论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2172-05

PEG-GoldMag-pod 纳米粒标记乳腺癌淋巴管内皮细胞及体外磁共振成像研究

杨 华,龚明福,张 松,邹利光,舒通胜 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院放射科)

[摘要] **目的** 运用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、金磁微粒(GoldMag-Coreshell, GoldMag)和抗 podoplanin 抗体构建靶向淋巴管内皮细胞的磁性纳米粒。**方法** 在十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)的介导下采用 PEG 修饰 GoldMag 制备水溶性的 PEG-GoldMag 复合微粒,将抗 podoplanin 抗体结合到 PEG-GoldMag 纳米粒上制备 PEG-GoldMag-pod 分子探针并检测其相关参数。采用小室法体外诱导人真皮淋巴管内皮细胞(Human dermal lymphatic endothelial cells, HDLECs)向乳腺癌淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cells, LECs)分化。用铁浓度分别为 5、10、15、30、45 μg/mL 的 PEG-GoldMag-pod 纳米粒体外标记经诱导的 HDLECs,计算细胞标记率;对不同浓度铁标记的细胞进行 MR 成像,了解标记细胞的信号改变特点,以未诱导的 HDLECs 为对照。**结果** 成功合成了水溶性的 PEG-GoldMag-pod 纳米分子探针。在铁浓度分别为 5、10、15、30、45 μg/mL 时,诱导后的 HDLECs 和未诱导的 HDLECs 的标记效率分别为:(39.65 ± 3.48)%、(71.37 ± 3.07)%、(91.36 ± 4.87)%、100%、100% 和(22.61 ± 3.68)%、(36.40 ± 4.06)%、(70.13 ± 3.61)%、(91.40 ± 5.45)% 和 100%。经乳腺癌细胞诱导后的 HDLECs 较未诱导的 HDLECs 具有更高的标记阳性率($P<0.05$)。标记细胞在常规 MR 上能够产生明显的信号改变,以 T_2^* WI 信号改变最明显。**结论** 采用 PEG 修饰可以有效的构建水溶性的 PEG-GoldMag 纳米粒,进一步连接 PodAb 后能有效的标记 LECs,通过对标记的 LECs 进行 MR 成像可以反映细胞 podoplanin 的表达情况。

[关键词] 金磁微粒;聚乙二醇;podoplanin;淋巴管内皮细胞;磁共振成像

[中图法分类号] R445.2;R737.9;R981 [文献标志码] A

PEG-GoldMag-pod nanoparticles labeling breast cancer lymphatic endothelial cells and magnetic resonance imaging *in vitro*

Yang Hua, Gong Mingfu, Zhang Song, Zou Liguang, Shu Tongsheng (Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To build lymphatic endothelial cells (LECs)-targeted PEG-GoldMag-pod nanoparticles with gold magnetic particles (GoldMag) modified by polyethylene glycol (PEG) and anti-podoplanin antibody (PodAb). **Methods** PEG was covalently bound to GoldMag to obtain PEG-GoldMag nanoparticles mediated by cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB). PodAb was covalently bound to PEG-GoldMag to construct PEG-GoldMag-pod nanoparticles. The characteristics of the PEG-GoldMag-pod nanoparticles were tested. Human dermal lymphatic endothelial cells (HDLECs) were incubated with breast cancer cells in Millicell cell culture inserts to acquire breast cancer LECs. The breast cancer LECs were co-cultured with PEG-GoldMag-pod nanoparticles at iron concentrations of 5, 10, 15, 30, and 45 μg/mL separately for 24 h. The labeling ratio was evaluated by Prussian blue staining. Magnetic resonance (MR) imaging was performed to the labeled breast cancer LECs to investigate the signal characteristics. HDLECs without induction were used as control. **Results** The water-soluble PEG-GoldMag-pod nanoparticles were obtained successfully. Dose-dependence was observed in the labeling efficiencies and MR images of the labeled cells. The labeling ratio and signal intensity (SI) of breast cancer LECs were significantly higher than those of HDLECs. With increase of iron concentration, SI gradually increased in SE T_1WI, and decreased in FSE T_2WI and GRE T_2^* WI. The SI in T_2^* WI was significantly stronger than that in T_2 WI. **Conclusion** The PEG-GoldMag-pod nanoparticles can be used to label breast cancer LECs. MR imaging of the labeled LECs can reflect the expression of podoplanin on LECs.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770609,81071197)

