

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520111153334

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

自体富血小板血浆对兔预构皮瓣再血管化
作用的实验研究

An experimental study about the effect of autologous
platelet-rich plasma on the revascularization of rabbit
prefabricated flap

胡 君 玲

指导教师姓名: 郑健生 副教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

英文缩写一览表

英文缩写	英文全称	中文全称
PRP	Platelet-rich Plasma	富血小板血浆
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子
aFGF	acid Fibroblast Growth Factor	酸性成纤维细胞生长因子
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	碱性成纤维细胞生长因子
PDGF	Platelet-derived Growth Factor	血小板源生长因子
TGF	Transforming Growth Factor	转化生长因子
EDTA	Ethylene DiamineTetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
IGF	Insulin-like Growth Factor	类胰岛素生长因子
HE	Hematoxylin and Eosin	苏木精伊红
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
CD34	Cluster of Differentiation 34	簇分化抗原 34

摘 要

研究目的:

本研究通过提取动物自身全血,制备成富血小板血浆(Platelet-rich Plasma, PRP)。在兔腹部两侧各构建一个股动静脉血管束预构腹部皮瓣,将制备好的 PRP 应用于其中任意一侧的皮瓣,另一侧应用等量生理盐水,探讨局部应用 PRP 对预构皮瓣存活的影响,深入了解自身来源的富血小板血浆(PRP)在皮瓣转移过程中的作用,进一步探讨 PRP 影响预构皮瓣生长的作用原理,为 PRP 的临床应用提供理论依据。

研究方法:

在 20 只健康雄性新西兰大白兔腹部两侧构建股动静脉血管束预构皮瓣共 40 侧,随机分成实验侧和对照侧各 20 侧。实验侧向预构股血管束周围注射实验前 1 天预先制备好的自体 PRP,对照侧注射等量生理盐水。按照随机数字表法将 20 只兔分成 4 组,每组 5 只。分别于 1 期术后 7d (A 组)、14d (B 组)取实验兔预构皮瓣组织行组织学观察、免疫组化观察和血管密度测定,并在 1 期术后 14d 行 2 期手术,即沿原预构皮瓣标记线掀起以植入的股血管束为蒂的岛状皮瓣后原位缝合,于 2 期术后 7d 进行皮瓣存活率检测,并分别于 2 期术后 7d (C 组)、14d (D 组)取预构皮瓣组织行组织学观察、免疫组化观察和血管密度测定,比较各个时间组实验侧与对照侧预构皮瓣成活情况的差异是否存在统计学意义,并初步探讨其成活机理。

研究结果:

2 期术后 7d,实验侧与对照侧皮瓣存活率分别为 $(76.60 \pm 8.91)\%$ 、 $(64.75 \pm 6.49)\%$, $P < 0.05$ 。A 组、B 组、C 组、D 组 4 组实验侧新生血管密度分别为 (10.78 ± 1.07) 、 (12.86 ± 1.18) 、 (17.42 ± 0.84) 、 (18.44 ± 0.87) ,与对照侧 (7.22 ± 0.84) 、 (9.36 ± 0.88) 、 (15.02 ± 1.04) 、 (16.04 ± 1.39) 比较,均有统计学意义($P < 0.05$),并且随着时间的发展,B 组较 A 组,C 组较 B 组,实验侧和对照侧新生血管密度增长均显著($P < 0.05$),但 D 组较 C 组增长不显著($P > 0.05$)。

研究结论:

- 1、建立了一个简便、稳定的兔股血管束预构腹部皮瓣模型；
- 2、自体 PRP 可以促进预构皮瓣的血管新生，提高皮瓣存活率。

关键词: 预构皮瓣 富血小板血浆 生长因子

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Objective:

In this study, we extract platelet-rich plasma (platelet-rich plasma,PRP) from animal itself. Construct femoral arteriovenous bundle prefabricated flap on both side of these rabbits' abdomens. We randomly divided the rabbits into experimental side and blank control side. Explore the influence of prefabricated flap survive by locally using PRP. Deeply understand the role of platelet-rich plasma (PRP) from their own body in the process of prefabricated flap transfer, and further study the action principle of PRP influencing skin flap growth, providing theoretical basis for the clinical application of PRP.

