

负压封闭引流技术干预局部氧分压的实验研究

王翔 杨帆 解杰 陈驾君 李占飞 白祥军

【摘要】目的 研究负压封闭引流 (vacuum sealing drainage, VSD) 技术干预下局部氧分压 (oxygen partial pressure, PtO_2) 的变化, 并探讨 VSD 减轻兔骨骼肌缺血 - 再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, I/R) 的可能机制。**方法** 于同济医院急诊创伤外科实验室, 将 30 只新西兰兔随机 (随机数字法) 分成对照 (假手术) 组、I/R 组和 I/R+VSD 组, 每组 10 只。通过阻断左后肢股动静脉 (4 h) 和恢复再灌注 (6 h) 的方法建立兔 I/R 模型, 根据远端是否存在动脉搏动作为判断建模成功标准。在此基础上使用 VSD 技术进行再灌注时的干预, 分别于建模前、再灌注前、再灌注后 3 h 或实验结束后等数个时间点, 在损伤肌肉区域测量、取样及耳缘静脉抽血, 对各组 PtO_2 、低氧诱导因子 -1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α) mRNA 和蛋白, 以及乳酸 (lactic acid, LA) 的含量进行检测。所得数据采用方差分析、LSD- t 法或 Tamhane's T2 法进行统计学分析。**结果** (1) PtO_2 : 建模后, I/R 组和 I/R+VSD 组 PtO_2 均下降, 但两组间差异无统计学意义 ($t=1.322$, $P=0.296$); 恢复再灌注后两组 PtO_2 显著上升, 但仍低于对照组 ($F=8.334$, $P=0.006$), 且在此期间 I/R+VSD 组持续低于 I/R 组直至实验结束 ($t=2.015$, $P=0.046$); (2) HIF-1 α mRNA: 与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组 HIF-1 α mRNA 在建模后 2 h 和 4 h 时均显著升高 ($F=10.120$, $P=0.002$ 和 $F=36.480$, $P<0.01$); 恢复再灌注后, I/R 组和 I/R+VSD 组虽较前降低, 但仍高于对照组 ($F=6.960$, $P=0.015$ 和 $F=4.470$, $P=0.035$); 且 I/R+VSD 组显著高于 I/R 组 ($t=1.799$, $P=0.048$ 和 $t=5.911$, $P=0.019$); (3) HIF-1 α 蛋白: 与对照组比较, I/R 组 HIF-1 α 蛋白表达在再灌注前和再灌注后 3 h 显著升高 ($t=15.567$, $P<0.01$ 和 $t=2.768$, $P=0.031$); I/R+VSD 组 HIF-1 α 蛋白表达在再灌注前、再灌注后 3 h 和 6 h 均显著升高 ($t=13.438$, $P<0.01$; $t=7.854$, $P=0.009$; $t=6.442$, $P=0.011$); 且 I/R+VSD 组在再灌注后均高于 I/R 组 ($t=1.878$, $P=0.046$ 和 $t=2.609$, $P=0.030$); (4) LA: 与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组外周静脉血和骨骼肌中 LA 的含量在实验结束后均显著升高 ($F=9.540$, $P=0.002$ 和 $F=13.750$, $P<0.01$), 且 I/R+VSD 组均显著低于 I/R 组 ($t=2.263$, $P=0.040$ 和 $t=3.617$, $P=0.027$)。**结论** VSD 技术可通过降低局部 PtO_2 , 上调 HIF-1 α mRNA 的表达和减少 HIF-1 α 蛋白的降解, 使 HIF-1 α 蛋白积聚和合成增加, 并可能通过改善组织无氧代谢, 减轻乳酸堆积, 对兔骨骼肌的缺血 - 再灌注损伤起到保护作用。

【关键词】 创伤; 缺血 - 再灌注损伤; 负压封闭引流; 组织氧分压; 低氧诱导因子 -1 α ; 乳酸

Research on the oxygen partial pressure with vacuum sealing drainage in rabbits Wang Xiang, Yang Fan, Xie Jie, Chen Jiajun, Li Zhanfei, Bai Xiangjun
Department of Traumatic Surgery, Affiliated Tongji hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: Yang Fan, Email: yf_tjh@163.com