[通信作者] 邹利光,电话:(023)68774036,E-mail:zlgxqyy@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.005.html(2013-07-01)

[**Key words**] GoldMag; polyethylene glycol; podoplanin; lymphatic endothelial cells; magnetic resonance image

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30770609, 81071197). Corresponding author: ZOU Liguang, Tel: 86-23-68774036, E-mail: zlgxqyy@163.com

乳腺癌是威胁妇女健康最常见的恶性肿瘤。淋巴道转移是乳腺癌最常见的转移途径,是决定乳腺癌分期和选择治疗方案最关键的因素之一[1-2]。早期、准确识别淋巴道转移的有无及程度对治疗方案的选择具有重要意义。Podoplanin是淋巴管生成所必须一种细胞膜黏蛋白,能促进内皮细胞黏附、移行和淋巴管生成;Podoplanin特异性表达于生长中和成熟的小淋巴管内皮细胞表面,而在血管内皮不表达,是特异性较高的淋巴内皮细胞(lymphatic endothelial cells, LECs)标志物[3-4]。靶向podoplanin的磁共振(magnetic resonance, MR)成像有望特异性识别乳腺癌的淋巴生成。在前期的研究中我们已经证明:GoldMag是可靠的MR分子影像纳米载体,基于GoldMag制备的分子探针能有效的标记LECs[5-6]。然而,胶体金存在稳定性差,容易受环境因素影响而聚集的问题,从而在很大程度上限制了胶体金的应用[7-8]。同时,由于微环境的不同,乳腺癌LECs与人真皮淋巴管内皮细胞(human dermal lymphatic endothelial cells, HDLECs)的podoplanin表达可能存在差异。因而,在本研究我们拟采用巯基聚乙二醇(PEG-SH)对金磁微粒表面进行部分修饰,再用PodAb与复合微粒耦联形成特异性分子探针PEG-GoldMag-pod,并将探针应用于乳腺癌淋巴管内皮细胞模型,了解基于PEG-GoldMag-pod探针的MRI显像评价乳腺癌淋巴管生成的价值。

1 材料与方法

1.1 PEG-GoldMag-pod纳米粒制备及相关参数检测

参考Chao等[7]方法在十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)的介导下采用相对分子质量为5 000的巯基聚乙二醇(PEG_{5000}-SH)(Sigma, USA)修饰GoldMag(陕西北美基因有限公司)制备水溶性的PEG-GoldMag复合微粒,将微粒分别溶于PBS、双蒸水及10%胎牛血清溶液中了解其悬浮稳定性。按我们前期实验的方法[5-6]将抗podoplanin抗体(AngioBio, USA)采用"一步法"结合到PEG-GoldMag纳米粒上制备PEG-GoldMag-pod分子探针,透射电子显微镜(Tecnai-10, Philips, Holland)下观察GoldMag、PEG-GoldMag及PEG-GoldMag-pod的形态和粒径。酶标仪(Sunrise, Tecan, Switzerland)上采用ELISA双抗体夹心法测定PodAb与PEG-GoldMag结合前后的$D(460)$值。Zetasizer激光粒度仪(Nano zs90, Malvern England)检测其电位、Z-平均粒径及聚合物分散系数(polydispersity index, PDI)。

