

· 代谢营养与肠道修复 ·

左旋精氨酸对糖尿病大鼠烧伤创面血管形成的影响

葛奎 陆树良 青春 谢挺 戎柳 牛轶雯 王敏骏 廖镇江 史济湘

【摘要】 目的 观察左旋(L)精氨酸对糖尿病大鼠烧伤创面修复过程中血管形成的影响。方法 雄性 SD 大鼠,设烫伤对照(A)组、糖尿病烫伤(B)组、甘氨酸对照(C)组和 L-精氨酸干预(D)组,每组各 25 只。B、C、D 组大鼠通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病模型, C、D 组分别管饲甘氨酸和 L-精氨酸 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。8 周后取各组大鼠(每组 5 只)背部皮肤组织测定糖含量。之后各组大鼠给予 20% TBSA 深 II 度烫伤,于伤后 3、7、14、21 d 测量创面面积,计算创面愈合率;采用 CD34 免疫组织化学染色计算微血管密度(MVD);检测创面组织释放一氧化氮(NO)、血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子(TGF)- β_1 含量。结果 与 B 组相比, D 组大鼠创面愈合率从伤后第 7 天起显著增加为 $[(44.10 \pm 3.50)\%, P < 0.05]$, 创面 MVD 值在伤后各时相点均显著增加 ($P < 0.05$), 创面组织中释放 NO、VEGF 和 TGF- β_1 量增加, 皮肤组织糖含量降低为 $(1.380 \pm 0.120) \text{ mg/g}$ 。结论 L-精氨酸可通过增加 NO、VEGF 和 TGF- β_1 的合成与释放,降低皮肤组织糖含量,增加糖尿病大鼠烧伤创面的血管形成,并促进创面愈合。

【关键词】 烧伤; 糖尿病; L-精氨酸; 新生血管化,生理性

The influence of L-arginine on angiogenesis in burn wounds in diabetic rats GE Kui, LU Shu-liang, QING Chun, XIE Ting, RONG Liu, NIU Yi-wen, WANG Min-jun, LIAO Zhen-jiang, SHI Ji-xiang. Burn Institute, Rui Jin Hospital Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, P. R. China
Corresponding author: LU Shu-liang, Email: sluu@sh163.net, Tel: 021-64370045-611001

【Abstract】 Objective To investigate the possible mechanism of L-arginine supplementation on the angiogenesis of burn wounds in diabetic rats. Methods One hundred male Sprague-Dawley (SD) rats were used in the study and were randomly divided into A (scalding control, $n = 25$), B (scalding of the rats with diabetes, $n = 25$), C (L-glycin control, $n = 25$) and D (L-arginine supplementation, $n = 25$) groups. Diabetes was produced by intra-peritoneal injection of streptozotocin (STZ) in B, C and D groups. The rats in C and D groups were gavaged with L-glycin and L-arginine in dose of $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. The glucose content of the back skin tissue was determined for five rats in each group eight weeks after STZ administration. Deep partial thickness scalding of 20% TBSA was engendered on the back in the other 80 rats. The wound area, wound healing rate, and microvascular density with CD34 immunohistochemistry staining were determined on 3rd, 7th, 14th, and 21st post scalding days (PSDs). In addition, the amount of nitric oxide (NO) released from the wound tissue and the tissue contents of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) from wound were determined at the above time points. Results Compared to those in group B, the wound healing rate in group D increased significantly since the 7th PSD $[(44.10 \pm 3.50)\%, P < 0.05]$, and the wound MVD value was increased significantly at all post-burn time points. Furthermore, the levels of VEGF, NO and TGF- β_1 in the wound tissue was also increased significantly, while the glucose content in the cutaneous tissue was decreased to $(1.380 \pm 0.120) \text{ mg/g}$. Conclusion L-arginine supplementation could be beneficial to the angiogenesis in the burn wound of the rats with diabetes, as well as to wound healing by increasing the synthesis and the release of VEGF, NO and TGF- β_1 from burn wound and by decreasing the glucose content in the cutaneous tissue of diabetic rats.

