

· 论 著 ·

闭合性胫骨骨折骨膜微血管功能的动力学研究

张 俐, Thomas Mittlemeier, N. P. Haas, Klaus-D Schaser
(洪堡大学 Charité, Campus Virchow, 创伤与重建外科, 德国 柏林)

【摘要】 目的 通过建立闭合性胫骨骨折的动物模型,在荧光显微镜下动态观察骨折后骨膜微循环的动力学改变。方法 Sprague-Dawley 大鼠 14 只,随机分为对照组和骨折组。使用改良快速冲击法造成大鼠左下肢胫骨中段标准的横行骨折,显微手术解剖胫骨,充分暴露骨膜,在显微镜及计算机图像分析软件下进行骨膜微血管的动力学研究。结果 闭合性胫骨骨折导致骨膜功能性毛细血管密度、毛细管网微动、静脉内红细胞移动速率及毛细血管回流量下降($P < 0.05$);此外,亦引起毛细管网动、静脉的管径扩大,毛细管网动、静脉渗透率增加,毛细血管白细胞及内皮细胞的交互作用增强($P < 0.01$)。结论 骨折导致骨膜微血管损伤,而骨膜微血管损伤的程度又直接影响甚至决定骨折的愈合。如何修复与重建骨折后骨膜微循环是治疗骨折的又一关键。

【关键词】 胫骨; 骨折,闭合性; 骨膜; 微循环; 血液动力学

The dynamical investigation on the function of microcirculation of tibial periosteum after closed fracture
ZHANG Li, Thomas Mittlmeier, Norbert P. Haas, et al. Department of Trauma and Reconstruction Surgery, Charite, Campus Virchow (Berlin Germany)

【Abstract】 **Objective** Passing through the establishment of animal model imitated from the closed tibial fracture under the fluorescent microscopy to observe the dynamical changes of microcirculation of periosteum after bone fracture **Methods** 14 Sprage-Dawley rats were divided randomly into bone fractured and control group, 7 rats for each group. The standardized transversal bone fracture of middle part of left tibial shaft was induced with modified rapid weight drop technique. The periosteum of tibia was exposed fully with micro-surgical anatomy. The dynamical investigation had been carried out under microscopy and the software of computer, associated with image analysis system. **Results** The closed tibial fracture could decrease the functional density of periosteum, the velocity of the movement of erythrocytes, intra-micro-arteries and veins and the amount of reflux of capillaries ($P < 0.05$). In addition, It could also increase the calibers and osmotic rate of arteries and veins in the capillaries net, and enstrengthen the interaction of white blood cells and endothelial cell in the capillaries ($P < 0.01$). **Conclusion** Bone fracture can induce the damage of microcirculation of periosteum, and the grade of damages of micro-circulation can also directly influence or even determine the healing of bone fracture. The another key problem of treating the bone fracture might be how to recover and reestablish the micro-circulation of periosteum.

【Key words】 Tibial; Fractures, closed; Periosteum; Microcirculation; Hemodynamical changes

临床上,骨折引起的骨膜严重受损甚至大面积剥离往往是造成骨折不愈合或延迟愈合的主要原因。因此,骨膜是直接影响骨折愈合及决定骨折病人预后的关键所在。随着骨折愈合机制研究的不断深入,发现骨膜对于诱导骨折后血肿的软骨形成及软骨化骨极为

重要,骨折后血肿对于骨折愈合过程骨膜细胞的增生亦至关重要^[1],骨膜是骨折愈合及骨折后骨的修复的重要因素^[2]。然而,骨膜在骨折愈合中的病理生理机制尚未完全明了,尤其骨折后导致骨膜完整性的丧失,骨膜微循环受损反过来影响骨折愈合的研究尚在起步阶段,直接定量定性测量骨折引起骨膜微循环受损的研究未见报道。我们假设骨折后骨膜完整性的丧失及骨膜微循环障碍直接影响骨折愈合,为了验证该假设,

本实验通过建立闭合性胫骨骨折的动物模型,在荧光显微镜下动态观察骨折后骨膜微循环的动力学改变,尤其骨折断端微血管内细胞的粘附、凝聚情况,从微血管动力学水平进一步探究骨折后骨膜微血管的生理、病理变化及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物的选择 本实验使用 14 只 Sprague-Dawley 大鼠,体重 250~300 g,每 4 只一笼,自由摄食、饮水、活动,严格执行实验动物管理委员会规定(NIH Publication No. 8-23, revised, 1985)。

