

• 基础研究 •

# 骨肉瘤多药耐药表型的分化特性及矛盾相关性分析

曾恒, 陈安民, 李锋, 杨彩虹

(华中科技大学同济医学院附属同济医院矫形外科, 湖北 武汉 430030)

**【摘要】** 目的:探讨肿瘤的多药耐药性和恶性程度的关系,主要研究骨肉瘤细胞在向耐药表型的转化过程中,是否出现如骨源性干细胞在成熟分化过程中相似的生物学行为,或者是更复杂的生物学表型。方法:采用不同表达程度 P-gp 的骨肉瘤耐药亚型细胞,并针对增殖、分化及转移关键性基因 Stathmin 及 VEGF,应用原位杂交和 RT-PCR 来衡量 Mdr1 同 Stathmin、VEGF 表达的相关性。结果:Mdr1/P<sub>170</sub> 表型的骨肉瘤细胞的碱性磷酸酶的活性明显高于亲本细胞,说明 Mdr 表型的骨肉瘤细胞出现了分化。INH 和 RT-PCR 结果揭示 Mdr1 mRNA 同 VEGF、Stathmin mRNA 表达呈负相关。结论:Mdr1/P<sub>170</sub> 的表达预示着骨肉瘤细胞向成熟状态分化,为研究 Mdr 及其逆转开拓了新的思路,为正确认识 P-gp 的功能提供了新的研究方法。

**【关键词】** 骨肉瘤; 多药耐药相关蛋白质类; 血管内皮生长因子

**Analysis of differentiation characters in osteosarcoma Mdr sublines** ZENG Heng, CHEN An-min, LI Feng, YANG Cai-hong. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital Affiliated of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

**OBSTRACT Objective:** To explore the relationship between multidrug resistance (Mdr) and malignancy. To observe whether P-glycoprotein (P-gp) overexpression had the same bioactivity as osteogenic stem cell turning into more mature cell or more complex phenotype when parent cell line turned to Mdr phenotype. **Methods:** Six cell sublines of Mdr phenotype with different expression degree were analyzed. Stathmin generally identified in malignancy cell and stem cell, was a microtubule associated protein and the signal of differentiation in osteogenic stem cell. RT-PCR and hybridization in situ were used to analyze the relationship between Mdr1 mRNA and expression of Stathmin mRNA and VEGF mRNA. **Results:** Morphological and functional analysis of Mdr phenotype showed the P-gp-positive cell lines were more differentiated than the parent cells in terms of enhanced activity of cellular alkaline phosphatase. These subclones all displayed a decrease in potential malignancy such as tumor growth rate and metastatic ability. A significant negative correlation could be identified between Mdr1 mRNA and expression of VEGF and Stathmin mRNA. **Conclusion:** Expression of Mdr1/P<sub>170</sub> indicated osteosarcoma cells differentiated towards more mature state, which will develop the new research field of Mdr and supply the new research method of the function of P-gp.

**Key words** Osteosarcoma; Multidrug resistance-associated proteins; Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(5):368-372 www.zggszz.com

现在骨肉瘤治疗的经典方式为原发灶的控制和综合应用抗癌药处理微小转移灶,而肿瘤细胞的耐药与否直接影响到患者的生存率。似乎存在着这样一种量效关系:Mdr 基因表达增高,患者的预后就向坏的方向转化。因而有人认为:Mdr 基因的表达增加是骨肉瘤恶性程度增高的一个显著性标志。然后在实验中人们发现耐药表型的骨肉瘤细胞在增殖能力、侵袭能力、转移能力等恶性特征方面相对于亲本细胞呈明显下降趋势<sup>[1]</sup>。针对这一现象我们设计了本实验,选择经典的耐药

机制 Mdr1/P<sub>170</sub> 作为骨肉瘤耐药表现的标志,选择 Stathmin 作为骨肉瘤分化增殖的标志性基因<sup>[2]</sup>。本实验的目的是观察骨肉瘤细胞转化为耐药细胞的过程中是否也出现如骨源性干细胞在成熟分化过程中相似的生物学行为,以论证骨肉瘤耐药表型同成熟分化之间的相关性。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和细胞** 人成骨肉瘤细胞系 MG-63(武汉大学中国典型培养生物馆藏中心)及其耐药表型 MG-63/R(由 MG-63 经 ADM 间断冲击法诱导产生)<sup>[2]</sup>,四甲基偶氮唑盐(MTT,华美生物工程公司),鼠抗人 P-gp(C219)单克隆抗体及地高辛标记的原位杂交试剂盒(购自博士德公司),IR1201

