间断和持续压应力对培养骨器官骨折愈合影响的形态计量学研究

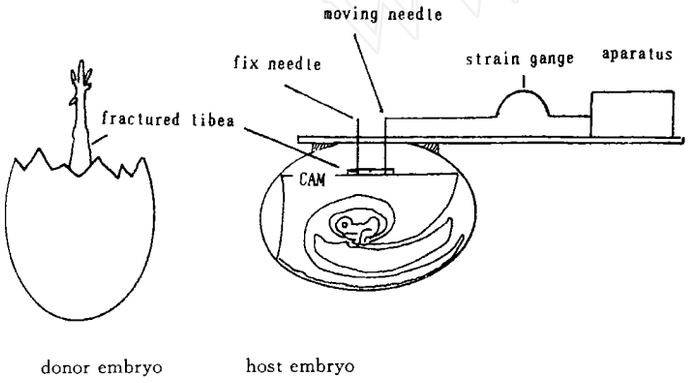
李可心　张碧辉*　钱民全**　陈楚楚*
董福慧　尚天裕　贝时璋*

本研究采用鸡胚绒毛尿囊膜培养人工骨折的鸡胚胫骨，并设计了一套施加机械压力的装置，直接施力于骨折线两侧骨段，实现骨折端的纵向挤压，并提供持续和间断不同力值的压应力。此外，运用骨形态计量学技术，采用电子计算机图像处理系统对不脱钙骨切片进行图像分析，对骨形成量、骨生长潜力，成骨细胞活性和数量等作全面综合分析。

1　材料与方法

1.1　骨组织培养方法

取孵育 15d 来亨鸡胚做供体，在无菌条件下取出鸡胚胫骨，去除两端干骺端，保留骨干约 0.8～1.0cm，以小尖刀在骨干中段做半离断，造成实验性骨折，将机械加压装置之两针分别插入骨折线两侧骨段，两针距离 0.6cm。然后将其移植在孵育 8d 的同种受体鸡胚绒毛尿囊膜上。受体鸡胚要预先在照蛋灯上选择开窗位置，以微型钻砂轮打磨开窗。移植后以环氧树脂胶封闭窗口。将受体鸡胚安放在蛋座上，稳固好机械加压装置，放入湿度 20%～25%，温度在 38℃的培养箱中孵育。（附图）



附图　骨器官培养及加力方式

1.2　机械加压装置及加压

机械加压装置通过传力杠杆上的两针直接施力于培养骨器官骨折线两侧，实现骨折端的纵向挤压。整套装置由定时电源，脉冲控制系统，电磁—机械力转换系统，机械力传导杠杆和测量系统组成。该装置通过信号转换提供静态和间断压应力，力值变化分为两个档次：分别为 0.20～1.50g；3.10～5.10g。施加的力值通过应力应变仪记录。间断力值波形为脉冲循环波型，持续力值的波形为直线。

1.3　施力与分组

O. 对照组：除未加力外，其余条件与实验组相同；

(1)持续加压低力组：0.33～1.00g(平均 0.72g)

(2)持续加压高力组：3.10～4.40g(平均 3.67g)

(3)间断加压低力组：0.49～1.35g(平均 0.93g)

(4)间断加压高力组：3.04～5.10g(平均 4.14g)

持续加压为培养开始至结束始终施加压力，间断加压为每天加压 4 次，每次 30min，频率为 1Hz。经 t 检验，在两低力值实验组间力值无统计学差异($P>0.1$)，两高力值实验组间力值也无统计学差异($P>0.1$)，而高力和低力组间力值有明显统计学差异($P<0.01$)。

每一供体均为 15d 鸡胚，将其中一侧胫骨作为实验组，另一侧胫骨作为对照组，培养过程为 10d，培养结束后每组随机取 6 个标本进行分析。

1.4　不脱钙骨标本包埋与切片

标本直接浸入 4℃，4%冷酒精，并逐级脱水、透明，以甲基丙烯酸甲酯包埋，在重型切片机上以钨钢刀切成 5μ 厚度切片，甲苯胺蓝染色。

1.5　骨形态计量学分析

在半自动图像分析系统上，以 Osteoplan(Vers 200)软盘，测量、分析骨折修复，重建过程的各个参数，每一标本切成 4 片，每一切片观察骨折处 4 个视野。根据标本情况进行下列 14 项指标的测量：

(1)TBV(%)：总骨体积百分比(Total bone volume.)

