

疏血通注射液预防大鼠血管吻合口血栓形成的实验研究

赵祚臻, 王孝辉, 姚俊娜, 郭绍勇, 陈利国, 段卫峰, 穆世民, 杜志军, 蔡利涛

(河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院, 河南 洛阳 471002)

摘要 目的:观察疏血通注射液预防大鼠血管吻合口血栓形成的疗效。**方法:**将 120 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、疏血通组及肝素钠组, 每组 40 只。对照组、疏血通组及肝素钠组大鼠分别以生理盐水($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、疏血通注射液($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及肝素钠注射液($600 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行腹腔注射。药物注射 6 h 后将所有大鼠左侧颈总动脉切断, 并即刻对其进行端端吻合。分别于造模结束后 30 min 及 1、3、7 d 时从各组随机选取 10 只大鼠, 切取包含吻合口远近端各 0.5 cm 的颈总动脉, 在电子显微镜下观察并计算吻合口及缝线表面覆盖的纤维蛋白、血小板及内皮细胞的百分比。**结果:**①纤维蛋白覆盖率。造模后不同时间, 3 组大鼠血管吻合口纤维蛋白覆盖率比较, 组间差异均有统计学意义($F = 133.802, P = 0.000; F = 18.741, P = 0.000; F = 212.943, P = 0.000; F = 341.174, P = 0.000$)。造模后 30 min 时对照组纤维蛋白覆盖率低于疏血通组和肝素钠组($P = 0.000, P = 0.000$); 造模后 1、3、7 d 时对照组纤维蛋白覆盖率均高于疏血通组和肝素钠组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$); 造模后 3 d 时疏血通组纤维蛋白覆盖率高于肝素钠组($P = 0.000$); 其余各时点疏血通组和肝素钠组比较, 组间差异均无统计学意义。②血小板覆盖率。造模后不同时间, 3 组大鼠血管吻合口血小板覆盖率比较, 组间差异均有统计学意义($F = 352.002, P = 0.000; F = 84.734, P = 0.000; F = 368.903, P = 0.000; F = 14.413, P = 0.000$)。造模后 30 min、1 d、3 d、7 d 时对照组血小板覆盖率均高于疏血通组和肝素钠组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$); 造模结束后 30 min 时疏血通组血小板覆盖率高于肝素钠组($P = 0.027$); 其余各时点疏血通组和肝素钠组比较, 组间差异均无统计学意义。③内皮细胞覆盖率。除造模后 30 min 时外, 其余各时点 3 组大鼠血管吻合口内皮细胞覆盖率比较, 组间差异均有统计学意义($F = 0.000, P = 1.000; F = 835.502, P = 0.000; F = 363.874, P = 0.000; F = 780.410, P = 0.000$)。造模后 1、3、7 d 时对照组内皮细胞覆盖率均低于疏血通组和肝素钠组($P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000$); 造模后 1、7 d 时疏血通组内皮细胞覆盖率均高于肝素钠组($P = 0.002, P = 0.001$); 造模后 3 d 时疏血通组和肝素钠组比较, 组间差异无统计学意义。**结论:**疏血通注射液能促进内皮细胞生长, 减少血小板在血管吻合口的堆积, 从而避免血栓形成, 其疗效与肝素钠相当。

关键词 血栓形成; 疏血通; 肝素; 显微外科手术; 血小板; 纤维蛋白; 内皮细胞; 动物实验

An experimental study of Shuxuetong(疏血通) injection for prevention of vascular anastomotic stoma thrombosis in rats

ZHAO Zuogong, WANG Xiaohui, YAO Junna, GUO Shaoyong, Chen Ligu, DUAN Weifeng, MU Shimin, DU Zhijun, CAI Litao

