

· 基础研究 ·

兔骨髓基质细胞和骨血肿块移植促进骨折愈合的研究

李贵涛, 彭湛贤, 张国红, 罗狄鑫, 陈为坚, 徐汪洋, 齐勇
(广东省第二人民医院骨科, 广东 广州 510310)

【摘要】 目的:研究骨折后骨血肿块和骨髓基质细胞的骨再生潜能,以及骨血肿块和骨髓基质细胞联合移植对骨折愈合的影响,探讨促进骨折愈合的新途径。**方法:**在新西兰兔胫骨上制造骨缺损模型,3 d 后取出骨血肿,并从股骨抽骨髓血分离出骨髓基质细胞,将骨髓基质细胞联合骨血肿块回植到实验组骨缺损区;对照组骨缺损区则单纯行骨血肿块回植。定期拍 X 线片和取出骨痂行组织学观察。**结果:**骨缺损处骨痂生成数量在实验组和对照组两组间有显著性差异,骨髓基质细胞联合骨血肿块移植组的骨痂形成数量和骨膜反应明显多于以单纯骨血肿块移植组;组织学观察:实验组成骨样细胞形成数量也明显多于对照组。**结论:**骨髓基质细胞有较强的骨再生潜能,骨髓基质细胞和骨血肿块联合移植比单纯骨血肿块移植成骨效果更好。

【关键词】 骨折; 骨折愈合; 骨髓基质细胞; 动物实验

Study on combined transplantation of rabbit's marrow stroma cells and hematomas in bone healing LI Gui-tao, PENG Zhan-xian, ZHANG Guo-hong, LUO Di-xin, CHEN Wei-jian, XU Wang-yang, QI Yong. Department of Orthopaedics, Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, Guangdong, China

ABSTRACT Objective:To study the potentiality of osteogenesis of the hematomas formed around the fractures and that of the marrow stroma cells, evaluate the effect of the combined trans-plantation of the hematoma and the marrow stroma cells, to explore a new method to accelerate the union of fracture. **Methods:**The bone defect models were made on the tibias of the New-Zealand's rabbits. The hematomas formed around the fracture were taken out 3 days latter after the operation, the marrow stroma cells were abstracted from the femoral marrow simultaneously. And then the mixture of the hematoma and the marrow stroma cells were transplanted to the defects of the tibias in the experiment group, and the hematoma transplanted simply to the same place in the control group. The radio-graph and the histological observation of the osteotylus were carried out regularly post-operation. **Results:** ①There was a significant difference in osteotylus quantity between the two groups; more osteotylus and obvious periosteal proliferation were found in the experiment group than that in the control group which accepted the transplantation of the hematomas alone. ②There was a significant difference in osteoblast number between the two groups; more sclerotal-like cells were observed under the microscope in the experiment group than that in the control group. **Conclusion:** Marrow stroma cells have great potentiality of osteoanagenesis. The result of combined transplantation of the marrow stroma cells and the hematomas is more effective than that of simple transplantation of the bone hematoma.

Key words Fractures; Fracture healing; Bone marrow stromal cells; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(11): 839-841 www.zggszz.com

骨折愈合受很多因素影响,在骨折复位固定的手术操作中,要尽量保护骨折愈合的微环境,骨髓中的基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)和原始骨血肿就可能是促进骨折愈合的因素之一。本研究就骨髓基质细胞和骨血肿的可能骨再生潜能进行探讨。

1 材料与方

1.1 动物分组与造模

取 3 月龄新西兰大白兔 12 只,雌雄

不拘,体重 1 000~1 500 g(南方医科大学动物实验中心提供)。每只兔子后足左右侧胫骨制作骨缺损模型并编号,按照随机数字表分为对照组、实验组,每组骨缺损模型均为 12 侧。术后第 2、4 周随机处死其中 2 只兔子,取其骨痂行组织学观察。

