

· 基础研究 ·

高压氧预处理对皮瓣移植术后大鼠
白介素-23 的影响

李雅娟 刘雪华 梁芳 武连华 庞宝森 高春锦

【摘要】目的 探讨高压氧预处理对皮瓣移植术后大鼠缺血再灌注损伤炎症反应的影响。**方法** 将 SD 大鼠 56 只按随机数字表法分为假手术组 (SH, $n=8$), 缺血再灌注组 (IR, $n=24$) 和高压氧预处理后缺血再灌注组 (HBO, $n=24$), IR 组和 HBO 组再根据取血的时间各分 3 个亚组 (IR 1 d、3 d、5 d 组和 HBO 1 d、3 d、5 d 组), 每个亚组 8 只大鼠。HBO 1 d、3 d、5 d 组于造模前 3 d 进行高压氧预处理, 每天 2 次 (间隔 12 h), 连续干预 3 d。7 组均建立腹部带蒂移植皮瓣动物模型, SH 组不夹闭或切断动静脉。造模成功后, SH 组于术后第 3 天, 其余 6 组则于对应的时间点应用酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 法检测各组大鼠血清 IL-23 水平; 同时采用组织损伤评分对 SH 组及 IR 3 d、5 d 组和 HBO 3 d、5 d 组的成活皮瓣进行组织学评分。**结果** 经高压氧预处理后, HBO 3 d 组 IL-23 水平为 $(17.80 \pm 14.78) \text{ ng/ml}$, 显著低于 IR 3 d 组的 $(38.91 \pm 12.26) \text{ ng/ml}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 组织学评分结果, IR 3 d、5 d 组和 HBO 3 d、5 d 组的组织学评分分别为 (2.66 ± 0.44) 分、 (3.20 ± 0.53) 分、 (1.85 ± 0.31) 分和 (2.29 ± 0.32) 分, 均显著高于 SH 组的 (0.38 ± 0.10) 分, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 HBO 3 d、5 d 组组织学评分均显著低于同时时间点的 IR 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 高压氧预处理可通过降低皮瓣移植术后大鼠 IL-23 水平来减轻皮瓣移植后缺血再灌注损伤的炎症反应。

【关键词】 高压氧预处理; 皮瓣移植; 白介素-23

Effects of hyperbaric oxygen preconditioning on interleukin-23 level in rats after skin flap transplantation Li Yajuan*, Liu Xuehua, Liang Fang, Wu Lianhua, Pang Baosen, Gao Chunjin. *Department of Hyperbaric Oxygen, Beijing Luhe Hospital, the Capital Medical University, Beijing 101149, China
Corresponding author: Gao Chunjin, Email: gehjw@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of hyperbaric oxygen preconditioning on ischemia-reperfusion inflammatory reaction of rats after skin flap transplantation. **Methods** Fifty-six Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: a sham ischemia-reperfusion (SH) group, an ischemia-reperfusion (IR) group and a hyperbaric oxygen preconditioning (HBO) group. Both IR group and HBO group were further divided into 3 subgroups, respectively, according to the time points of serum sampling for test post establishment of the IR model of the abdominal pedicle skin flap transplantation. The IR model of the abdominal pedicle skin flap transplantation was established in all the animals except those in the SH group, with those in the HBO group were preconditioned with HBO twice daily for 3 days before the operation. The blood was sampled at 1, 3 and 5 day post-operation to test the level of IL-23 using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The survival skin flaps were sampled from all the animals at 3 and 5 days after the operation for histological observation and evaluation. **Results** The average IL-23 level of HBO 3 d subgroup (17.80 ± 14.78) was significantly lower than that of the IR 3 d subgroup (38.91 ± 12.26). The average histological scores of the IR 3 d and 5 d subgroups, as well as HBO 3 d and 5 d subgroups were (2.66 ± 0.44) and (3.2 ± 0.53) , (1.85 ± 0.31) and (2.29 ± 0.32) , significantly higher than SH group (0.38 ± 0.10) . Moreover, the average histological score of the HBO 3 d and 5 d subgroups was significantly lower than IR 3 d and 5 d subgroups respectively. **Conclusion** Hyperbaric oxygen preconditioning can relieve the ischemia-reperfusion inflammatory reaction through reducing the serum level of IL-23 in rats after skin flap transplantation.