【Key words】 Burn; Diabetes mellitus; Arginine; Neovascularization, physiologic

糖尿病合并烧伤创面愈合速度明显低于一般烧伤,其原因很多,其中之一是创面血管形成减少。文献报道,左旋(L)精氨酸是一种血管形成促进剂^[1],可促进创面血管形成,但对糖尿病烧伤创面中血管

形成的影响目前鲜见报道。本实验拟通过建立糖尿病大鼠烫伤(以下称烧伤)模型,观察 L-精氨酸对糖尿病难愈创面的作用并探讨其可能的机制。

材 料 与 方 法

一、动物分组及模型的建立

清洁级雄性 SD 大鼠(复旦大学上海医学院动物实验部),体重 200 ~ 250 g。随机分为烧伤对照(A)

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054205)

作者单位:200025 上海第二医科大学瑞金医院烧伤科

通信(讯)作者:陆树良, Email: sluu@sh163.net, 电话: 021 -

64370045 - 611001

组、糖尿病烧伤(B)组、甘氨酸对照(C)组和 L-精氨酸干预(D)组,每组 25 只。B、C、D 组腹腔注射链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,65 mg/kg)建立糖尿病模型。C、D 组大鼠分别管饲甘氨酸和 L-精氨酸 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,共喂养 8 周。随后于每组中各抽取 5 只大鼠处死,取背部皮肤标本冻存,待检皮肤糖含量。其余大鼠参照文献[2]给予 20% TBSA 深 II 度烧伤。

二、取材

烧伤大鼠分别于伤后 3、7、14、21 d 处死,每组每时相点 5 只。取大鼠背部全层皮肤标本。部分标本用体积分数 10% 甲醛溶液固定后,制成石蜡块保存;部分标本立即行组织块培养^[2];其余标本置于 -70℃ 下保存。

三、检测指标

1. 创面愈合率:以伤后 24 h 创面为准,用透明方格纸描绘创面。用 Adobe Photoshop 7.0 和 Osiris 软件进行面积计算。创面愈合率 = (烧伤面积 - 各时相点面积) ÷ 烧伤面积 × 100%。

2. 微血管密度(MVD)计数:以抗 CD34 抗体(美国 Santa Cruz 公司)对标本进行免疫组织化学染色,操作步骤按 SP(生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶)试剂盒(福州迈新公司)说明书进行。根据 CD34 表达并参照 Pareek 等^[3]的方法计算 MVD,以此作为新生血管形成的量化指标。

3. 糖含量测定:取各组烧伤前冻存的大鼠皮肤组织,称重后加入质量浓度 2% $\text{ZnSO}_4 + 0.24 \text{ mmol/L Ba(OH)}_2$ 溶液共 1.5 ml,匀浆后离心。取上清液通过自动生化分析仪(L×20 型,美国 Beckman coulter 公司)检测糖浓度,计算每克皮肤组织的糖含量 $(\text{mg/g}) = \text{上清液体积}(\text{ml}) \times \text{糖浓度}(\text{mmol/L}) \times 180 / [\text{皮肤组织块湿重}(\text{g}) \times 1000]$ 。

4. 一氧化氮(NO)、血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子 β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$) 浓度的测定:取 1 cm × 1 cm 的全层创面组织,洗净,去除痂皮、坏死组织后,用 3 ml MCDB110 培养液培养 18 h。取组织块培养液,(1)NO 含量的测定按照试剂盒(南通碧云天公司)说明书进行;(2)采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法检测 VEGF、 $\text{TGF-}\beta_1$,操作按试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)说明书进行。

四、统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验,差异显著性检验采用 SAS 统计软件。

结 果

1. D 组创面愈合率在伤后 7 d 开始增加,与其余组大鼠比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。C 组创面愈合率较 A、B 组显著增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠创面愈合率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the percentage of healing area of the wounds among the groups(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(d)		
		7	14	21
A 组	15	24.32 ± 1.73	50.09 ± 2.06	79.47 ± 3.08
B 组	15	14.60 ± 3.40*	25.40 ± 3.00*	55.80 ± 8.00*
C 组	15	35.50 ± 2.50**	56.20 ± 3.60**	78.00 ± 8.00*
D 组	15	44.10 ± 3.50** ^Δ	48.80 ± 11.90*	82.20 ± 13.60*

注:A 组为烧伤对照组,B 组为糖尿病烧伤组,C 组为甘氨酸对照组,D 组为 L-精氨酸干预组;与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$

