

• 基础研究 •

# 天鹅型形状记忆接骨器对骨折愈合时应力遮挡率及骨痂成熟过程的影响

任可<sup>1</sup>, 张春才<sup>2</sup>, 汪光晔<sup>3</sup>, 赵建宁<sup>1</sup>, 孙剑伟<sup>2</sup>

(1. 南京军区南京总医院骨科, 江苏 南京 210002; 2. 第二军医大学附属长海医院骨科; 3. 芜湖市中医院骨科)

**【摘要】 目的:** 探讨天鹅型形状记忆接骨器固定下骨折愈合时应力遮挡率随时间的变化以及骨折处超微结构和力学性能的特点。**方法:** 新西兰兔行单侧肱骨干横断截骨, 实验组以天鹅记忆接骨器内固定, 对照组以加压钢板固定。分别于术后第 2、4、8、12、16 周时取材, 测定应力遮挡率和愈合骨的生物力学性能, 并观察骨折端的超微结构变化。**结果:** 愈合过程的前 12 周内实验组的应力遮挡率明显较低而力学性能则高于对照组, 电镜观察则显示实验组矿物质沉积领先于对照组且胶原纤维排列整齐。**结论:** 天鹅记忆接骨器应力遮挡效应较小, 加快了成骨细胞的分化成熟, 促进了骨痂细胞外基质的生成和钙化, 从而提高了愈合骨的力学性能。

**【关键词】** 骨折固定术, 内; 骨折愈合; 应力, 物理; 显微镜, 电子, 扫描

**Effects of Swan-like Shape Memory Connector on stress shielding rate and callus development during experimental fracture healing process** REN Ke\*, ZHANG Chun-cai, WANG Guang-ye, ZHAO Jian-ning, SUN Jian-wei. \*Department of Orthopaedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the stress shielding rate, ultrastructural and biomechanical property of the healing bone fixed by Swan-like Shape Memory Connector(SMC) during experimental fracture healing in rabbits. **Methods:** Unilateral osteotomy of left humeral diaphysis was performed in 140 adult New Zealand rabbits. The humeral fracture was fixed with SMC in study group and 4-hole dynamic compression plate (DCP) in control group. The animals were sacrificed at the 2nd, 4th, 8th, 12th, and 16th weeks postoperatively. The humeral shafts were harvested for three-point bending tests and stress shielding rate examination. Samples from the fracture gaps were observed with scanning electron microscope. **Results:** Within an observation period of 12 weeks after operation, the stress shielding rates were significantly lower in study group than those in control group, and the bending strength and the bending rigidity were statistically higher. It was also found that collagen fibers in callus was arranged more regulate and early mineral deposition in study group. **Conclusion:** These results suggest that SMC contributes to the proliferation and differentiation of osteoblasts, promoting the formation and calcification of bone matrix and enhancing biomechanical property of the healing bone, which might be closely correlated with a less stress shielding effect produced by SMC.

**Key words** Fracture fixation, internal; Fracture healing; Stress, mechanical; Microscope, electron, scanning

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(3): 202-205 www.zggszz.com

骨折愈合是复杂的细胞和分子生物学过程, 并受到生物力学环境的调控。人体上肢天鹅型形状记忆接骨器由镍钛形状记忆合金制成, 该器械的几何构型及其材质的形状记忆效应不仅保证了骨折处的稳定, 并使骨折端处于持续的压应力作用下, 这种力学环境与其他临床常用的内固定物明显不同<sup>[1]</sup>。该器械治疗肱骨干及尺、桡骨干骨折 300 余例, 临床观察显示骨折愈合快且成功率高<sup>[2]</sup>。我们将其按比例缩小制成了兔肱骨干形状记忆接骨器(shape memory connector, SMC), 并考察了其固定下愈合过程中应力遮挡效应的水平以及骨折端超微结构和力学性能的改变, 旨在探讨持续动态压应力环

