

热应激预处理缩短皮管断蒂时间的实验研究

吴建明*, 吴包金, 林子豪, 江 华, 袁湘斌, 赵耀忠, 朱晓海

(第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨热应激预处理对皮管的保护作用以及缩短皮管断蒂时间的可行性。**方法:**以 Labrador 犬为实验对象建立动物模型,行双侧下腹部皮管成形术,分为实验侧和对照侧进行自身对照,术后用红外线热疗仪对实验侧皮管局部加热进行热应激预处理,再分别延迟 0 h、24 h、48 h、72 h、1 周、2 周皮管断蒂,对照侧皮管未经热应激预处理直接断蒂,每一时间段组各 4 只动物,断蒂 7 d 后观测比较两侧皮管存活情况,并用免疫组化 ABC 法观察两侧皮管组织中热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP₇₀) 的相应动态变化。**结果:**实验侧皮管组织内 HSP₇₀ 表达阳性,以热应激预处理后延迟 24 h 及 48 h 断蒂皮管的表达最强,对照侧均呈阴性;24 h、48 h、72 h、1 周和 2 周各时段,热应激预处理侧(实验侧)的皮管存活率大于对照侧,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**热应激预处理对皮管具有保护作用,能够提高皮管断蒂以后的存活率,缩短皮管断蒂时间,其机制可能与热应激预处理后皮管 HSP₇₀ 的诱导合成有关。

[关键词] 热应激预处理;管形皮瓣;热休克蛋白 70

[中图分类号] R 622 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0027-03

Heat stress pretreatment shortening amputation time of tube skin flap in dogs

WU Jian-ming*, WU Bao-jin, LIN Zi-hao, JIANG Hua, YUAN Xiang-bin, ZHAO Yao-zhong, ZHU Xiao-hai (Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the protective effect of heat stress pretreatment on tubal flap and its feasibility to shorten the pedicle amputation time of tubed flap. **Methods:** Twenty-four adult Labrador dogs were selected to establish the animal model with hypogastric tubed skin flaps being prepared below two ventral sides. The experimental lateral tube flaps received heat stress pretreatment before amputating the pedicle at different time points (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 w, 2 w), whereas the pedicles of the control lateral flaps were amputated without heat stress pretreatment. The surviving length of the tube flaps and their HSP₇₀ expression were observed and compared 7 d after pedicle amputation. **Results:** In all experimental tube flap tissues, stress conditioning induced marked HSP₇₀ expression, especially in those of 24 h and 48 h group, while the HSP₇₀ expression in control lateral flaps was negative. There was an overall statistical significant difference of flap survival between the heat stress pretreated flaps (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 w, 2 w) and the controls ($P < 0.05$). **Conclusion:** Heat stress pretreatment plays a protective role in tubed skin flap. It can improve flap survival after pedicle amputation and shorten the amputation time of tubed skin flap, which may be related to HSP₇₀ inducement and synthesis.

[KEY WORDS] heat stress pretreatment; tubed skin flap; heat shock protein 70

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 27-29]

皮管即管形皮瓣,是远位皮瓣移植修复创面、缺损或器官再造时较为常用的皮瓣之一。临床上皮管形成后,一般术后 3 周经血流阻断试验提示皮管蒂部血运良好,足以维持整个皮管的营养代谢,才可行断蒂转移手术。其缺点是需要多次手术方能完成转移的全过程,耗时较长。所以,寻求一种缩短皮管断蒂时间的有效方法成为整形外科领域值得研究的课题。预处理是一类能调动机体内源性抗损伤机制、保护缺血缺氧组织的简单而切实有效的方法,它由 Murry 等^[1]于 1986 年首次提出。1992 年, Koenig 等^[2]研究发现热应激预处理能对皮瓣成活产生积极影响,热应激预处理的大鼠背部随意皮瓣存活长度明显高于对照组,而其对皮管存活的影响迄今尚未

见报道。本研究旨在探讨热应激预处理对皮管的保护作用及其缩短皮管断蒂时间的可行性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 红外线热疗仪,半导体点温计,715 型针型半导体点温计(均系上海医用仪表厂出品)。一抗 HSP₇₀ 单克隆抗体及 ABC 试剂盒由美国 Vector 公司生产。

1.2 动物分组 健康成年 Labrador 犬 24 只,雌雄

[基金项目] 上海市科技发展基金(994119042)。

[作者简介] 吴建明(1963-),男(汉族),硕士,副教授,硕士生导师。现在复旦大学附属华山医院整形外科,上海 200040。

* Corresponding author. E-mail: wujianming63@sohu.com

不拘,体质量 12~15 kg,由第二军医大学实验动物中心提供。根据热应激预处理后皮管延迟断蒂的时间不同分为 0 h(即刻断蒂)、24 h、48 h、72 h、1 周、2 周共 6 组,每组 4 只动物。