2. 烧伤后各组大鼠创面均有 CD34 阳性表达。

A 组伤后 14 d 为表达高峰。B 组显著低于 A 组 ($P < 0.05$)。C、D 组大鼠 MVD 值明显高于 A、B 组,尤以 D 组为甚 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠创面微血管密度值比较(条/mm², $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of MVD value in the wounds of the rats among the groups(条/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(d)			
		3	7	14	21
A 组	20	29.42 ± 4.14	37.32 ± 8.64	50.07 ± 6.31	30.08 ± 2.34
B 组	20	26.77 ± 5.51	19.33 ± 2.91*	34.33 ± 3.77*	22.93 ± 7.64
C 组	20	39.71 ± 2.61**	41.40 ± 5.80*	82.52 ± 34.07	51.96 ± 8.84**
D 组	20	44.62 ± 6.05**	54.35 ± 15.99*	76.30 ± 6.50**	66.91 ± 8.38** ^Δ

注:A 组为烧伤对照组,B 组为糖尿病烧伤组,C 组为甘氨酸对照组,D 组为 L-精氨酸干预组;与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$

3. A、B、C、D 组大鼠烧伤前皮肤组织的糖含量分别为 (0.480 ± 0.082) 、 (2.100 ± 0.220) 、 (1.410 ± 0.086) 、 $(1.380 \pm 0.120) \text{ mg/g}$ 。

4. NO 测定结果见表 3。

表 3 各组大鼠组织块培养液一氧化氮浓度比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of the NO concentration in the medium fluid of rat tissue culture among the groups(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	伤后时间(d)			
		3	7	14	21
A 组	20	2.86 ± 1.19	3.54 ± 0.57	3.54 ± 0.39	3.59 ± 2.92
B 组	20	2.29 ± 0.68	2.87 ± 0.73	2.87 ± 0.37*	2.85 ± 0.48
C 组	20	2.38 ± 0.95	2.91 ± 0.73	19.62 ± 3.70**	1.87 ± 0.74
D 组	20	1.44 ± 0.62	3.16 ± 1.28	6.02 ± 0.96** ^Δ	5.50 ± 1.94

注:A 组为烧伤对照组,B 组为糖尿病烧伤组,C 组为甘氨酸对照组,D 组为 L-精氨酸干预组;与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$

5. VEGF 浓度测定结果见表 4。

表 4 各组大鼠组织块培养液血管内皮生长因子浓度比较
(%, $\bar{x} \pm s$)Tab 4 Comparison of the VEGF concentration in the rat tissue medium among the groups (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(d)			
		3	7	14	21
A 组	20	37.93 ±11.26	37.57 ±16.83	42.34 ±4.91	51.43 ±23.72
B 组	20	19.96 ±5.67*	42.64 ±9.72	44.55 ±6.85	43.90 ±11.16
C 组	20	35.65 ±9.62*	44.43 ±6.74	180.97 ±68.56**	138.02 ±50.07**
D 组	20	48.83 ±9.05*	69.55 ±31.08*	215.27 ±146.64**	279.40 ±119.08** Δ

注:A 组为烧伤对照组,B 组为糖尿病烧伤组,C 组为甘氨酸对照组,D 组为 L-精氨酸干预组;与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较, # $P < 0.05$;与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$

6. TGF- β_1 浓度测定结果见表 5。表 5 各组大鼠组织块培养液转化生长因子 β_1 浓度比较
(%, $\bar{x} \pm s$)Tab 5 Comparison of the TGF- β_1 concentration in the rat tissue medium among the groups (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(d)			
		3	7	14	21
A 组	20	42.40 ±1.10	52.63 ±18.43	43.82 ±2.88	36.07 ±5.52
B 组	20	34.43 ±6.22	55.08 ±12.09	50.47 ±2.84	38.98 ±1.18
C 组	20	48.70 ±1.59	61.35 ±14.57	43.62 ±7.07	44.08 ±10.01
D 组	20	35.61 ±9.19	73.35 ±14.97	57.46 ±7.08* Δ	44.74 ±5.31***

注:A 组为烧伤对照组,B 组为糖尿病烧伤组,C 组为甘氨酸对照组,D 组为 L-精氨酸干预组;与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较, ## $P < 0.01$;与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

L-精氨酸可舒张血管,抑制血栓发生并促进血管形成,对糖尿病烧伤创面有显著的促愈合作用^[4]。在创面愈合过程中,必须有丰富的新生血管供给修复组织充足的血流和氧分,创面血管形成不足,可导致创面难愈。因此研究 L-精氨酸对糖尿病烧伤创面血管形成的影响,对阐明 L-精氨酸促进糖尿病烧伤创面愈合的机制有十分重要的意义。

