

• 实验研究 •

动态应力钢板与普通应力钢板对羊股骨干骨折愈合影响的实验研究

周纪平¹ 刘彬¹ 鞠海洋¹ 刘大山¹ 姜红江¹ 李佳佳¹ 谭远超^{1△}

[摘要] 目的:研究动态应力钢板与普通应力钢板对羊股骨干骨折愈合的影响。方法:择取 24 只山羊建造股骨干骨折模型,成功后随即分为动态应力钢板组(CO 组)和普通应力钢板组(AO 组),前者用 CO 钢板固定,后者用 AO 钢板固定,分别在术后 1,2 及 3 周取出造模股骨,进行免疫组化实验、RT-PCR 实验观测 I 型胶原蛋白的表达、电镜下观测成纤维细胞。结果:苏木精-伊红染色显示在 1 周后与 3 周后的时间节点上未能检测到 I 型胶原蛋白的 mRNA 的表达;2 周后 CO 组 I 型胶原蛋白的 mRNA 的表达优于 AO 组。RT-PCR 结果示普 AO 组的 I 型胶原蛋白表达在 1 周后要强于 CO 组;在 2 和 3 周后要弱于 CO 组。电镜下观察 1 周后 AO 组同 CO 组一样出现细胞核周围胞质增多,但是超微结构中没有线粒体出现,胶质纤丝的排列稀疏,总体上成纤维细胞没有 CO 组活跃;2 周后 AO 组细胞质的含量、核糖体、线粒体的数量均少于 CO 组;3 周后 CO 组细胞不再生长,成纤维细胞转变为纤维细胞,AO 组纵切面的细胞增生,细胞间充质增加。结论:应用动态应力钢板内固定治疗山羊股骨干骨折可以促进骨折断端血肿的机化吸收,加速成骨细胞的生长,减少骨折愈合的时间。

[关键词] RT-PCR; I 型胶原蛋白;成纤维细胞;动态应力钢板;骨折愈合;山羊

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)06-0006-05

Effect of Dynamic Stress Steel Plate and Ordinary Stress Plate on the Healing of Femoral Shaft Fracture

ZHOU Jiping¹ LIU Bin¹ JU Haiyang¹ LIU Dashan¹
JIANG Hongjiang¹ LI Jiajia¹ TAN Yuanchao^{1△}

¹Wendeng Orthopedic hospital, Weihai 264400, Shandong China.

Abstract Objective: To study the effect of dynamic stress plate and common stress plate on the healing of femoral shaft fracture. **Methods:** Twenty-four goats were chosen to build the femoral fracture model, after the success of randomly divided into dynamic stress plate group (Chinese osteosynthesis, CO group) and normal group (Association for the study of internal fixation, AO group), the former fixed with CO steel, the latter with AO plate fixation. The femur of the goats' model was taken out at 1, 2, and 3 weeks after the operation, and the expression of type I collagen was observed by immunohistochemistry and RT-PCR experiment. The fibroblasts were observed under the electron microscope. **Results:** HE staining showed that the expression of mRNA of type I collagen was not detected after 1 weeks and 3 weeks later. After 2 weeks, the expression of type I collagen mRNA in group CO was better than that in AO group. RT-PCR results showed that the expression of type I collagen in group AO was stronger than that in group CO at one-week point; and at 2 and 3-week point, the expression of collagen was weaker than that in group CO. At one-week point, AO group with CO group appeared around the nucleus cytoplasm increased and observed under electron microscope, but no mitochondria ultrastructure, sparse glial filament, the fibroblasts were not active in CO group; At 2-week point, the number of content of AO group of cytoplasmic ribosomes, mitochondria were less than CO group. After 3 weeks, the cells in group CO was no longer grew, and fibroblasts were transformed into fibroblasts. In group AO, cell proliferation and cell mesenchyme increased on the longitudinal side. **Conclusion:** The application of dynamic stress plate fixation in the treatment of goat femoral shaft fracture can promote the absorption of fracture and hematoma, accelerate the growth of osteoblasts, and reduce the time of fracture healing.

