

## · 基础研究 ·

## 甲状旁腺激素结合煅烧骨治疗兔桡骨临界性缺损

魏军渔, 王邦荣, 俞怡辉, 娄伟刚, 徐荣明  
(宁波市第六医院创伤骨科, 浙江 宁波 315040)

**【摘要】** 目的: 探讨甲状旁腺激素(PTH)结合煅烧骨对兔桡骨临界性缺损的修复作用。方法: 36 只成年新西兰大白兔, 建立兔桡骨中段 15 mm 临界性骨缺损模型, 随机分为空白对照组、煅烧骨组、PTH 组。分别给予溶剂及间歇性 PTH 治疗。术后 8 周, 应用影像学、组织学等方法检测缺损处的骨修复情况。结果: 术后第 8 周放射学检测显示, 空白对照组桡骨缺损明显, 无新骨形成; 煅烧骨组缺损处只有少量骨形成; 而 PTH 组煅烧骨与桡骨断端间有连续的骨小梁通过骨折线, 缺损处密度明显增高, 提示有大量新生骨形成。组织切片中 PTH 组和煅烧骨组平均新生骨小梁面积百分比分别为  $0.627 0 \pm 0.086 1$  和  $0.241 0 \pm 0.071 5$ , 两组间差异有统计学意义 ( $P=0.000 6$ )。另外, 生物力学检测结果显示, PTH 组的平均最大载荷为  $(253.70 \pm 41.29)$  N, 而煅烧骨组的平均最大载荷为  $(144.60 \pm 23.20)$  N, 两组间差异有统计学意义 ( $P=0.0341$ )。结论: 联合应用煅烧骨和 PTH 可以促进骨缺损处新骨的形成, 有利于临界性骨缺损的修复。

**【关键词】** 甲状旁腺激素; 桡骨; 创伤和损伤; 生物力学

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.01.016

**Repair of critical-size bone defects in the radius of the rabbit using PTH and true bone ceramics** WEI Jun-yu, WANG Bang-rong, YU Yi-hui, LOU Wei-gang, XU Rong-ming. Department of Trauma, the 6th Hospital of Ningbo, Ningbo 315040, Zhejiang, China

**ABSTRACT** **Objective:** To study the repairing effects of PTH combined with true bone ceramics (TBC) on critical-size segmental radius defects in rabbit. **Methods:** Thirty-six adult New Zealand White rabbits, critical-size radius defects were created and were randomized into three groups: Control group, TBC group and PTH group. Each group was treated with solvent, TBC or PTH and TBC respectively. Eight weeks after operation, radiological, histomorphometric and biomechanical evaluation were performed to evaluate the osteogenesis in each group. **Results:** Eight weeks after surgery, postoperative radiograms showed that the defects were evident and no bone formation was seen in the control group, and only partial bone formation was recognized in the TBC group. While the defect was filled by dense material which indicating a large amount of new bone deposition and a bony bridge was notable in the PTH group. Histological sections revealed the new bone percentage of bone defects was  $0.627 0 \pm 0.086 1$  和  $0.241 0 \pm 0.071 5$  respectively in the TBC and PTH group, which had significant differences ( $P=0.000 6$ ). The maximum load for fracturing in the PTH and TBC group was  $(253.70 \pm 41.29)$  N and  $(144.60 \pm 23.20)$  N respectively, which also had significant differences ( $P=0.034 1$ ). **Conclusion:** Osteogenesis can be promoted by PTH and TBC, which is an appropriate tool to induce bone healing in atrophic nonunions.

**KEYWORDS** Parathyroid hormone; Radius; Wounds and injuries; Biomechanics

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(1): 55-58 www.zggszz.com

骨缺损的治疗是骨科修复领域的一道难题, 骨缺损达到一定的长度后不能自然愈合, 而且不能完全通过人工内固定的方法解决。因此, 生物学上的增援就显得尤为重要。临床上常用各种骨移植物来治疗大段的骨缺损, 其中, 自体骨移植被认为是移植材料的“金标准”, 并已被成功应用于临床骨缺损的治疗, 但容易受到合适的取骨部位和移植物体积的限制, 而且取自体骨可能会带来一系列的并发症, 包括慢性疼痛、深部感染和血管损伤等<sup>[1]</sup>。同种或异种骨移植物适宜于巨大的骨缺损, 不会引起额外的创

