

## 水蛭素调节断指再植大鼠皮瓣成活、血管生成、炎症因子表达的作用

刘涛, 朱宏涛, 戴黎明

三峡大学仁和医院 手外科 (三峡大学手外科研究所), 湖北 宜昌 443001

**摘要:** **目的** 探讨水蛭素调节断指再植大鼠皮瓣成活、血管生成、炎症因子表达的作用。**方法** 选取 80 只 Wistar 大鼠为研究对象, 建立断指再植模型后随机分为两组: 模型组、水蛭素组, 均 40 只。水蛭素组大鼠皮瓣局部 sc 天然水蛭素 6 ATU/次, 2 次/d, 模型组大鼠 sc 生理盐水。术后 7 d, 观察大鼠皮瓣存活率; 制备皮瓣组织匀浆, 提取总蛋白, 采用 ELISA 双抗体夹心法测定血管内皮生长因子 (VEGF)、白细胞介素-6 (IL-6)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 表达情况; 采用免疫印迹法测定皮瓣中细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2)、Bcl-2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 表达; HE 染色法测定皮瓣中炎症介质浸润情况; CD34 免疫组织化学染色法检测血管密度值。**结果** 水蛭素组大鼠皮瓣存活率、血管密度值、VEGF 水平、ERK1/2 相对表达量均明显高于模型组, 而 p38 MAPK、Bcl-2 相对表达量, IL-6、ICAM-1、TNF- $\alpha$  水平明显低于模型组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 水蛭素在断指再植模型大鼠中具有提高皮瓣成活率、促进 VEGF 表达、抑制细胞凋亡、减少炎症因子表达作用。

**关键词:** 水蛭素; 断指再植模型; 炎症因子; 皮瓣; 血管内皮生长因子 (VEGF); 凋亡

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)01-0073-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.012

## Effect of hirudin on survival, angiogenesis and expression of inflammatory factors in replanted flaps of rats with finger replantation

LIU Tao, ZHU Hong-tao, DAI Li-ming

Department of Hand Surgery, Renhe Hospital of Sanxia University (Institute of Hand Surgery in Sanxia University), Yichang 443001, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of hirudin on survival, angiogenesis and expression of inflammatory factors in replanted flaps of rats with finger replantation. **Methods** Totally 80 Wistar rats were selected to establish finger replantation model, and they were randomly divided into two groups with 40 cases in each group. Hirudin group was given local subdermal injection of six ATU natural hirudin, twice a day, and control group was given local subdermal injection of normal saline. After 7 d, rat skin flap survival rate was observed; Flap tissue homogenate was prepared to extract total protein, and then detect vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin -6 (IL-6), intercellular adhesion molecule -1 (ICAM-1), and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) expression by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) double antibody sandwich method. Western blotting method was used for the determination of flap in extracellular regulated protein kinase (ERK1/2), Bcl-2 and p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) expression; Flap inflammatory infiltration was determined by HE staining; CD34 immunohistochemical staining method was used to detect vascular density. **Results** The flap survival rate, vessel density, VEGF level, and relative expression of ERK1/2 of hirudin group were significantly higher than those of model group, but p38 MAPK and relative expression of Bcl-2 were significantly lower than control group ( $P < 0.05$ ); The IL-6, ICAM-1, TNF- $\alpha$  levels of hirudin group were significantly lower than those of control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hirudin for rats model with finger replantation can increase flap survival rate, promote VEGF expression, inhibit cell apoptosis, and reduce inflammatory factors expression.

**Key words:** hirudin; finger replantation model; inflammatory factors; replanted flaps; vascular endothelial growth factor (VEGF); apoptosis

断指再植是指失去血液供应的离断肢体, 通过指再植手术是临床比较常见的一种外科手术, 且断指再植手术重建其血液循环并使断指再生的手术。断指常伴有皮肤软组织缺损, 临床常采用

收稿日期: 2017-10-09

第一作者: 刘涛, 男, 主治医师, 研究方向为手部创伤及软组织修复。E-mail: liutaozhuhongtao@sina.com

各种皮瓣进行修复<sup>[1]</sup>。皮瓣手术成功的关键在于保证术后皮瓣的成活。影响皮瓣坏死的因素较多,包括皮瓣下血肿、血液循环障碍、皮瓣感染及皮瓣撕脱。目前,临床常采用糖皮质激素、前列腺素抑制剂、抗交感药、血瘤阻滞剂等药物,以防止皮瓣的完全坏死,但效果不佳,且需要大剂量的全身用药,导致多种毒副反应的发生<sup>[2]</sup>。相关研究表明<sup>[3]</sup>,应用水蛭素可显著减少皮瓣完全坏死发生,提高断指再植的成功率。本研究对 80 只断指再植模型、行皮瓣修复的 Wistar 大鼠断指分别使用水蛭素和生理盐水进行干预,比较皮瓣存活情况、细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2)、Bcl-2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 的磷酸化水平及白细胞介素-6 (IL-6)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子水平,旨在探讨水蛭素调节断指再植模型大鼠血管内皮细胞凋亡及炎症因子表达的作用,为临床应用水蛭素预防及治疗断指再植术中皮瓣坏死提供参考。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

