

一氧化氮介导 VEGF 对大鼠任意型皮瓣存活的影响

华德军¹, 郝丽文², 神兴勤¹, 高学柱¹

1. 滕州市中心人民医院手足外科, 山东 滕州 277500;

2. 山东省立医院手足外科, 山东 济南 250021

摘要: **目的** 探讨一氧化氮(NO)介导血管内皮生长因子(VEGF)对任意型皮瓣存活的影响。**方法** 按照随机数字表法将 48 只 Wistar 大鼠随机分为实验组($n=24$)和对照组($n=24$),48 只大鼠均在其背部建立任意型皮瓣大鼠模型。实验组以左旋精氨酸作为 NO 供体,建模后即刻在大鼠腹腔内注射左旋精氨酸(300 mg/kg 加 2 ml/kg 生理盐水),之后每隔 24 h 注射 1 次,直至第 7 天;对照组每次腹腔注射 2 ml/kg 生理盐水。分别应用 SABC 免疫组化法及 HE 染色检测 VEGF 蛋白的表达及新生血管增生情况,RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达;应用皮瓣存活长度比皮瓣实际长度计算皮瓣存活率。**结果** 与对照组比较,实验组胞浆染色为深棕色颗粒,分布密集,皮瓣组织血管内皮细胞内染色加深,棕色颗粒分布集中。实验组和对照组均有不同程度的微血管增生,实验组新生微血管增生更明显。建模后第 1 天两组皮瓣微血管计数差异无统计学意义($P>0.05$);对照组建模后第 7 天(7.60 ± 2.56)根/每高倍视野,实验组建模后第 7 天(12.82 ± 4.17)根/每高倍视野,两组差异有统计学意义($P<0.01$)。建模后第 1 天及第 7 天,实验组皮瓣组织 VEGF mRNA 相对表达水平平均高于对照组[(0.88 ± 0.07)vs(0.52 ± 0.06), $P<0.05$];(1.74 ± 0.12)vs(1.10 ± 0.08), $P<0.01$]。术后第 7 天实验组大鼠皮瓣平均存活率为(74.81 ± 5.36)%明显高于对照组的(50.10 ± 4.17)%,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** NO 介导 VEGF 的升高可以改善皮瓣移植术后的微循环,对皮瓣移植具有保护作用。

关键词: 任意型皮瓣;皮瓣移植;皮瓣存活率;血管内皮生长因子;一氧化氮;左旋精氨酸;微循环;大鼠

中图分类号: R 628 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)11-1522-04

Influence of nitric oxide on survival of random pattern skin flap by mediating VEGF in rat model

HUA De-jun*, HAO Li-wen, SHEN Xing-qin, GAO Xue-zhu

* Department of Hand and Foot Surgery, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou, Shandong 277500, China

Abstract: Objective To explore the influence of nitric oxide (NO) on the survival of the random patterns skin flap by mediating vascular endothelial growth factor(VEGF). **Methods** A total of 48 Wistar rats were randomly divided into experimental group and control group according to random number table method ($n=24$ each). The random pattern skin flap model was established on rat back. In experimental group, taking exogenous L-arginin as NO donator, intraperitoneal injection of L-arginin (300 mg/kg) and normal saline (2 ml/kg) was given immediately after modeling, and normal saline (2 ml/kg) was given in control group (once every 24 hours for 7 days in both groups). Taking rat skin flap survival sample, SABC immunohistochemistry and HE staining were used to detect the expression of VEGF protein and microvascular hyperplasia situation of skin flap. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect the expression of VEGF mRNA in skin flap tissues. The survival rate of skin flap was calculated by the ratio of survival length of the skin flap to the actual length of the skin flap. **Results** Compared with control group, cytoplasm staining was dense dark brown particles, and dyeing deepened in vascular endothelial cells of skin flap tissues with centralized brown particle distribution in experimental group. The microvascular hyperplasia of different degree was found in both groups, and neomicrovascular hyperplasia in experimental group was more significant. There was no significant difference in microvascular count of skin flap (per high power field) at the first day after modeling between experimental group and control group($P>0.05$) but was significant difference at the seventh day after modeling [(12.82 ± 4.17) vs (7.60 ± 2.56), $P<0.01$]. Compared with control group, the relative expression levels of VEGF mRNA at 1- and 7-day after modeling in experimental group were all significantly higher than those in control group [(0.88 ± 0.07) vs (0.52 ± 0.06), $P<0.05$]; ($1.74 \pm$

0.12) vs (1.10 ± 0.08), $P < 0.01$]. The survival rate of skin flap in experimental group was significantly higher than that in control group at the seventh day after modeling [(74.81 ± 5.36)% vs (50.10 ± 4.17)% , $P < 0.01$]. **Conclusion** NO-mediated VEGF higher-expression can improve the microcirculation after skin flap transplantation and has the protect effect on transplanted skin flap skin flap.

