

B 型肉毒素干预 choke II 区对大鼠跨区皮瓣的影响

李浙峰 周光伟 王 峰 李 悦 徐 东 戴箴言

摘 要 **目的** 研究 B 型肉毒毒素(BTX B)术中干预大鼠背部跨区穿支皮瓣 choke II 区对皮瓣成活的影响。**方法** 在大鼠背部建立三血管体穿支皮瓣模型,50 只 SD 大鼠采用数字表法随机分为实验组(B 型肉毒素组)和对照组(生理盐水组),术后即刻,对实验组皮瓣 choke II 区皮下间隔 0.2mm 均匀注射 100U,总计 1500U(约 0.3ml)BTX B,对照组采用相同剂量生理盐水均匀注射 choke II 区。术后 7 天分别检测两组皮瓣的成活率;用明胶-氧化铅灌注进行皮瓣造影;取蒂部组织做 HE 测蒂部穿支动脉血管管径变化;取 choke II 区域组织做 HE 测微血管数量;取 choke II 区域组织做 RT-PCR 测 VEGF、HIF-1 α 的表达情况。**结果** 术后 7 天,实验组皮瓣的成活面积(90 ± 2.9)% 显著高于对照组(75 ± 3.2)%,差异有统计学意义($P < 0.01$);明胶-氧化铅灌注造影显示实验组 choke 区真性吻合数较对照组明显增多。实验组 choke II 区 VEGF、HIF-1 α 基因表达均明显高于对照组($P < 0.01$)。实验组蒂部穿支动脉管径大于对照组($P < 0.01$),新生血管计数高于对照组($P < 0.05$)。**结论** B 型肉毒毒素可以促进皮瓣 choke 血管扩张及血管新生改善皮瓣血供,从而提高了大鼠背部跨区穿支皮瓣的成活。

关键词 B 型肉毒毒素 穿支皮瓣 Choke 血管 VEGF HIF-1 α

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.01.028

Effect of Intra-operative Injection of BTX B in Choke Zone II on Extended Perforator Flap Survival in a Rodent Model. Li Zhefeng, Zhou Guangwei, Wang Feng, et al. Department of Orthopedics and Traumatology, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of Intra-operative Injection of Botulinum toxin B (BTX B) in Choke zone II on extended perforator flap survival in a rodent model. **Methods** A three-territory flap was elevated based on the cutaneous perforator of deep circumflex iliac vessel on a rat. Fifty SD rats were randomly divided into control group and experimental group. After elevating the flap, BTX B was injected in subcutaneous, every 2mm apart, of choke II zone in the experimental group, while the same volume of saline was administered to the control group. After 7 days, flap survival area and microangiography were appraised. Tissue samples were taken from pedicle zone and choke zone II for histologic study, Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression detection. **Results** 7 days after operation, viability of the skin flaps of experimental group were significantly improved. The number of true anastomosis in choke zones of experimental group was significantly increased. HIF-1 α and VEGF expression in choke zone II of the experimental group were significantly higher than those in the control group. Neovascularization in choke zone II of experimental group were enhanced markedly compared with control group. Perforating artery diameter in pedicle zone of experimental group was dilated obviously compared with control group. **Conclusion** We suggested that Intra-operative injection Choke zone II with BTX B improved skin flap viability and increased angiogenesis and choke vessels vasodilation in rat models.

Key words Botulinum toxin B; Perforator flaps; Choke vessels; VEGF; HIF-1 α

临床上组织瓣移植手术是解决组织缺损和创面长期不愈的有效方法。穿支皮瓣以符合“受区修复重建好,供区破坏损失小”的优点,广泛应用于临床,成为组织缺损修复技术的研究热点^[1,2]。穿支皮瓣仅以管径细小的皮肤穿动脉为蒂取瓣,故其供皮面积往往偏少,以三血管体为例,坏死常发生在潜在区,极

大限制了穿支皮瓣的跨区切取。肉毒毒素(BTX)的应用在近十年发展迅速,以往研究发现 BTX 可以通过扩张血管改善皮瓣组织灌注,同时对皮瓣血管新生也起着重要的作用。而目前皮瓣领域研究较多的集中在 A 型肉毒毒素(BTX A),对 B 型肉毒毒素(BTX B)近来也开始有所研究,BTX B 与 BTX A 结构和功能相似,目前还没有相关报道将 BTX B 局部应用于 choke II 区域以逆转跨区穿支皮瓣潜在区坏死的研究。本研究拟观察 BTX B 术中干预 choke II 区对大鼠背部跨区穿支皮瓣成活的影响,并讨论其作用机制。