Keywords: RT-PCR; type I collagen; fibroblasts; dynamic stress plate; fracture healing; goats

1970 年代 AO^[1]学派渐渐发起并形成了完整的理

论体系,其理论依据为“借助牢固内固定先期纠正长骨干骨折的解剖和力学的连续性及完整性”。AO 理论数十年的临床实践带来了成功,然而同期也发现了一些严重的问题:某些患者依据 AO 的原理进行“牢固固定”,却不能愈合;相当大概率的骨折在愈合后取出固

定物后出现二次骨折。通过大量摸索,提出了应力遮挡概念和内固定物下皮质骨因血供毁损而出现哈佛系统加快修复的观点。在 AO 理论的基础上,渐渐演化出生物学为主的接骨学理论,即(Biological Osteosynthesis)BO 理论,其以生物力学为主即充分保护局部血运、牢固固定而不加压。BO 针对 AO 出现的缺点加以修正、改进,其可以最大限度保护骨折端及周围血运,为骨折愈合提供良好环境^[2]。BO 仍然属于坚强固定的范畴,骨折断端的坚强固定破坏了骨折愈合的正常生物学过程,影响了骨的自身修复能力。为了解决坚强内固定带来的不利影响,在 BO 基础上出现了中国接骨学,即 CO 理论,其以“筋骨并重、动静结合”为指导原则,利用现代科技技术,把小夹板固定从皮肤外面移植到骨折部位^[3],研究设计了动态应力钢板(CO 钢板)。本研究通过动物试验来验证 CO 钢板固定治疗骨折的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成熟体健山羊 24 只,公母各半,羊龄平均 1.5 岁,体质量 (17.0 ± 1.0) kg,普通豢养,由泰安医学院动物实验中心供应。

1.2 实验钢板

钢板型号为 TC4-09051402 和 TC26-09081204 两种,螺钉规格是 $\Phi 3.5 \times 24$,两种钢板均由山东文登整骨医院科技有限公司供应。

1.3 实验药物及试剂

多聚赖氨酸、戊二醛、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)戊巴比妥钠、饿酸、蛋白酶 K,美国 Sigma 公司。反转录试剂盒、琼脂糖,上海 Invitrogen 公司。免疫荧光染色试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司。DAB 显色试剂盒,武汉博士得生物公司。阿托品注射液、PBS 溶液、梯度酒精、酒精灯、福尔马林溶液、固定液、线锯、苏木精-伊红染色试剂、纯净水、电镜液试剂。

1.4 实验仪器

GEL DOC 2000 电泳凝胶成像分析系统,美国 Bio Rod 公司。CM1900 型 LEICE 冰冻切片机、RM2145 型 LEICE 石蜡切片机,德国 LEICE 公司。3K30 超速低温离心机,德国 Sigma 公司。MIUI-Q 超纯水系统,法国 Millipore 公司。日本投射电子显微镜、Cx21FSI 光学显微镜,日本 OLIMPUS 公司。MDF-382E 型 -80°C 超低温冰箱,日本三株氏会社。JGL-16G 型离心机、TDL-5 型离心机、TGL-16C 台式离心机,上海安亭科学仪器厂生产。AUP-1-150G-01 型 Aquapro 实验室标准级专用逆渗透超纯化水机、BCD-27B 海尔普通冰箱,青岛海尔家用电器有限公司。BCM-1000 超净工作台,苏州净化设备有限公司。WGP-500 隔水式电热恒温培养箱、DL-210BS 电热恒温干燥箱,天津中环仪器有限公司。日本产微波炉,芬兰产微量移液器若干。DPX-L 型双能 X 线骨密度仪、WDW301 微机控制电子万能材料试验机,美国 LU-

NAR 公司。

1.5 方法

1.5.1 建模方法 术前 24 h 禁食,统一选取右上肢,取臀部至膝关节下范围备皮,3%戊巴比妥钠 1 mg/kg 静脉麻醉,麻醉深度合适,根据 0.04 mg/kg 的剂量前 30 min 给予阿托品术,常规手术消毒,铺无菌巾,全部流程严格按照骨科常规手术操作规则进行,切皮,沿筋膜间隙剥离,充分露出山羊股骨,在靠近膝关节处,股骨干下方有一条滋养动脉,应结扎后分离股骨,否则出血很多,影响预后。分离股骨与肌肉后,不剥离骨膜,用线锯在股骨的中上 1/3 处横行截断股骨,造成股骨干骨折,两断端中间留 3 mm 间隙。