基金项目:科技部 973 课题子课题(编号:2002CB513107)

通讯作者:曾恒 Tel:027-83663532 E-mail:zengheng@hotmail.com

RNA 提取试剂盒(购自 GIBCOBRL 公司)。

**1.2 细胞系的选择及生长动力学测定** 6 种骨肉瘤耐药细胞系 MG-63/R<sub>1-6</sub>, 这些骨肉瘤细胞系亚克隆通过阿霉素间断冲击法筛选而来, 从阿霉素 ADM 为 0.01 μg/ml 起到 4 μg/ml 分为 6 个药物浓度梯度, 大剂量冲击处理骨肉瘤细胞, 将诱导过程中能在含 ADM 0.01、0.04、0.1、0.4、1.0、4.0 μg/ml 的培养基中稳定生长的细胞, 分别称为 MG-63/R<sub>1</sub>、MG-63/R<sub>2</sub>、MG-63/R<sub>3</sub>、MG-63/R<sub>4</sub>、MG-63/R<sub>5</sub>、MG-63/R<sub>6</sub><sup>[2]</sup>。

**1.3 P-gp 表达的鉴定及蛋白质斑迹法(Westernblot)** 提取细胞总蛋白制备样品<sup>[3]</sup>, 取上述药物作用后的细胞用 PBS 洗涤加入预冷的细胞裂解液, 冰上裂解 20 min, 离心, 取上清 751 分光光度计测蛋白含量, 并配置 SDS-PAGE 凝胶行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白质电转移和膜封闭, 封闭结束后, 加入用漂洗液稀释的抗 P-gp 抗体(购自晶美生物工程公司)(1:500)封口, 4℃孵育过夜。加入用漂洗液稀释的碱性磷酸酶标记的二抗(1:1 000), 37℃振荡 40 min, 大量 TBS 漂洗液洗膜 3 次, 各 10 min 避光用 BCIP:NBT:Buffer 为 140 ml:80 ml:10 ml, 显色 5~10 min。图像经 Uvgrab-itImagel 软件采集, Gelwords ID Advanced V 4.01 软件处理分析。

**1.4 原位杂交分析** Mdr mRNA, Stathmin mRNA 及 VEGF mRNA 的原位杂交试剂盒均购自博士德公司, 一般操作程序如下: 标记探针用 3'端加尾法, 标记成功后行标记探针效率检测。组织切片附在 RNA 酶及渡膜处理的玻片上, 多聚甲醛固定, 体积分数为 0.1% 的 DEPC 水处理, 按 1:100 浓度稀释探针进行杂交, 时间 24 h<sup>[4]</sup>。显色 4 h 后中性树脂或明胶封片, 封片前不复染。

对实验结果进行分析。半定量分析: 染色后光学显微镜下数 200 个有核细胞, 其中胞浆内棕黄色标记物着色者为阳性, 计算阳性细胞百分数。阳性细胞 ≥ 15 为该基因阳性, 否则为阴性。定量分析: 用 HPLAS-1000 型全自动彩色图像分析系统对原位杂交结果进行定量测定, 以平均光度作为量化指标。平均光度越大, 阳性反应生物染色强度越强。

**1.5 RT-PCR 分析**

**1.5.1 提取细胞总 RNA 制备样品** IRI201 RNA 提取试剂盒(购自 GIBCOBRL 公司)。用 751 分光光度计在 260 nm 处测定 RNA 含量。

**1.5.2 引物的序列及所扩增 BP 产物** 引物设计采用 Primer 1.0 软件设计。

actin: 5'-ATGATGATATCGCCGCGCTC-3' Bp-pos: 78 5'-TCACCGGAGTCCATCAGAT-3' Bp-pos: 543 扩增片段长度为 465 bp; VEGF: 5'-CCTCTTGGAAATTGGATTTCGC-3' Bp-pos: 242 5'-CAACTCAAGTCCACAGCAGT-3' Bp-pos: 501 扩增片段长度为 259 bp; Mdr: 5'-CTGGACTTCTCTCATGATG-3' Bp-pos: 307 5'-CTAATTGCTGCCAAGACCTC-3' Bp-pos: 904 扩增片段长度为 597 bp; Stathmin: 5'-CTGAGGTCTTGAAGCAGCTG-3' Bp-pos: 289 5'-CACCAACAGCACTGTGCAGT-3' Bp-pos: 994, 扩增片段长度为 705 bp。

