

动脉原位扩张即时延长的实验研究

班雨 滕青山 黎檀实 沈洪

【摘要】 目的 观察动脉快速延长对血管壁的影响,研究创伤性动脉缺损新的修复方法。方法 选用 12 只杂种犬,对 24 条股动脉进行急性延长,分别于术后 1、7 和 28 d 行延长段血管组织学、免疫组化和超微结构观察。结果 各组血管腔通畅率为 100%;延长段血管内膜光滑,中膜损伤轻微,各时间点胶原纤维与弹力纤维含量及其比值差异无显著性。动脉吻合后吻合口段顺应性降低;增殖细胞核抗原阳性细胞百分率峰值小于 20%;吻合口和扩张段内、外径组间差异均无显著性。总体比较缺损组和手术对照组组织学改变差异无显著性。结论 动脉缺损通过低压球囊扩张在有限张力存在下延长吻合是一种简单、安全、有效的治疗手段,可以部分替代静脉和人造血管移植,急诊情况下更具有实用价值。

【关键词】 血管损伤; 创伤修复; 动脉延长; 增殖细胞核抗原

Experimental study of acute intraoperative arterial elongation BAN Yu, TENG Qing-shan, LI Tan-shi, SHEN Hong. Emergency Department of General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of arterial elongation on the arteries and to set up a new method for vessel repair. **Methods** This study was performed in 24 arteries that underwent different traumatic deficit and acute intra-operative elongation repair. The vessels were harvested and studied by histology, electron microscopy, and immunohistochemistry on day 1, 7 and 28 after operation. **Results** The total unobstructed rate was 100% for deficit group as well as control experimental group. The content of collagen and elastin at various intervals showed no significant difference, the ratio of them also had no significant difference. Following anastomosis, the compliance of arteries was decreased, the peak value of proliferative cell nuclear antigen(PCNA) positive cell percentage was less than 20%, the internal diameter of elongation and anastomosis edge had no significant difference between deficit group and control group. There were no marked differences in pathological changes between deficit group and control group. **Conclusion** Acute intraoperative artery elongation after balloon dilatation is a simple, safe, and effective alternative to vein interposition in the repair of traumatic arterial injuries. It appears to be a useful method in the emergency treatment.

【Key words】 arterial injury; traumatic repair; arterial elongation; proliferative cell nuclear antigen

常规情况下血管缺损大于 2 cm 时,需要自体或人工血管移植,但手术复杂,并发症多,早期容易导致血栓形成和出血,后期内膜增生、重塑,容易导致狭窄。因此,本研究拟探索扩大血管直接吻合适应证的可行性和手术方法。

1 材料与方法

1.1 动物分组: 12 只健康杂种犬,共计 24 条股动脉,随机分为手术对照组(A组)、中度缺损组(B组)和重度缺损组(C组),每组 8 条血管。3 组分别切除 0(原位缺损)、14 和 28 mm 长的血管,缺损组测量切除段离体后长度,计算轴向血管收缩率。

1.2 手术方法: 静脉注射质量分数为 2% 的硫喷妥钠 30 mg/kg 麻醉。游离股动脉约 70 mm,分别造成 0、14 和 28 mm 长血管缺损后,气囊(7F Cook Inc,

5 mm~4.0 cm, Australia) 扩张远端和近端血管(1.5 atm 扩张 5 min,连用 2 次),合拢器合拢断端,手术显微镜下用 6-0 聚丙烯单丝缝线(polypropylene, American Cyanamid Co)血管减张缝合后,两定点连续褥式缝合法端对端血管吻合,勒血实验通畅后将血管外膜和血管周围组织缝合固定,吻合口周围包裹明胶海绵,术后双下肢固定,抗凝治疗。

1.3 血管收缩度、直径测量: 术后 1、7 和 28 d 处死动物,手术显微镜下游标卡尺测量吻合口和扩张段内、外径,切取活体 60 mm 长血管,同时测量离体后长度,计算轴向血管收缩率。

1.4 组织学观察

1.4.1 BH-2 光学显微镜下观察: 新鲜血管,肝素冲洗,纵向剖开,制成 5 mm×5 mm 组织块。部分组织块置于体积分数为 10% 的中性甲醛溶液中固定 48 h,水洗 12 h,梯度乙醇脱水,浸蜡包埋。组织切片厚 5 μm。染色方法:常规苏木素-伊红(HE)染色,组