1.2 实验方法 氯胺酮按 6~8 mg/kg 于兔臀部注射麻醉,剪毛消毒,无菌条件下于双侧踝关节近侧 3 cm 处用钢丝锯制成 1 mm 骨缺损,缝合皮肤及皮下组织。3 d 后同样用氯胺酮按 6~8 mg/kg 肌注麻醉诱导,然后用 100 g/L 的水合氯醛按 8 ml/kg 腹腔内再次注射以延长麻醉时间。剪毛消毒,无菌条件下骨穿针穿透股骨皮质至骨髓腔,以 500 U/ml 的肝素 2 ml

基金项目:广东省医学科研基金项目(编号:A2005159)

通讯作者:李贵涛 Tel:020-89168085 E-mail:lgtgk@163.com

湿化处理注射器并用力抽吸骨髓 1~3 ml。所获骨髓用 Hanks 液稀释, 细胞悬液按 1:2 比例加到淋巴细胞分离液 (Percoll, Sigma) 中, 2 500 r/min 密度梯度离心 15 min。小心吸取富含核细胞的界面层, 加入 1~2 ml 双蒸水(4 ℃)吹打这部分细胞约 1 min 以破坏红细胞, 再加入培养基终止红细胞溶解, 800 r/min 离心 5 min, 去上清, 沉淀物即含 BMSCs, 备用。

抽吸骨髓和分离 BMSCs 的同时, 于无菌下拆线分开尚未愈合好的皮肤及皮下组织并取出骨血肿凝块, 生理盐水冲洗骨折区。然后将分离的含有 BMSCs 的沉淀物与一半骨血肿凝块混合, 回植入随机选择的一侧骨缺损区, 另一侧作为对照组单纯回植另外一半骨血肿凝块。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 X 线检查 分别在术后第 2、4、6 周进行 X 线摄片, 测定骨痂体积, 以观察骨痂生长情况。

1.3.2 组织学检查 分别在术后第 2、4、6 周进行组织学检查, 观察纤维血管反应情况和类骨组织的生成情况。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件包对检测结果进行统计学处理。计量资料数值用均数±标准差表示, 术后不同时期内两组间比较用近似 t 检验 (Satterthwaite 法), P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 影像学观察 术后第 2、4、6 周采用同一条件摄片。从第 2 周开始, 实验组、对照组骨折处均有骨痂生长; 第 4、6 周, 实验组骨痂数量明显增多(见图 1), 对照组骨痂数量比实验组少(见图 2), 术后第 2、4、6 周实验组和对照组骨痂生成量见表 1, 两组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。

2.2 组织学观察 实验组术后 2 周骨缺损区骨痂主要是纤维骨痂(见图 3), 术后 4 周缺损区骨痂明显增多, 骨小梁表面

有单层的成骨细胞覆盖(见图 4), 术后 6 周骨小梁纵横交错成一定的方向, 部分骨桥形成。

表 1 术后不同时期外骨痂生成量(占小圆点的数量)

Tab.1 Osteotylus in different occasions after the operation (account for)

分组	动物数	术后观察时期(周)		
		2	4	6
实验组	10*	2.6±0.4 [△]	5.2±1.8 [△]	7.3±2.1 [△]
对照组	10*	2.2±0.3	3.4±0.5	4.1±1.7

注: *另 2 只兔已分别于术后第 2、4 周处死并取其骨痂行组织学观察; [△]与对照组比较, P<0.05

Note: *Two rabbits had been executed in sequence for histological observation of the osteotylus after 2 and 4 weeks post-operation; [△]Compared with the control group, P<0.05

3 讨论

中医正骨方法, 不但复位好而且骨折不愈合率低; 骨折部位原始骨血肿的完好保存应该是其主要的的原因之一^[1]。骨折愈合发源于骨膜及骨髓腔内的骨有关的细胞而非成熟后的骨细胞, 是连续进行的血肿机化演进期。由于骨折致髓腔、骨膜下及周围组织血管破裂出血, 因此在骨折部位形成的血肿中, 既有骨髓血也有外周血。骨髓血中分造血和基质两大系统, 其成骨能力来源于基质系统。BMSCs 中含有少量的多能基质干细胞, 能克隆增殖和具有多向分化潜能^[2], 在特定的条件下可生成多种间质细胞, 如成骨细胞、成纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞、网织细胞和内皮细胞等。梁雨田等^[3]通过动物实验证实自体骨髓移植在骨缺损部位有明显的成骨作用, 许多临床和实验研究证明, 自体骨髓具有成骨能力^[4]。因此骨髓基质细胞在体内外成骨作用受到广泛重视^[5]。随着干细胞分离培养技术的发展, 将骨髓中的基质细胞群分离提取, 然后用骨折血肿块为载体, 一起再放回到骨折部位以促进骨愈合成为可能。

