

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.53.002

[http://www.crter.org]

韦淑怡, 殷国前, 韩志强, 潘新元, 林博杰: 天然水蛭素水凝胶可改善随意皮瓣的存活[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(53):9107-9112.

天然水蛭素水凝胶可改善随意皮瓣的存活**

韦淑怡, 殷国前, 韩志强, 潘新元, 林博杰(广西医科大学第一附属医院整形美容外科, 广西壮族自治区南宁市 530021)

文章亮点:

天然水蛭素是一种生物活性物质, 具有抗凝、抗血栓等药理作用, 但由于其抗原性使其应用受到限制, 而重组水蛭素也以注射、口服给药为主。实验创新性的将注射用天然水蛭素改制成外用药剂, 大幅降低药物对实验动物的毒性、致敏性, 使给药方式更自主灵活。结果表明天然水蛭素水凝胶同样可减轻大鼠随意皮瓣的瘀血, 同时能促进血管生成, 提高皮瓣存活率。

关键词:

器官移植; 组织移植; 天然水蛭素; 凝胶; 皮肤渗透实验; 随意皮瓣; 皮瓣存活率; 大鼠; 省级基金

主题词:

水蛭素类; 凝胶类; 渗透; 外科皮瓣; 大鼠, Wistar

基金资助:

广西壮族自治区卫生厅重点科研课题资助项目(2011101)*, 课题名称: 天然、重组水蛭素凝胶对大鼠随意皮瓣瘀血模型中 VEGF、PGI₂、TXA₂ 的影响

摘要

背景: 随意皮瓣移植后易发生瘀血, 甚至缺血坏死, 临床与动物实验已经证明水蛭素能够提高皮瓣的存活率。

目的: 探讨天然水蛭素凝胶对大鼠随意皮瓣存活的影响。

方法: 制备天然水蛭素凝胶, 用改良的 Franz 扩散池进行经皮渗透实验, 使用 Markwardt 法进行水蛭素活性的检测。选用 Wistar 大鼠, 在其背部设计随意皮瓣, 面积为 9 cm×3 cm; 皮瓣随机分 3 组, 分别涂抹生理盐水、天然水蛭素凝胶、空白凝胶基质。术后进行大体、组织病理学形态观察, 第 7 天计算皮瓣存活率。

结果与结论: 体外实验: Markwardt 法检测到天然水蛭素凝胶组的活性成分能透过皮肤, 而空白凝胶组未检测到任何活性成分。体内实验: 术后 7 d, 天然水蛭素凝胶组皮瓣坏死长度明显长于生理盐水组、空白凝胶基质组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。术后 3 d, 天然水蛭素凝胶组真皮内毛细血管及微静脉红细胞瘀滞现象较生理盐水组、空白凝胶基质组明显减轻; 术后 7 d, 天然水蛭素凝胶组皮下胶原及肉芽组织增生明显优于生理盐水组、空白凝胶基质组; 术后 7 d, 天然水蛭素凝胶组皮瓣存活率高于生理盐水组、空白凝胶基质组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。结果表明天然水蛭素可渗透进入完整皮肤组织, 局部应用天然水蛭素水凝胶同样对皮瓣移植后瘀血有改善作用, 有利于新生血管的生成。

Natural hirudin hydrogel improves the survival rate of random pattern flaps

Wei Shu-yi, Yin Guo-qian, Han Zhi-qiang, Pan Xin-yuan, Lin Bo-jie (Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: A random pattern flap is prone to resulting in blood stasis and even ischemic necrosis. Clinical and animal experiments have proved that hirudin can improve the survival rate of the pattern flap.

OBJECTIVE: To discuss the effects of natural hirudin hydrogel on the survival of rat random pattern flaps.

METHODS: Natural hirudin hydrogel was prepared for percutaneous permeation experiment using modified Franz diffusion cell. Markwardt method was used to detect hirudin activity. Random pattern flaps from the back of Wistar rats, 9 cm × 3 cm, were used for flap preparation. The flaps were randomized into three groups, normal saline group, hirudin group and blank gel matrix group. Postoperative gross, histopathological, and morphological observations were conducted, and the survival rate of the flaps was calculated at day 7.