【Key words】 Hyperbaric oxygen preconditioning; Skin flap; Interleukin-23

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.08.003

作者单位:101149 北京,首都医科大学附属北京潞河医院高压氧科 (李雅娟);首都医科大学附属北京朝阳医院高压氧科 (刘雪华、梁芳、武连华、高春锦);首都医科大学附属北京朝阳医院呼吸疾病研究所 (庞宝森)

通信作者:高春锦, Email: gehjw@hotmail.com

皮瓣缺血再灌注损伤是引起移植皮瓣坏死的常见因素之一,减轻缺血再灌注损伤引起的组织损害是提高皮瓣成活率的关键^[1]。有研究指出,皮瓣缺血再灌注损伤是多细胞参与和多因子介导的一系列复杂的病理生理过程,从基因水平的转录、蛋白的表达以及细胞

炎症信号传导通路的建立到效应细胞的激活等一系列链式反应机制尚不完全明确^[2-5]。

高压氧治疗作为一种首要或辅助的治疗方式,因在逆转伤口缺氧和低灌注,减轻缺血再灌注损伤,促进毛细血管增殖以及防止中性粒细胞活化等方面具有其特殊且有效的作用而被广泛应用于临床皮瓣移植领域^[6]。本研究主要观察高压氧预处理对皮瓣移植后大鼠组织学和血清中炎症介质白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23)水平的影响,旨在探讨高压氧预处理减轻皮瓣移植术后缺血再灌注损伤的机制。

材料和方法

一、材料

1. 实验动物:健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 56 只,体重 250 ~ 300 g,由首都医科大学实验动物中心提供,分笼喂养,自由饮水,室温(25 ± 2)℃。

2. 主要试剂及仪器:IL-23 ELISA 试剂盒购自美国 RB 公司,高压氧舱 YLC0.5/0.8 型购自上海 701 所, BX40 显微镜购自日本 Olympus 公司。

二、实验方法

1. 实验动物分组:56 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组(SH 组, $n=8$)、缺血再灌注组(IR 组, $n=24$)以及高压氧预处理后缺血再灌注组(HBO 组, $n=24$)。IR 组和 HBO 组根据造模后取血的时间点再分 3 个亚组(即 IR 1、3、5 d 组和 HBO 1、3、5 d 组),每个亚组 8 只大鼠。

2. 实验动物处理:HBO 1、3、5 d 组大鼠均于造模前 3 d 进行 HBO 干预,将大鼠放于实验氧舱中,纯氧洗舱 5 min, 升压 10 min, 在压力 2.0 ATA 下吸氧 60 min, 减压 15 min。HBO 治疗时持续通风,氧流量维持 10 ~ 12 L/min, 舱内氧浓度在 95% 以上,舱内温度控制在 20 ~ 25℃, 湿度在 40% ~ 50%。高压氧干预每日 2 次(间隔 12 h),连续干预 3 d。所有大鼠均于 HBO 组治疗 3 d 后进行造模。SH 组和 IR 组均不接受高压氧干预。

3. 带蒂移植皮瓣模型建立^[7]:所有大鼠均以 10% 的水合氯醛(350 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,于木板架上固定。腹部备皮,设计 9 cm × 6 cm(长宽比为 3:2)皮瓣,于内膜浅层全部掀起,分离、夹闭并切断右侧腹壁下浅动静脉,保留左侧腹壁下浅动静脉,形成以左侧腹壁下浅动静脉为蒂的腹部扩大皮瓣。夹闭左侧腹壁下浅动静脉 3 h 后取下血管夹。在皮瓣下植入面积与其相同的厚度为 0.05 cm 的硅胶片(用来阻断皮瓣与供皮区的血液供应),随后原位缝合。SH 组造模过程中不夹闭或切断动静脉。

4. 标本制备和检测方法:SH 组大鼠于术后第 3

天麻醉腹主动脉取血 4 ~ 5 ml,其余 6 个亚组大鼠分别于各自对应的取血时间点麻醉后腹主动脉取血 4 ~ 5 ml。所有大鼠血样均置于清洁试管中静置 1 h 后, 2000 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm),然后将血清置于 1.5 ml Eppendorf 管中,于 -80℃ 低温保存。采用双抗体夹心酶联免疫吸附剂测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 IL-23 水平。

5. 组织学标本采集及评分:SH 组和 IR 3、5 d 组、HBO 3、5 d 组于取血后取 3 ~ 4 mm 成活皮瓣组织置于 10% 甲醛中固定 1 周,常规组织切片,包埋,行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。采用 BX40 显微镜配备的计算机显微图像自动处理系统进行图像分析。参照文献^[8]于双盲状态下对镜下皮瓣组织损伤程度进行组织损伤评分,评分内容包括出血、水肿、炎性细胞浸润和坏死。评分标准:0 分,无损伤;1 分,损伤范围 ≤ 25%;2 分,损伤范围 25% ~ 55%;3 分,损伤范围 55% ~ 75%;4 分,损伤范围 > 75%。

