

取样方式对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤模型 细胞因子测定的影响^{*}

覃仕瑞¹ 赵 岭¹ 谢 飞¹ 马雪梅^{1**} 王友彬^{2**}

(1 北京工业大学生命科学与生物工程学院 北京 100022 2 北京协和医院 北京 100032)

摘要 目标:利用大鼠腹岛状皮瓣构建缺血再灌注损伤模型,评价距血管夹闭点近、中、远不同距离的位置取样是否会影响细胞因子的检测,为该模型实验确立一种合理的取样方式。方法:对术后5天的大鼠成活皮瓣按照近、中、远三个位置进行取样,分别测定各样品的4种细胞因子IL-1 β , IL-6, TNF- α 和EPO的表达量,并用配对T检验分析评价三种取样方式。结果:样品中IL-1 β , IL-6, TNF- α 和EPO在缺血再灌注组的表达水平较假手术组显著上调;同一细胞因子在同一皮瓣不同取样位置的表达量在统计学上无显著性差异。结论:取样位置并不影响细胞因子的测定,即可以从成活皮瓣的任意位置取样测定相应细胞因子,但是在同一批实验中不同皮瓣取样位置须一致。

关键词 缺血再灌注损伤 皮瓣 细胞因子 取样方式

中图分类号 Q819

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是指缺血基础上恢复血流后组织损伤反而加重的现象^[1]。在整形外科,皮瓣移植经常应用于修复由外伤、肿瘤、手术切除等引起的组织损伤,而缺血再灌注损伤依然是导致临床手术中皮瓣部分或全部坏死的主要原因^[2]。

缺血再灌注损伤常常会引起炎症反应^[3],产生多种炎症因子,这些因子在炎症反应中起着关键作用,可以作为评价炎症反应水平的重要“标志”^[4]。大鼠腹岛状皮瓣模型是用于缺血再灌注损伤研究的一个理想模型,在大鼠下腹壁剥离含腹壁浅动、静脉的岛状皮瓣,切断右腹股动脉,保留左腹股动脉,以保证皮瓣的血液和营养供给只来源于左腹股动脉。夹闭左腹股动脉一定时间之后恢复血流供给,就可以形成缺血再灌注。术后大鼠皮瓣从远离左腹股动脉的位置开始坏死,随着时间的推移坏死区域逐渐向保留血管蒂位置蔓延,成活区域梯度大致呈三角形,可用以直接观察皮

瓣的损伤和成活面积,并通过测定炎症因子在皮瓣中的表达水平评价缺血再灌注损伤中的炎症反应水平。然而在该模型中取样位置(即取样点距保留血管蒂的距离)是否会影响炎症因子的测定尚不明确。

炎症反应产生各种表达水平不同的炎症细胞因子,为了探究取样方式对炎症细胞因子的影响,选择表达水平不同的细胞因子作为研究目标。白细胞介素-1 β (IL-1 β)属于白细胞介素1家族,是一种促炎因子^[5],主要由活化的单核-巨噬细胞产生,与细胞的增殖、分化和凋亡有关,在炎症反应中属于高水平表达细胞因子。白细胞介素-6(IL-6)主要由T细胞和巨噬细胞分泌,是一种多功能的细胞因子,在机体中主要参与急性免疫反应,起着加强固有免疫系统和防止组织损伤的作用^[6],IL-6的表达水平是用来评价组织损伤的重要指标之一^[7]。同样IL-6也是炎症反应中表达水平较高的细胞因子之一。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)由活化的单核巨噬细胞产生,促进细胞增殖和分化,并参与一些组织损伤^[8],在炎症反应中表达水平较低。红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是骨髓中红细胞的前体,在伤口愈合过程中具有非常重要的作用^[9],属于低

收稿日期:2011-12-09 修回日期:2012-02-18

^{*} 北京市生物学产学研联合培养(015000541211009)资助项目

^{**} 通讯作者,电子信箱:xmma@bjut.edu.cn

水平表达的炎性因子。

为此,我们设计在成活皮瓣腹壁下动脉夹闭端的近、中、远3个位置分别取样并测定样品中相应炎性因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和 EPO 的表达量,通过统计学分析评价不同取样方式对炎性因子测定的影响,进而确定用于大鼠腹岛状皮瓣模型的合理取样方式,为缺血再灌注的研究提供方法学支持。

