

定量外固定器刚度对骨折愈合影响的组织学研究

张俊忠^{1△} 李振阳¹ 张鹏² 黎立² 王世立³

[摘要] 目的:探讨不同刚度外固定对骨折愈合的影响。方法:18 只健康雄性 SD 大鼠随机分为低刚度组和高刚度组,均行股骨干中段横行截骨,分别以自行设计的 18.5 N/mm(低刚度组)和 60.6 N/mm(高刚度组)刚度的外固定支架固定。术后 6 周一次性处死大鼠,对骨折愈合情况进行组织学观察。结果:高刚度组骨折愈合,新生骨痂连接骨折断端,骨痂中可见大量活跃的骨细胞;低刚度组大鼠股骨干均表现肥大性骨不连。1)在股骨干增粗处均是新生骨,骨细胞较多且活跃,表现膜内成骨;2)骨折端软骨内成骨为主;3)软骨成骨活跃,形成了明显的肥大区和成骨区,在与正常骨组织接触处形成了软骨成骨的骨痂组织。结论:肢体负荷与固定器刚度是调节骨折端稳定性的两个重要因素,稳定性决定着骨折愈合的形式和性质。因此,在固定器刚度不变的情况下,可以通过控制肢体负荷来调节骨折端的稳定性,从而调节骨折愈合过程。

[关键词] 骨折;外固定器;刚度;组织学;实验研究

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)01-0005-05

Histological Study of the Effect of Quantitative External Fixator Stiffness on Fracture Healing

ZHANG Junzhong^{1△} LI Zhenyang¹ ZHANG Peng² LI Li² WANG Shili³

¹Shandong University of TCM, Jinan 250014, China;

²The Hospital Affiliated to Shandong University of TCM, Jinan 250014, China;

³Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250014, China.

Abstract Objective: To explore the effect of different external fixation stiffness on fracture healing. **Methods:** All 18 healthy male SD rats were randomly divided into low stiffness and high stiffness group. Two groups were performed the middle femoral bone cutting. And they were fixed by different support of the self-designed 18.5 N/mm(low stiffness group) and 60.6 N/mm(high stiffness group) stiffness of external fixations respectively. Six weeks after the operation all rats were killed at once. To observe the histology of the fracture healing. **Results:** In the high stiffness group, new bone scabs link of fracture broken end, and bone scabs were visible in a large number of active bone cells, with the fracture healing. In the low stiffness group, the femoral shaft of rats were characterized by hypertrophic nonunion; 1) In the femoral enlargement were new bone, bone cells were more and active, and they were showed intramembranous ossification; 2) Fracture end was given priority to endochondral ossification; 3) The osteogenesis of cartilage was active, hypertrophy and ossification were formed obviously. The bone scab formed from the cartilage in contact with normal bone tissue. **Conclusion:** The physical load and stiffness of the fixator are two important factors which can regulate the stability of fracture end. Stability decided the modality and nature of fracture healing. Therefore, in the case of the same stiffness, we can regulate the stability of fracture site by controlling the body load, and we can regulate the process of fracture healing eventually.

Keywords: fracture; external fixator; stiffness; histology; experimental research

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373661)

山东省科技发展计划资助项目(2013G0021806)

¹ 山东中医药大学(济南, 250014)

² 山东中医药大学附属医院

³ 山东省医学科学院

△通信作者 E-mail: 13793188178@163.com

近年来的临床实践与实验研究均证明,在骨折愈合早期,骨折端适度的应力与微动能够募集更多数量的间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)并调控其分化的方向^[1,2],从而决定着骨折愈合的方式。

本研究依据大鼠生理状态下股骨应力数据,设计制作两种不同刚度的外固定支架,建立大鼠股骨骨折外固定支架固定模型,对骨折端在不同应力作用下的骨折愈合情况进行组织学观察研究,探讨在生理状态下外固定刚度与骨折愈合的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用健康雄性 SD 大鼠 18 只,体质量 250~300 g,由山东省医学科学院提供。