三、统计学分析

使用 SPSS 13.0 版统计学软件进行分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用方差分析及 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

经高压氧预处理后, HBO 3 d 组 IL-23 水平显著低于未经高压氧预处理的 IR 3 d 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);组织学评分结果, IR 3 d、5 d 组和 HBO 3 d、5 d 组的组织学评分均显著高于 SH 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且 HBO 3 d、5 d 组组织学评分均显著低于同时时间点的 IR 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 各组大鼠皮瓣移植术后大鼠血清 IL-23 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-23 表达水平 (ng/ml)	组织学评分 (分)
SH 组	8	23.54 ± 23.50	0.38 ± 0.10
IR 1 d 组	8	31.35 ± 16.69	—
IR 3 d 组	8	38.91 ± 12.26	2.66 ± 0.44 ^a
IR 5 d 组	8	28.47 ± 15.00	3.20 ± 0.53 ^a
HBO 1 d 组	8	25.37 ± 16.11	—
HBO 3 d 组	8	17.80 ± 14.78 ^b	1.85 ± 0.31 ^{ab}
HBO 5 d 组	8	24.40 ± 18.20	2.29 ± 0.32 ^{ac}

注:—为未进行评分;与 SH 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 3 d 组比较,^b $P < 0.05$;与 IR 5 d 组比较,^c $P < 0.05$

SH 组和 IR 3、5 d 组、HBO 3、5 d 组皮瓣组织 HE 染色结果:SH 组大鼠皮瓣组织存活良好,细胞形状规则,细胞核与细胞质分别染色均匀,出血、血管壁及组织周围炎症细胞数量较少。IR 3、5 d 组组织细胞形态不规则,细胞核固缩、碎裂现象严重,组织周围有出血

及大量炎性细胞浸润。HBO 3 d、5 d 组皮瓣细胞形态略有不规则,部分细胞核出现固缩,但出血及炎性浸润情况明显减轻。详见图 1。

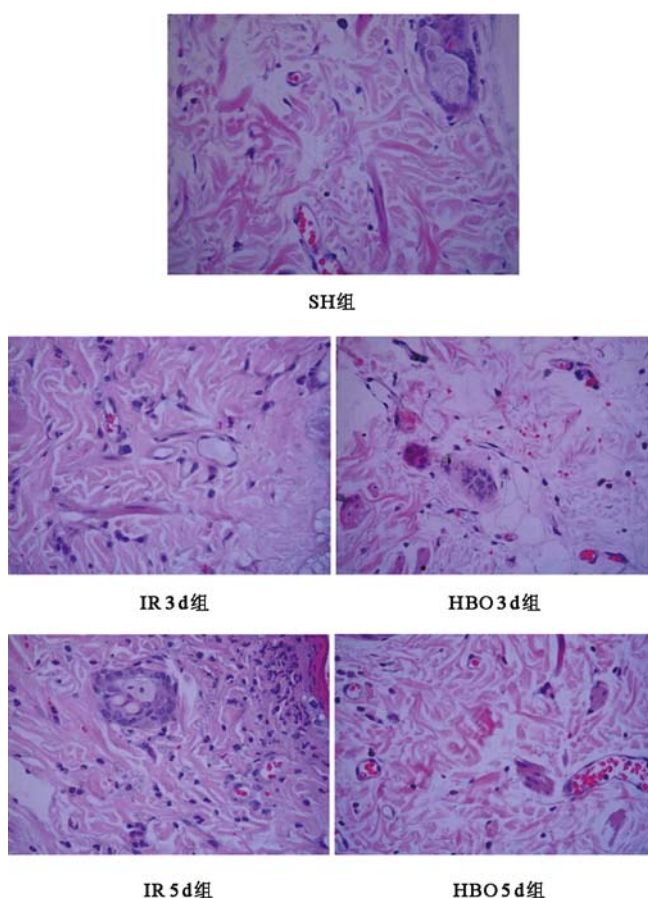


图 1 各组大鼠皮瓣组织 HE 染色结果比较 (HE 染色, $\times 400$)