1.2 外科手术步骤 全麻(Isoflurane 1.5 Vol%, N₂O 0.51/min, O₂ 0.31/min)状态下,行双下肢、双颈部常规消毒、备皮。首先,手术行右侧颈动、静脉插管(型号内径 0.58 mm, PE 50)。颈动脉插管外接血压、心率自动监测仪(型号 Digimed; Micropo-med, Louisville, Kentucky, 美国)以持续检测手术过程中大鼠的血压、心率,及时进行补液。颈静脉插管用于注射荧光显示剂。其中,7 只大鼠使用改良快速重物冲击法造成大鼠左下肢胫骨中段标准的横行骨折^[3]。骨折下肢使用 1.0 mm 钢针固定。另 7 只大鼠作为对照组(无骨折)。然后,使用显微手术解剖胫骨,充分暴露骨膜^[4]。用 7-0 丝线缝合胫骨周围软组织,尽可能使之水平位固定在外固定器上,充分止血,用 0.9% 的温生理盐水冲洗胫骨及周围软组织数遍后,以玻璃薄膜覆盖以防水分蒸发及氧化。大鼠的体温使用自动调温床持续维持在 37 ℃。

1.3 荧光显微镜观察及骨膜微循环图像录制 荧光示踪剂 Fluorescein-isothiocyanate-labeled dextran, (MW 150000, 5%, 15 mg/kg, Rhodamine 6G, 0.1%, 0.15 mg/kg, Sigmachemical, Germany), 于正式录相前 5 min 内通过右颈静脉导管注入以提高微血管网的清晰度与白细胞染色。骨膜表面从远至近以每 2 mm 的距离连续录制六个不同位置的骨膜微循环的图像,以供计算机测试系统分析、统计。尽可能减少荧光显微镜的荧光对骨组织、细胞的杀伤作用^[5,6], 每个位置的录像时间应少于 60 s。

1.4 微血管动力学测试 计算机图像测试系统测试内容包括功能性毛细血管密度(FCD), 毛细血管网微动、静脉内红细胞移动速率(V_{crbc} , V_{vrcbc}), 毛细血管网微动、静脉的管径(D_c , D_v), 毛细血管网微动、静脉渗透率(L_c , L_v)。毛细血管血流量(CBF)的计算公式为: $CBF = (\pi/4) \times D^2 \times V_{RBC}$; 白细胞与内皮细胞的交互作用通过测试骨折处远、近段各 100 μm

的微静脉系统内移动及静止的白细胞数获得。

1.5 胫外侧肌水分含量及肿胀指数测试 荧光显微镜观察及骨膜微循环图像录制后,称取双下肢胫外侧肌的干湿重(湿重即提取肌肉的即时重量,干重为肌肉在 80 ℃烤炉烘 24 h 后肌肉的重量)。计算双侧胫外侧肌水分含量。肿胀指数的计算公式为:左胫外侧肌湿重/干重的比值。

1.6 统计学处理 实验结果以均数 \pm 标准差表示。采用单向回归统计软件及 t 检验进行统计。 $P < 0.05$ 说明组间有差异,以 * 表示; $P < 0.01$ 说明差异显著,以 ** 表示, $P > 0.001$ 说明差异十分显著,以 *** 表示。

2 实验结果

2.1 微循环血液动力学测试 14 只受测大鼠的血压、心率在整个实验过程中持续稳定,无显著性差异(见表 1)。

表 1 实验大鼠血压、心率监测结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 血压(kPa) | 心率(min ⁻¹) |
|-----|------------------|------------------------|
| 对照组 | 10.66 \pm 0.93 | 327 \pm 48 |
| 骨折组 | 11.46 \pm 0.80 | 326 \pm 22 |

