

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021>.

术前供区拔罐负压吸引促进兔皮瓣成活率的实验研究

刘东昕, 马骏焕, 夏雪, 王虎

(汕头大学医学院第一附属医院骨科, 广东 汕头 515041)

[摘要] 目的: 探讨术前供区拔罐负压吸引对兔皮瓣成活率的影响。方法: 选取新西兰兔10只, 每只兔背部设计4块皮瓣, 按照自身对照原则, 以背部左侧前方及右侧后方皮瓣(20个)为实验组, 背部右侧前方及左侧后方皮瓣(20个)为对照组。实验组手术前7天每天均对皮瓣进行拔罐预处理; 对照组未进行任何预处理。测量实验组拔罐前后皮肤温度; 比较两组皮瓣成活率, 观察HE染色、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)免疫组织化学染色情况。结果: 拔罐负压吸引后皮温显著高于拔罐前($P < 0.05$); 术后第7天, 实验组皮瓣成活率高于对照组($P < 0.05$); HE染色可见实验组较大新生毛细血管形成, VEGF免疫组织化学染色可见实验组皮瓣组织存在大量棕黄色颗粒沉着, 两者均优于对照组; 实验组皮瓣组织VEGF水平高于对照组($P < 0.05$)。结论: 术前供区拔罐负压吸引能够提高兔移植皮瓣成活率, 其作用机制与促进VEGF表达有关。

[关键词] 拔罐; 负压; 皮瓣; 成活率;

Experimental study on the promoting effect of negative pressure suction of preoperative cupping on the survival rate of rabbit skin flap

LIU Dongxin, MA Junhuan, XIA Xue

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515041, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of negative pressure suction of preoperative cupping on the survival rate of rabbit flap. **Methods:** Ten New Zealand rabbits were selected, and 4 skin flaps were designed on the back of each rabbit. According to the principle of self-control, the left anterior and right posterior back flaps (20) were used as the experimental group, and the right anterior and left posterior back flaps (20) were used as the control group. In the experimental group, skin flaps were pretreated with cupping every day for seven days before operation. The control group did not undergo any preconditioning. Skin temperature was measured before and after cupping in the experimental group. The survival rate of skin flap was compared between the two groups. HE staining and vascular endothelial growth factor (VEGF) immunohistochemical staining were observed. **Results:** The

收稿日期 (Date of reception): 2021-03-15

通信作者 (Corresponding author): 刘东昕, Email: ldx1970@163.com

基金项目 (Foundation item): 广东省中医药局科研课题面上项目 (20191179)。This work was supported by the Scientific Research Project of Guangdong Provincial Bureau of Traditional Chinese Medicine (20191179), China.

skin temperature after negative pressure suction of cupping was significantly higher than that before cupping ($P<0.05$). Seven days after operation, the flap survival rate of the experimental group was higher than that of the control group ($P<0.05$). HE staining showed the formation of large new capillaries in the skin flap tissue of the experimental group, and VEGF immunohistochemical staining showed a lot of brown-yellow granules in the skin flap tissue of the experimental group, both of which were superior to those of the control group. The level of VEGF of the experimental group was higher than that of the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Preoperative negative pressure suction of cupping in donor area can improve the survival rate of rabbit transplanted skin flap, and the mechanism is related to the promotion of VEGF expression.

Keywords cupping; negative pressure; skin flap; survival rate

皮瓣移植是创伤、整形外科的常用治疗方法, 保证充足的动脉血供与良好的静脉回流, 是提高皮瓣成活率的关键^[1]。已有研究^[2]表明: 移植后发生静脉危相相比动脉危相更为常见且更易导致皮瓣成活障碍。目前临床中各种用于提高皮瓣成活率的术前预处理手段, 究其根本均着重于改善动脉供血^[3-4], 而从改善静脉回流角度探讨如何提高皮瓣成活率的研究还较少见。近期有研究^[5]报道, “淤血预处理”(埋线结扎皮瓣周边血管主干, 阻断静脉回流)可预防术后皮瓣出现静脉淤血, 提高皮瓣成活率。前期研究证实, 拔罐时局部皮肤发生静脉性淤血, 拔罐后则出现动脉性充血, 因此猜测, 对供区皮肤实施拔罐负压吸引, 可起到“淤血预处理”的作用, 从而提高术后皮瓣对静脉淤血的耐受能力, 减轻甚至避免静脉危象。本研究以兔为实验动物, 观察术前供区拔罐负压吸引对于皮瓣成活率的影响。