1.3 皮管制备 3%戊巴比妥钠腹腔注射(40 mg/kg)麻醉后将犬仰卧位四肢外展固定于手术台,下腹部术区脱毛备皮,常规碘伏消毒,铺无菌巾单。于下腹部右侧腹壁设计长 18 cm、宽约 3 cm 的纵向矩形供瓣区,沿设计线切开长条形皮瓣一侧的皮肤及皮下脂肪达深筋膜,沿深筋膜浅面剥离,直达皮瓣对侧的切口线,在皮瓣两端蒂部各保留一三角区不作剥离。将皮瓣边缘卷向对侧未切开切口线,估计皮管成形后既无张力,又不会形成死腔,切开该侧切口线。确切止血后,皮瓣间断全层缝合形成皮管。供区继发创面直接缝合封闭,蒂部褥式缝合。同法于左侧腹壁相对位置形成另一皮管。术后妥善固定。右侧为实验侧,左侧为对照侧,进行自身对照。

1.4 皮管热应激预处理方法 实验侧皮管术后用红外线热疗仪局部加温进行热应激预处理,升温至皮面温度 42℃,持续 50 min^[3],用半导体皮肤测温计和 715 型针型半导体点温计测控,热应激预处理后分别于延迟 0 h(即刻断蒂)、24 h、48 h、72 h、1 周、2 周行皮管远侧断蒂。对照侧皮管断蒂前未经热应激预处理。

1.5 观察项目

1.5.1 HSP₇₀免疫组化染色 皮管断蒂同时对皮管远端活检组织进行 ABC 法 HSP₇₀ 检测。染色步骤:5 μm 厚冰冻切片晾干,丙酮 37℃ 固定 2 h;入 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液 30 min 以抑制封闭内源性过氧化物酶,PBS 洗 3×3 min;滴加一抗 HSP₇₀ 鼠源

性单克隆抗体(稀释度 1:100)湿盒内 4℃ 孵育过夜,PBS 洗 3×3 min;加生物素化二抗 1:200,37℃,40 min,PBS 漂洗 3×3 min;于用前半小时将亲合素与生物素-HRP 等量混合制备 ABC 复合物,滴加 ABC 复合物(1:100~1:150),37℃,50 min;酶底物显色剂 0.05% DAB+0.03% H₂O₂ 显色 5~12 min,蒸馏水充分洗涤,终止显色;苏木精衬染 30 s,盐酸乙醇分化,脱水透明,中性树胶封片,镜下观察。PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。HSP₇₀ 阳性呈棕褐色颗粒状,定位于细胞核。结果判定根据着色强度分为 4 级^[4]:强阳性(卅),胞核深棕色,阳性细胞数 ≥50%;阳性(++) ,胞核棕色,25% ≤ 阳性细胞数 <50%;弱阳性(+),胞核着色浅黄,阳性细胞数 <25%;阴性(-),不着色。

1.5.2 皮管存活长度和存活率 皮管存活参照 Sasaki 等^[5]的方法以长度表示。皮管断蒂存活 7 d 后观测比较两侧皮管存活情况,以游标卡尺测量两侧皮管 7 d 后的存活长度(单位:mm)。皮管存活长度与设计总长度的比值×100%为皮管存活率。

1.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时段组皮管存活率的两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 HSP₇₀免疫组化结果 热应激预处理侧皮管组织均可见 HSP₇₀ 表达,表现为由弱变强再减弱的变化过程,以 24 h 和 48 h 时段组 HSP₇₀ 表达最强,各时段组热应激预处理侧皮管组织 HSP₇₀ 表达强度分别为:0 h(+),24 h(卅)、48 h(卅)、72 h(++),1 周(++),2 周(+)。对照侧皮管组织 HSP₇₀ 免疫组化染色均阴性(图 1)。

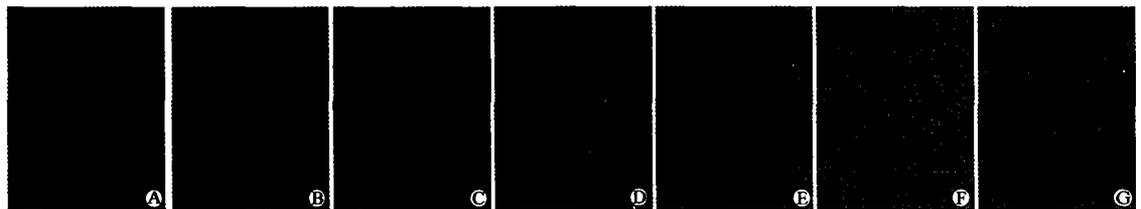


图 1 皮管组织中的 HSP₇₀ 免疫组化染色

Fig 1 Immunohistochemistry staining of HSP₇₀ protein in tubed skin flap in dog(ABC, ×400)

A: Tubed flap slice from the control side; B-G: Tubed flap slice from experimental side with heat stress pretreatment and pedicle amputation at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 and 2 weeks respectively