1.2 体外诱导HDLECs向乳腺癌LECs分化

参考Mikhaylova等[9]的方法,采用小室诱导正常淋巴管内皮细胞向乳腺癌淋巴管内皮细胞分化。将HDLECs(ScienCell, USA)按细胞密度5×10^4/孔接种于6孔板,在培养箱中孵育12 h使细胞贴壁,然后将接种有5×10^4/孔密度人乳腺癌细胞MDA-MB-231(第三军医大学生物化学教研室惠赠)的Millicell小室(MILLIPORE, USA)放入6孔板中,继续培养3 d后收获6孔板内的目标细胞用于后续实验。对目标细胞进行podoplanin和CD34免疫荧光染色了解经诱导后的HDLECs的podoplanin表达情况,以未诱导的HDLECs为对照。

1.3 PEG-GoldMag-pod体外标记LECs

经乳腺癌细胞诱导后的HDLECs和未诱导的HDLECs以细胞密度为5×10^5/mL接种于铺有PLL预处理盖玻片的6孔板,常规培养过夜后,分别向每孔加入铁浓度为5、10、15、30、45 μg/mL的PEG-GoldMag-pod共培养24 h,取出盖玻片,PBS洗净后,4%多聚甲醛固定。行常规普鲁士蓝染色后封片,倒置显微镜下观察、摄片。每张玻片任意取20个高倍视野进行细胞计数,计算标记阳性率=视野内阳性细胞数/视野内细胞总数×100%,以未诱导的HDLECs为对照。

1.4 细胞悬液的MR成像

细胞标记方法同上。标记细胞以PBS重悬于1 mL EP管,细胞密度为2×10^6/mL,体积为0.6 mL,以PBS为对照,于3.0T MRI扫描仪(Signa HDx, GE, USA)上采用8通道头颅线圈进行轴位2D多层成像。成像条件:视野(FOV)19 cm×19 cm,层厚2 mm,层间距0,重建矩阵256×160。分别行SE T_1WI(TR=380 ms, TE=20 ms),FSE T_2WI(TR=2 000 ms, TE=46.4 ms),16回波T_2^* mapping(TR=400, TE=2.2~55.4 ms)及GRE T_2^*WI(TR=400 ms, TE=12 ms,翻转角20°)扫描。在同一层面选取15 mm^2的感兴趣区进行信号强度(signal intensity, SI)测量,计算信号强度变化值△SI,$\triangle SI=(SI_{cell}-SI_{PBS})/SI_{PBS}\times100\%$,其中,$SI_{cell}$为细胞的信号强度,$SI_{PBS}$为PBS的信号强度,采用GE公司ADW 4.4工作站自带T_2^*软件在T_2^* mapping图像测量溶液的T_2^*值。

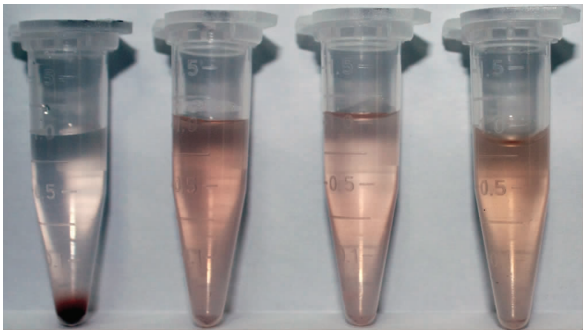
1.5 统计学分析

数据均采用SPSS 13.0处理,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用独立样本t检验。

2 结果

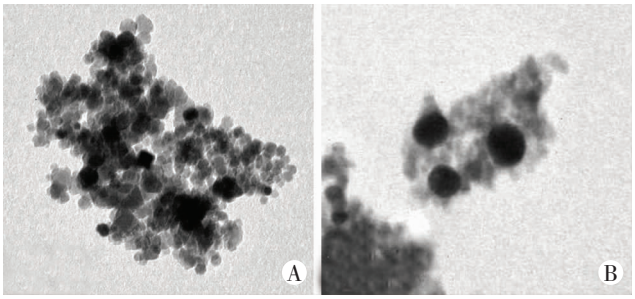
2.1 PEG-GoldMag-pod纳米粒合成及相关参数

PEG-GoldMag复合微粒可以稳定分散于液相中(包括双蒸水、PBS液及10%胎牛血清溶液)至少半个月,不发生团聚(图1)。在电镜下GoldMag和PEG-GoldMag呈圆形或椭圆形,GoldMag粒径为40~60 nm,平均48.5 nm(图2A),结合PEG后的PEG-GoldMag呈两层结构,其核心为高电子密度的GoldMag,外层为浅淡的PEG,其粒径为60~82 nm,平均66.8 nm,连接上podAb后粒径变化不大(图2B)。podAb的平均$D(460)$值为0.88,分子探针组的$D(460)$值为0.37,podoplanin与GoldMag偶联后其活性下降为42.05%,仍具有较高活性,能满足靶向结合的需要。