1 资料与方法

1.1 资料

新西兰兔10只, 雌雄不限, 年龄8~12周; 体重2.0~2.5(2.32±0.12) kg。饲养温度23~27℃, 术后分笼饲养。于每只兔的躯干左右两侧各设计2块皮瓣, 共计4块, 皮瓣均距兔背正中中线4 cm; 每个皮瓣直径相同, 均为5 cm; 皮瓣蒂位置均在下, 长宽为2 cm; 同侧皮瓣间距均为3 cm。用油性标记笔标出所设计的皮瓣区域(图1)。按照自身对照原则, 以兔子背部左侧前方及右侧后方皮瓣(20个)为实验组, 兔子背部右侧前方及左侧后方皮瓣(20个)为对照组。本研究已获伦理委员会批准。



图1 皮瓣设计图

Figure 1 Flap design

1.2 方法

1.2.1 拔罐预处理

于手术前7天, 每天对实验组皮瓣进行拔罐预处理。具体操作方法: 拔罐5 min、负压值为7 kPa, 休息1 min(即无负压状态), 为一个循环。每天共拔罐5个循环。

1.2.2 皮瓣手术

采用全身麻醉, 于兔耳缘静脉注射10%水合氯醛, 剂量2~3 mL/kg, 麻醉成功后, 俯卧位固定兔四肢于兔台, 常规消毒铺巾。对每只兔子实验组及对照组共计四块皮瓣行切开并原位缝合处理, 操作方法: 沿皮瓣设计线切开皮肤、皮下组织, 达深筋膜浅层, 保留真皮下毛细血管网, 于深筋膜浅层表面分离皮下组织(图2)。皮瓣完全掀起后, 充分止血。皮瓣掀起后以4.0丝线原位缝合, 术毕予手术区域消毒, 干洁棉垫覆盖, 绷带包扎保护伤口。术后分笼饲养, 以青霉素钠20万U腹腔

注射, 1次/天, 连续3天。术后7天内每日予手术区域行换药处理。为减少手术操作引起的误差, 所有手术由同一实验者完成。



图2 术中皮肤

Figure 2 Intraoperative skin

1.3 评价方法

1.3.1 拔罐前后皮肤温度

每次拔罐前后观察实验组皮瓣颜色是否正常、是否出现淤血肿胀等, 并测量拔罐前后皮肤温度。

1.3.2 皮瓣成活率比较

手术前以及术后7天内每日观察两组皮瓣外观, 是否肿胀淤血, 有无色泽变化、温度变化等。术后7天, 于皮瓣上方20 cm固定位置, 固定灯光下拍照。应用软件image Pro Plus 6.0分析皮瓣照片, 计算皮瓣存活面积和皮瓣总面积之比, 二者比值即为皮瓣成活率。皮瓣坏死判定标准: 皮肤颜色发黑、弹性差、组织回缩、质地变硬、切割无出血。

1.3.3 局部皮瓣 HE 染色及免疫组织化学染色

横向切取皮瓣近端1/3处的正常组织, 组织块大小约0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm, 常规固定、包埋、切片, 行HE染色后, 在高倍镜下(×200及×400)实验组织学及血管生长情况。根据HE染色结果, 选择合适的切片进行血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)免疫组织化学染色, 检测过程严格按VEGF试剂盒说明书进行。VEGF阳性判定标准: 观察VEGF在成纤维细胞、血管内皮细胞的表达, VEGF的阳性定位于细胞的胞浆, 反应物质呈黄色颗粒状, 表达较强时为棕黄色。

1.3.4 VEGF 含量检测

采用ELISA法测定样品中VEGF水平。向预先包被了兔VEGF单克隆抗体的酶标孔中加入VEGF, 温育后加入生物素标记的抗VEGF抗体,

再和链霉亲和素-HRP结合, 形成免疫复合物, 再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶, 然后加入底物A, B, 产生蓝色, 并和酸的作用下转化成最终的黄色, 测量阳性细胞染色的积分光度值(IOD)。