Content:

Construct femoral arteriovenous bundle prefabricated flap on both sides of the 20 healthy male New Zealand rabbits' abdomens, a total of 40 flaps. We randomly divided the rabbits into experimental side and blank control side, each side having 20 flaps. Then we injected the autologous PRP which was prepared one day before the experiment into hypodermia around the prefabricated femoral vascular bundle in experimental side, at the same time we simply injected the same amount of physiological saline of the same amount into the control side. By using the random number table method, we divided 20 rabbits into 4 groups, each group having 5 rabbits. Then, we stained the prefabricated flap tissue of experimental rabbits by HE and made an immunohistochemical observation over them the 7th day (group A) and the 14th day (group B) after the first-stage operations. The second-stage operation had been taken on after 14 days after of the first-stage operation. During the second-stage operation, we opened the island flap along the prefabricated flap marked line, that the pedicle is the implanted femoral arteriovenous bundle, then orthotopic suture the flap. Flap viability was evaluated on the 7th day of the second-stage operation. And we detected the immunohistochemistry of the prefabricated flap after 7

days (group C) and 14 days (group D) of the second-stage operation, then compared with the contralateral side, the difference of flap survival situation that Whether there is statistical significance in each time group, and discussed its survival mechanism.

Results:

7 days after the second-stage operation, the survival rates of the experimental sides' flap and the blank sides' flap were (76.60±8.91)%, (64.75±6.49)%, different from both the others with $P<0.05$. Comparing to the control sides with microvessel density of (7.22±0.84), (9.36±0.88), (15.02±1.04), and (16.04±1.39). The microvessel density of A, B, C, and D groups in experimental sides were (10.78±1.07), (12.86±1.18), (17.42±0.84), and (18.44±0.87), compared with the control sides (7.22±0.84), (9.36±0.88), (15.02±1.04), (16.04±1.39), and all the groups were with $P<0.05$, and meanwhile, with the development of time, for compared the group B to the group A, and the group C to the group B, we observed the microvessel density increased significantly on experimental sides and control sides ($P<0.05$). The growth was not significant when compared group D to group C ($P>0.05$).

Conclusion:

- 1、Set up a simple and stable models that femoral arteriovenous bundle prefabricated flap on rabbits' abdomens;
- 2、Autologous PRP can promote the prefabricated flap vascularization.

Key words: Prefabricated Flap ;Platelet-rich Plasma;Growth Factor

目 录

英文缩写一览表	I
摘 要.....	II
Abstract.....	IV
目 录.....	VI
Table of Contents.....	VIII
第一章 前 言.....	1
第二章 实验材料和实验方法.....	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 实验动物	7
2.1.2 实验试剂	7
2.1.3 实验仪器	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 实验动物与分组	8
2.2.2 PRP 制备活化.....	8
2.2.3 动物模型制备	9
2.2.4 实验步骤.....	10
2.2.5 标本采集与处理	12
2.3 观察指标及检测方法.....	12
2.3.1 皮瓣肉眼观察.....	12
2.3.2 皮瓣存活率测定.....	12
2.3.3 病理组织学检测.....	13
第三章 实验结果.....	18
3.1 PRP 制备和血小板浓度测定	18
3.2 大体观察及皮瓣存活率的检测.....	19
3.3 组织学检测	20
3.4 皮瓣毛细血管密度检测.....	24
3.4.1 免疫组化测定 VEGF 表达.....	24
3.4.2 CD34 免疫组化测定血管密度	25

