

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00488

· 论 著 ·

透明质酸注射后组织坏死机制的实验研究

黄明欢¹, 宋建星^{1*}, 杜振峰²

1. 同济大学附属东方医院医学美容科, 上海 200120
2. 第二军医大学长海医院整形科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨透明质酸注射治疗后发生组织坏死的机制。**方法** 采用新西兰白兔 20 只(40 只兔耳), 结扎耳郭前动静脉和其他旁支动静脉, 制成以耳中央动脉、静脉为主要血供的兔耳复合组织瓣模型。把兔耳组织瓣模型随机分为 A、B、C、D 组。A、B、C 组分别将透明质酸 0.2 ml 注射入兔耳根部中央动静脉周围、中央静脉内和中央动脉内; D 组切断耳中央动脉作为对照。分别于注射后第 1、7、14 天观察大体和微循环变化, 监测皮温和血氧饱和度, 第 14 天处死动物取耳标本进行组织学检查。**结果** 各组动物均出现不同程度的缺血, A 组和 D 组注射后皮温和血氧饱和度变化与注射前相比差异无统计学意义。B 组注射后第 1 天皮温和血氧饱和度下降, 而后逐渐回升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A、B 和 D 组所有兔耳均成活。C 组注射后兔耳皮温和血氧饱和度急剧下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 7 d 后皮肤相继出现溃疡和坏死。**结论** 透明质酸注入动脉内可以导致远端小动脉栓塞和微循环障碍, 可能是组织坏死的主要原因。

[关键词] 透明质酸; 注射; 组织坏死; 栓塞**[中图分类号]** R 622.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0488-05

Study on mechanism behind of tissue necrosis following injection of hyaluronic acid filler

HUANG Ming-huan¹, SONG Jian-xing^{1*}, DU Zhen-feng²

1. Department of Medical Cosmetic, Eastern Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China
2. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of tissue necrosis following injection of hyaluronic acid.
Methods Twenty New Zealand white rabbits (40 ears) were used to establish ear complex tissue flap models with blood supply only from the central pair of artery and vein by ligating the anterior pair and other branches. Then the animal models were randomly divided into 4 groups. Group A, B and C were injected with 0.2 ml hyaluronic acid into the periphery of the root portion of the central artery, central vein and central artery, respectively; Group D received cutting and ligation of the central artery (control group). The visual findings, microcirculation changes, skin temperature and percutaneous oxygen saturation were examined at 1, 7, and 14 days after injection. The animals were sacrificed on the 14th day and the ears were studied pathologically. **Results** All the groups showed different degrees of tissue ischemia. In Group A and D the skin temperature and oxygen saturation were not significantly different before and after injection of hyaluronic acid. The skin temperature and oxygen saturation were decreased one day after injection in Group B, and they gradually increased thereafter ($P < 0.05$). All the ears in Group A, B and D survived. The skin temperature and oxygen saturation in Group C were significantly decreased after injection of hyaluronic acid ($P < 0.05$), and all the ears in Group C developed skin ulceration and necrosis after 7 days. **Conclusion** Injection of hyaluronic acid into the artery can cause obstruction of distal arterioles and microcirculation disorder, which might be the main cause of skin tissue necrosis.

[Key words] hyaluronic acid; injection; tissue necrosis; embolism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5):488-492]

近年来, 现代微创注射美容技术得到了快速的发展。1996 年, 欧盟首先批准非动物性的透明质酸皮肤填充剂在欧洲使用。透明质酸类注射具有创伤小、无过敏反应、疗效显著且可控性强、不良反应

少等优点, 目前已成为仅次于肉毒毒素之后的第二大注射美容产品, 2008 年 12 月首个透明质酸类皮肤填充剂瑞典 Q-Med 公司生产的 Restylane 被批准在中国注册上市^[1]。虽然我国透明质酸的临床应用起

[收稿日期] 2012-03-08

[接受日期] 2012-05-04

[作者简介] 黄明欢, 主治医师. E-mail: hmhuan1007@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873459, E-mail: drsong@163.com

步相对较晚,但是发展势头极其迅猛,而相关的基础研究还仅处于发展阶段,缺乏深层的认知。随着它在美容领域应用的不断普及,带来的并发症也日益受到关注。其中最严重的并发症是注射后引发的组织坏死。目前对这类并发症产生的机制还没有明确的定论^[2-4]。