2.2 骨膜微循环测试 对照组胫骨骨膜的毛细血管网呈“网格样”(图 1)及“条纹样”(图 2)两种截然不同的类型。邻近主干滋养血管部位的毛细血管网致密并有许多网间毛细血管分支相吻合(图 3)。远离主干滋养血管部位的毛细血管相对平行于胫骨骨干(图 2)。两种类型的毛细血管微循环顺畅,未见毛细血管功能障碍或白细胞凝聚反应。相反,骨折后骨折处骨膜毛细血管网呈现毛细血管灌注完全失败及毛细血管通透性显著提高(图 3)。然而,即使远离骨折处的骨干区域,亦可见红细胞的移动速率显著下降,大面积的毛细血管栓塞,毛细血管渗出物增多及白细胞-内皮细胞系统的相互作用显著提高(骨折后骨膜毛细血管内滚动的白细胞及凝聚白细胞比对照组提高 2 倍有余)。大多局限于骨膜内皮毛细血管后静脉(图 3、4)。

2.3 骨膜微血管动力学 骨折后骨膜毛细血管网功能性密度、红细胞移动率显著降低,但骨膜毛细血管网的平均血管管径增大(图 5、6、7)。

2.4 胫外侧肌水分含量及肿胀指数的测定 胫外侧肌水分含量由对照组的 77.9 \pm 4.7 增加至 80.5 \pm 3.1;肿胀指数由 1.03 \pm 0.03 增加至 1.07 \pm 0.03。两组对比均有显著性差异(表 2)。

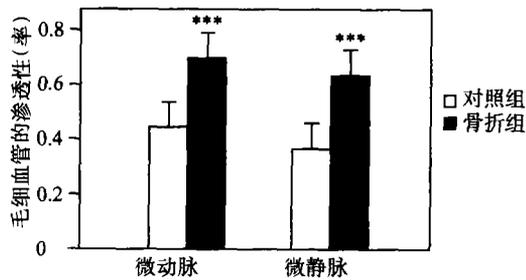


图 4 毛细血管的渗透性

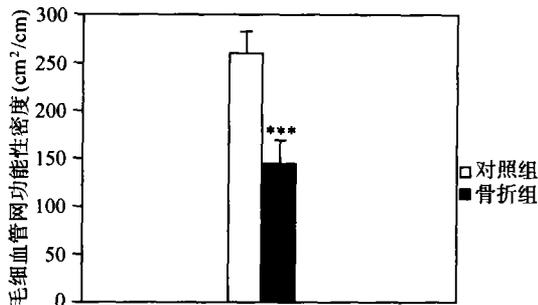


图 5 毛细血管网功能性密度

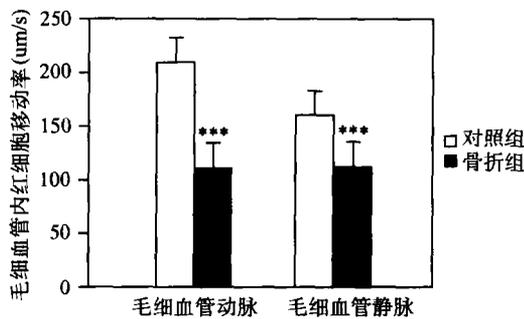


图 6 毛细血管内红细胞移动率

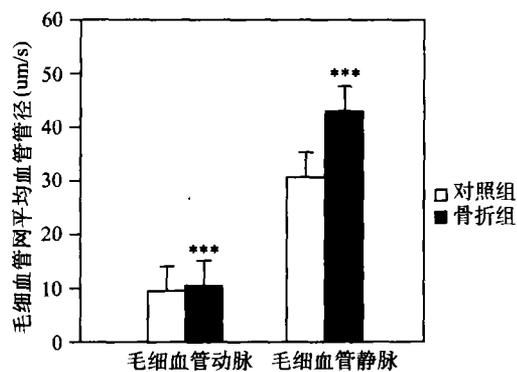


图 7 毛细血管网平均血管管径

表 2 胫外侧肌水分含量及肿胀指数结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 胫外侧肌水分含量 (%) | | 肿胀指数 骨折侧/非骨折侧 |
|-----|--------------|------------|------------------|
| | 左侧 | 右侧 | |
| 对照组 | 77.9 ± 4.7 | 74.9 ± 3.4 | 1.03 ± 0.03 |
| 骨折组 | 80.5 ± 3.1 | 75.1 ± 4.0 | 1.07 ± 0.03 |

