doi:10.11659/jjssx.04E023024

·基础研究·

外源性直流电场诱导大鼠扩张皮肤软组织血管新生的作用研究

刘 天[1],张警泓[1],刘 杰[2],张 泽[1],武 潮[1],张家平[1]（1.陆军军医大学第一附属医院整形外科,重庆 400038;2.重庆医科大学附属第二医院整形美容与颌面外科,重庆 400010）

［摘 要］ **目的** 探索外源性直流电场对大鼠扩张皮肤软组织血管新生的诱导作用与机制。**方法** 采用SD大鼠作为实验对象,在头皮下埋置微型皮肤扩张器,建立头皮软组织扩张模型。在大鼠扩张头皮头尾两端贴附电极片并施加外源性直流电场刺激(并分为100 mV/mm、200 mV/mm和300 mV/mm电场组),未刺激的大鼠作为对照组。观察大鼠病理学、组织学和血管生成相关分子表达等变化。**结果** 100 mV/mm和200 mV/mm电场组大鼠表现出良好的电场耐受性,300 mV/mm组大鼠出现不同程度的间断性抽搐、焦虑、烦躁等不适宜继续实验的症状表现,终止实验。与对照组相比,100 mV/mm和200 mV/mm电场组大鼠扩张头皮组织角质层厚度显著增大($P<0.05$),真皮层内及真皮下层微小血管数均显著增加($P<0.05$),血管生成相关分子Ki67和FGF-2的表达明显上升($P<0.05$),组织匀浆中SDF-1和VEGF-α的表达显著升高($P<0.05$)。**结论** 一定强度的外源性直流电场可以有效诱导大鼠扩张皮肤软组织血管新生,为临床上采用电场技术原位诱导血管新生、增加皮瓣切取面积和提高皮瓣存活率提供了实验依据。

［关键词］直流电场;扩张皮瓣;皮瓣移植;血管新生;血管密度
［中图分类号］R654.3 ［文献标识码］A ［收稿日期］2023-04-07

Effect of exogenous direct current electric fields inducing angiogenesis in dilated skin soft tissue of rats

LIU Tian[1], ZHANG Jing-hong[1], LIU Jie[2], ZHANG Ze[1], WU Chao[1], ZHANG Jia-ping[1] (1.Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Plastic and Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the induction effect and mechanism of exogenous direct current electric fields on angiogenesis of dilated skin soft tissue in rats. **Methods** The SD rats were used as experimental subjects, and a micro skin expander was buried under the scalp to establish a dilated scalp skin soft tissue model. The electrode sheets were attached to the head and tail of the dilated scalp and the exogenous direct current electric fields stimulation was conducted (divided into the 100 mV/mm, 200 mV/mm and 300 mV/mm electric field groups), and the unstimulated rats were used as the control group. The changes of rats in pathology, histology and expression of angiogenesis-related molecules were observed. **Results** The rats in the 100 mV/mm and 200 mV/mm electric field groups showed good electric field tolerances, while rats in the 300 mV/mm group had different degrees of symptoms unsuitable for continuing the experiments including intermittent convulsions, anxiety, irritability, etc., and their following experiments were terminated. Compared with the control group, the thickness of the stratum corneum of the dilated scalp skin soft tissues of rats in the 100 mV/mm and 200 mV/mm electric field groups increased significantly ($P<0.05$), the numbers of tiny blood vessels in the dermis and subdermis layer increased significantly ($P<0.05$), the expression of angiogenesis-related molecules including Ki67 and FGF-2 increased significantly ($P<0.05$), and the expression of SDF-1 and VEGF-α in tissue homogenate increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** A certain intensity of exogenous direct current electric fields can effectively induce the angiogenesis of the dilated skin soft tissues in rats, which provides an experimental basis for the clinical use of electric field technology on inducing the angiogenesis in situ, increasing the incision area of flap and improving the survival rate of flap.