为此,本研究自行设计动物模型模拟临床透明质酸注射中可能出现的情况,针对产生组织坏死并发症的可能原因进行研究,旨在为临床应用时预防和减少不良反应的发生提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料及仪器 采用体质量约2.3~2.7 kg的10~11个月龄新西兰白兔20只(雌雄不限)为实验对象,由第二军医大学实验动物中心提供。透明质酸 Restylane(瑞典 Q-Med 公司); Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统(中国);多参数监护仪(中国宝莱特医用科技有限公司);非接触式红外测温仪(德国 Beurer 公司);微循环检测仪(中国响石电子科技有限公司);数码相机(日本索尼公司)。

1.2 动物模型制备 新西兰白兔20只,实验前1周购入,单笼喂养,混合饮食,自由饮水与摄食,房间温度保持在20~22℃。固定动物,剪去兔耳被毛,常规消毒,1%利多卡因表面浸润麻醉,距兔耳根部3~4 cm耳缘内侧切开皮肤,用血管钳分离耳郭前动脉,结扎动脉近端和远端,切断血管,动脉远端搏动消失,并结扎其他旁支动静脉,缝合皮肤,包扎。制成以耳中央动脉、静脉为主要血供的兔耳复合组织瓣模型。

1.3 动物分组和处理 供实验的动物兔耳模型被随机分成4组,每组10只兔耳,每只实验动物左右耳均为不同实验组。A组于距兔耳根部3~4 cm处耳中央动静脉周围注射透明质酸0.2 ml;B组于中央静脉内注射透明质酸0.2 ml;C组于中央动脉内注射透明质酸0.2 ml;D组(对照组)切断耳中央动脉。分别于注射后第1、7、14天进行大体观察和微循环血流观察,监测皮肤温度和血氧饱和度;第14天用过量戊巴比妥钠处死动物,行组织学检查。

1.4 观察指标

1.4.1 大体观察和毛细血管血流观察 观察实验动物兔耳的皮肤温度、皮肤色泽、水肿、淤血等情况。用微循环探测仪观察兔耳毛细血管血流变化。

1.4.2 皮肤温度和血氧饱和度测量 在室温20℃条件下用非接触式红外测温仪在耳背侧中心位置测定皮温,每次测3次后取平均值(精确到0.1℃);多参数监护仪测量兔耳血氧饱和度。

1.4.3 组织学观察 术后第14天用过量戊巴比妥钠处死动物,切取兔耳组织块,所有标本均经10%甲醛固定,常规梯度乙醇脱水、石蜡包埋后,常规切片,H-E染色,观察标本中血管内栓塞物、血管及血管周围组织损害程度和炎症细胞浸润程度。

1.5 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 16.0统计软件进行分析。组间比较采用单因素方差分析,术前、术后的比较采用可重复测量资料的方差分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 大体和毛细血管微循环血流观察 将透明质酸填充物注射于兔耳中央动静脉周围(A组)后,注射部位出现局限性隆起,血管受到压迫,血管充盈减少;注射后第1天兔耳皮肤略微变白(图1A1),皮温变化不明显;第7天动静脉充盈良好,皮温正常,无水肿、淤血表现(图1A2),毛细血管内血液流速正常;第14天兔耳皮肤色泽红润(图1A3),所有兔耳均成活。

将透明质酸填充物注射入兔耳中央静脉(B组)后,填充物充满中央静脉及其分支内,静脉血流暂时中断,数分钟后部分小静脉有血液充盈,注射口处出血少;注射后第1天兔耳淤血明显、皮肤暗红色,伤口周围水肿、淤血明显、少许渗出(图1B1);第7天兔耳淤血逐渐减退、伤口周围仍有淤血、兔耳远端皮肤少量淤血、恢复淡红色,无溃疡(图1B2),毛细血管内血液流速基本恢复正常;第14天兔耳皮肤色泽红润(图1B3),所有兔耳全部成活。

