

引用本文:张淦,刘胜杰,王智,等.高压氧治疗海水浸泡火器伤兔股骨骨缺损的疗效观察[J].安徽医药,2023,27(5):999-1002.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.05.034.

◇临床医学◇



高压氧治疗海水浸泡火器伤兔股骨骨缺损的疗效观察

张淦,刘胜杰,王智,陈聪聪,马武秀,陈肖松

作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院骨科,安徽 合肥 230031

通信作者:陈肖松,男,副教授,硕士生导师,研究方向为骨折愈合机制,Email:varizon123@163.com

基金项目:军队后勤科研项目(CLB18J059)

摘要: **目的** 观察高压氧治疗海水浸泡火器伤所致兔股骨开放性骨缺损的疗效。**方法** 实验实施时间2020年7月至2021年5月。84只新西兰兔采用随机数字表法分成对照组和高压氧组。制作海水浸泡火器伤所致肢体开放性骨缺损模型,对照组彻底清创后,行骨折切开复位钢板内固定术;高压氧组彻底清创后,行骨折切开复位钢板内固定术,连续高压氧治疗7 d。通过X线摄片、定量PCR法、HE染色及生物力学分析评价各组治疗效果。**结果** 血管内皮生长因子(VEGF) mRNA各组各个时间段均有表达,与对照组相比,高压氧组术后1 d[(2.97±0.25)比(2.39±0.24)],3 d[(4.12±0.38)比(3.65±0.30)],1周[(4.83±0.23)比(4.36±0.39)],2周[(5.89±0.40)比(5.04±0.36)],4周[(4.21±0.42)比(5.04±0.36)],差异有统计学意义($P<0.05$);术后8周、12周,两组VEGF mRNA表达,差异无统计学意义($P>0.05$)。影像学观察:术后2周两组未见明显骨组织影,钢板及螺钉在位。术后4周两组骨缺损区有薄云状骨痂阴影,阴影区域高压氧组>对照组,钢板及螺钉在位。术后8周对照组骨组织阴影增强,高压氧组达骨性愈合,髓腔未完全再通,钢板及螺钉在位。术后12周,对照组达骨性愈合,但髓腔部分再通,钢板及螺钉在位;高压氧组皮质连续性良好,髓腔再通,基本完成修复,钢板及螺钉在位。Lane-Sandhu放射学评分,与对照组相比,高压氧组术后4周[(4.17±0.75)分比(2.83±0.98)分],8周[(7.67±1.63)分比(5.67±0.82)分],12周[(10.17±1.47)分比(7.83±1.17)分],差异有统计学意义($P<0.05$);术后2周,两组Lane-Sandhu放射学评分,差异无统计学意义($P>0.05$)。组织学观察:术后第12周,两组大量板层骨形成,对照组髓腔部分再通,高压氧组髓腔再通。生物力学分析:对照组最大负荷(195.97±11.70)N<高压氧组最大负荷(239.75±10.76)N,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 高压氧具有促进海水浸泡火器伤致骨缺损愈合的作用。

关键词: 高压氧; 创伤,枪击; 海水浸泡; 兔股骨骨缺损; 火器伤

Effect of hyperbaric oxygen on the open bone defect of limbs caused by firearm wound in seawater

ZHANG Gan, LIU Shengjie, WANG Zhi, CHEN Congcong, MA Wuxiu, CHEN Xiaosong

Author Affiliation: Department of Orthopaedics, The 901th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Hefei, Anhui 230031, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of hyperbaric oxygen on the open bone defect of limbs caused by firearm wound in seawater. **Methods** The experiment was performed from July 2020 to May 2021. Eighty-four New Zealand rabbits were randomly assigned into control group and hyperbaric oxygen group. The model of the open bone defect of limbs caused by firearm wound in seawater was made. After thorough debridement, open reduction of fracture was performed with plate internal fixation in control group, while open reduction, internal fixation and continuous hyperbaric oxygen treatment for 7 days were performed in hyperbaric oxygen group. X-ray radiography, quantitative PCR, HE staining and biomechanical analysis were used to evaluate the therapeutic effect of each group. **Results** Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA was expressed in each group at all time periods. There were statistically significant differences between control group and hyperbaric oxygen group at postoperative 1 d [(2.97±0.25) vs. (2.39±0.24)], 3 d [(4.12±0.38) vs. (3.65±0.30)], 1 week [(4.83±0.23) vs. (4.36±0.39)], 2 weeks [(5.89±0.40) vs. (5.04±0.36)], 4 weeks [(4.21±0.42) vs. (5.04±0.36)] ($P<0.05$); There was no significant difference in VEGF mRNA expression between the two groups at 8 weeks and 12 weeks postoperatively ($P>0.05$). Imaging observation results showed that two weeks after surgery, no obvious bone shadow was found in both groups, and plates and screws were present. Four weeks after surgery, thin cloud-shaped callus shadows were found in the bone defect area of control group and hyperbaric oxygen group, and the shadow area of control group was bigger than that of hyperbaric oxygen group, plates and screws in position. Eight weeks after the operation, the bone shadow of control group was enhanced, and the bone healing of hyperbaric oxygen group was achieved. The medullary cavity was not completely recanalized, and the plates and screws were in place. Twelve weeks after operation, osseous union was achieved in control group, the medullary cavity was partially recanalized, and the

