

透明质酸酶注射及刺血疗法联合应用对透酸钠凝明质胶血管栓塞的疗效研究

石华堂¹ 于广兰¹ 陈博伦¹ 陈新华¹ 张威²

(1.佳木斯大学附属第一医院整形科黑龙江佳木斯 154002; 2.上海健威医疗美容医院 上海 200030)

摘要:目的 探讨透明质酸酶注射及刺血疗法联合应用对透酸钠凝明质胶血管栓塞的疗效研究。方法采用新西兰大白兔 50 只(100 只兔耳), 结扎耳廓后静脉内外侧支, 制成以耳廓后中央动脉静脉为主要血供的兔耳模型。把兔耳模型随机分为 A、B、C、D、E 五组。A 组为空白对照组, 于耳廓后中央动脉内注入 0.2ml 的生理盐水; B 组为栓塞组, 于同一位置注入 0.2mlHA; C 组为透明质酸酶组, 在耳廓中动脉栓塞的病灶周围注射 300U/ml 透明质酸酶溶液 2ml; D 组为针刺组, 在病灶处用 27G 针头在标记点处进行针刺; E 组为联合组, 先于耳廓中动脉栓塞的病灶周围注射透明质酸酶溶液, 而后再行 D 组操作。分别于处理好后的即刻、1、7、15 天观察兔耳变化情况, 同时监测兔耳动脉血氧饱和度, 于第 15 天处死实验兔, 收集各组坏死面积数据, 同时行组织学检查。结果除 A 组对照组外, 其余四组皆有不同程度的坏死, 且平均坏死面积呈现 B 组 > D 组 > E 组 > C 组; CE 组中, 注射后第 1 天血氧饱和度继续降低, 差异有统计学意义(P<0.05), 注射后第 7、15 天血氧饱和度明显回升, 与注射前相比, 差异无统计学意义;结论透明质酸酶注射及刺血疗法联合应用对透酸钠凝明质胶血管栓塞有较好的疗效, 但是效果差于单纯透明质酸酶注射, 不建议应用。

[关键词]透明质酸; 刺血疗法; 组织坏死; 栓塞

[Abstract]Objective To investigate the efficacy of hyaluronidase injection and blood prick therapy on vascular embolism of hyaluronic acid. Methods Fifty New Zealand white rabbits (100 rabbit ears) were made with the central artery vein as the main blood supply. The rabbit ear model was randomly divided into five groups A, B, C, D and E. Group A was the blank control group, and 0.2ml of normal saline was injected into the central artery of the posterior auricle; Group B was the embolization group, and 0.2 ml of HA was injected at the same location; Group C was hyaluronidase group, where 300U / ml hyaluronidase solution was injected around the lesion of the middle artery; Group D was the acupuncture group, with a 27G needle at the marker point; Group E was the combined group, where hyaluronidase solution was injected around the lesion in the middle artery before Group D. Rabbit ear changes were observed immediately, 1, 7 and 15 days after treatment. At the same time, rabbit ear arterial oxygen saturation were monitored, and experimental rabbits were killed on day 15, necrotic area data of each group were collected, and histological examination was performed. Results Except for the control group of group A, the other four groups had different degrees of necrosis, and the average area of necrosis showed group B > group D > group E > group C; the blood oxygen saturation continued to decrease on the first day after injection, and the difference was statistically significant (P < 0.05), the blood oxygen saturation increased significantly on days 7 and 15 after injection, and the difference was not statistically significant compared with before injection. Conclusion The combination of hyaluronidase injection and blood prick therapy has a good effect on vascular embolism of hyaluronic acid, but the effect is slightly worse than that of hyaluronidase injection alone.