单纯骨髓移植、混合骨髓移植都可促进骨折愈合, 同样骨折后骨折部位的血肿也有骨再生潜能^[6], 实验还证明, 即使人骨折血肿的提取液和部分提纯的血肿渗出液也能加速大鼠 MC3T3E1 成骨细胞样细胞合成, 且其效果与浓度成正比。骨折后多种骨生长因子被激活, 它们分布在骨折周围的血肿中, 共同作用可刺激成骨细胞的活性, 调节局部成骨。骨折部位的血管反应、骨痂的形成及改建具有普遍意义^[7]。骨折后骨折部位发生纤维蛋白渗出, 毛细血管增生, 成纤维细胞吞噬细胞侵入, 血肿演变转化为纤维结缔组织。骨内膜和骨外膜的成骨细胞增生, 骨折断端间及髓腔内的纤维组织亦逐渐化为软骨组织, 并随骨细胞的增生钙化而骨化, 骨折断端间形成外骨痂和内骨痂, 骨折端被外骨痂固定在一起, 骨痂逐渐变硬。

笔者等验证了骨血肿块移植可促骨折愈合的试验^[8], 但本实验证明骨髓基质细胞联合骨

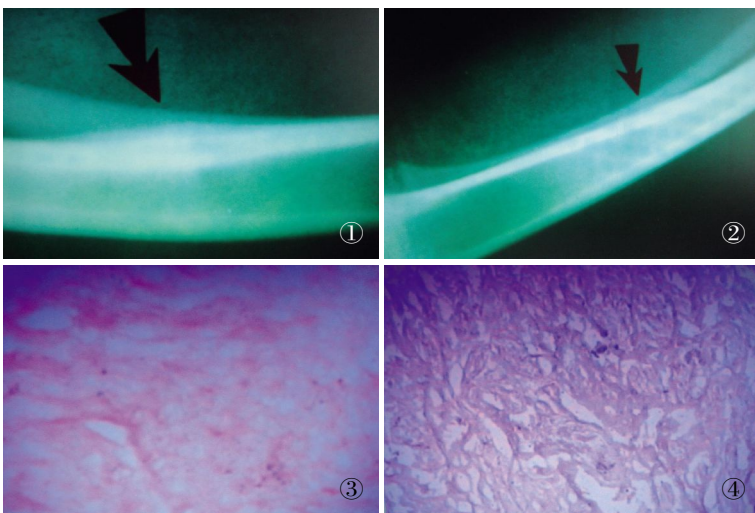


图 1 术后 4 周实验组明显骨痂生成 图 2 术后 4 周对照组骨痂生成较少 图 3 术后 2 周实验组可见纤维骨痂(伊红染色, 200×) 图 4 术后 4 周实验组可见成骨细胞(伊红染色, 200×)

Fig.1 Obvious osteotylus were found in the experiment group after 4 weeks of operation Fig.2 Less osteotylus were found in the control group after 4 weeks of operation Fig.3 Fibrous osteotylus were found in the experiment group after 2 weeks of operation (eosin stain, 200×) Fig.4 Osteoblast were found in the experiment group after 4 weeks of operation (eosin stain, 200×)

血肿块移植比单纯骨血肿块移植,对骨折愈合有更好的促进作用,其差异有统计学意义。目前,除了实验证明骨髓移植和骨血肿块移植可促骨折愈合外,临床上已有不少成功应用骨髓移植治疗骨缺损、骨不连的报道。本研究在骨缺损 3 d 即取出骨血肿块并与骨髓基质细胞混合移植,是考虑到兔的细胞增殖周期比人类短。在临床上可于骨折 5 d 左右手术时保存骨血肿块,同时分离骨髓基质细胞,于复位固定后回植骨血肿块与骨髓基质细胞的混合体于骨折线区域。自体骨血肿块联合骨髓基质细胞移植简单、经济、实用,临床上可广泛应用。

参考文献

[1] Becker AJ, McCullough EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 1963, 197:452-454.