plates and screws were in place. In hyperbaric oxygen group, the cortical continuity was good, the medullary cavity was recanted, the repair was basically completed, and the plates and screws were in place. Significant differences were found between control group and hyperbaric oxygen group in Lane-Sandhu radiological score at postoperative 4 weeks $[(4.17 \pm 0.75) \text{ vs. } (2.83 \pm 0.98)]$, 8 weeks $[(7.67 \pm 1.63) \text{ vs. } (5.67 \pm 0.82)]$, 12 weeks $[(10.17 \pm 1.47) \text{ vs. } (7.83 \pm 1.17)]$ ($P < 0.05$); Lane-sandhu radiological scores at 2 weeks after surgery showed no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). Histological observation results showed that at the 12th week after surgery, large amounts of lamellar bone formed in both groups, and the medullary cavity was partially recanalized in control group and recanalized in hyperbaric oxygen group, respectively. Biomechanical analysis results showed that maximum load $[(195.97 \pm 11.70) \text{ N}]$ in control group was lower than the maximum load $[(239.75 \pm 10.76) \text{ N}]$ in hyperbaric oxygen group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion Hyperbaric oxygen therapy promotes the healing of the open bone defect of limbs caused by firearm wound in seawater.

Key words: Hyperbaric oxygenation; Wounds, gunshot; Seawater immersion; Bone defect of rabbit femur; Firearm injury

骨缺损是战争中常见的损伤,骨缺区血运遭到严重破坏导致无法获取充足的氧气和营养,海水浸泡及火器伤,加重损伤程度。高压氧在海水浸泡骨缺损治疗中取得良好效果^[1]。本研究探讨高压氧治疗海水浸泡火器伤所致肢体开放性骨缺损的疗效。实验实施时间2020年7月至2021年5月。

1 材料与方法

1.1 材料 Olympus 光学显微镜; OLYMPUS-IX71 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 动物实验高压氧舱(上海杨园医用氧舱厂); EDTA 脱钙液、4% 多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司); 钢板及螺钉(常州康辉医疗器械有限公司); 20% 乌拉坦(上海士锋生物科技有限公司); 荧光定量 PCR 仪(Bio-rad); 标准试剂型纯水仪(青岛富勒姆科技有限公司); 台式高速冷冻型微量离心机(DragonLab); RNA 提取液(Servicebio); 中国东风速射运动手枪 SS04 型,口径为 5.6 mm; 子弹质量 2.5 g; 人工海水由天津中盐公司提供,海水主要理化指标:渗透压 $(1250.00 \pm 11.52) \text{ mmol/L}$, pH 为 8.20, 钠离子浓度 $(630.00 \pm 53.30) \text{ mmol/L}$, 平均密度 1.025 g/cm^3 。

1.2 方法

1.2.1 建立海水浸泡火器伤致骨缺损模型 84 只新西兰大耳兔由安徽医科大学动物实验中心提供,体质量 2.5~3.0 kg,雌雄不拘,以 20% 乌拉坦(4 mg/kg)静脉麻醉。随机选择一侧兔后肢,于兔后肢股骨中段进行枪击,枪口距离 20 cm,造成股骨干开放性骨缺损。将兔伤肢浸泡于海水 1 h。

1.2.2 实验分组 将实验兔采用随机数字表法分为对照组和高压氧组,每组 42 只。对照组行常规清创+股骨复位内固定术,一期闭合伤口。高压氧组行常规清创+股骨复位内固定,一期闭合伤口,行高压氧治疗。高压氧治疗过程:纯氧洗舱 5 min,压力为 0.12 MPa,加压 5 min,压力为 0.2 MPa,持续稳压吸氧 6 min,减压 10 min,每天 1 次,连续 7 d。见图 1。