【Abstract】Objective To measure the oxygen partial pressure (PtO_2) within a situation of vacuum sealing drainage (VSD) implement, and to discuss the potential mechanism of VSD alleviating skeletal muscle ischemia reperfusion (I/R) injury in rabbits. **Methods** Rabbits were randomly (random number) divided into three groups: sham ($n=10$), I/R ($n=10$) and I/R+VSD ($n=10$) groups. In the I/R group, left hind limb ischemia was induced by clamping the femoral artery and vein for 4 h, then released for 6 h, to allow reperfusion of the limb. VSD was only performed in the I/R+VSD group during the reperfusion period.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.11.008

基金项目: 湖北省科技厅自然科学基金面上项目 (2018CFB743)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科

通信作者: 杨帆, Email: yf_tjh@163.com

All rabbits were administered a series test of PtO₂ in different time points before and after reperfusion, and the left hind limb skeletal muscle and ear vein blood samples were immediately harvested for biochemical analyses, including hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) mRNA and protein, and lactic acid (LA). One-way analysis of variance (ANOVA), Fisher's least significant difference (LSD) test or Tamhane's T2 test was used where appropriate to analyze the experimental results. **Results** The levels of PtO₂ in the I/R and I/R+VSD groups were decreased after ischemia, but no significant difference was noted between the two groups ($t=1.322$, $P=0.296$). The PtO₂ levels in the I/R+VSD group were less increased than those in the I/R group after reperfusion ($t=2.015$, $P=0.046$). The levels of HIF-1 α mRNA and protein were increased after I/R injuries ($F=10.120$, $P=0.002$; $F=36.480$, $P<0.01$; $F=6.960$, $P=0.015$, $F=4.470$, $P=0.035$), and the levels in the I/R+VSD group were greater than those in the I/R group ($t=1.799$, $P=0.048$, $t=5.911$, $P=0.019$; $t=1.878$, $P=0.046$, $t=2.609$, $P=0.030$). The LA levels were significantly increased in the skeletal muscle and blood samples in the I/R and I/R+NPWT groups compared with those in the sham group at the final stage ($F=9.540$, $P=0.002$ and $F=13.750$, $P<0.01$), but the levels in the I/R+VSD group were less than those in the I/R group ($t=2.263$, $P=0.040$ and $t=3.617$, $P=0.027$). **Conclusions** Our results suggested that VSD technique decreased PtO₂ in regional ischemic muscles and led to increases in HIF-1 α mRNA and protein that subsequent accumulation of less LA in both of regional skeletal muscle and systemic blood circulation, which provided protection effect after I/R injury in rabbits.

【 Key words 】 Trauma; Ischemia reperfusion injury; Vacuum sealing drainage; Oxygen partial pressure; Hypoxia inducible factor 1 alpha; Lactic acid

严重创伤，特别是多发伤，常合并有不同程度的骨骼肌损伤，尤其是在挤压伤及挤压综合征中，由于血循环受阻，肌肉组织常常发生进行性坏死，即使解除压迫，继发的骨骼肌缺血-再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, I/R) 也可致伤情加重^[1]。这种缺血后低氧灌注导致组织细胞损伤，当再次恢复正常血供和氧供时，组织细胞的损伤不仅未能恢复，反而进一步加重的现象被称之为氧反常 (oxygen paradox)^[2-3]。其主要机制为线粒体损伤、细胞内钙超载和氧自由基的过度释放^[4]，临床上可表现为肌红蛋白血症、电解质紊乱、酸碱失衡和多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[5]。由此可见，如何控制氧反常，减轻恢复正常氧供后对组织造成的危害，避免继发的一系列并发症，成为临床研究的重点目标之一。

