

银杏提取液对随意皮瓣 bFGF 表达的影响

郑鑫, 张义鹏, 王安远, 解学关, 林丁盛, 李志杰*

温州医学院附属第二医院 手外科, 浙江 温州 325027

摘要:目的 研究银杏提取液能否通过刺激随意皮瓣碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达来促进皮瓣的成活。方法 取健康SD大鼠24只分为2组,构建大鼠背部缺血随意皮瓣,实验组大鼠每天ip银杏提取液100 mg/kg,对照组大鼠每天ip等量生理盐水。术后7 d通过大体观察皮瓣成活,血管造影术观察皮瓣血管显影程度,HE染色观察皮瓣病理改变情况,免疫组化法检测bFGF的表达情况。结果 实验组皮瓣的存活率为 $(67.07 \pm 2.66)\%$,明显高于对照组皮瓣的存活率 $(48.64 \pm 2.09)\%$ ($P < 0.01$)。实验组皮瓣远端的血管显影程度、bFGF的表达均高于对照组 ($P < 0.01$)。结论 银杏提取液能通过刺激bFGF的表达来促进局部血管形成,从而在大体上促进高皮瓣的成活。

关键词: 银杏提取液; 随意皮瓣; bFGF; 存活率; 血管形成

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0559-04

Effect of *Giankgo biloba* extract on bFGF expression of random flap

ZHENG Xin, ZHANG Yi-peng, WANG An-yuan, XIE Xue-guan, LIN Ding-sheng, LI Zhi-jie

Department of Hand Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China.

Key words: *Giankgo biloba* extract; random flap; bFGF; survival rate; angiogenesis

随意皮瓣是临床上修复创面、重建功能、改善外观较为常用的皮瓣,但因为此皮瓣无知名血管,在临床运用上往往受到长宽比例的限制,超过一定长宽比例的皮瓣其远端易发生缺血坏死,因此,如何增加随意皮瓣的血供,改善皮瓣组织微循环,预防皮瓣术后的缺血坏死具有重要的临床意义。银杏提取物(*Giankgo biloba* extract, EGB)具有抗血小板凝集、抑制血栓形成、促血管舒张的作用,同时也是天然的氧自由基清除剂,在治疗缺血性疾病上具有良好的效果^[1],本实验就其治疗缺血皮瓣的血管形成机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物、药品及试剂

健康雄性SD大鼠24只,体质量200~250 g,由温州医学院实验动物中心提供。银杏提取液(金纳多)购自德国威玛制药厂(批号DA204)。免疫组化采用二步法,兔抗大鼠碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)抗体购自Santa Cruz公司;山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司;用PBS液替代一抗作阴性对照。工业明胶,强度300 bloom,购自中国上

海试剂总厂;氧化铅采用水溶性红丹粉(Pb_3O_4)。

1.2 动物模型及用药

将大鼠随机分为对照组和实验组,每组各12只。5%水合氯醛ip麻醉,将动物俯卧位固定,脱毛,采用改良后的McFarlane皮瓣制作方法^[2-3]以大鼠尾部两髂嵴连线为蒂,在背部正中设计3 cm×9 cm矩形随意型皮瓣,在皮瓣深筋膜浅层钝性分离组织,皮瓣完全掀起后,彻底止血,结扎皮瓣基底部的知名血管。皮瓣制作完成后间断缝合。术后切口周围碘伏消毒后涂抹金霉素软膏,ip生理盐水(50 mL/kg)抗休克。实验组和对照组在手术2 h后ip银杏提取液(100 mg/kg)及等量生理盐水。术后第7天,取皮瓣远端(距蒂部8 cm)、中端(距蒂部4 cm)、近端(距蒂部2 cm)组织于10%中性福尔马林液中固定,常规脱水包埋,用于HE染色及免疫组化检测。

1.3 皮瓣成活及血管化观察

对皮瓣成活进行肉眼大体观察,具体包括皮瓣颜色、组织弹性、质地。术后第7天,两组大鼠在麻醉状态下用透明纸准确描记皮瓣成活及坏死面

收稿日期: 2010-08-23

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2009CA076)

*通讯作者 李志杰 E-mail: lzhjwh@126.com

积,用 SONY 数码相机拍摄带有尺度标记的照片,然后导入计算机,以 Image-Pro Plus v6.0 软件测量皮瓣存活长度,取一个最大长度,一个最小长度,得到平均存活长度,得出皮瓣存活后有效长宽比;同时对皮瓣存活面积和总面积进行测量,计算两组皮瓣存活率(皮瓣存活率=皮瓣存活表面积/皮瓣总面积 $\times 100\%$)。皮瓣坏死标准:皮瓣颜色发黑,组织回缩、弹性差,质地坚硬,切割组织不出血。

