

## 局部应用 VEGF 对失神经皮瓣抗菌力影响的实验研究

褚立明,张彦军,穆树林,张明,贺房勇,张松林  
(河北联合大学附属医院急诊科,河北唐山 063000)

**摘要:**目的 观察血管内皮生长因子(VEGF)在失神经皮瓣中对白细胞功能的影响,探讨 VEGF 在皮瓣抗感染中的作用机理。方法 选用 60 只 Wister 大鼠,制作右下腹 2 cm×2 cm 岛状皮瓣的动物模型,随机分为 3 组。所有皮瓣接种金黄色葡萄球菌悬液( $5 \times 10^7$  /mL)2 mL,动物观察 96 h 后处死。测定白细胞计数、白细胞活力、中性粒细胞化学发光、组织细菌计数、皮瓣组织肉眼观察及光镜观察等指标。结果 术后 96 h 三组渗出液中白细胞计数比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );而在白细胞活力、中性粒细胞化学发光、组织细菌计数等指标测定中,慢性失神经组较对照组差异有统计学意义( $P < 0.01$ );VEGF 治疗组较慢性失神经组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。皮瓣组织病理变化:对照组及 VEGF 治疗组皮瓣的病理改变较轻。结论 软组织失去神经支配后,降低了白细胞的功能。而血管内皮生长因子能改善皮瓣微循环,并有增强白细胞功能的作用。

**关键词:**失神经;岛状皮瓣;血管内皮生长因子;感染;白细胞功能

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)03-0304-03

### Experimental study on effect of local application of vascular endothelial growth factor on antibacterial power of denervated skin flap

Chu Liming, Zhang Yanjun, Mu Shulin, Zhang Ming, Hu Fangyong, Zhang Songlin

(Department of Emergency, Affiliated Hospital of Hebei Union University, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of vascular endothelial growth factor(VEGF) on the leukocyte function in a rat denervated infect flap model and to investigate the action mechanism of VEGF in the flap anti-infection. **Methods** An island pedicle flap measured 2 cm×2 cm was raised on the right abdomen of sixty wister rats, which were divided into three groups. All flaps received intradermal inoculation of 107 Staphylococcus aureus, and the animals were observed for 96 h. The indexes of the leukocyte count, leukocyte vitality, hemiluminescence of neutrophils, tissue bacterial count, naked eyes observation of flap tissue and the light microscope observation were detected. **Results** The leukocyte count in the exudation at postoperative 96 h had no statistical differences among 3 groups( $P > 0.05$ ); while in the indexes detection of the leukocyte vitality, chemiluminescence of neutrophils, tissue bacterial count, etc., the comparison between the chronic denervated group and the control group showed very significantly differences( $P < 0.01$ ); the differences between the VEGF treatment group and the chronic denervated group was very significant( $P < 0.01$ ). The flap pathological change in the control group and the VEGF treatment groups was slight. **Conclusion** The soft issue after losing the innervation decreases the leukocyte function. VEGF might improve the flap micro circulation and play an important role in improving the leukocyte function.

**Key words:** denervation; island flap; vascular endothelial growth factor; infect; leukocyte function

截瘫患者长期卧床,极易产生褥疮,褥疮容易反复感染,不但增加了患者的护理难度,还加重了患者的心理负担,所以对于截瘫患者褥疮的治疗及研究进展,国内外一直有相关报道。有研究发现,在没有神经支配软组织伤口中,其细菌增长数量是有神经支配伤口的 100 倍。1992 年,Alison 等<sup>[1]</sup>建立了失神经岛状皮瓣模型观察发现,在慢性失神经皮瓣中,其细菌生长的数量是有神经支配皮瓣和急性失神经皮瓣组的 25 倍。因此,截瘫患者易患褥疮,与局部长期失神经有关。血管内皮生长因子(VEGF)是一种能特异性地作用于血管内皮细胞的糖蛋白,具有促进内皮细胞增殖,增加血管通透性,诱导血管生成等多种功能<sup>[2]</sup>。国内外学者对 VEGF 在不同类型皮瓣存活中的具体作用和相关机制做过一些报道<sup>[3-5]</sup>,但是 VEGF 用于失神经皮瓣白细胞功能的研究,国内外尚未见有报道。为此作者制作了大鼠失神经感染皮瓣模型,通过检测白细胞功能的一些