RESULTS AND CONCLUSION: *In vitro* experiments: The active ingredient of the natural hirudin hydrogel passed through the skin, but there was no active ingredient in the blank gel group. *In vivo* experiments: After 7 days, the length of necrotic flaps in the hirudin group was significantly longer than that in the normal saline and blank gel matrix groups ($P < 0.05$). After 3 days, the phenomenon of red blood cell stasis in dermal capillaries and venules was significantly reduced in the hirudin group as compared with the normal saline and blank gel matrix groups; after 7 days, subcutaneous collagen and granulation tissue hyperplasia was more obvious in the hirudin

韦淑怡★, 女, 1987 年生, 广西壮族自治区南宁市人, 广西医科大学在读硕士, 主要从事组织修复研究。

pp99.student@qq.com

通讯作者: 殷国前, 广西医科大学第一附属医院整形美容外科, 广西壮族自治区南宁市 530021
yingq61@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344
(2013)53-09107-06

修回日期: 2013-10-09
(201308219/M - W)

Wei Shu-yi★, Studying for master's degree, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
pp99.student@qq.com

Corresponding author: Yin Guo-qian, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
yingq61@163.com

Accepted: 2013-10-09

group than in the normal saline and blank gel groups; after 7 days, the survival rate of flaps in the hirudin group was significantly higher than that in the normal saline and blank gel matrix groups ($P < 0.05$). Natural hirudin permeate the intact skin tissue, and local application of natural hirudin hydrogel can improve blood stasis after flap transplantation and be conducive to the formation of new blood vessels.

Subject headings: hirudins; gels; osmosis; surgical flaps; rats, Wistar

Funding: the Major Scientific Research Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2011101*

Wei SY, Yin GQ, Han ZQ, Pan XY, Lin BJ. Natural hirudin hydrogel improves the survival rate of random pattern flaps. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(53):9107-9112.

0 引言 Introduction

随意皮瓣移植修复创面是临床上应用较广泛的手术方法之一,而术后的皮瓣瘀血会影响手术的疗效。长久以来使用活体水蛭的吸血疗法治疗皮瓣瘀血已经得到了肯定^[1-2],但活体水蛭价格昂贵,在紧急状况下不易获得,同时会受地域、气候等限制^[3-4],因此寻求一种替代活体水蛭疗法的方法很重要。天然水蛭素是一种生物活性物质,属于天然的凝血酶抑制剂^[5],具有抗凝、抗血栓等药理作用。课题组前期经动物实验证实,对于随意皮瓣术后瘀血,注射天然水蛭素有明显改善作用,且具有促进血管生成、抗凝抗血栓、抗氧化及炎症反应、抑制血管收缩等作用^[6-7]。因注射用天然水蛭素还存在一些问题,例如感染、局部瘙痒等^[8-9],将其制成经皮给药制剂,可达到局部迅速给药、降低药物毒副作用等目的。

课题组通过对自主研发的天然水蛭素凝胶进行一系列的临床前实验研究,探讨天然水蛭素是否能通过局部外用给药,观察天然水蛭素制成水凝胶后对大鼠随意皮瓣的影响,讨论天然水蛭素从表皮给药后是否仍然具有改善皮瓣瘀血、促进新生血管形成的作用,旨在为临床上治疗皮瓣移植后瘀血及提高皮瓣存活率提供一种新的给药方式。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 体外皮肤渗透试验,随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年1至12月在广西医科大学实验室完成。

材料:

实验动物: 健康Wistar大鼠30只,雌雄各半,体质量(250±20)g;健康裸鼠,体质量(20±2)g,由广西医科大学动物实验中心提供并统一喂养,自由饮水,室温25℃,相对湿度40%~70%。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

分组: 将30只健康的Wistar大鼠按雌雄各半的比例随机分为3组:生理盐水组、天然水蛭素凝胶组、空白凝胶基质组,每组10只。

天然水蛭素水凝胶对大鼠随意皮瓣存活影响的实验所用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
天然水蛭素凝胶	自制
天然水蛭素冻干粉	专利号 ZL03113566.8, 浓度分别为 20 ATU/瓶和 80 ATU/瓶, 广西科康生物科技有限责任公司
人纤维蛋白原	上海莱士
凝血酶	湖南一格
Carbopol 934	美国诺誉化工有限公司
氮酮	阿拉丁试剂
光学显微镜	OLYMPUS 公司
RYJ-6B 型透皮扩散仪	上海黄海药检, 接受池体积为 6.50 mL, 透皮有效扩散面积为 2.8 cm ²

实验方法:

天然水蛭素凝胶的制备: 由实验室自行研制,先将1g Carbopol 934溶于适量蒸馏水中,静置充分溶胀后,Carbopol 934水凝胶用25%三乙醇胺水溶液调节pH值至7,加入0.2g氮酮、3.6g乙醇、5g丙二醇混合液,加入100 ATU天然水蛭素冻干粉,最后将剩余水分补足至100g,均匀搅拌即得1 ATU/g浓度天然水蛭素水凝胶。