1 材料与方法

本实验均遵循国际动物委员会的相关规定并经北京协和医院动物伦理委员会批准。

雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠喂养于 22 ~ 25 $^{\circ}$ C 的环境中,术前术后均采用自由喂食和饮水。实验设计为随机对照试验,将 25 只体重在 250 ~ 300g,生长状况相同的大鼠随机分成 2 组,分别为假手术组 (n = 10) 和缺血再灌注组 (n = 15)。

1.1 手术过程

大鼠用 10% 水合氯醛 (350mg/kg) 腹腔注射麻醉。将大鼠固定于手术平板上,腹部去毛,在下腹壁设计 6cm \times 9cm 的含腹壁浅动、静脉的岛状皮瓣^[10]。为确保皮瓣的血液营养供给只来源于左腹壁下浅动脉,将右腹壁下浅动脉切断,保留左腹壁下浅动脉。

皮瓣制备完成后将皮瓣缝合于原位置,在皮瓣和腹部肌肉之间垫一层硅胶膜防止新生血管着床,以保证皮瓣的血液营养供给只来源于左腹壁下浅动脉。实验分为两组:其中假手术组大鼠不做任何处理,即皮瓣制备后直接缝合,不作腹壁下浅动脉夹闭,不阻断皮瓣血流;缺血再灌注组大鼠皮瓣制备完成之后立即用血管夹夹闭左腹壁下浅动脉,用以制造组织缺血,然后再进行缝合,夹闭时间为 3 小时。夹闭完成之后小心取下血管夹并在夹闭部位进行轻微按摩以辅助夹闭血管尽快恢复血流供应。最后在大鼠颈部固定一颈圈,防止大鼠自残腹部皮瓣或者相互撕咬损伤皮瓣。

1.2 成活面积检测

在术后 5 天,用激光多普勒血流灌注成像仪 (PeriScan PIM3, Perimed AB, Sweden) 观测皮瓣成活与坏死的面积。激光多普勒血流灌注成像仪基于激光多普勒原理,能较好地监测皮瓣的微循环,区分坏死和成活区域,从而较准确地测量和计算皮瓣成活率,即:皮瓣成活率 (%) = 皮瓣成活面积/皮瓣总面积 \times 100%。

1.3 取样

对成活皮瓣取样,实验中定义离夹闭点最近的成

活皮瓣为近段,沿着左腹壁下浅动脉延伸最远的为远段,中间部位为中段。如图 1 所示,按照近、中、远段分别取样,样品面积大约为 1cm²,将收集好的皮瓣样品迅速放入液氮备用。

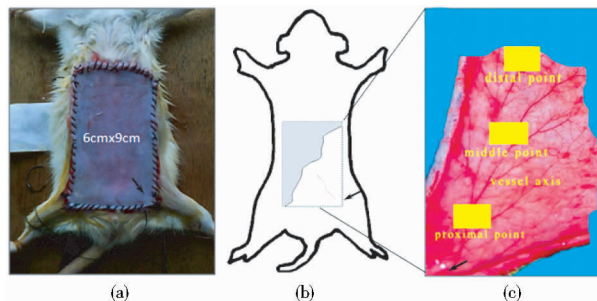


图 1 皮瓣取样位置示意图

Fig. 1 Schematic illustration of sample collection

Skin flap (6cm \times 9cm) were elevated on each animal (a) and harvested on the postoperative day 5. The demarcation between necrotic and survival tissue became clear (b) The gray part indicates the necrotic flap and white part indicates the survival flap. And flaps were harvested at the proximal, middle and distal points along the vascular axis (c) Sample size was around 1cm². The black arrow indicates the clamping position