[2] Blau HM, Brazelton T, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001, 105(7):829-841.

[3] 梁雨田, 张伯勋, 卢世璧, 等. 经皮自体骨髓移植治疗骨折不愈

合. *中华骨科杂志*, 1999, 19(12):709.

[4] Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, et al. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 1991, (266):259-270.

[5] Chapman MW. Closed intramedullary bone-grafting and healing of segmental defects of the femur-A report of three cases. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1980, 62(6):1004-1008.

[6] Denboer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*, 2003, 21(3):521-528.

[7] 金鸿宾, 董福慧, 王志彬, 等. 尚天裕骨折治疗的微创理念. *中国骨伤*, 2007, 20(12):801-802.

[8] 李贵涛, 徐洪章. 骨血肿的骨再生潜能. *骨与关节损伤杂志*, 2004, 17(2):123-124.

(收稿日期:2008-06-25 本文编辑:王玉蔓)

·手法介绍·

自握单杠式复位法治疗 Colles 骨折

王许太, 李金萍

(金川集团公司医院骨科, 甘肃 金昌 737100)

关键词 Colles 骨折; 正骨手法; 外固定器

Treatment of colles fracture with self grasping the horizontal bar style of reduction WANG Xu-tai, LI Jin-ping.

Department of Orthopaedics, Hospital of Jinchuan Group Ltd., Jinchang 737100, Gansu, China

Key words Colles fracture; Bone setting manipulation; External fixation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(11):841-842 www.zggszz.com

Colles 骨折指发生于桡骨远端 2.5 cm 范围内且向背侧移位的松质骨骨折, 常见于跌倒时肘部伸展、前臂旋前、腕关节背伸、手掌着地所致, 多见于中老年, 女性多于男性, 2000 年至 2006 年在门诊急诊中共采用自握单杠式复位治疗 Colles 骨折 112 例, 效果较为满意。

1 临床资料

本组 112 例, 男 38 例, 女 74 例; 年龄 14~85 岁, 平均 52.5 岁; 女性比例近 67%, 而 45 岁以上女性 53 例, 占女性发病人数的 71.6%。骨折按 Frykman 分类^[1]: I 型 23 例, II 型 14 例, III 型 13 例, IV 型 14 例, V 型 18 例, VI 型 14 例, VII 型 16 例。其中陈旧性骨折 23 例。

2 治疗方法

112 例均采用自握单杠式复位法整复, 根据患者健康状况决定整复前是否给予血肿内浸润麻醉。我们认为, 患有心脏病及对疼痛耐受性差的患者应给予麻醉。将骨折情况及治疗方法介绍给患者, 使患者相信并解除恐惧感, 让患者用患侧手自握高度可调节的单杠, 助手帮扶患侧手, 不能握单杠时助手

抓住患者手指末节并将近节手指压在单杠上。嘱咐患者弯腰下蹲, 术者可轻摸骨折部位, 看到畸形消失, 一般 5~10 min 就可以, 有时能听到骨擦音, 再纠正桡偏并用手固定, 行石膏托固定, 拍 X 线片复查。如尚有较大畸形, 可再次用此法整复。固定期间可指导肘关节、手指关节伸屈功能锻炼。4~6 周后解除固定, 行中药熏洗, 腕关节由轻度屈伸到完全屈伸锻炼, 直到活动自如。

3 结果

本组 112 例, 其中 13 例行 2 次整复, 占 11.6%; 99 例 1 次整复成功, 占 88.4%。均达解剖或功能复位, 复位质量在 Dienst 等推荐的 Steward 基础上结合 Aro 等测量方法制定的^[2], 本组优 72 例, 良 27 例, 可 13 例。随访 2.6 个月, 疗效按 Dienst 等标准评定^[2], 优 79 例, 良 26 例, 可 7 例。典型病例见图 1-3。

4 讨论

Colles 骨折的整复方法有术者与助手、术者与患者对抗牵引及术者施行屈腕复位等多种, 但多引起患者恐惧, 不配合