境对骨折愈合的影响及相关机制。

## 1 材料与方法

**1.1 SMC 制作** SMC 制作、作用原理及兔肱骨干骨折 4 孔加压钢板的制作见文献[1]。

**1.2 仪器设备** WD-10E 力学实验机为广州实验设备厂产品, JY-25 型静态电阻应变仪由上海华东电子仪器厂生产, 电阻应变片由上海应变片厂生产。BZ 2.5/TS1S 型材料试验机为 Zwick GmbH & Co. KG 产品。AMARY-1000 扫描电镜为美国 AMARY 公司产品。

**1.3 手术操作** 成年雄性新西兰兔 140 只, 体重(2.4±0.3) kg。40%氯安合剂(氯胺酮/安定 2 ml/kg)腹腔麻醉后, 经外侧切口暴露左肱骨干中部, 线锯横形截骨。随机选取 60 只

兔以 SMC 内固定(实验组),60 只以 DCP 内固定(对照组)。术后分笼饲养,自由活动(图 1-2)。术后第 2、4、8、12、16 周时,每组各处死 10 只兔,取出装有内固定的肱骨留作标本。另外,两组各取 10 只兔,未经截骨手术即予处死,取其完整肱骨标本作空白对照。

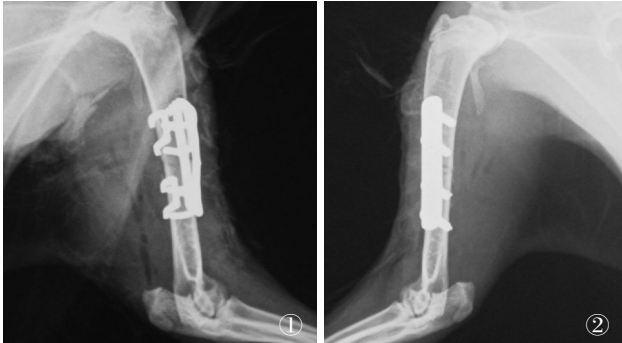


图 1 实验组动物术后 X 线片 图 2 对照组动物术后 X 线片

Fig.1 X-ray radiographs of an experimental animal in study group after operation Fig.2 X-ray radiographs of an experimental animal in control group after operation

#### 1.4 观察项目与方法

**1.4.1 内固定应力遮挡率测定** 分别在术后第 2、4、8、12、16 周时每组各取 5 根肱骨标本,剔除附着的软组织,不取内固定,在内固定物对侧骨折端骨表面粘贴应变片,将两侧干骺端修整后在 WD-10E 力学实验机上施加静态轴向压缩载荷,加载速度 0.1 mm/min,最大载荷为 100 N,反复加载 3 次,测得应力-应变曲线。每组另取 5 根未经手术的完整肱骨,测得相应部位未固定情况下的应变值,按照以下公式计算各时相点不同内固定对骨的应力遮挡率  $\eta$ 。 $\eta=(1-\sigma_{\text{固定}}/\sigma_{\text{未固定}})\%$ ,  $\sigma=E\cdot\varepsilon$  (式中  $\sigma$  为应力, E 为杨氏弹性模量,  $\varepsilon$  为应变)。

**1.4.2 愈合骨生物力学测试** 两组各时间点各取肱骨标本 5 个,小心拆除内固定后在 BZ 2.5/TS1S 型材料试验机上测定

抗弯刚度和最大弯距。测量时保持两端的夹头相距 5 cm,中央夹头的加载速率为 0.3 mm/min,肱骨内侧面朝向上方。另外,两组各取 5 只未经手术的兔处死取材作空白对照。

