

大鼠后肢短暂缺血后胫骨骨膜变化的组织学观察

程迅生¹ 周维江² 张勇¹ 李嘉寿¹

(1. 解放军 105 医院, 安徽 合肥 230031; 2. 上海第二军医大学附属长征医院, 上海)

【摘要】 目的 探讨缺血对骨外膜的影响。方法 于 SD 大鼠 (n= 50) 右后肢大腿中段经止血带结扎缺血 1.5 小时后, 分别饲养 3 天 (I 组) 和 10 天 (II 组), 以及缺血 4.5 小时后分别饲养 3 天 (III 组) 和 10 天 (IV 组), 经切片观察胫骨骨膜组织病理学变化。结果 光镜观察发现 I、II 组右侧胫骨骨外膜细胞 (PCRT) 无明显变化; III 组 PCRT 明显增生肥大, 伴有大量编织骨形成; IV 组 PCRT 增生明显减弱, 无新的编织骨形成。骨髓内小血管周围可见骨化灶。III、IV 组 PCRT 和髓内变化情况与骨折愈合过程中外骨痂和内骨痂的形成相类似。结论 大鼠后肢严重缺血可引起胫骨骨外膜增生及成骨, 但作用是短暂的。骨折局部的严重缺血可能是启动骨折愈合过程的一个重要因素。

【关键词】 骨膜 缺血 骨折愈合 组织病理学

Histopathological observation of tibia periosteum of rats after transient posterior limb ischemia CHENG Xun-sheng, ZHOU Wei-jiang, ZHANG Yong, et al. 105 PLA Hospital (Anhui Hefei, 230031)

【Abstract】 Objective To explore the effect of ischemia on periosteum. **Methods** Ischemia SD rat models (n= 50) were established by application of tourniquet on middle third of right posterior limb. After 1.5 hours of ischemia the rats were raised 3 (group I) and 10 days (group II) respectively, and after 4.5 hours of ischemia the rats were also raised 3 (group III) and 10 days (group IV) respectively. **Results** The periosteal cells of right tibia (PCRT) had no obvious changes in group I and II. Hyperplastic and hypertrophic PCRT could be seen notably in group III and a large amount of woven bones were formed. In group IV, hyperplasia of PCRT was much less than that in group III and there was no new woven bone formed; meanwhile the circumvascular ossification was found in bone marrow. The change of PCRT and bone marrow in group III and IV were similar to initial formation of external and medullar callus during fracture healing. **Conclusion** Severe ischemia of hind limb of rats can induce hyperplasia and hypertrophy of periosteum of the tibia; but the effect is transient. It suggests that severe ischemia in the region of fracture may be an important factor in initiating the process of fracture healing.

【Key Words】 Periosteum Ischemia Fracture healing Histopathology

本实验拟就各不同缺血时间对骨外膜的影响以及缺血引起骨外膜增生时效问题作一探讨。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组 取 50 天雌性 SD 大鼠 50 只, 体重 120~150g。实验共分 5 组, I~IV 组为实验组, V 组为对照组, 每组 10 只大鼠。以右后肢作为实验肢体。I 组: 肢体缺血 1.5 小时, 饲养 3 天 (72 小时); II 组: 肢体缺血 1.5 小时, 饲养 10 天; III 组: 肢体缺血 4.5 小时, 饲养 3 天 (72 小时); IV 组: 肢体缺血 4.5 小时, 饲养 10 天; V 组: 不予肢体缺血处理。

1.2 肢体缺血的方法 各实验组用 1% 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 腹腔麻醉, 于右后肢大腿中段用橡皮筋止血带结扎, 完全阻断该平面以下肢体的血流。I、II

组于缺血 1.5 小时后去除止血带; III、IV 组于缺血 4.5 小时后去除止血带。缺血过程中经腹腔用适量戊巴比妥钠维持麻醉, 缺血时相结束后, 经腹腔注射生理盐水 5ml 以防脱水。各实验组所有的动物均存活, 无皮肤坏死、破溃现象。V 组: 对照组, 不做任何处理。