选取 80 只 SPF 级 Wistar 大鼠为研究对象,凯学生物科技(上海)有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(沪)2014-0013,12 周龄,均为雄性,体质量 200~280 g,平均(256.36 $\pm$ 25.26) g。所有大鼠均自由摄食、饮水,饲养室温度 23~25  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 8%左右,适应性饲养 1 周。

### 1.2 主要试剂

天然水蛭素(南宁净血皇生物工程有限公司,生产批号 20161201,规格 5 ATU/mL);碘伏(浙江普洛康裕制药有限公司,生产批号 20161101);水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司,生产批号 20161102);血管内皮生长因子(VEGF)、IL-6、ICAM-1、TNF- $\alpha$  ELISA 双抗体夹心试剂盒(北京金桥生物公司提供);CD34 抗体,英国 Abcam 公司。

### 1.3 主要仪器

恒温水浴箱(北京长源试剂设备厂);光学显微镜(日本奥林巴斯);电泳仪(美国 Bio-red);扫描仪(美国 LI-COR);酶标仪(美国 Thermo)。

## 2 方法

### 2.1 建立断指再植大鼠模型及皮瓣修复

参考 Reyers 建模方法<sup>[4]</sup>,使用碘伏消毒,铺无菌巾,使用 0.3 g/kg 的 10%水合氯醛进行腹腔麻醉,大鼠取仰卧位,股内侧皮肤去毛。于股内侧做长 2~

3 cm 切口,逐层分离至股骨,暴露游离股动脉。切断股骨,使用 10 号注射针头进行髓内固定,将血管夹上于股动脉远近端后剪断,内膜外翻吻合,缝合皮肤和腹壁。皮瓣移植时应先在皮瓣受区将皮神经、静脉和动脉解剖出来,在显微镜下将血管修剪为无絮状漂浮物,切开皮肤及皮下组织,在肉膜下层分离皮瓣,根据受区皮肤缺损大小、形状设计皮瓣进行皮瓣修复。

### 2.2 分组及干预

将成功建立断指再植模型及皮瓣修复的大鼠根据随机数表法随机分为 2 组:模型组、水蛭素组,均 40 例。水蛭素组大鼠局部 sc 天然水蛭素,术后即刻开始注射,6 ATU/次(距蒂部 2~8 cm 皮瓣位置对称选择 6 个点,每个点注射 1 ATU),2 次/d(间隔 12 h),直至大鼠被处死。模型组大鼠局部 sc 生理盐水,注射时间及剂量与水蛭素组一致。

### 2.3 观察指标及检测

**2.3.1 大鼠皮瓣存活率** 术后第 7 天,ip 1.5%戊巴比妥钠麻醉大鼠,待背部皮肤展平后数码相机拍摄大鼠背部皮瓣,照片经 Image-Pro 6.0 软件计算皮瓣总面积、坏死与存活表面积,皮瓣存活率=存活表面积/总面积。

**2.3.2 HE 染色** 术后第 7 天,处死所有大鼠,在皮瓣中部取一 1 cm $\times$ 3 cm 的全层皮肤作为标本,组织包埋、制备切片,应用 HE 染色法测定皮瓣中炎症介质浸润情况。

**2.3.3 炎症及皮瓣凋亡相关因子** 制备皮瓣组织匀浆,提取组织总蛋白,采用 ELISA 双抗体夹心法测定 VEGF、IL-6、ICAM-1、TNF- $\alpha$  表达情况,严格按照试剂盒操作说明书进行;采用吸光度法和免疫印迹法测定皮瓣中 ERK1/2、Bcl-2、p38 MAPK 表达情况。

**2.3.4 血管密度值** 皮瓣组织切片染色,采取 CD34 免疫组织化学染色法,200 倍光镜下对棕褐色排列成圈状的 3 个视野下血管密度进行计数。

### 2.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学检验,计量资料符合正态分布且方差齐采用  $\bar{x} \pm s$  表示,配对  $t$  检验进行统计分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 HE 染色