**1.4.3 扫描电镜观察** 术后第 2、4、8、12、16 周时,每组各取 2 根肱骨标本骨折端处的骨质,用手外科小骨刀快速截取约 5 mm×5 mm 大小的骨组织后,以生理盐水洗净血迹,投入 -196℃液氮中冻结后取出,再用锐利的手术刀片将骨块纵向劈开,投入 5%戊二醛中前固定 48 h。然后在 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液中漂洗 3~5 d,1%四氧化锇溶液后固定 2 h,乙醇逐级脱水。经临界点干燥后纵向粘附于载物台上,真空喷金后以 AMARY-1000 扫描电镜观察标本的胶原及骨小梁形态。另取正常兔肱骨干皮质骨观察作为对照。

**1.5 统计学处理** 所有数据以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,SPSS 11.5 统计软件分析,组别和愈合时间的主效应和交互作用以双因素方差分析考察,相同时间点的组间差异行非配对定量资料比较的 *t* 检验。设定显著性界限为 0.05。

#### 2 结果

**2.1 应力遮挡率的测定** 对照组随固定时间延长,应力遮挡率有显著下降,但实验组变化幅度较小。总体上两组应力遮挡率随愈合时间有明显改变。相同时间点的 *t* 检验显示术后 2~12 周期间,实验组的应力遮挡率低于对照组,但术后 16 周两组应力遮挡率无明显差异(见表 1)。

**2.2 生物力学测试** 术后 2 周时,两组肱骨断端尚未形成骨性连接,不能测得数据。从术后 4 周起,两组抗弯刚度和最大弯距指标数值均逐渐升高。4 周时,实验组的弯曲刚度和最大弯距均远高于对照组 ( $P<0.01$ )。术后 8~12 周时两组生物学指标亦有显著差异但 *P* 值逐渐增大。16 周时两组差异已无统计学意义(见表 2)。

**2.3 超微结构观察** 术后 2 周时,实验组可见较多尚未钙化的骨基质和一些胶原纤维束,这些胶原纤维束的表面有一定量矿物质颗粒开始沉积,提示新骨的形成已经开始;对照组的基质为果冻样,胶原纤维很少且排列不规则,未见明显钙质沉

表 1 两组标本应力遮挡率测量值 ( $n=5, \bar{x}\pm s, \%$ )

Tab.1 Comparison of stress shielding rates in two groups ( $n=5, \bar{x}\pm s, \%$ )

组别	应力遮挡率(%)					
	术后时间	2 周	4 周	8 周	12 周	16 周
实验组		25.92±11.47**	23.25±10.21**	21.65±8.57**	17.91±7.40*	18.01±9.19
对照组		56.72±14.74	50.19±14.17	42.59±9.86	38.57±12.95	31.88±10.50

注:与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

Note: Compared with control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

表 2 两组标本弯曲性能测试结果 ( $n=5, \bar{x}\pm s, \%$ )

Tab.2 Determination of bending strength and bending rigidity in two groups ( $n=5, \bar{x}\pm s, \%$ )

组别	术后时间	弯曲刚度				最大弯距			
		4 周	8 周	12 周	16 周	4 周	8 周	12 周	16 周
实验组		52.46±5.85**	67.87±9.15*	84.08±8.55*	91.92±6.21	46.26±6.99**	75.80±7.43**	78.22±7.09*	96.18±8.03
对照组		30.82±9.22	49.02±10.12	71.12±8.24	86.94±7.89	29.38±6.92	55.12±9.28	87.32±11.46	90.70±6.56