(2)SV(mm^2/cm^3)：骨表面密度(Surface density of bone.)

(3)D－TRAB(μ)：平均骨小梁直径(Mean trabecular diameter.)

(4)VV－OS－L(mm^3/cm^3)：类骨质体积(Volumetric density of lamellar osteoid.)

(5)SV－OS－L(mm^2/cm)：类骨质表面积(Surface density of lamellar osteoid.)

(6)TH－OS－L(u)：类骨质厚度(Thickness of lamellar osteoid.)

(7)OS－L%：总类骨质面积百分比(%trabecular surface covered by lamellar osteoid.)

(8)SV－OSB(mm^2/cm^3)：活性成骨细胞覆盖类骨质面积(Surface density of osteoid covered by active osteoblasts.)

(9)VV－O－L(mm^3/cm^3)：类骨质相对体积(Relative volumetric density of lamellar osteoid.)

(10)SV－O－L(mm^2/cm^3)：类骨质相对表面积(Relative Surface density of lamellar osteoid.)

(11)SV－OB(mm^2/cm^3)：成骨细胞覆盖的活性类骨质表面积(Surface density of active osteoid covered by osteoblasts.)

(12)OB/OS%：成骨细胞覆盖的类骨质百分比(% of osteoid covered by osteoblasts)

(13)OB%：活性类骨质覆盖的全部骨小梁百分比。(%of

国家自然科学基金资助项目

中国中医研究院骨伤科研究所　100700
* 中国科学院生物物理所
** 中国科学院力学所

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

total trabecular surface covered by "active" osteoid (osteoblasts.)

(14)OBI：成骨细胞指数(Osteoblastic index-Number of osteoblasts/10cm of trabecular bourdary lenth.)

各组参数首先经方差齐性检验，若方差不齐，经变量变换达统计学要求，再经 OXSTAT 统计软件(Version400)行单因素方差分析，再以 Newman-Keuls 法行样本均数两两比较，以对比各处理因素对骨折修复的作用。

2 结果

2.1 外观

成活供体骨均有绒毛尿囊膜包裹。培养至第 3d，骨折线明显可见。第 6d 后骨折线变浅。至第 8d 和第 10d，骨折线多不清晰，实验组标本较对照组粗壮，尤以间断加压组明显，还可见隆起的外骨痂。

2.2 切片观察

培养至第 3d 的骨标本，骨折线明显，对照组与实验组间差别不大。第 6d，对照组骨折线明显，有纤维样组织形成及成骨细胞反应性激活现象；实验组骨折线也未开始连接，持续加压组骨折线可见骨吸收现象，部分骨小梁呈溶解状态，成骨细胞呈立方形，可见复层立方形成骨细胞排列在骨小梁终端周围；间断加压组骨折端未见溶骨现象，骨小梁周围立方形成骨细胞非常活跃，数量增多，也见复层排列。第 8d，对照组中大部分标本其骨折处骨小梁已开始连接，少部份不连接；持续加压组骨小梁连接状态较对照组好，骨小梁也较为粗大，骨膜愈合，溶骨现象消失，某些骨小梁终端圆钝，无成骨细胞及类骨质覆盖；间断加压组骨折处已是骨性连接，但排列尚不完好，骨膜较厚，骨小梁粗大，成骨活跃，骨折线处未见终端圆钝而又无类骨质及成骨细胞覆盖之骨小梁。培养至第 10d，对照组骨膜已连接，但骨折线依然可见，骨小梁较细小，类骨质较薄，成骨细胞不够活跃。在所切片的 24 个对照组标本中，发现 2 个标本未愈合。实验组中，持续加压组的骨小梁及类骨质量较对照组丰满，但较间断加压组为少，成骨细胞活跃程度以两高力组明显，两低力组次之。间断加压组有明显外骨痂形成，以间断加压高力组外骨痂量形成较多。

2.3 骨形态计量学分析

在 14 项指标中，发现 TBV，VV－OS－L，SV－OS－L，OBI，SV－OSB，VV－O－L 和 SV－O－L 七项指标在各实验组和对照组间存在明显差异。

