

学校代码: 10285

学 号: 20175233072

蘇州大學

SOOCHOW UNIVERSITY

硕士学位论文

(专业学位)



前列地尔脂微球注射剂对狭长窄蒂皮瓣

成活影响的研究

Experimental Research of Effecton of Alprostadiil lipid
microspheres on Narrow Pedicle Flaps survival in Rats

研究生姓名 付鲲鹏

指导教师姓名 赵天兰

专业名称 整形外科学

研究方向 皮瓣的基础应用和临床研究

所在院部 苏州大学附属第二医院

论文提交日期 2020年3月

苏州大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

论文作者签名：任鲲鹏 日期：2020.5.25

学校代码： 10285

学 号： 20175233072

苏州大学学位论文使用授权声明

本人完全了解苏州大学关于收集、保存和使用学位论文的规定，即：学位论文著作权归属苏州大学。本学位论文电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。苏州大学有权向国家图书馆、中国社科院文献信息情报中心、中国科学技术信息研究所（含万方数据电子出版社）、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社送交本学位论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存和汇编学位论文，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索。

涉密论文

本学位论文属 _____ 在 _____ 年 _____ 月解密后适用本规定。

非涉密论文

论文作者签名： 任鲲鹏 日 期： 2020.5.25

导 师 签 名： 赵天芝 日 期： 2020.5.25

前列地尔脂微球注射剂对狭长窄蒂皮瓣成活影响的研究

中文摘要

目的：通过构建大鼠狭长窄蒂皮瓣模型并予腹腔注射前列地尔脂微球，观察其对皮瓣存活的影响，并观察皮瓣组织病理变化，分析 VEGF/CD34 表达质量和微血管密度变化，探究其发挥作用的可能机制。

方法：随机将 24 只成年 SD 大鼠分为实验组（A 组）、对照组（B 组）两组并编号，通过手术在大鼠背部两侧对称位置各建立一个狭长窄蒂皮瓣，设计的皮瓣蒂部长宽为 1.5cm×0.8cm 且垂直于大鼠背部中线，并带有直径 2.5cm 的圆形瓣部，皮瓣整体类似乒乓球拍。实验组术后连续 7 天每天腹腔注射前列地尔脂微球注射液 4 μ g/Kg，对照组术后每天腹腔注射相同剂量的 0.9% 的氯化钠水溶液。观察并记录两组大鼠皮瓣术后变化情况并在术后 1h、1d、3d、5d、7d 于皮瓣远端中轴线部位取标本；术后第 7 天计算皮瓣成活面积；通过显微下镜观察 HE 染色的皮瓣组织微血栓形成、内皮细胞变化及新生血管等病理变化；免疫组织化学法及酶联吸附测定检测 VEGF、CD34 的表达的质与量；计算 CD34 标记的 MVD 值。

结果：（1）术后第 7 天 A、B 两组皮瓣成活率分别为 (91 \pm 1.96)%、(72 \pm 2.38)%，A 组成活率比大于 B 组，P<0.05；（2）相同时间点，A 组皮瓣组织中内皮细胞受损程度较 B 组皮瓣轻，微循环内形成的血栓较 B 组皮瓣少。（3）在同组中，VEGF、CD34 的表达质量及微血管密度随时间点延长而提高，A 组皮瓣组织中 VEGF、CD34 的表达量在第 3 天达到高峰(A 组为 973.19 \pm 25.46、45.74 \pm 0.55)；B 组皮瓣组织中 VEGF、CD34 的表达量在第 5 天达到高峰(B 组为 656.53 \pm 18.76、20.68 \pm 0.25)；两组微血管密度均第 7 天达到高峰(A 组 36.91 \pm 3.86，B 组 23.18 \pm 2.78)；（4）相同时间点,A 组皮瓣中 VEGF、CD34 的表达量及 MVD 值都高于 B 组，P<0.05。

结论：（1）前列地尔能减少循环内微血栓形成，减少血管内皮细胞损伤；（2）前列地尔脂微球有利于狭长窄蒂皮瓣 VEGF、CD34 的表达及皮瓣组织中血管的新生；（3）前列地尔脂微球注射剂能有效提高狭长窄蒂皮瓣的成活率。

关键词：前列地尔脂微球注射剂，狭长窄蒂皮瓣，微循环， VEGF， CD34

作 者：付鲲鹏

指导教师：赵天兰

Experimental Research of Effect of Alprostadil lipid microspheres on Narrow Pedicle Flaps survival in Rats

Abstract

Objective: The rat model of narrow pedicle flap was constructed and intraperitoneally injected with alprostadil lipid microspheres, then observing Alprostadil lipid microspheres impact on the influence degree of survival area of narrow pedicle flap, the expression of VEGF / CD34, and the number of neovascularization in the flap were detected. And the mechanism of the results was preliminarily discussed.