Luoyang Orthopedic - Traumatological Hospital, Luoyang 471002, Henan, China

ABSTRACT Objective: To observe the preventative effect of Shuxuetong(疏血通) injection on vascular anastomotic stoma thrombosis in rats. **Methods:** One hundred and twenty Wistar rats were randomly divided into control group, Shuxuetong group and heparin group, 40 cases in each group. The Wistar rats in the 3 groups were intraperitoneal injected with normal saline(10 mL/kg), Shuxuetong injection(2 g/kg) and heparin injection(600 U/kg) respectively. The left common carotid arteries(LCCA) of all rats were cut off at 6 hours after injection, and end-to-end anastomosis were performed instantly. Ten rats were randomly selected from each group at 30 minutes, 1, 3 and 7 days after the modeling respectively, and the common carotid arteries near the anastomotic stoma were fetched for observing. The fraction of coverage of fibrin, blood platelets and endothelial cells at anastomotic stoma and suture surface were observed and calculated by using electron microscope. **Results:** There was statistical difference in coverage fraction of fibrin in vascular anastomotic stoma between the 3 groups after the modeling($F = 133.802, P = 0.000; F = 18.741, P = 0.000; F = 212.943, P = 0.000; F = 341.174, P = 0.000$). The coverage fraction of fibrin of control group was lower than that of Shuxuetong group and heparin group at 30 minutes after the modeling($P = 0.000, P = 0.000$). The coverage fraction of fibrin of control group was higher than that of Shuxuetong group and heparin group at 1, 3 and 7 days after the

modeling ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$). The coverage fraction of fibrin of Shuxuetong group was higher than that of heparin group at 3 days after the modeling ($P=0.000$). There was no statistical difference in coverage fraction of fibrin between Shuxuetong group and heparin group at the rest timepoints. There was statistical difference in coverage fraction of blood platelets in vascular anastomotic stoma between the 3 groups after the modeling ($F=352.002, P=0.000; F=84.734, P=0.000; F=368.903, P=0.000; F=14.413, P=0.000$). The coverage fraction of blood platelets of control group was higher than that of Shuxuetong group and heparin group at 30 minutes and 1, 3 and 7 days after the modeling ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$). The coverage fraction of blood platelets of Shuxuetong group was higher than that of heparin group at 30 minutes after the modeling ($P=0.027$). There was no statistical difference in coverage fraction of blood platelets between Shuxuetong group and heparin group at the rest timepoints. There was statistical difference in coverage fraction of endothelial cells in vascular anastomotic stoma between the 3 groups except at 30 minutes after the modeling ($F=0.000, P=1.000; F=835.502, P=0.000; F=363.874, P=0.000; F=780.410, P=0.000$). The coverage fraction of endothelial cells of control group was lower than that of Shuxuetong group and heparin group at 1, 3 and 7 days after the modeling ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$). The coverage fraction of endothelial cells of Shuxuetong group was higher than that of heparin group at 1 and 7 days after the modeling ($P=0.002, P=0.001$). There was no statistical difference in coverage fraction of endothelial cells between Shuxuetong group and heparin group at 3 days after the modeling. **Conclusion:** Shuxuetong injection can promote the growth of endothelial cells and reduce the accumulation of blood platelets in vascular anastomotic stoma to avoid thrombogenesis, and it is similar to heparin in the total curative effect.

Key words thrombosis; Shuxuetong; heparin; microsurgery; blood platelets; fibrin; endothelial cells; animal experimentation

断肢(指)再植或游离组织瓣移植术后,移植肢(指)体及皮瓣能否成活主要与血管吻合口是否通畅有关,而这在很大程度上取决于术者的显微外科技术和术后药物的辅助治疗^[1-5]。疏血通注射液的主要成分为水蛭和地龙,具有抗凝、抗血小板聚集及溶栓的作用^[6-7],为探讨其在预防显微外科术后血栓形成的疗效,我们通过实验观察了疏血通注射液对大鼠血管吻合口周围纤维蛋白覆盖率、血小板覆盖率及内皮细胞覆盖率的影响,现总结报告如下。

1 材料和仪器

1.1 实验动物 12月龄清洁级健康 Wistar 大鼠 120 只,雌性 55 只,雄性 65 只,体质量(250 ± 50)g,由河南省实验动物中心提供,合格证号:410117。实验通过医学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验药物及试剂 疏血通注射液(牡丹江友博药业股份有限公司,规格:2 mL,批号 13012411);肝素钠注射液(天津生物化学制药有限公司,规格:2 mL,批号 1203110);生理盐水(青州尧王制药有限公司,规格:500 mL,批号 2A13031901)。

1.3 实验仪器 JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),S-3500N 扫描电子显微镜(日立高新技术公司),医用缝合针(上海申乐医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 分组及药物干预 实验在河南省洛阳正骨医院

实验动物中心进行,所有大鼠以标准饲料常规饲养。采用随机数字表将 120 只大鼠随机分为对照组、疏血通组及肝素钠组,每组 40 只。造模前 6 h,对照组、疏血通组及肝素钠组大鼠分别以生理盐水($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、疏血通注射液($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及肝素钠注射液($600 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行腹腔注射。