重要指标,为截瘫患者褥疮的治疗提供新的治疗途径。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康 4 月龄 Wister 雌性大鼠 60 只,体质量 250~300 g,分笼喂养,自由饮水,室温( $25 \pm 2$ )℃,湿度 40%~50%。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠慢性失神经感染皮瓣模型的制作<sup>[6-7]</sup>** 实验动物术前 1 d 8%硫化钠脱毛,备皮,温水清洗试干,实验前晚停止喂食,3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射,麻醉成功后俯卧位固定,在右侧腹股沟区设计 2 cm×2 cm 以腹壁下血管为蒂的岛状皮瓣,皮瓣内下角定位在腹股沟第二乳腺,皮瓣逆行切取,完全游离血管、分离腹部神经并离断,制作下腹壁失神经皮瓣,所有动物皮瓣原位缝合,室温下饲养 7 d,使其形成慢性失神经模型。整个手术在显微镜下进行并注意无创操作。7 d 后,按

原切口切开皮肤,皮下埋置长 1.5 cm 直径 0.5 cm 的铜网圆柱体(50 目金属滤网卷成,两端用硅胶膜封闭,穿刺针可自此进出),以便抽取渗出液。放回岛状皮瓣,覆盖圆柱体,1 号丝线间断原位缝合。术后即用 7 号针头经皮穿刺,从圆柱体近端刺入,清除渗出后,接种金黄色葡萄球菌悬液( $5 \times 10^7$  / mL)2 mL。皮瓣手术均由同一人完成,所用器械及材料均经过严格消毒且整个过程均在无菌条件下进行。为防止大鼠自行撕咬及皮瓣回缩变形,从而使测量结果更准确,采用石膏环形固定皮瓣。方法是先以数层纱布包裹腹部,再以石膏环形固定于纱布上面,上、下界略超出皮瓣。

**1.2.2 实验分组** 随机分成对照组、慢性失神经组和 VEGF 治疗组。对照组、慢性失神经组每瓣皮下注射 0.4 mL 生理盐水,分多位点注射。VEGF 治疗组每瓣皮下注射 0.4 mL 浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 VEGF,分多位点注射。分别于细菌注射的同时给药。所有动物观察 96 h 后处死,抽出渗液,用于分离白细胞。

**1.2.3 渗液白细胞的分离** 术后 96 h 从金属圆柱体内抽出 0.5 mL 渗液,用 10 mL M199 溶液稀释,反复多次离心,并用 0.83% NH<sub>3</sub>Cl-Tris-HCl 溶液将红细胞溶解掉,收集白细胞,悬浮到 3 mL M199 溶液中。

**1.2.4 白细胞计数及白细胞活力的检测** 用血球计数器计数总的白细胞数,采用台盼蓝拒染法检测白细胞的活力=有活力的白细胞数/总白细胞数。

**1.2.5 化学发光法检测中性粒细胞氧化暴发功能**

**1.2.5.1 调理酵母多糖,准备发光溶液**<sup>[8]</sup> 100 mg 酵母多糖加入到 20 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中,煮沸、离心,扔掉上清液,加入到羊血清中,孵育、再离心,扔掉上清液,剩下的酵母多糖加入到 10 mL PBS 溶液中,待用。17.7 mg 的 luminol 加入到 2 mL 二甲亚砜和 48 mL 0.9% NaCl 溶液中,充分混合后,取 5 mL 加入到 45 mL 0.9% NaCl 溶液中,配制成 50 mL 的 luminol 溶液。

**1.2.5.2 测定化学发光** 取 1 mL 中性粒细胞悬浮液放入到聚乙烯发光小瓶,加入 2 mL luminol 溶液和 0.1 mL 调理过酵母多糖,小瓶被放到液体闪烁计数仪上,在室温下测定,每次 6 s,共测 10 次,取平均值,结果用每分钟化学发光脉冲数(CPM)表达。

**1.2.6 组织细菌计数**<sup>[8]</sup> 切取皮瓣皮下及肉膜层少许组织,无菌称重,以 1:10 比例稀释在无菌盐溶液中,并培养在 5% 血液琼脂培养基中,在 37  $^{\circ}$ C 温箱中孵育 48 h,然后计数,用每克组织中含菌落形成单位(CFU)表示。