1.3 组织学标本制作 I、III 组于缺血后 3 天 (72 小时) 处死, II、IV 组于缺血后 10 天处死, V 组按前四组相同的饲养条件饲养 10 天后处死。于髌关节水平, 各实验组截取左、右后肢, 对照组截取右后肢。标本置于 4% 甲醛液中固定 48 小时以上。取小腿中 1/3 段置 10% 硝酸溶液中脱钙 24 小时, 再用清水漂清 24 小时, 常规石蜡包埋, 作胫骨横断面的 5 μ m 切

片并用 HE 染色。光镜观察骨膜及有关联的组织结构,并在 10×10 倍的光镜下分别于胫骨前、后、内、外四个部位数出骨外膜内外两层(外层为纤维层,内层为生骨层^[1])的细胞层数,并计算出中位数。

1.4 统计学处理 各实验组内,左、右两侧胫骨骨外膜细胞层数对比用 Wilcoxon 配对法秩和检验。各实验组右侧与对照组右侧对比用 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 骨及其内、外组织结构的观察

对照组:光镜下,右侧胫骨骨膜纤维层由 2~3 层细胞组成,细胞呈梭形,类似于正常的纤维细胞;生骨层由 0~1 层细胞组成,细胞呈立方形。皮质骨、肌组织、骨髓组织均正常(见图 1)。

I 组:右侧胫骨,10 只大鼠中,有 8 只大鼠的切片中胫骨周围的肌纤维无明显坏死,骨膜细胞无增生,无新生骨形成;有 2 只大鼠的切片中有部分肌纤维变性、坏死,骨膜轻度增生,骨膜下有少量不成熟的编织骨生成;所有动物的骨髓组织无坏死。左侧胫骨与对照组类似。

II 组:左、右胫骨周围的肌纤维均无坏死,无骨膜增生,无新生骨形成,骨髓组织正常。

III 组:右侧胫骨,10 只大鼠中,有 7 只大鼠的切片中肌肉广泛变性、坏死,骨外膜纤维层增生,生骨层细胞明显增生、肥大,可见大量新生的编织骨(见图 2),骨髓造血组织部分坏死,骨髓内小血管增多,管腔增大,管壁增厚;有 3 只大鼠的切片中肌肉坏死相对较轻,其骨外膜增生亦较轻,编织骨形成亦较少。左侧胫骨,有 2 只大鼠切片中有部分肌肉变性坏死,可见有轻度骨膜增生及少量编织骨形成,骨髓组织无明显坏死;其余大鼠切片中无异常变化。

IV 组:右侧胫骨,原 II 组中所见的大量坏死的肌肉此时已完全被吸收,骨外膜增生已明显减弱,无新的编织骨形成,原 II 组中所产生的编织骨此时已形成成熟的板层骨,与原皮质骨间有明显的粘合线(见图 3),骨髓组织内小血管管腔进一步扩大,管壁进一步增厚,伴有透明变性,部分小血管周围形成环形骨化灶,灶内含有较成熟的骨细胞(见图 4)。左侧胫骨,所有切片中肌纤维正常,骨外膜无明显增生,骨髓组织正常。

各组所有切片中骨内膜无增生,均为单层立方细胞。

2.2 骨膜的观测

各实验组左、右胫骨骨膜细胞层数如表 1 所示。III 组右侧(实验侧)骨膜纤维层细胞层数(2.75 层,为中位数,下同)与其左侧(2 层)相比相差显著($H=8, P<0.05$)。III 组右侧骨膜生骨层细胞层数(3.5 层),与其左侧(0.5 层)相比相差非常显著($H=0, P<0.01$)。余各实验组内,左、右两侧对比,相差均不显著。

表 1 各实验组大鼠左右胫骨骨膜细胞层数比较(单位:层)

动物号	纤维层								生骨层							
	I 组		II 组		III 组		IV 组		I 组		II 组		III 组		IV 组	
	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右
1	1	3	1	2	1	3.5	2	2	1.5	0.5	2	2	0.5	5	2	2.5
2	2	2	2	2	2.5	3.5	2	2	0	0	2	1	0	5.5	1	2.5
3	1.5	2.5	1.5	1.5	2	3	1	1.5	0.5	0	1	1	0	3.5	0.5	1
4	2.5	2	2	2	2.5	2.5	1	2	0	1.5	0	0.5	0	3	1.5	1
5	1.5	2	1	2	2	2.5	2.5	2	0	1	1	0	1	2.5	2.5	1.5
6	2.5	2.5	2	2	2	2	1.5	2	0	0	0	0.5	1	3	1.5	1.5
7	2	2	2	2	2	3	2	2	0	0.5	1	0	0.5	3.5	1.5	1.5
8	1	2	2	2	2	2.5	2	2	0	0	0	1	1	5	1.5	1
9	1.5	2	2	2	3	2	1	2	0.5	0	0	1	0.5	4.5	1	1
10	1	1	1	2	2	3.5	1.5	2	1	0	0	0.5	0	6	1	1.5
中位数	1.5	2	2	2	2	2.75*	1.75	2	0	0	0.75	0.75	0.5	3.5**	1.5	1.5