3 讨论

完全性骨折导致骨膜的严重破坏是骨科临床的常见现象。骨膜受损及剥离导致骨折不愈合,甚至比骨折本身更为严重^[7]。在骨折愈合过程中,骨膜通过外部编织骨与软骨形成桥梁骨痂。骨折后,骨膜损伤毫无疑问地直接伤及骨的外周血运^[8]。因此,临床上治疗骨折合并周围软组织损伤比单纯骨折复杂的多。

该实验采用荧光显微镜,动态观察闭合性长骨骨折后骨膜的微血管反应,揭示骨折导致骨膜微血管受损,引起营养失调、内皮功能障碍、白细胞移动及聚集率显著性增加。此外,实验结果提示:骨折后骨膜微血管的渗透性显著性增大,可能是因为骨折引起的骨膜进一步受损导致微血管受阻,继发缺氧及内皮的完整性丧失而引起微毛细血管内液体的失调、紊乱及内皮渗透性增大导致水肿及组织压增高。这个病理过程加剧功能性毛细血管密度及红细胞速率降低(图 6),与实验结果一致。另外,骨折后大面积的骨膜毛细血管栓塞缘于骨折导致聚集及移动率明显加大亦是创伤导致炎症性反应的表现。

骨折后,胫外侧肌水分含量及肿胀指数明显提高,提示胫骨骨折易引起胫骨周围肌肉的严重受损。

综上所述,骨折导致骨膜微血管损伤,而骨膜的微血管损伤程度亦直接影响骨折的愈合,决定骨折的预后。

(本文图 1~3 见后插页 1)

参考文献

- Grundnes O, Reikeras O. The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 1993, 64(1):47-49.
- Macnab I, De Haas WG. The role of periosteal blood supply in the healing of fractures of the tibia. *Clin Orthop*, 1974, 105:27-33.
- Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, 1984, 97(2):101.
- Rücker M, Roesken F, Vollmar B, et al. A novel approach for comparative study of periosteum, muscle, subcutis, and skin microcirculation by intravital fluorescence microscopy. *Microvas Res*, 1998, 56:30-42.
- Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, et al. Intravital fluorescence microscopy: Impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45:505-513.
- Steinbauer M, Harris AG, Abels C, et al. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg*, 2000, 385:290-298.
- Volpon JB. Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1994, 113:312-317.
- Whiteside LA, Lesker PA. The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. I. On blood flow in muscles. II. On fracture healing. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1978, 60:23-30.

(收稿:2003-01-10 编辑:李为农)

闭合性胫骨骨折骨膜微血管功能的动力学研究

(正文见 449 页)

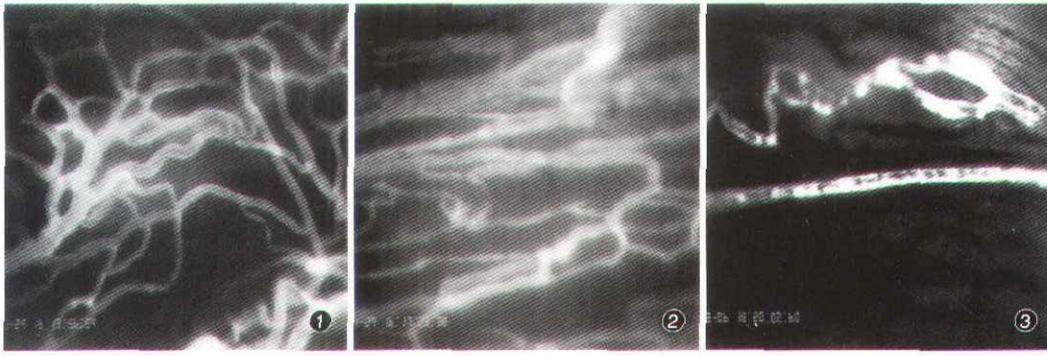


图1 邻近骨干的滋养血管处, 毛细血管呈致密的网格状, 其中有許多交通支相吻合 ($\times 465$) 图2 远离骨干的滋养血管处, 毛细血管相对平行于胫骨骨干 ($\times 465$) 图3 胫骨骨膜毛细血管可见大面积散在的栓塞, 毛细血管渗出物增加 ($\times 465$)

中药黄芪对实验性脊髓损伤的神经保护作用

(正文见 463 页)