[Keywords]hyaluronic acid; pricking blood therapy; tissue necrosis; embolism

近年来, 随着我国经济水平的不断发展与社会的不断进步, 美容行业也得到了长足的发展, 其中, 注射填充类整形具有的创伤小、恢复快、效果佳等特点使其成为了越来越多求美者的首要选择, 透明质酸钠 (Hyaluronic Acid, HA) 以其良好的生物相容性及生物可降解性被广泛应用于注射填充^[1]。随着时间的推移, HA 填充相继出现了各类的并发症, 虽然绝大多数的并发症都是轻微的, 但是当 HA 误入血管时则会造成组织坏死, 甚至失明、脑梗死等严重情形。其中, 血管栓塞引起的组织坏死又较其余两种并发症更为常见^[2]如何快速有效的识别以及应对这些并发症成了研究者们不懈追求的目标。

透明质酸酶是当前用于治疗 HA 血管栓塞各类并发症的唯一特异性药物, 是处理 HA 血管栓塞并发症的首选药物^[3]。临床上也有一部分医生通过刺血疗法配合透明质酸酶注射用以预防及治疗 HA 血管栓塞引起的组织坏死, 并取得较为良好的疗效, 但这其中究竟是透明质酸酶起到关键作用, 还是刺血疗法起到关键作用, 亦或是二者联和能够取得更佳疗效, 缺乏相关的实验研究加以证明。本实验通过结扎兔耳部分血管制成的兔耳动脉栓塞模型, 研究了透明质酸酶联合刺血疗法治疗 HA 动脉栓塞的疗效, 以及进一步探讨其安全性及研究价值, 为今后相关临床工作提供参考。

1. 材料与方

1.1 主要材料和仪器 10 月龄新西兰大白兔 50 只 (质量约 2.1-2.3kg, 雌雄不限), 由佳木斯大学动物实验中心提供。瑞蓝透明质酸钠凝胶 (瑞典 Q-Med 公司)、照相机 (日本佳能公司)。

1.2 动物模型的制备 50 只新西兰大白兔于实验 1 周前购入, 健

康状态良好, 单笼饲养, 室温维持于 22-24℃, 喂以饲料, 自由饮水。制备方法: (1) 固定兔子。自制固定盒固定动物, 头部与双耳露出; (2) 备皮刀剃去兔耳被毛; (3) 兔耳消毒, 铺巾; (4) 麻醉。为保证兔耳血管完整性, 便于实验的顺利进行及实验结果的观察, 本实验采用腹腔注射麻醉。为避免损伤脏器, 一只手捏住兔子中腹部部分皮肤, 20% 乌拉坦溶液腹腔注射麻醉, 剂量 5ml/kg, 约 5 分钟兔子后完全麻醉; (5) 耳廓前动静脉不做处理, 找到较明显的耳廓后静脉内外侧支主干, 距离耳根部 5-7cm 耳廓后静脉外侧支处注射少量 1% 利多卡因局部浸润麻醉, 用 11 号手术刀切开静脉旁皮肤, 血管钳钝性分离耳廓后静脉外侧支, 6-0 尼龙线结扎静脉血管近端与远端, 血管中间处离断, 原位连续缝合皮肤; 距离耳根部约 3cm 耳廓后静脉内侧支处同上述处理, 分离耳廓后静脉内侧支主干, 结扎血管近端与远端, 血管中间处离断, 原位连续缝合皮肤, 切口处涂抹金霉素软膏, 耳廓后部制成以耳廓后中央动静脉为主要血供的兔耳模型。

1.3 动物的分组与处理 50 只新西兰大白兔共 100 只耳朵制好兔耳模型后, 分成 ABCDE 五组, 每组各 20 例兔耳模型, 各组别的兔耳模型均为不同的兔子, A 组为空白对照组, 适度揉搓耳廓后中央动脉, 血管膨胀后, 于距离耳根 4cm 处的耳廓后中央动脉内注入 0.2ml 生理盐水; B 组为栓塞组, 于同一位置注入 0.2mlHA; C 组为透明质酸酶组, 在耳廓中动脉栓塞的病灶周围注射 300U/ml 透明质酸酶溶液 2ml, 共计 600U; D 组为针刺组, 在病灶处间隔 3mm 进行描点, 每只兔耳约 150 点, 用 27G 针头在标记点处进行针刺, 针刺深至兔耳软骨膜层, 同时进行轻柔按压。E 组为注射透明质酸酶