**1.5.3 结果采集** 应用 3% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察, Marker 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000。图像经 Uvgrab-itImagel 软件采集, Gelwords ID Advanced V 4.01 软件处理分

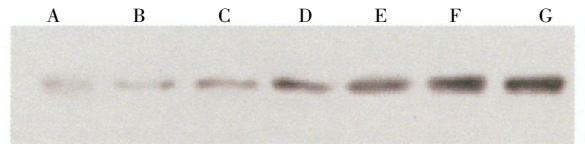
析。相对表达率=实验灰度值/内参灰度值。

**1.6 细胞的碱性磷酸酶活性鉴定** 细胞用胰酶消化后, 重悬于 10 mmol/L Tris·HCl (pH 7.4 含 1 mmol/L KCL、30 mmol/L ZnCl<sub>2</sub>), 0.1% TritonX-100, 超声破膜 30 s, 后将处理液 4℃ 8 000 r/min 离心后, 用 Lowry 法检测 ALP 活性, 并双宿豚法检测蛋白含量, 单位为 μmol·min<sup>-1</sup>·ng<sup>-1</sup> protein。

**1.7 统计学处理** 用 SPSS 10.0 统计软件计算, 计量资料组间比较用 t 检验, 计数资料两组间比较用 χ<sup>2</sup> 检验和等级相关分析法(Pearson 法)。

**2 结果**

**2.1 蛋白质斑迹法分析结果同耐药程度比较** Westernblot 分析可见, MG-63, MG-63/R<sub>1-6</sub>, Mdr 表达产物 P<sub>170</sub> 依次表达增加(见图 1), 随着 P<sub>170</sub> 的表达增强, 其对 ADM 的耐药性显著增加, MG-63 对阿霉素的耐药性同 P<sub>170</sub> 的表达呈高度相关 (P<0.05)(见表 1)。耐药程度以 IC<sub>50</sub> 衡量, IC<sub>50</sub> 为 50% 的细胞被抑制时的药物浓度。耐药程度的变化以耐药倍数 RF 表示, RF=IC<sub>50</sub> 耐药细胞/IC<sub>50</sub> 亲本细胞。Westonblot 显示 P<sub>170</sub> 在多药耐药的发生上起着关键性作用(相关系数 R=0.98, P<0.01)。



A:MG-63 B:MG-63/R<sub>1</sub> C:MG-63/R<sub>2</sub> D:MG-63/R<sub>3</sub> E:MG-63/R<sub>4</sub> F:MG-63/R<sub>5</sub> G:MG-63/R<sub>6</sub>

图 1 Westernblot 分析 P<sub>170</sub> 表达变化情况

Fig.1 Representative Westernblots of P<sub>170</sub> extracts from severn osteosarcoma cell lines

表 1 IC<sub>50</sub> 值和 MG-63/R 对 ADM 的耐药倍数 (RF) 及 P<sub>170</sub> 的表达情况

Tab.1 IC<sub>50</sub> value and resistance multiple factor match to parent cell line and expression of P<sub>170</sub>

细胞	IC <sub>50</sub> 值 (μg/ml) <sup>a</sup>	对 ADM 增加的耐药倍数 (RF) <sup>b</sup>	P <sub>170</sub> 表达值 <sup>c</sup>
MG-63	0.13	1.0	4.20
MG-63/R <sub>1</sub>	0.21	1.6	5.30
MG-63/R <sub>2</sub>	0.63	4.8	13.80
MG-63/R <sub>3</sub>	1.54	11.8	44.60
MG-63/R <sub>4</sub>	4.30	33.0	78.37
MG-63/R <sub>5</sub>	6.40	49.2	110.58
MG-63/R <sub>6</sub>	9.30	71.5	130.34

注: a.细胞株生长 50% 受抑制所作用的药物浓度; b.相对于亲本细胞对 ADM 的耐药倍数; c.Westernblot 条带的灰度值, 相关系数 R=0.98, P<0.01

