

The Healing Effect of Nitrogen on Wistar Rats Femoral Oblique Fracture

Gongjian Zhang¹, Lele Dong²

¹Graduate School of Baotou Medical College, Baotou Inner Mongolia

²The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou Inner Mongolia

Email: 41856988@qq.com

Received: Apr. 7th, 2015; accepted: Apr. 23rd, 2015; published: Apr. 30th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: Using the treatment of low temperature and frozen in liquid nitrogen from the 6-week-old normal Wistar rat femur bone in experimental 20 min upper intercept, rapid recover bone block temperature from the conventional disinfection, after reset, to observe the healing effect of nitrogen on Wistar rats femoral oblique fracture. **Methods:** Ten 6-week-old Wistar rats were randomly divided into two groups, group A had five Wistar rats that was blank control group, group B was an experimental group. By routine aseptic operation treatment of two groups of Wistar rat right hind femur, A group operation manufacturing oblique fracture model out fracture specimens were immersed in saline at 20 minutes after routine disinfection after the reduction, B group operation manufacturing oblique fracture specimens were frozen in liquid nitrogen removal at low temperature 20 minutes rapidly after 27°C of sterile saline after rewarming and after routine disinfection fracture reduction model. **Results:** Experimental study found that the experimental group, femoral specimens were reimplanted into Wistar rats, a few weeks after the observation of normal growth, the growth of the fracture line intact, and the blank control group growth recovery after statistical analysis; there was no significant difference or statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** Through the experimental study of liquid nitrogen freezing technology has no effect on the Wistar rats of normal bone fracture healing of normal growth, the future will be applied to the clinical treatment.

Keywords

Liquid Nitrogen, Liquid Nitrogen Freezing Technology, UMR-106, Wistar Rats, Animal Models of Osteosarcoma

液氮对Wistar大鼠股骨斜型骨折愈合的影响

张弓剑¹, 董乐乐²

¹包头医学院研究生院, 内蒙古 包头

²包头医学院第一附属医院, 内蒙古 包头

Email: 41856988@qq.com

收稿日期: 2015年4月7日; 录用日期: 2015年4月23日; 发布日期: 2015年4月30日

摘要

目的: 利用低温液氮冷冻处理从6周龄正常Wistar大鼠股骨中上段截取的实验骨块20 min后, 快速复温取下的骨块, 经过常规消毒处理复位, 观察低温液氮对Wistar大鼠股骨斜型骨折愈合的影响。**方法:** 6周龄Wistar大鼠10只随机分成两组, A组空白对照组5只, B组实验处理组。通过常规无菌手术处理两组Wistar大鼠右后肢股骨中上段, A组手术制造斜型骨折模型取出骨折标本进行生理盐水浸泡20 min处理后常规消毒后复位, B组手术制造斜型骨折模型取出骨折标本进行低温液氮冷冻处理20 min后迅速27℃无菌生理盐水复温后再常规消毒后复位。**结果:** 实验研究发现, 实验组的股骨实验标本回植到Wistar大鼠体内后, 数周后观察骨质正常生长, 骨折线生长完好, 与空白对照组生长恢复情况经过统计学分析, 无明显差别, 无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** 通过实验研究发现液氮冷冻技术对Wistar大鼠正常骨骨折愈合的正常生长无影响, 可以应用到未来临床研究。

关键词

液氮, 液氮冷冻技术, UMR-106, Wistar大鼠, 骨肉瘤动物模型

1. 冷冻技术在医学的发展历史

在临床上使用凝剂作用于组织细胞, 导致细胞破裂, 结晶, 脱水, 蛋白质变性, 酶活性受到抑制, 从而导致细胞的死亡, 此技术应用于临床病患的治疗中, 称为冷冻或冷冻手术治疗。

历史回顾。在 1945 年最早报告的是 Arnott 发明的冰盐水灌注器, 用于冻结病灶, 并起到镇痛, 止血效果。Oppenchowski 用乙醚冷冻治疗宫颈癌, 从而扩大了冷冻治疗技术的使用范围, 并创建了新冷冻治疗时代。1899 年 White 最早用液态空气冷凝剂, 与原来的棉签浸渍法和喷雾方法对各种疾病的治疗, 尤其是下肢的治疗, 冷冻外科揭开了序幕。冷冻治疗难治性溃疡。1927 年 Fay 结技术对复发乳腺癌和子宫颈癌的治疗。在 1961 年的液氮冷冻机的发明使用, 冷冻治疗被广泛使用。

