

大鼠背部超长原位回植皮瓣成活: 人参皂甙Rb1影响的验证★

曹 畅, 李 棋, 岑 瑛

Effect of ginsenoside rb1 on survival of dorsal random-pattern skin flap with large length-to-width ratio in rats

Cao Chang, Li Qi, Cen Ying

Abstract

BACKGROUND: Ginsenoside Rb1 has been extensively used in the protection and treatment of heart, encephalon, lung, kidney and liver damage. However, its application in skin flap is rare.

OBJECTIVE: To investigate the effects of intraperitoneal injection of ginsenoside Rb1 on the survival of the dorsal random-pattern skin flap with large length-to-width ratio in rats.

METHODS: Healthy adult SD rats were randomly divided into experimental and control groups. A caudally based dorsal random pattern skin flap, 80 mm×20 mm (length: width = 4: 1), was symmetrically made. Ginsenoside Rb1 (2 mg/kg) was intraperitoneally injected into the experimental group rats, and the same volume of normal saline was injected into the control group. Malonyl dialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) level of the flaps were tested 1 day after operation; the amount of viable tissues of the flaps were examined by planimetry 10 days after operation. Specimens from the proximal, middle and distal flaps were harvested for HE staining to examine the microstructure.

RESULTS AND CONCLUSION: At the first day after operation, NO level was higher in the experimental group than the control group ($P < 0.01$), while MDA level was lower than the control group ($P < 0.01$). At the 10th day after operation, the survival rate of the flap was significantly greater in the experimental group than the control group ($P < 0.001$). Histological observation showed that compared with the control group, the edema and inflammatory cells infiltration were less, while the fiber hyperplasia and the microvascular growth were more obvious in the experimental group. Results show that intraperitoneal injection of ginsenoside Rb1 can enhance the blood supply of the flaps and improve the survival of the random-pattern skin flaps with large length-to-width ratio in rats. This may involve its effects of improving NO activity, decreasing lipid peroxidation, and promoting angiogenesis of skin flaps.

Cao C, Li Q, Cen Y. Effect of ginsenoside rb1 on survival of dorsal random-pattern skin flap with large length-to-width ratio in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(18): 3339-3342.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 国内外将人参皂甙 Rb1 应用于心、脑、肺、肾及肝损害的保护与治疗的报道较多,但是将人参皂甙 Rb1 用于皮瓣的研究还未见报道。

目的: 观察腹腔注射人参皂甙 Rb1 对大鼠背部超长宽比例随意皮瓣成活的影响。

方法: 将健康成年 SD 大鼠以数字表法随机分为实验组及对照组。于大鼠背部设计制备蒂部在尾部的超长皮瓣 80 mm×20 mm(长宽比 4:1),原位回植。术中即刻、术后第 1~5 天腹腔注射 2 mg/kg 人参皂甙 Rb1 生理盐水溶液,对照组腹腔注射等量生理盐水。术后 1 d 取材测定皮瓣一氧化氮和丙二醛含量,术后 10 d 测定皮瓣存活率,取皮瓣近、中、远段行苏木精-伊红染色观察。

结果与结论: 术后 1 d 实验组皮瓣一氧化氮含量高于对照组($P < 0.01$),丙二醛含量低于对照组($P < 0.01$)。术后 10 d,实验组皮瓣成活率明显高于对照组($P < 0.001$)。组织学观察显示,实验组水肿及炎性细胞浸润较对照组明显减轻,纤维增生较对照组明显。结果提示围手术期腹腔注射人参皂甙 Rb1 能明显改善大鼠皮瓣血供,提高皮瓣的成活面积和成活率,其作用机制可能与促进内皮细胞分泌释放 NO、清除氧自由基、降低脂质过氧化产物、促进皮瓣血管新生有关。