1.5.2 分组方法 将山羊编号,随机分为两组,每组 12 只,相同环境下饲养,分 3 次进行建模,每次每组 4 只,时间分别为第 1 天,第 8 天,第 15 天,第 22 天统一处死。

1.5.3 干预方法 建模成功后分别植入不同内固定钢板,术中静脉给 0.9%氯化钠注射液 500 mL、5%葡萄糖注射液 500 mL、维生素 B6 注射液 0.2 g、维生素 C 注射液 1 g,术后静脉注射五水头孢唑啉钠 2.0 g 一次,按时饲养,勤换饮水,伤口均 I/甲级愈合,待去除钢板后取股骨断端部分组织,分别做免疫组化实验、RT-PCR 实验、电镜观察等。

1.5.4 标本制作方法

1.5.4.1 免疫组化:1)脱水、透明、包埋。将修成小块的组织放入脱水盒,依次放入梯度酒精浓度由低到高各 30 min;二甲苯 I、二甲苯 II 透明各 30 min;进行石蜡包埋。2)切片。在美国 AO 公司生产的 Microbome 轮片式切片机制备 4 μm 切片。3)铺片。在美国 AO 公司生产的 Rdtary 铺片机进行铺片,水温 40°C ,烘干槽 60°C 。4)苏木精-伊红染色。病理切片放入二甲苯 I 及 II 各 20 min;100%酒精 I 及 II 各 10 min;95%酒精 1 min;90%酒精 1 min;80%酒精 1 min;70%酒精 1 min;自来水流水冲洗 5~10 min;盐酸酒精分化 10 s;自来水返蓝 20 min 或过夜;蒸馏水清洗数分钟;0.5%伊红染色 1~5 min;蒸馏水快速清洗切片;80%酒精 15 s;95%酒精 15 s;100%酒精 I 30 s;100%酒精 II 1~5 min;二甲苯 I 5 min;二甲苯 II 5 min,中性树胶封片。

1.5.4.2 免疫组化显色过程观察 I 型胶原的 mRNA 表达:1)石蜡切片放入 60°C 的烘箱中静置 5~6 min。2)切片常规脱蜡至水。3)3%双氧水去离子水孵育 10~15 min,以消除内源性过氧化物酶活性。4)滴加试剂 A(蓝色液体)室温孵育 10~15 min,倾去,勿洗。5)滴加适当稀释的一抗(骨钙素), 37°C 孵育 2~3 h 或 4°C 过夜。6)PBS 冲洗,3 min \times 3 次。7)滴加试剂 B(黄色液体)室温孵育 10~15 min,PBS 冲洗,3 min \times 3 次。8)滴加试剂 C(橙色液体)室温孵育 10~15 min,PBS 冲洗,3 min \times 3 次。9)显色剂显色,自来水充分冲洗,苏木精复染,脱水、透明、封片。

1.5.4.3 RT-PCR 观测 I 型胶原的 mRNA 表达: 截取的组织在液氮中研磨, 匀浆, 在 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按 1:5 比例加入氯仿, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 取水相部分, 加入 0.5 倍体积的无水乙醇, 转入新的吸附柱中 4 °C 12 000 r/min 离心 30 s, 去掉废液, 加入 500 μ L 去蛋白液, 4 °C 12 000 r/min 离心 30 s, 去掉废液, 加入 700 μ L 漂洗液, 离心, 祛除残余液体, 加入 50 μ L RNase-free ddH₂O, 室温放置, 离心后加入 2 μ L oligo(dt), 2 μ L dNTP, 然后加入 4 μ L 5 \times First-strand Buffer, 0.5 μ L RNasin, 然后进行 PCR 扩增, 扩增之前先测循环数, 最后用 2% 琼脂糖跑电泳。操作 RNA 抽提后, RNA 纯度及浓度测定, 逆转录-聚合酶链式反应, PCR 反应条件: 95 °C, 4 min, 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; 72 °C, 5 s; 4 °C, 共 38 个循环。