伤口隔日换药,预防伤口感染。各组动物分笼

饲养,1 周后拆线。所有实验兔每天给予青霉素 40 万单位肌肉注射,连续 3 d。

1.2.3 观察指标 ①各组动物于术后 1 d、3 d、1 周、2 周、4 周、8 周、12 周各取 6 只行 X 线摄片,观察骨痂生长情况。②摄片处死后取材进行实验室检测,收集各组兔股骨骨痂组织,按照 TRIzol 试剂说明提取样本总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,根据反转录试剂盒说明将提取得 RNA 反转录成 cDNA,进行 RT-PCR 检测,观察骨缺损部位周围骨痂组织中血管内皮生长因子 mRNA (vascular endothelial growth factor, VEGF mRNA) 表达情况。引物序列: VEGF (正向) 5'-TCCACCCACGACAGAAGGGGA-3', (反向) 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTGACA-3'。GAPDH (正向) 5'-TGAAGGTCGGAGTGAACGGAT-3', (反向) 5'-CGTTCTCAGCCTTGACCGTG-3'。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C、10 s, 55 °C、20 s, 40 个循环。溶解曲线: 95 °C、1 min, 55 °C、1 min, 95 °C、10 s, 以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 VEGF 的相对表达量。③骨组织 HE 染色: 在术后 2、4、8、12 周摄片后,各组采用随机数字表法处死 6 只,收集股骨缺损标本,固定、脱钙,行 HE 染色,观察病理改变。④免疫组化观察: 抗骨钙素(OCN)及骨形成蛋白(BMP)单克隆抗体为一抗,于术后 4 周行骨组织免疫组化染色。⑤生物力学分析: 术后 12 周各种分别处死 6 只,获取股骨标本,去除内固定物及周围软组织,行三点折弯试验。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。Lane-Sandhu 评分组间比较采用秩和检验。VEGF 表达的测定结果采用双因素方差分析,若差异有统计学意义,则进一步采用 LSD-*t* 进行组间比较。生物力学实验结果组间比较采用独立样本 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察 术后 12 周,对照组股骨基本达骨性愈合,骨皮质基本完整,前方皮质部分未愈合,质

硬,较难折断;高压氧组股骨达到骨性愈合,原骨折区表面平滑,质硬,难以折断。见图2。

2.2 VEGF mRNA 表达 VEGF mRNA 各组各个时间段均有表达,两组 VEGF mRNA 表达先随着时间增加先呈递增趋势,之后出现递减,高峰出现在术后第2周,术后1 d、3 d、1周、2周、4周,高压氧组 VEGF mRNA 表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后8周、12周,两组 VEGF mRNA 表达,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.3 影像学观察 术后2周两组未见明显骨组织影,钢板及螺钉在位。术后4周两组骨缺损区有薄云状骨痂阴影,阴影区域对照组<高压氧组,钢板及螺钉在位。术后8周对照组骨组织阴影增强,高压氧组达骨性愈合,髓腔未完全再通,钢板及螺钉在位。术后12周,对照组达骨性愈合,但髓腔未完全再通,钢板及螺钉在位;高压氧组皮质连续性好,髓腔再通,基本完成修复,钢板及螺钉在位。见图3。各组术后2、4、8、12周 Lane-Sandhu 放射学评分比较,见表2。

表2 对照组与高压氧组不同时间点 Lane-Sandhu 评分/(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	2周	4周	8周	12周
对照组	6	1.67±0.82	2.83±0.98	5.67±0.82	7.83±1.17
高压氧组	6	1.83±0.75	4.17±0.75	7.67±1.63	10.17±1.47
Z值		-0.43	-1.96	-2.22	-2.28
P值		0.670	0.060	0.030	0.020

2.4 组织学观察 术后2周两组的骨折区域被结缔组织填充,未见明显骨痂形成,第4周,两组有新生骨小梁生成,高压氧组较对照组多。术后第8周,两组出现髓腔,大量骨小梁生成。术后第12周,两组大量板层骨形成,对照组髓腔部分再通,高压氧组髓腔再通。见图4。

2.5 免疫组化观察 OCN 及 BMP 主要表达于成骨细胞、软骨细胞,早期表达强,随着时间增加,表达逐渐减弱。对照组染色浅,高压氧组染色较深。见图5、6。

2.6 生物力学分析 术后12周对照组最大负荷(195.97 ± 11.70) N<高压氧组最大负荷(239.75 ± 10.76) N,差异有统计学意义($t=-5.51, P<0.05$)。