实验研究证明，各种缺血缺氧前/后预处理可以对组织损伤起到保护作用^[6]，但是对于创伤患者，由于无法预见创伤和实现创伤前预处理，使得后预处理成为改善再灌注损伤的重要手段。同济医院创伤外科利用负压封闭引流 (vacuum sealing drainage, VSD) 技术，在治疗挤压伤和预防 MODS 中取得了良好效果^[7-8]，但是该技术如何通过局部负压吸引来减轻缺血-再灌注损伤的具体机制尚不明确。因此，本研究拟通过缺血-再灌注损伤动物模型，结

合前期实验结果^[9-10]，来探讨 VSD 技术对组织氧分压 (oxygen partial pressure, PtO₂)、低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α) mRNA 和蛋白、以及无氧代谢物乳酸 (lactic acid, LA) 的影响，以探索其在骨骼肌缺血-再灌注损伤中的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性新西兰兔 30 只，由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供，本实验中的饲养与操作均符合《湖北省实验动物管理条例》。

1.2 动物建模

将新西兰兔分别称质量后按照 150 mg/kg 的剂量，耳缘静脉注射盐酸氯胺酮注射液，麻醉成功后固定于操作台。缺血-再灌注损伤模型制备：取实验兔左后腿中部以上的皮肤剃毛消毒后剪开，于大腿根部游离股动静脉并予以保护，大腿中上水平切断所有肌肉，将离断的肌肉进行原位缝合，使左后肢仅通过股动静脉控制血液循环。使用无创伤血管夹阻断股动静脉造成下肢缺血 (持续 4 h)，然后放开血管夹，造成再灌注损伤 (持续 6 h)。

1.3 实验分组

30 只实验兔随机 (随机数字法) 分为 3 组，即对照组 (假手术组)、缺血-再灌注组 (I/R 组)、

VSD 干预的缺血 - 再灌注组 (I/R+VSD 组), 每组 10 只: ① 对照组动物仅完成组织游离, 不进行左后肢动静脉的夹闭及开放; ② I/R 组动物完成组织游离后进行左后肢动静脉的夹闭及开放, 不进行 VSD 干预; ③ I/R+VSD 组动物在进行再灌注的同时, 对损伤处予以 VSD 干预。术中负压控制在 -125 mmHg (-16.6 kPa)。各组实验结束后将兔用注射水合氯醛法处死, 取相应部位组织进行生化指标测定。

1.4 主要仪器、材料和试剂

(1) 仪器。组织氧分压测量仪 (同济医学院生物医学工程实验室、专利号为 CN200320128234.1, 武汉, 中国), 便携式负压吸引仪 (维斯第公司, 武汉, 中国), CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 加州, 美国)。

(2) 材料。VSD 一次性使用负压引流护创材料 (维斯第公司, 武汉, 中国)、特制饲养笼 (同济医院实验动物中心, 武汉, 中国)。

(3) 试剂。① 实时荧光聚合酶链反应: TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司, 加州, 美国)、FSK-100 ReverTra Ace- α -cDNA 合成试剂盒 (Toyobo 公司, 大阪, 日本)、QPK212 plus SYBR Green real time-PCR master mix-plus- 荧光定量 PCR 试剂盒 (Toyobo 公司, 大阪, 日本); ② 酶联免疫吸附法: LA 检测试剂盒 (江莱公司, 杭州, 中国); ③ 免疫印迹法: HIF-1 α 抗体 (Novus 公司, 纽约, 美国)。

(4) 引物和内参。HIF-1 α 引物 (NM001082782.1) 由 Prime Premier 5.0 软件设计, 美国 Invitrogen 公司合成 (编号: 15596-026), 见表 1。

1.5 局部组织氧分压的测定方法

应用组织氧分压测量仪结合传感针, 分别记录建模前、建模后和再灌注 10 h 内各时间点下肢骨骼肌 PtO₂ 数值的变化。因模型动物的个体差异, 以及传感针安放位置存在一定误差 (I/R+VSD 组为 VSD 敷料区域皮下 0.5 cm, 对照和 I/R 组为相应区域皮下 0.5 cm), 遂以各组建模前测得的 PtO₂ 为基础值, 计算各组建模后测得值的比率, 从而体现 PtO₂ 的变化情况, 以尽可能消除组内误差的影响。测量过程中, 应避免过度刺激实验兔, 引起剧烈活动影响测量结果。