讨 论

高压氧治疗作为一种无创的治疗方法,早在 1967 年就被运用于提高移植皮瓣的成活率,此后国内外学者进行了大量的动物和临床实验研究,均证实术后高压氧治疗可提高皮瓣成活率,且其机制与高压氧可提高组织氧分压、促进血管增生、抑制缺血再灌注损伤等有关^[6,9-10]。2000 年,有研究证实,反复的高压氧暴露可预防动物脑和脊髓的缺血性损伤^[11-12],提示高压氧预处理可预防机体缺血性损伤的发生。朱春艳等^[13]的研究发现,连续高压氧预处理 4、8、16 d 均可减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤,而连续高压氧预处理 8 d 后其作用逐渐减弱。有研究提出,高压氧预处理可上调内源性抗氧化酶活性,在缺血再灌注的过程中可有效地对抗自由基,减少氧自由基所导致的氧化损伤介导的细胞凋亡,减轻脊髓缺血损伤^[14]。高压氧预处理也可通过增加脑中脑源性神经营养因子水平和抑制 p38 的活化从而减少细胞的早期凋亡,以及阻止早期凋亡

转化为晚期凋亡^[15]。还有研究认为,高压氧预处理机制在一定程度上与热休克蛋白表达变化、过氧化氢酶及超氧化物歧化酶活性提高、血管内皮生长因子表达的变化以及早期凋亡受抑制有关^[16]。

本研究结果可见,IR 3 d、5 d 组和 HBO 3 d、5 d 组的组织学评分均显著高于 SH 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且 HBO 3 d、5 d 组组织学评分均显著低于同时时间点的 IR 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),即 HBO 3 d、5 d 组的组织损伤范围明显低于同时时间点的 IR 组。具体表现在 IR 3 d、5 d 组组织细胞形态不规则,细胞核固缩、碎裂现象严重,组织周围有出血及大量炎性细胞浸润。HBO 3、5 d 组皮瓣细胞形态略有不规则,部分细胞核出现固缩,但出血及炎性浸润情况较 IR 3、5 d 组明显减轻。该结果提示,高压氧预处理可减轻皮瓣移植术后大鼠的缺血再灌注炎症反应。这与戚征等^[9]的研究结果一致。

缺血再灌注炎症反应是组织器官移植过程中的重要病理生理过程,其发生发展有众多炎症介质参与。IL-23 是 Oppmann 等^[17]于 2000 年发现的一种新的免疫调节因子,主要来源于活化的单核巨噬细胞和 B 细胞,是 IL-12 细胞因子家族的新成员。IL-23 作为一种促炎症细胞因子主要作用于记忆性 T 细胞,具有影响免疫反应的作用,还具有潜在的抗肿瘤、抗感染作用。IL-23 有前炎症反应活性,IL-23 因子激活后大量分泌前炎症介质,可趋化炎症细胞聚集与迁移,促进炎症反应,如上调 MMP-9 活性和增加血管的生成^[18]。

本研究结果显示,HBO 3 d 组 IL-23 水平显著低于未经高压氧预处理的 IR 3 d 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示高压氧预处理可降低皮瓣移植术后大鼠 IL-23 的水平,抑制皮瓣移植大鼠缺血再灌注损伤炎症反应的作用。这与梁芳等^[19]的研究结果一致。刘雪华等^[20]的研究提示 HBO 预处理可通过降低移植皮瓣大鼠基质金属蛋白酶-9、血清高迁移率族蛋白 1 水平来减轻皮瓣移植后缺血再灌注的炎症反应。但本研究中,HBO 1、5 d 组均与同时时间点的 IR 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),可能是因为 IL-23 在术后的产生呈逐渐升高的曲线,至第 3 天达到峰值,而后逐渐下降,而 HBO 预处理的作用在术后第 3 天也开始逐渐消失。

综上所述,HBO 预处理可减轻皮瓣移植术后大鼠的缺血再灌注炎症反应,其作用机制是 HBO 预处理可通过降低移植皮瓣大鼠 IL-23 水平,抑制炎症反应,从而减轻移植皮瓣缺血再灌注损伤。