1.4 统计学处理

使用SPSS 19.0软件进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 负压吸引前后皮温比较

拔罐负压吸引后皮温为(37.71±0.27)℃, 显著高于拔罐前皮温(37.53±0.34)℃, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图3)。

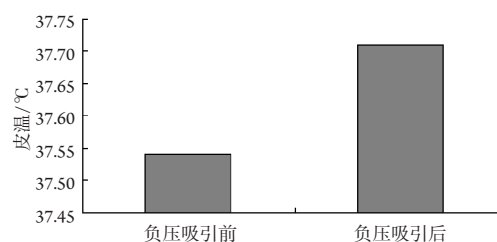


图3 两组负压吸引前后皮温比较

Figure 3 Comparison of skin temperature between two groups before and after negative pressure suction

2.2 皮瓣成活率比较

术后4 h各组皮瓣远端均出现轻微组织肿胀淤血(图4), 术后24 h两组皮瓣肿胀加重, 术后第2天两组皮瓣淤血肿胀达到高峰, 术后第3天实验组皮瓣远端淤血肿胀开始逐渐消退, 对照组皮瓣远端淤血肿胀继续加重, 此后两组皮瓣淤血组织界限开始逐渐出现, 术后第7天, 两组皮瓣中远段出现大小不同的坏死区域, 坏死区域皮肤组织回缩、颜色发黑、质量变硬, 呈现焦痂样(图5)。皮肤照片分析结果显示, 实验组皮瓣成活率为(83.52±3.74)%, 高于对照组的(55.35±4.96)%, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图6)。

2.3 局部皮瓣 HE 染色

术后第7天, 在实验组可见新生毛细血管形成, 高倍镜(×400)下观察, 实验组新生血管呈现进一步分化成熟, 已出现血管腔; 而对照组新生小血管较少(图7)。



图4术后当天皮肤

Figure 4 Skin on postoperative day



图5 术后7天皮肤

Figure 5 Skin 7 days after surgery

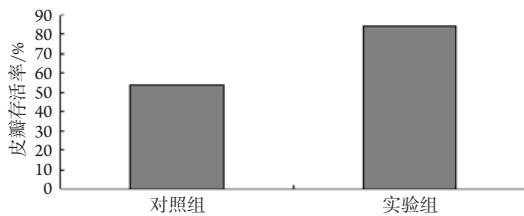


图6 两组皮瓣存活率比较

Figure 6 Comparison of flaps survival rate between the two groups

2.4 免疫组织化学染色

术后第7天, 两组VEGF蛋白表达均呈阳性。与对照组比较, 实验组皮瓣组织存在大量棕黄色颗粒沉着, 表明VEGF高表达(图8)。

2.5 两组 VEGF 含量比较

术后7 d, 实验组皮瓣组织VEGF水平(178.82 ± 15.22) pg/mL, 高于对照组的(37.35 ± 4.92) pg/mL, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