1.6 样本取材和检测方法

(1) HIF-1 α mRNA 组织标本: 分别于建模

表 1 qPCR 引物序列和反应条件

引物名称	序列 (5'→3')	序列大小 (bp)	退火温度 (°C)	循环次数
HIF-1 α	正向: CGAGATCGTGCGGGACAT	184	60	35
	反向: CAGGAAGGAGGGCTGGAAC			
β -actin	正向: TGATTTTACCCATCCGTGT	172	60	30
	反向: CTTCCAGGTGGCAGACTTTA			

前、再灌注前、实验结束后 3 个时间点损伤肌肉区域取材, 严格按照试剂盒说明操作, 一次性提取 RNA、反转录、循环后测定和计算 HIF-1 α mRNA 样本实际 Ct 值, 根据各时间点的扩增倍数比较 HIF-1 α mRNA 表达的变化。

(2) HIF-1 α 组织标本: 本实验引入 β -actin 作为内参, 采用免疫印迹法检测 HIF-1 α 蛋白的表达。分别于再灌注前、再灌注后 3 h 和实验结束后 3 个时间点损伤肌肉同一区域取材, 取漂洗干净的骨骼肌组织, 提取总蛋白进行 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转移至硝酸纤维素膜上, 封闭过夜后依次加入一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗, 使用化学发光法进行显色。

(3) LA 组织标本: 各组实验结束后, 将兔处死, 使用冰去离子水对获取的兔左后肢骨骼肌组织进行冲洗并进行匀浆处理, 使用低温离心机以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液以酶联免疫吸附法进行 LA 的检测, 严格按照试剂盒说明操作。

(4) LA 血液标本: 分别于建模前、再灌注前、实验结束后 3 个时间点, 于兔耳缘静脉抽取外周静脉血 1 mL, 使用低温离心机以 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液以酶联免疫吸附法进行 LA 的检测, 严格按照试剂盒说明操作。

1.7 统计学方法

所有数据使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计分析前先行数据正态性及方差齐性检验; 多组间比较采用单因素方差分析; 组间两两比较用 LSD-*t* 法 (确定方差齐性) 或 Tamhane's T2 法 (未确定方差齐性); 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨骼肌组织氧分压的时效变化曲线

与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组自建模后 (夹闭血管) 5 min 起, PtO₂ 均显著下降, 且两组间差异无统计学意义 ($t=1.322$, $P=0.296$); 与

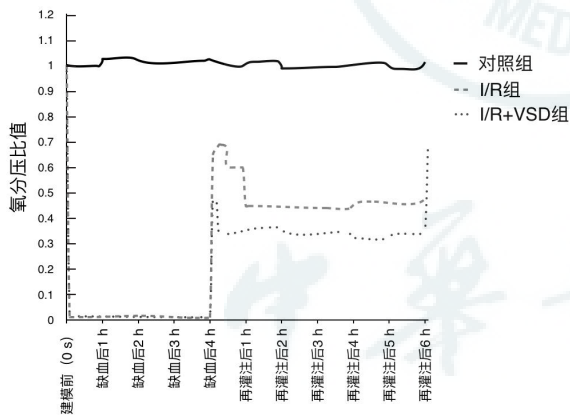
对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组再灌注后 5 min PtO₂ 均显著上升, 但仍低于对照组 ($F=8.334, P=0.006$), 随后 I/R+VSD 组 PtO₂ 持续低于 I/R 组直至实验结束 ($t=2.015, P=0.046$); 实验结束去除 VSD 敷料后, I/R+VSD 组较前显著升高, 接近 I/R 组再灌注后 5 min PtO₂ 水平 ($t=4.300, P=0.038$), 见图 1。