注: Wilcoxon 配对秩和检验, 各组内左右对比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

各实验组右侧与对照组右侧胫骨骨膜细胞层数如表 2 所示。III 组纤维层细胞层数(2.75 层)与对照组(2 层)相比相差非常显著($q'_{III}=4.45, P<0.01$)。I、II、IV 组纤维层与对照组的相比相差均不显著($P>0.05$)。III、IV 组生骨层细胞层数(分别为 3.5 和

1.5 层)与对照组(0.25 层)相比相差均非常显著($q'_{III}=5.78, q'_{IV}=4.42, P<0.01$), 但 IV 组的生骨层细胞层数已明显少于 III 组。I、II 组生骨层与对照组的相比相差均不显著($P>0.05$)。

表 2 各实验组右侧与对照组右侧胫骨骨膜
细胞层数比较(单位:层)

动物号	纤维层					生骨层				
	I 组	II 组	III 组	IV 组	V 组	I 组	II 组	III 组	IV 组	V 组
1	3	2	3.5	2	2	0.5	2	5	2.5	0.5
2	2	2	3.5	2	2	0	1	5.5	2.5	0
3	2.5	1.5	3	1.5	2	0	1	3.5	1	1
4	2	2	2.5	2	2.5	1.5	0.5	3	1	0
5	2	2	2.5	2	2	1	0	2.5	1.5	0
6	2.5	2	2	2	2	0	0.5	3	1.5	1
7	2	2	3	2	2	0.5	0	3.5	1.5	0.5
8	2	2	2.5	2	3	0	1	5	1	0
9	2	2	2	2	2	0	1	4.5	1	1
10	1	2	3.5	2	2	0	0	6	1.5	0
中位数	2	2	2.75**	2	2	0	0.753.5**	1.5**	0.25	

注: Wilcoxon 秩和检验, 与对照组(V 组)相比, ** $P < 0.01$

3 讨论

骨折的正常愈合有赖于骨膜的参予, 当缺乏骨膜时骨折愈合延迟^[2]。关于骨折的愈合机理许多学者作了大量的研究。Raab 等^[3]发现肢体局部受压可诱发骨膜反应。Shaw 等^[4]的体外实验证明成骨与氧浓度密切相关。Kruse 等^[5]发现应用止血带使肢体静脉回流受阻可加速骨折愈合。Brighton 等^[6]发现在骨折愈合的不同时期, 骨痂中纤维骨的氧张力也不同。

我们发现大鼠后肢缺血(缺氧) 4.5 小时, 3 天后, 胫骨骨外膜细胞明显增生、肥大, 伴有大量不成熟的编织骨生成, 骨内膜无明显变化。而缺血 1.5 小时无上述变化, 说明肢体严重缺血确可诱发骨外膜增生和形成新生骨。其组织学特点与骨折后所形成的外骨痂相类似^[7]。我们还发现缺血 4.5 小时, 3 天后髓内小血管增生; 10 天后髓内小血管进一步增生、管腔扩大、管壁增厚, 小血管周围形成环形骨化灶。Hulth 等^[7]发现大鼠骨折后内骨痂形成与骨内膜无关, 可能与髓内增生的小血管密切相关, 从而提出血管周围成骨的概念。我们的发现与其相吻合, 可见肢体缺血所引起的骨外膜和髓内变化与骨折后的愈合过程相类似, 提示缺血可能是启动骨折愈合过程的一个重要因素。