和针刺法联合组,先于耳郭中动脉栓塞的病灶周围注射 300U/ml 透明质酸酶溶液 2ml,而后再行 D 组操作。分别于处理好后的即刻、1、7、15 天观察兔耳变化情况。

1.4 观察指标

1.4.1 兔耳基本情况观察 观察兔耳皮肤的颜色、淤血、水肿及坏死情况。

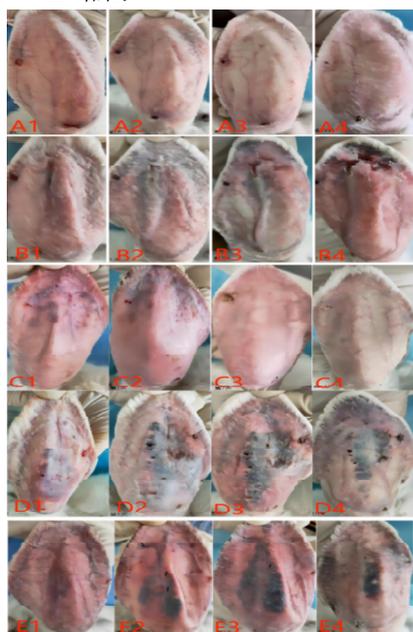
1.4.2 坏死面积分析 血管栓塞及处理后,每天观察 实验兔耳外形及色泽改变,并于即刻、1、7、15d 进行拍照记录选取各组 15d 后照片进行坏死面积测量,用 ImageJ 图像处理软件。用结痂坏死后与正常颜色差异可分别计算 A、B、C、D、E 组的兔耳坏死面积占全部兔耳的百分比。

1.4.3 兔耳血氧饱和度分析 在室温 23℃条件下用多参数监护仪测量兔耳血氧饱和度

1.4.4 组织学观察 实验的第 15 天,用过量的 20%乌拉坦溶液处死实验兔,平行于耳根的方向切取部分兔耳组织,送检样本经 4%多聚甲醛固定,固定状态良好后,进行修剪、脱水、包埋、切片、染色、封片最后镜检合格的样片。在显微镜下浏览切片,在不同倍数下仔细观察组织切片情况,对切片中充血、淤血、出血、水肿、变性、坏死、增生、纤维化、机化、肉芽组织、炎性变化等情况文字描述,对典型病变部位成像并用箭头标识。

1.4.5 统计学处理:用 SPSS22.0 统计软件分析,将 A、B、C、D、E 的栓塞坏死面积兔耳表皮温度及动脉血氧饱和度进行两两比较,数据进行正态性检验,符合正态性的数据采用均数 ± 标准差来表示,三个以上组别的差异性分析,采用单因素方差分析;非正态分布资料采用中位数(四分位间距)进行描述,分析采用非参数秩和检验比较;以 P<0.05 表示有统计学意义。

2. 结果:



2.1 兔耳基本情况观察 通过结扎兔耳后静脉内外侧支,制成以耳廓后中央动静脉为主要血供的兔耳模型,A 组兔耳模型制成即刻,兔耳整体可见明显充血,轻度红肿,静脉结扎处可见相关静脉淤血发黑;第一天(A2)兔耳整体仍轻度充血水肿,边缘可见轻微淤血,呈青紫色;第七天(A3)可见兔耳动静脉充盈良好,无明显淤血及病变表现;第十五天(A4)可见兔耳同第七天,未出现坏死表现。