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科

作者简介:班雨(1970-),男(汉族),河北省人,博士研究生,主治医师。

织切片;Weigert 法染弹力纤维, Van Gieson 法染胶原纤维, Neubert 法染平滑肌。

1.4.2 日立 H-600 透射电镜观察:部分组织块置体积分数为 3% 的戊二醛液中固定 6 h, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗;体积分数为 1% 的锇酸两次固定,乙醇脱水,己腈梯度置换,低真空干燥,镀金。

1.4.3 IBAS-2000(Opton)计算机图像处理系统测量在相同辉度和放大倍数下弹力纤维、胶原纤维和平滑肌的相对含量,并计算刚度值,即胶原纤维与弹力纤维含量的比值(C/E);以及增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞百分率峰值,每张切片选 5 个视野,将其相加后取平均数。

1.5 PCNA 检测:石蜡切片烤片,脱蜡至水;体积分数为 3% 的过氧化氢和 0.05% 胰酶分别孵育,抗原修复;体积分数为 1% 的正常山羊血清室温封闭,加入一抗,室温下 3 h, PBS 冲洗 5 min(×3 次);滴加生物素标记的二抗(质量分数为 1% 的牛血清白蛋白稀释 1:300), 37 °C 下孵育 40 min, 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP) 37 °C 孵育 40 min; 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显微镜下控制显色,苏木精复染细胞核 2 min;体积分数为 1% 的盐酸乙醇分化,自来水返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固,光学显微镜下观察。采用 PCNA 工作液(PC10)和 S 试剂盒(美国 Zymed 公司)。

1.6 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全随机分组单因素方差分析及 F 检验对

实验数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 标本测量:各组血管腔通畅良好。各组间仅吻合口壁厚差异有显著性;吻合口内、外径,扩张段内、外径及管壁厚度差异均无显著性(表 1)。术前轴向血管收缩率 35%,组间差异无显著性;术后收缩率均减少,张力大者明显,组间差异有显著性(表 2)。

2.2 组织学:术后 1 d 各组镜下结构相似,内、中、外膜结构正常,部分内皮细胞脱落,炎细胞浸润,无附壁血栓和栓塞性血栓(彩色插页图 1);7 d 时 A 组内膜未见增生或轻度增生,B、C 组内膜不同程度增生,平滑肌细胞(SMC)表现活跃,管腔无明显缩小;28 d 吻合口已完全内皮化,A 组内膜轻度增厚,血管壁结构完整,B、C 组血管形态正常,平滑肌增殖和弹力纤维丰富。血管组织结构成分相对含量见表 3。

2.3 免疫组化:棕黄色染色阳性增殖细胞核主要分布于中膜和内膜,A 组核阳性率小于 B、C 组,A 组中膜未见 SP 法染色阳性增殖细胞核,内膜仅见单层染色阳性增殖细胞核(彩色插页图 2),B、C 组内膜及增生内膜见染色阳性增殖细胞核,中膜可见散在 SP 法染色棕黄色阳性增殖细胞核(彩色插页图 3)。各组 PCNA 阳性细胞百分率峰值分别为(13.70±5.81)%、(14.51±5.70)%和(18.32±3.78)%。

2.4 超微结构:术后 1 d 各组超微结构差异不明显,分层结构清楚,偶见炎性细胞浸润,未见内弹力膜(IEL)断裂(彩色插页图 4),SMC 肌浆中线粒体

表 1 各组吻合口和扩张段血管内、外径及管壁厚度比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Vessel wall thickness, the outer and internal diameter of the anastomosis and expansion section ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血管内径(mm)		血管外径(mm)		血管壁厚度(mm)	
	吻合口	扩张段	吻合口	扩张段	吻合口	扩张段
A 组	3.48±1.36	4.12±1.71	5.63±2.28	4.90±2.11	2.40±0.77	0.80±0.32
B 组	2.94±1.30	4.02±1.35	5.22±2.14	4.87±1.92	2.83±1.11	0.91±0.22
C 组	2.78±1.37	4.33±1.51	6.30±2.50	4.85±1.78	3.67±0.81	0.78±0.23
F 值	0.596 1	0.085 5	0.445 1	0.001 3	4.036 0	0.577 3
P 值 A-B	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
B-C	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
C-A	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