体外皮肤渗透试验: 取适量空白凝胶基质,再在其中加入实验剂量的天然水蛭素冻干粉,按需要配置成100 ATU/g浓度的天然水蛭素凝胶。常规处死裸鼠,无菌条件下剥离腹部完整皮肤,去除皮下组织,露出真皮层。将皮片剪裁成适当大小,安装在透皮扩散杯上,角质层朝上,真皮层朝下。实验组给予天然水蛭素凝胶1g,对照组给予空白凝胶1g,将凝胶均匀涂于角质层。向接受室中注入6.5 mL 0.9%氯化钠注射液,置于(37±1)℃恒温水浴中,转速设置为200 r/min。分别于0.5, 1, 2, 3, 4 h吸取0.5 mL接受室溶液进行储存。

水蛭素的活性检测: 使用Markwardt法^[10]进行水蛭素活性的检测。分别配置0.05 mol/L Tris-HCl溶液、100 U/mL凝血酶溶液、5 g/L纤维蛋白原溶液。使用移液器向一次性试管中加入200 μL纤维蛋白原溶液,再加入50 μL样品,吹吸混匀,加入5 μL凝血酶溶液并即时开始计时,记录下试管中纤维蛋白原凝结时的时间。若1 min纤维蛋白原溶液未凝集,则再加入5 μL凝血酶溶液。每个样本重复检测5次。

大鼠随意皮瓣的建立: 购入实验动物安静饲养3 d后,予5%水合氯醛5 μL/g腹腔麻醉,将大鼠四肢固定于实验

动物手术台上, 用电动理发器剔除大鼠背部毛发, 使用亚甲蓝在大鼠背部设计皮瓣, 见图1, 每只大鼠设计1个皮瓣, 皮瓣面积为9 cm×3 cm。制备皮瓣时, 沿皮瓣设计线切开皮肤, 于浅筋膜下锐性分离至皮瓣蒂部, 小心不要破坏蒂部血管, 掀起后, 充分止血, 用4-0丝线原位缝合。术中如遇其他血管, 则切断后结扎, 以保证皮瓣为随意皮瓣。手术过程严格遵守无菌操作。

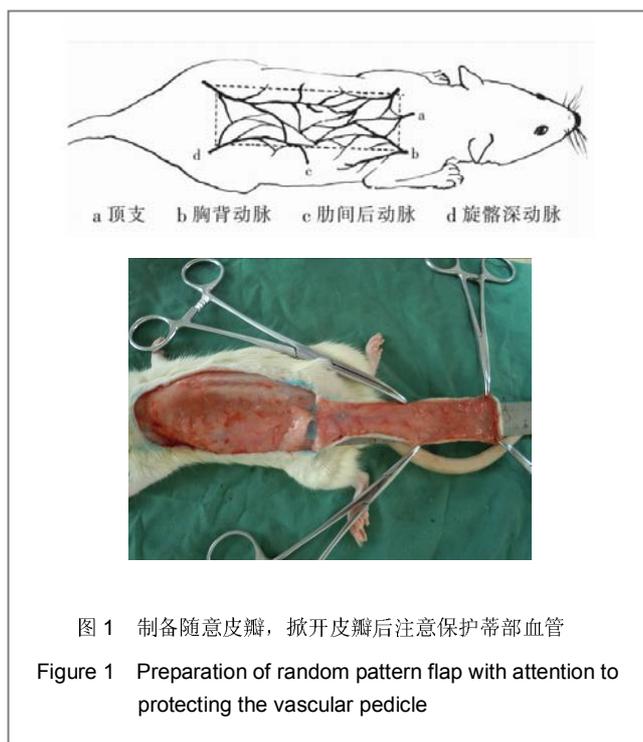


图1 制备随意皮瓣, 掀开皮瓣后注意保护蒂部血管

Figure 1 Preparation of random pattern flap with attention to protecting the vascular pedicle

术后处理: 术后大鼠放在无垫料的动物房, 由广西医科大学动物实验中心统一喂养, 分笼单独常规饲养, 室温控制在25℃左右。每天观察大鼠生长状态及皮瓣瘀血情况, 并拍照留证。术后生理盐水组予每天每次涂抹10g生理盐水, 3次/d, 天然水蛭素凝胶组每天每次涂抹10g天然水蛭素水凝胶, 3次/d, 空白凝胶基质组每天每次涂抹空白凝胶10g, 3次/d。

主要观察指标: 于术后即刻开始, 每天观察皮瓣瘀血改变情况, 皮瓣远端坏死判断标准为皮瓣颜色发黑、质硬、无毛发生长、无毛细血管反应, 并用游标卡尺测量各皮瓣远端瘀血的长度, 精确到0.01 cm。