关于缺血引起骨外膜增生的机理目前尚不清。Gherardini 等^[8]发现体液因素参与局部组织抗缺血过程。Hulth^[9]论述到从骨折断端释放出的骨形态发生蛋白与骨折渗出液中的各种调节因子如白介素-1、各种生长因子等一起在骨折愈合过程中起重要作用。机械力、电流等均是通过对转译成各种生化调节因子起作用的。

在本实验中大鼠肢体并无骨折。因此, 骨折本

身不是引起骨膜反应的必要条件。在缺血 1.5 小时 3 天组中, 右侧(实验侧)肢体中有 2 个标本有部分肌纤维变性坏死, 同时有骨膜轻度增生。而在缺血 4.5 小时 3 天组中, 左侧(对照侧)肢体中有 2 个标本中亦有部分肌肉变性坏死, 同时亦有骨膜轻度增生。骨膜增生程度似与肌肉坏死程度一致, 提示骨膜增生可能与肌肉坏死有关。至于左侧(对照侧)肢体中有部分肌肉发生变性坏死的确切原因尚不清楚, 可能与缺血后再灌注损伤有关。

Skjeldal 等^[10]发现大鼠后肢缺血 4.5 小时 3 天后其肌肉坏死率为 70%, 坏死灶内有大量巨噬细胞, 坏死的肌纤维被部分吸收。我们的同一实验条件组的病理变化与上述的基本相同, 而在 10 天组中坏死的肌纤维已被全部吸收, 片中已无细胞浸润现象, 无纤维瘢痕组织形成。此时, 骨外膜增生已明显减弱, 无新的编织骨形成, 说明缺血刺激骨膜增生的作用是短暂的。

结论: 后肢严重缺血可引起胫骨骨外膜增生及成骨, 但作用是短暂的。其组织学特点与骨折后病理变化相类似, 提示缺血可能是启动骨折愈合过程的一个重要因素, 缺血引起骨外膜增生可能与肌肉坏死有关。

(本文图 1~4 见插图 1)

参考文献

- [1] McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1978, 60(2): 150.
- [2] Oni OOA, Stafford H, Gregg PJ. Healing of diaphyseal fractures: the relative contribution of individual osseous tissues. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1990, 72(1): 161.
- [3] Raab DM, Kimmel DB, Akhter MP, et al. Periosteal response to bending loads, compression and injury. *Trans Orthop Res*, 1993, 18(2): 127.
- [4] Shaw JL, Bassett CAL. The effect of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1967, 49(1): 73.
- [5] Kruse RL, Kelly PJ. Acceleration of fracture healing distal to a venous tourniquet. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1974, 56(4): 730.
- [6] Brighton CT, Krebs AG. Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1972, 54(2): 323.
- [7] Hulth A, Olerud S. Early fracture callus in normal and cortisone treated rats. *Acta Orthop Scand*, 1964, 34(1): 1.
- [8] Gherardini G, Evans GRD, Theodorsson E, et al. Calcitonin gene related peptide in experimental ischemia: implication of an endogenous anti ischemic effect. *Ann Plast Surg*, 1996, 36(6): 616.
- [9] Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res*, 1989, 249: 265.
- [10] Skjeldal S, Groggaard B, Reikeras O, et al. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res*, 1991, 23: 355.

(收稿: 1999 01 11 修回: 1999 04 27 编辑: 房世源)

髓复康促进大鼠脊髓修复再生的超微结构研究

(正文见 389 页)