伤, 但是可能会引起疾病传播、感染或宿主对移植骨的排斥反应<sup>[2]</sup>, 因此, 在实际应用过程中亦受到很大的限制。本实验以具有天然小梁结构的煅烧骨 (TBC) 为载体, 探讨局部使用甲状旁腺激素 (PTH) 对兔桡骨临界性缺损的修复作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 煅烧骨: 将新鲜成年牛股骨下端松质骨锯成  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$  骨条, 分别于 1% NaOH 和 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  中浸泡 1 h 进行脱脂、脱蛋白, 大量冲洗后, 置  $70^\circ\text{C}$  恒温干燥箱内干燥 72 h。随后将标本置于煅烧炉中煅烧, 将温度缓慢上升至  $800^\circ\text{C}$ , 并保持 3 h。自然降温后取出, 高压蒸汽灭菌备用。PTH1-34

(Sigma, USA)。

**1.2 兔桡骨临界骨缺损动物模型的建立** 36 只成年新西兰大白兔 (购于上海斯莱克实验动物有限责任公司), 雌雄不限, 体重 2.5~3.0 kg。36 侧右桡骨缺损模型随机分为 3 组, 每组 12 侧: ①空白对照组, 骨缺损处不放置植入物; ②煅烧骨组, 骨缺损处放置煅烧骨块; ③PTH 组, 缺损处放置煅烧骨块, 并给予 PTH 间歇性局部注射。

兔麻醉成功后, 俯卧位固定四肢。常规消毒, 在右前臂中段前内侧做 1 个长 3 cm 的纵切口, 分离软组织, 暴露桡骨。用摆锯在桡骨中段做 1 个长 15 mm 的临界性骨缺损, 在远近两断端分别剥离 5 mm 的骨膜。无菌生理盐水冲洗骨缺损处, 按照分组的情况, 将不同的植入物分别放置于骨缺损部位, 依次缝合皮下组织和皮肤。术后第 1~3 天分别肌注庆大霉素 10 000 U/kg 预防感染。

术后第 2 天开始各组给予溶剂或 PTH 治疗。PTH 组给予 PTH1-34, 10 μg/d, 局部注射至煅烧骨空隙中 (剂量选择由预实验获得), 每 3 d 注射 1 次, 共 8 周。空白对照组和煅烧骨组同样方法注射等量的生理盐水。

治疗结束后, 耳缘静脉注射空气将动物处死取材, 并进行放射学、组织学和生物力学分析。

**1.3 观测指标及方法**

**1.3.1 放射学检查** 每只兔分别于术后 8 周行 X 线摄片以判断缺损处新骨形成的情况。

**1.3.2 不脱钙组织学切片** 取第 8 周标本, 切取骨缺损处的植入物, 室温下丙酮固定 6 h, 聚甲基丙烯酸甲脂 (PMMA) 包埋, 硬组织切片切片机切片, 甲苯胺兰染色。显微镜下观察新骨形成情况, 并于每一切片中随机选取 3 个视野 (每组共 9 个视野), 使用 Leica Qwin 图像分析软件对新生骨进行分析, 计算出各组平均新生骨小梁面积的百分比。

**1.3.3 四环素标记** 动物处死前第 13 天和第 3 天分别肌肉注射四环素 (25 mg/kg)<sup>[3]</sup>, 荧光显微镜下观察硬组织切片中的荧光标记以判断新骨形成情况。

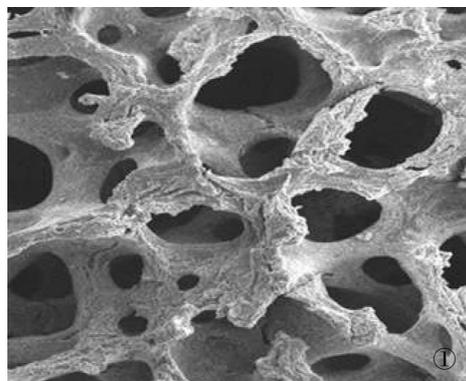
**1.3.4 生物力学分析** 动物处死后, 将植入物取出, 使用生物力学测试仪 (Instron 5543 型单柱材料测试仪, 美国) 进行三点弯曲法测试。

**1.4 统计处理** 所有数据应用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 各组实验资料统计量以均数±标准差表示。各组间平均新生骨小梁面积百分比和生物力学差异通过 ANOVA 程序分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 煅烧骨的检测分析** 煅烧骨块呈白色, 相互联