1.5.4.4 电镜观察成纤维细胞的生长状况: 处死动物后的数分钟取骨折断端组织, 组织块要小 (1 mm³ 以内), 用戊二醛和锇酸进行双重固定, 送山东农业大学, 树脂包埋, 用特制的超薄切片机切成超薄切片, 再经醋酸铀和柠檬酸铅等进行电子染色, 最后观察成纤维细

胞的生长发育情况。

1.6 实验观察指标

苏木精-伊红染色观察骨折断端骨折愈合情况, 免疫组化观察骨折断端 I 型胶原蛋白的 mRNA 的表达, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 观察骨折断端 I 型胶原蛋白的 mRNA 的表达, 电镜下观察成纤维细胞的生长状况。

2 结果

免疫组化观测见图 1, A1 CO 组 I 型胶原蛋白及 B1 AO 钢板组 I 型胶原蛋白 mRNA 的表达如箭头所指, CO 组 I 型胶原蛋白的 mRNA 含量要高于 AO 组。

RT-PCR 的结果见图 2, A2 随机选择样本, 进行测序实验, 循环数分别定位 30, 32, 34, 36, 38 及 40, 从结果看, 选择 38 个循环 (MRNA 表达最好) 作为接下来实验的循环数。B2 内参的设计与实验, 内参选择人的 β -actin, 长度 144 bp, 随机选择样本, 进行电泳, 内参表达均可。C2 在循环数与内参设计好以后人的胶原 Collagen I (COL1A2), 对两组 22 个标本进行 MRNA 的检测, 第 1 周两组均有表达, 在第 2 周与第 3 周 AO 组均低于 CO 组的表达。

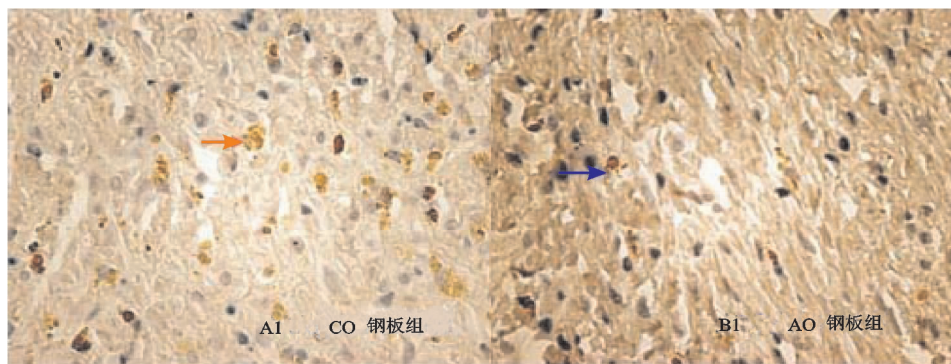


图 1 免疫组化观测 (200 \times)