于术后第3, 5, 7天, 使用5%水合氯醛5 μL/g腹腔麻醉, 切取各组皮瓣远端3 cm处组织, 每只大鼠只取一次, 取出的组织使用体积分数为10%的甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察组织学变化。

术后7 d, 麻醉大鼠后, 展平背部, 用数码相机拍摄皮瓣情况, 用Imaga-Pro 6.0软件分析系统(美国TIANGE公司)计算皮瓣坏死面积、存活面积和总面积并计算存活率。

$$\text{皮瓣存活率} = \frac{\text{皮瓣存活面积}}{\text{总面积}} \times 100\%$$

统计学分析: 使用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较使用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

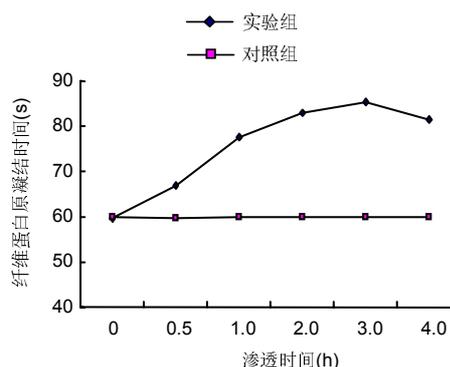
2.1 体外皮肤渗透试验结果 Markwardt法对透过物质的纤维蛋白原凝结时间的检测结果显示: 在各观察时间点, 实验组的纤维蛋白原凝结时间均有延迟($P < 0.05$), 在3 h时达到最大(85.400±1.454) s, 而对照组纤维蛋白原凝结时间无明显延迟, 见表1和图2。

表1 各组纤维蛋白原凝结时间对比

Table 1 Comparison of the coagulation time of fibrinogen in each group ($\bar{x} \pm s$, s)

渗透时间	实验组	对照组
0 h	59.733±0.594	59.800±0.560
0.5 h	66.867±0.743	59.667±0.724
1 h	77.733±1.222	59.800±0.560
2 h	83.066±1.163	59.800±0.560
3 h	85.400±1.454	59.733±0.799
4 h	81.533±1.302	59.800±0.414

注: 实验选用 Markwardt 法, 可检测透过液中是否存在直接抗凝血酶成分, 若存在直接抗凝血酶成分表明纤维蛋白原凝结时间延长。该方法同时可以检测样本中水蛭素的含量, 纤维蛋白原凝结时间越长, 表明样本中所含水蛭素越多。



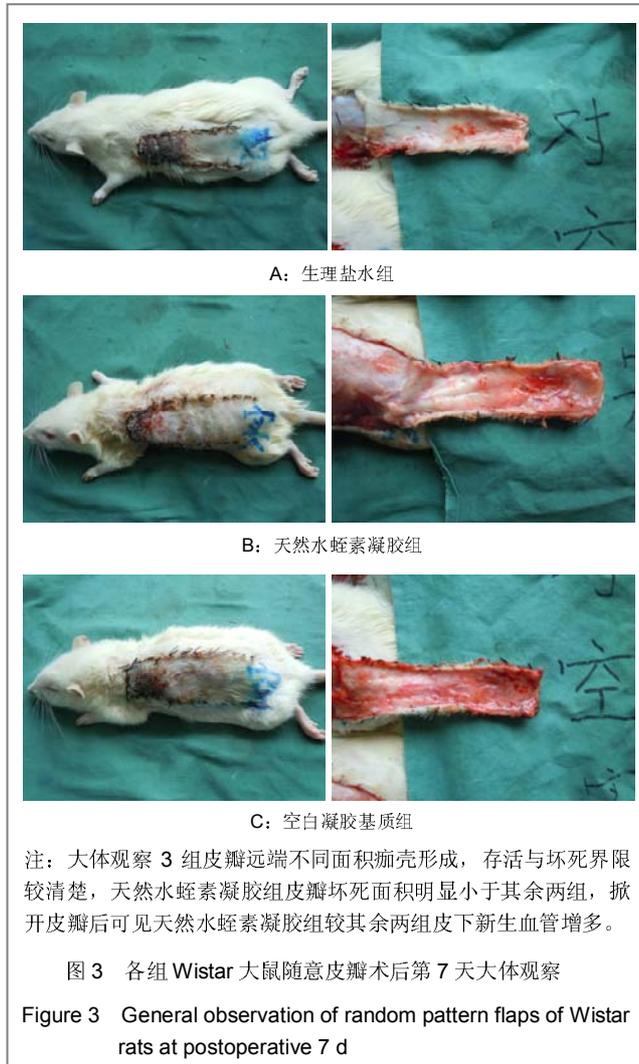
注: 在各观察时间点, 实验组的纤维蛋白原凝结时间均有延迟, 在3 h时达到最大(85.400±1.454) s, 而对照组纤维蛋白原凝结时间无明显延迟。