注:与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

Note: Compared with control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

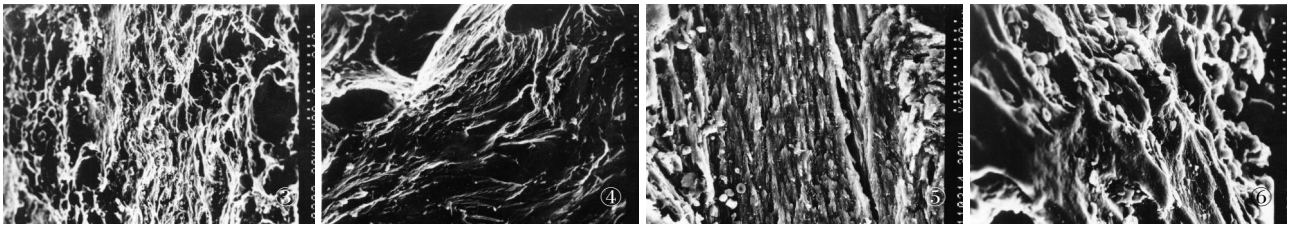


图 3 骨折后 4 周时实验组有较多矿物质沉积, 胶原含量丰富, SEM ×500 图 4 骨折后 4 周时对照组钙质的沉着很少且分散, SEM ×500 图 5 骨折后 12 周时实验组胶原纤维粗细均一并沿骨干的长轴排列, SEM ×500 图 6 骨折后 12 周时对照组板层骨的胶原纤维排列相对不规则, SEM ×500

**Fig.3** Four weeks after fracture, there was large amount of mineral depositions and collagen fibers in the fracture gap in study group (SEM ×500) **Fig.4** Four weeks after fracture, less calcified bone matrix was found in control group (SEM, ×500) **Fig.5** In the study group 12 weeks after fracture, collagen fibers in mature lamellae bone callus was arranged along the long axis of diaphysis (SEM ×500) **Fig.6** In the control group 12 weeks after fracture, the arrangement of collagen fibers in the bone was still irregular (SEM ×500)

着。4 周时,实验组有较多矿物质沉积,胶原含量丰富,其表面可见新生骨形成;对照组仍然包含不少尚未钙化的骨基质,钙质的沉着很少且分散(图 3-4)。8 周时,实验组主要包括含有哈佛氏系统的板层骨痂,另外可见少量遗留的编织骨痂组织;而对照组编织骨痂仍较多,胶原纤维排列散乱,此外尚可见仅有部分钙化的骨基质。12 周时,实验组的板层骨组织已经成熟,胶原纤维粗细均一并沿骨干的长轴排列;对照组的板层骨形成也已较明显,但排列相对不规则(图 5-6)。术后 16 周时,实验组局部偶有小的吸收陷窝,但胶原排列整齐,胶原纤维的连续性也较好;对照组则有少量胶原纤维中断,排列也稍紊乱、稀疏,吸收腔略多,周围胶原排列呈现密集趋势。

### 3 讨论

骨折愈合时,骨祖细胞在局部血供与力学因素共同作用下可以再活化,并通过细胞分裂转变为成骨细胞。而成骨细胞的主要功能则是合成并分泌骨的有机基质(胶原纤维和无定形基质)并参与基质的矿化。骨折愈合不同于其他组织之处就在于钙盐的沉积和胶原纤维的有序排列。胶原纤维是组成骨构架和维持骨的力学强度的基质蛋白,也是骨矿化的核心,骨痂的矿化即是无定型的钙盐规律的沉积在胶原等有机质间隙内的过程<sup>[3]</sup>。随愈合的进行,胶原等有机基质与钙盐结晶紧密结合形成编织骨,以后胶原纤维再逐步平行排列成板层骨,骨的强度和刚度也随之增加<sup>[4]</sup>。

骨折愈合的速度和质量受到生物力学环境的影响<sup>[5]</sup>。我们以 SMC 和 DCP 在兔肱骨干骨折端制造了两种应力环境。既往研究显示 SMC 和 DCP 均可在骨折端产生纵向压应力,但因骨折端的吸收及骨组织本身的黏弹性,DCP 的加压作用会随时间明显消减<sup>[6]</sup>,而镍钛合金的 SMC 纵向压力持续的时间较长<sup>[1]</sup>。更重要的是镍钛合金弹性模量仅 54.18 GPa,所以我们推测 SMC 的应力遮挡效应较高刚度材料的 DCP 低。所谓应力遮挡效应是指当不同刚度的成分并联承担载荷时,高刚度的成分承担较多的载荷,即起到降低低刚度成分所受应力的作用。在骨折治疗领域,应力遮挡效应即为内固定材料对骨骼生理应力(主要是压应力)的分流现象,应力遮挡的程度也与内固定物的弹性模量和体积呈正相关关系。本试验显示术后 12 周内实验组的应力遮挡率明显较低,证实了骨折愈合的关键时期内实验组骨折端承受的压应力载荷较大。又考虑