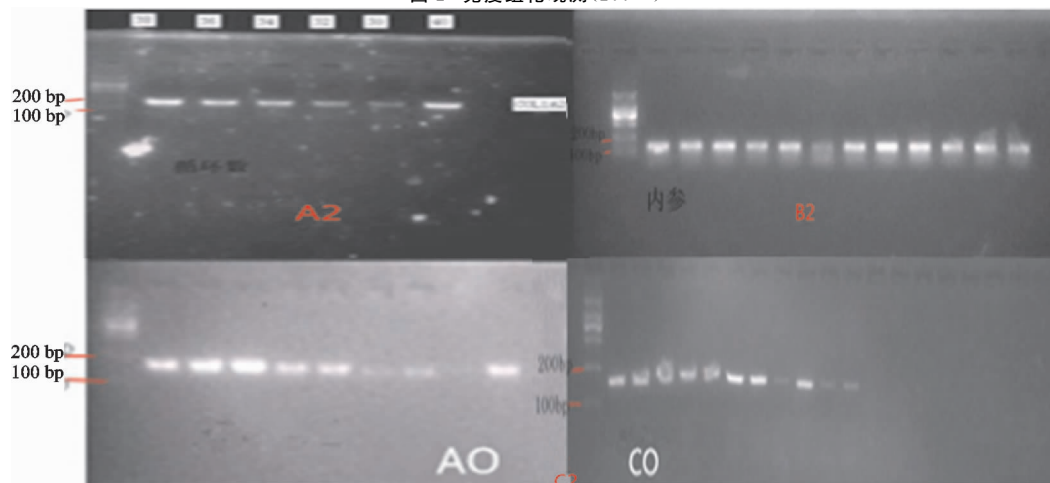


图 2 RT-PCR 结果

电镜下观察结果见图 3-5。A3 CO 组 1 周后取材电镜下见 CO 组成纤维细胞形态产生变化, 遭受应力刺激后由静止形态向幼稚成纤维细胞改变, 细胞增加, 细胞间充质含量增长, 超微结构线粒体出现 (箭头所指), 核糖体也出现, 表明成纤维细胞活跃, 表明其具有合成和分泌蛋白质的功能, 周围纤维排布渐

渐增加, 表明成纤维细胞分泌合成胶原纤维增加, 组织处在修复中。B3 AO 组 1 周后取材电镜下见同 CO 组取材组织一样, 细胞核周围细胞质增多, 但是超微结构中没有线粒体出现, 胶质纤维的排布稀疏, 整体上成纤维细胞的活跃度没有 CO 组高, 组织修复水平较 CO 组低。

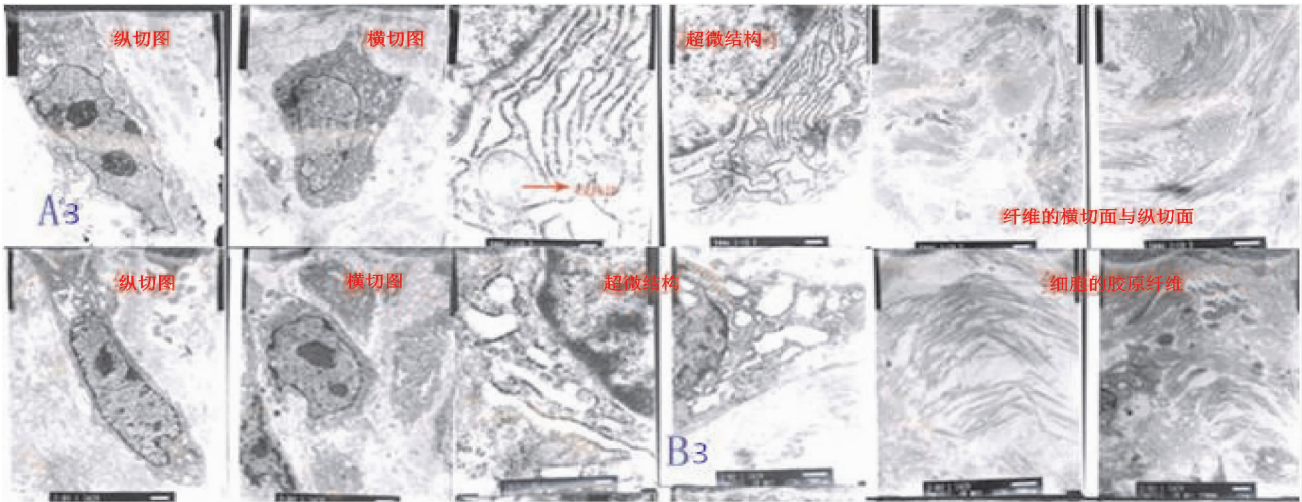


图 3 A3 CO 组及 B3 AO 组(10 000×)

A4 CO 组 2 周后取材电镜下见,细胞更加增加,细胞间充质分泌合成增多,表明细胞生长活跃,在超微构造中线粒体(箭头所指)增加,核糖体(箭头所指)增加,表明细胞代谢旺盛,合成和分泌蛋白质的能力更加变强。细胞周围胶原纤维的纵横切面中胶原纤维形成较