如图 1 所示,模型组大鼠皮瓣组织中可见炎性渗出和中性粒细胞聚集,数量较多,出现组织水肿。水蛭素组大鼠皮瓣组织中可见中性粒细胞聚集及炎

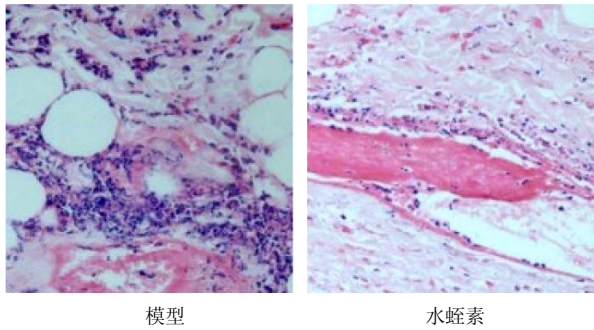


图1 大鼠皮瓣组织 HE 染色结果 (×40)

Fig. 1 HE staining results of flap tissues in rats (×40)

性渗出,但数量不多,未出现组织水肿。

### 3.2 皮瓣存活率和皮瓣存活表面积

两组大鼠皮瓣存活率和存活表面积比较,水蛭素组均明显高于模型组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表1。

### 3.3 血管密度值和 VEGF 水平

两组大鼠血管密度值和 VEGF 水平比较,水蛭素组均明显高于模型组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图2和表2。

表1 两组皮瓣存活率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Table 1 Comparison of flap survival rate between two groups of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

组别	皮瓣存活率/%	皮瓣存活表面积/cm <sup>2</sup>
模型	65.52±5.64	5.44±1.21
水蛭素	80.25±6.21*	7.36±1.36*

与模型组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

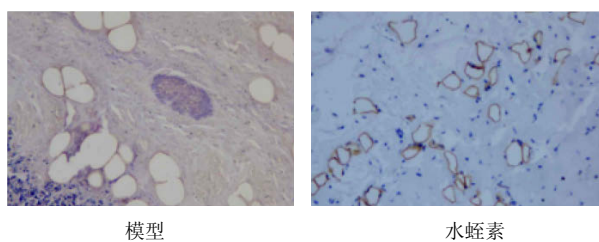


图2 大鼠皮瓣内血管密度值 (×200)

Fig. 2 Vessel density in flap of rats (×200)

表2 两组血管密度值和 VEGF 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Table 2 Comparison of vessel density and VEGF level between two groups ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

组别	血管密度值	VEGF/ (ng·L <sup>-1</sup> )
模型	20.53±3.67	200.53±25.37
水蛭素	30.58±3.24*	389.36±36.57*

与模型组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

### 3.4 ERK1/2、p38 MAPK、Bcl-2 水平

水蛭素组大鼠 ERK1/2、Bcl-2 相对表达量明显高于模型组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 水蛭素组大鼠 p38 MAPK 相对表达量明显低于模型组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表3。

### 3.5 IL-6、ICAM-1、TNF-α 水平

两组 IL-6、ICAM-1、TNF-α 水平比较,水蛭素组均明显低于模型组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表4。

表3 两组 ERK1/2、p38 MAPK、Bcl-2 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Table 3 Comparison of relative expression of ERK1/2, p38 MAPK and Bcl-2 between the two groups of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

组别	ERK1/2	p38 MAPK	Bcl-2
模型	0.29±0.09	0.38±0.11	0.41±0.16
水蛭素	0.44±0.08*	0.30±0.09*	0.78±0.24*

与模型组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

表4 两组 IL-6、ICAM-1、TNF-α 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Table 4 Comparison of IL-6, ICAM-1 and TNF-α levels between two groups of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

组别	IL-6/(ng·L <sup>-1</sup> )	ICAM-1/(ng·L <sup>-1</sup> )	TNF-α/(ng·L <sup>-1</sup> )
模型	425.63±35.23	385.36±28.56	236.52±12.03
水蛭素	324.25±32.35*	265.37±22.85*	175.85±12.36*

与模型组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

## 4 讨论

近年来,随着我国工业的不断发展、交通事故的增多,我国行断指再植手术人数明显增多。大部分断指患者伴有不同程度的皮肤组织缺损,常需要进行皮瓣修复。皮瓣在烧伤科、创伤手外科、整形外科等众多外科手术中应用较为广泛,如用于瘢痕切除整复术、皮肤软组织缺损修复术、阴茎再造术、鼻再造术及耳廓再造术,具有皮瓣色泽、质地接近修补区及操作简便等优点,受到广大患者及临床医师的青睐<sup>[5]</sup>。但在皮瓣修复的过程中,皮瓣远端血运循环障碍是比较常见的问题,一旦皮瓣血运出现障碍,皮瓣组织会受到一系列损伤,导致皮瓣坏死,影响皮瓣修复效果。随着对皮瓣血供、监测手段及手术方式的深入研究,皮瓣组织术后的坏死率大大降低。但在临床工作中,尽管在手术前完善各项检查、术中仔细操作、充分止血、认真缝合、合理包扎,但仍不能确保皮瓣完全存活<sup>[6]</sup>。皮瓣坏死的发