将透明质酸填充物注射于兔耳中央动脉(C组)后,填充物充满兔耳中央动脉及其分支内,动脉血流阻断,注射口处出血多;注射后第1天兔耳淤血严重,皮肤呈灰白色和紫黑色错综的网状淤斑、伤口周围干燥(图1C1),皮温低,肉眼可见大量透明质酸填充物栓塞于中央动脉内,微循环探测仪探测毛细血管内血液几乎停滞;第7天兔耳淤血仍严重,远端皮肤发黑,表面可见数个坏死溃疡面,伤口周围干燥(图1C2);第14天兔耳远端皱缩、坏死,呈黑色,质地坚实,与周围组织有明显的分界线,所有实验组动物兔耳远端均发生不同程度的干性溃疡和组织坏死,坏死面积为 $(6.3 \pm 1.5) \text{ cm}^2$ (图1C3)。

结扎兔耳中央动脉两端,切断动脉,血流截断(D组)后,远端血管无充盈;注射后第1天兔耳皮肤略显微白,伤口周围红肿、淤血(图1D1);第7天兔耳伤口周围红肿、淤血消退,远端皮肤淡红(图1D2),毛细血管内血液流速基本正常;第14天兔耳色泽红润(图1D3),所有兔耳均成活。

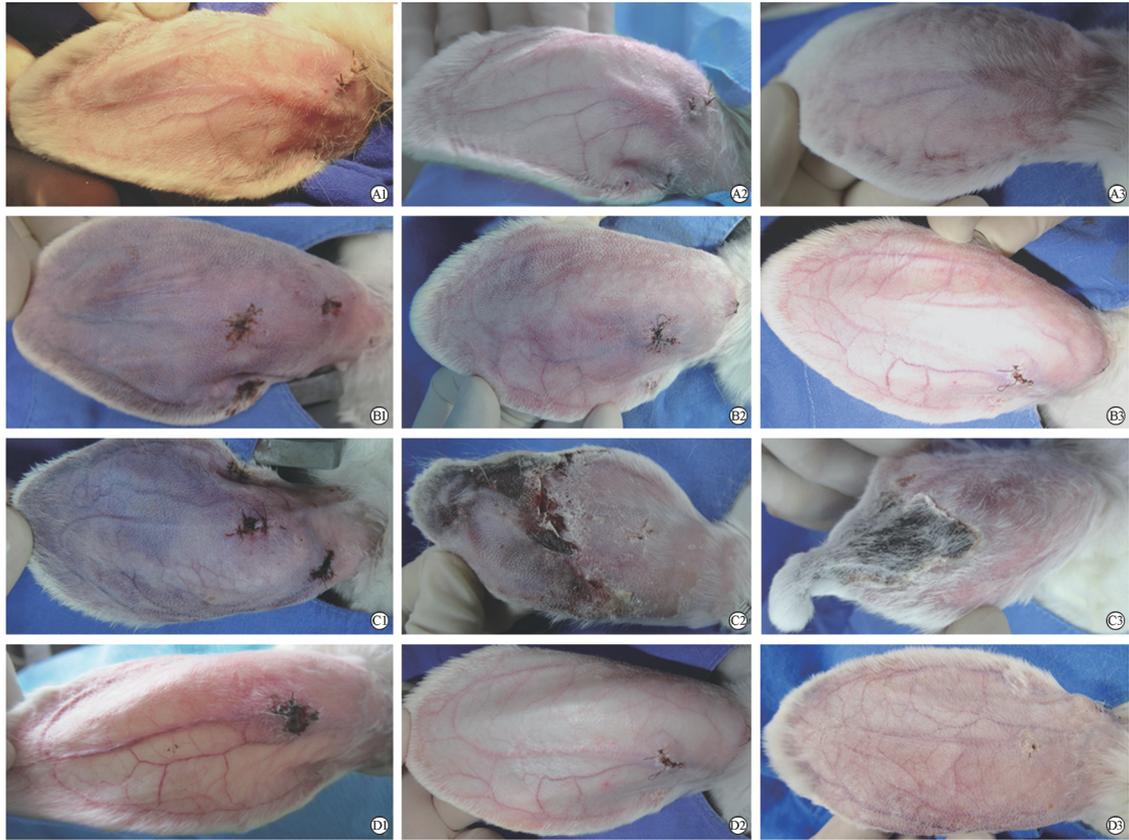


图 1 注射透明质酸后各实验组兔耳大体观察

Fig 1 General observations of rabbit ears in each group after injection of hyaluronic acid

