肢体缺血再灌流时 CPK 动态变化的实验研究

周 跃 梅芳瑞 曾维权 （第三军医大学新桥医院骨科）630037
陶 濬 刘素英 张 征 （第三军医大学新桥医院化验科）630037

提 要 采用临床和动物实验模型，观察肢体不同缺血、不同再灌流时间下，患肢股静脉回流血中肌酸磷酸激酶（CPK）的动态变化，并辅以肌组织病理检查。实验结果表明：(1) 缺血和再灌流损伤与缺血时间明显相关，缺血时间越长，其损伤越重。(2) 再灌流期的病理改变明显重于缺血期，主要以肌组织充血、水肿和大量炎性细胞浸润为其特点。以再灌流后 16～32h 最明显。(3) 肢体缺血 1～30h，其缺血损伤不显著，但再灌流后 24～72h 出现明显的再灌流损伤。因此，应引起临床的高度重视。

关键词 止血带；肢体；局部缺血；再灌流；肌酸激酶类(CPK)

缺血引起的细胞损害一直是研究的重要课题。本实验通过观测肢体在不同缺血和不同再灌流时间下，患肢回流静脉血中 CPK 活性的动态变化，并辅以肌组织病理检查。借以探讨肢体缺血再灌流时 CPK 活性变化的规律及特点，以研究 CPK 活性动态变化与肌组织损伤程度之间的关系及临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 实验组：随机选取 30 例。男 19 例，女 11 例。年龄 14～60 岁，平均 36.5 岁。均为单侧膝关节和膝以远骨骼手术。止血带压力 59.85～79.8 kPa，时限均在 1～1:30h。分别在阻断血流前 5min，松带后 5、20、60min 和 24、48、72h 从患肢大隐静脉插管中取血 2ml 送检。

1.1.2 对照组：随机选取 15 例，男 10 例，女 5 例。年龄 15～61 岁，平均 33.2 岁。均为脊柱或髋部手术。分别在术前 5min，术中 60min，术后 24、36 和 72h 取静脉血送检。

1.2 动物资料

1.2.1 动物及其分组：随机选健康家兔 30 只，成龄，雌雄不拘。体重 5±2.5kg。随机分为 6 组。A 组：缺血 1h，B 组：缺血 2h，C 组：缺血 3h，D 组：缺血 4h，E 组：缺血 6h，F 组：对照组。对照组手术操作相同，但不致肢体缺血。

1.2.2 模型复制和标本采集：室温 20～50℃。2%戊巴比妥钠(1～1.5ml/kg)经兔耳静脉麻醉。分离并显露股静脉。驱血后在右后肢根部上充气止血带。实验组分别在止血带前 5、20min 和 40min 从股静脉取 1ml 血送检。

1.2.3 病理学检查：另选 5 只家兔，雌雄不拘，体重 5±1.5kg。分别在上止血带前 1h，止血带期间 1、2、3、4、6h 和松带后 1、4、8、16、32h 取肌肉标本经 10%甲醛液固定后送检。

1.3 标本测定和病理观察

1.3.1 血清肌酸磷酸激酶测定：根据磷酸肌酸和二磷酸腺苷在 CPK 的催化下，生成三磷酸腺苷和肌酸。产生的肌酸与 α 萘酚和双乙酰结合生成红色化合物，在一定范围内红色深浅与肌酸含量呈正比，从而测得 CPK 酶活性(U/L)。

1.3.2 肉眼观察肌组织颜色、血供、弹性以及渗血等。光镜观察：HE(Harris 氏苏木素染色法)观察一般形态。Piah(Nallor 氏磷钨酸苏木素染色法)观察骨骼肌横纹。Vangieson（胶原纤维染色法）观察结缔组织。PAS(Schiffis 染色法)观察肌糖元。

1.4 统计学分析

各组实验数据均在电子计算机上行单因素，多因素方差分析，线性回归和相关性检验等程序处理，用最小显著值 IFLSD 法等判定各均数间差别的显著性，各项参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1 临床结果

本组患者止血带缺血 1～1:30h 后再灌流，患肢均发生不同程度的充血、水肿、肿胀和疼痛，尤以术后 24～72h 最明显。其中 3 例因患肢肿胀严重，肢端血循环不佳而被迫松解绷带，而发生伤口内积血。1 例经穿刺抽出积血后，再次加压包扎而痊愈，2 例发生感染。另外有 2 例发生压迫性水泡，造成伤口延迟愈合。