1.2 试剂和仪器

外固定支架由 4 枚钢针(选用意大利 Orphfix 产品)和固定钢针的两块横梁组成。钢针直径与股骨接触端为 0.6 mm(低刚度)和 1.2 mm(高刚度),另一端均为 1.2 mm。其中 1.2 mm(高刚度)股骨接触端有螺纹。外固定架横梁材料为高分子聚乙烯医用材料,其刚度、弹性、韧性均符合生物力学要求,且具有不遮挡 X 线的特性和牢固固定钢针的独特优势。外固定架长、宽、高分别为 20 mm、5.5 mm 及 6 mm,由 2 枚直径 2.6 mm 钛合金微型螺钉固定(钛合金螺钉购自强生公司)。采用微机控制电子万能试验机(济南华兴试验机有限公司生产,产品型号:WDW-50H,产品规格:50 kN)测试,低刚度和高刚度外固定架的刚度系数分别为 18.5 N/mm 和 60.6 N/mm(图 1)。

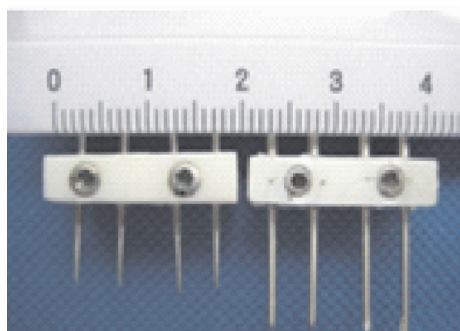


图 1 低刚度与高刚度外固定架

1.3 实验方法

1.3.1 分组方法 随机分为高刚度组 and 低刚度组,每组 9 只。

1.3.2 动物模型制作 大鼠称质量后戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,手术侧股骨去毛备皮。消毒铺巾,手术在严格无菌条件下进行。从股骨外侧切口,自外侧肌间隙暴露股骨,首先放置外固定支架,外固定支架自股骨小粗隆至股骨髁上跨越股骨全长。固定完成后,高刚度组和低刚度组大鼠均在内侧 2 个固定钢针之间用厚度 1 mm 的微锯横行切断股骨。冲洗切口,用可吸收线缝合肌肉组织,用不可吸收线缝合皮

肤。手术后第 3 天将大鼠的饮用水中加入镇痛药盐酸曲马多(12 mg/500 mL),手术前 30 min 及手术后第 3 天皮下注射克林霉素(45 mg/kg),防止细菌感染。手术完成后,即可让大鼠自由活动。标准鼠笼养,每笼 2 只,每天钢钉处皮肤常规消毒。

1.4 观察指标

1.4.1 大体观察 观察大鼠术后存活情况,切口及针道是否存在感染,外固定架固定是否可靠,观察大鼠双侧股骨干标本形态。

1.4.2 DR 片观察 在大鼠股骨骨折模型制作完成当日和 6 周后,各照射 1 次 DR 片,分别观察骨折对位和骨折愈合情况。

1.4.3 组织学观察 以大鼠股骨骨折端为中心截取 10 mm 骨折标本,用 10% 甲醛药液固定,脱钙液脱钙至松软,标本酒精脱水,二甲苯透明,Leica RM2245 型切片机(德国 Leica 公司生产)顺骨痂处股骨纵轴切片,制成 5 μ m 厚切片,苏木精-伊红染色,中性树胶封片,在光镜下行组织学观察。

1.4.4 健侧与模型侧骨质 CT 数测量 采用东芝 Aquilcom ONE 320 排 CT, KV80, mAs17, 周期 0.3 s。测量健侧股骨与造模侧股骨皮质和髓腔对应部位的 CT 数。

1.4.5 股骨干标本直径测量 用游标卡尺分别测量两组大鼠造模侧股骨干直径,每个股骨干测量 3 处,分别在中间骨痂最粗处和股骨干上、下四分之一处。

1.5 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 t 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