**1.2.7 组织学观察**

**1.2.7.1 肉眼观察** 观察皮瓣的色泽及脓肿分布情况。

**1.2.7.2 光镜观察** 术后 96 h 从皮瓣中央取材,固定包埋,切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,各组数据均作正态性检验及方差齐性检验,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。统计方法采用单因素方差分析检验各组间的差异性,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 白细胞计数及白细胞活力** 术后 96 h 3 组渗出液中白细

胞计数差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组比较,慢性失神经组的白细胞活力显著降低( $P < 0.05$ )。VEGF 治疗组经 VEGF 干预后,其白细胞的活力显著提高,与慢性失神经组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

**表 1 各组渗出液中白细胞计数及白细胞活力比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	白细胞计数( $10^9$ / L)	白细胞活力(%)
对照组	10	181.20 $\pm$ 63.45	66.00 $\pm$ 10.27
慢性失神经组	10	170.50 $\pm$ 76.27	40.50 $\pm$ 13.97
VEGF 治疗组	10	184.10 $\pm$ 114.07	59.40 $\pm$ 11.74

**2.2 中性粒细胞化学发光** 与对照组比较,慢性失神经组中性粒细胞化学发光显著降低( $P < 0.01$ )。经 VEGF 治疗后,VEGF 治疗组化学发光显著提高,与慢性失神经组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2。

**表 2 各组渗出液中中性粒细胞化学发光比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	中性粒细胞化学发光(CPM/ $10^6$ )
对照组	10	140.20 $\pm$ 36.98
慢性失神经组	10	13.50 $\pm$ 6.25
VEGF 治疗组	10	125.60 $\pm$ 47.15

**2.3 组织细菌计数** 与对照组比较,慢性失神经组每克组织细菌计数差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。经 VEGF 治疗后,VEGF 治疗组组织细菌计数显著降低,与慢性失神经组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 3。

**2.4 组织学观察**

**2.4.1 肉眼观察** 对照组:皮瓣弹性较好,色泽尚可,稍有苍白,散在稀疏的脓肿,未见坏死区。慢性失神经组:皮瓣弹性较差,色泽苍白,肿胀,脓肿较大,较密集,可见明显的溃疡,部分坏死。VEGF 治疗组:皮瓣弹性尚可,肿胀,脓肿稀疏,坏死较轻。

**表 3 各组组织细菌计数比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	组织细菌计数( $\times 10^5$ CFU/g)
对照组	10	2.63 $\pm$ 1.34
慢性失神经组	10	13.35 $\pm$ 6.76
VEGF 治疗组	10	5.76 $\pm$ 3.57

**2.4.2 光镜观察** 对照组:皮肤表皮、毛囊及皮脂腺等结构基本正常,散在炎性渗出,没有明显的组织细胞损伤。慢性失神经组:皮肤结构严重破坏,皮肤附件(毛囊、汗腺及皮脂腺)消失,组织坏死明显,病变部位较深、较广,炎症反应较重,可见大片炎性渗出,皮下大量炎性细胞浸润。VEGF 治疗组:皮肤结构尚清,炎症反应较轻,组织坏死不明显。

**3 讨 论**

许多实验均证实了失神经能够增加软组织的易感性。然而这一事实的确切机制却一直不清楚。有实验证实了失神经能够使血管舒缩紊乱,并能导致软组织水肿,而压力和失神经所导致的水肿是淋巴性和静脉性的,它能导致皮肤免疫功能的改变,而这些改变最终导致了皮肤抗感染能力的低下,增加了软组织在褥疮中受破坏的程度。有学者也证实了压力、局部缺

血以及组织水肿所导致的细菌大量繁殖与组织失神经有密切关系。缺少神经生长因子(NGF)或其他神经递质确实能够降低机体对于局部组织感染发生后应激反应的能力,这个结论在慢性失神经感染皮瓣模型中得到了证实。有实验证实 P 物质能够增强机体组织的炎性反应,所以在失神经的组织中炎性反应明显减弱。NGF 被认为能够影响非特异性炎性细胞的氧化物质代谢<sup>[9]</sup>,而且能够调节中性粒细胞的趋化性。所以无论是在急性失神经皮瓣还是在慢性失神经皮瓣,软组织中的局部 NGF 水平都会降低,特别是在慢性失神经皮瓣中,表现尤为突出。可以从一个侧面解释为什么失神经的组织比没有失神经的组织更具有易感性。然而,缺乏神经递质和 NGF 到多大程度才能影响机体的抗感染能力,目前还不清楚。