参 考 文 献

- [1] 张巍,顾文奇,柴益民. 皮瓣缺血-再灌注损伤的机制研究进展

- [J]. 国际骨科学杂志, 2011, 32(2): 108-110.
- [2] 徐瑞生, 葛建华, 雷玉凯, 等. 雌激素改善皮瓣再灌注损伤和血供的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009; 23(8): 964-968.
- [3] Wu X, Yu M, Li A. Protective effect of a nuclear factor-kappa B inhibitor on ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric flap model [J]. J Reconstr Microsurg, 2008; 24(5): 351-359.
- [4] Tamas R, Nemeth N, Brath E, et al. Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model [J]. Microsurgery, 2010; 30(4): 282-288.
- [5] 刁立君, 仇树林. 皮瓣缺血再灌注损伤与细胞凋亡的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2008, 17(8): 1240-1243.
- [6] Phillips JC. Understanding hyperbaric oxygen therapy and its use in the treatment of compromised skin grafts and flaps [J]. Plast Surg Nurs, 2005, 25(2): 72-80.
- [7] Kuntischer MV, Schirmbeck EU, Menke H et al. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model [J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(7): 2398-404.
- [8] Zdichavsky M, Kratt T, Stüker D et al. Acute and elective laparoscopic resection for complicated sigmoid diverticulitis: clinical and histological outcome. [J]. Gastrointest Surg, 2013, 17(11): 1966-71.
- [9] 戚征, 刘雪华, 王友彬, 等. 高压氧预处理促进皮瓣成活的研究 [J]. 中华医学美容美容杂志, 2009; 15(1): 46-48.
- [10] Richards L, Lineaweaver WC, Stile F, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the tubed pedicle flap survival in a rat model [J]. Ann Plast Surg, 2003, 50(1): 51-56.
- [11] Freiburger JJ, Suliman HB, Sheng H, et al. A comparison of hyperbaric oxygen versus hypoxic cerebral preconditioning in neonatal rats [J]. Brain Res, 2006, 1075(1): 213-222.
- [12] Wang YC, Zhang S, Du TY, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by stimulating autophagy in neurocyte [J]. Brain Res, 2010, 1323(4): 149-51.
- [13] 朱春艳, 刘宝, 周树生, 等. 不同高压氧预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的研究 [J]. 安徽医药, 2011, 15(7): 820-822.
- [14] Nie H, Xiong L, Lao N, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(5): 666-674.
- [15] Ostrowski RP, Graupner G, itova E, et al. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(1): 1-13.
- [16] Koca K, Yurtas Y, Bilgic S, et al. Effect of preconditioned hyperbaric oxygen and ozone on ischemia-reperfusion induced tourniquet in skeletal bone of rats [J]. Surg Res, 2010, 164(1): e83-9.
- [17] Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12 [J]. Immunity, 2000, 13(5): 715-725.
- [18] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 [J]. Biol Chem, 2003, 278(3): 1910-1914.
- [19] 梁芳, 高春锦, 刘雪华. 高压氧预处理对皮瓣移植术后大鼠缺血再灌注损伤炎症反应的影响 [J]. 中华航海医学与高压医学杂志, 2012, 19(3): 176-179.
- [20] 刘雪华, 梁芳, 李雅娟, 等. 高压氧预处理对移植皮瓣大鼠炎性介质基质金属蛋白酶-9 及高迁移率蛋白 B 1 的影响 [J]. 中华航海医学与高压医学杂志, 2012, 19(5): 301-303.

(修回日期: 2015-06-13)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 短篇论著 ·

体外冲击波联合肩峰双注射治疗原发性冻结肩的疗效观察

谢美明 范凌 李伟 刘金标 崔琳 黄钢 潘显明

原发性冻结肩以患肩主被动活动功能受限为主要表现, 其病因和发病机制尚不十分清楚, 临床上多采用保守治疗, 若保守治疗不理想可导致肩关节囊挛缩、关节粘连、关节疼痛及活动受限^[1-3]。目前, 保守治疗的内容主要包括休息、手法松解、肌肉能量技术、等速肌力训练、物理治疗、局部注射皮质类固醇药物、口服非甾体类抗炎药等^[4-5]。如何缩短康复时间、降低病残率、提高原发性冻结肩保守治疗的有效率仍是当今康复医学和骨科研究者所面临的严峻挑战之一。体外冲击波是物理治疗的一

种有效手段, 但其治疗无菌性炎症的效果不佳^[6-7]。有研究报道, 复方倍他米松注射液有利于原发性冻结肩无菌性炎症吸收^[8]。本研究将体外冲击波与肩峰双注射治疗联合应用, 探讨其对原发性冻结肩的疗效, 旨在为治疗原发性冻结肩提供新思路。

一、对象与方法

(一) 研究对象

选取 2008 年 12 月至 2013 年 6 月在成都军区总医院骨科门诊就诊的原发性冻结肩患者 126 例 (126 肩), 其中男 75 例, 女 51 例; 年龄 38 ~ 76 岁; 左肩 28 例, 右肩 98 例, 双侧冻结肩患者取右肩受试。纳入标准: ①符合原发性冻结肩的诊断标准^[9]; ②患肩疼痛、活动受限, 影响穿衣、梳头、投掷、提重物、睡觉等日常生活; ③患肩压痛明显, 前屈、后伸、内外旋均不同程度

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.08.004

基金项目: 成都军区总医院管课课题 (2013YG-B103)

作者单位: 610083 成都, 成都军区总医院骨科

通信作者: 潘显明, Email: panxianming@medmail.com.cn