Note: a.IC<sub>50</sub>=the drug concentration yielding 50 percent growth inhibition; b.Resistance multiple factor match to parent cell line;c.Value of gray scale in Westenblot strap, correlation coefficient R=0.98, P<0.01

**2.2 原位杂交结果** 因为 MG-63 和 MG-63/R<sub>6</sub> 均为细胞系, 因此对细胞系的原位杂交结果只存在有或无及强度多少的问题, 因而半定量分析的可靠性更低一些, 因此本实验利用

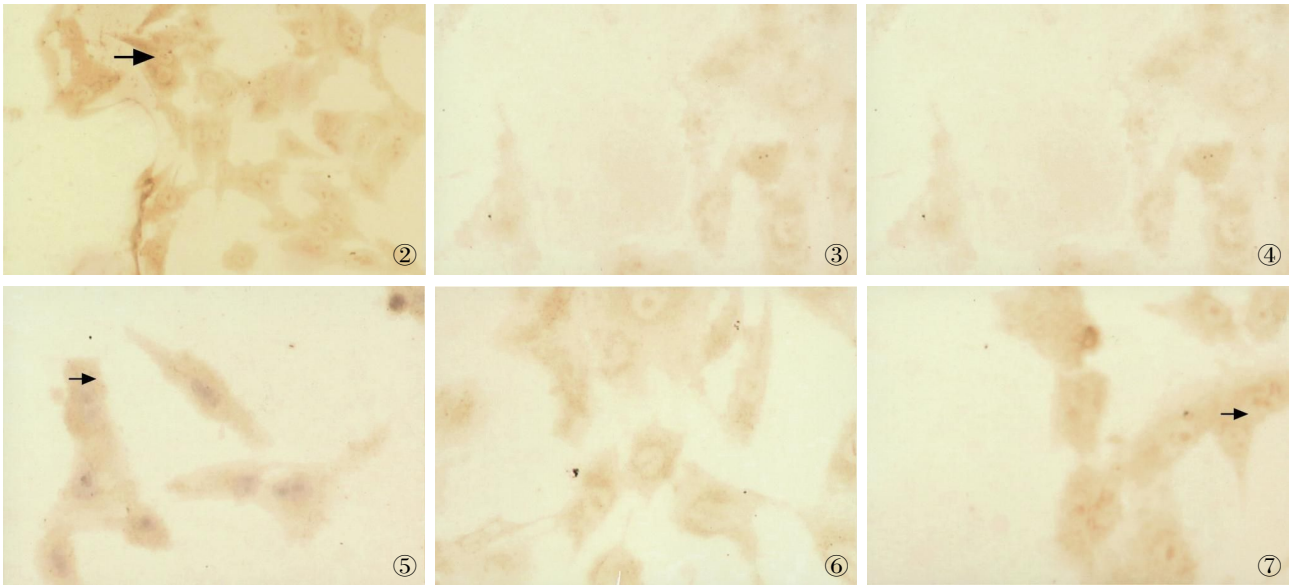


图 2 MG-63 中 VEGF mRNA 的表达可见核周有颗粒状棕黄, ISH×200 图 3 MG-63/R<sub>6</sub> 中 VEGF mRNA 的表达, ISH×200 图 4 MG-63 /R<sub>6</sub> 中 Stathmin mRNA 的表达, ISH×200 图 5 MG-63 核周有高 Stathmin mRNA 的表达, 核经苏木素复染, ISH×200 图 6 MG-63 中 Mdr mRNA 的表达, ISH×200 图 7 MG-63/R<sub>6</sub> 中 Mdr mRNA 的表达, ISH×200

Fig.2 The expression of VEGF mRNA detected by ISH. In parent cell line there were several buffy grana around nucleus, ISH×200 Fig.3 The expression of VEGF mRNA in resistance MG-63 subline, ISH×200 Fig.4 The expression of Stathmin mRNA in resistance MG-63 subline, ISH×200 Fig.5 Overexpression of Stathmin mRNA was in MG-63 parent line around nucleus. The nucleus was after stained by hematoxylin, ISH×200 Fig.6 The expression of Mdr mRNA detected by ISH×200 Fig.7 The expression of Mdr mRNA in resistance MG-63 subline, ISH×200