血管化程度观察依赖血管造影术,血管造影采用明胶-氧化铅技术^[4]。分别于术后第7天取实验组和对照组各4只大鼠进行微血管造影术。先通过向大鼠一侧颈动脉ig 0.9%生理盐水,同侧颈静脉放血排尽大鼠体内血液,然后将预置的明胶+氧化铅灌注液(100 mL/kg)缓慢注射入颈动脉,当观察到大鼠巩膜及四肢末端色泽变成造影剂颜色后停止注射。灌注成功后将大鼠冷藏12~24 h,使明胶凝集。最后将大鼠背部皮瓣及周围皮肤解剖,平铺行X线摄影,观察皮瓣血管显影程度。

1.4 组织病理切片观察

取皮瓣远端、中端、近端组织,制成4微米厚的切片,HE染色。在低倍镜下观察各区域组织水肿、坏死,炎症细胞浸润等情况。

1.5 免疫组化检测

检测对照组和实验组皮瓣bFGF表达及分布情况。用免疫组化二步法对两组中端组织切片进行染色,每张片子选择染色均匀的区域,在40 $\times$ 10倍光镜下进行观察,每张片子取5个视野拍摄保存,在拍摄过程中,设置白平衡、快门时间等参数一致。

将保存的图片导入Image-Pro Plus v6.0软件,检测bFGF阳性表达的累积吸光度值,作为评价bFGF表达的指标。

1.6 统计学分析

数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 16.0进行统计学分析,检测结果进行 t 检验。

2 结果

2.1 皮瓣成活及血管化观察

术后第1天两组皮瓣出现不同程度的皮肤肿胀、远端暗紫色,但无明显坏死。随着时间的延长,皮瓣中、远端开始出现局部灶状、小片状坏死,坏死部分颜色多为红褐色,有瘀血。术后第7天两组皮瓣中、远端坏死部分趋于融合,有黑色痂壳出现,手感变硬,皮瓣分界基本稳定(图1)。

在X线下可观察到大鼠背部皮肤血管灌注良好,小血管显影清晰。两组皮瓣血管化范围与皮瓣成活范围较为一致,皮瓣远端无血管存在,皮瓣近、中端血管显影程度较周围皮肤有所增高,实验组的血管显影范围较对照组大($P < 0.01$),见图1。

2.2 皮瓣存活面积、成活长度、成活率的检测结果

7d后两组皮瓣面积均有萎缩,对照组和实验组的皮瓣总面积差异无统计学意义。实验组的皮瓣存活面积、成活长度,成活率与对照组相比,均有明显统计学差异($P < 0.01$),见表1。对照组的皮瓣存活有效长宽比为1.47:1,实验组为1.89:1。

2.3 组织病理观察结果

低倍镜下观察,两组皮瓣远端组织出现均质样改变,大量炎症细胞浸润,皮肤附属器如毛囊结构

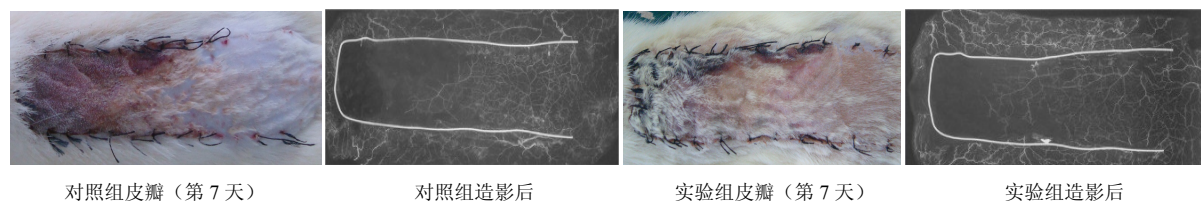


图1 皮瓣成活及血管形成情况

Fig. 1 Conditions of flap survival and angiogenesis

表1 各组的皮瓣存活面积、成活长度、成活率

Table 1 Survival area, survival length, and livability of flap in every group

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	皮瓣面积/cm ²	成活面积/cm ²	成活率/%	最大长度/mm	最小长度/mm	平均长度/mm
对照	—	25.85 $\pm$ 1.02	12.47 $\pm$ 0.71	48.64 $\pm$ 2.09	47.70 $\pm$ 2.28	40.45 $\pm$ 2.40	44.08 $\pm$ 2.03
实验	100	25.67 $\pm$ 1.12	17.35 $\pm$ 1.25**	67.07 $\pm$ 2.66**	67.72 $\pm$ 3.49**	50.71 $\pm$ 2.13**	56.72 $\pm$ 1.82**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