最先将冷冻治疗引入骨科领域的是 Marcove [1]。一名 48 岁的男性肺癌患者, 有骨转移, 治疗 2 个疗程(共 4000Rads)放射治疗不能缓解其疼痛。Marcove 将液氮注入瘤腔内进行治疗后, 疼痛完全缓解。此后 Marcove [2] [3]等分别 1967 年、1968 年、1973 年、1978 年报告了液氮冷冻治疗骨肿瘤的大宗病例的随访结果。液氮冷冻治疗骨肿瘤, 显示液氮冷冻技术有良好的局部肿瘤控制, 而对骨与关节功能影响较小的作用, 从而奠定冷冻外科在骨肿瘤治疗中的地位。

冷冻有多种方法, 浸泡法主要是降温快、复温慢, 对细胞特别是肿瘤细胞有较强的杀灭作用。多数学者认为, 冷冻导致生物细胞死亡是冷冻生物学多种因素综合作用的结果。基本原理是利用低温杀灭肿瘤细胞。液氮所致的深冷可因脱水、水结晶后增加的细胞内电解质浓度、细胞膜的破裂、细胞膜蛋白质的变性及组织细胞离体后血流中断、缺氧崩解等, 均可导致细胞死亡。

随着医学发展的不断进步, 近年临床开始利用液氮技术制备各种模型[4] [5], 从而利于临床疾病的治疗发展, 还有学者利用液氮冷冻技术开始临床的治疗中, 陈丹宇利用液氮冷冻疗法治疗儿童牙髓疾病[6]。

2. 冷冻技术的机制

冷冻技术有多种方法, 浸渍法主要是快速降温和复温缓慢, 特别是对细胞具有杀伤肿瘤细胞的作用。目前, 大多数学者认为, 冷冻导致生物细胞死亡的冷冻生物学的多种因素综合作用的结果。其基本原理是低温杀死肿瘤细胞的使用。液氮低温可因脱水造成的, 水结晶细胞内电解质浓度增加, 细胞膜破裂, 细胞膜蛋白变性和体外组织细胞缺氧后流端, 解体, 从而导致细胞死亡。低温, 冷冻, 热熔胶是冷冻治疗的三个主要过程。冷冻技术是基于肿瘤组织快速冷冻和解冻导致肿瘤细胞损伤和死亡。目前世界上大多数学者认为对肿瘤细胞的冷冻保存的失效机理有四个方面: 1) 是冰晶体的理论, 在冷却过程中, 癌细胞逐渐失去生命活动所必需的热量, 导致停止所有的代谢反应。在“饥饿”状态的细胞, 冷冻水结晶肿瘤细胞内外冰晶形成, 切应力可以直接破坏肿瘤细胞和细胞膜[7], 在光学显微镜和透射电子显微镜实验可以看到冰伤害骨肉瘤细胞空泡。线粒体对温度变化非常敏感, 扩张和波峰出现在冷, 液化消失后开裂。线粒体是细胞氧化提供能量, 其破坏的主要部位, 是导致细胞死亡的重要因素。同时, 盐和剩余, 使细胞周围的环境成为高渗条件下的蛋白质组分, 渗透压和 pH 值, 微环境的变化, 最终导致肿瘤细胞萎缩, 细胞膜的损伤[8]。2) 免疫效果。临床实践证明, 许多肿瘤的冷冻损伤, 转移, 他们也会缩小或消失。不但如此, 异体肿瘤再接种也不会增长, 有可能是一个冰冻的免疫效果。其原理是: 一块冷冻再解冻后的组织, 同时在冻伤的细胞, 还可能导致新生血管(对比度烧伤不血管再生。当冷冻组织)。恢复血液循环, 理论上是接近受损细胞新生血管释放胞内产物可能进入血液循环, 有些产品可以被抗原能刺激抗体的产生在血液内的。这些抗体可以有效地抑制同种异基因肿瘤细胞的生长。能力的冷冻损伤机体产生抗体, 称为“冷冻免疫反应”。冷冻损伤范围大, 更多的产品发布的抗原性, 冷冻免疫反应更强。冷冻坏死更为严重, 更大的冷冻免疫反应。在体外实验肿瘤组织冷冻灭活, 因此不涉及身体的“冷冻免疫反应”。3) 微血管栓塞学说。冷冻引起的血管痉挛, 血管内皮的变化, 血小板微血栓形成, 血液有形成分的损伤和血栓的形成, 快速冷冻冰晶形成细胞壁穿孔, 微血管栓塞至肿瘤细胞缺血[9]。4) 是细胞凋亡的机制。一个区域中心的学者发现冻结在冷冻的细胞坏死的实验神经胶质瘤, 而周边区细胞凋亡, 和某些基因的过度表达可能与本实验通过骨肉瘤细胞冷冻在光学显微镜和透射电子显微镜对细胞凋亡和坏死现象, 灭活后发现, 支持上述机制。解释冷冻对骨肉瘤细胞的杀伤作用同时包含物理, 化学因素引起的细胞坏死, 与肿瘤细胞凋亡机制参与。当液氮肿瘤细胞, 使细胞坏死周边区发生在很短的时间, 中心区的核酸酶诱导肿瘤细胞的活化, 核小体 DNA 断裂成小片段, Bax, Fas 诱导, 在 Rb 基因的表达, 而引发凋亡油[10] [11]。Nagle [12]等认为认为, 冻结引起凋亡的微管和微丝细胞骨架降解, 而 Burton 认为冷冻后释放的氧自由基也可诱导细胞凋亡, 表现为延迟细胞的杀伤作用。