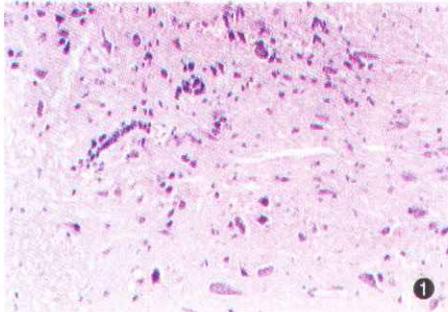


图1 黄芪治疗组脊髓组织病理改变 (HE $\times 400$) 黄芪腹腔注射治疗2周后, 受累脊髓组织出血、水肿明显减轻, 坏死区域减小。

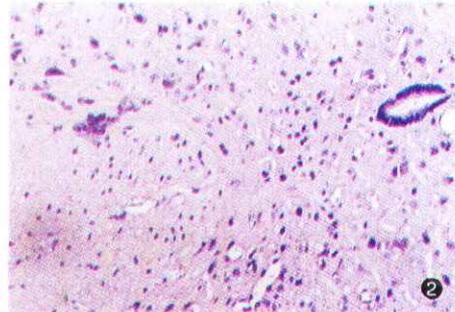


图2 MP治疗组脊髓组织病理改变 (HE $\times 400$) MP(30 mg/kg)腹腔注射后, 受累脊髓组织出血、水肿反应减轻, 救免范围增大。

椎板再造椎管成形治疗胸腰椎骨折的临床观察

(正文见 466 页)

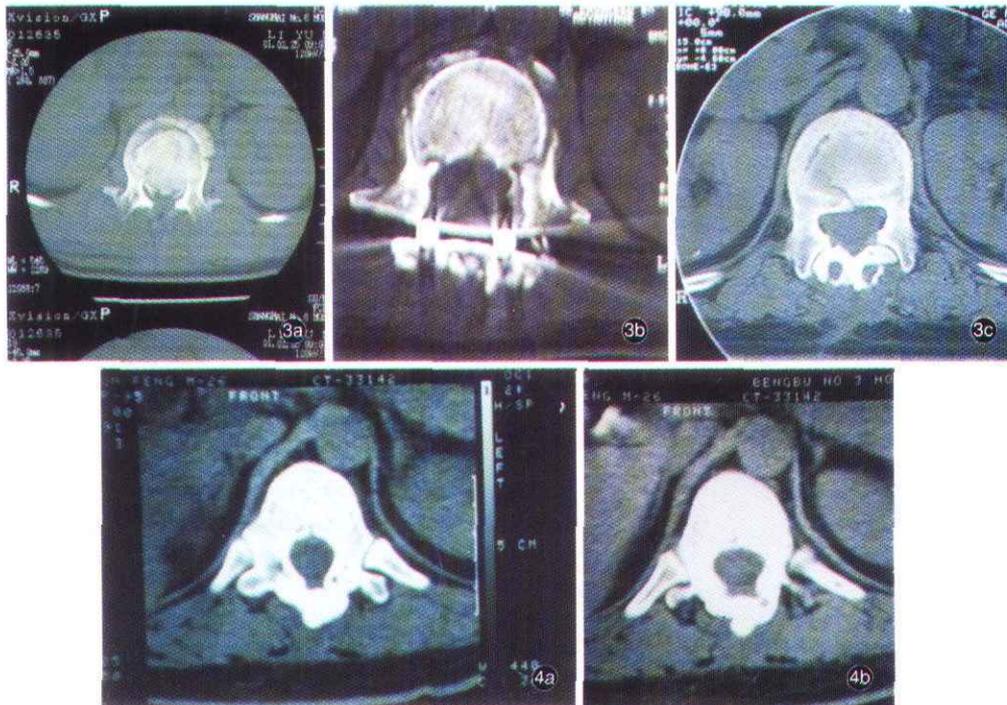


图3a 术前CT 患者女性, 40岁, L₁ 压缩性骨折截瘫, 行脊髓前后减压, Luque 棒内固定, 椎板再造椎管成形术; 图3b 术后1周CT 因Luque 棒伪影影响, 再造板形态显示不完整, 碎植骨块清楚可见; 图3c 术后1年2个月CT 去除Luque 后, 棒孔清晰可见, 再造椎板椎管成形; 图4a 术后1年5个月CT 再造椎板形成椎管良好; 图4b 术后2年1个月CT 椎管形态良好, 无骨性狭窄。