图2 天然水蛭素凝胶体外经皮渗透情况(200 r/min, 37℃)

Figure 2 *In vitro* percutaneous penetration of natural hirudin hydrogel (200 r/min, 37℃)

2.2 大体观察 3组大鼠均无死亡, 皮瓣术后无感染, 饮食无异常。术后即刻, 3组大鼠的皮瓣外观并无差别。术后7 d, 3组皮瓣远端不同面积痂壳形成, 坏死区域稳

定, 存活与坏死界限较清楚, 天然水蛭素凝胶组皮瓣坏死面积明显小于其余2组($P < 0.05$), 掀开皮瓣后可见天然水蛭素凝胶组较生理盐水组、空白凝胶基质组皮下新生血管增多, 见图3。



2.3 皮瓣存活率测定 天然水蛭素凝胶组皮瓣存活率高于生理盐水组、空白凝胶基质组($P < 0.05$), 空白凝胶基质组皮瓣存活率略高于天然水蛭素凝胶组, 但其差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表2。

表 2 各组 Wistar 大鼠随意皮瓣存活率

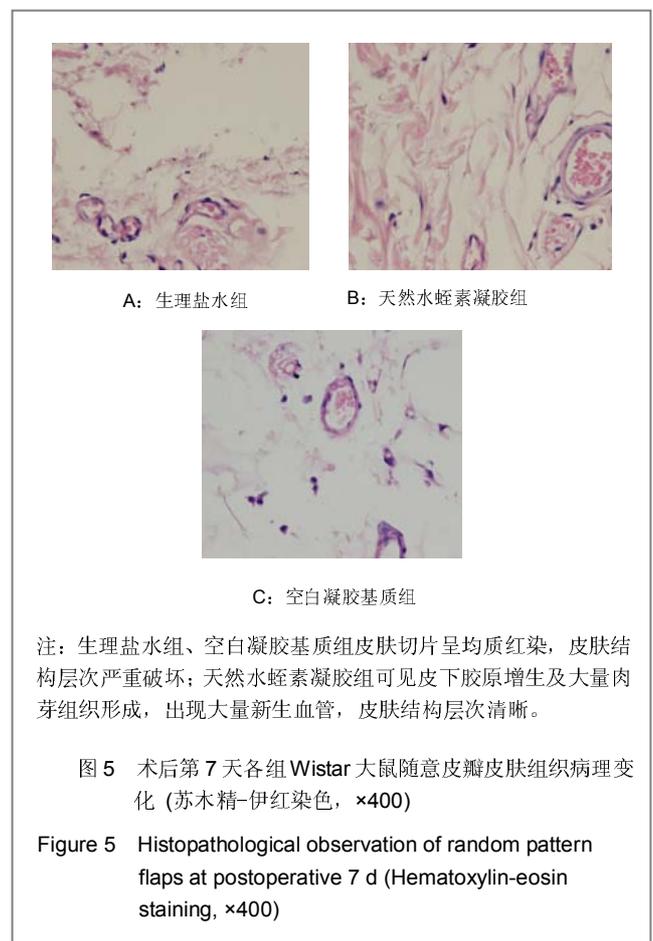
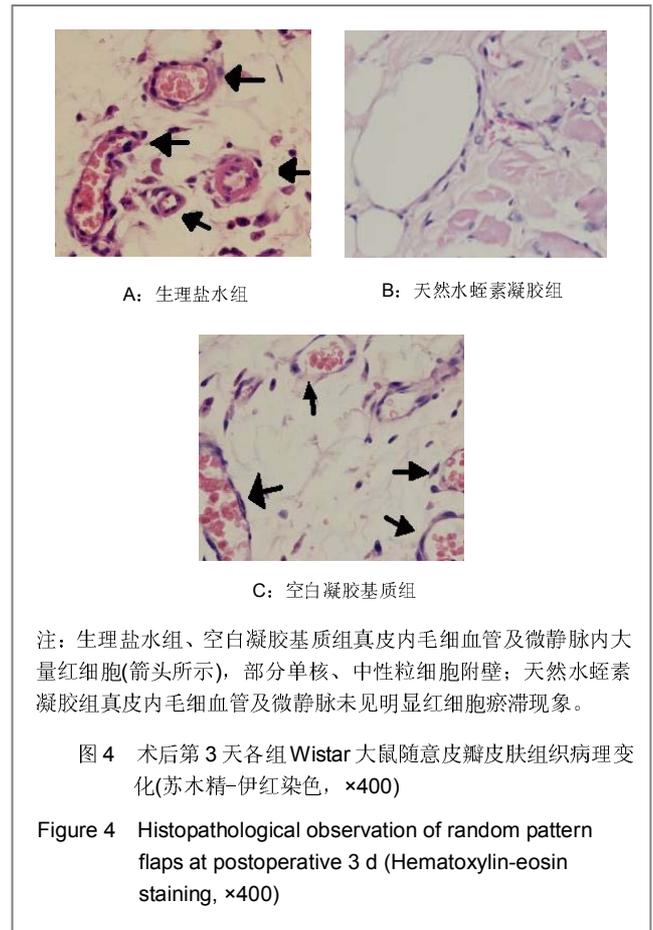
Table 2 Survival rate of the random pattern flap in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	坏死面积(cm^2)	皮瓣面积(cm^2)	存活率(%)
生理盐水组	6.42±0.91	27	76.22±3.36
天然水蛭素凝胶组	2.52±0.65	27	90.66±2.41 ^a
空白凝胶基质组	5.79±0.79	27	78.56±2.91