表 2 手术前各组血管切除比例和收缩率比较(n=8)

Table 2 Comparison of vascular contraction ratio between preoperative and postoperative (n=8)

组别	术前				术后			
	游离长度 ($\bar{x} \pm s, mm$)	切除长度 (mm)	离体后长度 ($\bar{x} \pm s, mm$)	切除比例 (%)	收缩率 ($\bar{x} \pm s, %$)	切除前长度 (mm)	离体后长度 ($\bar{x} \pm s, mm$)	收缩率 ($\bar{x} \pm s, %$)
A 组	69.88±4.91	0	0	0	0	60	40.57±4.25	32.38±3.39
B 组	68.88±6.13	14	8.91±1.41	20.33	35.81±2.74	60	43.37±3.78	27.72±2.42
C 组	67.13±4.78	28	18.35±2.13	41.71	35.00±1.93	60	45.35±4.11	24.42±2.21
					t=0.681			F=17.266 0
					P=0.506 8			P< 0.01

表 3 各组手术不同时间股动脉吻合后弹力纤维、胶原纤维、平滑肌相对含量及 C/E 值比较($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Comparison of content of collagen, dastin, smooth muscle and C/E value at different time($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	术后时间(d)	胶原纤维(%)	弹力纤维(%)	平滑肌(%)	C/E	4 个指标的 P 值
A 组	1	34.93±10.31	14.08±5.17	50.69±17.73	1.76±0.85	P 均>0.05
	7	31.71±13.35	19.16±4.06	48.72±13.03	1.66±0.83	
	28	39.75±10.61	17.54±3.90	42.19±11.38	1.85±1.02	
B 组	1	29.78±10.11	16.51±5.23	53.79±18.46	1.80±0.85	P 均>0.05
	7	38.24± 8.21	18.03±4.29	43.77±10.46	2.04±0.96	
	28	42.51±17.66	17.03±6.33	40.09±11.25	2.47±0.97	
C 组	1	27.76±11.11	18.24±6.10	50.18± 9.69	1.52±0.55	P 均>0.05
	7	31.37± 9.93	20.53±6.00	47.04±16.11	2.12±1.01	
	28	39.50±11.30	18.37±7.71	40.05±16.35	2.17±0.89	

肿大,结构模糊;术后 7 d 各组见动脉弹力层完整、变厚,C 组见 SMC 平行于弹力层梭状延伸,胞核明显,肌浆内容物丰富,内膜增厚,内膜下可见幼稚 SMC,纤维母细胞增生(彩色插页图 5);术后 28 d B、C 组见胶原纤维增生,细胞外基质增多,增生的 SMC 散在分布于基质中,可见类平滑肌细胞在内皮下出现,弹力纤维相对完整,未见全层损伤及内、外弹力膜广泛撕裂,修复以增生反应为主。

3 讨论

缺损动脉吻合的主要挑战来自于:张力可使血管变细,缝合线孔过大漏血或撕脱,吻合口两端血管壁牵拉后出现中层损伤、内膜脱落和血栓形成。本研究通过适当措施可以减轻或消除以上情况。

3.1 扩张压迫和张力牵拉对血管壁的影响:血管壁的主要细胞成分是 SMC 和内皮细胞,二者不仅有结构上的联系,而且代谢上也是互相联系的,内皮细胞产生抑素,抑制中膜平滑肌的增生^[1]。正常血管壁的中膜 SMC 为收缩型,其基质内主要充满收缩丝、肌动蛋白和肌球蛋白,这些细胞能够收缩,但由于抑素样抑制信号的影响却不能进行有丝分裂。若血管牵拉受损,则有丝分裂抑制消除,中膜 SMC 可变为代谢型,其胞质内富有合成活性的细胞器,而收缩丝则很少。代谢型肌细胞对促细胞分裂刺激最为敏感,保持功能代谢和增生活性,并产生大量胶原及弹性蛋白基质。弹力纤维的主要功能是不消耗生化能量而产生弹性张力,胶原纤维具有防止血管过度扩张的功能,平滑肌能产生主动张力。这些结构及功能上的特点使血管壁可以扩张延长,所以动脉弹性好,肌层延伸性强。实验发现动脉吻合后胶原纤维相对含量逐渐增高,弹力纤维相对含量先升后降,平滑肌相对含量逐渐减少,C/E 值增高,刚性增强,顺应性减弱,这可能是血管最初承受扩张力的刺激而引起血管反射性收缩,而随时间延长,逐渐出现应力松弛的结果。后期发现张力越大,中层破裂倾向越大,术后