Methods: 24 healthy SD rats were selected, then randomly divided into experimental group (A group) and control group (B group) and numbered. Symmetrical positions were taken on both sides of the back of the rats, and a narrow pedicle flap was designed on each side, while the distance of the central line was 1.5 cm. The pedicle size was 1.5×0.8 cm while the flap size was 2.5 cm in diameter circular. Every group has 12 rats. After surgery, the experimental group would have intraperitoneal injection with Alprostadil lipid microspheres (4 μg / Kg·d) for 7 days, while we used the same method and dose of N.S. in control group. Meanwhile, we would monitor the two groups of rats and measure the survival rate of each flap on the 7th day after surgery. After surgery, collecting the specimens at the distal flap of the two groups at 1 h, 1 d, 3 d, 5 d, and 7 d. Then microscope was brought to observe the flaps tissues with HE staining, afterwards, the microvascular density of flaps was calculated. And immunohistochemical staining and ELISA were taken to detect the expression quality and quantity of VEGF and CD34 expression of the tissues. And Calculate the MVD through the CD34 tag.

Results: (1) Seven-days observation after the operation has witnessed, the ratio of the survival area of the flap in group A and B group to the total flap area was (91±1.96)%, (72±2.38)%. Group A were significantly greater than group B, P<0.05. (2) In the same time, the tissue injury severity and venous thromboses in Group A is less than Group B; (3) For the same set of narrow pedicle flaps, the expression of VEGF, CD34 and MVD was

increase over time. Meanwhile, the expression of both VEGF and CD34 in group A was in peak on the 3th day after surgery (Separately: group A was 973.19 ± 25.46 、 45.74 ± 0.55). By contrast, the expression of VEGF and CD34 of B was in peak on the 5th day after surgery (Separately: group B was 656.53 ± 18.76 、 20.68 ± 0.25). The two groups' MVD were in peak on the 7th day after surgery (Separately: group A was 36.91 ± 3.86 , group B was 23.18 ± 2.78); (4) At the same point of time, the expression of VEGF, CD34 and microvascular density in narrow pedicle flaps of Group A are higher than these of group B, $P < 0.05$.

Conclusion: (1) Injection of Alprostadil lipid microspheres on the narrow pedicle flap can lessen the formation of microthrombus and the damage of vascular endothelial cell. (2) Injection of Alprostadil lipid microspheres on the narrow pedicle flap can promote the angiogenesis and improve the expression of VEGF and CD34. (3) The rate of survival on the narrow pedicle flap can be improved in the case of injection of Alprostadil lipid microspheres

Key words: alprostadil lipid microspheres, flap, microspheres, vascular endothelial growth factor, cluster of differentiation 34

Written by Fu Kunpeng

Supervised by Zhao Tianlan

目 录

序 言	1
参考文献.....	5
实验材料.....	7
一、实验动物.....	7
二、主要仪器设备.....	7
三、实验药物.....	8
四、主要试剂.....	8
五、主要溶液配制.....	8
实验方法与步骤.....	9
一、皮瓣设计与手术操作.....	9
二、实验动物分组.....	10
三、给药方法.....	11
四、观察指标及统计、处理数据.....	11
结 果.....	16
一、大鼠大体观察.....	16
二、皮瓣成活情况.....	17
三、大鼠皮瓣组织 HE 染色.....	18
四、大鼠皮瓣组织中 VEGF 的表达.....	20
五、大鼠皮瓣中 CD34 的表达.....	22
六、微血管密度测定	23
讨 论.....	25
一、皮瓣成形后微循环的变化对皮瓣存活的影响.....	25
二、狭长窄蒂皮瓣的优点及成活机制.....	26
三、皮瓣成形术后微血栓的形成对皮瓣存活的影响.....	26
四、前列地尔脂微球对 CD34 在组织中表达的影响.....	27
五、前列地尔脂微球对 VEGF 表达的影响	28
六、前列地尔脂微球促进皮瓣成活的可能机制.....	29

七、本实验的研究意义与展望.....	30
结 论	32
参考文献.....	33
综 述 前列地尔脂微球及其在整形外科中的应用进展	36
一、前列地尔的结构基础.....	36
二、前列地尔的不良反应.....	37
三、前列地尔脂微球的剂型特点及其优点.....	38
四、前列地尔在整形外科的应用.....	38
五、总结	41
参考文献.....	42
中英文对照缩略词表.....	45
致 谢	46