到骨端承受的压力随肢体活动而变化,因此 SMC 固定下骨折间隙始终处在持续、动态的压应力/应变下<sup>[1]</sup>。业已发现骨折断端间应力传导所造成的短时微损伤效应是骨痂形成反应得以重复和延续的基本条件,骨折愈合过程实质上就是这种一次性骨痂反应的重复积累<sup>[7]</sup>。坚强内固定物造成的应力遮挡效应往往导致骨折的延迟愈合、不愈合以及去除内固定后的再骨折现象,其主要机制便是抑制了骨痂形成反应<sup>[5,7]</sup>。据此,我们认为 SMC 以低应力遮挡效应为重要基础的持续、动态的压应力环境有助于刺激骨痂形成反应,促进骨折愈合。另外,两组应力遮挡率总体上随时间逐渐降低,至 16 周后两组已无明显差异,这可能与愈合中后期骨痂弹性模量的显著增高及骨痂体积增大有关。

另一方面,作为愈合进程的评价指标,电镜观察显示实验组骨折端不仅胶原合成旺盛、胶原纤维的排列远较对照组整齐,而且钙盐的沉积和板层骨痂的形成也明显领先。相应的,生物力学测试表明自术后 4 周骨折端初步连接至 12 周板层骨痂基本形成期间,实验组的弯曲刚度和强度也明显高于对照组。研究发现,骨组织的细胞具有感受应力刺激的功能和压电效应,合理的机械应变可以诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞系分化,提高成骨细胞的增殖速度和功能活性,并对编织骨痂向板层骨的改建起着重要的促进作用<sup>[8-10]</sup>,而且周期性动态应力的成骨刺激作用明显高于静态负荷。应变刺激下 ST2 间充质细胞系的增殖明显加速并大量表达 I 型胶原 mRNA,表明其正向成骨细胞方向分化<sup>[10]</sup>。实时定量 PCR 显示,5%的周期性应变下 SaOs-2 等成骨细胞样细胞中 I 型和 III 型胶原基因的转录都有明显增加<sup>[11-12]</sup>,碱性磷酸酶和骨钙素等钙化相关分子的合成也显著提高<sup>[12]</sup>。三维立体基质构架中成骨细胞的长轴及其合成的胶原等基质蛋白可按照周期性应变的方向平行排列,且一定幅值的应变甚至可使成骨细胞增殖数量和 I 型胶原蛋白的合成量增加数倍<sup>[9]</sup>。考虑到本实验中两组的差异主要在于内固定力学环境,而且两组超微结构及力学性能的差别随应力遮挡率的差异同步减小,我们认为 SMC 较低的应力遮挡率使得骨折端承受到持续动态压应力,这种周期性压应力/应变促进了成骨细胞的分化成熟并激发了其成骨活性,胶原等细胞外基质的生成及其钙化因此得以迅速而有序地实现,这提高了愈合骨的力学性能,加速了骨折

## · 基础研究 ·

## 黄芪对破裂型椎间盘突出重吸收动物模型的影响

姜宏<sup>1</sup>, 刘锦涛<sup>2</sup>, 惠 ■ 华<sup>1</sup>, 王拥军<sup>2</sup>

(1. 苏州市中医医院, 江苏 苏州 215003; 2. 上海中医药大学脊柱病研究所)