1 d 无此差异,提示张力存在,限制了弹力膜回缩、修复或张力本身对弹力膜及中层膜有新的损害;但在裂损处和缝线暴露处仍有完整内膜覆盖,说明增生有自限性;增生强度与内膜、内弹力板损伤情况相关,说明有限张力存在时;血管组织损伤程度和修复方式与无张力时类似,表明张力存在下进行血管吻合有其可行性^[2]。同时证明中膜平滑肌牵拉变长及内弹力膜伸直断裂,管壁扩张状态的维持是由于平滑肌的变性及其内弹力板损伤后增生愈合^[3]。

3.2 动脉气囊原位扩张术中延长的手术方法:动脉创伤性缺损是平时的常见损伤,以往多数学者将缺损小于可游离段血管 1/4 作为对端吻合的允许标准^[4],强调无张力血管吻合的重要性^[5]。但随着对血管损伤后反应、修复机制认识的深入和药物治疗效果的提高,以及手术技巧的日渐成熟,对突破以上标准的动脉缺损进行成功吻合已有报道^[6]。本实验中造成游离段血管缺损最大达 41.71%,然后行气囊扩张,并在低张力存在下行端对端吻合,结果实验各组动脉通畅率 100%,组织形态学研究证实重建的血管形态正常,血流通畅,吻合口及扩张段血管腔内膜光滑。因此,可以认为,严格掌握手术适应证,选择合适的气囊直径,选择最佳的扩张压力和时间,熟练手术技巧,合理选用抗凝药物及术后妥善固定患肢,是增加血管腔通畅率的有效途径。

术中应注意:①血管暴露良好;吻合口两端血管必须有充分的游离,仅留血管一侧和组织床相连,进行气囊扩张,扩张后吻合前完全游离血管,对不重要的小分支可予以结扎后剪断。②气囊间断扩张:目的在于扩张血管直径,利于延长,克服血管痉挛,减小弹力膜的弹性回缩,解除血管外膜对血管的束缚,造成中膜平滑肌受压变长及内弹力膜伸直断裂,使平滑肌变性及其内弹力板损伤后增生愈合维持管壁扩张延伸状态。③无损伤操作:采用二点牵拉连续贯穿缝合合法,进针打结准确,边距、针距适度,针序恰当,确

保内膜平整对齐,吻合口外翻。连续贯穿缝合可以自行调节,松紧一致,避免了间断缝合时由于打结松紧不一致所造成的单针线受力以及切断撕裂血管的情况,也可避免连续褥式缝合容易形成的环状狭窄。

④减张缝合:用适宜的无损伤缝线在距离断端约 10 mm 处的血管壁上穿透血管外膜与平滑肌层,对侧同样操作,将线头和线尾交叉牵拉,拉至损伤血管两个断端相互靠拢时打结。这样可以对抗两个断端回缩在吻合口形成的张力,减小吻合口所受张力。

⑤术后低分子肝素浸泡明胶海绵包裹吻合口,局部释放,可以连续 24 h 维持有效浓度,防止针口漏血,缓释药物,防止扩张吻合早期血管内膜损伤后血小板大量黏附、聚集、附壁血栓形成。

3.3 远期效果判断:PCNA 是一种仅在增殖细胞中合成与表达的酸性核蛋白,作为合成 DNA 的必需物质,目前已将 PCNA 作为判断细胞增殖的重要标志物^[7]。成年后血管 SMC 增殖受到抑制,一般仅有 1% 的血管 SMC 增殖分裂,但损伤后细胞增殖时,G1→S 期表达大幅增高,PCNA 在 G1 期中被诱导并反之诱导其他调控蛋白,如 DNA 聚合酶 δ 、非组蛋白染色体蛋白、降钙素、DNA 聚合酶复合因子等。所以,根据 PCNA 阳性率可以判定细胞增殖情况,进而判断远期狭窄情况,为进一步预测最终的增生和狭窄程度提供了依据。文献报告增殖从损伤后 1~2 d 开始,7 d 达峰值,因而本实验选用了各组术后 7 d 的标本进行染色。血管内膜剥脱性损伤时,Karim 等^[8]报告 PCNA 阳性细胞百分率的峰值为 22%,血管无明显狭窄等;而 Li 等^[9]报告 PCNA 阳性细胞百分率的峰值为 45.7%,内膜较中膜反应早,血管狭窄程度同 PCNA 阳性细胞百分率相关。本实验中 PCNA 阳性细胞百分率峰值均小于 20%,B 组中膜未见染色阳性增殖细胞核,内膜仅见单层