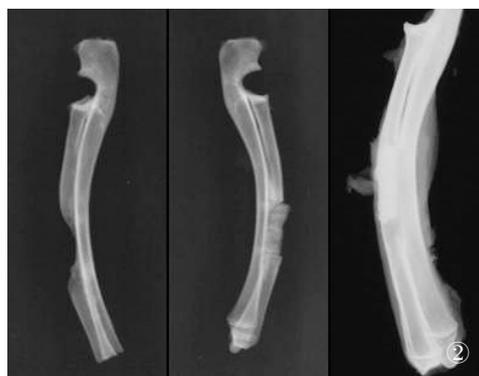
通的多孔网状结构。扫描电镜下煅烧骨则呈现天然的高密度孔隙网架结构, 孔隙率 87%, 孔径大小为 260~430 μm, 且孔隙间相通 (图 1)。



**图 1** 煅烧骨扫描电镜所见 (×30), 煅烧骨呈相互交通的网架结构  
**Fig.1** Scanning electron micrograph of the TBC block (×30). Scanning electron microscopy showed the microskeletal structure and interconnecting pores of cancellous TBC

**2.2 造模后实验动物的一般观察** 术后各组动物无死亡情况, 伤口愈合良好, 无感染征象。

**2.3 放射学检测** 空白对照组术后第 8 周桡骨断端明显萎缩, 缺损处无新生骨。煅烧骨组 8 周时桡骨缺损处有局限性密度增高, 煅烧骨与桡骨断端间隙清晰, 无连续性骨痂通过。PTH 组 8 周时煅烧骨与桡骨断端愈合良好, 有连续的骨小梁通过骨折线, 缺损处密度明显增高, 提示有大量新生骨形成 (图 2)。



**图 2** 术后 8 周 X 线检测结果。左: 空白对照组, 缺损处无新骨形成; 中: 煅烧骨组, 缺损处有少量骨形成; 右: PTH 组, 缺损处有大量新骨形成

**Fig.2** Radiographic images at the 8th week after operation. Left: control group, the defect was evident and no bone formation; Middle: only partial bone formation was recognized; Right: PTH group, a large amount of new bone deposition and a bony bridge was notable

**2.4 组织学切片** 8 周不脱钙组织切片 (甲苯胺兰染色): PTH 组可见煅烧骨孔隙中大量新生骨组织形成, 呈同心圆状排列, 形成典型的骨单位 (图 3); 煅烧骨组在孔隙边缘有少量的新生骨形成, 而孔隙中央未见有明显的新生骨组织 (图 4)。通过 Leica Qwin 图像分析软件计算出 PTH 组和煅烧骨组平均

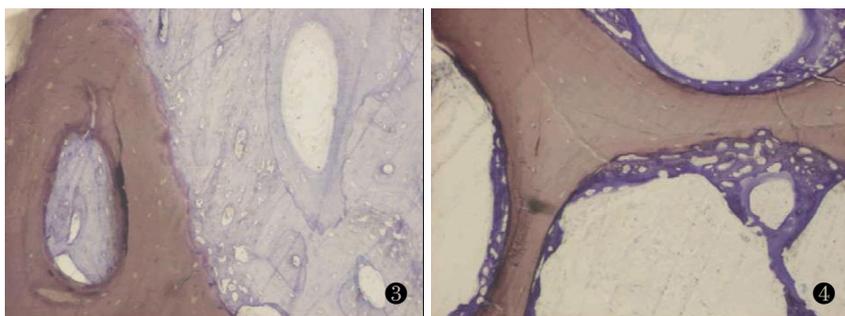


图 3 PTH 组不脱钙切片(甲苯胺兰染色  $\times 100$ ), 煅烧骨孔隙中形成大量新生骨 图 4 煅烧骨组不脱钙切片(甲苯胺兰染色  $\times 100$ ), 煅烧骨孔隙中仅边缘形成少量新生骨

Fig. 3 Histological appearance of PTH group at the 8th week after operation (toluidine blue stain  $\times 100$ ). A large amount of new bone deposition was seen in the porous structure of TBC Fig. 4 Histological appearance of TBC group at the 8th week after operation (toluidine blue stain  $\times 100$ ). Only partial bone formation was recognized in the porous structure of TBC