Key words: Random patterns skin flap; Skin flap transplantation; Skin flap survival rate; Vascular endothelial growth factor; Nitric oxide; L-arginin; Microcirculation; Rat

皮瓣修复手术是目前整形外科及手显微外科最常应用的术式之一,移植术后皮瓣因周围血供大部分被切断,进而导致皮瓣微循环发生一系列的病理生理变化。而在影响皮瓣预后的众多因素中,血供不足被认为是导致皮瓣坏死的一个重要原因^[1-2]。因此,皮瓣移植术后微循环的变化及其调控机制的相关因子成为目前皮瓣研究的热点。一氧化氮(NO)在介导炎症过程、免疫反应、缺血再灌注损伤、微血管形成过程中起着重要的作用,其作为重要的信使和效应分子参与血管平滑肌的舒张。既往研究显示,适量使用外源性左旋精氨酸(L-arg)可以提高任意型皮瓣成活率,但不能确定调控生成NO的哪一种NOS亚型在发挥保护作用^[3-4];此外,皮瓣掀起后应用外源性L-arg对皮瓣组织内源性NO产生的影响程度、NO的效应浓度以及NO对皮瓣微循环的调控通路和保护机制目前仍未明了。血管内皮生长因子(VEGF)可特异性作用于血管内皮细胞促进血管新生,改善移植皮瓣组织的血液循环,预防和治疗皮瓣缺血坏死。

为进一步研究皮瓣移植后酶源途径合成NO的分子效应,进一步明确外源性L-arg是否参与皮瓣氧化应激及缺血再灌注损伤的过程,是否促进皮瓣微循环的改善,是否通过VEGF的表达而提高真皮下血管网的血运,本研究通过建立大鼠任意型皮瓣模型,应用外源性L-arg产生NO介导VEGF蛋白及分子水平的变化,探讨NO与VEGF在皮瓣掀起后的作用机制及进一步探讨NO对皮瓣微循环的改善作用,为临床更有效的预防和治疗皮瓣坏死提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性Wistar大鼠48只,体重230~260g。由山东大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及设备 一抗Rabbit-anti-VEGF和二抗通用型PV-9000Kit购自武汉博士德生物有限公司。VEGF prime及RT-PCR Kit购自日本TaKaRa Biotechnology公司。Light Cycler PCR仪(美国Bio-Rad公司)。德国Leica公司石蜡切片机RM2135S型。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 实验前适应性喂养大鼠1周,实验室温度控制在(23 ± 2)℃。采用8%硫化钠于术前48h背部脱毛,大小约40mm × 90mm。根据大鼠体重按4ml/kg硫磺妥钠进行腹腔内注射麻醉。在大鼠背部切取任意型皮瓣(蒂宽30mm,蒂长80mm),设计蒂部在尾侧,深度达深筋膜,皮瓣延深筋膜下方掀起至蒂部,然后丝线原位缝合,张力适中。

1.2.2 实验动物分组 将48只Wistar大鼠按照动物随机数字表随机分为实验组($n = 24$)和对照组($n = 24$)。实验组:术后即刻在大鼠腹腔内注射L-arg(300mg/kg加2ml/kg生理盐水);对照组:在大鼠腹腔内注射生理盐水(2ml/kg)。之后每隔24h重复注射1次,直到术后第7天。于皮瓣术后第1天,随机采用实验组和对照组各12只大鼠背部皮瓣组织,各组取6只行免疫组化检测VEGF蛋白的表达,6只行RT-PCR检测VEGF mRNA的表达;于皮瓣术后第7天,分别测量实验组和对照组剩余12只大鼠皮瓣中间和两侧缘3组皮瓣存活长度,将三组数据的平均值作为该皮瓣存活长度,后采用皮瓣组织进行蛋白及分子检测,各组取6只行免疫组化检测VEGF蛋白的表达,6只行PCR检测VEGF mRNA的表达。