结 论	31
讨 论	32
参 考 文 献	41
综 述	49
致 谢	59

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Table of English Abbreviation	I
Abstract in Chinese	II
Abstract in English	IV
Table of Contents in Chinese	VI
Table of Contents in English	VIII
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Experimental materials and technique	7
2.1 Experimental materials	7
2.1.1 Experimental animals	7
2.1.2 Experimental reagents	7
2.1.3 Experimental instruments	7
2.2 Experimental methods	8
2.2.1 Animals grouping	8
2.2.2 Preparation and Activation of PRP	8
2.2.3 Animals Experimental models established	9
2.2.4 Experimental procedures.....	10
2.2.5 Specimens sampling and processing	12
2.3 Observation indexes and Test methods	12
2.3.1 Macroscopic observation	12
2.3.2 Survival rate	12
2.3.3 Pathological and histological test	13
Chapter 3 Experimental results	18
3.1 PRP Preparation and Platelet Concentration Determination	18
3.2 General observation and Test the survival rate of the flaps	

19	
3.3	The pathological histological detection..... 20
3.4	Invesitigation of the capillay density..... 24
3.4.1	The expresssion of VEGF by immunohistochemistry.....24
3.4.2	determiration of vessel density by CD34..... 25
Conclusion 31
Discussion 32
Reference 41
Review 49
Acknowledgement
59	

厦门大学博硕士学位论文摘要

第一章 前言

在上世纪 70 年代前, 由于外科修复技术的限制, 对于一些复杂组织损伤的修复通常需要进行多期手术。随着轴型皮瓣、肌皮瓣、筋膜皮瓣、显微外科技术和皮肤软组织扩张器等开发利用, 使复杂组织修复的治疗和效果有了很大地提高。然而, 由于临床病例中常常存在血管变异、局部血管分布的限制以及供区功能障碍等问题, 使有些损伤的修复仍有很多困难, 为了解决这些问题, 学者们开始了对预构皮瓣的基础研究与临床应用。在转移修复前将所需供区组织转移到血管区域或将血管(或血管束)组织转移到所需供区组织下, 使得所需组织再血管化后再行二期转移修复, 这个过程中形成的皮瓣即为预构皮瓣。预构皮瓣的出现, 打破了解剖学的限制, 在没有知名血管分布的区域也可形成有轴型血管滋养的皮瓣, 大大拓宽了组织缺损修复的范围及领域。预构皮瓣已逐渐成为治疗复杂的畸形和缺损, 尤其是颜面部畸形缺损的理想手段, 它拓展了再造手术的范围, 摆脱了原有血管供区的局限, 可以满足人们的需要, 不受到血管分区的限制, 从而保证皮瓣有较好的血供, 同时它可形成皮瓣质地好、色泽佳、易于塑性且薄而大的皮瓣, 甚至可以同时预构血管神经束, 制成有感觉的皮瓣, 为临床医生, 尤其是整形外科医师在对于难治性复杂性缺损的修复上带来了新的灵感, 有很大的研发价值。预构皮瓣临床类型有以下 3 种^[1]: 一种是将血管或血管束转移到皮瓣内, 经过一段时间后(临床上一一般为 6~8 周), 等到植入血管与皮瓣内原有的血管建立起了良好的吻合, 再转移到需要修复的部位; 另一种是将皮片直接移植到血供较丰富的筋膜和大网膜上, 使其成活, 再作为预构的游离皮瓣, 通过血管吻合移植到需要修复的组织处; 还有一种是利用原有轴型皮瓣的供区, 预制扩张皮瓣, 这种预制综合了预构皮瓣和扩张皮瓣优点, 不仅增加了供区可用面积, 使得皮瓣变薄、血供更丰富外, 更可以延长血管蒂的长度。由此, 预构皮瓣的出现给临床外科医生提供了更多复杂组织修复的方法, 但是由于预构皮瓣血供范围难以预计, 可能会出现不可预料的皮瓣坏死, 尤其是在皮瓣的远端, 而再血管化不充分, 皮瓣出现血循环障碍, 是比较常见而严重的并发症。因此如何有效缩短血管化进程, 诱导血管新生是亟