关键词: 人参皂甙 Rb1; 超长皮瓣; 血管新生; 一氧化氮; 丙二醛

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.18.026

曹畅,李棋,岑瑛.大鼠背部超长原位回植皮瓣成活:人参皂甙 Rb1 影响的验证[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(18):3339-3342. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在整形重建外科中,随意皮瓣因其使用方便和灵活,被广泛应用于组织缺损的修复和重建。但由于随意皮瓣内没有知名的血管,皮瓣坏死是常见的并发症,也是修复重建的主要障碍。皮瓣制备过程中缺血再灌注损伤是引起皮瓣坏死的重要原因之一^[1]。近年来的研究表明,

人参皂甙Rb1对促进心、脑等器官缺血损伤后血管再生、组织修复有显著作用,能明显改善器官功能。目前,国内外关于人参皂甙Rb1的研究报道较多,已经广泛用于心、脑、肺、肾及肝损害及创面的保护与治疗^[2-11],但是将人参皂甙Rb1用于皮瓣的研究还未见报道。本实验通过对大鼠腹腔注射人参皂甙Rb1观察其对于背部超长宽比例随意皮瓣成活的影响,并初步探讨其作用机制。

Department of Burn and Plastic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Cao Chang★, Studying for master's degree, Physician, Department of Burn and Plastic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
viviennecao@yahoo.cn

Correspondence to: Cen Ying, Professor, Department of Burn and Plastic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Received:2009-12-01
Accepted:2010-01-31

四川大学华西医院烧伤整形科,四川省成都市610041

曹 畅★,女,1982 年生,四川省绵阳市人,汉族,四川大学烧伤整形在读硕士,医师,主要从事创面修复及瘢痕防治研究。
viviennecao@yahoo.cn

通讯作者:岑瑛,教授,四川大学华西医院烧伤整形科,四川省成都市610041

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)18-03339-04

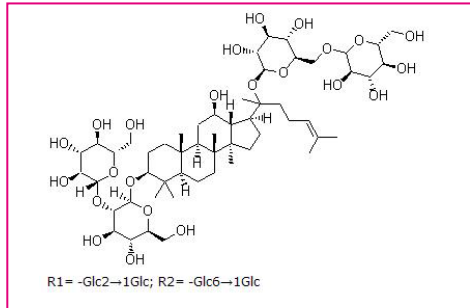
收稿日期:2009-12-01
修回日期:2010-01-31
(20091201012/
GW·A)

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2008-09/11在四川大学完成。

材料: 健康成年SD大鼠32只, 雌雄不拘, 体质量250~300 g, 由四川大学华西医院实验动物中心提供。人参皂甙Rb1购自成都思科华生物制品公司, 其结构式为:



使用前用前与生理盐水按1 mg : 5 mL配成混悬液。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
丙二醛试剂盒、一氧化氮试剂盒、蛋白定量检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
Astra4700 扫描仪	台北力广科技股份有限公司
BX51 光学显微镜、图像采集系统	Olympus 公司,日本

实验方法: 将大鼠以数字表法随机分为实验组和对照组, 每组16只, 适应性喂养1周后, 用10%硫化钠脱毛, 范围约30 mm×90 mm, 温水清洗。术前禁饮食12 h, 以3%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉。将大鼠固定后, 在背部设计蒂部在尾部的超长皮瓣80 mm×20 mm(长宽比4:1), 沿设计线切开, 在肉膜深层与深筋膜之间作锐性分离, 掀起皮瓣, 注意识别两侧及基底的3组血管及其分支(胸外侧动脉、肋间后动脉、旋髂深动脉), 并切断结扎, 以保证是随意皮瓣, 随后以3-0 丝线原位回植。术后即刻及术后1 d腹腔注射青霉素钠20万U预防感染。人参皂甙Rb1用前与生理盐水按1 mg : 5 mL配成混悬液, 实验组术中即刻、术后第1~5天腹腔注射2 mg/kg人参皂甙Rb1生理盐水溶液, 对照组腹腔注射等量生理盐水。术后1 d及术后10 d分别取材。

检测指标:

一氧化氮和丙二醛含量测定: 术后1 d每组随机抽取8只大鼠, 断颈法处死, 取皮瓣中心(对角线交点为圆心)直径1 cm的圆形全层皮瓣, 称质量后用超声匀浆机制成10%匀浆液, 取上清液, 按照一氧化氮和丙二醛检测试剂盒说明书检测皮瓣一氧化氮和丙二醛含量。

大体观察: 术后观察大鼠是否存活, 每天观察皮瓣

的色泽、弹性、坏死范围等情况。术后10 d每组各取剩余8只大鼠, 麻醉后展平背部, 扫描仪扫描皮瓣, 用Image-Pro6.0软件分析系统计算皮瓣坏死面积、成活面积和总面积。

$$\text{成活率} = \frac{\text{成活面积}}{\text{总面积}} \times 100\%$$

组织学观察: 术后10 d皮瓣扫描后处死所有大鼠, 于皮瓣中轴线上距离蒂2, 4, 6 cm处取皮瓣全层, 用体积分数10%甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色。在20×10倍光镜下观察组织细胞水肿、炎细胞浸润、毛细血管增生等情况。

主要观察指标: 术后第1天皮瓣一氧化氮和丙二醛含量, 术后第10天皮瓣存活率及苏木精-伊红染色。

设计、实施、评估者: 均为本文作者, 均经过正规实验培训。

统计学分析: 两组大鼠皮瓣组织中皮瓣成活率、一氧化氮和丙二醛含量, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 11.5统计软件包进行两组独立样本均数比较的t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。统计学处理由公共卫生学院相关专业人员完成。

2 结果

2.1 大体观察 实验过程中大鼠均存活至实验完成, 无意外死亡。术后2 d开始, 两组皮瓣远端出现不同程度及不同范围变紫或深红区域, 并逐渐扩大; 术后7 d开始, 两组皮瓣远端变黑坏死的范围及程度趋于稳定, 并出现不同程度皱缩; 术后8~10 d皮瓣远端坏死情况无明显变化。与对照组相比, 实验组变黑坏死区域较小, 见图1。



A: Experimental group; B: Control group

Figure 1 General observation of flaps 10 days after operation
图1 术后10 d 皮瓣大体观察

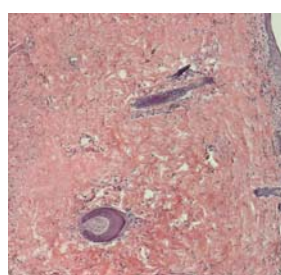
术后10 d, 实验组皮瓣成活率为(65.82±6.34)%, 对照组为(51.25±5.38)%, 差异有显著性意义($P < 0.001$)。

2.2 一氧化氮和丙二醛含量测定 术后10 d实验组皮

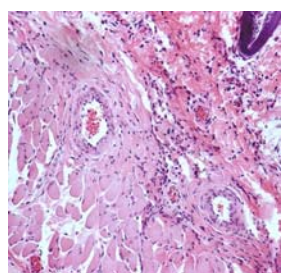
瓣一氧化氮为 (7.792 ± 0.385) U/mg, 高于对照组的 (1.856 ± 0.343) U/mg ($P < 0.01$); 丙二醛含量为 (4.963 ± 0.276) $\mu\text{mol/g}$, 低于对照组的 (7.368 ± 0.219) $\mu\text{mol/g}$ ($P < 0.01$), 两组比较差异均有非常显著性意义。