1.2.3 免疫组化检测皮瓣组织VEGF蛋白的表达 取大鼠皮瓣远端成活标本,用4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,每层10μm纵向切片,铺片,烘干,用SABC法进行免疫组化,HE染色,镜下检测皮瓣微血管增生情况,在皮瓣成活的深层,应用400倍光学显微镜随机选取6个视野,计数微血管数。

1.2.4 RT-PCR检测皮瓣组织VEGF mRNA的表达

(1)组织总RNA提取:分别于术后第1、7天各收集实验组($n = 6$)和对照组($n = 6$)皮瓣成活远端组织各10mg剪碎置于Trizol中,按Trizol说明书步骤提取组织RNA。(2)RT:依次加入Free H₂O 4μl,10 × RT Buffer 1μl, MgCl₂ 2μl, dNTP Mixture 1μl, Random 9 0.5μl, RNA 1μl, AMV 0.5μl。反应条件30℃ 10min, 42℃ 30min, 99℃ 5min, 5℃ 5min, 以10μl逆转录产物作为模板。(3)PCR:加入10 × ExTaq buffer 5μl, RNase Free dH₂O 32.75μl、上下游引物各1μl、Taq酶0.25μl,总体系为50μl,反应条

件 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 60 ℃/56 ℃/57 ℃ 30 s, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 1 min, 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳显示。

1.2.5 皮瓣存活率计算 皮瓣术后第 7 天, 分别测量实验组及对照组大鼠皮瓣的平均存活长度, 应用皮瓣平均存活长度比皮瓣实际长度计算得出皮瓣存活率, 并进一步计算出两组大鼠的平均皮瓣存活率。皮瓣颜色发黑、无毛细血管反应, 并经病理证实组织细胞核消失作为皮瓣坏死的评定标准。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

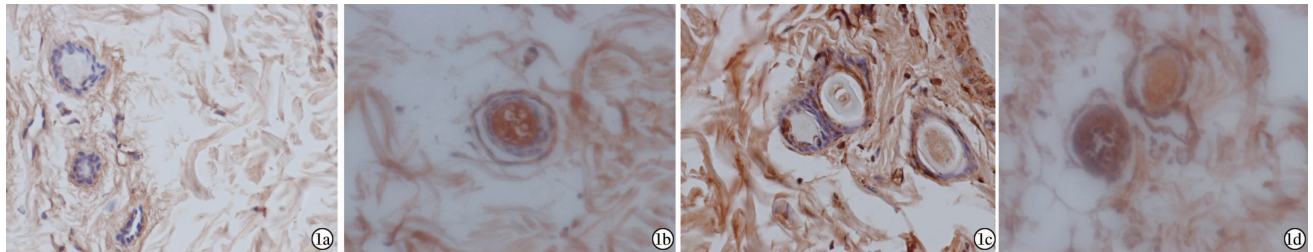
2.1 两组皮瓣组织新生血管及 VEGF 蛋白的表达比较 组织切片观察, 两组均有不同程度的微血管增生情况。与对照组比较, 实验组新生微血管增生明显。两组皮瓣微血管计数: 对照组术后第 1 天为 (4.38 ± 1.51) 根/每高倍视野, 实验组术后第 1 天为 (5.02 ± 2.09) 根/每高倍视野, 差异无统计学意义 ($P >$

0.05); 对照组术后第 7 天为 (7.60 ± 2.56) 根/每高倍视野, 实验组术后第 7 天为 (12.82 ± 4.17) 根/每高倍视野, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

实验组胞浆染色为深棕色颗粒, 颗粒分布密集, 对照组胞浆染色为浅棕色颗粒, 颗粒分布稀疏。与对照组相比, 实验组大鼠皮瓣组织血管内皮细胞内染色加深, 棕色颗粒分布集中。见图 1。

2.2 两组皮瓣组织 VEGF mRNA 的表达情况 在皮瓣术后第 1 天, 实验组 ($n = 6$) VEGF mRNA 相对表达水平为 0.88 ± 0.07 , 对照组为 0.52 ± 0.06 , 与对照组比较, 实验组的 VEGF mRNA 表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在皮瓣术后第 7 天, 实验组 ($n = 6$) VEGF mRNA 相对表达水平为 1.74 ± 0.12 , 对照组为 1.10 ± 0.08 , 与对照组比较, 实验组的 VEGF mRNA 表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 两组术后第 7 天皮瓣存活率比较 实验组 12 只大鼠皮瓣平均存活率为 $(74.81 \pm 5.36)\%$, 明显高于对照组的 $(50.10 \pm 4.17)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注: 1a: 对照组术后第 1 天; 1b: 实验组术后第 1 天; 1c: 对照组术后第 7 天; 1d: 实验组术后第 7 天。