序 言

整形外科通过外科手术或组织移植,对人体组织、器官的缺损、畸形,进行修复和再造,对正常人体形态再塑造,为患者“雪中送炭”,为健康的求美者“锦上添花”,达到功能的重建及形态美化。皮瓣移植是整形外科最基础也是最重要的治疗手段。

皮瓣(Skin flap)是皮肤及其附着的皮下组织组成的具有血供的组织块。按照皮瓣供血途径的不同将其分为:1、由肌皮动脉穿支供血的随意型皮瓣;2、由直接皮动脉及肌间隙或肌间隔动脉供血的轴型皮瓣。大部分皮瓣由肌皮动脉供血,因此整形外科医生最基本掌握、最常选择的皮瓣类型是随意型皮瓣。但随意型皮瓣的临床应用也是有限制的。传统观念认为,一定范围内的长宽比例是保持皮瓣血供,保证皮瓣存活的重要条件。Stell^[1]通过实验得出,随意型皮瓣蒂部的宽度影响着皮瓣成活的长度,蒂部越宽,成活长度越长,但超出相应范围后,蒂部的宽度的增加对皮瓣存活长度的影响甚微。一般术前设计随意型皮瓣的长度需在12.5cm内,皮瓣设计过长,皮瓣远端容易坏死。王炜^[2]在《整形外科学》中表明在头面颈等血供充足部位,3~3.5:1是设计任意皮瓣的长宽比的极限,在躯干或四肢应控制在2:1之内,在血运相对薄弱的小腿末端应控制在1.0~1.5:1范围内较安全;郭恩覃^[3]则认为,设计任意皮瓣的长宽比应在1.5:1范围内,在血运相对丰富的头颈部可超过1.5:1,部分区域即便达到3:1也能存活,但在肢体远端等血供较差部位最好为1:1。一定范围内的长宽比例一定程度上成为了束缚整形外科医生双手的枷锁。因此为打开长宽比限制的枷锁,诸多研究者不断研究、突破,先后提出了穿支皮瓣、皮神经营养血管皮瓣、预购皮瓣等概念。怎样促进皮瓣的成活,拓展皮瓣在临床中的使用,是国内外许多学者关注的焦点。

皮瓣的血供是影响术后皮瓣成活质量的重要条件,皮瓣的血管网络分为血管层、浅筋膜层、深筋膜层,由浅入深又细分为皮下浅动脉血管网、真皮下血管网、真皮层血管网、乳头状血管网和深筋膜层血管网组成相互联系的立体的血管网络^[4]。直接皮动脉与肌皮动脉的穿支大多终结于真皮下血管网,所以该层为皮瓣最重要的血供来源。所以皮瓣存活的面积取决于真皮下血管网所能供应的范围。1990年Taylor等^[5]通过研究发现人体皮肤和皮下组织由不同的体区组成,同一动脉血供来源的可划为一个体

区, 据此推出“血管体区”的观点。直接皮动脉和肌皮动脉的穿支是任意皮瓣血供的主要来源, 但每条动脉能够供血的真皮下血管网面积是一定的。1993年 Morris 等^[6]研究发现皮瓣蒂部血管同相邻血管区主要穿支间越近, 皮瓣存活的面积越大。1987年成红兵等^[7]通过构建猪皮瓣模型, 观察到不同蒂部宽度的皮瓣在同等血流灌注压下, 皮瓣存活面积相近, 并认为皮瓣皮瓣组织中血管的有效灌注压可能是影响皮瓣成活的主要因素, 血流灌注越多, 皮瓣血供越丰富越容易成活。1997年, 赵天兰等^[8-9]在新鲜成人尸体头颈部标本解剖学研究上取得成果后, 在临床修复面部缺损创面时设计了远超传统任意型皮瓣长宽比例的窄蒂侧颌颈皮瓣, 术后皮瓣成活良好且局部形变小, 取得成功, 据此提出“狭长窄蒂皮瓣”的概念。狭长窄蒂皮瓣由一定长宽比例的可旋转蒂部与远端携带修复受区的瓣部构成, 外观近似乒乓球拍。该皮瓣狭长的蒂部与携带的瓣部为其带来可旋转角度大和可修复创面范围大的优势, 为整形外科做皮瓣设计时提供了一种新思路。2017版最新的江苏省手术分级目录(苏卫医政(2017)68号)已将狭长窄蒂皮瓣列入四级手术范畴, 表明各级卫生计生行政部门、医疗机构对这一技术手段的认可与期待。现在狭长窄蒂皮瓣的应用范围不断得到突破, 已将其扩大应用于躯干及四肢皮肤软组织缺损修复。但在大量的临床应用中我们发现当蒂部和瓣部的长宽比超过一定限度时, 皮瓣远端仍会出现缺血、淤血等循环障碍, 导致皮瓣坏死。因此如何缓解皮瓣的血运障碍、改善皮瓣成活质量及进一步研究影响皮瓣成活的相关机制, 仍是整形外科医生的主攻方向。