CD34 是血管形成的重要标志,新生血管的 CD34 呈高表达,抗 CD34 抗体标记能很好地区分新生血管和成熟血管^[3],根据 CD34 表达计算出的 MVD 是新生血管形成的量化指标。本研究中, B 组大鼠烧伤后创面中 MVD 与 A 组相比不能相应增加,提示糖尿病烧伤创面血管形成不足。用 L-精氨酸干预后, D 组大鼠各时相点创面 MVD 均显著高于 B 组,伤后 21 d 显著高于 C 组,表明 L-精氨酸可促进糖尿病烧伤创面血管形成。由此推测:增加创面

血管形成改善创面的营养状况,是 L-精氨酸促进糖尿病烧伤创面愈合的重要机制之一。

本实验诱导前大鼠血糖水平 < 8.9 mmol/L,诱导后血糖水平 ≥ 11.2 mmol/L,体重明显下降者,被视为糖尿病模型诱导成功。根据各组大鼠血糖水平,腹腔注射低精蛋白锌胰岛素 1~4 U/d,维持血糖在 11.2 mmol/L 以上,避免低酮症的发生。结果 B 组大鼠皮肤组织中的糖含量显著高于 A 组, D 组与 B 组相比,糖含量显著下降。研究表明,高糖环境可抑制内皮细胞的增生^[5]。推测 L-精氨酸是通过降低皮肤组织的糖含量用以解除对内皮细胞的抑制作用。甘氨酸也可降低糖尿病皮肤组织的糖含量,其作用机制有待进一步研究。

NO 是一个重要的信号转导分子,内皮细胞源性 NO 在 VEGF 促进血管形成过程中发挥重要作用^[6],阻断 NO 合成酶可抑制 VEGF 的血管形成作用^[7]。伤后 14 d, D 组大鼠创面组织释放的 NO 含量增加,表明 L-精氨酸可增加 NO 的合成与释放,促进糖尿病烧伤创面血管形成。甘氨酸也可增加糖尿病皮肤组织的 NO 释放量,但作用机制有待进一步研究。VEGF 是一组与肝素结合的同源二聚体蛋白,具有明显的促进血管形成作用^[7]。本实验中 D 组大鼠创面组织释放的 VEGF 增加,表明 L-精氨酸可通过增加 VEGF 合成和释放这一途径促进创面血管形成。

人们推测 TGF- β_1 高表达可触发 VEGF 的转录和稳定^[8]。本实验也证实了 L-精氨酸可增加创面组织的 TGF- β_1 的合成与释放,有助于 VEGF 发挥促进糖尿病烧伤创面血管形成的作用。

研究结果提示,糖尿病创面难愈的一个重要原因可能与创面血管形成不良有关。L-精氨酸可通过增加 NO、VEGF 和 TGF- β_1 的合成与释放,降低皮肤组织的糖含量,增加糖尿病烧伤创面的血管形成,改善局部血流,从而促进糖尿病烧伤创面愈合。

参 考 文 献

- 1 Wu G, Meininger CJ. Arginine nutrition and cardiovascular function. J Nutr, 2000, 130:2626-2629.
- 2 Lu Shuliang, Xiang Jun, Qing Chun, et al. Effect of necrotic tissue on progressive injury in deep partial thickness burn wounds. Chinese Medical Journal, 2002, 115:323-325.
- 3 Pareek G, Shevchuk M, Armenakas NA, et al. The effect of finasteride on the expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density: a possible mechanism for decreased prostatic bleeding in treated patients. J Urol, 2003, 169:20-23.
- 4 葛奎, 陆树良, 青春, 等. L-精氨酸对糖尿病烧伤创面促愈作用的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19(增刊):11-14.
- 5 Kamal K, Du W, Mills I, et al. Antiproliferative effect of elevated glucose in human microvascular endothelial cells. J Cell Biochem,

1998, 71: 491-501.

6 Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*, 1997, 95: 1030-1037.

7 Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, et al. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1997, 100: 3131-3139.