生,严重影响手术效果,增加患者住院时间、医疗费用等,给家庭及社会带来沉重的负担。

皮瓣发生局部或完全坏死的原因比较复杂,主要与皮瓣下血肿、皮瓣撕脱、皮瓣感染及血液循环障碍等有关。其中血液循环障碍分为两种,即静脉回流障碍和动脉供血不足,在皮瓣移植术后,静脉回流障碍发生率明显高于动脉供血不足,表明静脉回流障碍引起的皮瓣损伤明显更大<sup>[7]</sup>。静脉回流障碍引起的皮瓣坏死的机制比较复杂,主要与皮瓣内的过度炎症反应、缺血再灌注损伤、细胞凋亡、静脉内血液淤滞、皮瓣局部微循环发生障碍、凝血功能改变等有关。血管内皮细胞通常指衬于心血管和淋巴管内表面的单层扁平上皮,形成血管的内壁,具有吞噬异物、细菌、坏死和衰老的组织,还参与集体免疫活动功能<sup>[8]</sup>。VEGF 又称血管通透因子,是人类血管发生和血管生成过程中重要的调控因子,可特异性作用于内皮细胞,具有诱导血管发生和血管生成、增强血管的渗透性、促进内皮细胞生长及细胞迁移、抑制细胞凋亡等作用<sup>[9]</sup>。由此可见,抑制血管内皮细胞的凋亡,增强 VEGF 的表达,可显著减少皮瓣的坏死。丝裂原活化蛋白激酶信号通路存在于部分细胞内,主要包括 p38MAPK 通路、ERK1/2 通路。临床发现,p38 MAPK 通路可传导炎症细胞因子和多种类型的细胞应激信号,而 ERK1/2 通路主要传导细胞生长、分化及分裂信号<sup>[10-11]</sup>。据此,我们推测 p38MAPK 通路、ERK1/2 通路在皮瓣坏死的发生、发展中具有重要作用。bcl-2 是一种原癌基因,可抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡,其抑制细胞凋亡的机制可能与细胞抗氧化作用、抑制钙离子跨膜流动等有关。本研究结果显示,水蛭素组皮瓣存活率、皮瓣存活表面积、血管密度值、VEGF 水平、ERK1/2、bcl-2 相对表达量均明显高于模型组,而 p38MAPK 相对表达量低于模型组。表明水蛭素在断指再植模型大鼠中具有提高皮瓣成活率、促进 VEGF 的表达、抑制细胞凋亡的作用,可促进皮瓣修复成功。

在断指再植及皮瓣修复手术的过程中,手术创伤、缺血及术后瘀血均是炎症反应的触发因素。炎症反应发生时会产生多种炎症介质,包括趋化因子、黏附分子和细胞因子<sup>[12]</sup>。IL-6 是活化的成纤维细胞及 T 细胞产生的一种淋巴因子,参与机体免疫应答,当宿主对组织损伤、感染等发生炎症反应时,巨噬细胞分泌大量的 IL-6 并参与到炎症反应中。TNF- $\alpha$

是由巨噬细胞分泌的一种小分子蛋白,是重要的炎症因子,具有杀伤和抑制肿瘤细胞、诱导肝细胞急性期蛋白合成、促进细胞增殖和分化等作用<sup>[13]</sup>。此外,TNF- $\alpha$  还可以促进 T 细胞产生各种炎症因子,进而促进炎症反应的发生。ICAM-1 是介导黏附反应重要的一个黏附分子,作为内皮细胞和白细胞跨膜的蛋白质,其在促进白细胞和内皮细胞的迁移和稳定细胞间相互作用起到重要作用。ICAM-1 可增进炎症部位的黏连性,和受体特异性结合后,可增强炎症细胞、白细胞等黏附作用。正常情况下,内皮细胞与白细胞保持滚动状态,若 ICAM-1 过度表达,可导致白细胞的大量聚集,从而释放炎症细胞。因此,减少炎症反应的发生,是提高断指再植、皮瓣修复手术成功率的关键。本研究结果显示,水蛭素组 IL-6、ICAM-1、TNF- $\alpha$  水平均低于模型组。提示水蛭素在断指再植模型大鼠中具有提高皮瓣成活率、减少炎症因子表达等作用。分析原因为,水蛭素是由 65~66 个氨基酸组成的小分子蛋白质,具有高效抗血栓形成、抗凝血、阻止因血小板反应、凝血酶催化的凝血因子活化等加重血瘀现象及抑制凝血酶对内皮细胞的刺激、凝血酶诱导的成纤维细胞的增殖等作用,可有效改善皮瓣静脉回流障碍和动脉供血不足,从而减少皮瓣坏死的发生<sup>[14-16]</sup>。