有研究发现^[10-11]皮瓣成形术后出现的微循环障碍、炎症细胞大量释放的炎症因子、血管内皮细胞受损及血小板聚积形成微血栓等因素联合作用下引起皮瓣坏死。查阅文献发现通过使用重组人生长激素^[12]、地拉罗司^[13]等药物治疗能促进狭长窄蒂皮瓣术后皮瓣远端血管的新生, 保证皮瓣远端的血供; 但皮瓣术后高凝状态的血液与损伤的血管内壁, 使血小板常在术后早期聚积成血栓, 血栓阻塞血管是影响皮瓣早期微循环的主要原因。在皮瓣出现淤血早期采取负压封闭引流(vacuum sealing drainage, VSD)装置^[14]可及时将皮瓣内淤滞的血液抽吸出来, 并通过节律性的负压调节对皮瓣组织正向加压、按摩, 调高皮瓣远端血流灌注压, 改善皮瓣组织血供, 减少炎症因子及缺血、缺氧对内皮细胞损伤, 改善循环瘀滞, 减少微血栓的形成, 提高皮瓣存活率; 但负压封闭引流技术操作较复杂, 需要长期床边负压维持, 且存在术后封闭辅料贴合不严, 出现漏气、漏液等情况, 常需再次更换新的辅料。因此为解决这些问题, 我们要寻求

一种更简单、方便、有效的治疗方式。

前列腺素 E1 (prostaglandin E1, PGE1), 临床常称其前列地尔, 由一个五碳环戊烷和两条主链构成的不饱和二十碳炔基脂肪酸, 侧链含一个羧基。PGE1 是广泛分布于体内的活性物质, 最开始是从人的精液中提纯制备, 现作为临床药物已经得到广泛应用。大量研究证明 PGE1 具有舒张血管平滑肌扩张收缩痉挛的血管、减少微血栓形成和减少炎症因子对内皮细胞的损伤^[15]等功能, 可以提高循环血流灌注量、缓解循环缺血或淤血症状^[16]。但前列地尔的普通剂型药物靶向性差, 由于其属于炎症因子的一种, 易引起滴注部位疼痛、皮肤出现“红线”等非感染性静脉炎症状。前列地尔在体内消除速度较快, 且在经过肺时, 80%的前列地尔会被灭活, 临床应用时为维持药效有效浓度, 常采用大剂量、长时间持续静脉滴注方式给药, 患者易出现头晕头疼、恶心呕吐等不良反应, 限制了前列地尔在临床上的应用。随着不断的深入研究, 前列地尔脂微球注射液的临床价值被越来越多的发现及应用。被脂微球的包裹前列地尔, 在肺部的灭活率降低了, 前列地尔能更多的作用于患处, 使得前列地尔脂微球注射剂给药量小于传统剂型的 1/10, 较大限度减少了前列地尔在临床应用中的相关副作用。

CD34 (cluster of differentiation 34) 为造血干细胞分化抗原群中的一员, 不仅表达于血液系统各类细胞表面, 在内皮细胞、激素分泌型神经细胞等多种组织细胞上也可表达。特别是在增殖、分化或成熟的内皮细胞上 CD34 呈强阳性表达, 常用来标记组织中新生血管内皮细胞计算 MVD, 以此间接反映其中的血管数量。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种外分泌蛋白。VEGF 基因由 8 个外显子和 7 个内含子构成, 经转录水平上对信使 RNA 不同剪切方式形成 VEGF-A、B、C、D、E 和胎盘生长因子 (PGF) 六种同分异构体^[17-18]。通常所说的 VEGF 是 VEGF-A, 通过降解血管内皮下基质增加血管的通透性并作用于内皮细胞促进血管新生; VEGF-B 可调节肿瘤组织周围局部血管新生, 促进肿瘤生长; VEGF-C、D 可调节肿瘤组织中血管、淋巴管的生成; VEGF-E 是潜在的新生血管生长因子; 胎盘生长因子在营养视网膜外层的脉络膜新生血管中表达较高^[19]。VEGF 作用于蛋白酪氨酸激酶家族内的三种受体, 分别称之为 VEGF-R1、R2、R3。当 VEGF 与内皮细胞上特异受体结合并使其兴奋后, 增加 Ca^{2+} 内流入内皮细胞, 触发级联作用, 引起内皮细胞分裂、分化与成熟, 调节血管新生^[20]。VEGF 激活 VEGF-R2 后, 可以增加微循环的血管通透性, 促进血液与血管外基质间的物质交换。