破坏,组织水肿明显;皮瓣近端组织可见正常皮肤结构,表皮层与真皮层界线清晰,无明显炎症细胞浸润。对照组中端皮瓣见局部坏死组织,表皮变性萎缩明显,皮下组织水肿,炎性细胞浸润严重;实验组中端皮瓣无明显坏死改变,表皮变性不明显,皮下组织可见水肿,炎性细胞浸润较轻。

2.4 免疫组化结果

实验组和对照组的皮瓣 bFGF 均阳性表达,实验组 bFGF 累计吸光度值为 $5\,352.83 \pm 462.12$, 对照组为 $3\,016.45 \pm 227.08$, 实验组的表达量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 2。

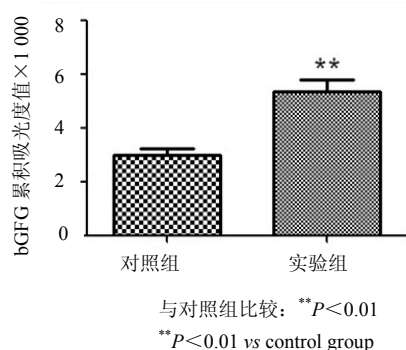


图2 各组皮瓣 bFGF 累积吸光度值

Fig. 2 IOD value of bFGF in flap of every group

3 讨论

随意皮瓣是由蒂部和皮下筋膜血管网供养,皮瓣转移术后,仅由蒂部无名血管进行血液供应,由于血流通路的减少及血流灌注压较低,当皮瓣长宽比超过 1.5:1 时血流较难到达远端,导致皮瓣远端的缺血坏死。如何能有效地促进皮瓣形成新的血管通路,增加皮瓣远端的血供,对随意皮瓣应用范围扩大起着重要的临床意义。目前在血管化机制的研究当中,血管形成 (angiogenesis) 被认为促进新生血管化的主要机制之一。诸多生长因子如 bFGF 在血管形成过程中起着关键的作用^[5]。bFGF 是一种广谱的有丝分裂原,其靶细胞有成纤维细胞、血管内皮细胞、软骨细胞、成骨细胞等,对新生血管形成过程中多个环节如毛细血管基底膜降解、内皮细胞迁移增生、胶原合成、小血管腔形成均有明显促进作用,并且能促进各种组织和器官内的血管再生,可显著增强内皮细胞黏附迁移、分裂增殖,促进血管新生,加速创伤愈合^[6-8]。

本实验通过对皮瓣存活长度的测量,对照组的存活有效长宽比为 1.47:1,与王成琪^[9]认为随意皮瓣长宽比以 1~1.5:1 为宜的说法相符,而银杏提

取液可使皮瓣存活有效长宽比提高至 1.89:1,且实验组皮瓣成活面积较对照组增加约 20%,说明银杏提取液的确能有效地促进随意皮瓣成活。

银杏提取物是以银杏为原料,提取有效成分的一类中药产品。目前已知银杏的活性成分有 170 余种,其中黄酮类和萜内酯类是研究较多^[10-11]、临床运用最广泛的两种成分。银杏提取液作为公认的自由基清除剂,对缺血再灌注损伤有着积极地预防及治疗作用,同时该作用也被认为是促进皮瓣成活的主要原因。Bekerecioglu 等^[12]研究认为 EGb761 作为自由基清除剂,能有效地促进大鼠背部皮瓣的成活。张恒术等^[13]通过对使用银杏提取液后皮瓣组织 SOD、MDA 水平的检测,也得出了类似的结论。但银杏提取液是否会通过加速皮瓣血管形成的方式来促进皮瓣成活目前尚无明确报道。范冀湘等^[14]研究心肌缺血大鼠促血管生成作用机制时发现使用银杏提取液后缺血梗死边缘区 bFGF 的表达量增加。而通过基因转染的方式局部应用 bFGF 已经被证明能够促进皮瓣的成活^[15]。由此提示银杏提取液有可能通过刺激缺血皮瓣 bFGF 的表达来增加皮瓣的血供,最终达到促进皮瓣成活的目的。本实验通过免疫组化方法对皮瓣 bFGF 的表达进行了测定。通常认为 bFGF 主要是由巨噬细胞和成纤维细胞分泌,属于胞浆表达。在实验过程中,发现无论是实验组还是对照组,炎性细胞均有 bFGF 的阳性表达,但实验组的表达量更多。提示银杏提取液可能是通过刺激 bFGF 等血管生长因子的表达来促进局部血管形成,从而在大体上促进皮瓣的成活。本实验对银杏提取液血管形成的机制进行了初步的探讨,但细胞信号传导途径及联合基因治疗是否具有协同作用等一系列问题,仍有待后续的实验研究加以明确。