HPLAS-1000 型全自动医学彩色图像分析系统进行定量分析, 原位杂交信号为棕黄色, 主要位于胞浆及核膜周围, 信号强的标本胞浆及胞核中均可见杂交信号。测 Mdr1 mRNA 的细胞片未复染, 核因此呈空泡状, 信号弱的标本, 仅在胞浆及核膜周边见淡黄色稀疏的微细颗粒(见图 2-7)。亲本细胞 MG-63, Mdr1、Stathmin, 两种细胞系每个基因进行比较, Mdr1:  $t=6.253, P<0.05$ ; Stathmin:  $t=7.234, P<0.05$ ; VEGF:  $t=8.315, P<0.05$ 。在亲本细胞同耐药细胞比较中, Mdr1 mRNA、Stathmin mRNA 及 VEGF mRNA 的差异有统计学意义, 且 Mdr 同 Stathmin 表达呈负相关 ( $r=-0.96, P<0.05$ ), Stathmin、VEGF 表达呈正相关 ( $r=0.955, P<0.05$ ) (见图 8)。

2.3 RT-PCR 结果 MG-63、MG-63/R<sub>3-6</sub> 均有 Mdr1、Stathmin 及 VEGF 表达, 经 32 个循环后产物上梯进行电泳, 结果

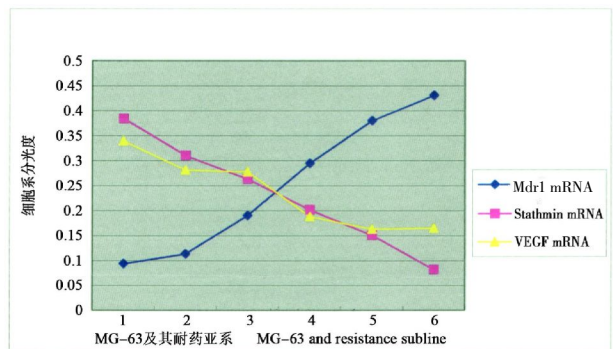


图 8 INH 检测 Mdr1 mRNA、Stathmin mRNA 及 VEGF mRNA 在亲本骨肉瘤细胞系及耐药细胞系中的表达

Fig.8 Expression of Mdr1 mRNA, Stathmin mRNA and VEGF mRNA

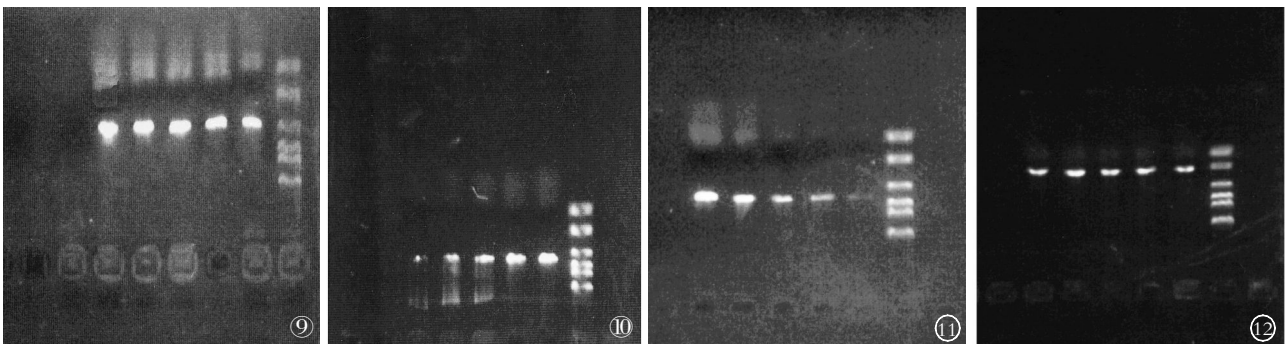


图 9 内参  $\beta$ -actin RT-PCR 图 10 Mdr mRNA RT-PCR 图 11 Stathmin mRNA RT-PCR 图 12 VEGF mRNA RT-PCR

Fig.9 Semiquantitative RT-PCR assays of the expression of marker genes  $\beta$ -actin Fig.10 Semiquantitative RT-PCR assays of the expression of Mdr mRNA Fig.11 Semiquantitative RT-PCR assays of the expression of Stathmin mRNA Fig.12 Semiquantitative RT-PCR assays of the expression of VEGF mRNA