2.2 骨骼肌组织中 HIF-1 α mRNA 的变化

与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组 HIF-1 α mRNA 在建模后 2 h 和 4 h 时均显著升高 ($F=10.120, P=0.002$ 和 $F=36.480, P<0.01$); I/R 组和 I/R+VSD 组 HIF-1 α mRNA 在再灌注后 3 h 和 6 h 时虽有所下降, 但仍显著高于对照组 ($F=6.960, P=0.015$ 和 $F=4.470, P=0.035$); I/R+VSD 组 HIF-1 α mRNA 在再灌注后 3 h 和 6 h 时均高于 I/R 组 ($t=1.799, P=0.048$ 和 $t=5.911, P=0.019$), 见表 2。

2.3 骨骼肌组织中 HIF-1 α 表达的时效变化

与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组 HIF-1 α 蛋白表达相对灰度比在再灌注前、再灌注后 3 h 和 6 h 分别为 16.780 ± 4.352 和 15.198 ± 3.773 、 2.516 ± 0.341 和 3.858 ± 0.537 、 1.324 ± 0.264 和 3.299 ± 0.413 ; 其中, I/R 组 HIF-1 α 蛋白表达在



I/R 组为缺血 - 再灌注损伤组, I/R+VSD 组为缺血 - 再灌注损伤 + 负压封闭引流组

图 1 骨骼肌组织氧分压的时效变化曲线

Fig 1 Timing-dependent curve of oxygen partial pressure in skeletal muscle

表 2 骨骼肌组织中 HIF-1 α mRNA 相对表达的时效变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Timing-dependent changes of HIF-1 α mRNA in skeletal muscle ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	建模后 2 h	再灌注前 (建模后 4 h)	再灌注后 3 h	再灌注后 6 h
对照组	1.012 \pm 0.008	1.027 \pm 0.011	1.019 \pm 0.021	1.040 \pm 0.033
I/R 组	5.780 \pm 0.544 ^b	8.438 \pm 1.593 ^b	2.516 \pm 0.733 ^a	1.324 \pm 0.429 ^a
I/R+VSD 组	5.941 \pm 0.609 ^b	8.198 \pm 1.506 ^b	3.858 \pm 1.057 ^{ac}	3.299 \pm 0.872 ^{bc}
F 值	10.120	36.480	6.960	4.470
P 值	0.002	<0.01	0.015	0.035

注: I/R 组为缺血 - 再灌注损伤组, I/R+VSD 组为缺血 - 再灌注损伤 + 负压封闭引流组; 与对照组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与 I/R 组比较, ^c $P<0.05$

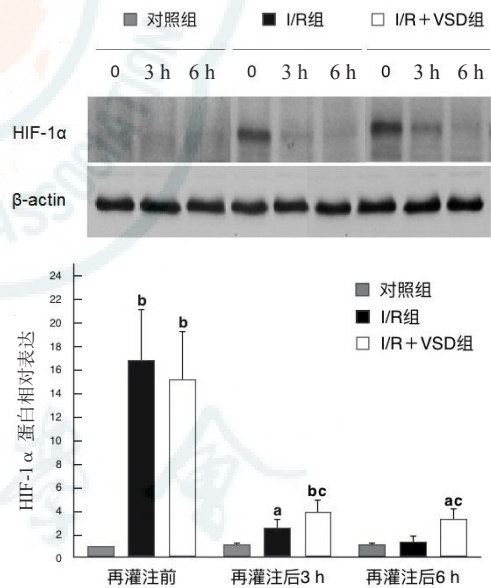
再灌注前和再灌注后 3 h 均显著升高 ($t=15.567, P<0.01$ 和 $t=2.768, P=0.031$); I/R+VSD 组 HIF-1 α 蛋白表达在再灌注前、再灌注后 3 h 和 6 h 均显著升高 ($t=13.438, P<0.01$; $t=7.854, P=0.009$; $t=6.442, P=0.011$); 且 I/R+VSD 组 HIF-1 α 蛋白表达在再灌注后 3 h 和 6 h 均高于 I/R 组 ($t=1.878, P=0.046$; $t=2.609, P=0.030$), 见图 2。