综上所述,水蛭素在断指再植模型大鼠中具有提高皮瓣成活率、促进 VEGF 表达、抑制细胞凋亡、减少炎症因子表达等作用,优势显著,具有临床推广意义。

#### 参考文献

- [1] 邢鸿基. 断指再植与非断指再植对手指末节完全离断的疗效比较 [J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(1): 68-70.
- [2] 缪力, 袁举, 贾玉俊, 等. 游离股前外侧皮瓣修复四肢软组织缺损的疗效和影响因素分析 [J]. 中华全科医学, 2015, 13(11): 1883-1885.
- [3] Samir J, Khaled R A, Qussay S, et al. Fasciocutaneous flap reconstruction after repair of meningocele: technique and outcome [J]. J Wildl Dis, 2015, 50(6): 344-349.
- [4] Reyers I, Mussoni L, Donati M B, et al. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats [J]. Thromb Res, 1980, 18(5): 669-674.
- [5] 林博杰, 殷国前, 邵纯旭, 等. 水蛭和水蛭素的基础研究及临床应用进展 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2013, 24(4): 222-225.
- [6] 何明飞, 吴建伟, 李亮, 等. 改良动脉化静脉皮瓣在

- 伴有环形皮肤软组织缺损断指再植中的应用 [J]. 中华显微外科杂志, 2015, 38(5): 432-434.
- [7] Mohamed E S. Inclusion and exclusion criteria to overcome bias and reach a valid conclusion for interpositional flap coverage in primary hypospadias repair with tubularized incised plate urethroplasty [J]. Ann Plast Surg, 2013, 71(5): 581-585.
- [8] Zhang R, Wang C M, Chen Y, et al. The use of unilateral or bilateral external oblique myocutaneous flap in the reconstruction of lower abdominal wall or groin defects after malignant tumor resection [J]. J Surg Oncol, 2014, 110(8): 930-934.
- [9] 赵 岭, 王友彬, 覃仕瑞, 等. 富氢生理盐水对缺血再灌注皮瓣核因子- $\kappa$ B、 $\alpha$  肿瘤坏死因子及细胞凋亡的影响 [J]. 中华医学美学美容杂志, 2013, 19(2): 130-133.
- [10] 程行健, 张 川. 高压氧后处理对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤炎症反应的影响 [J]. 河北医药, 2016, 38(1): 24-26.
- [11] Fu D H, Zhou L Y, Yang S H, et al. Surgical technique: repair of forefoot skin and soft tissue defects using a lateral tarsal flap with a reverse dorsalis pedis artery pedicle: a retrospective study of 11 patients [J]. Clin Orthop Relat Res, 2013, 471(1): 317-323.
- [12] 张 炎, 刘同涛, 岳 欣, 等. 脂多糖通过 p38 丝裂原活化金属蛋白激酶信号传导途径促进小鼠主动脉内皮脂肪酶的表达 [J]. 中华老年医学杂志, 2016, 35(11): 1221-1224.
- [13] 王友彬, 戚 征, 高春锦, 等. 高压氧预处理对皮瓣组织 Cx43 和 TNF- $\alpha$  表达的影响 [J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2013, 20(1): 9-11.
- [14] Nobuyuki M, Atsuomi S, Shinsuke A, et al. Two-stage repair for severe proximal hypospadias using oral mucosal grafts: combination of a modified Bracka method and a modified Byars flap method [J]. Ann Plast Surg, 2015, 74(2): 220-222.
- [15] 韦巽兮, 殷国前, 潘新元, 等. 水蛭素对大鼠缺血皮瓣血运恢复与新生血管生成的影响 [J]. 中华医学美学美容杂志, 2016, 22(5): 300-304.
- [16] 徐海燕, 陈学勋, 刘蒙蒙, 等. 水蛭素对肾病综合征患者凝血酶激活的纤溶抑制物的影响及疗效观察 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 918-921.
- [17] 王 瑶, 覃昌焘, 马琴琴, 等. 水蛭素对压应力作用下牙龈成纤维细胞胶原纤维I和基质金属蛋白酶1表达的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(2): 243-247.