一般来说, 肿瘤细胞比正常细胞更为敏感冻结。这种方法能使病骨连同肿瘤一起灭活而保留骨的连续性。只要适当的病例选择, 手术无肿瘤及术后化疗正确的基本合理, 疗效好, 既能保留肢体和关节功能的完整性更好。在我国目前有骨假体置换术中普遍使用的保留的情况下无条件的肢体, 骨病灭活更换假体置换是一种较好的操作。弧后残余肿瘤细胞坏死可以提高人体的抗肿瘤免疫能力的活。但是冷冻技术也有它的自身的缺点, 如果肿瘤侵蚀破坏正常的骨, 冷冻前和肿瘤彻底刮除, 并冻结可能引起断裂, 此时应以骨水泥或钢绞线加固。冷冻切口一旦感染后, 术后要用大量广谱抗菌素预防。

3. 试验方法的建立

3.1. 实验动物

Wistar 大鼠 20 只, 雄性 6 周龄, 体质量 60~100 g, 由内蒙古医科大学动物实验中心购买, 鼠粮 50 KG 由内蒙古医科大学动物实验中心购买。Wistar 大鼠饲养于内蒙古包头医学院第一附属医院动物实验中心, 每两天更换食用水、饲料和保持卫生清洁。

3.2. 脱毛剂的配制及方法

1) 利用化学方法对实验老鼠进行脱毛处理：用化学药品脱去实验动物的被毛。首先将被毛剪短，然后用棉球蘸取脱毛剂，在所需部位涂一薄层，2~3 分钟后用温水洗去脱落的被毛，用纱布擦干，再涂一层油脂即可。

2) ① 硫化钠 3 g，肥皂粉 1 g，淀粉 7 g，加适量水调成糊状；② 硫化钠 8 g，淀粉 7 g，糖 4 g，甘油 5 g，硼砂 1 g，加水 75 ml；③ 硫化钠 8 g 溶于 100 ml 水中。

3.3. 实验动物的麻醉

常规手术前准备，严格按照无菌操，取出避光储存的 10% 的水合氯醛溶液，用一次性注射器 1 ml 按照给予大鼠计量进行腹腔注射(0.3 ml/100g)，将 Wistar 大鼠腹腔注射麻醉后，观察 1 分钟开始后实验 Wistar 大鼠出现步态不稳，3 分钟后，实验 Wistar 大鼠进入麻醉状态，用自作细绳将实验 Wistar 大鼠四肢固定(仰卧)于固定板上(固定板为自制长条形木板，长 20 cm，宽 10 cm，厚 0.5 cm，其四角各钻有一个小孔用于系细绳)。用眼科弯剪将→后下肢毛发备皮处理后，再用准备好的脱毛剂处理皮毛。处理完毕后，将进行手术视野常规无菌消毒处理。

3.4. 实验动物手术

无菌操作制作，手术解剖麻醉好的实验 Wistar 大鼠 10 只，A 组 5 只按照标号分别处置，选择其右后肢股骨中段，利用手术器械将其右后肢股骨中段骨质折断，取出骨块进行生理盐水浸泡 20 分钟，此间麻醉的实验鼠伤口表面用沾有生理盐水的无菌纱布覆盖表面，保护创口。B 组 5 只按照标号分别处置，选择其右后肢股骨中段，利用手术器械将其右后肢股骨中段骨质折断，取出骨块进行深低温液氮浸泡 20 分钟后，取出浸泡在液氮罐内的浸泡骨块，在投入 27 摄氏度无菌生理盐水复温处理，此间麻醉的实验鼠伤口表面用沾有生理盐水的无菌纱布覆盖表面，保护创口。再将两组组骨块按照无菌手术处理原则处置后，复位各组实验鼠，模拟接骨手术毕，伤口用红霉素软膏涂抹表皮伤口，外用夹板固定。放回原饲养笼喂养，观察。