待解决的问题。Asahara T 等人^[2]认为皮瓣再血管化的形成存在两种途径：一是血管的形成，即原有血管通过出芽方式形成大量微血管；二是血管的生成，即由缺血部位的血管内皮细胞分化而来。目前关于加快血管化过程的方法很多，临床上较常用的有^[3]：1、带筋膜血管植入预构区，可以加速预构皮瓣血管化进程；2、蒂部放置硅胶膜，使得血管化的过程以硅胶膜为载体，迅速进入皮瓣内，而不向下发展；3、将预构皮瓣与扩张术相结合，能缩短二次手术的时间，同时使得皮瓣变薄，血运更加丰富；4、植入血管束的同时进行皮瓣延迟手术，在皮瓣相对缺血的条件下更利于预构皮瓣的血管化；5、血管内皮生长因子（VEGF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）以及转化生长因子- β （TGF- β ）等血管形成因子，均可加快预构皮瓣的血管化过程，增加肉芽组织形成。

导致预构皮瓣坏死原因很多，可能与供体血管束血栓形成有关，也可能在手术操作过程中没有严格的无菌操作，引起感染造成手术失败，但归根到底是皮瓣再血管化的不充分，如何促进预构皮瓣的再血管化已逐渐成为学者们研究的热点。

1 生长因子促进预构皮瓣再血管化 大量研究表明，血管内皮生长因子（VEGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）、血小板源性生长因子（PDGF）等生长因子能够刺激细胞外基质和胶原形成，促进新生血管形成。Iwasawa^[4]在血管束和肉膜之间放置以胶原为载体的 TGF- β ，结果显示在各时间段实验组皮瓣存活率均大于对照组，并证实了 TGF- β 可以缩短兔预构皮瓣再血管化的时间。2011 年孙占胜等^[5]在大鼠血管蒂部局部应用 VEGF 重组蛋白，发现植入血管束与皮瓣间的血运在皮瓣预构时局部注射 VEGF 的 2~3 周已经形成，该实验也证明了在促进植入血管束新生血管的快速形成上，VEGF 作用功不可没，它使得预构轴型皮瓣时间缩短，并且提高了预构皮瓣的存活率。Wang 等^[6]将 bFGF 介导的 AAV2 对缺血性预构皮瓣进行基因治疗，结果证明，AAV2-bFGF 基因治疗组皮瓣血管化程度更显著，免疫组化染色显示，这种基因的转染大大增加了 bFGF 的表达，同时也说明了 bFGF 可以使得皮瓣存活和血管生成增加，从而促进预构皮瓣生长。黄晨昱等人^[7]用 VEGF/bFGF 来促进兔预构扩张皮瓣的形成，并且用生物蛋白胶作为 VEGF/bFGF 的载体和缓释体，结果表明 VEGF 和 bFGF 均能通过减少细胞凋亡且刺激细胞增殖来促进新生血管生长和预构扩张皮瓣的成熟。上述实验研究

表明，在促进预构皮瓣的血管化中，多种生长因子被证明有效，目前普遍认为 VEGF 能与内皮细胞受体特异性结合从而促进血管内皮细胞生长，是一种最重要的血管生成因子，能更好地促进皮瓣组织中成纤维细胞趋化增殖、内皮细胞生长，使皮瓣存活后加快新生血管生长，尽快与皮瓣受区和边缘建立血液循环和新生血管网，加快皮瓣存活率和成活质量。

2 细胞疗法促进预构皮瓣再血管化

2.1 脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs) Lu 等^[8]研究发现，ADSCs 具备促进血管新生的功能。ADSCs 能促进血管新生不仅是由于它具有分化为血管内皮细胞的潜能并进而参与血管构成，另外，它的分泌作用也在其中起到了不可忽视的作用。有研究表明脂肪来源干细胞在体外或移植入体内后能分泌生成。Li 等^[9]在大鼠预构皮瓣植入的血管蒂周围注射 ADSCs，结果显示预构皮瓣新生毛细血管数量和存活面积显著增加，在细胞植入后的 7 天内，ELISA 检测显示，VEGF-A 蛋白水平在 ADSCs 组预构皮瓣组随着时间延长是逐渐增加的，而在 PBS 空白对照组这种趋势是不显著的，这种趋势在软骨细胞组却呈现出轻微降低。这也进一步说明 ADSCs 能够分泌促进血管的形成的生长因子，是促进创伤愈合和缺血组织包括皮瓣血管形成的理想细胞来源。脂肪组织取材容易，并且能够在体外稳定增殖且衰亡率低，并且机体损伤小，利用自体脂肪来源干细胞还能避免个体的排异反应，如果 ADSCs 能够从吸脂术的多余脂肪组织中提取出来，从而用于促进再血管化和组织再生，将会是干细胞研究中的另一个重大突破，ADSCs 有望成为一新的种子细胞来源。