两组大鼠术后无死亡、无感染,1 周后均能正常行走,活动自如(图 2)。低刚度组大鼠股骨干均显著增粗,而且增粗的范围较大,约占股骨干长度的 2/3(图 3A)。高刚度组大鼠股骨干均骨性连接,但骨痂较少,较健侧股骨干直径无明显增粗,股骨干未见成角及其它移位(图 3B)。

2.2 DR 片观察

大鼠模型制作当日,两组 DR 片显示外固定架固定正确,骨折对位对线良好(图 4A, B)。6 周 DR 片显示,高刚度组骨痂较少,有连续性骨痂通过骨折线,骨折线模糊(图 4C)。低刚度组骨断端大量梭形骨痂,股骨干增粗明显,增粗长度约占全长的 2/3,但骨折间隙存在线状硬化带(图 4D)。



图 2 低刚度与高刚度大鼠股骨骨折外固定架固定模型

图 3 骨折 6 周低刚度固定且骨折侧与健侧骨干

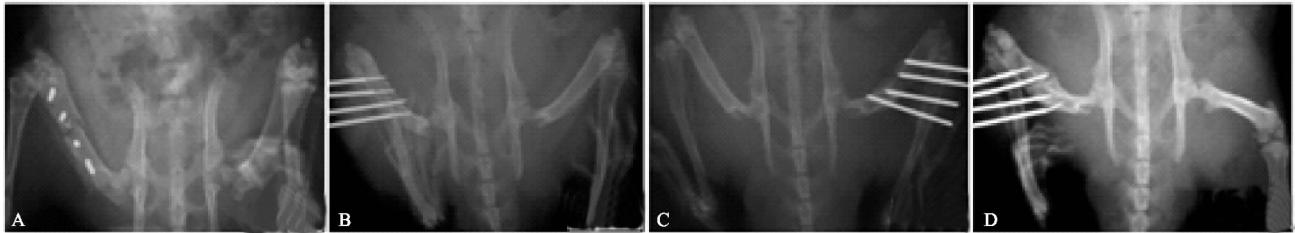
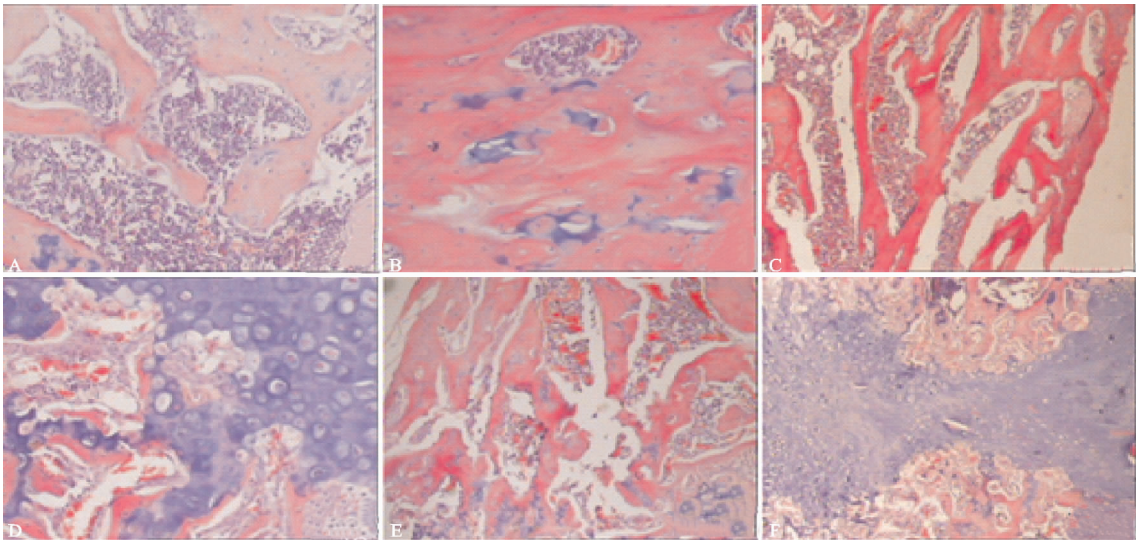