2.2 皮管存活长度和存活率 各时间段处理组皮管断蒂 7 d 后均出现不同程度坏死,以对照侧明显,存活率比较情况见表 1。各时间段除 0 h 外,24 h、

48 h、72 h、1 周和 2 周,热应激预处理侧的皮管存活率均明显大于对照侧,组内比较两者差异具有统计学意义(*P*<0.05);热应激预处理后延迟 48 h 断蒂

的皮管存活长度与对照侧皮管术后 2 周断蒂的存活长度接近, 皮管存活长度超过 50%。

表 1 各时间段处理组断蒂 7 d 后两侧腹部皮管的存活率

Tab 1 Surviving rate of abdominal tubed flaps 7 d after pedicle amputation in different groups

Group	(n=4, $\bar{x} \pm s, \%$)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	1 week	2 weeks
Experimental	29.16 ± 3.68	36.69 ± 7.31*	52.01 ± 3.14*	51.29 ± 4.06*	59.31 ± 5.44*	65.11 ± 3.50*
Control	27.52 ± 4.39	30.30 ± 2.16	31.66 ± 5.32	34.68 ± 3.33	40.39 ± 2.45	50.80 ± 3.17

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

传统的外科延迟手术是增加皮瓣存活及长宽比的可行方法, 但需 2 次手术, 且时间较长, 应用受到限制。而皮管延迟时间过长会增加患者负担和术后护理难度, 同时增加并发症的发生概率。如何尽可能地缩短皮管断蒂时间对于临床及患者本身都具有实际意义和价值。上世纪 90 年代开始有报道^[6,7]热应激预处理能够影响皮瓣成活, 提高皮瓣耐受完全缺血能力。后来陆续研究发现, 热应激预处理对皮瓣保护作用的程度与 HSP₇₀ 密切相关, 在一定温度范围内 (41~43°C), 热应激预处理后的皮瓣存活率与 HSP₇₀ 的合成量呈正相关^[8]。吴建明等^[3]对大鼠的在体实验观察结果亦证实了这一观点。HSP₇₀ 是 HSP 中最保守和最主要的一类, 在细胞应激后生成最为显著, 对细胞损伤具有保护作用^[9]。本研究发现: 热应激预处理后的皮管存活率高于对照组, 而其皮管组织内 HSP₇₀ 表达亦相应增强, 未经热应激预处理的皮管组织则未见 HSP₇₀ 表达。该结果表明, 热应激预处理对皮管保护作用的机制可能与热应激预处理后皮管组织内 HSP₇₀ 的诱导合成有关。

为便于对皮管的成活与坏死部分进行对比观察, 计算存活率, 本实验设计了超长皮管 (皮瓣的长宽比超过 3:1), 并将实验侧与对照侧皮管在同一动物个体身上制备进行自身对照, 以最大限度减少误差。观察发现, 热应激预处理对犬腹部皮管具有保护作用, 能够提高皮管断蒂以后的存活率, 具有手术延迟效果, 利于缩短皮管断蒂时间, 热应激预处理皮管后达到 50% 存活长度所需的时间大为缩短, 皮管热应激预处理后 48 h 断蒂, 皮管存活率即超过 50%, 接近对照组皮管成形术后 2 周的存活长度。分析其原因可能系热应激预处理 48 h 后断蒂, 皮管内 HSP₇₀ 含量达到峰值, 能最大限度提高皮管耐受缺血缺氧的能力, 对断蒂后的皮管发挥保护作用。免疫组化结果亦证实, 热应激预处理后延迟 24 h 和 48 h 时段组的皮管

组织 HSP₇₀ 表达也相应较强。但如何选择热应激预处理的适宜时机, 以及皮管断蒂的时间可能缩短到何种程度尚待进一步深入研究。本研究结果初步表明, 皮管断蒂前 48 h 进行热应激预处理的“快速延迟”效果最佳。热应激预处理激发机体内源性保护机制, 诱导方法简便易行, 控制精确, 所以利用它缩短皮管断蒂时间具有临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reiner KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [2] Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, et al. Improving acute skin flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1992, 10(3): 659-664.
- [3] 吴建明, 林子豪, 刘麒, 等. 热应激预处理对皮瓣缺血再灌注损伤的影响及机制 [J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1999, 15(5): 351-353.
- [4] Harder Y, Contaldo C, Klenk J, et al. Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs [J]. *J Surg Res*, 2004, 119(1): 100-105.
- [5] Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1980, 65(2): 152-158.
- [6] Menger MD, Laschke MW, Amon M, et al. Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2003, 388(5): 281-290.
- [7] Al-Qattan MM. Nonsurgical delay of cutaneous flaps using the flash lamp pumped pulsed dye laser [J]. *Ann Plast Surg*, 2000, 45(5): 568.
- [8] Ghavami A, Nutt MP, Hardy SP. Heat shock protein and high-dose aspirin: effects on random skin flap survival in a rat model [J]. *Ann Plast Surg*, 2002, 48(1): 60-67.
- [9] Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena DK, et al. Heat shock response: HSP₇₀ in environmental monitoring [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(5): 249-254.

[收稿日期] 2004-07-15

[修回日期] 2004-10-21

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群