从左至右分别为 GoldMag 溶于 PBS 中和 PEG-GoldMag 溶于 PBS、双蒸水和10%胎牛血清中的 EP 管

图1 GoldMag 和 PEG-GoldMag 纳米粒溶于液相后半个月变化



A：GoldMag（×160 000）；B：PEG-GoldMag-pod（×93 000）

图2 透射电子显微镜观察纳米粒的形态变化

GoldMag 和 PEG-GoldMag 的 Zeta 电位、Z-平均粒径及 PDI 见表1，GoldMag 呈正电荷，链接 PEG 后纳米粒电荷没有明显改变，然而，进一步链接抗体后的纳米微粒呈负电荷，且电位值增高；PEG-GoldMag-podAb 的 Z-平均粒径约为 72.5 nm，粒径较均匀，Z-平均粒径大于电镜下粒径，这可能是纳米粒吸附了周围的水分子，DLS 能观察到整个纳米粒的水合粒径，而电镜不能显示结合的水分子，PDI 表明两种微粒均呈单分散性。

表1 DLS 下 GoldMag 和 PEG-GoldMag-pod 纳米粒的参数比较

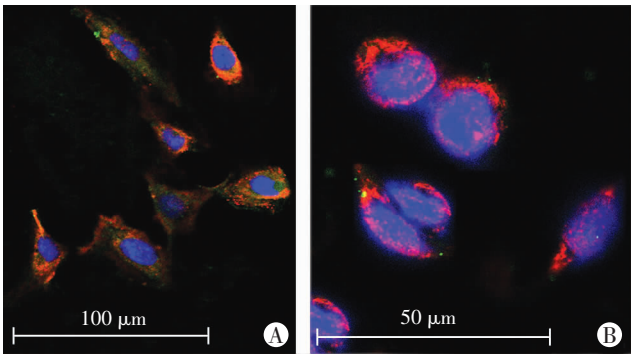
纳米粒	电位($\bar{x}\pm s$, mV)	Z-平均粒径($\bar{x}\pm s$, nm)	PDI
GoldMag	15.2±5.2	49.9±8.6	0.071
PEG-GoldMag	14.4±5.6	68.7±10.8	0.072
PEG-GoldMag-pod	−17.5±4.0	72.5±11.3	0.075

2.2 体外诱导 HDLECs 向乳腺癌 LECs 分化

HDLECs 在 podoplanin 和 CD34 双染下呈红色（podoplanin）和绿色（CD34）荧光，细胞核呈蓝色荧光，乳腺癌诱导后的乳腺癌 LECs 的 podoplanin 染色免疫荧光明显强于未处理的 HDLECs，表明采用 Millicell 小室共培养能有效的诱导 HDLECs 向肿瘤 LECs 分化（图3）。