基金项目:浙江省温州市科技计划经费自筹项目(Y20160366)

作者单位:325000 温州市中医院骨科

通讯作者:李浙峰,电子信箱:lizhefeng2013@163.com

材料与方法

1. 实验试剂及动物: B 型肉毒毒素: (爱尔兰 Elan 制药公司), 红色氧化铅 Pb_3O_4 (中国上海试剂总厂), RT-PCR 试剂盒 (美国 Thermo 公司), SYBR Green I Master (美国 Roche 公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司)。雄性健康 SD 大鼠 50 只, 由温州医科大学实验动物中心提供, SPF 级, 实验动物许可证号: SCXK (浙) 2005-0019, 体重 200~300g。

2. 实验分组及模型制备: 大鼠随机分为实验组 (B 型肉毒毒素组) 和对照组 (生理盐水组), 各 25 只。皮瓣掀起术后即刻, 实验组在皮瓣 choke II 区均匀皮下间隔 0.2mm 注射 100U, 总计 1500U (约 0.3ml) BTX B, 对照组采用相同剂量生理盐水均匀注射 choke II 区^[3]。所有动物用戊巴比妥钠麻醉 (30mg/kg, 腹腔注射), 采用 Yang 等^[4]大鼠皮瓣制备方法, 在背部以后正中中线为内侧缘, 髂后上棘连线为下界, 肩胛下角为上界, 设计保留一侧髂腰深动脉穿支为蒂的背部三血管体穿支皮瓣, 面积约为 9cm × 3cm 皮瓣。切开皮瓣四周皮肤后, 在深筋膜层面完全游离皮瓣, 在皮瓣掀起后即刻, 按上述方法注射 BTX B 或生理盐水, 然后用 4-0 慕斯线, 原位缝合 (图 1)。手术后 1~3 天, 8 万单位青霉素 G 腹腔注射, 1 次/天。

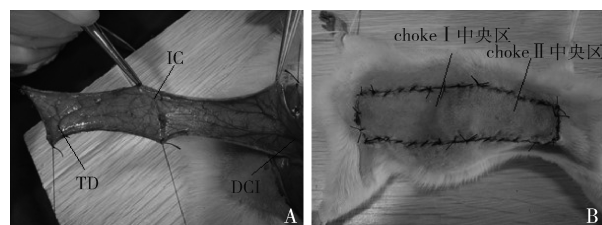


图 1 切取以髂腰动脉穿支为蒂的跨区三血管体穿支皮瓣, 将皮瓣原位缝合, choke I 及 choke II 区中央区用苦味酸标记

A. 切取皮瓣; DCI. 髂腰动脉穿支; IC. 肋间后动脉穿支; TD. 胸背动脉穿支; B. 将皮瓣原位缝合

3. 观察指标: (1) 皮瓣观察及记录皮瓣成活: 术后第 7 天麻醉下数码相机拍摄高质量图片, 导入计算机图像软件 (M2 Image Analysis System) 计算皮瓣成活面积百分比, 即皮瓣成活率。皮瓣坏死标准包括组织回缩、弹性差, 质地坚硬, 切割组织不出血。(2) 明胶-氧化铅血管造影: 分别于术后第 7 天取对照组、实验组各 5 只大鼠, 采用明胶-氧化铅灌注法对大鼠行全身灌注血管造影。麻醉下将 22-规格容量留置针置入大鼠颈总动脉, 放血排尽大鼠体内血液, 注入

