

## 龙血竭对大鼠撕脱皮瓣的保护作用

罗志红<sup>1</sup>, 鲁开化<sup>2\*</sup>, 张荣平<sup>3</sup>, 宁亚功<sup>1</sup>, 王继华<sup>4</sup>, 胡炜彦<sup>3</sup>, 康文博<sup>2</sup>, 王师平<sup>2</sup>

(1. 成都军区昆明总医院, 昆明 650032; 2. 第四军医大学西京医院全军整形外科研究所, 西安 710032;  
3. 昆明医学院药学院, 昆明 605000; 4. 昆明医学院第二附属医院整形外科, 昆明 650101)

[摘要] 目的: 探讨龙血竭对大鼠撕脱皮瓣的保护作用及机制。方法: 实验大鼠随机分为空白对照组、龙血竭灌胃组、龙血竭外用组。在大鼠背部制作一个蒂在尾部的 3 cm × 9 cm 大小的撕脱伤皮瓣, 皮瓣碾压撕脱后原位缝合。分别于术后 1, 12, 24 h 取皮瓣近、中、远段组织检测丙二醛(MDA) 含量、超氧化物歧化酶(SOD) 及髓过氧化物酶(MPO) 活性, 术后 7 d 计算皮瓣成活率。结果: 龙血竭能降低 MDA 含量和 MPO 活性, 增加 SOD 活性。术后 7 d 皮瓣成活率龙血竭组明显升高。结论: 龙血竭可提高撕脱皮瓣组织的抗氧化能力, 减轻中性粒细胞在皮瓣中的聚集, 从而发挥对撕脱皮瓣的保护作用。

[关键词] 龙血竭; 撕脱皮瓣; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 髓过氧化物酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 01-0152-03

皮肤撕脱伤是临床常见的创伤之一, 组织坏死机理复杂, 临床缺乏有效的防治方法。近年来大量研究表明自由基在常规皮瓣缺血坏死中起着十分重要的作用, 撕脱皮瓣也存在着

与常规皮瓣坏死类似的因素, 课题组在前期的实验研究中也发现皮肤撕脱伤后组织中脂质过氧化反应增强, 说明自由基在撕脱皮瓣坏死中可能发挥重要的作用<sup>[1]</sup>。

龙血竭是传统名贵中药, 为龙舌兰科剑叶龙血树脂提炼的纯天然药物, 临床应用广泛, 特别是在创伤修复方面疗效显著。现代研究证实, 血竭具有能改善局部血循环, 抑制血小板聚集, 抗血栓形成, 清除自由基和抗氧化作用, 促进成纤维细胞增殖, 促进角质形成细胞的游走、增殖, 抗细菌、抗真菌及消炎止痛等多种药理活性<sup>[2-4]</sup>。但龙血竭对撕脱皮瓣影响的实验研究目前尚无文献报道。本实验采用大鼠撕脱伤模型, 检测龙血竭对大鼠皮瓣撕脱伤后组织中 SOD、MDA、MPO 的影响, 探讨龙血竭对撕脱皮瓣损伤的保护作用。

### 1 材料

**1.1 龙血竭外用药的制备** 龙血竭外用药的制备在昆明医学院天然药物药理重点实验室完成, 龙血

竭粉(昆明医学院天然药物药理重点实验室提供)配制成浓度为 10% 的外用制剂。

**1.2 动物及主要试剂、仪器:** SD 大鼠 75 只(雌雄不限), 体重 220 ~ 250 g, 购于第四军医大学动物实验中心。皮肤撕脱伤模型机(由第四军医大学西京医院整形外科研究所研制); 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO) 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

### 2 方法

**2.1 大鼠撕脱伤皮瓣模型的制备** 1% 戊巴比妥钠(40 mg · kg<sup>-1</sup>) ip 麻醉, 剃毛机剃除背部的毛后用硫化钠脱毛, 皮肤常规消毒后, 以背部中线为准, 蒂位于尾侧, 设计 3 cm × 9 cm 大小的长条形任意皮瓣, 切开皮肤至肉膜, 在肉膜下掀起皮瓣, 然后将皮瓣放置于大鼠皮肤撕脱伤模型机固定底板与齿轮之间, 调节二者合适高度, 确保对皮瓣产生基本相同的压力; 使齿轮旋转并从皮瓣的远端向蒂部快速滑动, 对皮瓣形成撕脱伤。重复碾压 4 次。将皮瓣复位后用 5 ~ 0 丝线原位缝合。

