生血管数量均明显优于对照组(图 1)。定量分析显示, 实验 1 组和 2 组新生血管标记物 CD31、CD34、vWF 密度显著高于对照组 ($P < 0.01$), 实验 1 组与实验 2 组 CD31 密度无统计学差异 ($P > 0.05$), CD34 及 vWF 密度差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 相关基因检测

实验 1 组和 2 组凋亡指标 *BCL-2* 及 *BAX* 基因表达较对照组显著下调 ($P < 0.05$), 而 3 组成血管基因 *eNOS* 表达无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3), 提示小牛血清去蛋白注射液可以下调凋亡基因表达, 但对血管指标基因表达无影响。

3 讨论

皮瓣移植是修复重建外科治疗软组织缺损的重要方法。尽管皮瓣外科学技术已较成熟, 但当皮瓣切取面积过大或修复距离较远时, 仍会出现皮瓣远端缺血坏死的现象, 这也是皮瓣手术最常见的并发症。皮瓣移植后, 皮瓣血运重建有多种途径, 主要包括蒂部血管供血、皮瓣内原有血管扩张、皮瓣内新生血管生成及受区基底和周边新生血管长入。当蒂部血管供血不足时, 其他途径便成为皮瓣成活的重要因素。近年来已有多种方法如皮瓣延迟技术、全身或局部药物、细胞移植、生长因子、基因治疗、体外震波治疗等用于改善皮瓣手术后血供^[5-8]。本研究采用小牛血清去蛋白注射液增加大鼠腹腔缺血皮瓣成活面积, 为其临床应用提供了实验依据。

小牛血清去蛋白注射液改善脑及外周神经功能的作用及安全性已得到临床认可^[4]。它是从发育旺盛的健康小牛血清中提取的一种生物活性物质, 包含小分子激活肽、磷酸肌醇寡糖、氨基酸、脂类等。一般认为, 前两者是其主要有效成分。在低氧条件下, 细胞内的葡萄糖会发生无氧糖酵解, 产生大量乳酸, 乳酸会进一步影响细胞功能, 加重细胞损伤。而磷酸肌醇寡糖则可以促进和改善组织细胞对葡萄糖的摄取利用, 使葡萄糖利用由无氧酵解向有氧氧化转化, 通过三羧酸循环和呼吸链产生大量能量, 既增加了葡萄糖的利用率, 又降低了代谢产物对组织的损害, 为细胞修复和再生提供了良好条件^[3]。李娟等^[9]研究小牛血清去蛋白注射液对急性重型颅脑损伤患者脑脊液乳酸浓度的影响, 结果显示治疗组乳酸含量从第 3 天开始出现明显下降, 治疗组患者远期预后也优于对照组。

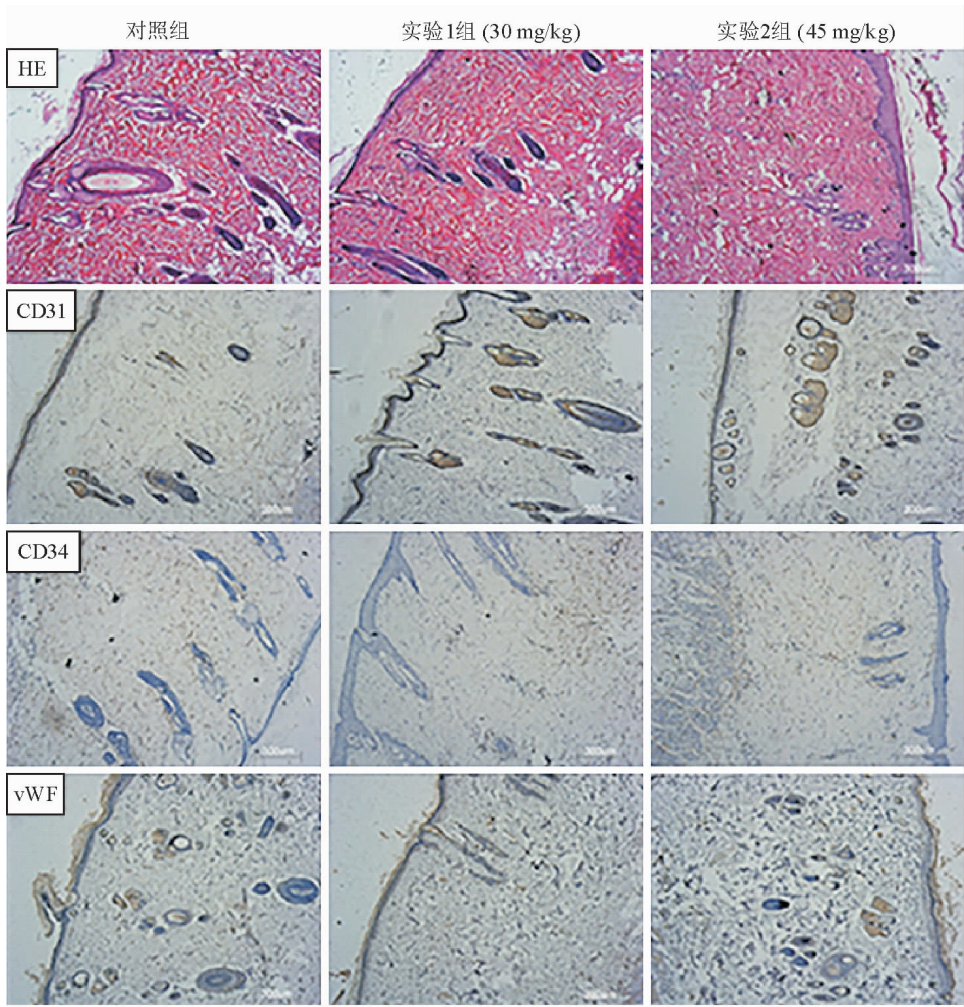


图 1 HE 及免疫组化染色(×200)