表 2 RT-PCR 检测 Mdr1、Stathmin 及 VEGF 表达情况分析

Tab.2 Expression of Mdr1, Stathmin and VEGF

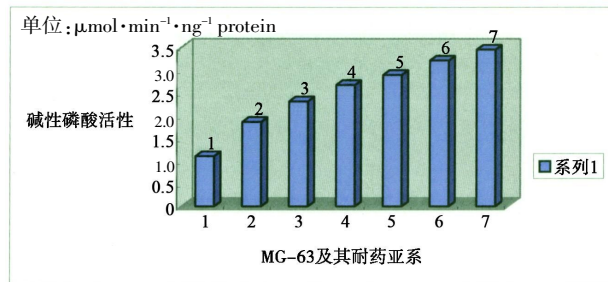
基因	MG-63		MG-63/R <sub>3</sub>		MG-63/R <sub>4</sub>		MG-63/R <sub>5</sub>		MG-63/R <sub>6</sub>	
	灰度值	表达率	灰度值	表达率	灰度值	表达率	灰度值	表达率	灰度值	表达率
内参 β <sub>2</sub> -m	134.2	-	142.8	-	143.6	-	145.8	-	146.2	-
Mdr1	66.1	0.50	102.3	0.71	113.8	0.79	124.5	0.85	138.6	0.95
Stathmin	143.2	1.06	139.8	0.98	110.5	0.77	98.4	0.67	86.5	0.59
VEGF	138.3	1.03	134.8	0.94	126.3	0.88	105.8	0.73	104.3	0.71

注: 表达率=所测基因灰度值/内参 β<sub>2</sub>-m 灰度值

Note: Expression rate = value of gray scale of the detected gene / value of gray scale of marker gene β<sub>2</sub>-m

见图 9-12, 从 MG-63 至 MG-63/R<sub>6</sub>, Mdr1 扩增带明显增亮, 而 Stathmin 明显减弱。用 Pearson 相关分析可见两者的表达呈负相关( $r_1 = -0.948, P < 0.05$ ), Mdr1 同 VEGF 的表达呈负相关( $r_2 = -0.944, P < 0.05$ ) (见表 2)。

2.4 碱性磷酸酶活性测定结果 MG-63 亲本细胞碱性磷酸酶活性明显低于耐药细胞亚系 (见图 13)。



1: MG-63 2: MG-63/R<sub>1</sub> 3: MG-63/R<sub>2</sub> 4: MG-63/R<sub>3</sub> 5: MG-63/R<sub>4</sub> 6: MG-63/R<sub>5</sub> 7: MG-63/R<sub>6</sub>

图 13 碱性磷酸酶活性测定

Fig.13 Alkaline phosphatase activities

3 讨论

P-gp 是 ATP 依赖的转运子超家族的一员 (ATP-binding cassette, ABC), 这些 ABC 转运子在不同的生物学行为中起着至关重要的作用, 如获取养分、排泄毒素复合物、分泌毒素、转运离子或多肽。而且这些超家族成员彼此间也存在着一些相关性, 如磺脲受体发生突变提示幼儿高胰岛素性低血糖症。而我们现在了解的关于 P-gp 的功能主要是多药耐药性<sup>[5]</sup>, 且存在着细胞有 P-gp 的表达就有 Mdr 表型存在这一相关现象。

在很多恶性肿瘤中均存在着高表达的 P-gp, 如果检测出 P-gp, 那就揭示着该肿瘤患者有一个较差的预后, 并且大多数肿瘤发现存在着 P-gp 时没有经过任何化疗药治疗。这一现象提示人们 Mdr1/P-gp 可能参与了肿瘤的生长、发育信号分子运动的过程。由于 Mdr1/P-gp 的表达揭示了一个不良的预后, 因而认为 Mdr1/P-gp 的表达预示着肿瘤更加恶性变<sup>[5]</sup>。然而很多实验发现 Mdr1/P-gp 的表达可导致肿瘤活性下降, 使肿瘤转向一种更加分化的表型。人们将 P-gp 转录入骨肉瘤细胞中发现存在着一种量效关系: P-gp 表达越高, 肿瘤更加良性化, 这一相互矛盾的观点, 提示需要更进一步的研究以探讨这一复杂的关系<sup>[6]</sup>。