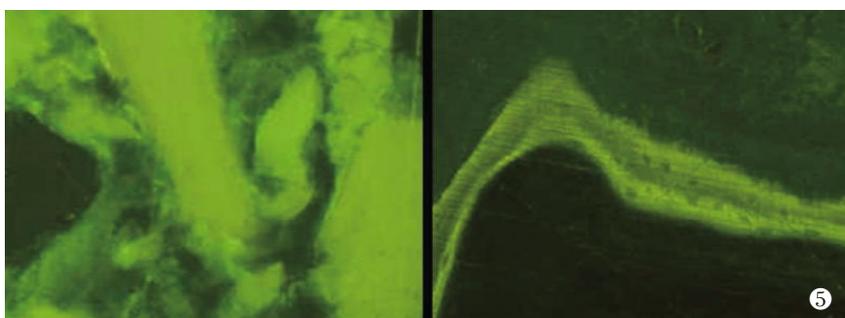


图 5 四环素荧光标记( $\times 40$ )。左:煅烧骨组,未形成明显的双荧光标记带;右:PTH 组,可见清晰的四环素双荧光标记带

Fig. 5 Tetracycline fluorescence labeling ( $\times 40$ ). Left: TBC group, no obvious double label was seen; Right: PTH group, obvious double label was recognized

新生骨小梁面积百分比分别为  $(0.627 0 \pm 0.086 1)$  和  $(0.241 0 \pm 0.071 5)$ 。统计分析显示两组间差异有统计学意义( $P=0.000 6$ )。

**2.5 骨修复处的新骨形成状况** 荧光显微镜下 PTH 组可见清晰的四环素双荧光标记带, 两条荧光带之间的距离为 10 d 内新骨的形成量, 表明新骨生长活跃。而煅烧骨组未形成明显的双荧光标记带, 表明新生骨生长不活跃(图 5)。

**2.6 生物力学** 煅烧骨组和 PTH 煅烧骨复合物组各 6 侧兔桡骨植入物进行了生物力学分析。将植入物完整游离取出, 彻底清除周围黏附的软组织, 植入物的最大载荷通过三点弯曲方法进行测试。PTH 组的平均最大载荷为  $(253.70 \pm 41.29)$  N, 而煅烧骨组的平均最大载荷为  $(144.60 \pm 23.20)$  N, 统计分析显示两组间差异有统计学意义( $P=0.034 1$ )。

### 3 讨论

PTH 是甲状旁腺细胞合成分泌的一种多肽分子, 对骨有双重作用, 持续作用可以引起破骨细胞增殖、活性增加, 使骨基质和骨盐溶解, 从而引起骨量的丢失。而间断给予 PTH 刺激则可以增加成骨细胞形成、降低脂肪形成或抑制成骨细胞凋亡, 骨改建单

位中增多的成骨细胞产生较多的新生骨, 诱导骨转换率的增加(通过活化成骨细胞), 从而导致骨量和小梁骨厚度增加<sup>[4]</sup>。

煅烧骨是由 Ueno 等<sup>[5]</sup>发明, 是唯一一种保持小梁骨天然结构的骨无机质结晶体。与人工材料相比, TBC 是一种具有天然的小梁结构和天然骨相互联系的多孔结构的生物材料。骨小梁、小梁间隙及骨内管腔系统同时存在, 孔隙间相互交通, 符合骨长入及骨形成的最佳孔径<sup>[6]</sup>, 有利于成骨细胞和新生血管的长入, 并为骨形成提供了一个理想的环境<sup>[7]</sup>, 同时也解决了化学合成人工骨的孔隙率、孔隙交通及孔径大小等方面的制作难题。另外, 由于是在高温下烧结而成, 经高温煅烧后, 骨的有机成分已经完全被去除, 消除了异种骨的抗原性, 同时也消除了异种骨中可能携带的病原微生物, 因此是一种良好的生物材料。

本实验中, 将 PTH 局部注射至煅烧骨孔隙, PTH 可由彼此相互交通的孔隙弥散至煅烧骨整体, 从而在整个骨缺损处发挥促进骨形成的作用。另外, 缺损处局部应用 PTH 可以增加促进骨形成的效率, 同时减少了对其他组织和器官的影响, 有利于减少并发症的发生。

通过兔桡骨临界性缺损实验, 我们对空白对照组、煅烧骨组和 PTH 组的成骨能力进行了衡量。术后 8 周, X 线片显示空白对照组桡骨断端萎缩, 骨缺损处无新生骨形成, 说明兔桡骨缺损在没有干预的情况下不能自然愈合, 符合长骨临界性骨缺损的要求。煅烧骨组在煅烧骨孔隙的边缘有少量新生骨组织, 散在分布, 不能包绕或覆盖煅烧骨材料, 表明新生骨组织与煅烧骨材料的关系不密切。这从一个方面也说明了, 尽管煅烧骨具有天然的相互联系的多孔结构, 体内外实验也证实煅烧骨有利于成骨细胞和新生血管的长入, 可以为骨形成提供一个比较理想的环境, 但新生骨组织的形成仍然相对比较缓慢。因此, 治疗大段性骨缺损还应增加使用其他促进骨形成的因子。而 PTH 组在术后 8 周时, 影像学显示有明显的新骨形成反应, 植入物与桡骨远近断端间为骨性组织连接, 界限不清, 形成明显的骨性愈合。