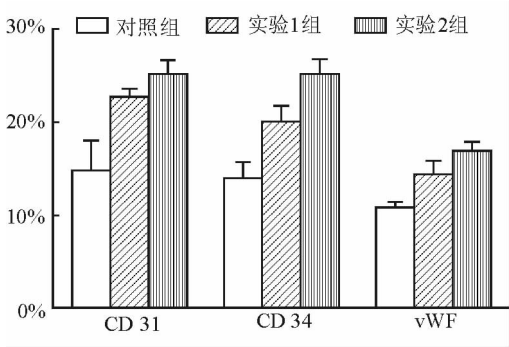


图 2 免疫组化定量分析

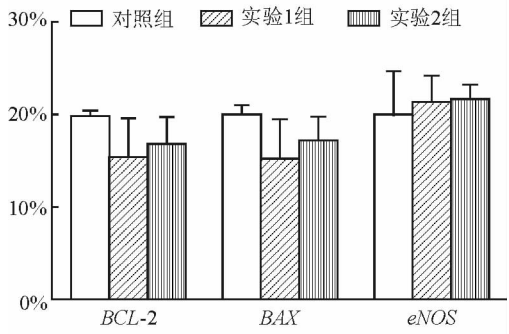


图 3 BCL-2、BAX 及 eNOS 基因检测

本研究显示,实验 1 组和 2 组皮瓣平均缺血坏死面积占比较对照组分别减小 14.4%和 17.1%,成活率较对照组分别提高了 30.1%和 35.8%;组织学检测表明,经小牛血清去蛋白注射液治疗后缺血皮瓣中有更多的新生血管生成;进一步的基因检测结果提示,小牛血清去蛋白注射液通过下调凋亡基因表达,稳定内环境,而非通过直接上调成血管基因表达来发挥作用。这表明小牛血清去蛋白注射液在改善缺血皮瓣再生方面起着积极的作用。此结论与文献报道的小牛血清去蛋白注射液在脑梗塞治疗中起作用相辅^[10],即其可有效抑制炎症因子过度反应,降低机体损伤性反应,但对血管再生基因无明显调控作用。

综上所述,小牛血清去蛋白注射液可以通过下调缺血皮瓣凋亡基因表达,改善皮瓣缺血状态下细胞能量代谢,从而促进皮瓣新生血管生成,达到增加皮瓣成活面积的治疗目的。

参考文献

[1] 张福庆, 闵定宏. 缺血性皮瓣的研究现状与进展[J]. 江西医

- 学院学报, 2006, 46(4): 214-216.
- [2] Sergesketter AR, Cason RW, Ibrahim MM, et al. Perioperative treatment with a prolyl hydroxylase inhibitor reduces necrosis in a rat ischemic skin flap model[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(4): 769e-779e.
- [3] 吕媛, 权菊香. 小牛血清去蛋白注射液对脑细胞缺血缺氧的保护作用及临床应用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2006, 22(2): 141-144.
- [4] 梁静涛, 郭强, 杨东东, 等. 小牛血清去蛋白注射液治疗脑梗死疗效与安全性的 Meta 分析[J]. *中国药房*, 2016; 27(6): 785-788.
- [5] Chehelcheraghi F, Chien S, Bayat M. Mesenchymal stem cells improve survival in ischemic diabetic random skin flap via increased angiogenesis and VEGF expression[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17491-17499.
- [6] Fang MJ, Qi CY, Chen XY, et al. Effects of batroxobin treatment on the survival of random skin flaps in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 235-242.
- [7] Zhang X, Yan X, Wang C, et al. The effect of autologous endothelial progenitor cell transplantation combined with extracorporeal shock-wave therapy on ischemic skin flaps in rats[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(8): 1098-1109.
- [8] 燕晓宇, 曾炳芳, 柴益民, 等. 低能量体外震波扩大随意皮瓣成活面积的实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2008, 31(1): 43-46.
- [9] 李娟, 张征宇, 王文华, 等. 小牛血清去蛋白注射液对急性重型颅脑损伤患者脑脊液内乳酸浓度的影响[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(2): 72-75.
- [10] 何国秋. 小牛血清去蛋白注射液治疗脑梗死老年患者的疗效及对 S100B、超敏 C 反应蛋白、血管内皮生长因子和血管形成素-1 的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(19): 4850-4851.

(收稿日期:2021-06-07)

(本文编辑:卢千语)