Keywords: direct current electric field; dilated flap; flap transplantation; angiogenesis; blood vessel density

扩张皮瓣移植是整形外科用于治疗大面积瘢痕与瘢痕挛缩畸形等皮肤软组织继发病损的重要技术[1]。通过皮肤软组织扩张可以获得更大面积、更小厚度的供体皮瓣,从而获得更好的修复质量和效果[2]。血管危象是扩张皮瓣移植最为常见的并发症,直接影响手术成败,其发生的主要原因之一是皮瓣内血管网的丰度不足以维持所切取皮瓣的正常血供及代谢[3]。血管新生是在原有血管结构上长出新血管的生物学过程[4]。诱导扩张皮瓣内微小血管新生是增强扩张皮瓣血供的可行策略,也是本领域的难点[5]。近年来,采用外源性电场促进血管新生的研究在细胞层面已取

［基金项目］国家自然科学基金面上项目(82272285);国家自然科学基金青年基金项目(82002048)

［通信作者］张家平,E-mail:japzhang@aliyun.com

得一定进展[6-9],但相关的体内研究未见报道。本课题以SD大鼠为实验对象,探讨外源性直流电场对扩张皮肤软组织血管新生的作用并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级4~6周龄雄性SD大鼠24只(体质量200~220 g),购自陆军军医大学实验动物中心,动物生产许可证号:SYXK(渝)2022-0018,饲养于恒温恒湿、昼夜规律标准化饲养间。动物手术操作环境及流程严格遵照陆军军医大学实验动物中心的标准进行。

1.2 主要实验试剂及设备

异氟烷(深圳瑞沃德生命科技,R510-22-10),小动物麻醉机(深圳瑞沃德生命科技,R500-IP),1 mL球形硅胶皮肤扩张器(广州万和整形材料),电极片(深圳创兴禾科技,PMD1×1a),稳压直流电源(东莞优利德科技,UTP1310S),光学显微镜(日本尼康,E200),荧光显微镜(德国蔡司,Axio Imager M2),酶标仪(美国BIO-RAD,iMark-17562),离心机(美国Thermo赛默飞世尔,Micro 21R)。

1.3 动物模型构建

1.3.1 动物分组 采用随机数字表法将SD大鼠随机分为直流电场刺激组(实验组)和对照组,实验组大鼠又根据所施加电场强度不同分为100 mV/mm电场组、200 mV/mm电场组和300 mV/mm电场组,每组6只。

1.3.2 动物模型构建 实验动物施以异氟烷麻醉,待麻醉稳定后用剃毛机及脱毛膏严格术区脱毛处理,俯卧位固定。采用1 mL微型扩张器(图1a)在体外注水30 mL,进行超量扩张检查,挑选形态完好、扩张均匀的扩张器用于后续实验。常规消毒铺单后,于大鼠颈背部设计一横向手术切口,长约1.5 cm。美兰标记切口,切开皮肤全层,眼科剪钝性分离皮下组织至深筋膜层,在深筋膜层钝性分离形成皮下腔隙,腔隙前至外眦连线,后至耳前连线,两侧至颧骨边界。将1 mL微型扩张器置入所分离皮下腔隙,扩张器注射壶埋置于大鼠背部,调整扩张器位置,使其位于颅顶部中央。采用5-0丝线全层缝合手术切口,术毕向扩张器内注入1 mL无菌生理盐水(图1b)。术后第7天开始,每隔3 d在气体麻醉下通过注射壶向扩张器中注入1 mL无菌生理盐水(图1c)。第3次注水后(术后第13天),将直径为10 mm的正/负凝胶电极分别固定于实验组大鼠扩张头皮的头、尾两端,外接稳压直流电源,分别施加100 mV/mm、200 mV/mm和300 mV/mm的直流电场刺激,持续72 h(图1d~f)。电场刺激结束后,继续每3 d向扩张器中注入1 mL无菌生理盐水,共注水4次。对照组除不进行电极刺激外,余处理同实验组。