与其他组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 天然水蛭素凝胶对大鼠随意皮瓣有改善作用。

2.4 组织学观察 见图4, 5。



术后3 d, 镜下观见皮肤结构清晰, 生理盐水组、空白凝胶基质组真皮内毛细血管及微静脉内大量红细胞, 部分单核、中性粒细胞附壁; 天然水蛭素凝胶组真皮内毛细血管及微静脉未见明显红细胞瘀滞现象。术后7 d, 生理盐水组、空白凝胶基质组皮肤切片呈均质红染, 皮肤结构层次严重破坏, 无正常细胞结构, 表皮角质层走行不连续且基底层结构不明显; 天然水蛭素凝胶组可见皮下胶原增生及大量肉芽组织形成, 出现大量新生血管, 皮肤结构层次清晰。

3 讨论 Discussion

各种皮瓣在整形、修复重建及显微外科等领域已成为修复和再造的常用手段, 但静脉回流障碍导致的静脉瘀血是其术后常见的并发症之一, 是引起皮瓣等组织坏死的主要原因^[11-14]。水蛭疗法已成为救治静脉瘀血并发症的标准疗法^[15], 但活体水蛭价格昂贵, 在紧急状况下不易获得, 同时会受地域、气候等限制。而注射用天然水蛭素存在一些不良因素, 如注射不均匀, 代谢过快, 治疗时需多次注射才能达到效果等, 因此, 寻求一种安全、有效的给药方式势在必行^[16]。

水蛭素是目前已知最有效和安全的凝血酶抑制剂^[17-27]。已有研究表明, 水蛭素外用可治疗中轻度的瘀伤^[28-29]。课题组的前期研究更深入的研究了水蛭素的作用机制, 孙智勇等^[30-31]应用天然水蛭素对猪随意皮瓣进行治疗, 获得了较好的效果。肖汉、殷国前等^[32-35]通过实验证实, 水蛭素能促进瘀血皮瓣的血管内皮细胞生长因子表达, 可使皮瓣超氧化物歧化酶的含量升高, 而血栓素B₂、丙二醛及内皮素的含量降低, 可以抑制血栓形成, 降低血小板的黏附。上述机制表明天然水蛭素能使移植皮瓣新生血管增多, 炎症细胞减少, 本实验组织学能观察到这一现象, 并且天然水蛭素凝胶组中红细胞聚集现象几乎没有。在3, 7 d的皮瓣大体中可明显观察到天然水蛭素凝胶组皮瓣瘀血范围较生理盐水组、空白凝胶基质组小, 掀开皮瓣后可见新生血管增多, 皮瓣存活率增高($P < 0.05$), 证实了实验所制天然水蛭素凝胶对大鼠随意皮瓣有改善作用。

天然水蛭素是一条单链多肽, 分子质量为7 ku, 呈水溶性, 酸性环境下稳定。实验选用Carbopol 934作为凝胶基质, 对皮肤有良好的亲和性和润湿性, 在本制剂中含水量高于90%, 水分可使角质层水化而促进药物的透皮吸收^[17]。弱碱三乙醇胺作为中和剂, 能较好保护天然水蛭素的活性不被pH影响, 并对皮肤刺激性较小。氮酮作用于皮肤角质层, 加上丙二醇协同作用, 最终将水凝胶中的有效活性成分送入皮下。在课题组的实验中, 已经通过毒理实验证实天然水蛭素凝胶皮肤局部用药对实验动物较为安全。