2.2 动物造模 通过腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠对所有大鼠进行麻醉,用药量 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。麻醉起效后,在大鼠左侧胸锁乳突肌内下方显露颈总动脉,将其游离、显露并切断,并即刻由 2 名技术熟练的高年资显微外科医师于显微镜下行端端吻合术,用 11-0 缝合线,每个吻合口缝合 8 针,吻合口通畅良好后分层缝合切口。术后常规包扎,大鼠自由活动。

2.3 实验观察 分别于造模结束后 30 min 及 1、3、7 d 时从各组随机选取 10 只大鼠,经原手术切口切开,分离暴露并切取包含吻合口远近端各 0.5 cm 的颈总动脉。沿纵轴剖开,用肝素钠漂洗后,再用 PBS 液漂洗,然后将漂洗后的血管内膜朝上置于滤纸上,经 2.5% 戊二醛溶液和 1% 锇酸双重固定、梯度乙醇脱水、醋酸异戊酯置换、临界点干燥后,再以离子溅射喷金^[8]。在 S-3500N 扫描电子显微镜下观察并计算吻合口及缝线表面覆盖的纤维蛋白、血小板及内皮细胞的百分比^[9]。

2.4 数据统计分析 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,3 组大鼠血管吻合术后血管吻合口处纤维蛋白

覆盖率、血小板覆盖率及内皮细胞覆盖率的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

整个实验过程中各组均无大鼠死亡。造模后不同时间 3 组大鼠血管吻合口电子显微镜下图片见图 1、图 2、图 3、图 4。

造模后不同时间,3 组大鼠血管吻合口纤维蛋白覆盖率比较,差异均有统计学意义。造模后 30 min 时对照组纤维蛋白覆盖率低于疏血通组和肝素钠组 ($P=0.000, P=0.000$);造模后 1、3、7 d 时对照组纤维蛋白覆盖率均高于疏血通组和肝素钠组 ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$);造模后 3 d 时疏血通组纤维蛋白覆盖率高于肝素钠组 ($P=0.000$);其余各时点疏血通组和肝素钠组比较,差异均无统计学意义。见表 1。

造模后不同时间,3 组大鼠血管吻合口血小板覆盖率比较,差异均有统计学意义。造模后 30 min、1 d、3 d、7 d 时对照组血小板覆盖率均高于疏血通组和肝素钠组 ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$);造模结束后 30 min 时疏血通组血小板覆盖率高与肝素钠组 ($P=0.027$);其余各时点疏血通组和肝素钠组比较,差异均无统计学意义。见表 2。

除造模后 30 min 时外,其余各时点 3 组大鼠血管吻合口内皮细胞覆盖率比较,差异均有统计学意义。造模后 1、3、7 d 时对照组内皮细胞覆盖率均低于疏血通组和肝素钠组 ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$);造模后 1、7 d 时疏血通组内皮细胞覆盖率均高于肝素钠组 ($P=0.002, P=0.001$);造模后 3 d 时疏血通组和肝素钠组比较,差异无统计学意义。见表 3。

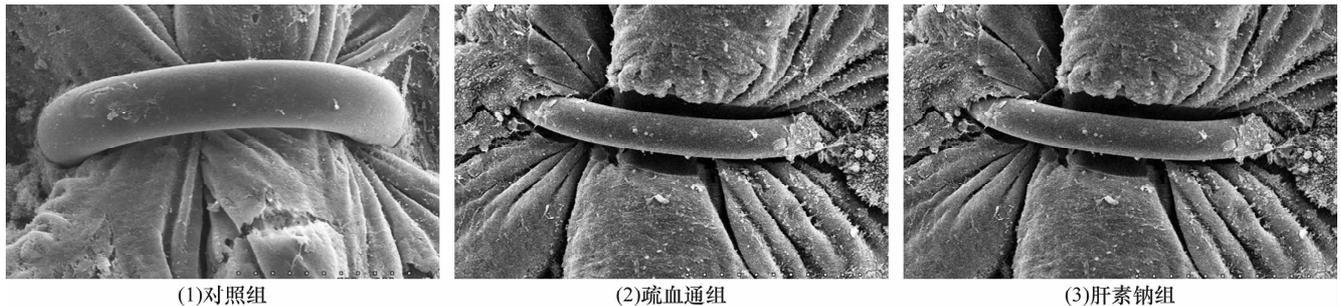


图 1 造模后 30 min 血管吻合口电子显微镜下观察结果 (×500)