a:微型扩张器实物图;b:扩张器植入前后图;c:扩张器植入后7次注水扩张;d、e:电极片及电极片安置位置示意图;f:电极片安置实物图

图1 大鼠头部扩张皮肤处构建外源性稳压直流电场模型

1.4 明暗箱实验

将大鼠置于明箱中央,背对洞口,记录10 min内动物的穿箱次数以及分别在明箱和暗箱的滞留时间。

1.5 动物处理与取材

注水扩张7次后处死大鼠,用无菌手术刀切取凝胶电极片间的大鼠扩张头皮组织,部分采用4%多聚甲醛固定,行石蜡包埋、切片和HE染色;部分组织匀浆行ELISA检测。

1.6 样品检测

1.6.1 切片染色 按常规方法行HE染色和Masson染色后,随机选取5个高倍视野,统计视野内的血管数量。免疫荧光染色:切片经0.01 mol/L PBS充分洗涤后置于3% H_2O_2去离子水中孵育10 min,以阻断内源性过氧化酶;加入FGF-2一抗(1∶200)4 ℃孵育过夜,之后加入对应荧光二抗室温孵育1 h,采用DAPI染细胞核10 min后封片,于荧光显微镜下观察、拍照。参照文献[10]中的方法行免疫组化染色,一抗为Ki67(1∶200),DAB显色后光学显微镜下观察。

1.6.2 ELISA检测 采用预冷的PBS(0.01 mol/L,pH=7.4)冲洗大鼠头皮组织,称重后将组织剪碎,与9倍质量的PBS加入玻璃匀浆器中,于冰上充分研磨。将匀浆液5 000 g离心5 min,取上清,根据大鼠基质细胞衍生因子1(stromal cell derived factor 1,SDF-1)、大鼠血管内皮生长因子α(vascular endothelial growth factor α,VEGF-α)ELISA试剂盒进行检测,于450 nm波长下计算SDF-1和VEGF-α含量。

1.7 统计学分析

使用SPSS 23.0软件分析数据,所有数据均采用*Shapiro-Wilk*法行正态性检验及*Levene*法行方差齐性检验,定量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用*LSD*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物基本情况

所有动物均麻醉满意且耐受建模手术,术后无伤口感染、球囊破损等异常情况,扩张器扩张状态良好,无漏水、破裂、移位等。施加100 mV/mm和200 mV/mm外源性直流电场的SD大鼠均表现出良好的耐受性。其中4只施加300 mV/mm电场的SD大鼠出现不同程度的间断性抽搐、焦虑、烦躁等不适合继续实验的症状,因而该组的后续实验予以终止。10 min标准明暗箱实验结果显示,100 mV/mm组和200 mV/mm电场组大鼠的穿箱次数分别为(9.00±1.83)次和(9.83±1.57)次,提示2组大鼠均无明显焦虑症状,对所施加的外源性电场耐受良好。

2.2 HE和Masson染色

HE染色:对照组大鼠头皮组织表皮层由2~3层角质细胞组成,平均厚度为(24.2±3.2)μm;实验组大鼠头皮组织表皮层细胞数增多,100 mV/mm组的平均厚度为(42.0±4.7)μm,200 mV/mm组的平均厚度为(62.6±4.4)μm,均厚于对照组($P<0.01$),表皮厚度随施加电场强度增强而呈增大趋势($P<0.01$),见图2a、b。实验组真皮层和真皮下层的微小血管数较对照组明显增加($P<0.05$),其中真皮下层的微小血管增多更明显;大鼠皮下脂肪与肌肉组织厚度较对照组明显薄,胶原纤维排列整齐,毛囊及汗腺等皮肤附属器官结构完整(图2a~d)。Masson染色:与对照组比较,实验组的疏松皮下胶原纤维组织减少(图2e)。

2.3 组织学免疫染色

与对照组比较,100 mV/mm电场组和200 mV/mm电场组Ki67染色强度明显升高,量化评分显著升高($P<0.05$),见图3a、b。进一步观察发现,实验组增多的Ki67阳性细胞主要来源于表皮基底层矮柱状上皮细胞、新生血管内皮细胞以及毛囊细胞。