1 周时增加,且排布紧密,表明组织处在进一步的修复中。B4 AO 组 2 周取材后电镜下见细胞质的含量、线粒体、核糖体的数目都少于相同时刻的 CO 组,说明合成与分泌蛋白质的功能弱,组织修复更慢,细胞周围胶原纤维的排布稀疏,组织修复较相同时刻的 CO 组慢。

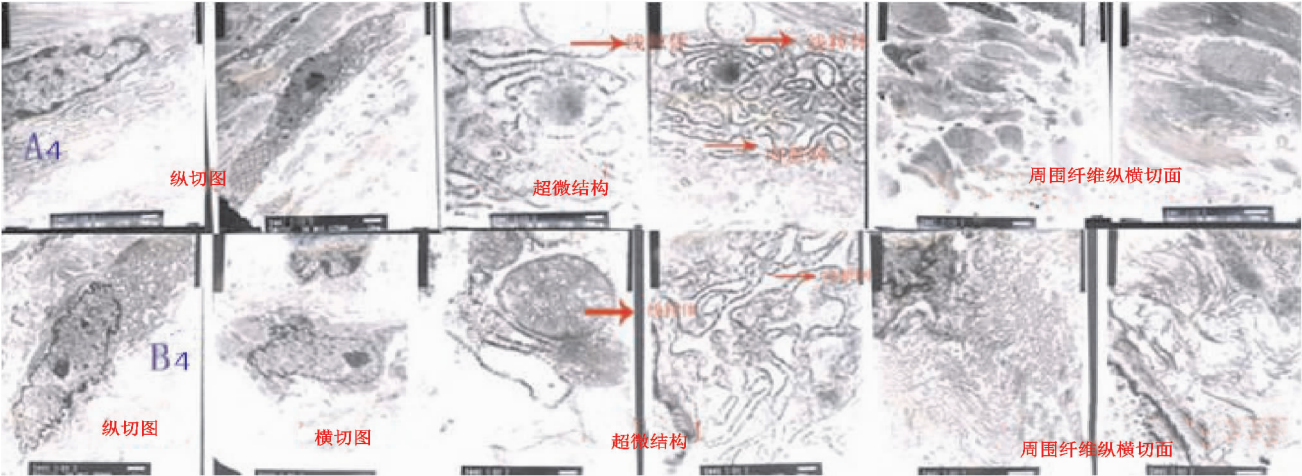


图 4 A4 CO 组及 B4 AO 组(10 000×)