透皮给药系统可以绕过肝脏的首关效应及胃肠道的破坏, 维持稳定、持久的血药浓度, 相较注射给药能降低药物全身毒性和不良反应, 减少给药次数, 给药方便。但药物经皮吸收必须先通过皮肤屏障, 故先通过体外皮肤渗透试验, 证实凝胶中的天然水蛭素已能顺利渗透进入皮下, 药物进入皮下后, 可在表皮、真皮内形成药物储库, 使药物缓慢释放, 持久地发挥局部药效。而实验设计的天然水蛭素水凝胶在处方设计上除考虑从正常皮肤给药以外, 同时也能通过破损皮肤给药, 凝胶覆盖于伤口上给药的同时起着伤口保护、预防感染的作用, 在预实验中已经证实对破损皮肤无刺激性。

综上所述, 实验表明天然水蛭素水凝胶同样可减轻大鼠随意皮瓣的瘀血, 同时能促进血管生成, 提高皮瓣存活率。但本实验所制水凝胶透皮效率较低, 实验选用动物与人类皮肤解剖有较大差异, 尚待进一步优化研究。

作者贡献: 实验设计为韦淑怡, 实验实施为韦淑怡、韩志强, 实验评估为殷国前, 资料收集为潘新元、林博杰。韦淑怡成文, 殷国前校审, 韦淑怡为文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 天然水蛭素—是水蛭及其唾液腺中已提取出多种活性成分中活性最显著的小分子蛋白质, 具有抗凝、抗血栓等药理作用, 是迄今为止所发现最强的凝血酶天然特异抑制剂。与重组水蛭素相比, 天然水蛭素活性更强。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 许文玉, 王伟, 刘蕾, 等. 慢性心肌缺血瘀证模型小型猪TXB₂、6-K-PGF₁ α与心功能的变化及其相关性研究[J]. 吉林中医药, 2008, 28(1): 62-64.
- [2] 李辰佳, 冯梅, 张庆元, 等. 不同阿司匹林抵抗类型脑梗死患者血栓素B₂与6-酮-前列腺素的检测及其意义[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(11): 1811-1813.
- [3] 包承鑫. 血小板功能检测及其临床应用[J]. 血栓与止血学, 2009, 15(4): 189-192.
- [4] 杨晓楠, 殷国前. 活体水蛭吸血疗法救治皮瓣静脉淤血一例[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(11): 1129.
- [5] Kvist S, Min GS, Siddall ME. Diversity and selective pressures of anticoagulants in three medicinal leeches (Hirudinida: Hirudinidae, Macrobellidae). *Ecol Evol.* 2013; 3(4): 918-933.
- [6] 林丁盛, 郑鑫, 李志杰, 等. 水蛭素对大鼠随意型皮瓣存活的影响[J]. 中华整形外科杂志, 2011, 27(1): 35-39.