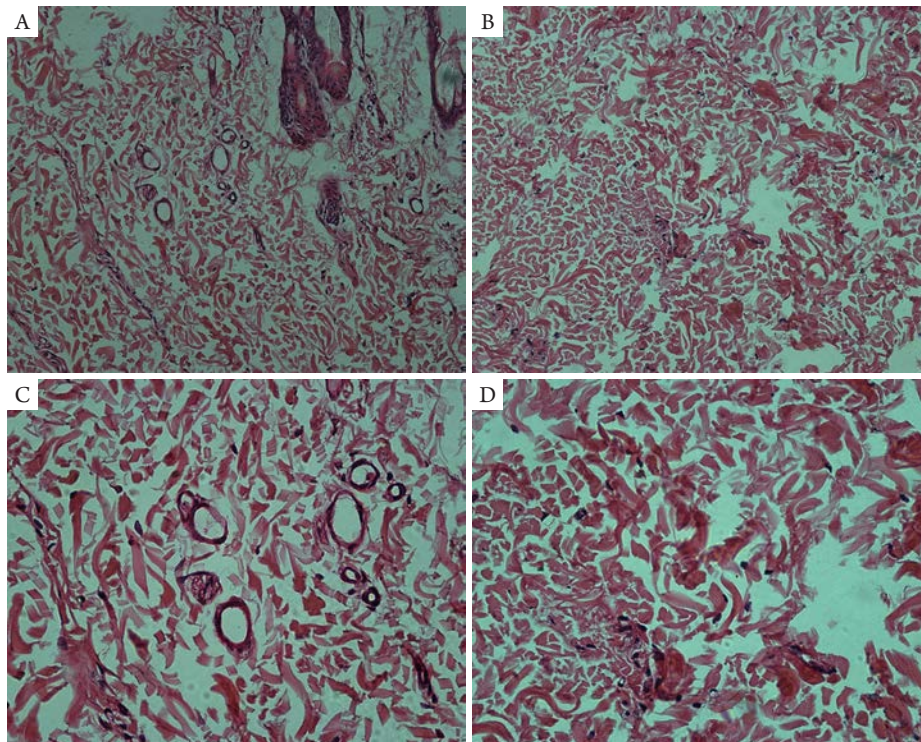


图7 两组皮瓣比较

Figure 7 Comparison of skin flaps of two groups

(A)实验组皮瓣(HE, $\times 200$); (B)对照组皮瓣(HE, $\times 200$); (C)实验组皮瓣(HE, $\times 400$); (D)对照组皮瓣(HE, $\times 400$)。

(A) Skin flap in experimental group (HE, $\times 200$); (B) Skin flap in control group (HE, $\times 200$); (C) skin flap in experimental group (HE, $\times 400$); (D) skin flap in control group (HE, $\times 400$).

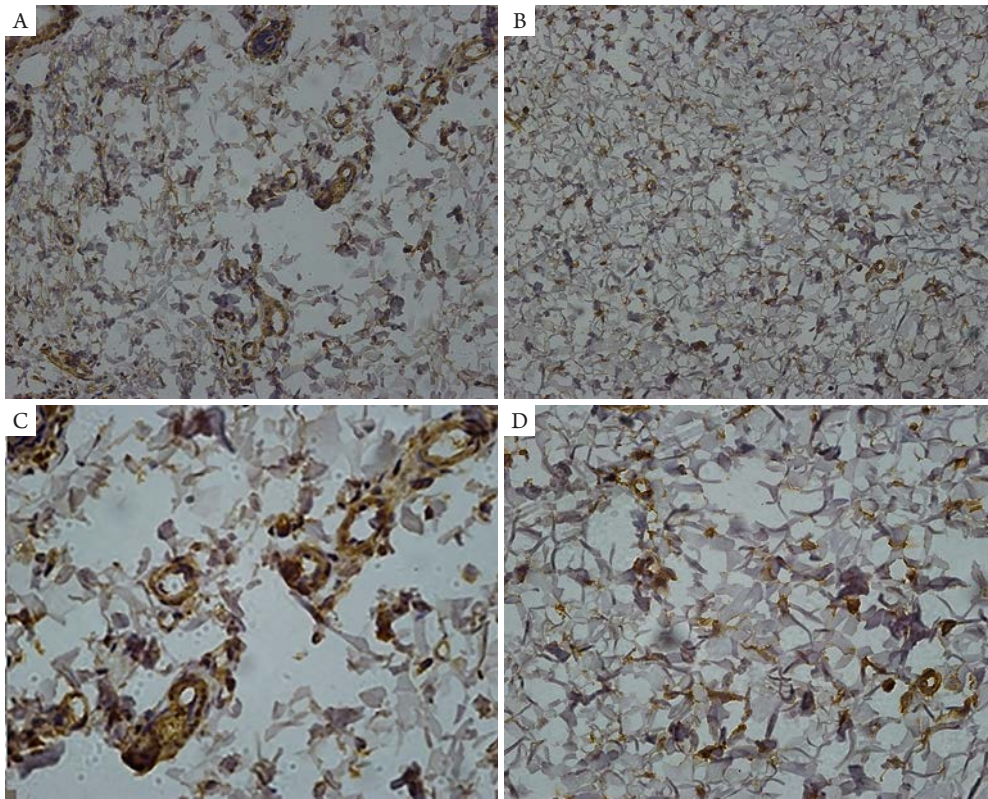


图8 两组皮瓣比较

Figure 8 Comparison of skin flaps of two groups

(A)实验组皮瓣(VEGF, $\times 200$); (B)对照组皮瓣(VEGF, $\times 200$); (C)实验组皮瓣(VEGF, $\times 400$); (D)对照组皮瓣(VEGF, $\times 400$)。

(A) Skin flap in experimental group (VEGF, $\times 200$); (B) skin flap in control group (VEGF, $\times 200$); (C) skin flap in experimental group (VEGF, $\times 400$); (D) skin flap in control group (VEGF, $\times 400$).