图 4 骨折日高刚度大鼠股骨骨折外固定模型 DR 片

2.3 组织学观察

术后 6 周,高刚度组骨折愈合,新生骨痂连接骨折断端,骨痂中可见沿轴向排列的骨痂和大量活跃的骨细胞(图 5A,B)。术后 6 周,低刚度组大鼠组织学表现较为丰富,大鼠股骨干均表现肥大性骨不连,组织切

片具有以下特点:1)在股骨干增粗处均是新生骨,骨细胞较多且活跃,表现膜内成骨(图 5C);2)骨折断端软骨内成骨为主,在与正常骨组织接触处形成了软骨成骨的骨痂组织(图 5D,E);3)骨折间隙软骨连接,有大量的软骨细胞(图 5F)。



A, B 骨折6周高刚度固定组骨折愈合,骨痂致密生长良好,骨细胞活跃(苏木精-伊红染色×4)
C 骨折6周低刚度固定组,骨折远端股骨干增粗处膜内成骨骨痂生长活跃,血运丰富(苏木精-伊红染色×4)
D 骨折6周低刚度固定组骨折端软骨成骨过程(苏木精-伊红染色×20)
E 骨折6周低刚度固定组骨折端软骨成骨过程(苏木精-伊红染色×4)
F 骨折6周低刚度固定组骨折端软骨链接,两端与软骨链接紧密,不同部位软骨宽度并不一致(苏木精-伊红染色×4)

图 5 组织学观察

2.4 健侧与模型侧骨质 CT 数比较

健侧与模型侧骨质 CT 数比较见表 1。

表 1 健侧与模型侧骨质 CT 数比较(±s)

组别	模型侧股骨		健侧股骨	
	股骨皮质	髓腔	股骨皮质	髓腔
高刚度组	3 256.3±205.4	217.5±82.9	5 079.3±124.7	52.6±10.2
低刚度组	2 314.3±196.7 ¹⁾	1 062.7±251.4 ¹⁾	5 333.5±311.2 ²⁾	56.1±12.5 ²⁾

注:与高刚度组比较 1) $t=9.937,P<0.05$;2) $t=9.937,P>0.05$ 。

2.5 股骨干标本直径测量

值比较见表 2。

两组大鼠骨痂最大直径及其同侧股骨干直径平均

表 2 两组大鼠股骨干骨髓最大直径与股骨干直径
平均值比较(±s)

组别	骨髓最大直径 (mm)	股骨干 3 处直径 平均值(mm)
高刚度组	4.3±0.1	4.5±0.1
低刚度组	7.6±0.2 ¹⁾	6.3±0.2 ²⁾

注:1)与高刚度组比较, $t=44.274, P<0.01$;2)与高刚度组比较, $t=44.274, P<0.05$.

3 讨论

骨折愈合是一项复杂的生物学修复过程,受多种因素影响,固定器的刚度与肢体负荷是调节骨折端力学环境最重要的可变要因素。骨折端力学环境对骨折端间 MSCs 募集、分化与成骨等促进骨折愈合的生物学反应发挥关键性作用^[3]。因此,如何利用固定器的刚度和肢体负荷获得有利于骨折愈合的力学环境,一直是研究人员关注的问题。

在骨折愈合中,骨折端主要依靠软骨内成骨完成愈合。软骨内成骨先由 MSCs 分化成软骨细胞,形成软骨组织,然后由软骨内成骨的骨组织逐渐取代软骨组织,最终完成骨化。因此,骨折端 MSCs 向软骨 F 细胞分化的数量是促进软骨内成骨重要的细胞学基础,而固定器刚度调控 MSCs 向软骨细胞分化和促进软骨内成骨是影响骨折愈合的关键因素。