组织学切片显示,煨烧骨的孔隙中形成较多新生骨,呈同心圆状排列,中心为血管腔,形成典型的骨单位。新生骨面积百分比单纯煨烧骨组均有明显的增加。这也充分说明了 PTH 能够诱导新骨的形成并可有效修复兔桡骨的临界性缺损。

另一方面,四环素标记显示 PTH 组形成了清晰的双荧光标记带,两条带之间为新骨的形成量,显示出新生骨形成活跃。而煨烧骨组没有形成明显的双荧光带,这也意味着新生骨形成相对较缓慢。

总之,本实验证明,在兔桡骨临界性缺损处联合应用煨烧骨和 PTH 可以有效地促进新骨的形成,有利于临界性骨缺损的修复,从而可能会对骨缺损等疾病的治疗提供新的思路。

参考文献

[1] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, et al. Complications of iliac crest bone graft harvesting[J]. Clin Orthop Relat Res, 1996, (329): 300-309.

[2] Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes; a review of current technology and applications[J]. J Appl Biomater,

1991, 2(3): 187-208.

[3] 何川,邓廉夫,周来生. 四环素标记:自体成骨细胞-nBGC 复合物修复犬胫骨骨缺损[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(15): 1047-1049.

He C, Deng LF, Zhou LS. Recovery of tibia defect of dog with compound of autoallergic osteoblast[J]. Zhongguo Jiao Xing Wai Ke Za Zhi, 2003, 11(15): 1047-1049. Chinese.

[4] Manuele S, Sorbello L, Puglisi N, et al. The teriparatide in the treatment of severe senile osteoporosis[J]. Arch Gerontol Geriatr, 2007, 44(Suppl 1): S249-S258.

[5] Ueno Y, Shima Y, Ueyoshi A, et al. Experimental studies of sintered bone implantation[J]. Bessatsu Seikeigeka (Orthop Surg Suppl), 1985, 8: 85-88.

[6] Kuboki Y, Jin Q, Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83 Suppl 1(Pt 2): 105-115.

[7] Minamide A, Tamaki T, Yoshida M. An experimental approach to spinal fusion using sintered bovine bone in a pig model[J]. J Spinal Disord, 2000, 13(2): 156-164.

(收稿日期:2010-04-07 本文编辑:连智华)

### 本刊关于中英文摘要撰写的要求

为了便于国际间的交流,本刊要求论著(骨伤论坛、临床研究、基础研究)及综述类栏目的稿件必须附中英文摘要。

临床研究和基础研究等论著类稿件的中英文摘要按结构式的形式撰写,即包括目的(说明研究的背景和要解决的问题)、方法(说明主要工作过程,包括所用原理、条件、材料、对象和方法,有无对照、病例或实验次数等)、结果(客观举出最后得出的主要数据资料)、结论(对结果的分析、研究、比较、评价,提出主要贡献和创新、独到之处,或提出问题及展望)4 部分,文字一般不超过 400 字,英文摘要应较中文摘要详细。述评、骨伤论坛和综述类稿件可采用报道性摘要的形式,文字在 200 字左右。

中英文摘要均采用第三人称撰写,不使用第一人称“I”“We”“本文”主语,应着重反映文章的新内容和新观点。不要对论文的内容作诠释和评论。不要使用非公知公用的符号和术语,英文缩写第一次出现时要注明英文全称,其后括号内注明缩写。

英文摘要的内容应包括文题(为短语形式,可为疑问句)、作者姓名(汉语拼音,姓的全部字母均大写,复姓应连写;名字的首字母大写,双字名中间加连字符)、作者单位名称、所在城市、邮政编码、省和国名。作者应列出全部作者的姓名,如作者工作单位不同,只列出通讯作者的工作单位,在通讯作者姓名的右上角加“\*”,同时在单位名称首字母左上角加“\*”,例如:MA Yong-gang\*, LIU Shi-qing, LIU Min, PENG Hao. \*Department of Orthopaedics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

另外,有关中医药英译要求:中药材译名用英文;中成药、方剂的名称用汉语拼音,剂型用英文,并在英文后用括号加注中文,例如: Xuefu Zhuyu decoction(血府逐瘀汤);中医证型的英译文后以括号注明中文,例如: Deficiency both of Yin and Yang(阴阳两虚)。