2.4 骨骼肌组织和外周静脉血中 LA 的变化特点

如表 3 所示, 与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组再灌注后 6 h 外周静脉血中 LA 表达显著升高 ($F=9.540, P=0.002$); 其中, I/R+VSD 组显著低于 I/R 组 ($t=2.263, P=0.040$)。与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组实验结束后 (处死后) 骨骼肌中 LA 表达显著升高 ($F=13.750, P<0.01$); 其中, I/R+VSD 组显著低于 I/R 组 ($t=3.617, P=0.027$)。

3 讨论

临床上, 休克、挤压伤和捆扎止血都可以造成



I/R 组为缺血 - 再灌注损伤组, I/R+VSD 组为缺血 - 再灌注损伤 + 负压封闭引流组; 与对照组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与 I/R 组比较, ^c $P<0.05$

图 2 骨骼肌组织中 HIF-1 α 蛋白表达的时效变化

Fig 2 Timing-dependent changes of HIF-1 α protein in skeletal muscle

表 3 外周静脉血和骨骼肌组织中乳酸的时效变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 3 Timing-dependent changes of lactic acid in peripheral venous blood and skeletal muscle ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	外周静脉血 (mmol/L)			骨骼肌组织 (mmol/L)
	建模前	建模后 4 h (再灌注前)	再灌注后 6 h (处死前)	处死后
对照组	1.373 ± 0.147	1.415 ± 0.172	1.400 ± 0.151	2.216 ± 0.336
I/R 组	1.405 ± 0.163	1.420 ± 0.201	3.341 ± 0.379 ^a	6.732 ± 1.631 ^a
I/R+VSD 组	1.388 ± 0.161	1.408 ± 0.196	3.017 ± 0.538 ^{ab}	4.599 ± 1.043 ^{ab}
F 值	1.440	1.280	9.540	13.750
P 值	0.375	0.462	0.002	<0.01

注: I/R 组为缺血-再灌注损伤组, I/R+VSD 组为缺血-再灌注损伤+负压封闭引流组; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 I/R 组比较, ^b $P < 0.05$

全身和局部区域的缺血缺氧改变, 其中骨骼肌是最易受累的组织之一。骨骼肌的直接损伤和缺血可引起细胞变性和坏死, 继发性肌红蛋白尿损伤肾脏, 而再灌注后的氧化应激反应, 使得组织内氧自由基释放、细胞内钙超载和线粒体损伤, 可导致损伤的进一步加重^[11]。同时, 由于缺血前预处理不适用创伤患者, 所以采用何种有效的后预处理方式来减轻再灌注损伤成为了临床研究的重点之一。

HIF-1 α 是一类对氧极其敏感的核转录因子, 在常氧环境极易降解失活, 无法发挥其调节效应^[12]; 而在低氧条件 ($O_2\% < 5\%$) 下主要发挥低氧耐受效应, 调控下游糖酵解途径酶、细胞生成素、血红素氧合酶-1、诱导型一氧化氮合酶等多种促细胞生存基因的转录激活, 提高低氧状态下的细胞生存率, 但是在无氧条件 ($O_2\% < 0.1\%$) 下时却发挥细胞程序性死亡效应, 诱导严重缺氧细胞发生凋亡和自噬^[13-14], 以减轻线粒体损伤、细胞坏死引起的胞内物质释放和失控性炎症反应的发生^[15]。因此, HIF-1 α 同组织氧分压密切相关, 可以直接反映缺氧程度。而 LA 是无氧代谢糖酵解中丙酮酸的重要代谢产物, 可以间接反映局部缺氧程度。

VSD 技术是我科白祥军教授积极推广的一项创新性的物理创面治疗技术^[16], 可明显预防和改善创面感染, 加快创面愈合, 2008 年遴选进入国家卫生部“十年百项”计划以来, 已予以全国推广并广泛应用于各种急慢性创面的治疗中^[17]。同时, 国内外的临床研究均表明, 应用 VSD 技术可有效改善缺血和再灌注所造成的损害^[18,18], 但其具体作用机制尚不明确。