2.2 CPK 活性测定结果

2.2.1 患者 CPK 的动态变化(见表 1)：实验组缺血再灌流后 CPK 活性均增高，再灌流后 24～48h 极显著高于缺血前（$P<0.01$），72h 虽有明显降低，但仍显著高于缺血前（$P<0.05$）。对照组术中和术后 CPK 活性均高于术前，但相差不显著（$P>0.05$），说明骨骼手术本身对 CPK 活性影响不显著。

表 1 患者股静脉血清 CPK 活性变化 (U/L)

	缺血前 5min	缺血再灌流时间					
		5min	20min	60min	24h	48h	72h
实验组	51.30	54.40	58.35	53.45	562.40▲▲	436.35▲▲	120.56▲
	±20.80	±18.30	±16.50	±17.50	±65.45	±52.56	±30.23

缺血前与再灌流后比较 ▲$P<0.05$ ▲▲$P<0.01$

2.2.2 动物 CPK 活性变化(见表 2)：A、B 和 C 组缺血再灌流后 CPK 活性均有增高，但各均值间无显著差异（$P>0.05$）。D 组缺血再灌流后 20、40min 点显著高于缺血前（$P<0.05$）。E 组缺血再灌流后各时相点均极显著高于缺血前（$P<0.01$）。F 组术后 CPK 增高，但手术前后之间无显著差异（$P>0.05$）。经双因素方差分析表明，再灌流时间对 CPK 活性有显著影响（$P<0.05$），缺血时间有极显著影响（$P<0.01$）。

表 2 动物股静脉血清 CPK 浓度变化比较 (U/L)

		术前 5	缺血再灌流 (min)		
			5	20	40
缺血组	A	475.0±111.1	503.5±61.1	594.3±176.2	546.5±196.7
	B	472.3±123.1	426.5±101.0	451.3±113.0	552.3±120.6
	C	461.3±236.6	621.7±229.4	528.7±178.0	560.0±95.4
	D	450.5±149.2	601.0±113.9	629.3±97.3▲	645.8±158.6▲
	E	436.5± 42.5	658.0±135.9▲▲	684.5±135.9▲▲	677.35±76.5▲▲
对照组	F	491.4±188.4	590.3±125.1	627.3±258.6	620.2±237.5

注：缺血前与灌流后比较 ▲$P<0.05$ ▲▲$P<0.1$；术前与术中比较 ▲$P<0.05$ ▲▲$P<0.01$

实验结果表明：(1) 患者肢体缺血 1～1:30h，其缺血损伤不严重，说明该止血带时间比较安全；(2) 患者缺血再灌流后 24～72h 期间，存在比较严重的缺血再灌流损伤，对此需引起临床重视；(3) CPK 值的增高与组织缺血时间和缺血损伤的程度呈正比。

2.3 病理学检查结果

2.3.1 缺血期：肉眼观察缺血 2h 内，肌组织无明显改变。缺血 3～6h，肌组织轻度水肿，弹性稍差，渗血时间稍延长。光镜观察，缺血 1～2h，肌纤维排列较整齐。肌横纹清楚，染色均匀，局限性肌间质轻度水肿和少量中性粒细胞浸润，缺血 3～6h，肌纤维轻度水肿，部分肌横纹消失和变性，以缺血 6h 最明显。

2.3.2 再灌流期：肉眼观察肌组织充血，水肿呈灰红色。渗血时间延长，质脆，弹性差。光镜观察肌间质明

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

显充血、水肿、渗出增多、大量炎性细胞浸润。间质血管壁增厚、肿胀，血管内有小血栓，充血伴较明显出血。肌纤维有不同程度水肿，局限性肌纵、横纹紊乱和消失。散在肌纤维点状坏死和局限性坏死。病理改变发现：(1) 肌组织病理改变随缺血时间延长而加重，以缺血 3 h 后改变最明显；(2)再灌流后的病理改变较缺血期明显，以再灌流后 16～32h 最明显；(3)再灌流后的病理改变以肌组织充血、水肿和大量炎性白细胞浸润为主。

3 讨 论

CPK 酶是组织器官特异性酶，正常人血清 CPK 含量主要是 CPK-MM 型，占总活力的 95%。它大量存在于骨骼肌细胞内。CPK 增高是检查骨骼肌损伤最敏感的一项指标[1]，并且与组织缺血时间和损伤程度具有很好的相关性[2]。本动物实验结果证实该酶对组织缺血损伤非常敏感。当肢体缺血 3 h 内，CPK 增高不显著（$P>0.05$），缺血 3 h 以上，CPK 显著增高（$P<0.05$）。病理检查也发现，缺血 1～2 h，仅见肌间质轻度水肿和炎性细胞浸润，肌纤维无明显改变。缺血 3～6 h，肌纤维出现不同程度的水肿，变性和肌横纹消失，部分肌细胞变性、坏死，以缺血 6 h 最明显。Klenerman[3] 等通过对止血带下肌肉组织学研究后认为，3 h 内是肌肉组织耐受缺血损害的安全时限。Palatta[4] 等认为肢体缺血超过 3h，将导致肌肉和神经功能的严重损害。研究表明，只有当组织细胞损伤严重，细胞破坏时，才释放大量的 CPK 进入血循环。本实验结果表明，CPK 值的改变与组织缺血损伤的程度具有良好的相关性，因此，是临床上判断肢体缺血损伤的有效指标。