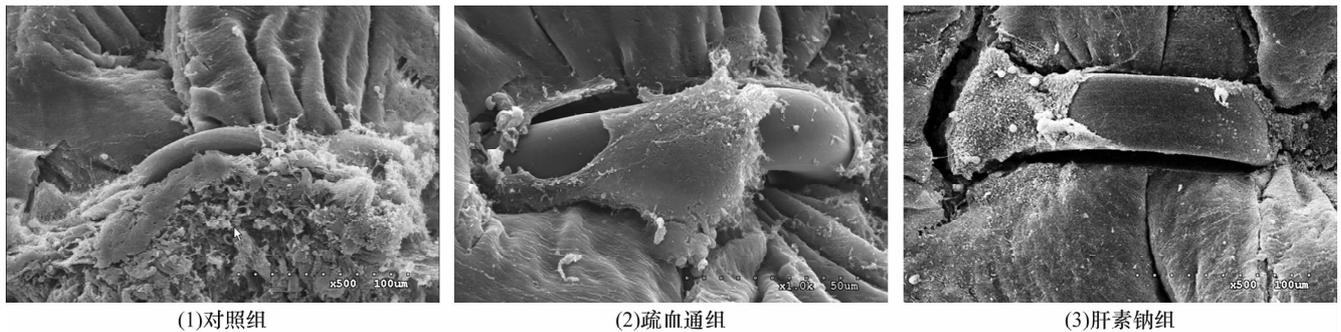


图 2 造模后 1 d 血管吻合口电子显微镜下观察结果 (×500)

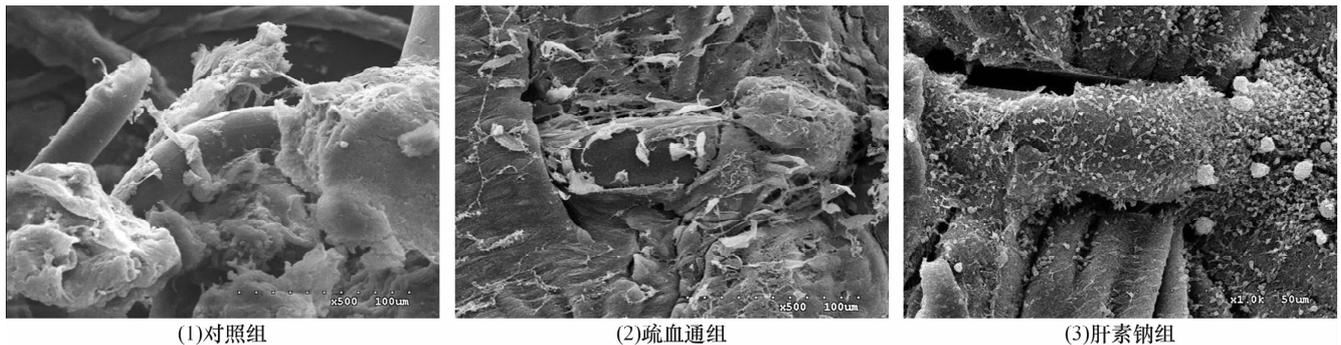


图 3 造模后 3 d 血管吻合口电子显微镜下观察结果 (×500)

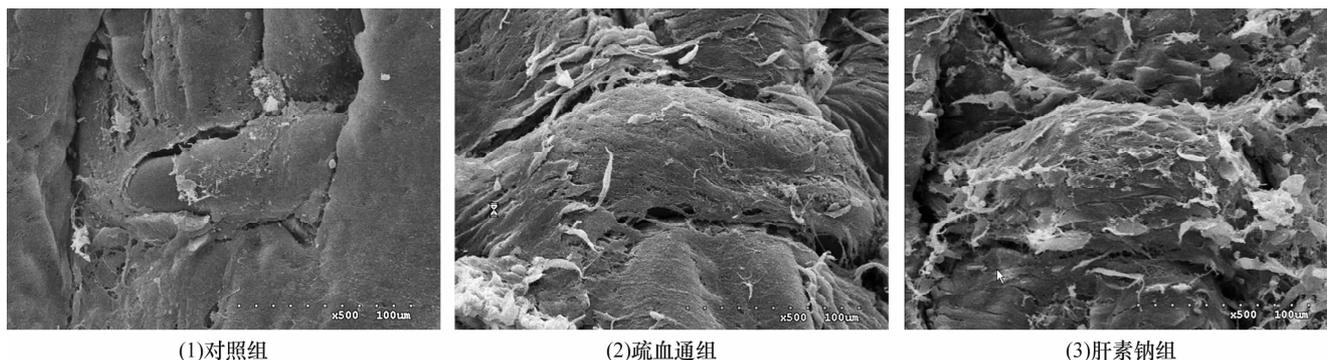


图 4 造模后 7 d 血管吻合口电子显微镜下观察结果 (×500)