1.4 蛋白提取及定量

参照 Bio-rad 蛋白提取试剂盒说明书提取样品总蛋白:取 100mg 样本,用液氮研磨后,加入 1ml 裂解液进行均浆,4 $^{\circ}$ C、14000r/min 离心 10min。取上清, - 80 $^{\circ}$ C 留存备用。按照 Bradford 法对提取的蛋白进行定量,即使用 BSA 建立标准曲线后,通过吸光度和浓度间的线性关系检测样品浓度,样品蛋白终浓度为 900 μ g/ml。

1.5 细胞因子检测

样品 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和 EPO 的表达水平均通过 Bio-plex 悬液芯片系统大鼠 23 因子检测试剂盒 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA) 进行检测。参照 Bio-rad 细胞因子检测试剂盒说明用双抗夹心法检测皮瓣组织的炎性因子,具体步骤如下:将包被有抗体的微珠震荡混匀 30s, 96 孔板每孔加入 25 μ l, 抽滤。150 μ l Wash buffer 清洗 1 次, 抽滤。加入梯度稀释的标准品或样品, 室温混匀 30min。150 μ l Wash buffer 清洗 3 次, 抽滤。每孔加入预混检测抗体 25 μ l, 室温混匀 30min。150 μ l Wash buffer 清洗 3 次, 抽滤。每孔加入 50 μ l Streptavidin-PE, 室温混匀 30min。150 μ l Wash buffer 清洗 3 次, 抽滤。加入 Reading buffer, 震荡 5min, 上机检测。

1.6 统计学方法

应用SPSS17.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行组间配对T检验及方差分析,数据以均值±标准差(mean±SEM)表示, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 实验结果

2.1 皮瓣成活面积

如图2所示,术后5天皮瓣坏死部分与成活部分已经产生了明显的界限。坏死部分干瘪、颜色呈深棕或黑色,而存活皮瓣质地柔软,颜色新鲜,并有部分毛根生长。假手术组的皮瓣成活比率为 $(63.8\pm19.80)\%$,缺血再灌注组皮瓣成活比率为 $(13.92\pm3.42)\%$,两组之间成活面积具有显著性差异($P<0.01$)。

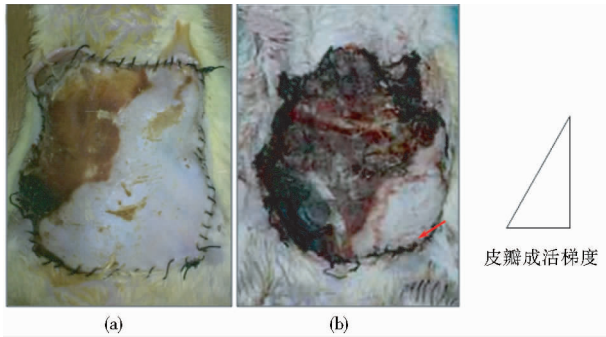


图2 术后5天皮瓣成活率检测

成活部位从血管蒂部位延腹股动脉大致呈三角区域

Fig.2 Survival rate of flap on the postoperative day 5

Flap survival rate in sham group (a) was $(63.8\pm19.80)\%$. Flap survival rate in IR group (b) was $(13.92\pm3.42)\%$. The result showed that the sham group had a significantly higher surviving area than IR group($P<0.01$). The red arrow indicates the clamping position

2.2 炎症因子表达的检测与比较

2.2.1 假手术组和缺血再灌注组比较 将测得的各炎症因子的表达量分组求平均值(表1)。

表1 假手术组和缺血再灌注组炎症因子表达水平比较

Table 1 Comparison of the level of cytokines between sham group and IR group

炎症因子	平均表达水平 (pg/ml)		P
	假手术组(n=10)	缺血再灌注组(n=15)	
IL-1 β	274.51±49.17	1997.90±311.97	0.000
IL-6	268.58±48.00	1096.42±145.37	0.000
TNF- α	132.22±20.36	366.84±59.37	0.002
EPO	116.65±6.19	182.28±14.37	0.004