3 讨论

海水具有高渗、高碱、低温、含菌量高等特点。海水的特点导致海水浸泡火器伤致骨缺损与单纯火器伤不同。黄宏等^[2]研究表明海水浸泡火器伤较单纯火器伤组织损伤更加严重,浸泡时间越长,损伤程度越重。火器伤致损伤组织肿胀,压迫血管引起局部微循环障碍,同时海水浸泡会加重局部血流循环,最终加重损伤周围组织缺血缺氧。陈肖松等^[3]研究表明海水浸泡可通过损伤骨折断端骨痂中成骨细胞中细胞膜、线粒体等,进而影响骨折愈合。王长生等^[4]通过海水浸泡骨折断端处骨膜,表明海水浸泡影响骨膜,膜内成骨明显延缓。

Wright 等^[5]认为骨折内固定能有效防治火器伤致骨折感染,降低感染的发生率。笔者认为及时彻底地清创是预防感染的关键,本实验中所有实验兔伤口均获得彻底清创,HE染色中均未见炎性细胞。

高压氧是促进骨折愈合的一种有效方式。Grassmann 等^[6]研究表明高压氧治疗促进兔股骨临界骨缺损愈合。Chen 等^[7]研究证明高压氧治疗促进海水浸泡胫骨开放性骨缺损愈合。本实验中,X线片上可以看出两组实验兔在随着时间的延长,新骨形成逐渐增多。在相同时间点内,高压氧组形成的新骨比对照组多,高压氧组骨折在8周达到愈合,而对照组在12周末达到基本达骨性愈合。说明高压氧促进海水浸泡火器伤致骨缺损愈合。

高压氧可能通过以下机制促进海水浸泡火器伤致骨缺损愈合:(1)高压氧增加血氧含量及氧分压,增加毛细血管血氧弥散距离,提高组织的氧溶解能力,改善损伤处局部组织缺氧状态。当损伤组织血液灌注降低时,高压氧促进缺血组织对氧气的利用率^[8]。当高压氧达到2个标准大气压时,血液和组织中的氧分压提高10倍^[9]。

(2)高压氧促进血管生成。高压氧促进侧支循环的形成,有助于骨折后成骨细胞的生长和新生毛细血管的形成,从而促进骨折愈合及骨形成^[10-12]。其中 VEGF 是最重要的细胞因子之一,新生毛细血管的形成对骨折修复具有重要的意义,VEGF 作用于血管内皮细胞,促进内皮细胞移动、增殖,有助于毛细血管的生成,进而为骨组织修复提供充足的血供^[13]。通过 PCR 可以看出,术后1 d、3 d、1周、2周、

表1 对照组与高压氧组不同时间点血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 的表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	1 d	3 d	1周	2周	4周	8周	12周
对照组	6	2.39±0.24	3.65±0.30	4.36±0.39	5.04±0.33	3.54±0.36	2.37±0.40	2.23±0.42
高压氧组	6	2.97±0.25	4.12±0.38	4.82±0.23	5.89±0.40	4.21±0.42	2.26±0.36	2.24±0.44
F值		8.84	5.67	6.26	15.91	8.85	0.24	0.00
P值		0.010	0.040	0.030	<0.001	0.010	0.640	0.970

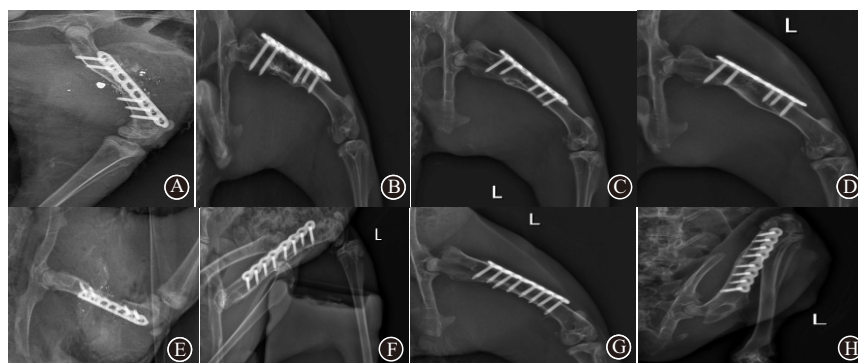


图3 不同时间点兔股骨摄片:A为对照组术后2周;B为对照组术后4周;C为对照组术后8周;D为对照组术后12周;E为高压氧组术后2周;F为高压氧组术后4周;G为高压氧组术后8周;H为高压氧组术后12周