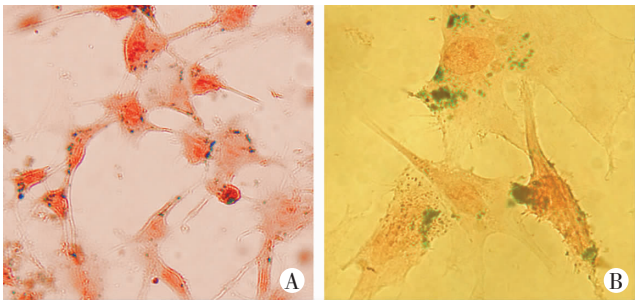
2.3 PEG-GoldMag-pod 标记 LECs

普鲁士蓝染色细胞内可见大量蓝染颗粒，表明 PEG-GoldMag-pod 纳米粒能标记 HDLECs，标记阳性率随着铁浓度的增加而增加。共培养 24 h 的情况下，铁浓度为 5、10、15、30、45 μg/mL时，乳腺癌 LECs 的标记效率分别为：(39.65±3.48)%、(71.37±3.07)%、(91.36±4.87)%、100%和100%，未诱导的 HDLECs 的标记率分别为：(22.61±3.68)%、(36.40±4.06)%、(70.13±3.61)%、(91.40±5.45)%和100%。乳腺癌 LECs 较未诱导的 HDLECs 具有更高的标记阳性率（$P<0.05$）（图4）。连续观察 48 h，各浓度组细胞形态未见明显改变。



A：未处理的 HDLECs；B：经乳腺癌诱导的乳腺癌 LECs

图3 HDLECs 的 podoplanin（红色）和 CD34（绿色）免疫荧光双染结果观察

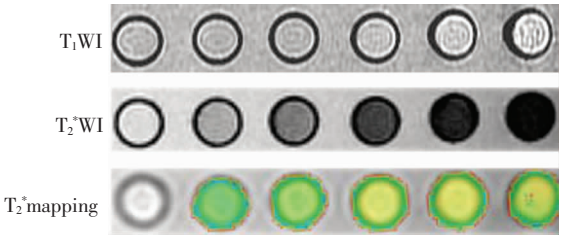


A：未诱导的 HDLECs；B：乳腺癌 LECs

图4 PEG-GoldMag-pod 纳米粒标记后细胞的普鲁士蓝染色观察（×400）

2.4 细胞悬液的 MR 成像

随着铁浓度增加，在 SE T_1WI 上，细胞悬液的信号强度呈缓慢升高；在 FSE T_2WI 和 GRE T_2^* WI 上，信号强度逐渐下降；以 GRE T_2^* WI 改变更明显，GRE T_2^* WI 较 SE T_1 WI 和 FSE T_2WI更敏感（$P<0.05$）。T_2^* mapping 显示随着浓度增加 T_2^* 值逐渐降低，在铁浓度分别为 5、10、15、30、45 μg/mL 时，乳腺癌 LECs 和未诱导的 HDLECs 的 T_2^* 值分别为：(193.48±11.37)、(66.25±10.86)、(47.14±3.52)、(38.28±2.47)、(35.14±2.65)和(196.04±13.63)、(124.47±9.67)、(81.65±5.70)、(51.37±2.14)、(41.52±2.24)。乳腺癌 LECs 的信号强度改变较未诱导的 HDLECs 更明显，但随着铁浓度的增加，二者的差异逐渐减小。乳腺癌 LECs 细胞悬液的 T_1 WI、T_2^* WI 和 T_2^* mapping 图像见图5。



T_2^* mapping 图像，颜色从蓝-绿-黄变化代表 T_2^* 值逐渐降低

图5 PEG-GoldMag-pod 纳米粒标记乳腺癌 LZCs 的 MRI 表现

3 讨论

分子影像是基于细胞的分子特征成像手段。磁共

振分子影像技术是磁共振成像研究领域中最新的发展方向,它是利用磁共振成像为手段来无创伤地研究活体条件下生物细胞内的正常或病理状态下的分子过程的技术。通过分子影像,可以为肿瘤的分级提供参考,为特异性靶向治疗选择更敏感的生物靶点[10]。淋巴道转移是乳腺癌最常见的转移途径[1,11],通过特异性靶向淋巴管内皮的分子影像,能够了解乳腺癌的淋巴管生成状况,为评估乳腺癌的淋巴转移风险及靶向淋巴管生成的治疗的疗效提供有力的证据。