B 组兔耳沿耳廓后中央动脉注入 0.2mlHA 后,即刻(B1)可见填充物充满了整个耳廓后中央动脉及其分支,血流阻断,兔耳充血明显,中央动脉可见淤血发黑;注射后第一天(B2)可见耳廓后中央动脉前端出现组织坏死缺损,兔耳前 1/3 段淤血明显,呈现黑紫

色;第七天(B3)兔耳 e 耳廓后中央动脉肿胀明显,前 1/3 出现部分坏死,第十五天(B4)可见兔耳整体仍旧充血红肿,兔耳前端全部坏死;

C 组注射透明质酸酶后,即刻(C1)可见兔耳整体发红肿胀,皮温轻度升高,部分注射点呈小范围淤血青紫;第一天(C2)可见兔耳进一步水肿,兔耳体积明显增大;第七天(C3)可见兔耳动静脉充盈良好,水肿消退,未出现明显血流阻断淤血情况;第十五天(C4)可见兔耳整体状态良好,皮肤较干燥,兔耳大体存活,仅边缘极小部分出现淤血情况。

D 组行刺血疗法后,即刻(D1)兔耳出血明显,耳廓后中央动脉恢复血流,随着血管的破坏,兔耳中央出现大面积淤血;第一天(D2)可见兔耳整体充血红肿,中央淤血处进一步恶化,呈现黑色;第七天(D3)兔耳远观学运不畅,呈现黑紫色,中央淤血面积较前局限收缩;第十五天(D4)可见兔耳整体血运受阻呈黑紫色,部分针刺点结痂坏死,边缘小范围坏死。

E 组经透明质酸酶及刺血疗法联合治疗后,即刻(E1)可见部分动静脉血流回复,兔耳中央针刺处皮下出血明显;第一天(E2)可见耳廓后中央动脉主干及其部分支流肿胀明显;第七天(E3)可见兔耳整体仍旧充血红肿,兔耳中央皮下出血出边缘明显,开始局限,颜色呈黑色;第十五天(E4)可见兔耳整体血管充盈良好,中央淤血发黑面积减少,仅边缘少量出现坏死。

表一: 坏死面分析

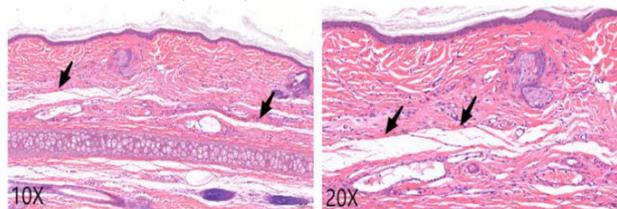
	坏死面积
A 组	0.0 ± 0.0
B 组	19.75 ± 3.17
C 组	0.30 ± 0.17 ^a
D 组	9.61 ± 2.58 ^{ab}
E 组	3.62 ± 1.74 ^{abc}
F	346.045
P	0.000

注:与 B 组对比^aP<0.05;与 C 组对比^bP<0.05;与 D 组对比^cP<0.05;

2.2 坏死面积分析 由表一可见,A 组未出现坏死,其余实验组动物兔耳远端均发生不同程度的干性溃疡和组织坏死,B 组坏死最为严重,与其余四组皆有统计学意义,E 组 C 组相比,差异有统计学意义;E 组 D 组相比,差异有统计学意义;且平均坏死面积呈现 B 组 > D 组 > E 组 > C 组。

2.3 兔耳血氧饱和度分析由表可见,注射前各

组间血氧饱和度相近,差异无统计学意义。A 组中,注射前和注射后比较差异无统计学意义;BCDE 组注射即刻,血氧饱和度明显下降,差异有统计学意义(P<0.05);B 组中,注射后第 1 天血氧饱和度急剧下降(P<0.05),第 7 天继续维持下降趋势(P<0.05),至注射后第 15 天,部分兔耳已无法测得血氧饱和度;CE 组中,注射后第 1 天血氧饱和度继续降低,差异有统计学意义(P<0.05),注射后第 7、15 天血氧饱和度明显回升,与注射前相比,差异无统计学意义;D 组注射后血氧饱和度也持续降低,第 1、7、15 天与注射前相比,差异有统计学意义(P<0.05)。