A1-A3: 1 d, 7 d, and 14 d after injecting hyaluronic acid into the periphery of the root portion of the central artery; B1-B3: 1 d, 7 d, and 14 d after injecting hyaluronic acid into the central vein; C1-C3: 1 d, 7 d, and 14 d after injecting hyaluronic acid into the central artery; D1-D3: Cutting and ligation of the central artery

2.2 兔耳皮温测定 由表 1 可见,注射前各组间皮温相近,差异无统计学意义,皮温基线情况较均衡。A、D 组中,注射前、注射后皮温变化不大,差异无统计学意义; B 组中,注射后第 1 天皮温轻度下降,而

后逐渐回升,差异有统计学意义($P < 0.05$); C 组中,注射后第 1 天皮温急剧下降,而后保持比较低的水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组间皮温比较

Tab 1 Skin temperature in each group

$n=10, \bar{x} \pm s, \theta/^\circ\text{C}$

Group	Pre-injection	Post-injection			F(P)
		Day 1	Day 7	Day 14	
A	32.82±2.17	32.32±2.91	30.20±2.15	30.96±1.46	2.15(0.15)
B	31.66±2.32	28.46±1.63	30.32±1.24	30.38±1.74	9.99(0.01)
C	30.54±0.52	19.48±3.68	19.02±3.41	18.44±2.32	23.39(0.01)
D	30.78±1.78	31.36±1.87	30.70±1.42	30.92±1.67	0.24(0.87)
F(P)	1.57(0.235)	24.30(<0.01)	23.39(0.01)	56.98(<0.01)	

Group A: Injecting hyaluronic acid into the periphery of the root portion of the central artery; Group B: Injecting hyaluronic acid into the central vein; Group C: Injecting hyaluronic acid into the central artery; Group D: Cutting and ligation of the central artery

2.3 兔耳血氧饱和度的测定 由表 2 可见,注射前各组间血氧饱和度相近,差异无统计学意义。A 组中,注射前和注射后比较差异无统计学意义; B 组

中,注射后第 1 天血氧饱和度降低,注射后第 7、14 天有所回升,差异有统计学意义($P < 0.05$); C 组中,注射后第 1 天血氧饱和度急剧下降($P < 0.05$),第 7

天继续维持下降趋势($P < 0.05$),至注射后第14天,部分兔耳已无法测得血氧饱和度;D组注射后血

氧饱和度也有所降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组间血氧饱和度比较

Tab 2 Comparison of oxygen saturation between different groups

Group	Pre-injection	Post-injection			F(P)
		Day 1	Day 7	Day 14	
A	92.0±1.87	89.6±1.82	90.8±1.92	90.4±2.70	1.36(0.30)
B	91.6±0.81	79.0±1.64	85.6±1.29	88.2±0.58	34.53(<0.01)
C	91.4±1.14	45.0±13.69	50.4±11.99	-	22.71(0.01)
D	91.4±2.07	83.8±1.92	86.8±2.59	89.6±1.82	16.71(<0.01)
F(P)	0.13(0.94)	38.62(<0.01)	43.49(<0.01)	1.51(0.26)	

$n=10, \bar{x} \pm s, \%$

Group A: Injecting hyaluronic acid into the periphery of the root portion of the central artery; Group B: Injecting hyaluronic acid into the central vein; Group C: Injecting hyaluronic acid into the central artery; Group D: Cutting and ligation of the central artery

2.4 组织学观察 注射后第14天,A组兔耳根部肌肉层可见大量透明质酸凝聚物,周围可见明显炎症浸润和组织破坏,血管内未见透明质酸凝聚物(图2A)。B组兔耳标本可见部分背侧血管内有透明质酸凝聚物残留,腹侧血管均未受累及,血管壁和周围

组织细胞形态正常,结构完整(图2B)。C组兔耳标本中可见血管内有大量透明质酸凝聚物和血栓堵塞,背侧和腹侧血管均受累及,周围组织炎症浸润和组织破坏严重(图2C)。D组兔耳标本各层次清楚,组织细胞正常,结构完整(图2D)。