本研究选择 Stathmin 作为分化的标志性基因, Stathmin 是一种保守的、普遍存在于细胞内的磷蛋白, 是细胞有丝分裂

中影响微管蛋白稳定性的关键因子, 也是细胞增殖的标志性因子, 在许多原始细胞中存在着高表达。特别是在骨源性干细胞中, 随着骨源性干细胞的分化, Stathmin 的表达渐次递减, Stathmin 表达的高低直接预示骨源性干细胞分化的程度<sup>[7]</sup>。而 VEGF 是血管内皮细胞的特异有丝分裂原, 最强的血管形成因子, 是恶性肿瘤生长及转移中起重要作用的因子<sup>[6,8]</sup>。因此本实验以 VEGF 做为衡量骨肉瘤转移能力变化的因子, 通过原位杂交和 RT-PCR 来观察 MG-63 在向耐药表型转化, 耐药程度不断增加的情况下, 是否分化程度越来越高。

原位杂交和 RT-PCR 结果显示 Stathmin 表达同 Mdr mRNA 表达呈负相关, 同 VEGF mRNA 表达呈正相关 ( $P < 0.05$ )。因此可以肯定骨肉瘤细胞在向耐药转化的过程中产生了分化, 也就是向良性转化。而且碱性磷酸酶的结果也证明骨肉瘤耐药表型产生了分化, 这些实验均证明了 Mdr1/P<sub>170</sub> 的表达同骨肉瘤恶性程度的降低存在着量效关系。

Mdr1/P<sub>170</sub> 不仅使癌细胞对多种彼此不相关的抗癌药产生耐药性, 而且可以通过多种彼此不相关的药物诱导产生翻译和表达。例如: 抗癌药、生长因子、分化诱导剂、肿瘤坏死因子等, 这也说明 Mdr1/P<sub>170</sub> 不仅仅只起耐药作用, 而且在多种生物学行为中产生作用<sup>[4,9]</sup>。而细胞的耐药不仅是单一因子产生作用的结果, 而是细胞内产生各种生理、生化的变化结果。这是一种状态, 一种有一定分化的耐药状态, 因为大多数抗癌药均是对增殖期的肿瘤细胞产生作用, 增殖能力越强杀瘤效果越好。而耐药细胞潜在的分化状态, 其增殖能力明显下降, 这恰恰可以逃避抗癌药的攻击。而且如果没有同抗癌药持续接触, Mdr1/P<sub>170</sub> 是呈下降趋势, 骨肉瘤细胞可能重新恢复活力, 因此临床上才出现患者术后无瘤生存很长时间, 局部又出现潜伏肉瘤细胞复发的现象。可以肯定 Mdr1/P<sub>170</sub> 是一种标志较低增殖能力并促分化的因子。

然而为什么会出现 Mdr1/P<sub>170</sub> 表达预测着肿瘤已向良性转化, 而临床预后很差的现象? 现在经典的治疗方案是新辅助化疗, 在充分切除肿瘤后, 肿瘤细胞的耐药性直接影响着患者的预后。有 Mdr1/P<sub>170</sub> 表达细胞影响其预后的不是肿瘤的侵袭及转移能力, 而是耐药细胞可以克服抗癌药的细胞毒作用, 因此找寻逆转 Mdr 的药物将是进一步研究的重点。

总之, Mdr1/P<sub>170</sub> 表达预示着骨肉瘤向成熟分化, 而这一分化状态是多种因素、多种分子生物学行为的结果。而 Mdr1/P<sub>170</sub> 除耐药以外的功能也值得进一步研究, 以了解骨肉瘤耐药表型的复杂生物学行为。