1% 肝素 1.5ml, 用 20ml 注射器将配置好的 20ml 明胶-氧化铅混合物 (含明胶 1g、四氧化三铅 20g、蒸馏水 20ml) 注入颈总动脉, 直至大鼠巩膜及四肢末端显现出点状、斑片状红色。然后将灌注后标本置于 4℃ 冰箱冷藏 24h 后, 切取大鼠背部皮瓣, 平铺行 X 线摄影。(3) 实时荧光定量 RT-PCR 测 VEGF、HIF-1 α 表达: 术后第 7 天将大鼠处死, 实验组、对照组各 10 只, 取跨区穿支皮瓣 choke II 区中央区域皮瓣组织。将切取的组织块 (约 100mg) 置于 1ml Trizol 液中, 采用生物匀浆机 (Master Prep, MAK 6075-047 Hichuang bioer, 中国) 匀浆, 按照 Trizol 法提取组织中总 RNA, 采用分光光度计检测 RNA 纯度及浓度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$)。根据浓度取 1 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA, 再进行 PCR 扩增。VEGF 上游引物 5'-CTGCTGTACCTCCACCATGC-3', 下游引物 5'-CTGCTTTGGTGAGGTTTGA-3'; HIF-1 α 上游引物 5'-GATGGCTCCCTTTTCAAGC-3', 下游引物 5'-TTTCTGCTGCCTTGTATGGG-3'; β -actin 上游引物 5'-AGTTGAGGGGACTTCCCAAG-3', 下游引物 5'-CCCTGGGAAAGTCCCTCAACT-3' (由美国 Invitrogen 公司合成)。在无菌去酶的 Eppendorf 管中将配置好的 Real-time PCR 反应液 (反应总体积为 20 μ l) 离心数秒, 混匀后迅速置入 Roche LightCycler[®] 480 实时荧光定量 PCR 仪中, 采用两步法 qRT-PCR 扩增程序: Stage One 预变性 95℃ 5min, Stage two 95℃ 10s, 60℃ 10s, 72℃ 10s, 共 45 个循环, 获得各样本待测基因的 Ct 值, 采用 $\Delta\Delta$ Ct 法进行试验数据处理, 其结果代表目的基因表达的相对定量, 以对照组作为校正样本。(4) 组织学检测: 术后第 7 天取实验组、对照组各 10 只, 切取跨区穿支皮瓣蒂部及 choke II 区中央区域组织, 面积约 3cm × 0.5cm, 以 10% 甲醛溶液固定组织块, 常规脱水包埋, 制成 3~4 μ m 厚的切片并行 HE 染色。术后 7 天在 10 × 10 倍镜下在蒂部区域测量穿支动脉管径, 管径 = (最大横径 + 最大纵径)/2。于 10 × 10 倍视野下, 在 choke II 区中央区域找到微血管密集区, 然后于 20 × 10 倍光镜下随意选取 5 个视野, 计数血管数并取平均值, 计算出单位面积微血管数 (个/平方毫米) 作为评价微血管密度 (MVD) 的指标。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析, GraphPad Prism 5.0 制图, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 检测结果采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 皮瓣大体观察及成活率: 术后第7天, 两组皮瓣远端坏死部分均趋于融合, 手感变硬, 呈干性坏死, 界线清晰(图2)。实验组和对照组背部皮瓣坏死率分别为 $90.0\% \pm 2.9\%$ 和 $75.0\% \pm 3.2\%$, 实验组皮瓣的成活面积显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

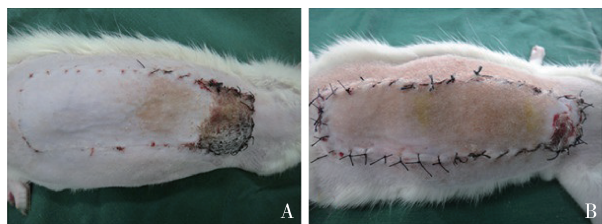


图2 术后7天大鼠背部三血管体穿支皮瓣的成活情况

A. 对照组; B. 实验组

2. 明胶-氧化铅造影: 实验组各血管体区血管结构较为完整, choke I及II区血管结构清晰。在 choke I及II区出现了大量的真性吻合(choke 血管扩张)。远端坏死区域显示胸背动脉穿支入皮点以远仅部分紊乱或消失。对照组明胶-氧化铅造影示 choke I区、choke II区的 choke 血管扩张不显著, 第三血管体区血管结构较为紊乱, 远端坏死区域显示胸背动脉穿支入皮点附近及远端血管结构紊乱或消失(图3)。

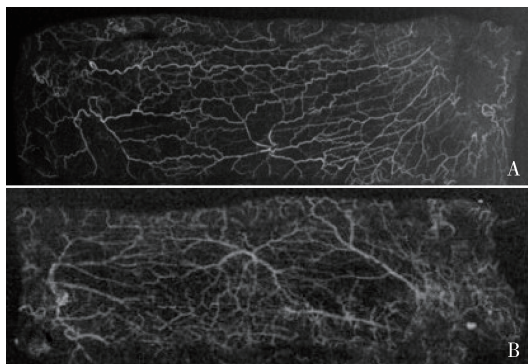


图3 大鼠背部三血管体皮瓣模型动脉造影

A 和 B 分别为实验组及对照组术后7天明胶-氧化铅动脉造影图。

在 choke 区, 实验组 A 较对照组 B 出现了大量的真性吻合(真性吻合为管径变粗的 choke 血管)