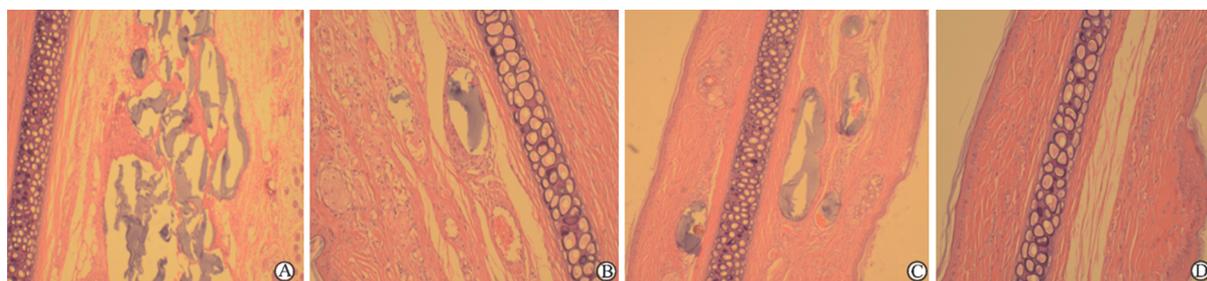


图2 注射透明质酸后第14天各实验组兔耳组织学变化

Fig 2 Pathological examination of rabbit ears in each group 14 d after injection of hyaluronic acid

A: Injecting hyaluronic acid into the periphery of the root portion of the central artery (Group A); B: Injecting hyaluronic acid into the central vein (Group B); C: Injecting hyaluronic acid into the central artery (Group C); D: Cutting and ligation of the central artery (Group D). H-E staining. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

透明质酸又名玻尿酸,是一种外观透明的酸性黏多糖,1934年由美国哥伦比亚大学眼科教授Karl Meyer等首先从牛眼玻璃体中分离出该物质并分析其结构。在人体皮肤组织细胞与胶原纤维之间有大量透明质酸,它通过形成一种有弹性的黏性基质充填在组织的空隙内^[5],维持皮肤的弹性。透明质酸也广泛地存在于其他脊椎动物,无论来源为何,其化学组成及结构均相同^[6],所以不会产生过敏反应。此外,它还具有吸水能力强(可以吸收1000倍的水分)、可被生物体分解吸收等优点,所以被认为是一种安全、方便的理想皮肤填充材料。然而所有填充

剂注射都可能产生不良反应,透明质酸注射填充也可能出现一些不良反应,例如:局部的红肿及疼痛、局部血肿甚至感染、患者的焦虑及异物感、血管堵塞、纤维化及肉芽组织的形成^[7]。其中最严重的是组织坏死,最易发生在眉间和鼻尖、鼻翼处。目前有关组织坏死的发生机制尚不明确,一般认为有两种可能的原因:(1)填充剂误注入血管或针尖损伤到血管,导致血管的堵塞^[2-3];(2)填充剂量过大,挤压血管,导致血液循环障碍、组织血供不良而引起坏死^[4]。为此,本研究尝试通过动物实验加以探讨和证实。

3.1 动物模型的可靠性和意义 已有研究证实,兔耳背侧血管有中央动静脉、头侧动静脉及尾侧动静

脉3套主要供血系统,中央动脉与头侧动脉在距耳根约3.5 cm处共干,3套血管系统之间存在丰富的吻合支^[8]。而人鼻尖和鼻翼处血管的解剖特点是:鼻尖部动脉血供是顺鼻背方向的,单侧侧鼻动脉和单侧鼻背动脉供血占55%^[9];鼻翼处血供则由鼻外侧动脉、鼻中隔动脉、鼻翼下缘动脉分支吻合形成鼻翼网来供应。本实验设计结扎耳郭前动静脉和其他旁支动静脉,形成以耳中央动脉、静脉为主要供血的兔耳复合组织瓣为实验模型,能够较真实地反映人鼻尖和鼻翼处血管的解剖特点。采用该模型,分别将透明质酸注入兔耳中央动脉、中央静脉及其血管周围,模拟临床透明质酸注射后组织坏死的各种可能机制,对坏死组织的发生、发展及其转归进行观察和研究。由此可见,本实验自行设计的动物模型能够比较客观地反映临床实际。