2.4 组织学观察组织血管中未见明显的血栓形成和其他形式的栓塞物;表皮完整,厚薄均匀,未见明显损伤,真皮层可见轻微的成纤维细胞和纤细的胶原纤维增生(黑色箭头)。

3.讨论:

HA 广泛分布于自然界中,可于脊椎动物的眼球晶状体、黏液组织、结缔组织中存在,人体亦然,HA 广泛存在于人体的真皮层及结缔组织当中,可通过氢键结合 1000 倍于自身重量的水^[4],是皮肤内的保湿因子。优良的生物学性质使得 HA 十分适合于注射填充材料,然而当 HA 误入血管时会引起组织坏死、失明和脑梗死的严重并发症,临床上出现组织坏死的现象明显多于后两者。经过诸多专家学者的不懈研究,达成了一些针对组织坏死的有效防治手段的共识,例如通过熟知注射区域的解剖结构和层次、掌握一定注射技巧、注射期间严密观察术区及患者反应等手段来预防血管栓塞的出

现。当 HA 误入血管,并发症已然发生时,可以通过在栓塞部位注射透明质酸酶溶解治疗,或辅以高压氧舱、抗凝扩血管、注射富含血小板血浆(Platelet-Rich Plasma, PRP)等有效治疗手段^[5]。然而,也有一部分防治手段存在着争议,例如刺血疗法治疗栓塞的疗效性如何?透明质酸酶注射联合刺血疗法对于 HA 血管栓塞的疗效如何?

3.1 兔耳模型的科学性探讨 兔耳易操作,毛发较稀短,脉管恒定,管径与人面部血管管径相近,分布表浅,容易观察血流情况,这些特点使

	注射前	即刻	第 1 天	第 7 天	第 15 天	Z (P)
A 组	97.0 (97.0-97.0)	97.0 (96.25-97.75)	97.0 (95.0-98.0)	97.0 (96.0-97.0)	97.0 (97.0-97.0)	1.243 (0.871)
B 组	97.0 (97.0-97.0)	92.0 (90.0-93.0) a	73.0 (70.0-75.0) ^{ab}	22.0 (20.25-24.0) ^{abc}	5.0 (3.0-7.0) ^{abcd}	80.000 (0.000)
C 组	97.0 (96.25-97.0)	93.5 (93.0-94.0) a	92.0 (90.0-93.0) ^{ab}	96.0 (95.25-97.75) ^b	96.0 (96.0-97.0) ^b	68.659 (0.000)
D 组	97.0 (97.0-97.0)	94.0 (93.0-95.0) a	84.0 (82.0-85.0) ^{ab}	72.0 (70.0-72.75) ^{abc}	70.0 (69.0-72.0) ^{abc}	77.259 (0.000)
E 组	97.0 (97.0-97.0)	94.0 (93.0-94.75) ^a	92.0 (90.0-93.75) ^{ab}	96.50 (96.0-97.0) ^b	97.0 (96.0-97.75) ^b	63.967 (0.000)
Z (P)	1.506 (0.826)	59.403 (0.000)	88.741 (0.000)	77.965 (0.000)	79.408 (0.000)	