2.2 骨髓间充质干细胞 (bone marrow stem cells, BMSCs) 近几年来，骨髓间充质干细胞逐渐成为干细胞领域的研究热点，骨髓间充质干细胞能够分化为多种参与血管形成的细胞，还能分泌多种细胞因子，如 VEGF、IGF、EGF 等促进新生血管生成，改善皮瓣血供。丁志等^[10]在骨髓间充质干细胞促进兔的预构皮瓣存活的实验中发现，BMSCs 组皮瓣内 VEGF 蛋白表达量明显高于对照组，将预构皮瓣制成岛状皮瓣后第 7 天，实验组和对照组皮瓣存活率分别为 $(93.1 \pm 2.6)\%$ 、 $(51.5 \pm 7.5)\%$ ，表明异体移植 BMSCs 可促进预构皮瓣的血管再生，提高预构皮瓣的存活率。

2.3 内皮祖细胞(endothelial prog enitor cells, EPCs)是内皮细胞(endo thelial cells, ECs)的前体,是一种多能干细胞。在生理或病理因素刺激下,可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复。Zan 等^[11]将 EPCs 植入大鼠预构皮瓣的血管蒂周围,术后7天,毛细血管密度明显增多,预构皮瓣的存活面积显著增加,免疫荧光检测发现预构皮瓣中存在 Dil 标记的能够表达血管性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF)的 EPCs。该实验证明了局部植入 EPCs 是提高预构皮瓣存活率的一种可靠的方法,并且内皮细胞在促进新生血管形成方面要优于 VEGF。内皮祖细胞取材方便,在心血管疾病和血管再生的细胞治疗和基因治疗中具有广阔的前景。

3 皮肤软组织扩张术的影响 组织扩张器与预构皮瓣相结合可以减少供区的牺牲面积,并且扩张器植入后扩张囊对周围血管的机械力作用和扩张器产生的延迟效应都可以增加新生血管的管径和密度,从而促进预构皮瓣的成熟。有学者^[12]选择色泽及纹理相似的大而薄的颈胸预构皮瓣对11个面部损伤的病人进行修复,将组织扩张器放置在皮瓣筋膜下,使得皮瓣更薄更大,结果显示除两例患者的皮瓣远端坏死外,所有面部软组织缺损均被预构皮瓣成功覆盖。Murat^[13]等人将预制扩张锁骨上皮瓣用于重度烧伤病人的后期修复,并进行临床随访,研究结果证实了预制扩张的锁骨上皮瓣可以加快皮瓣血管化进程,使得皮瓣更薄,皮瓣转移后无臃肿,并且能够获得与受区肌肤颜色相近的供区皮瓣。皮肤软组织扩张器的加入,扩展了预构皮瓣的应用范围,使得一些条件不良的供瓣区可以得到利用。

4 高压氧治疗促进预构皮瓣血管化 高压氧治疗已经被证实可以用于促进预构肌皮瓣的血管新生,为高压氧治疗促进预构皮瓣的存活提供了一个可靠依据^[14]。2010年Celalettin等^[15]同时将骨髓间充质干细胞和高压氧治疗用于大鼠的骨皮瓣移植,结果表明,实验组的骨瓣新生血管形成和骨形成均较对照侧显著。进一步证明了高压氧治疗可以增强新生血管生成和骨的再生。因此,高压氧治疗也将成为预构皮瓣的再血管化的又一更快更有效的方法。

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是富含血小板的血浆,通过离心动物的全血,分离提取出较高浓度血小板的血浆,激活后释放出多种高浓度生长因子,这些生长因子已被证实软组织和骨修复中起着重要作用。目前,PRP注

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