2.3 皮瓣组织学观察结果

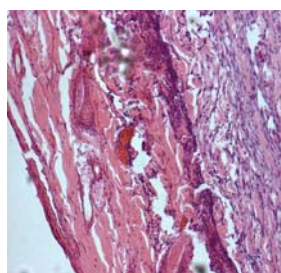
实验组: 皮瓣近段表皮完整, 真皮和皮下组织无明显炎性浸润及水肿, 皮下纤维增生明显(图2a)。中段表皮萎缩不明显, 轻度皮下组织水肿及炎性细胞浸润, 大量毛细血管增生, 皮下纤维组织可见增生(图2b)。远段皮肤全层坏死, 为焦痂改变, 组织结构崩解; 皮下明显水肿, 大量炎性细胞浸润, 肉膜层基本完整(图2c)。



a: Proximal flap



b: Middle flap

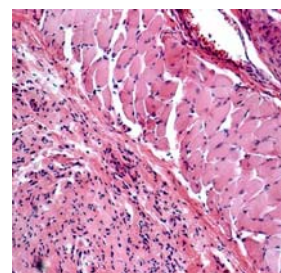


c: Distal flap

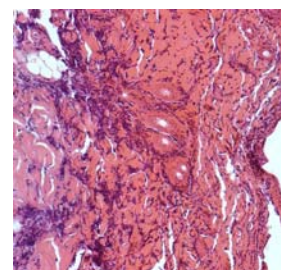
Figure 2 Histological observation of flaps in the experimental group 10 days after operation (HE staining, $\times 200$)

图2 术后10 d 实验组皮瓣组织学观察(苏木精-伊红, $\times 200$)

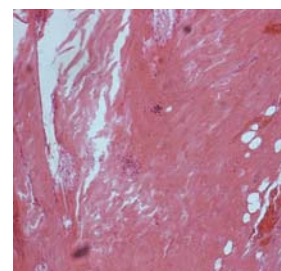
对照组: 皮瓣近段表皮完整, 皮下轻度水肿及炎性浸润, 皮下纤维有增生(图3a)。中段表皮明显萎缩, 明显皮下组织水肿及炎性细胞浸润, 可见毛细血管增生, 皮下纤维无明显增生(图3b)。远段皮肤全层坏死, 为焦痂改变, 组织结构崩解; 皮下弥漫炎性浸润, 可见少量残存肉膜层组织(图3c)。



a: Proximal flap



b: Middle flap



c: Distal flap

Figure 3 Histological observation of flaps in the control group 10 days after operation (HE staining, $\times 200$)

图3 术后10 d 对照组皮瓣组织学观察(苏木精-伊红, $\times 200$)

3 讨论

通常情况下, 随意皮瓣长宽比例一般不能超过2:1(头面部不能超过3:1)^[12]。如果其长宽比例过大, 皮瓣容易发生远端坏死, 影响效果甚至导致手术失败。中医认为“气血相关”“行气通脉”“补气活血”“脉者血之府也”, 因此, 有行活血作用的中药可能具有促进血管生成作用^[2], 并可改善微循环^[13], 这为中药促血管生成作用奠定了理论基础, 并已经得到了应用。人参皂甙Rb1为中国著名传统中药人参的提取物, 药物安全性高, 耐受性好, 临床上应用广泛, 其促血管生成、抑制缺血再灌注损伤作用主要包括以下方面: 抗氧自由基作用; 增加NO合成及释放作用^[14]; 促进血管内皮生长因子表达以促进侧支血管生成^[2]; 抑制白细胞黏附因子CD11b和CD18表达增加以抗血栓形成等^[15-16]。本实验重点研究其抗氧自由基作用和增加NO合成及释放作用。

皮瓣坏死是缺血再灌注损伤的结果, 内皮细胞功能失调是缺血再灌注损伤的病理生理基础。缺氧复氧诱导内皮细胞凋亡, 加重内皮细胞损伤, 其机制是氧

自由基参与皮瓣的缺血损伤过程,使生物膜中的多不饱和脂肪酸过氧化,产生脂质过氧化物,脂质过氧化物可以与邻近的多不饱和脂肪酸发生连锁反应,形成一系列的脂质自由基及其降解产物丙二醛,引起膜流动性、通透性和完整性破坏,进而使其双层结构发生断裂,破坏细胞膜^[17]。人参皂甙Rb1能够有效地对抗氧自由基对内皮细胞增殖的抑制作用,保护细胞免于损伤和死亡^[18],其机制可能与保护细胞的线粒体,提高细胞抗氧化酶活性有关。而抑制内皮细胞凋亡有助于防治内皮细胞功能损伤,改变缺血再灌注损伤的早期病理变化,起到内皮细胞保护效应。实验发现实验组大鼠背部超长宽比例随意皮瓣成活率较对照组高,测试MDA含量显著低于对照组($P < 0.01$),说明人参皂甙Rb1能够减轻皮瓣缺血再灌注损伤中的过氧化反应,促进皮瓣成活。