- [7] 王春艳,童庭辉,韩寅,等.低分子肝素和重组水蛭素对兔耳静脉淤血皮瓣成活的影响[J].中国组织工程研究,2012,16(18):3329-3332.
- [8] Taneja P, Rowson J.National survey of the use and application of leeches in oral and maxillofacial surgery in the United Kingdom.Br J Oral Maxillofac Surg. 2011;49(6):438-441.
- [9] Orevi M, Rigbi M, Hy-Am E,et al.A potent inhibitor of platelet activating factor from the saliva of the leech Hirudo medicinalis.Prostaglandins. 1992;43(5):483-495.
- [10] Markwardt F.Hirudin as an inhibitor of thrombin naturally occurring activators and inhibitors.Methods Enzymology. 1970; 19:924-930.
- [11] Porshinsky BS, Saha S, Grossman MD,et al.Clinical uses of the medicinal leech: a practical review.J Postgrad Med. 2011; 57(1):65-71.
- [12] Lemonas P, Hussain MA, Edwards D. Letter: Leeches as a cost-effective measure in plastic and reconstructive surgery. Int Wound J. 2011;8(2):212-213.
- [13] Guo-Qian Y, Gang W, Zhi-Yong S.Investigation on the microcirculation effect of local application of natural hirudin on porcine random skin flap venous congestion.Cell Biochem Biophys. 2012;62(1):141-146.
- [14] Koch CA, Olsen SM, Moore EJ.Use of the medicinal leech for salvage of venous congested microvascular free flaps of the head and neck.Am J Otolaryngol. 2012;33(1):26-30.
- [15] Gröbe A, Michalsen A, Hanken H,et al.Leech therapy in reconstructive maxillofacial surgery.J Oral Maxillofac Surg. 2012;70(1):221-227.
- [16] Zhao H, Shi Q, Sun ZY,et al.Effect of natural hirudin on random pattern skin flap survival in a porcine model.J Int Med Res. 2012;40(6):2267-2273.
- [17] 奚炜,胡晋红,朱全刚,等.正交设计法优化巴布剂基质处方[J].药学服务与研究,2004,4(1):80-82.
- [18] Zaidi SM, Jameel SS, Zaman F,et al.A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches.Altern Med Rev. 2011;16(1):59-65.
- [19] Greinacher A, Warkentin TE.The direct thrombin inhibitor hirudin.Thromb Haemost. 2008;99(5):819-829.
- [20] 滕磊,白秀萍.水蛭素对实验大鼠血流变学的影响[J].血栓与止血学,2012,18(4):179-181.
- [21] 廖毅,童庭辉,王太平,等.局部应用重组水蛭素对家兔耳静脉淤血皮瓣成活的影响[J].中华烧伤杂志,2011,27(3):215-217.
- [22] 廖毅,王太平,童庭辉.局部应用重组水蛭素对兔耳静脉淤血皮瓣存活的影响[J].中国烧伤创疡杂志,2011,23(2):160-163.
- [23] 刘在贵,方方敏.早期应用水蛭素治疗脑出血的临床研究[J].临床荟萃,2010,25(15):1311-1313.
- [24] 黎明,张荣军,曹国宪,等.水蛭素对凝血过程中凝血酶活化的纤溶抑制物的影响[J].中华血液学杂志,2006,27(3):201-203.
- [25] 芦峰,许强,张博,等.中药水蛭素对微循环及体液免疫的影响[J].医学研究杂志,2011,40(12): 47-49.
- [26] 陈伟华,玉光哲,尚勇.局部应用水蛭素对扩张皮瓣静脉淤血的防治[J].中国实用美容整形外科杂志,2005,16(5)313-315.
- [27] 郁琴,宋后燕.水蛭素在深静脉血栓治疗中的作用[J].中国心血管病研究杂志,2005,3(5):392-394.
- [28] Stamenova PK, Marchetti T, Simeonov I. Efficacy and safety of topical hirudin (Hirudex): a double-blind, placebo-controlled study.Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2001;5(2):37-42.
- [29] Whitaker IS, Izadi D, Oliver DW,et al.Hirudo Medicinalis and the plastic surgeon.Br J Plast Surg. 2004;57(4):348-353.
- [30] 孙智勇.天然水蛭素对猪随意型皮瓣静脉淤血影响的实验研究[D].南宁:广西医科大学,2009.
- [31] 孙智勇,王刚,杨晓楠,等.天然水蛭素对猪随意型皮瓣静脉淤血影响的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(11): 1296-1300.
- [32] 肖汉,殷国前,郭应信,等.天然及重组水蛭素对大鼠随意皮瓣中ET和TXB2的影响[J].中国美容整形外科杂志,2010,21(10):633-636.
- [33] 郭应信,殷国前,李佳荃,等.天然、重组水蛭素对随意皮瓣淤血模型血管内皮细胞生长因子的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(7):1210-1214.
- [34] Ying-Xin G, Guo-Qian Y, Jia-Quan L,et al.Effects of natural and recombinant hirudin on superoxide dismutase, malondialdehyde and endothelin levels in a random pattern skin flap model.J Hand Surg Eur Vol. 2012;37(1):42-49.
- [35] Guo-Qian Y, Gang W, Zhi-Yong S.Investigation on the microcirculation effect of local application of natural hirudin on porcine random skin flap venous congestion.Cell Biochem Biophys. 2012;62(1):141-146.

● 关于临床注册

SCI 数据库收录的高血压类杂志对临床试验注册的要求

● *Clinical And Experimental Hypertension* (《临床与实验高血压》), SCI 收录杂志, ISSN: 1064-1963, 2012年影响因子1.276。主要发表研究原著。

● *Hypertension In Pregnancy* (《妊娠期高血压》), SCI收录杂志, ISSN: 1064-1955,

2012年影响因子0.928。主要发表研究原著, 临床试验, 综述, 社论等类型稿件。

对临床试验注册的要求:《临床与实验高血压》与《妊娠期高血压》杂志的出版商Informa Healthcare 均要求临床试验在公开资源库中进行临床试验注册作为出版的必要条件。临床试验要在试验起步时或患者招募之前进行注

册。临床试验注册号要写在稿件摘要方法部分。临床试验注册必须由免费向公众开放, 对所有前瞻性研究公开注册, 并有非盈利为目的的组织管理。满足这些条件的注册平台列表请参见世界卫生组织国际临床试验注册平台(ICTRP)。这项要求是根据国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)指南而定的。