图 1 VEGF 蛋白在各组皮瓣中的表达的病理图 (HE 染色, $\times 400$)

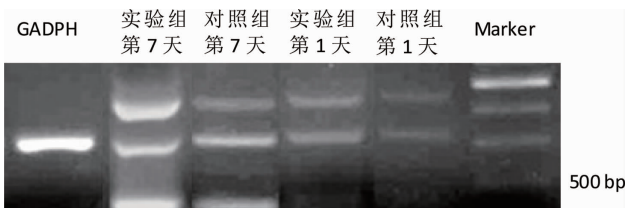


图 2 皮瓣组织 VEGF mRNA 表达的电泳图

3 讨论

术后皮瓣能否成活主要取决于皮瓣组织代谢所需的最低血流量^[5]。在皮瓣掀起后, 从根本上阻断了来自皮瓣基底及周围组织的血液供应, 此时皮瓣的血供只依靠皮瓣蒂部来维持, 皮瓣远端组织处于低血流灌注状态。皮瓣移植再通血管后处于缺血缺氧状态的组织会继发缺血/再灌注损伤, 并进一步导致皮瓣组织损伤。虽然一定程度上 NO 可扩张血管, 减轻皮瓣缺血/再灌注损伤, 但 NO 对皮瓣的保护作用存

在理论争议^[6-7]。已有部分实验观察到, 不同浓度的 NO 对组织及细胞代谢产生截然相反的作用, 在组织缺血损伤过程中, NO 一方面通过降低自由基的数量减轻组织的缺血/再灌注损伤, 另一方面又通过炎症反应及细胞毒性作用阻碍细胞代谢并加重组织损伤。另有报道, 皮瓣缺血后一些细胞因子可以活化血管壁上 iNOS, 从而促进高浓度 NO 的合成及大量自由基的生成而加重组织损伤^[8]。也有文献指出, 在缺血/再灌注皮瓣中未发现 iNOS 蛋白的表达, 皮瓣术后组织中 iNOS 的活性也并未增强^[9]。故目前关于 NO 对任意型皮瓣的正负效能机制尚存在争议。

皮瓣移植后在皮瓣的受区和皮瓣的切缘之间微血管开始重建。在延迟皮瓣研究中证实, 皮瓣的血流方向、血流量以及伤口边缘组织间微循环重建情况对缺血组织的存活起着关键作用^[10-11]。因此, 作为促血管新生作用最强、特异性最高的 VEGF 在提高皮瓣移植术后成活率方面也受到关注。大量文献已证实,

VEGF 在皮瓣移植后血管再生方面发挥重要作用,其主要作用机制是 VEGF 通过增加血管数量以及血管内皮的通透性,抑制炎症递质释放、增强皮瓣内白细胞吞噬功能,促进缺血皮瓣新生血管生成而改善缺血组织的血液供应,提高皮瓣的存活率。最新研究证实,外源性应用 VEGF 能够改善皮瓣组织微循环并提高皮瓣成活率^[12-13]。目前,对 VEGF 的深入研究主要在皮瓣移植中的转染方式,其中包括 VEGF 的蛋白注入和基因转入。实验研究通过大鼠脂肪干细胞(rADSCs)转运 VEGF 基因证实^[14-15],将转染 VEGF 基因的 rADSCs 注射于大鼠腹腔内,在大鼠皮瓣组织中发现 rADSCs 具有向皮瓣远端迁移的特性。而将 VEGF165 基因通过脂质体介导转染到体外培养的人脐血中的血管内皮祖细胞,则具有更强大的促血管新生作用^[16]。Wang 等^[17]在研究大鼠缺血皮瓣过程中,通过将载有 VEGF 基因的 II 型腺相关病毒转入皮瓣蒂部,进一步证明其可增加皮瓣成活率。