**【摘要】目的:** 研究破裂型椎间盘突出重吸收过程中免疫反应的作用机制, 以及黄芪干预重吸收过程的作用机制。**方法:** 将 28 只雄性 SD 大鼠, 随机分为正常组、模型组、黄芪注射液治疗组和胸腺肽治疗组等 4 组。动物 10 d 后处死, 取髓核组织, 进行 HE 染色观察形态结构变化, 流式细胞仪检测 T、B 细胞含量。**结果:** 相对于模型组, 治疗组大鼠髓核组织的形态结构发生明显变化, T、B 细胞含量比例明显大于模型组。**结论:** 突出髓核组织能够引发自身免疫反应, 黄芪对破裂型椎间盘突出的重吸收有一定促进作用, 可能是通过增强自身免疫而发挥作用的。

**【关键词】** 椎间盘移位; 模型, 动物; 自身免疫; 中草药

**An experimental study on the influence of radix astragali on the resorption of ruptured disc herniation** JIANG Hong, LIU Jin-tao\*, HUI Reng-hua, WANG Yong-jun. \*The Institute of Spinal Disease, the Shanghai University of TCM, 201203, Shanghai, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the possible mechanism of immune response in the resorption of the ruptured intervertebral disc herniation, and the possible mechanism of radix astragali on the resorption of the ruptured disc herniation. **Methods:** Twenty-eight male SD (Sprague-dawley) rats were chosen. The rats were randomly divided into 4 groups: the control group, model group, the group treated with radix astragali injection and the group treated with thymic peptide. The rats were killed and discs were harvested 10 days after treatment. Flow cytometry and HE staining were used for analysis of cells and tissue. **Results:** Compared with the control group, the proportion of activated T cells (CD4+ and CD8+) and B cells were significantly higher in the two drug-treatment groups. **Conclusion:** Herniated nucleus pulposus attracts activated T and B cells and triggered an immune response. Radix astragali could strengthen the autoimmune response.

**Key words** Intervertebral disk displacement; Models, animal; Autoimmunity; Drugs, Chinese herbal

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(3):205-207 www.zggszz.com

基金项目: 江苏省中医药局资助项目(编号: 200523)

通讯作者: 刘锦涛 Tel: 0512-65225929 E-mail: liujintao0533@yahoo.com.cn

愈合。

## 参考文献

- [1] 任可, 张春才, 康庆林, 等. 天鹅记忆接骨器对实验性骨折愈合时骨桥素和骨连接素 mRNA 的影响. 第二军医大学学报, 2005, 26(9): 1018-1021.
- [2] Isales CM, McDonald JM. Future developments in therapy. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1117: 258-263.
- [3] Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. Bone, 2007, 41(6): 928-936.
- [4] 张春才, 禹宝庆, 许硕贵, 等. 应用生理性成骨力值概念治疗骨折与骨不连——兼论 MO 现象与有效固定. 中国骨伤, 2007, 20(6): 361-363.
- [5] 康庆林, 张春才, 许硕贵. 对骨折有效内固定的几点思考. 中国骨伤, 2003, 6(5): 281-282.
- [6] Uthoff HK, Poitras P, Backman DS. Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. J Orthop Sci, 2006, 11(2): 118-126.
- [7] Brighton CT, Fisher JR Jr, Levine SE, et al. The biochemical pathway mediating the proliferative response of bone cells to a mechanical stimulus. J Bone Joint Surg Am, 1996, 78(9): 1337-1347.
- [8] Bhatt KA, Chang EI, Warren SM, et al. Uniaxial mechanical strain: an in vitro correlate to distraction osteogenesis. J Surg Res, 2007, 143(2): 329-336.
- [9] Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, et al. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. J Bone Miner Metab, 2005, 23(3): 219-225.
- [10] Liu X, Zhang X, Luo ZP. Strain-related collagen gene expression in human osteoblast-like cells. Cell Tissue Res, 2005, 322(2): 331-334.
- [11] Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. Biomaterials, 2005, 26(3): 311-318.
- [12] Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J, et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. Eur Cell Mater, 2004, 16(7): 35-41.

(收稿日期: 2008-07-10 本文编辑: 李为农)