3.1 骨折端应力与骨折愈合的关系

早在 19 世纪末,德国外科医生 Wolff 最早提出力学环境对骨骼的改建和维持起重要作用。随后一系列的实验研究和临床实践证明力学环境在骨折愈合中的重要地位。研究表明,高刚度的固定器械可以限制骨断端相对位移(Inter Fragmentary Movement, IFM)从而抑制骨痂形成;一定范围内的 IFM 能够促进骨痂形成;但是过量的 IFM 会抑制软骨骨痂矿化,甚至造成骨不连的发生^[4]。除了 IFM 的大小会影响骨痂形成外,IFM 相对于骨折断面的方向也是影响骨痂形成的重要因素。IFM 相对于骨折断面的方向主要有轴向挤压、轴向牵拉、侧向剪切和弯曲四种。研究证明轴向挤压负荷和环静水压力主要增加软骨的形成的几率^[5,6],轴向压力是促进骨折愈合的重要力学因素。Gupta 等^[7]研究表明大鼠自身体重 10%~30% 的轴向压力能有效地促进骨痂形成并加速软骨内成骨的过程;从而使骨折能够更快更好的愈合。施以自身体质量 1/3~1/2 轴向压力骨折愈合更快,但压力过大骨折成角的风险增大^[8]。同等大小的轴向牵拉方向的 IFM 则主要通过膜内成骨的方式促进骨折愈合^[9]。侧向剪切和弯曲的 IFM 抑制骨痂形成,降低骨折愈合组织的强度,延迟骨折愈合时间^[10]。有关研究表明较大的剪切应力适合 BMSCs 的内皮向分化^[11]。应变为在外力作用下,单位长度的材料所发生的形变,即 $\delta=\Delta L/L$,一般用百分比表示。不同组织在功能正常的状态下可耐受的应变范围不同,完整骨骼所能承受的

应变约为 2%(骨折发生前),肉芽组织所能承受的应变则可达到 100%。骨折愈合早期,骨折断端以血肿和肉芽组织为主,可承受较大范围的应变。随着软骨骨痂的形成和矿化,骨痂的应变逐渐减小,过大或过于频繁的应力会对骨折愈合造成极为不利的影响。

3.2 力学环境对 MSCs 的作用

鉴于骨折局部力学环境和 MSCs 对骨折愈合的重要意义,两者的相互作用近年来成为学者关注和亟待解决的科学问题。近年来的研究表明,骨细胞可以感受骨折端微动的刺激,增加骨细胞、成骨细胞等的代谢活性,促进骨的形成^[12]。体外研究发现, MSCs 的形态、培养基的硬度、液体流动、牵拉力、挤压力和静水压等都是影响 MSCs 分化方向的因素^[13]。在与骨基质硬度相当的培养基中, MSCs 呈成骨细胞样,且与骨形成相关的基因高表达;在与肌肉硬度相当的培养基中, MSCs 呈梭形,且与肌细胞分化相关的转录因子高表达^[14]。体内研究表明,骨断端适度的轴向挤压能有效地促进骨痂形成并加速软骨内成骨的过程,而同等大小的轴向牵拉力则主要通过膜内成骨的方式促进骨折愈合,与体外实验结果相符。

既往研究大多通过免疫组化等方法分析骨痂成分,了解骨折局部力学环境对 MSCs 分化方向的影响。以大鼠为例,骨折发生 3 d 内,骨折局部的 MSCs 即开始增殖和分化的过程,远早于大量骨痂形成的时间,骨折 20 d 后, MSCs 的增殖、分化基本停止。因此,通过分析骨痂成分研究 MSCs 的分化在时间上是滞后的,准确性尚有不足。有关骨折局部力学环境影响骨断端募集 MSCs 的研究刚起步,目前尚未形成统一认识,有待进一步研究。有研究表明较早的力学刺激可以增加骨断端 MSCs 募集的数量,而力学刺激的大小对骨断端募集 MSCs 的影响尚不明确。