NO能抑制中性粒细胞、巨噬细胞释放氧自由基及溶酶体酶。当血管内皮功能障碍时其合成减少,活性降低,抗炎、扩血管、抗血小板等作用减退。实验证明人参皂甙Rb1可促进内皮细胞分泌释放NO,抑制转化生长因子 $\beta 1$ 引起血管舒张和阻断氧自由基损伤,增强其抗血管内皮炎症作用^[14, 19-20]。本实验发现实验组大鼠背部超长宽比例随意皮瓣中测得NO水平高于对照组($P < 0.01$),说明当皮瓣血管内皮损伤时,人参皂甙Rb1可有效提高皮瓣NO含量,保护内皮细胞,促进血管修复及新生。

因此,作者认为围手术期大鼠腹腔注射人参皂甙Rb1能改善皮瓣的血供,提高皮瓣的成活面积和成活率。其作用机制可能与促进内皮细胞分泌释放NO、清除氧自由基、降低脂质过氧化产物、促进皮瓣血管新生有关。

4 参考文献

- [1] Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, et al. The role of oxygen radical in ischemic tissue injury in island skin flaps. Ann Surg.1983; 198(1): 87-90.
- [2] Liu YF, Liu SW, Liu ZX. Zhongguo Zuzhi Huaxue yu Xibao Huaxue Zazhi.2008; 17(1): 39-44.
刘咏芳, 刘少文, 刘正湘. 人参皂甙Rb1对大鼠心肌缺血再灌注后血管再生的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(1): 39-44.
- [3] Geng Q, Wu D, Zhang BG. Shanxi Yike Daxue Xuebao.2005; 36(3): 310-312.
耿庆, 乌达, 张本固. 人参皂甙Rb1对离体肺缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 山西医科大学学报, 2005, 36(3): 310-312.
- [4] Huang XG, Shao S, Li RS. Linchuang Yiyao Shijian.2006; 15(8): 579-581.
黄晓光, 邵珊, 李荣山. 人参皂甙Rb1对大鼠急性肾小管损伤的保护作用[J]. 临床医药实践, 2006, 15(8): 579-581.
- [5] Yang CX, Liu JX, Sun ZL, et al. Sichuan Daxue Xuebao: Yixueban. 2008; 39(2): 214-217.
杨朝祥, 刘军祥, 孙珠蕾, 等. 人参皂甙Rb1对大鼠脑缺血再灌注时神经元凋亡及Bcl-2和Bax表达的影响[J]. 四川大学学报: 医学版, 2008, 39(2): 214-217.
- [6] Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, et al. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. Br J Pharmacol.2006; 148(6): 860-870.
- [7] Ke LN, Wang W, Zhao XZ, et al. Shanxi Yike Daxue Xuebao.2009; 40(8): 688-692.
柯荔宁, 王伟, 赵小贞, 等. 人参皂甙Rb1抗SD大鼠海马神经元的缺氧损伤作用[J]. 山西医科大学学报, 2009, 40(8): 688-692.
- [8] Tang N, Wen Z, Zhang J. Jiangxi Yixueyuan Xuebao.2006; 46(4): 24-27.
唐宁, 文珠, 张进. 人参皂甙Rb1黄芩抗大鼠大脑皮层神经细胞缺氧性凋亡研究[J]. 江西医学院学报, 2006, 46(4): 24-27.