**2.2 分组** 将大鼠随机分为 3 组: 空白对照组(A)、龙血竭 ig 组(B)、龙血竭外用组(C), 每组 25 只, 在撕脱皮瓣形成后原位缝合, 术后 B、C 组分别 ig 龙血竭灌胃(2 g/kg, 每日量平均分 2 次给药)、龙血竭外用(16 g/kg, 每日量平均分 3 次给药)。连续给药 7 d。

**2.3 取材** 于 1, 12, 24 h 分别从 3 组大鼠中抽取 5 只, 分别距蒂部 2, 5, 8 cm 处, 迅速切取全层皮瓣组

[收稿日期] 2010-02-23

[第一作者] 罗志红, 女, 博士, Tel: 13116951199, E-mail: luozhihong666@sina.com

[通讯作者] \* 鲁开化, 教授, 博士生导师, Tel: 13809186698, E-mail: lukaihua@fmmu.edu.cn

织 1 cm × 2 cm, 所取组织部分用 10% 福尔马林及时固定, 待做石蜡切片 HE 染色, 部分称重后冰冻保存待测。其余 10 只大鼠于术后 7 d 计算皮瓣成活率。

## 2.4 观测指标

**2.4.1 SOD, MPO 活性和 MDA 含量测定** 按照试剂盒说明书的步骤, 测定所取皮瓣组织 SOD, MPO 活性和 MDA 含量。

**2.4.2 组织学观察** 光镜观察大鼠背部皮瓣组织切片。

**2.4.3 皮瓣成活率的计算** 以皮瓣质地柔软, 呈粉红色, 皮温正常, 毛发恢复生长为成活; 以皮瓣手感变硬, 颜色转黑为坏死标准。于术后第 7 d, 数码照相, 用图象分析软件 PHOTO SHOP 予以分析, 计算皮瓣成活率。皮瓣成活率 = 皮瓣存活面积 / 皮瓣总面积 × 100%。

**2.4.4 统计学处理** 所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理, 组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为有显著性差异,  $P < 0.01$  为有非常显著性差异。

## 3 结果

**3.1 皮瓣 MDA, SOD, MPO 含量比较** 术后 12, 24 h, 龙血竭灌药组和外用药组与模型对照组比较, MDA 含量及 MPO 活性均显著降低, SOD 活性显著增加。见表 1 ~ 3。

表 1 龙血竭对皮瓣组织术后 1, 12, 24 h MDA 含量的影响  
( $\bar{x} \pm s$ , nmol/mg,  $n = 5$ )

组别	时间/h	近段	中段	远段
模型对照	1	2.34 ± 0.21	3.28 ± 0.35	4.85 ± 0.31
	12	3.75 ± 0.32	4.51 ± 0.27	6.45 ± 0.36
	24	4.94 ± 0.25	6.84 ± 0.32	9.67 ± 0.34
灌药	1	2.28 ± 0.34	3.22 ± 0.25	4.76 ± 0.36
	12	3.05 ± 0.36 <sup>1)</sup>	3.83 ± 0.24 <sup>1)</sup>	5.74 ± 0.32 <sup>1)</sup>
	24	3.75 ± 0.24 <sup>1)</sup>	5.41 ± 0.32 <sup>1)</sup>	7.45 ± 0.28 <sup>1)</sup>
外用药	1	2.25 ± 0.25	3.38 ± 0.22	4.92 ± 0.25
	12	2.21 ± 0.25 <sup>2,3)</sup>	2.50 ± 0.32 <sup>2,3)</sup>	3.62 ± 0.26 <sup>2,3)</sup>
	24	2.65 ± 0.32 <sup>2,3)</sup>	3.65 ± 0.46 <sup>2,3)</sup>	5.05 ± 0.34 <sup>2,3)</sup>

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与灌药组比较, <sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (下同)