基于上述理论基础，我们以大鼠背部狭长窄蒂皮瓣模型为研究对象，通过连续7天每天腹腔注射前列地尔脂微球注射液 0.8ml/Kg 对实验组进行干预，术后连续7天每天腹腔注射等量生理盐水对对照组进行干预，期间观察记录皮瓣的外观变化情况，测定皮瓣成活面积，通过 HE 染色观察皮瓣组织的炎细胞浸润、血栓形成等病理变化并记算新生血管密度，运用免疫组化、ELISA 法评估皮瓣术后愈合过程中组织内 VEGF、CD34 表达的质与量，通过对相关结果的对比研究，探讨前列地尔脂微球注射液促进狭长窄蒂皮瓣成活作用的相关理论依据与可能机制，探索一条新的提高皮瓣存活率的途径。

参考文献

- [1] PM Stell. The viability of skin flaps[J]. Ann R Coil Surg Engl,1977,59(3):236-241.
- [2] 王炜. 整形外科学[M]. 浙江科学技术出版社,1999,139-143.
- [3] 郭恩覃.现代整形外科学[M]. 人民军医出版社,2000,109-122.
- [4] 柏树令,李吉.国人皮肤微血管的三维构筑及其规律性[J]. 微循环学杂志,1995. (01): 12-13.
- [5] Taylor GI,Caddy CM,WaUerson PA,et a1. The venous territories(venosomes)of the human Body:experimental study and clinical implications[J]. Plast Reconstr Surg,1990,86(2):185-213.
- [6] Morris SF,Taylor GI. Predicting the survival of experimental skin flaps with a knowledge of the vascular architecture[J]. Plast Reconstr Surg,1993,92(7):1352-1361.
- [7] 成红兵,侍德. 猪皮瓣长/宽比例的实验研究[J]. 手外科杂志,1987,3(2):42-44.
- [8] 赵天兰,程新德,熊绍虎,等. 窄蒂皮侧颌颈部皮瓣的解剖与临床应用[J]. 中华显微外科杂志,2002,25(4):301-303.
- [9] Xiong SH,Cheng XD,XU DC. Fascial Subdermal vascular network flap: anatomic study and clinical application[J]. Surg Radiol Anat,2002,24(5):258-264.
- [10]Wang WZ,Arderson G,et al. Lack of Nitric Oxide Contributes to Zasospasm During Ischemia Reperfusion Injury[J]. Plast Reconstr Surg,1997,99(1):1099-1108.
- [11]Oshima H,Inoue H,Aihara M,et al.Physiological roles of endotheliu-derived nitric oxide in the epigastric island flaps of rabbits[J]. Ann Plast Surg,1997,39:608.
- [12]孙卫,赵天兰,余道江,等.乒乓球拍样任意皮瓣局部注射重组人生长激素促进其成活的实验研究[J]. 中华显微外科杂志,2014,37(2):152-156.
- [13]冀宇,赵天兰,余道江,徐子寒,杨建新. 地拉罗司对成年大鼠狭长窄蒂皮瓣 Dll4\CD105表达及血管新生的影响[J]. 中华医学美学美容杂志,2012.18 (04) :298-301.
- [14]余道江,赵天兰,徐又佳,谢晓明,陈琦,韩文雅,伍丽君,柴筠. 负压封闭引流技术在狭长窄蒂皮瓣中的应用[J].中华整形外科杂志,2013,29(1):62-64.
- [15]Wen-tong Fang,Hong-jian Li,Liao-sheng Zhou.Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide[J]. .Acta Pharmacol Sin,2010 Apr; 31(4): 485-492.

- [16]杨宝峰.药理学[M].北京:人民卫生出版社,2016:281-289.
- [17]Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003,9(6):69-76.
- [18]Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007,38(2):58-68.
- [19]Gavin Thurston, Irehe Noguera Troise et al. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007,7(5):327-331.
- [20]Taub PJ, Silver L, Weinberg H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000,105(10):34-42.