分子探针的构建是进行MR成像研究的基础,理想的分子探针应具有如下特点[12]:①具有超顺磁性;②高水溶性及液相稳定性;③较高的磁化率,能引起周围组织明显的信号改变;④表面化学活性好,易于链接抗体、肽等生物分子;⑤血浆半衰期长。在我们前期的研究中已经证明了基于GoldMag构建MR分子探针的可行性[5-6]。由于单纯GoldMag不稳定,容易聚集和沉积,因而需要对其进行水溶性修饰[7-8]。已经证明:通过巯基聚乙二醇修饰可以增强其空间稳定性,并进一步促进细胞对纳米粒的内化作用[7-8,13-14],但PEG修饰胶体金的稳定性与PEG的链长具有一定的关系,采用相对分子质量为5 000的PEG修饰的胶体金具有更好的稳定性[8,14]。由于PEG-5000折叠包裹在GoldMag表面,相对于小分子质量的PEG,其并不明显增加纳米粒的粒径[8,14],我们所制备的探针的Z-平均粒径高于电镜所测粒径,这是由于PEG吸附了周围的水分子形成了较大的表观流体力学半径[15]。尽管PEG的修饰会一定程度的影响金磁微粒的抗体载药能力[8,16],但我们的研究结果表明,抗体仍保持了42.05%的活性,且体外细胞标记实验表明探针能靶向淋巴管内皮细胞,反映细胞podoplanin的表达情况。

由于从肿瘤组织中分离淋巴管内皮细胞数量极少且培养困难,目前学术界多采用HDLECs替代以解决肿瘤淋巴管内皮细胞难以获取的难题。研究表明:肿瘤细胞旁分泌和自分泌一些血管生成因子,可刺激内皮细胞发生增殖、迁移和管腔生成[17-18]。Khodarev等[19]采用Transwell小室将人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和人神经胶质瘤U87MG细胞进行共培养,观察HUVECs的形态、表型、功能变化,结果表明:HUVECs在一定程度上具有了肿瘤血管内皮细胞的特性。Mikhaylova等[9]采用millicell小室成功诱导HDLECs向乳腺癌LECs分化。为了在体外最大程度模拟肿瘤淋巴管生长的内环境,我们采用了Millicell小室建立了内皮细胞与肿瘤细胞共培养模型,结果表明:小室法是一种可靠的建立乳腺癌淋巴管内皮细胞模型的方法。

相对于SE序列,GRE序列使用极性相反的去相位梯度场和再聚焦梯度场致横向弛豫再聚焦,不使用180°脉冲,因此不会消除失相位效应,能同时检测物质本身T_2弛豫以及超小超顺磁性氧化铁周围不均匀磁场引起的横向弛豫变化,故对超顺磁性氧化铁微粒的磁敏感效应更为敏感[5,20-21]。本实验分别用FSE T_2WI和GRE T_2^* WI序列对GoldMag标记HUVECs进行MR成像,结果显示GRE T_2^* WI序列上信号改变更为明显。T_2^* Mapping能通过软件计算出标记细胞T_2^*值,实现定量分析,同时,伪彩编码能改善观察者的视觉分辨能力,提高检测的敏感性。