3 讨论

目前应用于提高皮瓣移植存活率的措施甚多,大致归纳为预处理、药物干预和干细胞移植等^[6-7]。预处理是指在皮瓣移植术前,通过各种手段对皮瓣进行预处理,使得局部皮瓣对术中损伤的耐受性增强,从而有效预防术后皮瓣坏死,具体方法包括缺血预处理、高压氧预处理、皮瓣扩张等^[8]。虽然预处理方法较多,但因其操作的复杂性及有创性,不可避免地加重患者治疗费用及身心痛苦。此外,静脉危相比动脉危相发生率更高,且更易导致皮瓣成活障碍^[2]。而上述多种预处理方法,均主要关注改善动脉供血,探讨如何改善静脉淤血的研究还较少见。本研究从“淤血预处理”的角度探讨供区拔罐负压吸引对皮瓣成活率的影响及其相关机制。

移植后皮瓣静脉淤血主要是静脉回流发生障碍而动脉供血并未受影响所致,其根本原因在

于静脉系统压力较低,因此易受周围组织状况影响^[9]。皮瓣发生回流障碍后,其微血管数量迅速减少,部分能够发挥代偿作用的侧支循环逐渐失效,细静脉血流速明显降低,微血栓开始形成并造成微血管堵塞,导致有效循环的微血管进一步减少,微血管充血加剧,腔内压升高,血浆黏度增加,诱发更多血栓形成,形成恶性循环,最终造成皮瓣坏死^[10]。皮瓣延迟术是目前提高皮瓣成活率最有效方法,其作用机制是通过切断皮瓣边缘及基底部分血供,造成适当程度但可耐受的缺血,缺血缺氧可导致VEGF等细胞因子大量合成与释放,进而诱导皮瓣组织内部微血管内径扩张以及新生血管形成,改善皮瓣血供,同时改善皮瓣对缺氧状态的耐受^[11]。有研究^[12]表明:淤血预处理可对再灌注损伤发挥保护作用。姚媛媛等^[5]研究报道,在扩张皮瓣期间,采用埋线法阻断皮瓣周围静脉主干,造成一定程度但可耐受的静脉回流障碍,能够提高术后皮瓣对静脉淤血的耐受性,

从而预防静脉危相的发生。

拔罐是传统中医治疗技术, 拔罐过程中持续的负压吸引可影响局部血液循环^[13]。陈勇等^[14]研究报道, 使用 $-0.02\sim-0.05\text{MPa}$ 的负压能够使拔罐部位的血流量显著升高。刘华朋等^[15]指出, 拔罐期间皮肤血流量明显增加, 但罐后皮肤血流量变化逐渐减弱, 至起罐后大约20 min, 拔罐部位血流量基本恢复至基线水平。拔罐开始后皮肤温度持续升高, 至启罐时平均升高大约 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 启罐后较高的皮肤温度仍维持大约15 min以上, 而且皮肤温度升高部位由罐中心逐渐向周围部位扩展, 面积逐渐增大^[16]。这提示拔罐后局部皮肤血流量可以一定时间内持续增加, 使局部代谢功能得到改善。我们前期研究证实, 拔罐过程中持续的负压吸引可使局部皮肤发生静脉性淤血, 拔罐后则出现动脉性充血, 因此我们推测, 采用拔罐的方法进行淤血预处理, 可能有助于提高皮瓣对静脉淤血的耐受性。本研究中, 根据以往拔罐研究的相关报道^[14-16]以及前期研究经验, 将拔罐负压值设定为7 kPa, 每次拔罐5 min后休息1 min, 共进行5个循环, 结果显示: 拔罐负压吸引后皮温显著高于拔罐前, 表明拔罐可影响供区皮肤的血液循环, 与上述研究结论一致。术后7 d对比皮肤照片显示, 实验组皮瓣成活率高于对照组, 证实术前拔罐预处理能够提高皮瓣成活率。局部皮瓣HE染色表明, 实验组可见新生毛细血管形成, 且进一步分化成熟, 已出现血管腔; 而对照组新生小血管较少。免疫组织化学染色均显示, 实验组皮瓣组织存在大量棕黄色颗粒沉着, 其VEGF水平高于对照组。VEGF是重要的促血管生成因子, 与新生血管形成密切相关^[17]。实验组VEGF高表达, 证实拔罐负压吸引能够提高VEGF的表达水平, 能够刺激血管内皮细胞分裂, 促进微血管生长。在皮瓣成活过程中, 皮瓣微循环功能的改善以及新生血管的形成发挥着关键性作用^[18-19]。术前拔罐造成供区皮肤静脉性淤血及动脉性充血, 提高了皮瓣对静脉回流障碍的耐受性, 同时刺激VEGF等因子的合成与释放, 这可能是拔罐预处理提高皮瓣成活率的主要机制之一。