与对照组比较,100 mV/mm电场组和200 mV/mm电场组FGF-2的表达增加,FGF-2阳性细胞比例均显著增高($P<0.05$),见图3c、d。

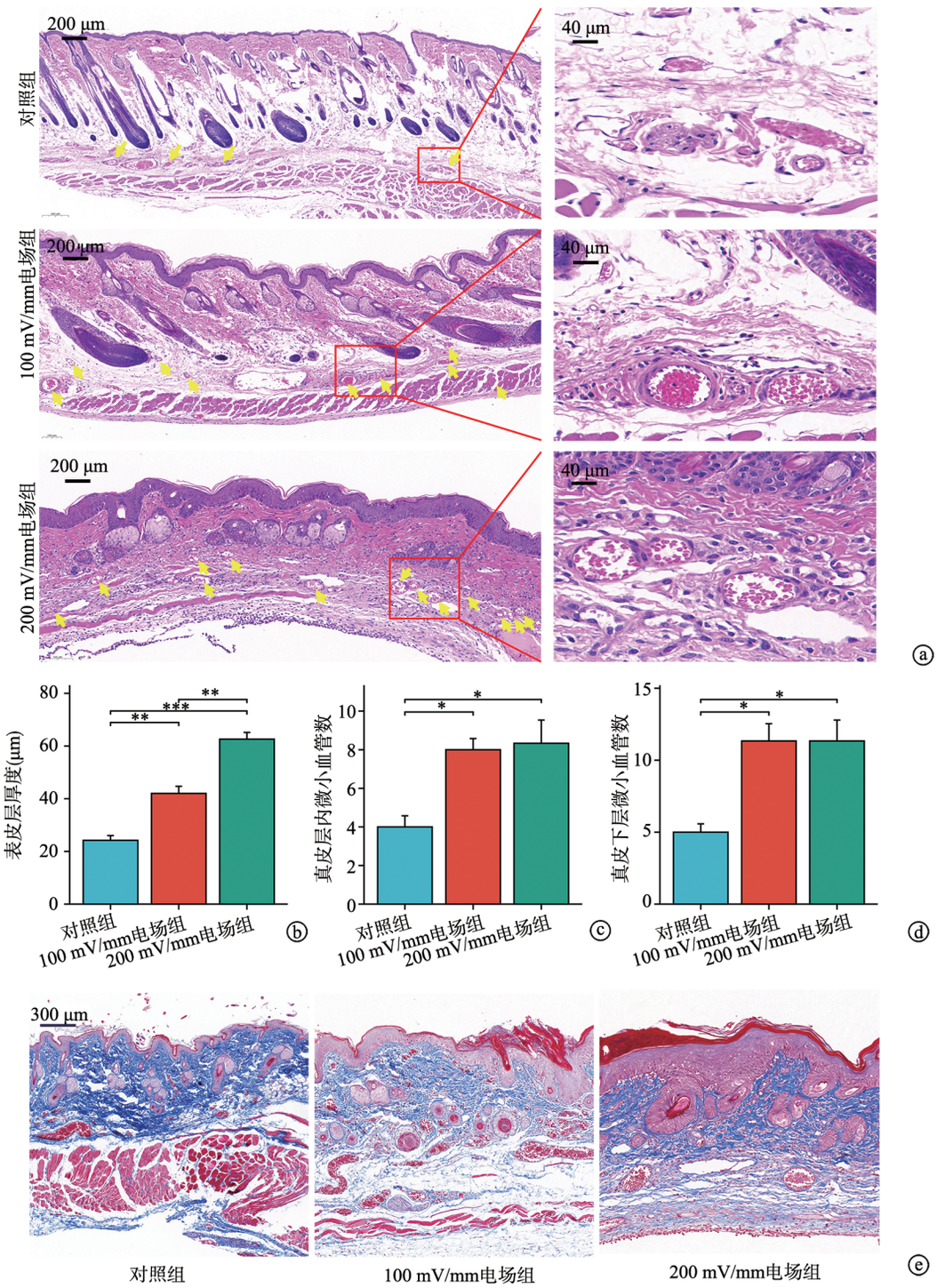
2.4 ELISA检测

组织匀浆ELISA检测结果显示:100 mV/mm电场组和200 mV/mm电场组的SDF-1、VEGF-α的表达量均较对照组显著升高($P<0.05$),且200 mV/mm电场组VEGF-α表达高于100 mV/mm电场组($P<0.05$),见图4。

3 讨论

血管危象或血运障碍是扩张皮瓣移植术后常见的并发症,直接关乎手术成败和临床预后。除外皮瓣设计不合理、皮瓣转移后蒂部扭转或卡顿等常见原因外,扩张皮瓣本身的新生血管丰度不足也是导致扩张皮瓣移植术后血运障碍、皮瓣继发坏死的重要原因,同时也是影响扩张皮瓣扩张效率的重要制约因素[3]。

1794年,Luigi Galvani首次证实“生物电”存在。1848年,德国生理学家Emil du Bois-Reymond首次描述了皮肤伤口内的电流[11]。随后的研究发现,细胞的许多生物学效应均与生物电场直接相关,且生物电场是影响组织再生和伤口愈合的重要因素[12-13]。体外研