染色阳性增殖细胞核,C 组内膜及增生内膜见染色阳性增殖细胞核,中膜见散在染色阳性增殖细胞核,预期血管后期狭窄程度较轻。

综上所述,本研究探讨了张力存在下血管吻合后的病理过程,并探索术中、术后处理措施,为临床提供了治疗依据和提高手术技巧,扩大了端端血管吻合的适应证。在急救情况下、战争中及偏远地区等无血管移植材料情况下,更具有实际价值。

参考文献:

- Forrester J S, Fishbein M, Helfant R, et al. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies[J]. J Am Coll Cardiol, 1991, 17: 758 - 769.
- 班雨,黎檀实,滕青山,等. 动脉损伤腔内气囊止血对血管壁的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 392.
- Andersen H R, Maeng M, Thorwest M, et al. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury, insights from a porcine coronary restenosis model[J]. Circulation, 1996, 93: 1716 - 1724.
- 雷刚刚,吴德贤. 小动脉张力缝合与静脉移植的比较[J]. 中华显微外科杂志, 1988, 11: 89.
- Burch J M, Richardson R J, Martin R R, et al. Penetrating iliac vascular injuries: recent with 233 consecutive patients [J]. J Trauma, 1990, 30: 1450.
- Althaus S J, Keskey T S, Harker C P, et al. Percutaneous placement of self-expanding stent for acute traumatic arterial injury[J]. J Trauma, 1996, 41: 145 - 148.
- Travali S, Ferber A, Reiss K, et al. Effect of the myb gene product on the expression of the PCNA gene in fibroblasts[J]. Oncogene, 1991, 6: 887 - 894.
- Karim M A, Miller D D, Farrar M A, et al. Histomorphometric and biochemical correlates of arterial procollagen gene expression during vascular repair after experimental angioplasty[J]. Circulation, 1995, 91: 2049 - 2057.
- Li R, Waga S, Hannon G J, et al. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair [J]. Nature, 1994, 371: 534 - 537.

(收稿日期:2004-11-10 修回日期:2005-01-20)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

第十次全国中西医结合危重病急救医学学术会议征文通知

中国中西医结合学会急救医学专业委员会拟于 2005 年 6 月在广东省广州市(增城,暂定)召开第十次全国中西医结合危重病急救医学学术会议。本届学术会议主要内容:①国内脓毒症诊断及中西医结合治疗现状;②介绍国内外脓毒症研究的新进展;③讨论和交流脓毒症中西医结合治疗成果;④介绍国内外危重病急救医学研究的新动态。

征文内容:西医、中医、中西医结合有关内、外、儿、妇、神经、麻醉、检验、影像、窥镜、创伤、灼伤、护理等各学科基础与临床研究的论文,感染性、非感染性全身炎症反应综合征并发症、多器官功能障碍综合征、临床监测新技术、急救药物等,以及急诊、ICU 质控标准和医疗管理。

征文要求:全文 3 000 字以内(附 500 字摘要,包括目的、方法、结果、结论),用稿纸正楷书写,标点符号要准确,著者要顺序排列,随寄软盘(Word 排版)和单位介绍信。请自留底稿,恕不退稿。截稿日期:2005 年 4 月 30 日。

寄稿地址:天津市和平区睦南道 122 号天津市天和医院急救医学中心夏欣华收,邮编:300050。

传真:(022)23114748,电话:(022)23042084。

(中国中西医结合学会急救医学专业委员会)

不同方法制备猪脱细胞真皮基质及创面移植的实验研究

(正文见92页)



图1 脱细胞真皮基质 I, 胶原纤维排列规整, 未见任何细胞成分(HE, ×100)
Figure 1 Acellular porcine dermal matrix I, structure of collagen fiber was regular and there were not any cells (HE, ×100)