**3.2 组织学观察** HE 染色光镜下可见皮瓣组织表皮细胞部分脱落, 皮下组织水肿明显, 模型对照组中、远段可见大量中性粒细胞浸润, 龙血竭灌药组和外用药组中、远段中性粒细胞浸润较模型对照组减

轻, 其中龙血竭外用组减轻较为明显。

**3.3 术后 7 d 皮瓣成活率比较** 术后 7 d 检测皮瓣成活率, 结果见表 4。

表 2 龙血竭对皮瓣组织术后 1, 12, 24 h SOD 活性的影响( $\bar{x} \pm s$ , U/mg,  $n = 5$ )

组别	时间/h	近段	中段	远段
模型对照	1	423.33 ± 34.53	382.45 ± 36.43	339.60 ± 32.32
	12	381.41 ± 54.32	339.43 ± 46.23	294.32 ± 36.78
	24	315.26 ± 55.42	267.56 ± 67.35	227.34 ± 45.67
灌药	1	419.44 ± 42.22	384.34 ± 43.33	342.34 ± 33.46
	12	383.24 ± 44.56	367.44 ± 33.45 <sup>1)</sup>	325.35 ± 26.46 <sup>1)</sup>
	24	317.58 ± 43.33	299.42 ± 51.35 <sup>1)</sup>	258.44 ± 43.31 <sup>1)</sup>
外用药	1	425.43 ± 37.48	385.32 ± 42.36	337.45 ± 37.43
	12	379.56 ± 36.65	398.34 ± 44.31 <sup>1,3)</sup>	357.24 ± 45.43 <sup>1,3)</sup>
	24	321.45 ± 30.36	328.44 ± 45.45 <sup>1,3)</sup>	289.43 ± 44.31 <sup>1,3)</sup>

表 3 龙血竭对皮瓣组织术后 1, 12, 24 h MPO 活性检测( $\bar{x} \pm s$ , U/g,  $n = 5$ )

组别	时间	近段	中段	远段
模型对照	1 h	4.92 ± 0.23	5.45 ± 0.23	7.75 ± 0.25
	12 h	7.17 ± 0.32	8.26 ± 0.25	10.51 ± 0.33
	24 h	9.45 ± 0.25	10.84 ± 0.36	14.75 ± 0.42
灌药	1 h	4.88 ± 0.27	5.28 ± 0.31	7.66 ± 0.26
	12 h	6.05 ± 0.24 <sup>1)</sup>	6.53 ± 0.35 <sup>1)</sup>	8.78 ± 0.36 <sup>1)</sup>
	24 h	7.14 ± 0.21 <sup>1)</sup>	8.88 ± 0.43 <sup>1)</sup>	11.23 ± 0.32 <sup>1)</sup>
外用药	1 h	4.83 ± 0.22	5.37 ± 0.26	7.89 ± 0.44
	12 h	4.35 ± 0.25 <sup>2,3)</sup>	4.79 ± 0.32 <sup>2,3)</sup>	6.02 ± 0.24 <sup>2,3)</sup>
	24 h	5.17 ± 0.35 <sup>2,3)</sup>	5.97 ± 0.22 <sup>2,3)</sup>	8.45 ± 0.45 <sup>2,3)</sup>

表 4 龙血竭对大鼠皮瓣术后 7 d 成活率( $\bar{x} \pm s$ , %,  $n = 10$ )

组别	剂量/g/kg	术后第 7 d
模型对照	—	35.76 ± 7.57
灌药	2	52.55 ± 6.35 <sup>1)</sup>
外用药	16	77.39 ± 6.48 <sup>2,3)</sup>

## 4 讨论

皮肤撕脱伤后, 撕脱皮瓣存在缺血再灌注过程, 撕脱伤造成组织内和撕脱皮瓣下广泛出血, 撕脱组织内大量炎细胞浸润, 血管栓塞和变性坏死, 这些都为氧自由基的产生创造了条件<sup>[5]</sup>。自由基具有极为活泼的反应性, 它可与细胞成分如细胞膜磷脂、蛋白质、核酸等发生反应, 最终使细胞膜的完整性遭到破坏, 进一步使细胞的功能代谢也发生障碍。SOD 是体内重要的抗氧化酶, 当体内自由基生成增多时, 它与超氧阴离子反应生成过氧化氢, 再由过氧