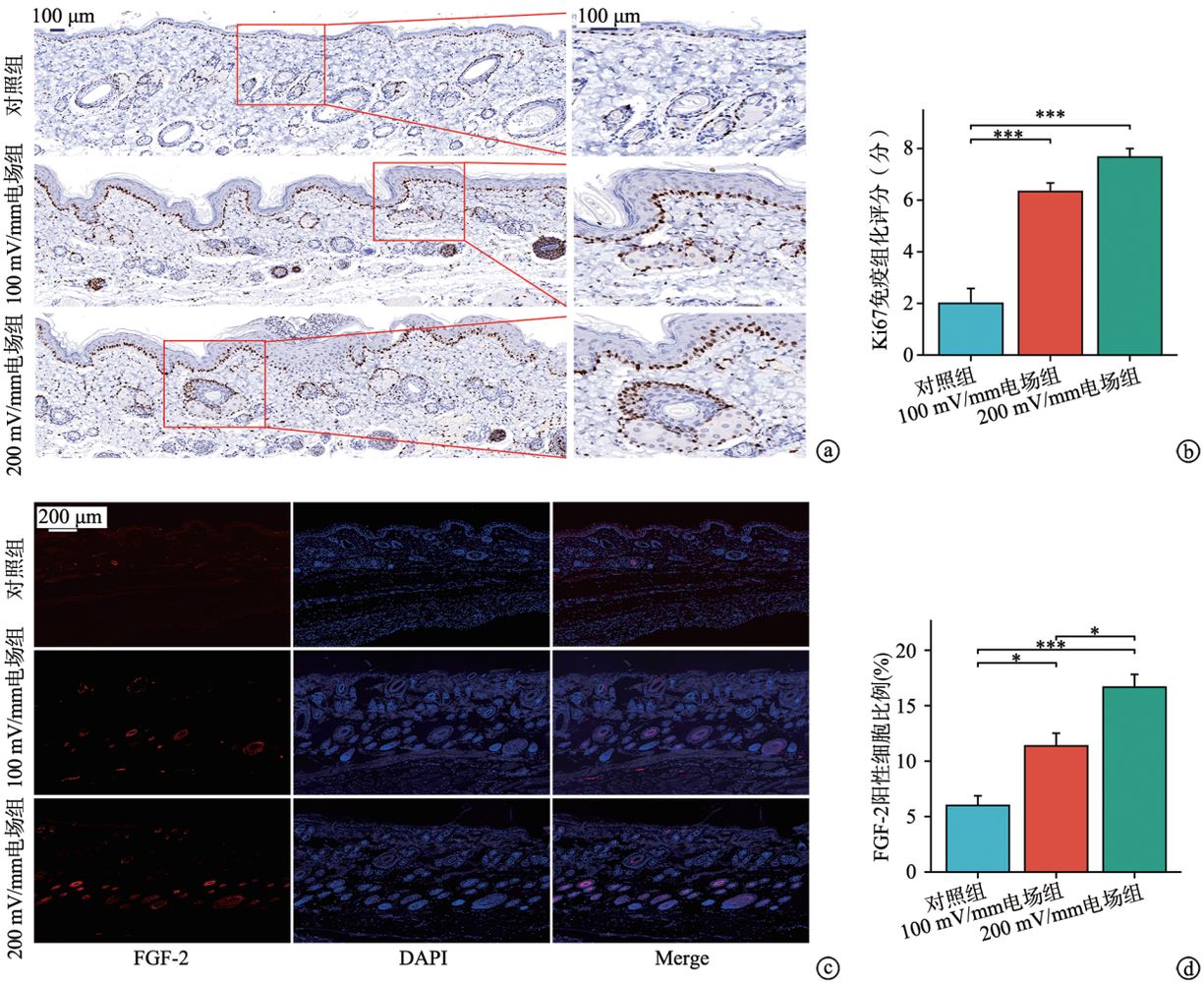


a:大鼠头皮组织HE染色(箭头:微小血管);b:大鼠头皮组织表皮层厚度统计;c、d:真皮层和真皮下层的微小血管数统计;e:大鼠头皮组织Masson染色结果 *:$P<0.05$;**:$P<0.01$;***:$P<0.001$

图2 外源性稳压直流电场施加后大鼠扩张头皮的组织病理学检测

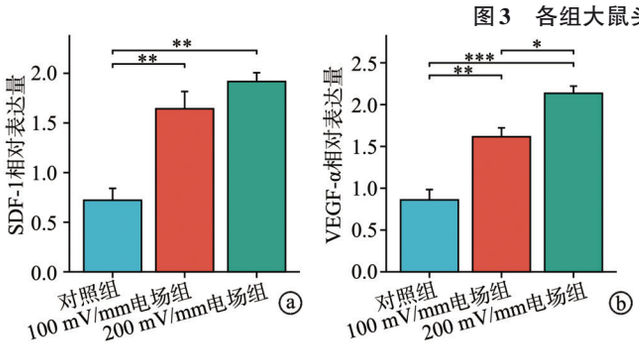
究发现,与生物电场强度相当的外源性电场可以有效诱导表皮细胞定向迁移、诱导血管内皮细胞增殖并形成新生血管[9,14]。然而,有关生物电场诱导血管新生的体内研究目前尚处于起步阶段。本研究旨在通过建立大鼠扩张头皮外源性直流电场刺激模型,探索外源性直流电场对扩张皮肤及血管新生的影响与机制。

本研究结果显示,在4~6周龄的大鼠头皮组织下埋置1 mL的微型扩张器,注水扩张7次后,皮肤扩张显著;观察大鼠日常活动发现,扩张器扩张过程对大鼠日常活动无明显不良影响。本研究根据头皮组织扩张后的形态体积,定制直径为10 mm的凝胶电极片,



a：Ki67免疫组化染色结果；b：各组大鼠头皮组织Ki67免疫组化评分；c：FGF-2免疫荧光染色结果；d：FGF-2阳性细胞比例 *：$P<0.05$；**：$P<0.01$；***：$P<0.001$