参考文献

- [1] 洪森荣,尹明华. 银杏叶提取物对缺血再灌注小鼠脑细胞凋亡的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1864-1867.
- [2] Khouri R K, Brown D M, Leal-Khouri S M, et al. The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfers [J]. *Br J Plast Surg*, 1991, 44: 585-588.
- [3] McFarlane R M, Deyoung G, Henry R A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1965, 35: 177-182.
- [4] 楼新法,梅劲,杨大平. 明胶-氧化铅血管造影术的优化 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24: 259-262.

- [5] 赵京霞, 李 萍, 张 玮. 桂皮醛对小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞成纤维细胞生长因子及转化生长因子 β_1 表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 582-584.
- [6] Nagatoro T, Fujita K, Murata E, *et al.* Angiogenesis and fibroblast growth factors (FGFs) in a three-dimensional collagen gel culture [J]. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 2003, 80: 7-14.
- [7] Ribatti D, Presta M. The role of fibroblast growth factor-2 in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane [J]. *J Cell Mol Med*, 2002, 6: 439-446.
- [8] Ding L, Donate F, Parry G C, *et al.* Inhibition of cell migration and angiogenesis by the amino-terminal fragment of 24kD basic fibroblast growth factor [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 31056-31061.
- [9] 王成琪. 皮瓣的命名及供区选择 [J]. 中华显微外科杂志, 1995, 18: 84-85.
- [10] 冯小龙, 王 伟, 张兰桐. 银杏叶总黄酮及其水解物静脉注射给药后在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1402-1405.
- [11] 潘 见, 高香兰, 杨 毅, 等. 银杏叶提取物中白果内酯的分离分化 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 135-137.
- [12] Bekerecioglu M, Tercan M, Ozyazgan I. The effect of *Gingko biloba* extract (Egb 761) as a free radical scavenger on the survival of skin flaps in rats. A comparative study [J]. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1998, 32: 135-139.
- [13] 张恒术, 薛 斌, 沈为民, 等. 银杏叶提取液对缺血皮瓣保护作用的实验研究 [J]. 重庆医学, 2003, 32: 515-516.
- [14] 范冀湘, 高绍芳, 贾 旭. 银杏叶提取物对实验性心肌梗死大鼠心脏促血管生成作用的观察 [J]. 中医导报, 2009, 15: 4-6.
- [15] Fujihara Y, Koyama H, Nishiyama N, *et al.* Gene transfer of bFGF to recipient bed improves survival of ischemic skin flap [J]. *Br J Plast Surg*, 2005, 58: 511-517.

关于推荐第14届中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目的通知

中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目是由中国药学会与法国施维雅研究院共同设立, 每年评选一次, 旨在鼓励我国优秀青年药物化学工作者立足于国内, 致力于新药研究。设奖十多年来, 有力推动了优秀青年药物化学工作者的健康成长和科学发展。2011年第14届奖项推荐评选工作已经开始, 现将有关事宜通知如下。

根据设奖宗旨和国内药物化学学科发展的实际情况, 2011年奖励办法为: (1) 继续面向全国, 奖励3名从事药物化学研究的青年药物化学(合成药物和天然药物)学者; 获奖者每人可获得奖金15 000元人民币、奖杯和证书。(2) 面向边远地区的专项资助项目, 资助1项研究课题, 经费为50 000元人民币, 二年内完成; 并颁发专项资助项目证书。(3) 如专项资助项目空缺, 则青年药物化学奖奖励名额为5名。

联系人: 孙文虹(010-58699280-819)、范玫杉(010-58699280-820)

地 址: 北京市朝阳区建外大街4号建外SOHO九号楼18层

邮 编: 100022 **传真:** 010-58694812

E-mail: sunwenhong2002@163.com; yxhfms@163.com

申报截止时间: 2011年4月30日, 以邮戳为准。

中国药学会