3.3 大鼠骨折模型

大鼠骨折愈合过程的研究较为广泛,目前已较为明确。研究显示,大鼠骨折愈合速度较快,约是人类的 2 倍,愈合过程中各个时期所占时间均较短。骨折后 1 h 内,骨断端血肿形成,血小板释放 TGF- β 和 PDGF,炎症细胞释放多种炎症因子;24 h 内, MSCs 开始表达多种 BMPs;2~5 d, MSCs 即开始增殖和分化,骨膜下成骨启动;6~10 d,软骨骨痂开始形成;20 d 以后,细胞增殖基本结束,软骨内骨化启动,骨膜下成骨^[15]。骨折愈合中力学环境的研究主要以大鼠、家兔、羊等动物作为骨折模型,通过外固定架进行骨折固定。力学刺激的来源有两类,一类是使用振动装置给予振幅和频率明确的力学刺激,另一类是依靠动物体内环境产生的力学刺激,后一种方法比前者的优势在于能真实地模拟体内的力学环境。在以往研究中,人们以大鼠行走时地面的反作用力近似为作用于大鼠股骨上的力,此方法很不准确,原因如下:第一,大鼠行走时,作用于其股骨上的作用力主要来自两个方面,即

大鼠的重力和相关肌肉的收缩力,实验证明两者产生几乎同等重要的影响,而上述近似方法忽略了肌肉收缩力;第二,大鼠股骨与地面不是垂直关系,因此大鼠的重力只有一部分产生作用于其股骨的轴向压力,另一部分则产生以大鼠股骨头为转轴的力矩。由于影响因素复杂,使得如何准确测量大鼠行走时其股骨所承受的力成为学界的难题。令人欣喜的是,2010 年,德国生物力学专家使用现代数理方法得出,大鼠行走时其股骨上的轴向压力的最大值在近端股骨和远端股骨分别是大鼠体质量的 6.0 倍和 7.0 倍,而剪切力的最大值在近端股骨和远端股骨分别是大鼠体质量的 0.6 倍和 0.9 倍^[16]。这样一来,大鼠股骨骨折模型具有骨折愈合过程明确、骨折固定方法成熟、力学环境可定量、实验操作方便、遗传背景清楚等优势,成为研究骨折愈合的优秀模型,因此被本研究选择使用。根据大鼠行走时其股骨上的应力数据值,进一步结合文献有关微动大小、轴向压力值与骨折愈合关系的研究成果,研制了刚度值差别 3 倍以上的两种大鼠股骨外固定支架,这样才有可能明确刚度值对骨折愈合组织学变化的影响。本研究结果显示,高刚度组大鼠股骨骨折模型均达到了骨性连接,但骨痂较少,股骨干未见明显增粗,提示高刚度固定骨折端相对稳定。低刚度组大鼠股骨骨折模型出现了软骨连接,而骨折两端明显增粗,增粗的组织为典型的新生骨痂,表明低刚度固定骨折端稳定性较差,产生较大范围的微动。有关研究表明,微动刺激细胞不断分泌骨形态形成蛋白(BMP)向骨折两端扩散,BMP 局部高浓度不断促使 MSCs 和骨祖细胞增殖和分化,成骨细胞数量剧增,促进骨折愈合^[17,18]。但微动过大、过多会引起软骨连接或纤维连接。BMP 的这种局部高浓度效应已经引起人们的重视,为今后探索促进骨折愈合和治疗骨不连方法指明了方向^[19]。由此可以认为,低刚度组大鼠股骨骨折两端尤其是远端明显增粗的原因可能是 BMP 作用的结果。若适当增加低刚度外固定架的刚度或减少高刚度外固定架的刚度,骨折端在优良的应力环境中很好地完成软骨内成骨与膜内成骨过程,骨折就可以达到理想的二期愈合。三维 CT 检测骨折远端增粗部分的髓腔直径随着骨干增粗而增大,骨皮质并没有明显增厚,骨皮质内外 CT 数无明显差异,而与健侧同部位骨质 CT 数比较却有显著性差异,说明大鼠骨折愈合、骨塑形与重建的速度很快,在 6 周内就可以明显观察到它们的变化。在骨折治疗中,固定器刚度与肢体负荷是影响骨折端力学环境最重要的可变因素。因此,针对骨折治疗中固定器刚度不变的实际情况,只有通过控制肢体负荷才能调节骨折端力学环境,使其充分发挥促进骨折愈合的作用,减少骨折并发症的发生。