以上研究证明:采用PEG修饰可以有效构建水溶性好的、靶向LECs的PEG-GoldMag-pod纳米探针,通过对标记的LECs进行MR成像可以反映细胞podoplanin的表达情况。为进一步利用核磁共振无创伤性的检测肿瘤淋巴管生成奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Ran S, Volk L, Hall K, *et al*. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer[J]. Pathophysiology, 2010, 17(4): 229-251.
[2] Tran-Cao H S, McElroy M, Kaushal S, *et al*. Imaging of the interaction of cancer cells and the lymphatic system[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(10/11): 886-889.
[3] Ordonez N G. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker[J]. Adv Anat Pathol, 2006, 13(2): 83-88.
[4] Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion[J]. Br J Cancer, 2007, 96(1): 1-5.
[5] Zhang S, Zou L, Zhang D, *et al*. GoldMag nanoparticles with core/shell structure: characterization and application in MR molecular imaging[J]. J Nanopart Res, 2011, 13(9): 3867-3876.
[6] 张松, 邹利光, 张冬, 等. MRI观察金磁微粒结合抗podoplanin抗体体外标记淋巴管内皮细胞[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(2): 237-241.
[7] Chao X, Guo L, Zhao Y, *et al*. PEG-modified GoldMag nanoparticles (PGMNs) combined with the magnetic field for local drug delivery [J]. J Drug Target, 2011, 19(3): 161-170.
[8] Liu Y, Shipton M K, Ryan J, *et al*. Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly (ethylene glycol) monolayers[J]. Anal Chem, 2007, 79(6): 2221-2229.
[9] Mikhaylova M, Mori N, Wildes F B, *et al*. Hypoxia increases breast cancer cell-induced lymphatic endothelial cell migration[J]. Neoplasia, 2008, 10(4): 380-389.
[10] Tafreshi N K, Kumar V, Morse D L, *et al*. Molecular and functional imaging of breast cancer[J]. Cancer control, 2010, 17(3): 143-155.
[11] Krag D, Weaver D, Ashikaga T, *et al*. The sentinel node in breast cancer-a multicenter validation study[J]. N Engl J Med, 1998, 339(14): 941-946.
[12] Herschman H R. Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions[J]. Science, 2003, 302 (5645): 605-608.
[13] 吴超, 郭红燕, 胡家文. 巯基聚乙二醇5000修饰的金溶胶的稳定性: 从DLVO稳定到空间稳定[J]. 化学学报, 2009, 67(14): 1621-1625.
[14] Zhang G, Yang Z, Lu W, *et al*. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and *in vivo* biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice

[J]. Biomaterials, 2009, 30(10): 1928-1936.
[15] Pons T, Uyeda H T, Medintz I L, *et al*. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots [J]. J Phys Chem B, 2006, 110(41): 20308-20316.
[16] Zheng M, Huang X. Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(38): 12047-12054.
[17] Chen Z, Htay A, Dos-Santos W, *et al*. *In vitro* angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells [J]. J Neurooncol, 2009, 92(2): 121-128.
[18] Garmy-Susini B, Makale M, Fuster M, *et al*. Methods to study lymphatic vessel integrins[J]. Methods Enzymol, 2007, 426: 415-438.
[19] Khodarev N N, Yu J, Labay E, *et al*. Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 6): 1013-1022.
[20] Chavhan G B, Babyn P S, Thomas B, *et al*. Principles, techniques, and applications of T_2^*-based MR imaging and its special applications [J]. Radiographics, 2009, 29(5): 1433-1449.
[21] Liu G, Yang H, Zhang X M, *et al*. MR imaging for the longevity of mesenchymal stem cells labeled with poly-L-lysine-Resovist complexes [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2010, 5(2): 53-58.

(收稿:2013-04-10;修回:2013-05-17)
(编辑 汪勤俭)

(上接2171页)

1.3 统计学分析

治疗组与对照组住院时间、换药次数、二期创面修复时间采用Wilcoxon秩和检验 t 检验。

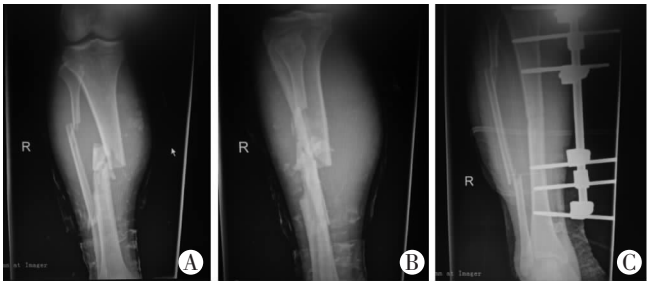
2 结果

治疗组均无感染,拆除VSD后植皮或转移皮瓣治愈21例,余6例经再次VSD、植皮后痊愈;患者随访至取出外固定支架,骨折愈合时间平均12.6个月。对照组有9例(33.3%)出现伤口感染,3例出现骨髓炎,经病灶清除、截骨延长后治愈;患者随访至取出外固定支架,骨折愈合时间平均14.6个月。2组患者住院时间、换药次数、二期创面修复时间比较,差异均有统计学意义(表2,$P<0.01$)。