参考文献

- Manechez A, Collet B, Payen L, et al. Differentiation of the P-gp and Mrp1 multidrug resistance systems by mobile lipid 1H-NMR spectroscopy and phosphatidylserine externalization. *Anticancer Res*, 2001, 21(6A):3915-3919.
- 曾恒, 陈安民, 杨彩虹. 阿霉素冲击诱导人骨肉瘤多药耐药试验细胞模型. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11(5):385-387.
- Burak Z, Ersoy O, Moretti JL, et al. The role of <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigraphy in the assessment of Mdr1 overexpression in patients with musculoskeletal sarcomas; comparison with therapy response. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28(9):1341-1350.
- Conze D, Weiss L, Regan PS, et al. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*, 2001, 61(24):8851-8858.
- Roman RM, Lomiri N, Braunstein G, et al. Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability. *J Membr Biol*, 2001, 183:165-173.
- Park YB, Kim HS, Oh JH, et al. The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma. *Int Orthop*, 2001, 24(6):307-310.
- Hummert TW, Schwartz Z, Sylvia VL, et al. Stathmin levels in growth plate chondrocytes are modulated by vitamin D3 metabolites and transforming growth factor-beta1 and are associated with proliferation. *Endocrine*, 2001, 15(1):93-101.
- Bräuer AU, Savaskan NE, Plaschke M, et al. Perforant path lesion induces up-regulation of stathmin messenger RNA, but not SCG10 messenger RNA, in the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 2001, 102(3):515-526.
- Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Foth H, et al. Induction of mdr1b mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol*, 1998, 176:506-515.

(收稿日期:2007-07-26 本文编辑:王玉蔓)

·骨伤论坛·

小切口减张在小腿部骨折手术中应用

刘新功, 韩乙庭, 端木群力, 朱红, 黄东辉, 赵琦辉  
(杭州市第三人民医院, 浙江 杭州 310009)

关键词 骨折; 小腿; 小切口; 减压; 外科手术

Small incision decompression in surgical treatment of leg fracture LIU Xin-gong, HAN Yi-ting, DUAN-MU Qun-li, ZHU Hong, HUANG Dong-hui, ZHAO Qi-hui. The 3rd Peoples Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

Key words Fractures; Leg; Small incision; Decompression; Surgical procedures, operative

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(5):372-373 www.zggszz.com

小腿部骨折无论是闭合性还是开放性,手术后出现皮肤坏死、骨外露、骨不连、骨延迟愈合、钢板螺钉外露,继而感染、骨髓炎等并发症发生率高,严重影响了治疗效果。怎样预防这些并发症的发生,是临床骨科医生一直所关注的课题。回顾性分析比较了2000年3月至2005年9月手术治疗小腿部骨折136例,其中2003年6月以前82例未应用小切口减张,从2003年6月以后54例应用小切口减张,发现并发症明显减少,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料与分组 本组共136例,其中减张组54例,男39例,女15例;年龄21~78岁,平均(50.6±2.9)岁;胫腓骨双骨折48例,踝部骨折6例;粉碎骨折29例;闭合骨折19例,开放骨折35例。开放伤按Gustilo分类:I型5例,II型18例,III A型8例,III B型4例。受伤至手术时间10~36h,平均(24.2±2.3)h,10h内24例,10~24h10例,25~36h20例;钢板螺钉内固定38例,交锁髓内钉内固定16例。未减张组82例,男58例,女24例;年龄25~73岁,平均(51.8±3.8)岁;胫腓骨双骨折68例,踝部骨折14例;粉碎性骨折53例;闭合

骨折33例,开放骨折49例。开放伤按Gustilo分类:I型11例,II型24例,III A型9例,III B型5例。受伤至手术时间10~36h,平均(26.1±3.3)h,其中10h内35例,10~24h21例,25~36h26例;其中钢板螺钉内固定51例,交锁髓内钉内固定31例。两组骨折分型、手术时间、性别、年龄经χ<sup>2</sup>或t检验,差异无统计学意义,具有可比性(P>0.05)。

1.2 治疗方法 未减张组,缝合皮肤后,常规放置引流皮片或引流管1根。减张组,缝合皮肤后,根据皮肤紧张程度,于手术切口两侧做数行纵行小切口,小切口长0.5~1cm,达筋膜层并切开筋膜;间距约1~2cm,行距1.5cm左右。并各选几个小切口内放置引流皮片,以充分引流减压。典型病例见图1。

1.3 观察项目 手术后对发生张力性水疱情况及皮肤坏死、创口感染、钢板外露、骨髓炎等并发症进行了统计观察并详细记录。

1.4 统计学处理 计数资料以频数或率表示,采用两样本χ<sup>2</sup>检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

两组术后发生张力性水疱,未减张组发生率明显高于减