- [9] Xie XS, Liu HC, Yang M, et al. Ginsenoside Rb1, a Panoxadiol Saponin against Oxidative Damage and Rental Interstitial Fibrosis in Rats with Unilateral Ureteral Obstruction. Chin J Integr Med. 2009; 15(2): 133-140.
- [10] Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 on calcineurin signal pathway in cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F2alpha. Acta Pharmacol Sin.2007; 28(8): 1149-1154.
- [11] Jiang QS, Huang XN, Dai ZK, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 on cardiac hypertrophy induced by monocrotaline in rat. J Ethnopharmacol. 2007; 111(3): 567-572.
- [12] Xing X. Shenyang: Liaoning Kexue Jishu Chubanshe. 2004: 2-3.
邢新. 皮瓣移植实例彩色图谱[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2004: 2-3.
- [13] Qiu X, Hong T, Meng Q, et al. Jilin Daxue Xuebao: Yixueban. 2009; 35(2): 314-317.
邱雪, 洪铁, 孟勤, 等. 人参皂甙单体Rb1、Re及Rg1对肾上腺素所致小鼠耳廓微循环障碍的改善作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2009, 35(2): 314-317.
- [14] Chen HX, Xie W. Linchuang Xueyexue Zazhi. 2009; 22(11): 603-605.
陈红霞, 谢薇. 人参皂甙Rb1对白消安干预人脐静脉内皮细胞一氧化氮合成及转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(11): 603-605.
- [15] Sun K, Wang CS, Guo J, et al. Effect of Panax notoginseng saponins on lipopolysaccharide-induced adhesion of leukocytes in rat mesenteric venules. Clin Hemorheol Microcirc. 2006; 34(1-2): 103-108.
- [16] Sun K, Wang CS, Cuo J, et al. Protective effects of ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, and notoginsenoside R1 on lipopolysaccharide-induced microcirculatory disturbance in rat mesentery. Life Sci. 2007; 81(6): 509-518.
- [17] Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol. 2002; 282: C227-C241.
- [18] Liu M, Zhang J. Effects of ginsenoside Rb1 and Rg1 on synaptosomal free calcium level, ATPase and calmodulin in rat hippocampus. Chin Med J (Eng J). 1995; 108(7): 544.
- [19] Yu J, Eto M, Akishita M, et al. Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb1 in human aortic endothelial cells: A possible involvement of androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 353(3): 764-769.
- [20] Xie W, Xia LH, Fang J, et al. Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi. 2007; 29(9): 1225-1228.
谢薇, 夏凌辉, 方峻, 等. 人参皂甙Rb1对人脐静脉内皮细胞一氧化氮释放和TGF- $\beta 1$ 表达的影响及意义[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 29(9): 1225-1228.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突。

课题的创新点: 人参皂甙 Rb1 已广泛用于心、肝、脑、肾、肺等重要脏器损害的保护治疗, 尚未有学者将其用于皮瓣缺血再灌注损伤; 皮瓣缺血再灌注损伤如能有效控制, 将为整形外科提供更大的手术空间; 人参为重要的中药, 近年对其研究较为热门, 尤其是对其不同成分分别的作用进行了深入研究, 使其单一成分能够最大限度发挥作用。中医药作为中国国粹, 值得研究推广, 尤其用于外科领域更为创新。

课题评估的“金标准”: 实验中大鼠超长皮瓣制备、NO、丙二醛测定方式及皮瓣扫描测量坏死面积的方法均为公认方法及标准。

设计或课题的偏倚与不足: 未能探讨药物作用的量效关系, 药物注射在大鼠体内的药代动力学尚不清楚。

提供临床借鉴的价值: 人参皂甙 Rb1 已广泛用于心肝肾脑肺等重要脏器损害的保护治疗, 如果能用于皮瓣缺血再灌注损伤, 将为整形外科提供更大的手术空间; 探讨中药“活血化瘀”的具体机制将推动中医药研究运用的发展。