表2 2组患者住院时间、换药次数、二期创面修复时间比较
($n=27$,M, 25%,75%)

组别	住院时间	换药时间	修复时间
对照组	39,37,43	8,7,15	29,27,31
治疗组	26,24,28	3,3,4	9,9,11
U	2.5	0	0
W	380.500	378.000	378.000
Z	-6.271	-6.370	-6.334
P	<0.01	<0.01	<0.01

典型病例:患者,男性,43岁,诊断右胫腓骨骨折并OCS,伤后5 h出现右足背苍白、感觉减退及牵拉痛,伤后6 h行右小腿OCS切开减张、外固定支架固定及VSD技术。术后感觉、血供恢复正常,X线片提示骨折对位、对线良好(图1)。



A:术前右小腿正位;B:术前右小腿侧位;C:术后右小腿正位
图1 右胫腓骨骨折并骨筋膜室综合征患者手术前后X线片表现

3 讨论

急性OCS是创伤严重并发症,其中胫腓骨骨折后发生最多。由于OCS病情变化迅速,及时的临床干预是使自然病程逆转的唯一方法,少部分患者可通过甘露醇、七叶皂苷钠等药物控制肿胀,达到缓解。

对于胫腓骨骨折合并OCS患者的处理,本研究对照组中有3例因术后并发感染,最终导致慢性骨髓炎发生,伤口经久不愈,最终行病灶清除后骨缺损长度达2.5~4.0 cm,待创面愈合后行胫骨上端截骨延长[5],虽疗效满意,但骨折愈合最长者达术后22个月,花费巨大。对本组患者采用单边外固定支架,我们有几点感受:①合理选择进针点,调整连杆高度;②对稳定性差的骨折,结合螺钉、克氏针等有限内固定增加稳定性[6];③部分骨折需跨关节固定,但应尽早去除跨关节连杆功能锻炼[7]。VSD为治疗急慢性创面的一种技术,已在临床较多应用,能有效控制感染发生、促进创面修复。治疗组均经VSD治疗,无伤口感染,愈合良好。我们有几点体会:①创面渗出物有效被引出,减少细菌的培养基;②负压能减轻组织肿胀,促进肉芽生长;③生物半透膜能减少院内感染的发生;④避免长期换药,降低患者痛苦。⑤降低抗生素疗程。同时,在临床使用中也应注意以下几点:①引流不能代替清创,彻底清创是前提;②重视术中止血;③负压需持续有效;④结合间断冲洗减少管腔堵塞。急诊一期切开减张联合应用外固定术和VSD技术治疗胫腓骨骨折合并OCS患者,方法简单,疗效确切,为治疗严重小腿损伤有效的方法。

参考文献:

[1] 裘法祖. 外科学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 1362.
[2] 张弛, 安智全, 于晓雯, 等. 有限内固定结合负压封闭引流技术治疗严重开放性跟骨骨折的初步经验[J]. 中华创伤骨科杂志, 2010, 12(5): 496-498.
[3] 王亦璁. 骨与关节损伤[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 703.
[4] Gustilo R B, Anderson J T. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses[J]. J Bone Joint Surg Am, 1976, 58(4): 453-458.
[5] 陈辉强, 章莹, 夏虹, 等. 单侧外固定支架联合腓骨移植修复胫骨缺损稳定性的有限元分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2013, 15(1): 23-27.
[6] 刘伟军, 王俊文, 焦竞, 等. 两种不同外固定支架治疗胫骨远端骨折的疗效比较[J]. 中华创伤骨科杂志, 2011, 13(6): 503-507.
[7] 朱跃良, 徐永清, 李军, 等. 胫腓骨外固定3003例: 置针、构型及相关问题分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2011, 13(6): 522-525.

(收稿:2013-02-27;修回:2013-04-09)
(编辑 龙 亮)