图3 各组大鼠头皮组织免疫染色结果



a：SDF-1检测结果；b：VEGF-α检测结果 *：$P<0.05$；**：$P<0.01$；***：$P<0.001$

图4 ELISA检测各组大鼠头皮组织血管新生相关因子表达

将正、负电极分别粘贴固定于扩张头皮组织的头、尾两端，外接稳压直流电源，建立SD大鼠扩张头皮软组织外源性电场刺激模型。前期我们在电场刺激干预对巴马香猪的创面愈合影响实验中设置了100 mV/mm、200 mV/mm和300 mV/mm三个梯度强度的电场刺激[6]。本研究中由于300 mV/mm电场组超半数的大鼠出现抽搐、焦虑和烦躁等刺激症状，因此后续实验中仅观察100 mV/mm和200 mV/mm电场扩张皮肤软组织的相关变化。

以往研究发现，在皮肤软组织扩张过程中，机械力学刺激将显著诱导组织大量分泌VEGF和诱导血管新生，但随着扩张过程持续，VEGF分泌和血管新生于扩张后2周降至正常水平[15-16]。我们也在实验中观察到了同样的现象。为避免扩张过程机械力学因素对血管新生的干扰，我们将外源性电场的刺激时机选定为第3次注水扩张后（术后第13天），以客观评估外源性直流电场对扩张皮肤软组织血管新生的作用，因此外源性直流电场的施加时机是本模型成功建立的另一关键。

Ki67是细胞增殖标志物，与细胞有丝分裂密切相关[17]。FGF-2具有促血管生成作用，常被用作血管生成的指标之一[18]。SDF-1和VEGF-α是两种与血管生成密切相关的细胞因子。其中，SDF-1具有诱导

VEGF-α表达的重要作用,而VEGF-α则可激活SDF-1/CXCR4信号轴,二者在促血管生成方面具有协同效果[19-20]。本研究发现,100 mV/mm和200 mV/mm电场组大鼠真皮内和真皮下微小血管数增加、血管内皮细胞增殖活跃,FGF-2和VEGF-α的表达增加,且这一作用在一定电场强度范围内与电场强度呈正相关,说明外源性直流电场可以显著诱导大鼠扩张皮肤软组织的血管新生。FGF-2是成纤维细胞生长因子家族的核心成员,在促进内皮细胞增殖并形成管腔结构等血管化核心环节中发挥重要作用[18-19,21]。FGF-2和VEGF-α具有协同互补的作用。有研究显示,VEGF-α可促进毛细血管的生成,而FGF-2则可促进小动脉的生成[22]。研究报道,FGF-2通过ERK 1/2途径促进血管内皮细胞增生,而VEGF-α需在外围间质细胞的旁分泌功能辅助下发挥促血管生成作用,同时二者共同调节MAPK通路的活性[19]。本研究发现,血管新生程度高的皮肤软组织往往伴随表皮层明显增厚,而表皮细胞又是FGF-2的重要来源细胞。因此,我们推测,电场可能通过刺激表皮细胞增殖而促进FGF-2的分泌,从而诱导血管新生,但具体机制以及血管新生和角质细胞增殖的关系需要进一步研究。

综上所述,本研究成功建立了外源性直流电场诱导扩张皮肤软组织血管新生的动物模型,明确了外源性直流电场对扩张皮肤软组织血管新生的促进作用,并初步探讨其机制,为采用直流电场诱导皮肤软组织血管新生,增加扩张皮瓣的切取面积,降低扩张皮瓣的血管危象发生率和提高扩张皮瓣移植存活率提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Zhou Y, Xu W, Hou J, et al. Application of free skin flap transplantation in skin malignant tumor resection [J]. J Oncol, 2022, 2022: 7510330. doi: 10. 1155/2022/7510330.

[2] Chen X, Zhang R, Zhang Q, et al. Auricular reconstruction in microtia for soft tissue coverage: flap pocket method versus expansion method [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2022, 152: 110987. doi: 10. 1016/j. ijporl. 2021. 110987.

[3] 倪 松,朱一鸣,李德志,等. 游离组织瓣修复头颈肿瘤术后缺损血管危象的处理[J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37(11): 855-858. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3766. 2015. 11. 012.