2.3.1 TBV：两间断加压组对骨量的影响较明显，持续加压高力组也增加总骨含量，而持续加压低力组与对照组无差异。

2.3.2 VV－OS－L：间断加压高力组对类骨质体积形成影响最大，与其他各组间存在明显差异。其次为间断加压低力组和持续加压高力组。持续加压低力组与对照组无差异。

2.3.3 SV－OS－L：各实验组对类骨质表面积的影响，均与对照组有差异，按其影响大小可顺序排列为：间断加压高力组，持续加压高力组，间断加压低力组，持续加压低力组。

2.3.4 SV－OSB：各实验组与对照组均存在明显差异，但间断加压高力组与持续加压高力组没有差异，并与两低力组有差异，量级也排列在后两者之前。

2.3.5 OBI：各实验组均与对照组有明显差异，而各实验组间无差异。按量值大小顺序排列为：间断加压高力组，持续加压高力组，间断加压低力组，持续加压低力组。

2.3.6 VV－O－L：间断加压高力组与其他四组间均有明显差异，间断加压低力组与持续加压低力组间无差异，而与对照组间有差异。持续加压高力组与对照组间无明显差异。

2.3.7 SV－O－L：四个实验组均与对照组有明显差异，而四个实验组间无差异。量级顺序排列为：持续加压低力组，持续加压高力组，间断加压高力组，间断加压低力组。

3 讨论

鸡胚绒毛尿囊膜上培养骨组织显示骨折可以较快愈合[1]，并能在没有肌肉收缩等因素影响下观察力对骨折的作用，而且较动物实验更容易控制条件。

骨形态计量学是一种测量骨生长和重建的定量方法。本实验中显示统计学意义的 7 项指标中，BTV 代表矿化骨量，VV－OS－L 和 SV－OS－L 代表类骨质含量，SV－OSB 和 OBI 则代表成骨细胞数量及活性，VV－O－L 和 SV－O－L 是类骨质相对于骨小梁的容积和面积比，表示成骨的潜力。

实验中所提供的四组压力，以间断加压高力组对骨折修复的作用最为明显，在各项指标中处于首位。其次为间断加压低力组和持续加压高力组，其中间断加压低力组对骨含量及类骨质含量的影响较明显，而持续加压高力组对成骨细胞指数影响较大。持续加压低力组则对骨修复的影响相对较弱。我们注意到持续加压组中骨折处类骨质相对体积及表面积量值较高，说明钙化骨小梁的含量相对较少，自然类骨质含量相对增多。

压应力对骨生长促进作用的生物学机理尚未完全被阐明。目前较有影响的理论有两种，压电学说和显微损伤学说。日本学者 Yasuda[2]确认骨具有压电效应，给骨施加一定的力，其压力侧出现阴极电荷分布、张力侧出现正电荷分布。进一步实验证明阴极负电荷促进成骨细胞和成骨母细胞的增殖[3]。骨作为一种载荷材料，在反复的应力作用下会出现显微骨折，显微损伤学说认为这种应力来自于肌肉的牵拉和负重，并能刺激骨的细胞活性，以修复骨的损伤保持其整体性[4]。我们考虑，骨折修复机理不能单纯用某一学说来解释。因为无论在压应力(包括间断力和持续力)还是无应力状态下，骨折均可愈合，只是愈合速度有差别。这说明骨的自身修复能力具有决定作用，外界环境的影响是通过调动自身修复的潜能来发挥其效力。压应力可使骨折端产生电势能变化，且由于应力的不断刺激和骨的显微骨折诱导，骨的修复潜能进一步激发，效应叠加，骨折愈合自然加速。

4 小结

培养骨组织水平定量检测间断和持续压应力对骨折愈合的影响研究，表明在生理范围内两种压应力对骨折愈合均有促进作用，且存在正变关系。但等值间断压应力与持续压应力之间的效应比较，前者促进骨折愈合的作用更强。

5 参考文献

1 Takahashi K, et al. Fracture Healing of Chick Femurs in tissue Culture. Acta Orthop Scand, 1991, 62(4): 352.

2 Yasuda I. Fundemental Aspects of Fracture Treatment. Clin Orthop, 1977, 124: 5.

3 Noda M, et al. Appearance of Osteoclasts and Osteoblasts in Electrically Stimmulated Bones Cultured on Chorioallantoic Membranes. Clin Orthop, 1985, 193: 288.

4 Carter DR. Mechanical Loading Historios and Cortical Bone Remodeling. Calcif Tissue Int, 1984, 36: S19.

(收稿：1994－10－18)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net