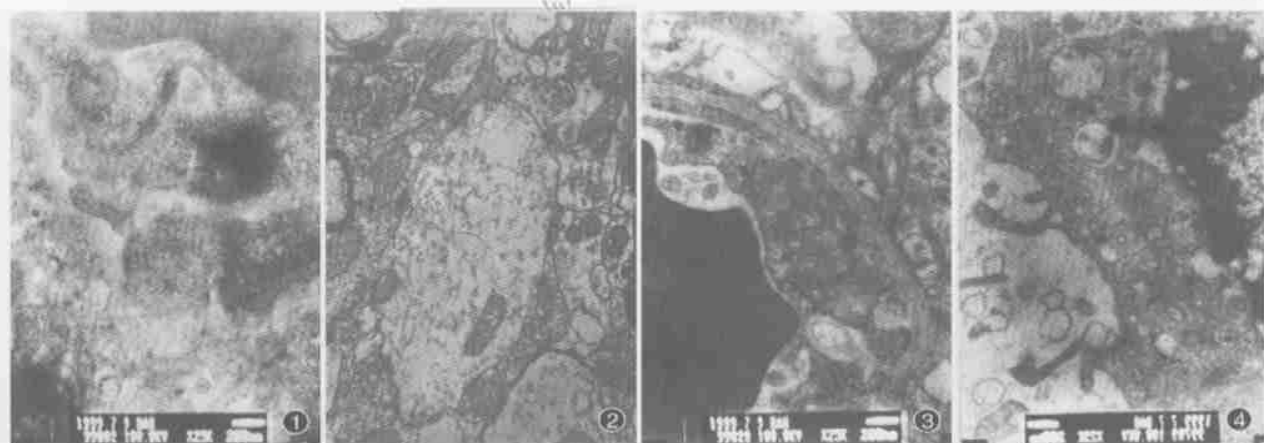


图1 空白对照3天组大鼠脊髓损伤灶邻近区内,一个处于变性过程中的树突野。树突已崩解为一团致密的无定型颗粒,周围的轴突末梢肿胀,结构模糊,部分已崩解成无定型颗粒。图2 脊髓1号3天组大鼠脊髓损伤区内,一个结构正常的树突野。树突主干、轴突末梢和轴树突触等微细结构均清晰可见。放大20K。图3 空白对照3天组大鼠脊髓损伤区毛细血管的电镜像。示内皮细胞中仅有少量饮液小泡,血管周围间隙有明显的肿胀。图4 脊髓1号3天组大鼠脊髓损伤区内毛细血管的电镜像。示内皮细胞中有大量饮液小泡,血管周围间隙没有水肿。

大鼠后肢短暂缺血后胫骨骨膜变化的组织学观察

(正文见 393 页)