Kim 等<sup>[10]</sup>研究发现 VEGF 可以刺激细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、内皮细胞选择素和血管细胞黏附分子-1 (vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1)的 mRNA 的表达,这种上调效应可被 KDR(Flk-1)的拮抗剂所抑制,也可被磷脂酶 C、NF- $\kappa$ B、鞘氨醇激酶与蛋白激酶 C 的抑制剂所抑制。但抑制 NO 合酶及有丝分裂原激活蛋白激酶的激酶后对此无影响。凝胶移动分析显示 VEGF 可以刺激 NF- $\kappa$ B 的活性,上述结果说明 VEGF 增加 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白质表达及促进白细胞的黏附是通过 NF- $\kappa$ B 信号通路实现的。VEGF 增加了 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达和主要组织相容性复合体 I、II 的表达,促使自然杀伤细胞(natural killer, NK)与内皮细胞黏附,并且 VEGF 对单核细胞具有趋化性。因此,VEGF 能吸引单核、巨噬细胞到达损伤处,诱导 MHC、ICAM-1 等分子表达,参与组织的免疫反应<sup>[11]</sup>。另外,ICAM-1 主要与中性粒细胞表面的 LFA-1 和 Mac-1 结合,Mac-1 表达于中性粒细胞、单核细胞、NK 细胞上,是中性粒细胞表达的主要整合素家族成员,可促进中性粒细胞的吞噬功能和氧自由基的释放<sup>[12]</sup>。因此,VEGF 有增强白细胞特别是中性粒细胞功能的作用。

本实验研究结果显示,术后 96 h VEGF 治疗组的白细胞活力较慢性失神经组显著提高,中性粒细胞化学发光亦显著提高,组织细菌计数显著降低。这充分说明 VEGF 改善了白细胞的功能水平,提高了白细胞吞噬细菌、杀灭细菌能力,从而提高了皮瓣清除细菌的能力。

总之,从本实验的数据中可以得出,在感染岛状皮瓣模型中,慢性失神经不但增强了细菌生长繁殖的能力,而且降低了白细胞的功能。适量的 VEGF 可以增强失神经皮瓣的抗感染能力,为修复重建外科提供新的途径,但这并不是说 VEGF 没有缺点,和其他细胞因子一样,在机体中它也是扮演着双重角色,它既能改善微循环、增强血供,以及增强白细胞功能,又有诱导炎性反应的作用,从而加重组织的炎性水肿。所以,进一步研究 VEGF 在失神经皮瓣中对白细胞功能影响的作用机制,以便在应用时选择适当的给药方法和给药途径,减少 VEGF 带来的不利影响。

#### 参考文献:

[1] Alison WE, Phillips LG. The effect of denervation on soft

tissue infection pathophysiology[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1992,90(10):1031-1035.

- [2] Neufeld G, Cohen T, Stela G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999,13(1):9-22.
- [3] Kryger Z, Zhang F, Dogan T, et al. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration [J]. *Br J Plast Surg*, 2000, 53(3):234-239.
- [4] Zhang F, Richards L, Angel MF, et al. Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model [J]. *Br J Plast Surg*, 2002,55(1):59-63.
- [5] 李青峰, 平萍, 张涤生. 血管内皮生长因子促进预构皮瓣成活的实验研究 [J]. *中华整形外科杂志*, 2002, 18(2):4-6, 64.
- [6] Karacalar A, Oztürk H, Ozcan M. Effect of surgical denervation on the viability of inferior epigastric neurovascular flaps in the rat [J]. *Ann Plast Surg*, 2000,45(3):298-304.
- [7] 杨勇, 何清濂, 林子豪, 等. 真皮下血管网岛状皮瓣抗菌力的实验研究 [J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1996,12(1):15-18.
- [8] Hui PS, Pu LL, Kucukceleki A, et al. The effect of denervation on leukocyte function in soft tissue infection [J]. *Surgery*, 1999,126(5):933-938.
- [9] Kannan Y, Ushio H, Koyama H, et al. 2. 5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils [J]. *Blood*, 1991,77(6):1320-1325.
- [10] Kim L, Moon SO, Kim SH, et al. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10):7614-7620.
- [11] Proescholdt MA, Jacobson S, Tresser N, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflammatory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002,61(10):914-925.
- [12] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm [J]. *Cell*, 1994,76(2):301-314.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-28)