图2 脱细胞真皮基质 II, 胶原纤维排列规整, 未见任何细胞成分(HE, ×100)
Figure 2 Acellular porcine dermal matrix II, structure of collagen fiber was regular and there were not any cells (HE, ×100)

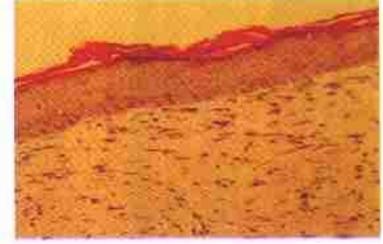


图3 复合皮 I 组6周后, 表皮层分层接近正常, 真皮层内可见胶原纤维排列规整(HE, ×100)
Figure 3 Histological examination of compound skin grafting group I at the 6 th week after operation showed epiderm was nearly normal and the collagen fiber was regular(HE, ×100)

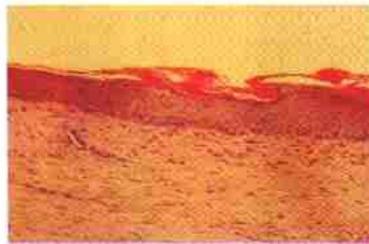


图4 复合皮 II 组6周后, 真皮层内可见胶原纤维排列较规整, 有完整的皮肤结构(HE, ×100)
Figure 4 Histological examination of compound skin grafting group II at the 6 th week after operation showed collagen fiber was regular and the intact skin structure (HE, ×100)



图5 术后6周免疫组化抗层粘连蛋白染色证实复合皮 I 组有完整基底膜结构, 乳头结构明显(HE, ×100)
Figure 5 Anti-laminin antigen staining at 6 th week after operation showed the intact basal membrane and obvious papillae structure in compound skin grafting group I (HE, ×100)



图6 术后6周免疫组化抗层粘连蛋白染色证实复合皮 II 组有完整基底膜结构, 乳头结构明显(HE, ×100)
Figure 6 Anti-laminin antigen staining at 6 th week after operation showed the intact basal membrane and obvious papillae structure in compound skin grafting group II (HE, ×100)

动脉原位扩张即时延长的实验研究

(正文见105页)



图1 B组术后1 d光学显微镜下血管壁结构 (HE, ×200)
Figure 1 Structure of blood vessel wall under light microscope at 1st day after operation in group B (HE, ×200)

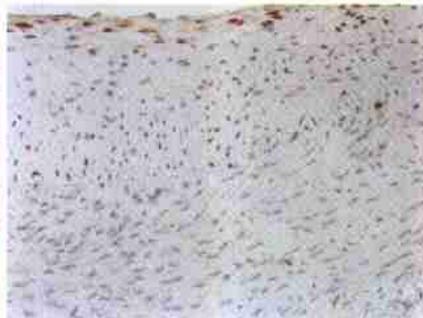


图2 C组术后1 d透射电子显微镜下血管壁结构 (TEM, ×3 500)
Figure 2 Structure of blood vessel wall under transmission electron microscope at 1st day after operation in group C (TEM, ×3 500)

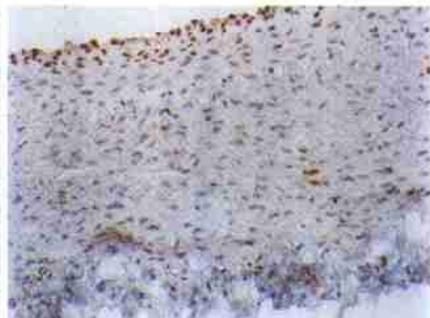


图3 A组术后7 d透射电子显微镜下血管壁结构 (TEM, ×10 000)
Figure 3 Structure of blood vessel wall under transmission electron microscope at 7 th days after operation in group A (TEM, ×10 000)



图4 A组术后7 d PCNA在血管壁中的表达 (SP, ×200)
Figure 4 Protein expression of PCNA in blood vessel wall at 7 th day after operation in group A (SP, ×200)



图5 C组术后7 d PCNA在血管壁中的表达 (SP, ×200)
Figure 5 Protein expression of PCNA in blood vessel wall at 7 th day after operation in group C (SP, ×200)