[4] Kretschmer M, Rüdiger D, Zahler S. Mechanical aspects of angiogenesis [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(19): 4987. doi: 10. 3390/cancers13194987.

[5] Folkman J. Angiogenesis [J]. Annu Rev Med, 2006, 57: 1-18. doi: 10. 1146/annurev. med. 57. 121304. 131306.

[6] Liang Y, Tian H, Liu J, et al. Application of stable continuous external electric field promotes wound healing in pig wound model [J]. Bioelectrochemistry, 2020, 135: 107578. doi: 10. 1016/j. bioelechem. 2020. 107578.

[7] Tai G, Tai M, Zhao M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing [J]. Burns Trauma, 2018, 6: 20. doi: 10. 1186/s41038-018-0123-2.

[8] McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential [J]. Physiol Rev, 2005, 85(3): 943-978. doi: 10. 1152/physrev. 00020. 2004.

[9] Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, et al. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2 [J]. FASEB J, 2004, 18(11): 1231-1233. doi: 10. 1096/fj. 03-0847fje.

[10] Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1641: 115-128. doi: 10. 1007/978-1-4939-7172-5_5.

[11] Santos RP, Nardi AE, Gomes MDM. Emil du Bois-Reymond and Dom pedro Ⅱ: research development on bioelectricity and electric fish [J]. Front Physiol, 2022, 13: 985473. doi: 10. 3389/fphys. 2022. 985473.

[12] Zhao M, Penninger J, Isseroff RR. Electrical activation of wound-healing pathways [J]. Adv Skin Wound Care, 2010, 1: 567-573. doi: 10. 1089/9781934854013. 567.

[13] Yan T, Jiang X, Guo X, et al. Electric field-induced suppression of PTEN drives epithelial-to-mesenchymal transition via mTORC1 activation [J]. J Dermatol Sci, 2017, 85(2): 96-105. doi: 10. 1016/j. jdermsci. 2016. 11. 007.

[14] Li Y, Jiang X, Zhang Z, et al. Autophagy promotes directed migration of HUVEC in response to electric fields through the ROS/SIRT1/FOXO1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 192: 213-223. doi: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2022. 09. 020.

[15] Hudlicka O, Milkiewicz M, Cotter MA, et al. Hypoxia and expression of VEGF-A protein in relation to capillary growth in electrically stimulated rat and rabbit skeletal muscles [J]. Exp Physiol, 2002, 87(3): 373-381. doi: 10. 1113/eph8702285.

[16] 常 谨,刘国林,刘 硕,等. VEGF在不同皮肤扩张方式中表达的意义[J]. 中国美容医学, 2012, 21(10): 1770-1773. doi: 10. 15909/j. cnki. cn61-1347/r. 2012. 13. 043.

[17] Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker [J]. Chromosoma, 2018, 127(2): 175-186. doi: 10. 1007/s00412-018-0659-8.

[18] Dolivo DM. Anti-fibrotic effects of pharmacologic FGF-2: a review of recent literature [J]. J Mol Med (Berl), 2022, 100(6): 847-860. doi: 10. 1007/s00109-022-02194-3.

[19] Laddha AP, Kulkarni YA. VEGF and FGF-2: promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. Respir Med, 2019, 156: 33-46. doi: 10. 1016/j. rmed. 2019. 08. 003.

[20] Wang M, Zou Z. Multiple mechanisms of SDF-1 promoting VEGF-induced endothelial differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Int J Cardiol, 2014, 177(3): 1098-1099. doi: 10. 1016/j. ijcard. 2014. 09. 198.

[21] Tamura M. Research and development of FGF-2 as a promising agent for wound healing [J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2000, 45(6 Suppl): 1145-1151.

[22] 朱华锋,汪春兰,赵 宇. VEGF和FGF-2在血管生成中的协同作用研究进展[J]. 中华整形外科杂志, 2006, 22(1): 72-75. doi: 10. 3760/j. issn: 1009-4598. 2006. 01. 020.

(编辑:刘 艺)