综上所述, 术前对供区皮肤进行拔罐预处理, 能够提高移植皮瓣成活率。与其他治疗方式相比, 拔罐预处理有着方便、经济等优势, 可操作性强, 具有推广应用价值。但由于皮瓣移植后成活与愈合是一个由多种不同细胞因子参与的复杂生理过程, 目前对于拔罐预处理促进皮瓣成活过程中各种因子之间的相互影响作

用, 以及各种因子对组织修复的调控作用等, 均有待进一步研究。

参考文献

1. Karinja SJ, Lee BT. Advances in flap monitoring and impact of enhanced recovery protocols[J]. *J Surg Oncol*, 2018, 118(5): 758-767.
2. Cuthbert R, Deutseh C, Roy A, et al. Postoperative monitoring of the free jejunal flap: use of colour duplex and systematic review of available techniques[J]. *Ann R Coil Surg Engl*, 2018, 100(6): 485-490.
3. Huang L. Beneficial effect of botulinum toxin A on secondary ischaemic injury of skin flaps in rats[J]. *Br J Oral MaxiIlofac Surg*, 2018, 56(2): 144-147.
4. 崔佳, 林博杰, 潘新元, 等. 不同频次高压氧预处理对大鼠皮瓣移植术后缺血再灌注损伤的影响[J]. *中华整形外科杂志*, 2019, 35(12): 1249-1257.
CUI Jia, LIN Bojie, PAN Xinyuan, et al. Effect of different frequency hyperbaric oxygen preconditioning on ischemia-reperfusion injury of rat flap after transplantation[J]. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 2019, 35(12): 1249-1257.
5. 姚媛媛, 张金明, 梁伟强, 等. 埋线法结扎周边血管预防扩张皮瓣静脉淤血的疗效观察[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(6): 789-791.
YAO Yuanyuan, ZHANG Jinming, LIANG Weiqiang, et al. Observation on the curative effect of peripheral vascular ligation by embedding suture to prevent venous congestion of dilated skin flap[J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2015, 29(6): 789-791.
6. Mangelsdorff G, Cuevas P, Rodriguez JR, et al. Reduced anterolateral thigh flap donor-site morbidity using incisional negative pressure therapy[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2019, 35(3): 229-234.
7. Clark JM, Rychlik S, Harris J, et al. Donor site morbidity following radial forearm free flap reconstruction with split thickness skin grafts using negative pressure wound therapy[J]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019, 48(1): 21.
8. 陈苗, 李秀存, 姜振民, 等. A型肉毒素在皮瓣缺血预处理中的应用进展[J]. *中华显微外科杂志*, 2019, 42(1): 104.
CHEN Miao, LI Xiucun, JIANG Zhenmin, et al. Progress in application of A type botulinum toxin in ischemic preconditioning of skin flap[J]. *Chinese Journal of Microsurgery*, 2019, 42(1): 104.
9. Wu M, Sun M, Dai H, et al. Negative pressure wound therapy: An effective adjunctive treatment to assist flap survival and wound closure[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2018, 71(11): 1664-1678.
10. Kagaya Y, Miyamoto S. A systematic review of near-infrared spectroscopy in flap monitoring: Current basic and clinical evidence and prospects[J]. *J Hast Reconstr Aesthet Surg*, 2018, 71(2): 246-257.