8 Latty GA, McLeod DS, Merges C, et al. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol*, 1996, 114: 971-977.

(收稿日期: 2003-08-15)
(本文编辑: 王旭)

· 病例报告 ·

超长斜方肌肌皮瓣修复腋部严重电烧伤一例

王爱武 刘燕 李金有 张万锋 陈俊刚 王文俊

患者女, 22 岁, 因接近 35 kV 高压电致伤, 伤后 1 d 入院。查体: 左腋部有圆洞形创面, 肌肉呈熟肉状, 周围为Ⅲ度创面, 面积 40 cm × 20 cm (图 1)。左上肢肿胀明显, 皮肤苍白, 尺、桡动脉搏动微弱, 除上臂内侧浅感觉存在外, 其余感觉、运动功能丧失。右腕部有椭圆形创面, 桡动脉缺损 8 cm, 桡骨远端炭化, 尺动脉搏动存在, 右手血运尚可。双下肢有 10% TBSA Ⅲ度创面。诊断: 高压电烧伤, 总面积 23% TBSA, Ⅲ度 10% TBSA。

组织生长包裹骨质。20 d 后感染得到控制, 缝合皮瓣同时行脐旁皮瓣断蒂术 (图 3)。



图 1 左腋部电烧伤创面

入院后急诊行清创探查术, 见肱三头肌、三角肌、肱三头肌部分坏死; 胸大小肌、背阔肌及大圆肌肋骨附着部坏死, 胸背动脉栓塞。清除坏死组织后创面面积 43 cm × 25 cm, 上臂组织缺损达周径的 3/4, 肱骨外露 10 cm, 骨膜苍白, 臂丛腋段毁损变性, 腋鞘暴露, 腋动脉搏动及左尺、桡动脉搏动均存在, 左手血运尚可。

以棘突与肩胛内侧缘间的中垂线为轴, 肩胛上角外上方 1.5 cm 处为轴心设计皮瓣, 内侧界为棘突外缘, 外侧界为腋后线, 上界至乳头下 5 cm, 下界达肩胛下角下方 18 cm 十二肋远端水平线, 长 30 cm, 宽 15 cm (图 2)。沿内侧设计线切开至斜方肌深面并掀起, 携带少部分菱形肌; 下界自深筋膜下掀起, 见斜方肌后, 从其下掀起。自肩胛内侧缘处及枕外隆突起点处切斜方肌, 勿切锁骨止点。掀起皮瓣转移达腋前锁骨外侧头及上臂上 1/3, 将斜方肌与肱三头肌、肱二头肌远端缝合, 重建部分抬上肢功能。剩余创面及供瓣区植皮。皮瓣下置带有侧孔的硅胶管冲洗引流。4 d 后行右腕清创脐旁皮瓣修复及双下肢切植皮术。因坏死骨未能彻底清除, 斜方肌皮瓣下出现感染灶。术后 15 d, 腋侧缘中段出现 4 cm × 4 cm 缺血处, 并逐渐发黑。予以敞开换药, 待肉芽



图 2 设计超长斜方肌肌皮瓣



图 3 术后 35 d

讨论 传统斜方肌肌皮瓣最长至肩胛下角 10 cm, 本例斜方肌肌皮瓣远端达肩胛下角下方 18 cm, 已至十二肋远端, 应归为超长。其成活的原因可能是: 斜方肌表面皮肤为多源血供, 其主轴血管颈横动脉降支与周围的胸背、旋肩胛、侧胸、旋腋浅、肋间、椎旁等血管之间具有丰富的血管吻合, 这些吻合支被称为“choke”血管。当皮瓣仅由 1 条主供血管供血, 而通向皮瓣外其他部位的血管分支被结扎时, 主供血管因灌注量集中而达到超灌注, 使这些分支开放, 成为供血通道, 承担皮瓣超长部分供血。本例患者术后 15 d 方出现皮瓣腋侧缘中段皮肤感染坏死, 而远端血供未受影响, 这与皮瓣本身的血供无关, 其原因是感染导致该处血管栓塞。本例患者腋部电烧伤创面清创后健康组织仅为周径的 1/4, 背血管损伤、外露, 邻近背阔肌、胸大肌、肩胛背皮瓣均无法采用, 同时游离皮瓣的供区缺乏。在此情况下笔者选择超长斜方肌肌皮瓣修复创面, 保全了肢体并重建了部分功能, 外形较好, 为后期修复臂丛及左上肢功能打下了基础。

(收稿日期: 2002-08-13)
(本文编辑: 罗勤)