结果显示,检测的细胞因子表达水平差异较大,4种细胞因子在缺血再灌注组中的表达较假手术组都显著上调($P<0.01$)。缺血再灌注组中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和EPO分别约为假手术组中各因子表达量的7倍、4倍、3倍和1.5倍。

2.2.2 假手术组皮瓣不同取样位置对细胞因子的影响 每个皮瓣按照近、中、远段分别取样,测得假手术组中不同位置样品炎症因子表达量(表2)。

从结果可以看出,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和EPO的表达水平都有从近端到远端逐渐升高的趋势,但是每一种细胞因子在3个位置的表达量在统计学上没有显著性差异($P>0.05$)。

2.2.3 缺血再灌注组皮瓣不同取样位置对细胞因子的影响 与假手术组相同,缺血再灌注组各皮瓣按照近、中、远段分别取样,测得不同位置样品炎症因子表达量(表3)。

表2 假手术组不同位置炎症因子表达水平(单位:pg/ml)

Table 2 Comparison of the level of cytokines among different points in sham group

炎症因子	取样位置			P
	近	中	远	
IL-1 β	211.88±85.11	240.64±100.21	371.00±67.43	>0.05
IL-6	235.49±102.78	253.79±86.51	316.46±88.32	>0.05
TNF- α	88.69±22.81	152.41±52.55	155.56±16.48	>0.05
EPO	106.61±15.74	114.43±3.60	128.92±8.44	>0.05

表3 缺血再灌注组不同位置炎症因子表达水平(单位:pg/ml)

Table 3 Comparison of the level of cytokines among different points in IR group

炎症因子	取样位置			P
	近	中	远	
IL-1 β	1397.60±270.70	1823.13±219.34	2772.97±742.09	>0.05
IL-6	742.82±173.36	1223.33±270.22	1323.10±232.93	>0.05
TNF- α	282.57±106.78	320.88±129.93	497.07±30.31	>0.05
EPO	150.87±8.00	171.87±11.53	224.08±393.31	>0.05

不同表达水平的 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和 EPO 的表
达量都有从近端到远端逐渐升高的趋势,但是每一种
细胞因子在 3 个位置的表达量在统计学上没有显著性
差异($P>0.05$)。

3 讨 论

缺血再灌注损伤至今仍是外科手术中一个棘手
的问题。大鼠腹岛状皮瓣模型能引起较单纯缺血^[11]并能
直观地显示损伤程度,因此广泛地运用于缺血再灌注
损伤机理研究。

实验中所选取的 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和 EPO 涵盖
了高表达水平的细胞因子到低表达水平的细胞因子,
通过对这些炎性因子表达水平的比较可以发现,假手
术组中同一炎性因子的表达水平明显低于缺血再灌注
组。而在比较皮瓣成活面积的比率时,假手术组同样
也明显高于缺血再灌注组。这表明假手术组和缺血再
灌注组在皮瓣存活和炎症反应上均存在显著性差异,
同时实验结果也表明通过检测炎症反应水平可以很好
地评价皮瓣损伤的程度,该模型的成功构建对以后缺
血再灌注损伤的研究具有重要应用价值。

同种炎性因子在皮瓣的近、中、远三段的表达水
平在统计学上无显著性差异,说明炎症反应在同一皮
瓣中各个部分程度没有显著性差异。因此理论上我们
可以在存活皮瓣的任意位置进行取样,但是在同一批
实验中不同的动物取样位置须一致。然而实验结果还
表明,随着腹壁下浅动脉的延伸,炎性因子的表达水
平有上升趋势,而由于不同大鼠成活皮瓣大小存在一
定差距,不方便量化取样位置跟血管蒂的距离,因此,
依据平行取样的原则我们建议采取近端取样的方式。

于是在以后的研究中,对于大鼠皮瓣缺血再灌注
模型,实验者无须多点测样就可以进行损伤指标的评
价。这样不仅可以为实验者节省大量的时间,更重要
的是,珍贵的皮瓣样本可以得到更合理的运用。