A5 CO 组 3 周后取材电镜下见细胞终止成长,成纤维细胞变为纤维细胞,表明组织修复完成。B5 AO 组 3 周后取材电镜下见纵切面细胞增加,细胞间充质

增加,表明组织仍处在修复过程,比相同时刻的 CO 组组织愈合要慢。

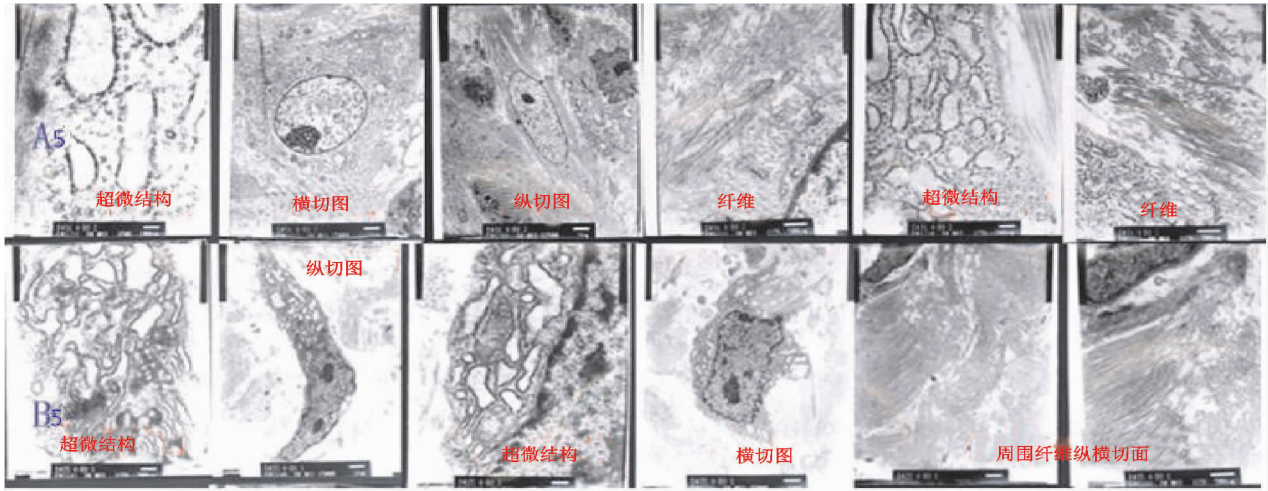


图 5 A5 CO 组及 B5 AO 组(10 000×)

3 讨论

3.1 CO 理论产生

人们在持久的大量的医疗活动中,不停积攒经验,渐渐形成了骨伤科理论体系。《五十二病方》中记录“伤者……以陈温傅之”的局部包扎固定^[4],西汉《导引图》中也记录了训练腰肌背肌及关节活动的引导训练方法^[5]。筋膜、肌肉、关节、骨骼是中医骨伤科重要的解剖组织,在《内经》中已有这些组织的记录^[6],而并记录了其功能,如“骨为干”“筋为刚”“骨属屈伸”“宗筋主束骨而利机关也”“诸筋者,皆属于节”。前人已领会到肌肉、筋等是运动的动力本源,骨具有支架、杠杆力学的功用。骨伤科中固定是骨折愈合的必须前提,最终要保证功能的完整,所以十分重视运动的重要性。《吕氏春秋》说:“流水不腐,户枢不蠹,动也。形不动则精不流,精不流则气郁”^[7],这种重视运动、引导训练的认识,形成了“形动精流”的骨伤科动静观念,所以骨伤科中无论是早前的包扎固定还是以后的夹板固定都十分重视练功。初次记录竹板固定骨折是葛洪的《肘后救卒方》^[8],开夹板固定骨折治疗之先河。

我国第一部骨伤科专著《仙授理伤续断秘方》,不光记录了夹板不超关节固定的方法和能让关节伸屈运动的绢布关节包扎固定法,还提出“凡曲转……将绢片包之,后时时运动,……或屈或伸,时时为之方可”^[9]。主动伸屈关节活动,保持血肉近乎生理情况下的舒张收缩,使骨折端持续产生压应力和微动,加速了骨痂的形成和塑形改建。而肌肉规律的收缩运动,可以产生“泵样作用”,促进血液流动,同样加快了软组织和骨组织内的微循环,使血流量及血氧分布明显增加,“便生气血,以接骨耳”。这种固定骨折与练功相结合的治疗方法,正是“形动精流”观点在临床实践中具体的应用。

3.2 I 型胶原蛋白

I 型胶原与 II 型胶原的最主要的区别是 I 型胶原一条 α 链中含有 5-6 个羟赖氨酸基,在 II 型胶原一条 α 链中含有的羟赖氨酸基是 I 型胶原的 25 倍^[10,11]。Melvin 等^[12]在骨折早期愈合的实验中未发现 II 型胶原。I 型胶原促使成骨细胞分化并增进成骨细胞间的黏附作用,对细胞的代谢成长有重要的功用^[13]。骨折早期成骨细胞可以分泌出大量的 I 型胶原,然则 I 型胶原的分泌有特定的周期性,Gary 等^[14]研究发现成骨细胞分泌的胶原量在 8~10 d 时最高,2 周后显著降低。试验中笔者采取高级脊椎动物山羊制备骨折模型,依照骨折愈合规矩在不同的时刻取材,通过免疫组化方法测试 I 型胶原与 II 型胶原的 mRNA 的表达,结果只在术后第二周发现了 I 型胶原的 mRNA 表达,结果与 Melvin 与 Gary 相似。

研究 I 型胶原对人体胚胎中骨膜的成骨细胞生物学特性影响的实验中,发现外源性 I 型胶原可以压制成骨细胞繁殖,使成骨细胞胶原蛋白合成量降低,但能增强成骨细胞的粘附力,提高骨钙素、碱性磷酸酶的合成量,表明 I 型胶原对人胚成骨细胞产生促分化作用。