3.2 透明质酸注射后组织坏死机制的探讨 本实验结果表明:注入兔耳根部动、静脉周围的透明质酸填充物对中央动、静脉产生了一定的压迫,注射后第14天,组织学观察发现大量透明质酸团块周围有炎症和组织结构破坏,但仅局部组织结构的破坏还不至于影响兔耳的血供,所以,大体观察并没有发现明显的兔耳缺血和坏死症状,术后皮温和血氧饱和度的差异也没有统计学意义。注入中央静脉中透明质酸填充物引起了静脉暂时阻塞,血流部分受阻,出现淤血、组织缺血等症状,注射后第1天皮温和血氧饱和度降低,而后逐渐回升,组织切片中可见近端兔耳的部分血管腔内仍有一定量透明质酸残留,没有引起静脉的完全闭塞,血管周围和组织的病理改变不明显。其原因可能为透明质酸填充物随着血流方向运行,进入管径更粗的静脉中,不至于完全堵塞静脉;部分透明质酸可能被血清中透明质酸酶降解。而透明质酸注入耳中央动脉后,栓塞动脉,血液循环停滞,术后皮温和血氧饱和度有明显降低,兔耳皮肤表面即刻出现灰白色和紫黑色错综的网状淤斑。由于血流的作用透明质酸栓子继续向末梢的细小动脉推进,病理标本中兔耳背面和腹面的血管内均可见透明质酸凝聚物证明了这一点。末梢动脉的栓塞引起了微循环障碍,相应区域缺血、缺氧,组织结构破坏,最终导致皮肤溃疡和干性坏死,实验动物的皮肤表现与临床上发生组织坏死的表现基本一致。而对照组中离断兔耳中央动脉,虽然产生了暂时的缺血改变,但由于兔耳的血供丰富,小动脉之间仍存在大量的吻合支,新生毛细血管的生成足以满足维系兔

耳成活的供血需要,所有兔耳均存活。

3.3 实验结果的临床意义 本实验结果提示,临床上发生组织坏死的主要原因可能是填充剂误注入血管或针尖损伤到动脉管壁,填充物进入血管后随着血流流入管径较小的动脉内,在侧支循环不丰富的血供不良区域中,一旦发生栓塞极易引起血液循环障碍,进而导致组织坏死。所以发生组织坏死很可能是由于操作技术方面的缺陷和疏忽造成的,医师必须对此提高警惕,进行注射治疗时务必小心、仔细、谨慎,注射进针后必须回抽以确定注射针没有伤及血管。其次,注射填充材料时针头一定要边回退、边注射。此外,作为注射医师必须熟悉注射区域的解剖结构和血管分布,重视术后观察,一旦出现动脉堵塞的征象时,须立刻进行相应处理。实验中我们还发现局部大量透明质酸的堆积对周围组织有明显的炎症反应和一定程度的破坏作用。提示临床医师要均匀地注射填充物,尽量避免过于集中。本实验的局限性在于各实验组所注射的透明质酸均为0.2 ml,因此组织坏死是否还与填充剂量过大、挤压血管而导致组织血供不良^[4]有关尚需进一步证实。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张建民. 国内外批准上市的注射美容产品[J]. 上海食品药品监管研究, 2010, (104): 33-37.
- [2] Cox S E. Clinical experience with filler complications[J]. Dermatol Surg, 2009, 35(Suppl 2): 1661-1666.
- [3] Burt B, Nakra T, Isaacs D K, Goldberg R A. Alar necrosis after facial injection of hyaluronic acid[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 125: 199e-200e.
- [4] Cohen J L. Understanding, avoiding, and managing dermal filler complications[J]. Dermatol Surg, 2008, 34(Suppl 1): S92-S99.
- [5] Romagnoli M, Belmontesi M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice[J]. Clin Dermatol, 2008, 26: 123-159.
- [6] Clark C P 3rd. Animal-based hyaluronic acid fillers: scientific and technical considerations[J]. Plastic Reconstr Surg, 2007, 120(6 Suppl): 27S-32S.
- [7] Weinberg M J, Solish N. Complications of hyaluronic acid fillers[J]. Facial Plast Surg, 2009, 25: 324-328.
- [8] Morris J L, Bevan R D. Development of the vascular bed in the rabbit ear: scanning electron microscopy of vascular corrosion casts[J]. Am J Anat, 1984, 177: 75-89.
- [9] Toriumi D M, Mueller R A, Grosch T, Bhattacharyya T K, Larabee W F Jr. Vascular Anatomy of the nose and the external rhinoplasty approach[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1996, 122: 24-34.