虽然研究证实通过蛋白注入或基因转入 VEGF 可以促进皮瓣的成活,但 VEGF 重组蛋白代谢快,若持续使用外源性 VEGF 可能会激发微血管的过度生长而诱导隐性肿瘤的发生。因此,通过外源性 NO 介导内源性 VEGF 表达的增高促进皮瓣成活成为本实验的研究目标。相关研究表明,NO 参与 VEGF 诱导血管生成的信号传导过程,内生性的 NO 是应用外源性 VEGF 促血管生成的必要因子^[18]。同时,多种因素也可以影响内源性 VEGF 的表达调控。最近文献表明,表皮生长因子、白细胞介素 1、白细胞介素 6、碱性成纤维生长因子、肿瘤坏死因子 β 、糖皮质激素、胰岛素类生长因子、雌激素等均可参与 VEGF 表达或调控^[19]。这些因子之间相互影响,彼此协调,最终通过 VEGF 在血管内皮细胞的表达改善组织微循环作用。本实验结果证实,外源性 NO 的增高也可促进内生性 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 表达,外源性 NO 也作为调控 VEGF 表达的因子之一参与机体的生理或病理反应。外源性 NO 可通过介导内源性 VEGF 的增高促进皮瓣的存活,进一步明确 NO 对皮瓣微循环的改善作用,为临床更有效的预防皮瓣坏死提供理论参考。

参考文献

[1] 梁钢,孙建平,徐宝成.应用小腿内侧游离皮瓣桥接修复上肢较大面积皮肤及主干血管缺损[J].中华烧伤杂志,2013,29(4):389-390.

[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] 晏泽,刘春利,苑凯华.皮瓣掀起后内皮素、一氧化氮变化与微循环关系的实验研究[J].中华整形外科杂志,2000,16(3):157.

[4] 欧阳嘉杰,牛其芳,韩正学.非酶源一氧化氮及其在游离皮瓣低血再灌注损伤中的作用[J].国际口腔医学杂志,2015,42(1):106-109.

[5] Wei JW, Dong ZG, Ni JD, et al. Influence of flap factors on partial necrosis of reverse sural artery flap; a study of 179 consecutive flaps [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 72(3): 744-750.

[6] Shu X, Keller TC, Begandt D, et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(23): 4561.

[7] Khiabani KT, Kerrigan CL. The effects of nitric oxide donor Sin-1 on ischemiareperfused cutaneous and myocutaneous flaps [J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 110(1): 169-176.

[8] Gribbe O, Lundeborg T, Samuelson UE, et al. Nitric oxide synthase activity and endothelial ultrastructure in ischaemic skin-flaps [J]. Br J Plast Surg, 1997, 50(7): 483-490.

[9] Khiabani KT, Kerrigan CL. Presence and activity of nitric oxide synthase isoforms in ischemia-reperfusion-injured flaps [J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(5): 1638-1645.

[10] Takanari K, Kamei Y, Toriyama K, et al. Differences in blood flow volume and vascular resistance between free flaps; assessment in 58 cases [J]. J Reconstr Microsurg, 2009, 25(1): 39-45.

[11] Edmunds MC, Czopek A, Wigmore SJ, et al. Paradoxical effects of heme arginate on survival of myocutaneous flaps [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014, 306(1): R10-R22.

[12] Huang N, Khan A, Ashrafpour H, et al. Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(1): 127-137.

[13] 王璐,郭树忠,马显杰,等.VEGF 明胶缓释微球对大鼠背部随意皮瓣存活的影响[J].中国美容医学,2008,17(5):673-667.

[14] Li H, Zan T, Li Y, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells promotes formation of prefabricated flap in a rat Model [J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 222(2): 131-140.

[15] Yang M, Sheng L, Li H, et al. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model [J]. Microsurgery, 2010, 30(4): 275-281.

[16] Park IS, Mondal A, Chung PS, et al. Prevention of skin flap necrosis by use of adipose-derived stromal cells with light-emitting diode phototherapy [J]. Cytotherapy, 2015, 17(3): 283-292.

[17] Wang XT, Avanesian B, Ma Q, et al. Enhancement of flap survival and changes in angiogenic gene expression after AAV2-mediated VEGF gene transfer to rat ischemic flaps [J]. Wound Repair Regen, 2011, 19(4): 498-504.

[18] Haeussler DJ, Pimentel DR, Hou X, et al. Endomembrane H-Ras controls vascular endothelial growth factor-induced nitric-oxide synthase-mediated endothelial cell migration [J]. J Biol Chem, 2013, 288(21): 15380-15389.

[19] Evans I. An overview of VEGF-mediated signal transduction [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1332: 91-120.