观察 I 型胶原在成骨细胞内的表达可以推测成骨细胞的生长能力,判断骨折的愈合情况^[15]。

3.3 成纤维细胞

众所周知成骨细胞可以合成分泌胶原原纤维^[16],具有 64 nm 周期横纹。而成纤维细胞形成的前胶原蛋白分子通过内切酶的合聚和重布,就能形成同样具有 64 nm 周期横纹的胶原原纤维。这些胶原原纤维彼此粘合产生胶原纤维。测定后发现这两种细胞合成分泌的胶原纤维都是 I 型胶原纤维,在结构形态和功能上完全一样。成纤维细胞变成熟时,胞体缩小,变为长梭形,粗面内质网和高尔基复合体都不发达,就变成了纤维细胞。在外力等因子刺激下,部分纤维细胞可从新转换成幼稚成纤维细胞,同时恢复了功能活动,参加组织毁伤后的修理。

动态应力钢板(CO 钢板)具有一定的柔韧度,它能够分担一部分应力,而不是承担全部应力,可以使更多应力作用到骨折端,既能保证骨折端的充分血运,又能达到固定后骨折端应力刺激的动态效果^[17],本实验利用山羊股骨干骨折动物模型研究 CO 钢板对骨折愈合的影响,发现应用其可加速骨折端血肿的机化和吸收,促进成骨细胞增长,减少骨折愈合时间。

参考文献

- [1] 荣国威,翟桂华,刘沂,等. 骨折内固定[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.
- [2] 陈志伟,廖瑛,戴祝,等. 关节镜辅助下伤 MIPPO 技术治疗 B 型胫骨平台骨折[J]. 中国矫形外科杂志,2006,14(8):627-628.
- [3] 谭远超,周纪平,闫虎,等. 动态应力钢板与 AO 钢板对羊股骨干骨折愈合的影响[J]. 中国组织工程研究,2012,16(52):9744-9749.
- [4] 葛洪. 肘后救卒方[M]. 北京:人民卫生出版社,1956.
- [5] 蒲道人. 理伤续筋方[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1989.
- [6] 顾志华等. 骨伤生物力学基础[M]. 天津:天津大学出版社,1990.
- [7] 胡廷光,伤科汇纂[M]. 北京:人民卫生出版社,1962.
- [8] 赵廷海. 救伤秘旨[M]. 上海:上海科技出版社,1958.
- [9] 尚天裕. 尚天裕医学文集[M]. 北京:中国科学技术出版社,1991.
- [10] Glimcher MJ. Composition, structure and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification. In: Handbook of Physiology. Endocrinology, Vol. 7, pp. 5-116. Edited by Greep RO, Astwood EB. Washington: American Physiological Society, 1976.
- [11] Miller EJ. Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens[J]. Mol Cell Biochem, 1976, 13(3):165-192.
- [12] Glimcher MJ, Shapiro F, Ellis RD, et al. Changes in tissue morphology and collagen composition during the repair of cortical bone in the adult chicken[J]. J Bone Joint Surg Am, 1980, 62(6):964-973.

(上接第 10 页)

- [13] 王希强,孙仁光,孙仕润,等. 丹参接骨胶囊对闭合性股骨骨折模型大鼠骨折愈合的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016,20(5):622-627.
- [14] Stein GS, Lian JB, Stein JL, et al . transcriptional control of osteoblast growth and differentiation[J]. Physiological reviews,1996,76(2):593-629.
- [15] 郭启发,李光,任荣,等. 骨髓间充质干细胞对创伤性骨折愈合的促进作用[J]. 中国组织工程研究,2016,20(45):6700-6705.

- [16] 郝丽亚,刘丽,白现广,等. P 物质及其神经激肽-1 受体在慢性非细菌性前列腺炎大鼠 L5~S2 脊段的表达[J]. 中华男科学杂志,2016,22(7):602-607.
- [17] 谭远超,周纪平,闫虎,等. 动态应力钢板与 AO 钢板对羊股骨干骨折愈合的影响[J]. 中国组织工程研究,2012,16(52):9744-9749.

(收稿日期:2017-06-01)