3. 实时荧光定量 RT-PCR 测 VEGF、HIF-1 α mRNA 表达: 术后第7天, 实验组 VEGF、HIF-1 α mRNA 表达均较对照组有所提高。实验组 choke II区 VEGF、HIF-1 α mRNA 表达量分别为 2.10 ± 0.56 、 1.98 ± 0.33 , 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图4)。

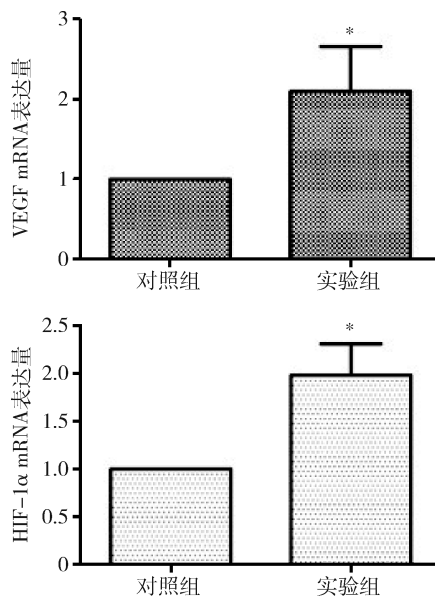


图4 实时荧光定量 RT-PCR 测 choke II 区的 VEGF、HIF-1 α mRNA 表达

实验组与对照组比较, 差异有统计学意义;

与对照组比较, * $P < 0.01$

4. 组织学检测: 两组皮瓣蒂部区的组织形态无明显差异, 实验组穿支动脉的管径较对照组明显增大(图5)。实验组穿支动脉管径及对照组穿支动脉管径分别为 $158.00 \pm 20.12 \mu\text{m}$ 、 $83.33 \pm 12.79 \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在 choke II 区组织中, 实验组及对照组微血管计数增多, 分别为 (43.36 ± 9.11) 个/平方毫米和 (34.16 ± 7.12) 个/平方毫米, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

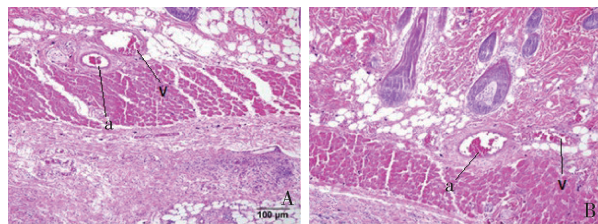


图5 对照组与实验组皮瓣蒂部穿支动脉区组织 HE 染色 ($\times 100$)

A. 对照组穿支动脉(a)及静脉(V);

B. 实验组穿支动脉(a)及静脉(V)

讨 论

以往研究发现跨区穿支皮瓣坏死常常发生在潜在区, 从而在根本上大大限制了跨区穿支皮瓣的扩大切取^[5-8]。与此相反, 动力学区往往都能成活, 可能与 choke 区管径小、血流阻力大有关, 当源动脉供应

血流跨越动力学区至 choke II 区时,减少的血流量已无法满足潜在区组织代谢及成活^[9]。另一方面,血管新生历来被认为与皮瓣成活密切相关。国内外大量的研究显示血管新生参与了皮瓣的成活^[10]。因此采取某种行之有效的方法使这 3 个不同供区之间的吻合血管开放、扩张乃至血管新生,进而通过新建的血液循环体系将 3 个不同的小供区变成一个大供区,可以提高跨区穿支皮瓣的成活率。

BTX 由肉毒杆菌产生,属于多肽,从 A 至 G,有 7 种血清型。BTX 虽然有 7 种不同类型,但结构和功能相似。近来,越来越多的研究证明,BTX 对血管有着不同程度的影响。首先 BTX 可以在神经肌肉连接处抑制乙酰胆碱的释放,通过化学去神经化作用于受交感神经系统支配的血管平滑肌细胞^[11]。其次,BTX 作用于 Rho 激酶,通过影响血管平滑肌细胞对钙离子的敏感度及 NO 系统直接抑制平滑肌细胞的收缩,从而使得血管扩张^[12, 13]。另外,研究发现 BTX A 可以通过减弱自主神经释放去甲肾上腺素来抑制交感神经收缩血管^[14]。因此,BTX 可以通过扩张血管改善皮瓣组织灌注、氧携带量、代谢,最终提高皮瓣的成活率。Park 等^[3]报道吻合大鼠股动静脉术前 3 天将 BTX B 局部注射于股动脉周围,随后分别测量吻合前后股动静脉管径以及血流速度,发现经 BTX B 预处理后诱导了血管扩张,减少了血管阻力,因此血流速度得到明显增加,从而也有效地预防了血栓的形成。笔者的实验中,实验组中皮瓣 choke I 及 choke II 区 choke 血管真性吻合较明显多于对照组,从而改善了皮瓣远端的灌注。Arnold 等^[15]报道,将 BTX A 局部浸润 1 支三血管体皮瓣蒂部血管,结果并未明显提高皮瓣成活率及改善缺血区域,其分析原因可能是 BTX A 保护作用可能在远期,而本实验提示 BTX B 干预后皮瓣成活率明显增加,可能与 BTX B 在早期起效后通过扩张 choke 血管改善了皮瓣血循环。