表 1 3 组大鼠造模后不同时间血管吻合口纤维蛋白覆盖率的比较 $\bar{x} \pm s, \%$

组别	样本量(只)	造模后时间点			
		30 min	1 d	3 d	7 d
对照组	10	19.99 ± 1.41	78.17 ± 2.31	70.83 ± 1.72	49.50 ± 2.26
疏血通组	10	94.67 ± 4.32	73.67 ± 1.36	51.83 ± 2.48	19.16 ± 2.92
肝素钠组	10	95.77 ± 2.16	71.83 ± 1.72	44.79 ± 2.46	19.83 ± 1.47
F 值		133.802	18.741	212.943	341.174
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 3 组大鼠造模后不同时间血管吻合口血小板覆盖率的比较 $\bar{x} \pm s, \%$

组别	样本量(只)	造模后时间点			
		30 min	1 d	3 d	7 d
对照组	10	73.33 ± 2.50	10.83 ± 2.31	9.16 ± 1.17	1.05 ± 0.87
疏血通组	10	5.17 ± 1.17	1.16 ± 0.75	0	0
肝素钠组	10	2.83 ± 0.75	1.03 ± 0.89	0	0
F 值		352.002	84.734	368.903	14.413
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 3 组大鼠造模后不同时间血管吻合口内皮细胞覆盖率的比较 $\bar{x} \pm s, \%$

组别	样本量(只)	造模后时间点			
		30 min	1 d	3 d	7 d
对照组	10	0	0	22.67 ± 2.16	49.17 ± 1.49
疏血通组	10	0	25.83 ± 1.47	50.33 ± 1.86	80.17 ± 1.47
肝素钠组	10	0	23.17 ± 1.57	51.07 ± 2.19	75.83 ± 1.58
F 值		0.000	835.502	363.874	780.410
P 值		1.000	0.000	0.000	0.000

4 讨论

血管吻合口血流动力学的改变和血小板、红细胞的黏附聚集是影响血流量、导致血栓形成的基本因素,而这些因素会随着内皮细胞在吻合口处的修复覆盖而逐步减少、消除^[9]。血管内皮细胞具有抗凝和促凝的双重作用,但以抗凝作用为主,而内皮细胞分泌的血管内皮生长因子又可以诱导纤溶酶原激活物及其受体的合成^[10]。因此,如何减少血小板聚集,促进内皮细胞生长,尽快覆盖吻合口及缝线,成为预防显微外科手术血栓形成,保持血流通畅的关键。

显微外科手术会不可避免的损伤血管吻合口处

的内皮细胞,加上手术的创伤、失血、术后疼痛等刺激因素,会使机体较长时间处于应激状态,产生大量氧自由基,对血管吻合口处的内皮细胞造成再次损伤。血管内皮细胞受损后,血小板容易在受损部位黏附、堆积,导致血栓形成,造成吻合口处堵塞,发生血管危象。良好的纤维蛋白覆盖能为内皮细胞的生长提供爬行支架^[11],而且纤维蛋白还可直接诱导内皮细胞分泌血管内皮生长因子,或间接通过缺氧诱导因子-1 α 促进血管内皮生长因子表达^[12-14],促进血管内皮细胞的分裂增殖。

根据显微外科手术血清丙二醛(malonalde-

hyde, MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的变化规律^[15], 术后 1 ~ 48 h 血清内 SOD 活性较低, MDA 含量较高, 氧自由基累积, 损伤血管内皮细胞, 易发生血管危象; 术后 7 ~ 14 d 血清内 SOD 活性升高, MDA 含量降低, 氧自由基逐步清除, 血管危象较为少见。因此, 我们选定血管吻合术后 30 min 及 1、3、7 d 作为实验观察的时间点。