4周两组 VEGF 表达均在早期即开始逐渐升高,高压氧组 VEGF mRNA 表达高于对照组。这与马信龙等^[14]的研究一致。

(3)高压氧的促进向成骨细胞的成骨方向分化^[15]。成骨细胞作为骨细胞的前体细胞,在骨的形成过程中起着重要的作用。吴建珊等^[16]的实验结果表明经过分化培养的成骨细胞在接受高压氧治疗后,通过对钙沉积分析、骨结节形成的观察和碱性磷酸酶活性的分析证明,高压氧能够增加成骨细胞的成骨分化。周延华等^[17]通过体外实验表明高压氧可增加间充质干细胞的成骨分化。席立成等^[18]通过用动物实验证明高压氧可以通过增强成骨细胞增殖及分化,加快骨小梁形成,从而促进了骨缺损修复。Lin 等^[19]通过体外和体内实验证明高压氧通过促进骨髓间充质干细胞成骨方向分化,修复骨缺损。

综上所述,高压氧具有促进海水浸泡火器伤致骨缺损愈合的作用。

(本文图1,2,4~6见插图5-4)

参考文献

- [1] 陈聪聪,程迅生,符来想,等.高压氧对兔桡骨开放性缺损海水浸泡后异体骨髓间充质干细胞移植修复效果的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2014,21(1):26-30.
- [2] 黄宏,王正国,周萍,等.海水浸泡弹道伤骨骼肌组织的超微结构改变[J].创伤外科杂志,2001,3(3):200-203.
- [3] 陈肖松,程迅生,马武秀,等.海水浸泡对兔胫骨开放性骨折愈合进程的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2011,18(3):142-145,149.
- [4] 王长生,程迅生,陈肖松,等.兔肢体软组织开放性损伤合并海水浸泡伤对骨髓的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2010,17(2):77-80.
- [5] WRIGHT DG, LEVIN JS, ESTERHAI JL, et al. Immediate internal fixation of low-velocity gunshot-related femoral fracture [J]. J Trauma, 1993, 35(5): 678-681.
- [6] GRASSMANN JP, SCHNEPPENDAHL J, HAKIMI AR, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects [J]. J Orthop Res, 2015, 33(4): 513-520.
- [7] CHEN X, CHENG X, MA W, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on open tibial fractures in rabbits after transient seawater immersion [J]. Undersea Hyperb Med, 2017, 44(3): 235-242.
- [8] STRAUSS MB. The effect of hyperbaric oxygen in crush injuries and skeletal muscle-compartment syndromes [J]. Undersea Hyperb Med, 2012, 39(4): 847-855.
- [9] BIRD AD, TELFER AB. Effect of hyperbaric oxygen on limb circulation [J]. Lancet, 1965, 1(7381): 355-356.
- [10] IZUMINO J, KAKU M, YAMAMOTO T, et al. Effects of hyperbaric oxygen treatment on calvarial bone regeneration in young and adult mice [J]. Arch Oral Biol, 2020, 117: 104828. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104828.
- [11] AN H, LEE JT, OH SE, et al. Adjunctive hyperbaric oxygen therapy for irradiated rat calvarial defects [J]. J Periodontal Implant Sci, 2019, 49(1): 2-13.
- [12] JUAN L, PENG L, MENGJUN W, et al. Impact of hyperbaric oxygen on the healing of bone tissues around implants [J]. Implant Dent, 2018, 27(6): 653-659.
- [13] VALENTINIS B, BASERGA R. IGF-I receptor signaling in transformation and differentiation [J]. Mol Pathol, 2001, 54(3): 133-137.
- [14] 马信龙,谢军,王沛,等.VEGF、TGF- β 1在骨缺损不愈合中表达的实验研究[J].中华骨科杂志,2002,22(9):561-566.
- [15] GARDIN C, BOSCO G, FERRONI L, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves the osteogenic and vasculogenic properties of mesenchymal stem cells in the presence of inflammation in vitro [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1452.
- [16] 吴建珊,吴东,陈江,等.高压氧对体外培养成骨细胞分化的影响[J].福建中医学院学报,2008,18(1):37-40.
- [17] 周延华,郑海锋,曾庆鑫,等.高压氧对脂肪干细胞成骨分化的影响[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2017,24(5): 365-369.
- [18] 席立成,李宏宇,赵子星,等.高压氧联合仙桃草饲喂治疗兔骨缺损效果观察[J].山东医药,2017,57(11):40-42.
- [19] LIN SS, UENG SW, NIU CC, et al. Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating wnt3a/ β -catenin signaling: an in vitro and vivo study [J]. Stem Cell Res, 2014, 12(1): 260-274.

(收稿日期:2022-02-23,修回日期:2022-04-12)