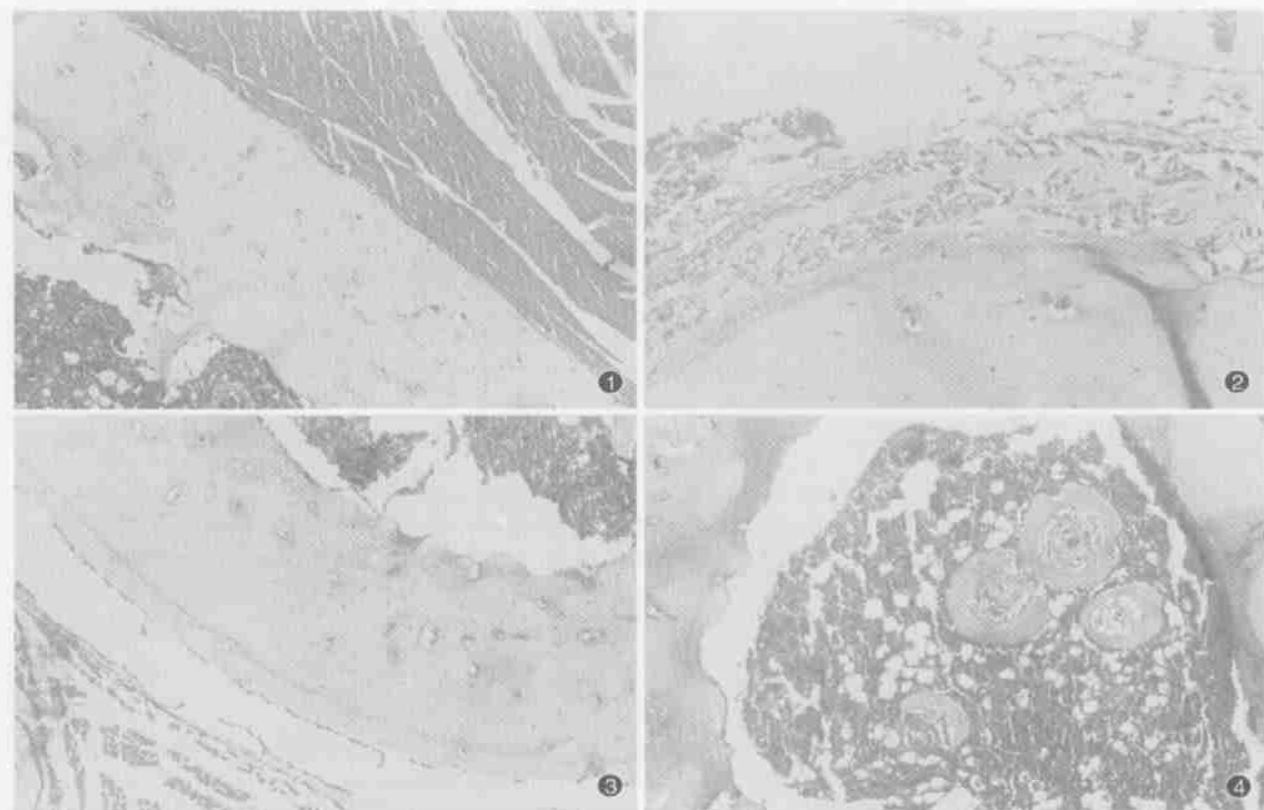


图1 对照组。胫骨骨外膜纤维层由2-3层细胞组成,细胞呈梭形;生骨层由0-1层细胞组成,细胞呈立方形。皮质骨、肌组织、骨髓组织均正常。HE×200。图2 缺血4.5小时3天组。骨外膜生发层细胞明显增生、肥大,伴大量编织骨形成。HE×200。图3 缺血4.5小时10天组。图3中所见的编织骨此时已形成成熟的板层骨,新形成的板层骨与原皮质骨间有一明显的粘合线,骨外膜已无明显增生迹象。HE×100。图4 缺血4.5小时10天组。髓腔内部分小血管周围形成环形骨化灶,灶内含有一较成熟的骨细胞。HE×400。

髓复康促进大鼠脊髓修复再生的超微结构研究

(正文见 389 页)

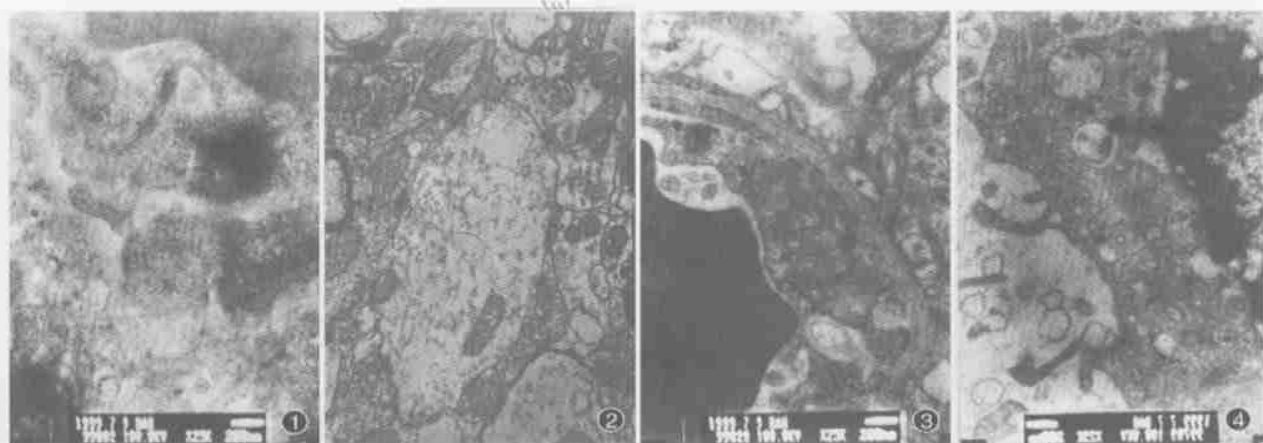


图1 空白对照3天组大鼠脊髓损伤灶邻近区内,一个处于变性过程中的树突野。树突已崩解为一团致密的无定型颗粒,周围的轴突末梢肿胀,结构模糊,部分已崩解成无定型颗粒。图2 脊髓1号3天组大鼠脊髓损伤区内,一个结构正常的树突野。树突主干、轴突末梢和轴树突突触等微细结构均清晰可见。放大20K。图3 空白对照3天组大鼠脊髓损伤区毛细血管的电镜像。示内皮细胞中仅有少量饮液小泡,血管周围间隙有明显的肿胀。图4 脊髓1号3天组大鼠脊髓损伤区内毛细血管的电镜像。示内皮细胞中有大量饮液小泡,血管周围间隙没有水肿。