参考文献

[1] 李颖,黎立,李俊玲,等.力学环境对骨折早期骨折端间质干细胞募集的影响[J].国际骨科学杂志,2016,37(3):

198-202.

- [2] Liu M, Liu N, Zang R, et al. Engineering stem cell niches in bioreactors[J]. World J Stem Cells, 2013, 5(4): 124-135.
- [3] Hasenboehler E, Rikli D, Babst R. Locking compression plate with minimally invasive plate osteosynthesis in distal humeral and distal tibial fracture: a retrospective study of 32 patients[J]. Injury, 2007, 38(3): 365-370.
- [4] Gardner MJ, van der Meulen MC, Demetrakopoulos D, et al. In vivo cyclic axial compression affects bone healing in the mouse tibia [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2006, 24(8): 1679-1686.
- [5] Castillo AB, Jacobs CR. Mesenchymal stem cell mechanobiology[J]. Curr Osteoporos Rep, 2010, 8(2): 98.
- [6] Kelly D, Jacobs CR. The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cell[J]. Birth Defects Res, 2010, 90(1): 75-85.
- [7] Gupta RR, Kim H, Chan YK, et al. Axial strain enhances osteotomy repair with a concomitant increase in connexin43 expression[J]. Bone Res, 2015, 3(2): 83-91.
- [8] 宋文超,段宜强,尹培荣,等.可控性应力与微动对骨折愈合影响的组织学研究[J].中华创伤骨科杂志,2010,12(3):256-259.
- [9] Hente R, Füchtmeier B, Schlegel U, et al. The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibial fractures[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2004, 22(4): 709-715.
- [10] Augat P, Burger J, Schorlemmer S, et al. Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2003, 21(6): 1011-1017.
- [11] Yuan L, Sakamoto N, Song G, et al. High-level shear stress stimulates endothelial differentiation and VEGF secretion by human mesenchymal stem cells[J]. Cellular & Molecular Bioengineering, 2013, 6(2): 220-229.
- [12] 宋文超,张思森,陈勇,等.可控性应力与微动对骨折愈合影响的 CT 影像结果[J].中华创伤骨科杂志,2015,17(7):624-628.
- [13] Andrew J. Steward, Daniel J. Kelly. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation[J]. Journal of Anatomy, 2015, 227(6): 717.
- [14] McAndrews KM, McGrail DJ, Quach ND, et al. Spatially coordinated changes in intracellular rheology and extracellular force exertion during mesenchymal stem cell differentiation[J]. Phys Biol, 2014, 11(5): 056004.
- [15] Phillips A M. Overview of the fracture healing cascade[J]. Injury, 2005, 36(3): S5-S7.
- [16] Wehner T, Wolfram U, Henzler T, et al. Internal forces and moments in the femur of the rat during gait[J]. J Biomech, 2010, 43(13): 2473-2479.
- [17] Boerckel JD, Kolambkar Y, Stevens HY, et al. Effects of in vivo mechanical loading on large bone defect regeneration[J]. J Orthop Res, 2012, 30(7): 1067-1075.
- [18] Piatkowski K, Piekarczyk P, Kwiatkowski K, et al. Comparison of different locking plate fixation methods in distal tibia fractures[J]. Int Orthop, 2015, 39(11): 2245-2251.
- [19] 曾炳芳,康庆林.四肢骨不连外科学[M].北京:人民军医出版社,2010:23-25

(收稿日期:2017-06-11)