从本实验的结果来看, 造模后早期疏血通组和肝素钠组血管吻合口纤维蛋白覆盖率远高于对照组, 没有内皮细胞覆盖, 血小板覆盖率明显低于对照组; 随着时间推移, 3 组内皮细胞覆盖率均增加, 纤维蛋白覆盖率和血小板覆盖率逐渐降低, 但疏血通组和肝素钠组内皮细胞覆盖率明显高于对照组、血小板覆盖率低于对照组; 疏血通组和肝素钠组各时点的各项指标相当。这说明疏血通注射液能促进内皮细胞生长, 减少血小板在血管吻合口的堆积, 从而避免血栓形成, 其疗效与肝素钠相当。

5 参考文献

- [1] 韩明通, 方光荣. 断指再植术后抗凝药物的应用[J]. 中华显微外科杂志, 2012, 35(4): 347-350.
- [2] 胡长青, 冯亚高, 付贯忠, 等. 利器致腕部完全离断七例[J]. 中华显微外科杂志, 2012, 35(2): 122.
- [3] 庄加川, 李敏姣, 吴耿, 等. 指动脉静脉化在末节断指再植中的临床应用[J]. 中华显微外科杂志, 2012, 35(1): 78-79.
- [4] 雷林革, 刘刚义, 何如祥, 等. 醉酒患者断指再植术后血管危象 30 例分析[J]. 中华显微外科杂志, 2012, 35(6): 493-495.
- [5] 王培吉, 董启榕, 易男. 断指再植术发生血管危象的原因分析及防治措施[J]. 中华显微外科杂志, 2010, 33(1): 19-22.
- [6] 朱福海. 疏血通的药理作用与临床应用[J]. 安徽医药, 2006, 10(11): 873-875.
- [7] 鲁鑫, 权晓丹. 疏血通的临床应用[J]. 黑龙江医药, 2005, 18(4): 298-299.
- [8] 程春生, 查朱青, 单海民, 等. 红花注射液对大鼠血管吻合口修复的影响[J]. 中医正骨, 2006, 18(12): 3-5.
- [9] 李继峰, 顾玉东, 钟慈声, 等. 药物及吸烟对大鼠血管吻合口内皮细胞愈合的影响[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(5): 350-353.
- [10] Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, et al. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration [J]. Blood, 2010, 115(21): 4302-4312.
- [11] 种振岳, 高聿同, 朱磊, 等. 抗凝药物作用于小血管吻合口的电镜观察[J]. 山东医药, 2001, 41(24): 17-19.
- [12] Sahni A, Francis CW. Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires alphavbeta3 [J]. Blood, 2004, 104(12): 3635-3641.
- [13] Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(8): 1894-1904.
- [14] Shiose S, Hata Y, Noda Y, et al. Fibrinogen stimulates in vitro angiogenesis by choroidal endothelial cells via autocrine VEGF [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004, 242(9): 777-783.
- [15] 赵凤林, 李宗宝, 王传荣, 等. 断指再植术后患者血清丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性变化[J]. 中华手外科杂志, 2013, 29(5): 299-300.

(2014-09-03 收稿 2015-01-19 修回)

· 通 知 ·

中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会第八届学术年会征文通知

为增强我国中西医结合脊柱学科的整体实力、推动脊柱外科的创新与发展、展示近年来我国脊柱外科领域所取得的新成果, 由中国中西医结合医学会脊柱医学专业委员会主办、河南省洛阳正骨医院河南省骨科医院承办的“中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会第八届学术年会”拟于 2015 年 5 月 22—24 日在洛阳召开。本次会议的主题是脊柱微创和中西医结合手术与非手术治疗脊柱相关疾病新进展。会议将邀请著名脊柱外科专家作专题讲演, 欢迎国内同道参会交流。会议将授予国家 I 类继续医学教育学分。现将会议征文有关事宜通知如下。

征文范围: 脊柱相关疾病的中医、西医及中西医结合基础和临床研究, 上颈椎伤病诊疗新技术, 脊柱微创、融合与非融合治疗, 椎间盘源性疾病的非手术诊疗手段, 脊柱脊髓损伤的康复和功能重建。

征文要求: ① 提供 400 字结构式摘要, 包括题目、目的、方法、结果及结论。尽快将发论文题目发至会议邮箱, 以便安排会议日程。② 来稿需注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮政编码、联系电话及邮箱名称。③ 请将稿件发送至 zxyjh2015@126.com, 邮件主题请用“论文题目+第一作者姓名”。④ 截稿日期: 2015 年 3 月 31 日。

联系人及电话: 杨磊 13592077531, 董亮 13167571545

中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会
2015 年 2 月 6 日