4. 实验结果与分析

经过对大鼠的术后第 4 周，第 6 周，第 8 周的观察，如表 1 数据发现，经过表 2，表 3 的统计学分

Table 1. A group and B group after 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks of observation

表 1. A 组与 B 组术后 4 周，6 周，8 周观察

组别	术后是否有无骨痂形成		
	4 周	6 周	8 周
A1	有	有	有
A2	无	有	有
A3	无	无	无
A4	有	有	有
A5	有	有	有
B1	无	无	有
B2	有	有	有
B3	有	有	有
B4	有	有	有
B5	无	有	有

Table 2. A group and B group statistically analyzed one
表 2. A 组与 B 组术统计学分析 1

组别	是否骨痂形成		X ²	P
	有	无		
A	11	4	0.186	0.666
B	12	3		

Table 3. A group and B group statistically analyzed two
表 3. A 组与 B 组术统计学分析 2

组别	$\bar{x} \pm s$	T	P
A	2.3222 ± 0.0741	-1.210	0.236
B	2.3635 ± 0.1093		

析, A 组与 B 组中骨折的生长情况基本相似, 无大差别, 经过统计学的相关分析实验研究发现, 实验组的股骨实验标本回植到 Wistar 大鼠体内后, 数周后观察骨质正常生长, 骨折线生长完好, 与空白对照组生长恢复情况经过统计学, 无明显差别, 无统计学意义($P > 0.05$)。

5. 讨论

本实验中住着模型选择股骨中段与纵轴成 45 度角的斜型骨折处理, 因为其骨折接触面大[13], 容易愈合, 减短实验操作时间, 在手术过程中, 利用手术器械制造骨折模型, 利用锯条在统一制造, 尽量避免骨折后所取骨块组织大小相仿, 从而减少误差率, 给实验创造条件。

通过本实验中 A, B 两组 6 周龄正常 Wistar 大鼠经过不同途径处理骨折骨块 8 周的喂养观察研究发现, 液氮浸泡 B 组对实验 Wistar 大鼠的骨折愈合时间与实验 A 组生理盐水浸泡对照组的实验 Wistar 大鼠的骨折愈合时间上未发现异常影响, 这对临床应用液氮冷冻技术治疗骨的相关性疾病提供有力的实验数据支持, 能否为临床上骨肉瘤的治疗在物理方法上的使用有一定的延展性。

参考文献 (References)

- [1] Marcove, A. (1982) 17-year review of cryosurgery in the treatment of bone tumors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **4**, 231-234.
- [2] Marcove, R.C. and Miller, T. (1967) The treatment of primary and metastatic localized bone tumors by cryosurgery. *Surgical Clinics of North America*, **49**, 421.
- [3] Marcove, R.C., Lyden, J., Huvos, A.G., et al. (1973) Giant cell tumors treated by cryosurgery: A report of twenty-five cases. *Bone and Joint Surgery*, **55**, 1633.
- [4] 周正丽, 张潜, 彭筋宸等 (2012) 液氮冷冻兔股骨头坏死模型制备新方法及其可靠性评价. *解剖学报*, **43**, 284-288.
- [5] 王鹏飞, 姜文学 (2014) 液氮型股骨头缺血坏死动物模型的研究进展. *中国矫形外科杂志*, **5**, 19.
- [6] 陈丹宇, 符起亚, 张旭凤等 (2013) 液氮冷冻疗法在儿童牙髓治疗中的临床应用. *海南医学*, **24**, 1759-1760.
- [7] Hixkey, C.H. (1973) Experience with closed cryosurgical technique. *Journal of Bone and Joint Surgery*, **58**, 735.
- [8] Hoffmann, N.E. (2002) The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*, **60**, 40-49.
- [9] Gao, D. and Critser, J.K. (2000) Mechanisms of cryoinjury in living cell. *Ilar Journal*, **41**, 187-196.
- [10] Hoffmann, N.E. (2001) Cryosurgery of normal and tumor tissue in the dorsal skin flap chamber: Part II—Injury response. *Journal of Biomechanical Engineering*, **123**, 310-316.
- [11] Murakami, M., Kondo, T., et al. (1997) Occurrence of apoptosis following cold injury-induced brain edema in mice. *Neuroscience*, **81**, 231-237.
- [12] Kane, D.J., Saratiaa, T.A., Antok, et al. (1993) Bcl-2 in hibitor of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, **262**, 1274.
- [13] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎 (2012) 实用骨科学. 人民军医出版社, 北京, 465-470.