推测在缺血-再灌注损伤中, VSD 技术可区域性调节 PtO_2 , 进而对缺氧状态下一系列分子、细胞、组织、系统进行干预。本研究结果证实: (1) 对照组未阻断血管, PtO_2 稳定, 而 I/R 组和 I/R+VSD 组建模后 PtO_2 持续下降接近无氧状态, 再灌注后,

即使恢复血运, 但仍低于对照组, 而且 I/R+VSD 组显著低于 I/R 组, 实验结束去除 VSD 敷料后, I/R+VSD 组 PtO_2 较前显著升高, 则提示该技术可以降低局部 PtO_2 ; (2) 与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组 HIF-1 α mRNA 在建模后均显著升高, 可能同血管阻断后, PtO_2 持续下降引起了 HIF-1 α mRNA 的上调有关; 恢复灌注后 HIF-1 α mRNA 则表达下调, 低于再灌注前水平, 说明一旦从无氧状态转变为低氧状态, 氧感受器信号再次发生变化, HIF-1 α 所发挥的功能就可能由促凋亡和自噬转变为低氧耐受, 反馈调节 HIF-1 α mRNA 的表达。而 I/R+VSD 组在再灌注后 HIF-1 α mRNA 高于 I/R 组, 提示 VSD 技术进一步降低了 PtO_2 ; (3) 与对照组比较, I/R 组再灌注前和再灌注后 3 h HIF-1 α 蛋白表达显著升高, I/R+VSD 组在再灌注前、再灌注后 3 h 和 6 h HIF-1 α 蛋白表达均显著升高, 提示无氧状态下 HIF-1 α 蛋白因避免被降解失活而积聚, 可持续发挥核转录作用; 而与 I/R 组比较, I/R+VSD 组在再灌注后的表达显著升高, 提示即使恢复血运后, VSD 技术仍然可以通过降低局部 PtO_2 来减少 HIF-1 α 蛋白的降解; (4) 与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组再灌注后 6 h 外周静脉血中 LA 较高, 提示缺血-再灌注后, 损伤组织以无氧代谢为主, 通过糖酵解的途径满足缺氧状态下细胞的能量需求。但是, I/R+VSD 组 LA 却显著低于 I/R 组, 可能同负压吸引在再灌注早期就直接加快组织微循环相关, 可避免“无复流现象”, 以提供更多的能量代谢底物; 亦或同其调节 HIF-1 α 蛋白和其下游关键酶的表达, 间接减轻氧化应激对细胞、线粒体的损伤, 提高有氧代谢率相关。与对照组比较, I/R 组和 I/R+VSD 组实验结束后骨骼肌中 LA 表达显著升高, 而且 I/R+VSD 组显著低于 I/R 组, 提示 VSD 技术虽然降低了局部 PtO_2 , 但是可能通过促进微循环等方式改善了组织的无氧代谢,

这同 VSD 技术构成敷料中心局部区域低氧和外周循环高灌注的“黑洞效应”并无矛盾^[10]。

综上所述, 本研究表明, VSD 技术通过降低局部 PtO_2 , 不仅可以上调 HIF-1 α mRNA 的表达, 而且显著减少 HIF-1 α 蛋白的降解, 使 HIF-1 α 蛋白短时间积聚和合成增加, 同时通过改善组织无氧代谢, 减轻乳酸堆积。其作用机制可能是负压调节微循环氧供的平衡, 减轻了氧反常的有害作用^[19]; 以及局部缺氧状态通过 HIF-1 α 途径, 起到对细胞低氧耐受的保护作用来实现的。但是如同高压氧治疗一样^[20], 如何通过 VSD 技术来调节负压和局部 PtO_2 的变化, 避免氧反常的同时达到组织微循环的高灌注, 彻底熟悉 VSD 技术“黑洞效应”的变化特点, 使 HIF-1 α 途径在无氧和低氧状态中达到平衡(既减少细胞的坏死和凋亡, 又增加细胞的低氧耐受, 最终提高细胞存活率), 还需要进一步的实验来探索。