表二: 血氧饱和度分析

注: 组内与注射前对比 ^aP<0.05; 组内与即刻对比 ^bP<0.05; 组内与第 1 天对比 ^cP<0.05; 组内与第 7 天对比 ^dP<0.05

得其广泛运用于动物模型的制作。然而笔者在实际操作中发现,正是由于兔耳血管十分丰富,直接往动静脉内注射 HA 很难造成坏死,在注射量达 0.5ml 时甚至会造成实验动物猝死。黄明欢^[6]等人通过结扎耳廓前动静脉及部分耳廓后动静脉,制作成仅以耳廓后中央动静脉为主要血供的兔耳模型,该模型能够制成有效的坏死。不足之处是当实际操作过程中,耳廓前动静脉管径较细,不易分辨,结扎较为困难。有学者^[7]通过对兔耳血管铸型的研究发现,兔耳前后两侧皆有极为丰富的血供,耳廓前动静脉管径较耳廓后动静脉管径更细,耳廓后侧主要由耳廓后动静脉及其分支作为血供,本实验兔耳模型通过结扎耳廓后静脉部分分支,减少耳廓后部分血供,操作便利,通过简单易行的手段即可制成较好的兔耳模型,并在接下来的 HA 动脉注射,成功复制了坏死模型。

3.2 实验结果分析探讨 刺血疗法^[8],又称放血疗法,是在中医的基本理论指导下,通过针对病灶或病理反应点、人体浅表小静脉进行针刺,放出适量的血液,用以治疗疾病的传统方法,是中医当中代表性的治疗手段之一。在西医中也被广泛应用于断指再植血管危象的治疗。其主要作用机理为,由于动静脉末梢栓塞,管腔细小等原因而无法有效吻合血管,导致静脉回流障碍,通过针刺放血,改善血液循环,缓解血管危象。^[9]

当前普遍认为,^[10]临床上 HA 血管栓塞引起较为严重的组织坏死主要由于动脉栓塞引起,当 HA 被注入动脉血管时,由于动脉血管的搏动以及血液的流动,一部分透明质酸钠会被冲入更多更为纤细的毛细血管,引起进一步的栓塞,导致严重的坏死,而刺血疗法的在 HA 血管栓塞中的应用可能与其在预防血管危象时的作用机理类似,一方面刺破栓塞血管,可以挤出部分 HA,减缓栓塞;另一方面亦可增加栓塞处组织血液供应,改善循环。

根据本实验结果可以看出,虽然透明质酸酶注射及刺血疗法联合应用对于透酸钠凝胶血管栓塞能够起到不错的疗效,但是效

果却差于单纯应用透明质酸酶注射,而且会引起皮肤淤血病变,因此不建议临床应用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

参考文献:

- [1]Doerfler L, Hanke CW. Arterial Occlusion and Necrosis Following Hyaluronic Acid Injection and a Review of the Literature. *J Drugs Dermatol.* 2019 Jun 1;18(6):587-591. PMID: 31251553.
- [2]Mohammed H, Abduljabbar, Mohammad A. Basendwh, Complications of hyaluronic acid fillers and their managements. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, Volume 20, Issue 2, 2016, Pages 100-106
- [3]Zheng C, Fu Q, Zhou GW, Lai LY, Zhang LX, Zhang DQ, . Efficacy of Percutaneous Intraarterial Facial/Supratrochlear Arterial Hyaluronidase Injection for Treatment of Vascular Embolism Resulting From Hyaluronic Acid Filler Cosmetic Injection. *Aesthet Surg J.* 2022 May 18;42(6):649-655. doi: 10.1093/asj/sjab425.
- [4]Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system[J]. *Eur J cell Biol.* 2006;85(8): 699-715.
- [5]陈敏亮,吴溯帆,李华.中国整形美容协会抗衰老分会《微创注射抗衰老技术规范化指南》[J]. *中华保健医学杂志*, 2016,18(06):519-520.
- [6]黄明欢,宋建星,杜振峰.透明质酸注射后组织坏死机制的实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2012,33(05):488-492.
- [7]梁成,庄跃宏,郑和平,谢志平,郝攀登.兔耳血管形态学特点及其意义[J]. *海峡预防医学杂志*, 2015,21(02):5-7+10.
- [8]庄岩.兔耳透明质酸动脉栓塞模型的建立及透明质酸酶溶栓效果的评估[D].北京协和医学院, 2016.
- [9]杨丽,袁秀丽.刺络放血疗法机理探讨及研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2016,12(02):67-69.