参考文献

- [1] Amr A F, Mahmoud H E, Arif M U, et al. A preliminary study of dexamethasone against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *International Journal of Pharmacology*, 2009, 5(2): 155-161.
- [2] 张洁. 皮瓣缺血再灌注损伤的防治进展. *中国美容医学*, 2011, 20(02): 345-347.
Zhang J. Progress on prevention and treatment of flaps ischemia-reperfusion injury. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2011, 20(02): 345-347.
- [3] Carroll M C, Holers V M. Innate autoimmunity. *Advances in Immunology*, 2005, 86: 137-157.
- [4] Rosa N J, Lira F S, Venancio D P, et al. Sleep deprivation affects inflammatory marker expression in adipose tissue. *Lipids in Health and Disease*, 2010, 9: 125-130.
- [5] Keller M, Ruegg A, Werner S, et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 2008, 132(5): 818-831.
- [6] Heinrich P C, Castell J V, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 1990, 265(3): 621-636.
- [7] Clark W M, Rinker L G, Lessov N S, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke*, 2000, 31(7): 1715-1720.
- [8] Feghali C A, Wright T M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 1997, 2:12-26.
- [9] Haroon Z A, Amin K, Jiang X H, et al. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *American Journal of Pathology*, 2003, 163(3): 993-1000.
- [10] Huang L. The impact of lidocaine on secondary ischemia injury of skin flaps. *Transplant Proceed*, 2011, 43(7): 2550-2553.
- [11] 曹景敏, 鲁开化, 王标, 等. 岛状皮瓣缺血再灌注损伤的血液流变学改变及地塞米松的调理研究. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16(05): 333-336.
Cao J M, Lu K H, Wang B, et al. Hemorheology of island flap after ischemia-reperfusion injury and modulation of dexamethasone. *Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery*, 2002, 16(05): 333-336.

The Impact of Sampling on Cytokines Test of Rat Skin Flap Model

QIN Shi-rui¹ ZHAO Ling¹ XIE Fei¹ MA Xue-mei¹ WANG You-bin²

(1 College of Life Science and Bio-engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

(2 Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100032, China)

Abstract Aim: Construct rat skin flap model for the research of ischemia/reperfusion injury. The flap samples were harvested from the proximal, middle, and distal part of the viable flap and cytokines expression were detected separately in order to assess whether there were significant differences among the three parts and confirm an equitable way of sampling on ischemia/reperfusion injury of rat skin flap model. Method: Samples were harvested on postoperative day 5. The level of IL-1 β , IL-6, TNF- α and EPO were detected to assess the sampling way. Statistical analyses were performed using SPSS. Results: Significant difference in cytokines levels was noted between the two groups. But no statistical difference in cytokines levels in either inter-group. Conclusion: Samples can be harvested at any arbitrary point on a skin flap to stand for the inflammatory level of the whole flap. And it should be sampled from the same position on different flaps in the same experiment. However harvest from the proximal point were encouraged for taking parallel samples.

Key words Ischemia/reperfusion injury Flap Cytokine Sampling

赛默飞新品发布会暨“进入中国三十周年庆祝活动启动仪式” 在北京召开

2012年4月6日,赛默飞世尔科技(以下简称:赛默飞)新品发布会暨“进入中国三十周年庆祝活动启动仪式”在北京召开。自1982年进入中国市场至今,赛默飞秉承“植根中国,服务中国”的承诺,不断为科研用户提供先进的产品和优质的服务。2011年赛默飞正式收购戴安(Dionex),从而进一步加强了在色谱质谱方面的实力和创新优势。此次新品发布会推出的新产品包括:Thermo Scientific Dionex ICS-4000、Thermo Scientific TraceTM 1300、新型的Thermo Scientific iCAPTM Q以及Thermo Scientific NanoDrop[®] Lite等等。新产品的发布,再次体现赛默飞产品在广度及深度上的优势,使赛默飞拥有业内全面的产品组合和先进的技术支持。面对新的市场趋势,赛默飞在不断完善自身产品及技术的同时,也致力于帮助客户提高实验室生产效率,在竞争日益激烈激励的市场环境下保持竞争力。