化氢酶和谷胱甘肽酶转变成水,从而使自由基清除,保护细胞免受损伤。自由基通过脂质过氧化反应生成脂质过氧化物(LPO),MDA 是脂质过氧化反应的终产物之一,与自由基代谢密切相关,测定 MDA 的含量可代表 LPO 的含量,也能反应自由基产生的多少。本研究发现与对照组比较,龙血竭灌胃组和外用组均能降低 MDA 水平,提高 SOD 水平,其中以外用药组明显,说明龙血竭可以减少自由基的产生,保护 SOD 活力,从而提高组织清除氧自由基的能力。

中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)是中性粒细胞的标志酶,直接与中性粒细胞的数目相关。因此可以通过检测皮瓣组织中的 MPO 活性来检测中性粒细胞在皮瓣组织中的浸润、聚集情况。大量研究表明中性粒细胞聚集是加重皮瓣缺血损伤的重要因素。本实验在术后 1, 12, 24 h 检测皮瓣组织中 MPO 的活性发现, MPO 活性远段最高,中段次之,近段最低,这反映出中性粒细胞在皮瓣缺血最重的区域聚集最多,这种现象与中性粒细胞参与到缺血皮瓣损伤的机理学说相吻合。实验发现术后 12, 24 h, 龙血竭灌胃组与外用组皮瓣组织中 MPO 活性均低于对照组,其中以外用药组明显。这表明局部使用龙血竭能在早期减轻撕脱皮瓣中中性粒细胞的聚集。

血竭是传统名贵中药,具有多种药理活性,在清除自由基和抗氧化方面,刘忠和等<sup>[6]</sup>研究发现复方血竭胶囊能明显降低大鼠局灶性脑缺血-再灌注后脑组织中 MDA 含量,增加 SOD 活性,说明血竭胶囊可通过清除氧自由基而发挥对脑缺血-再灌注后脑组织的保护作用。师梅梅等<sup>[7]</sup>研究龙血竭胶囊的体外抗氧化作用表明龙血竭胶囊能够清除 DPPH·, O<sub>2</sub>· 和 ·OH 自由基,并且可以有效抑制 Fe<sup>2+</sup> 诱导的脂质过氧化反应和 -胡萝卜素/亚油酸的自氧

化,说明龙血竭胶囊有较强的清除自由基和抗氧化活性。

本实验在撕脱皮瓣术后不同时间点测得对照组皮瓣组织中 MDA 含量、MPO 活性显著升高, SOD 活性显著下降,表明撕脱伤皮瓣可导致自由基生成,从而使膜发生脂质过氧化,使 MDA 含量升高, SOD 活性下降,两者的改变使机体的氧化与抗氧化平衡受到破坏。MPO 活性的升高说明中性粒细胞参与了早期撕脱皮瓣的损伤。实验结果显示龙血竭能降低皮瓣中 MDA 含量和 MPO 活性,提高 SOD 活性,从而促进撕脱皮瓣的成活,龙血竭对撕脱皮瓣具有保护作用,其机制可能与清除氧自由基,减少脂质过氧化物产生,提高 SOD 酶的活性,减轻中性粒细胞在皮瓣中的聚集有关。

#### [参考文献]

- [1] 郭树忠,鲁开化,张琳西. 皮肤撕脱伤后丙二醛含量变化及其意义[J]. 中国美容医学, 2001, 10(6): 477.
- [2] 罗世成,胡瑞祥,时德. 血竭的基础研究与临床应用. 现代中西医结合杂志[J]. 2001, 10(23): 2327.
- [3] 何书平. 血竭的药理研究[J]. 中国药房. 2008, 19(24): 1912.
- [4] 黄崇根,吕国忠. 血竭在烧伤创面中的应用[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2008, 3(1): 108.
- [5] 郭杰,鲁开化,郭树忠,等. 皮肤撕脱伤撕脱皮瓣组织血管活性因子的变化及意义[J]. 中华显微外科杂志, 1997, 20(3): 221.
- [6] 刘忠和,虞冬辉,吴基良. 复方血竭胶囊对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的拮抗作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(6): 714.
- [7] 师梅梅,杨建雄. 龙血竭胶囊的体外抗氧化研究[J]. 中成药, 2007, 29(11): 1591.