缺血引起的细胞损害主要为两个阶段：即组织细胞的缺血性损伤和缺血后再灌流损伤。缺血再灌流损伤是近年来广泛研究的课题，越来越多的研究发现组织细胞的缺血性损伤，不但发生在缺血期，而且发生在组织氧再供期。许多情况下，再灌流损伤不仅加重缺血期的损伤，而且还可导致其它脏器的损伤。现阶段研究表明，缺血再灌流损伤主要因：(1)缺血再灌流后氧自由基导致的脂质过氧化损伤；(2)缺血组织的“非灌流”损伤；(3)钙 Ca^{2+} 逆流。国外学者发现止血带缺血再灌流后，患肢充血、水肿、肿胀达原肢体周径 25%～40%，1 周后才逐渐恢复正常[5,6]。并认为肢体充血、水肿、肿胀以及创面严重渗血是止血带缺血再灌流后主要临床问题。我们也发现临床上止血带松解后，创面渗血明显，术后 24～48 h，患肢出现明显的充血、水肿、肿胀和缺血。常造成患肢剧痛和被迫松解石膏或绷带，从而导致伤口积血、延迟愈合和感染。本临床实验研究表明，患肢缺血 1～1:30 h 后再灌流 1 h，CPK 活性虽有增高，但相差不显著（$P>0.05$），缺血再灌流后 24～48h，回流静脉血中 CPK 活性极显著增高（$P<0.001$），72 h 尚未完全恢复到正常（$P<0.05$），说明肢体缺血 1～1:30 h，虽不会导致严重的缺血性损害，但却会造成明显的再灌流损伤，对此临床上应引起足够的重视，并采取相应的预防和治疗措施，以减轻和消除再灌流损伤给患者带来的术后痛苦和损害。

参考文献

1. Adriaenssens K. Simple electrophoretic technique for creatine kinase MM isoenzyme in neonatal ducheme muscular diease screening using dried blood samples, Clin Chem Acta, 1980; 105: 99
2. Chiu D, Wang HH, Blumenthal MR. Crentine phosphokinase release as a measure of tourniquet effect on skeletal muscle. Arch Surg, 1976; 111: 71
3. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, et al. Systemic and local effects of application of a tourniquet. J Bone and Joint Surg, 1980; 62-B(3): 385
4. Palett FL, Willman V, Ship AG. Prolonged tourniquet ischemia of extremities. J Bone and Joint Surg, 1980; 62-A(6): 945
5. Silver R, Garza JD, Rang M, et al. Limb swelling af-

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ter release of a tourniquet. Clin Orthop, 1986; 206: 86

6. Harman JW. The significance of local vascular phenomena in the production of ischemic necrosis in skeletal muscle. Am J Pathol, 1984; 24: 625

(收稿: 1991-08-10; 修回: 1992-06-10)

An experimental study on creatine phosphokinase activity and pathological changes in ischemia and reperfusion of extremities

Zhou Yue, Tao Jun, Mei Fangrui, et al (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract The changes of creatine phosphokinase activity in the different periods of ischemia and reperfusion of extremities were observed in clinical cases and laboratory models. In addition, the pathological changes of the skeletal muscles were also studied. The findings were as follows: (1)The severity of ischemic and reperfusion lesions was dependent on the ischemic duration, extent and severity. The longer the ischemic duration, the larger the ischemic lesions; (2)The pathological changes were more severe in the reperfusion period than in the ischemic period and they were characterized by congestion, edema, swelling and infiltration of large amounts of inflammatory cells in the skeletal muscles. These manifestation were most marked from the 16th to 32nd hour after reperfusion; (3)When the ischemic duration was less than one to one and half hours, the resultant lesion of little significance. But the lesions were quite severe when the ischemic duration was 24 to 72 hous, and the lesions in the repufusion period were also severe, which needs specical attention from the surgeon.

Key words tourniguets; extremities; ischemia; reperfusion; creatine kinase

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net