大鼠后肢短暂缺血后胫骨骨膜变化的组织学观察

(正文见 393 页)

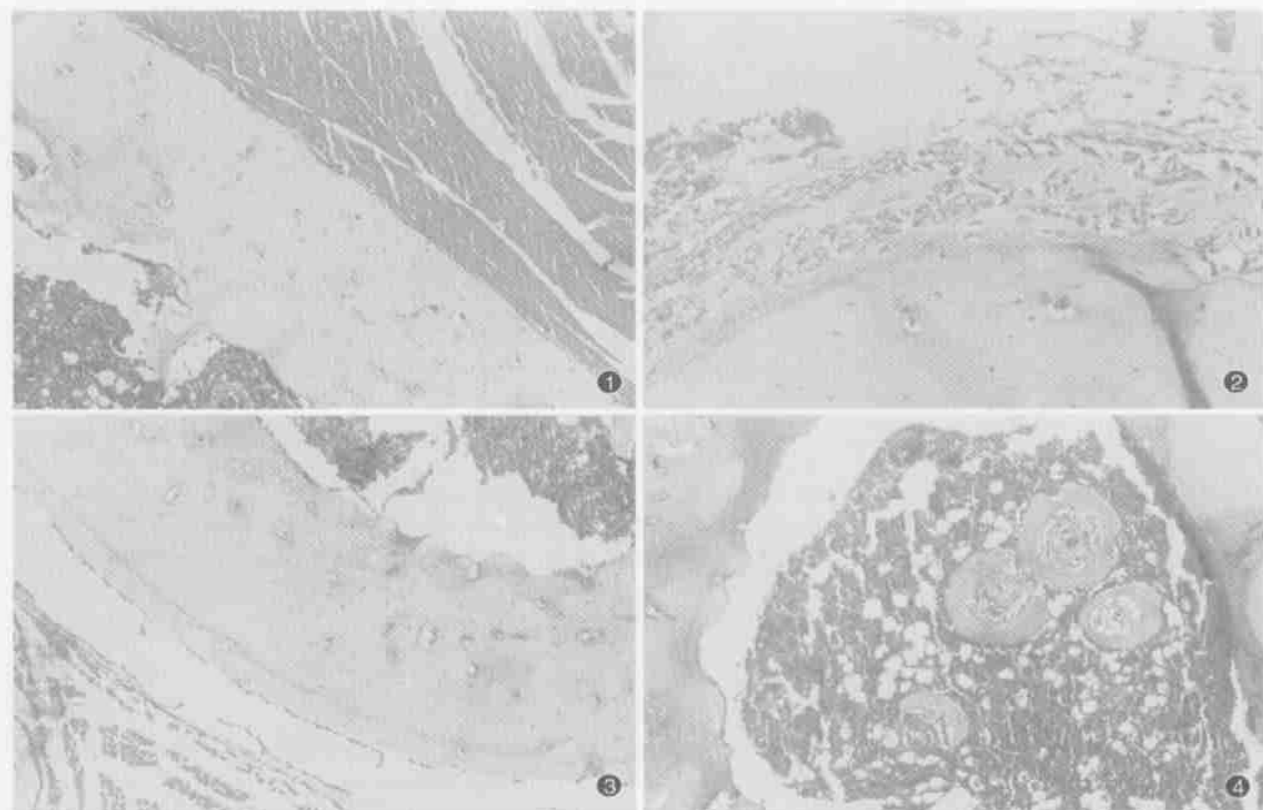


图1 对照组。胫骨骨外膜纤维层由2-3层细胞组成,细胞呈梭形;生骨层由0-1层细胞组成,细胞呈立方形。皮质骨、肌组织、骨髓组织均正常。HE×200。图2 缺血4.5小时3天组。骨外膜生发层细胞明显增生、肥大,伴大量编织骨形成。HE×200。图3 缺血4.5小时10天组。图3中所见的编织骨此时已形成成熟的板层骨,新形成的板层骨与原皮质骨间有一明显的粘合线,骨外膜已无明显增生迹象。HE×100。图4 缺血4.5小时10天组。髓腔内部分小血管周围形成环形骨化灶,灶内含有一较成熟的骨细胞。HE×400。