参 考 文 献

- [1] Li QY, Zhao DH, Qu HY, et al. Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature [J]. World J Emerg Med, 2014, 5(3):165-170. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2014.03.001.
- [2] May T, Cooper JS. Hyperbaric, crush injury, compartment syndrome [M]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482232/>.
- [3] Davies KJ. The oxygen paradox, oxidative stress, and ageing [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 595:28-32. DOI: 10.1016/j.abb.2015.11.015.
- [4] Oliveira MA, Brandi AC, Dos Santos CA, et al. The calcium paradox-what should we have to fear? [J] Rev Bras Cir Cardiovasc, 2014, 29(2):249-254. DOI: 10.5935/1678-9741.20140054.
- [5] Nishikata R, Kato N, Hiraiwa K. Oxidative stress may be involved in distant organ failure in tourniquet shock model mice [J]. Leg Med (Tokyo), 2014, 16(2):70-75. DOI: 10.1016/j.legalmed.2013.11.004.
- [6] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/reperfusion [J]. Compr Physiol, 2016, 7(1):113-170. DOI: 10.1002/cphy.c160006.
- [7] 杨帆, 胡嵩, 白祥军, 等. 损害控制理论中负压封闭引流技术预防多器官功能障碍综合征的作用 [J]. 中华临床医师杂志, 2010, 4(12): 2441-2444. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2010.12.019.
- [8] 杨帆, 白祥军, 易成腊, 等. 急诊负压封闭引流术治疗防治挤压综合征 [J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(2): 103-106. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-8050.2009.02.30.
- [9] 杨帆, 胡嵩, 白祥军, 等. 负压封闭引流对兔创面氧分压和创面愈合的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(9): 940-944. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2011.09.012.
- [10] 杨帆, 白祥军, 胡嵩, 等. 负压创面治疗对兔创面氧分压变化和血管化的影响 [J]. 中华外科杂志, 2012, 50(7): 1-5. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2012.07.020.
- [11] Chavez LO, Leon M, Einav S, et al. Beyond muscle destruction: a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice [J]. Crit Care, 2016, 20(1):135. DOI: 10.1186/s13054-016-1314-5.
- [12] Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology [J]. Cell Metab, 2018, 27(2):281-298. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.10.005.
- [13] Yang B, He K, Zheng F, et al. Over-expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in vitro protects the cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis [J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2014, 15(7):579-586. DOI: 10.2459/JCM.0b013e3283629c52.
- [14] Wu J, Lei Z, Yu J. Hypoxia induces autophagy in human vascular endothelial cells in a hypoxia-inducible factor 1-dependent manner [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4):2677-2682. DOI: 10.3892/mmr.2014.3093.
- [15] Lindholm ME, Rundqvist H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise [J]. Exp Physiol, 2016, 101(1):28-32. DOI: 10.1113/EP085318.
- [16] 杨帆, 白祥军. 创面治疗的新理念 - 负压封闭引流技术 [J]. 中华外科杂志, 2010, 48(5): 387-389. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2010.05.019.
- [17] 杨帆, 白祥军. 负压封闭引流 (VSD) 技术在各类创面的应用研究进展 [J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(1): 82-85. DOI:10.3969/j.issn.1009-4237.2011.01.034.
- [18] Huang C, Leavitt T, Bayer LR, et al. Effect of negative pressure wound therapy on wound healing [J]. Curr Probl Surg, 2014, 51(7):301-331. DOI:10.1067/j.cpsurg.2014.04.001.
- [19] 王翔, 杨帆, 管震, 等. 负压封闭引流术减轻兔骨骼肌缺血 - 再灌注损伤的作用机制研究 [J]. 中华外科杂志, 2016, 54(4): 292-296. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2016.04.010.
- [20] Zhou SH, Sun YF, Wang G. Effects of hyperbaric oxygen on intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury in rats [J]. World J Emerg Med, 2012, 3(2):135-140. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2012.02.010.

(收稿日期: 2018-03-11)

(本文编辑: 邵菊芳)