BTX 对皮瓣血管新生也起着重要的作用。VEGF 在改善皮瓣成活方面,是目前研究最为广泛且最为成功的生物因子^[16]。它是缺氧组织在病理或者生理条件下释放的,是调节血管新生的关键因子^[17]。Patel 等^[18]证实经 BTX A 局部注射预处理后的大鼠腹直肌 (TRAM) 皮瓣中,蒂部血管管径、VEGF、CD31 均有明显提高。Kim 等^[19]同样也报道,经 BTX A 干预后的大鼠背部随意皮瓣组织中,血管管径增加,微血管数量明显增多,一些被认为与血管扩张及血管内皮细胞增生有关的生物分子,如 VEGF、CD31 及 iNOS,含

量也明显提高。随后,Park 等^[20]又报道了经 BTX A 术前预处理后的大鼠 TRAM 皮瓣组织中,CD34、VEGF、HIF-1 α 的含量均有明显提高,认为 BTX A 可能通过 HIF-1 α /VEGF 通路改善了皮瓣血管新生,从而促进了 TRAM 皮瓣的成活率。VEGF 是处于 HIF-1 α 下游序列的靶基因,而 HIF-1 α 是一种可以调节体内氧平衡和血管新生的转录因子,VEGF 的上调作用可能来自 HIF-1 α ^[21]。笔者发现在实验组 choke II 区,HIF-1 α 、VEGF 的表达明显高于对照组,其可能原因是通过对 HIF-1 α 的积累增加了 VEGF 的表达,从而促进了 choke II 区血管新生,进而促进了跨区穿支皮瓣的成活率,但其具体作用机制还有待进一步研究。

本实验同时发现实验组蒂部穿支血管第管径较对照组明显扩张,其原因可能正是由于通过 choke 血管的扩张及 choke II 的血管新生带动了整个皮瓣的血流量的增加,从而反馈性的扩张了蒂部穿支动脉的管径,但需进一步对血流量的改变进行研究。

综上所述,结合本实验数据结果及皮瓣成活情况,应用 B 型肉毒毒素术中干预 choke II 区能有效地刺激大鼠背部跨区穿支皮瓣血管新生,扩张 choke 血管增加皮瓣远端的血流供应量,同时扩张了蒂部穿支动脉,从而降低了跨区穿支皮瓣潜在区的坏死率。

参考文献

- Kroll SS, Rosenfield L. Perforator-based flaps for low posterior mid-line defects[J]. *Plast Reconstruct Surg*, 1988, 81(4):561-566
- Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle[J]. *Bri J Plast Sur*, 1989, 42(6):645-648
- Park BY, Kim HK, Kim WS, *et al.* The effect of botulinum toxin B pretreatment to the blood flow in the microvascular anastomosis[J]. *Ann Plast Surg*, 2014, 72(2):214-219
- Yang D, Morris SF. An extended dorsal island skin flap with multiple vascular territories in the rat: a new skin flap model[J]. *J Surg Res*, 1999, 87(2):164-170
- Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM, *et al.* An anatomic review of the delay phenomenon: I. experimental studies [J]. *Plast Reconstruct Surg*, 1992, 89(3):397-407
- Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, *et al.* An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications [J]. *Plast Reconstruct Surg*, 1992, 89(3):408-416
- Morris SF, Taylor GI. Predicting the survival of experimental skin flaps with a knowledge of the vascular architecture [J]. *Plast Reconstruct Surg*, 1993, 92(7):1352-1361
- Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study [J]. *Plast Reconstruct Surg*, 1995, 95(3):526-533
- Taylor GI, Corlett RJ, Dhar SC, *et al.* The anatomical (angiosome)