11. 罗淦, 辛大伟, 康仪, 等. 皮瓣缺血再灌注损伤的防治进展[J]. 中医正骨, 2020, 32(7): 23-26.
LUO Gan, XIN Dawei, Kang Yi, et al. Progress in prevention and treatment of skin flap ischemia reperfusion injury[J]. J Trad Chin Orthop Trauma, 2020, 32(7): 23-26.
12. 赵霜艳, 陈文栋, 成黎明, 等. 淤血预处理减轻兔肝门静脉阻断模型中肠道淤血-再灌注损伤[J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36(10): 1018-1022.
ZHAO Shuangyang, CHEN Wendong, CHENG Liming, et al. Congestion preconditioning attenuate intestinal congestion-reperfusion injury in rabbit model of hepatic portal vein occlusion[J]. Journal of Clinical Anesthesiology, 2020, 36(10): 1018-1022.
13. 张君, 邵素菊, 王培育, 等. 拔罐法临床操作体会[J]. 河南中医, 2018, 38(8): 1252-1255.
ZHANG Jun, SHAO Suju, WANG Peiyu, et al. Experience in the clinical operation of cupping[J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 2018, 38(8): 1252-1255.
14. 陈勇, 陈波, 陈泽林, 等. 拔罐疗法的临床及其生物学机制研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1643-1650.
CHEN Yong, CHEN Bo, CHEN Zelin, et al. Clinical application and biological mechanism of cupping therapy[J]. World Chinese Medicines, 2020, 15(11): 1643-1650.
15. 刘华朋, 杨静, 朱成慧, 等. 拔罐疗法对寒凝血瘀型家兔局部皮肤相关因子影响的实验研究[J]. 吉林中医药, 2018, 38(1): 76-79.
LIU Huapeng, YANG Jing, ZHU Chenghui, et al. Experimental study on the effect of cupping therapy on local skin related factors in rabbits with cold blood coagulation and blood stasis[J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 38(1): 76-79.
16. El-Shanshory M, Hablas NM, Shebl Y, et al. Al-hijamah (wet cupping therapy of prophetic medicine) significantly and safely reduces iron overload and oxidative stress in thalassemic children: a novel pilot study[J]. J Blood Med, 2018, 9: 241-251.
17. Maisto R, Oltra M, Vidal-Gil L, et al. ARPE-19-derived VEGF containing exosomes promote neovascularization in HUVEC: the role of the melanocortin receptor 5[J]. Cell Cycle, 2019, 18(4): 413-424.
18. 明华伟, 何芸, 付光新, 等. BMSCs与VEGF 165-HUVEC局部皮下组织层共移植大鼠缺血皮瓣存活率观察[J]. 山东医药, 2019, 59(15): 37-41.
MING Huawei, HE Yun, FU Guangxin, et al. Observation of survival rate of ischemic flap by co-transplantation of BMSCs and HUVECs modified with VEGF 165 gene in local subcutaneous tissue layer of rats[J]. Shandong Medical Journal, 2019, 59(15): 37-41.
19. 张赛圣, 程丽霞. 脂肪间充质干细胞与细胞培养液原位注射对兔耳静脉淤血皮瓣成活和皮瓣VEGF表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(1): 21-24.
ZHANG Saisheng, CHENG Lixia. Effects of situ injection of adipose derived mesenchymal stem cells and cell culture fluid on survival of skin flaps with venous congestion in the rabbit ear and VEGF expression[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 18(1): 21-24.

本文引用: 刘东昕, 马骏焕, 夏雪, 王虎. 术前供区拔罐负压吸引促进兔皮瓣成活率的实验研究[J]. 临床与病理杂志, 2021. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.

Cite this article as: LIU Dongxin, MA Junhuan, XIA Xue, WANG Hu. Experimental study on the promoting effect of negative pressure suction of preoperative cupping on the survival rate of rabbit skin flap[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2021. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.