

实验研究

间断压力对离体培养成骨细胞作用的研究*

中国中医研究院骨伤科学研究所 (北京 100700)

李可心 尚天裕 董福慧 张碧辉** 陈楚楚** 贝时璋** 钱民全*** 赵笃凤***

摘要 实验模拟骨在功能活动过程中细胞外环境压力的变化这一生理过程, 给实验组离体培养成骨细胞提供间断气压变化 (0.098MPa, 15 分钟加压, 15 分钟无压力, 2 周期/小时, 每天加压 8 小时), 发现成骨细胞数逐步增加, 且碱性磷酸酶活性也明显增高, 均与对照组有明显差异。结果提示, 间断加压可促进离体培养成骨细胞的增殖与分化。

关键词 间断压力 成骨细胞 培养

按照 Wolff 定律, 骨的生长和修复与外力有重要的联系, 外力不但作用于骨的基质, 也可直接或间接作用于骨的细胞。力影响骨的细胞途径有三个^[1]: 一是力大到足够引起骨基质变形, 埋于骨基质内的细胞随之产生形变; 二是力作用于骨质表面的细胞, 胞膜电信号通过细胞连接传递到骨内细胞; 三是外力造成骨内流体静压的改变直接传导至骨内细胞。本实验模拟骨在功能活动中, 细胞外环境压力的变化这一生理过程, 给离体培养成骨细胞提供间断气压变化, 使成骨细胞在流体静压变化过程中形变, 观察这一条件对成骨细胞增殖与分化的影响。

材料与方法

1. 细胞分离和细胞培养: 细胞分离方法主要参照 Wong 和 Cohn^[2] 的描述。无菌条件下取出新出生的 Wistar 大鼠的头盖骨, 分离出顶骨和额骨, 在 D-Hanks 液中剥离纤维性骨膜后, 放入另一盛有 D-Hanks 液的培养皿中将颅骨剪成碎片, 用 0.5% 胶腺酶 (I 型, Sigma Chemical Co, USA) 在 37° 恒温水浴中消化 50~60 分钟, 以 10% 胎牛血清中止酶活性, 收集上清液, 再以 D-Hanks 液清洗两次后获得成骨细胞, 将细胞种入含 Eagle 培养基, 另加 10% 胎牛血清、青霉素 1u/ml、链霉素 5mg/ml 的培养瓶中, 每瓶中放入盖玻片 (0.8 × 2cm²) 2 条, 培养瓶以无菌培养容器封口膜 (北京, 植物所技术试验厂) 封口, 实验组放入特制加压容器中, 对照组放 CO₂ 培养箱中培养。培养箱温度为 37°C, 饱和湿度, 气体浓度为 5%CO₂, 95% 空气。(图 1)

2. 加压条件: 将实验组细胞培养瓶置入可耐高压的容器中, 通入 5%CO₂ 和 95% 空气, 并控制压力变

化, 每天加压 8 小时, 每周期加压 15 分钟 (1kg/cm² 或 0.098MPa) 后再放气 15 分钟, 2 周期/小时。加压条件从细胞培养 72 小时后开始。此装置也放入培养箱中, 除气压变化外, 培养条件与对照组相同。

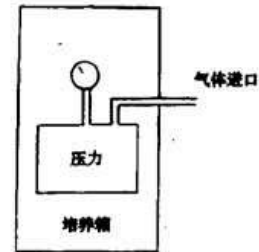


图 1 成骨细胞培养加压原理示意图

3. 形态学观察:

活体观察: 倒置相差显微镜下观察培养成骨细胞的活体形态和生长情况。

玻片染色观察: 取出生长有贴壁细胞的盖玻片, 作 HE 和 Von Kossa 染色, 光镜下观察细胞形态、结构和生长情况。

细胞计数: 细胞接种时即用细胞计数板, 按鄂征描述的细胞计数方法^[3]测出每瓶中每 ml 所含细胞数。培养至第 6、9 和 12 天后, 分别用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液将贴壁细胞游离, 再次计数。

成骨细胞碱性磷酸酶活性检测: 取出培养至第 6、第 9 和第 12 天长有贴壁细胞的盖玻片, 按 Gomori 氏钙-钴法显示碱性磷酸酶活性, 用细胞分光光度计, 以 410nm 波长进行酶活性定量分析, 各被检组分别检测 57~66 个视野。

结 果

1. 形态学观察: 离体培养的成骨细胞一般 24 小时

* 本文为国家自然科学基金资助课题
** 中国科学院生物物理研究所
*** 中国科学院力学研究所

后已贴壁生长，细胞形态有三种：(1) 扁平状，多突，常为单核，1~2 个核仁，核质清晰，胞质中有颗粒；(2) 梭形，较为常见，胞核常位于细胞一端；(3) 圆形，体积较小，尤以克隆化细胞群中多见。细胞经 HE 染色胞质内颗粒未被显示，Von kossa 染色胞质中颗粒被显示。经过 30 天左右的培养，可见细胞周围有基质沉积

表 1 不同培养日期实验组与对照组成骨细胞数增殖比较

实验批次	第 0 天		第 6 天		第 9 天		第 12 天	
	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
1	4.00×10 ⁴	4.00×10 ⁴	7.00×10 ⁴	9.40×10 ⁴	7.80×10 ⁴	1.45×10 ⁵	7.50×10 ⁴	2.73×10 ⁵
2	4.00×10 ⁴	4.00×10 ⁴	4.75×10 ⁴	1.07×10 ⁵	6.50×10 ⁴	1.33×10 ⁵	6.75×10 ⁴	2.25×10 ⁵
3	4.00×10 ⁴	4.00×10 ⁴	4.25×10 ⁴	1.00×10 ⁵	7.00×10 ⁴	1.53×10 ⁵	5.75×10 ⁴	1.75×10 ⁵
平均数	4.00×10 ⁴	4.00×10 ⁴	5.33×10 ⁴	1.00×10 ⁵	7.10×10 ⁴	1.44×10 ⁵	6.67×10 ⁴	2.24×10 ⁵

(单位：个/ml)

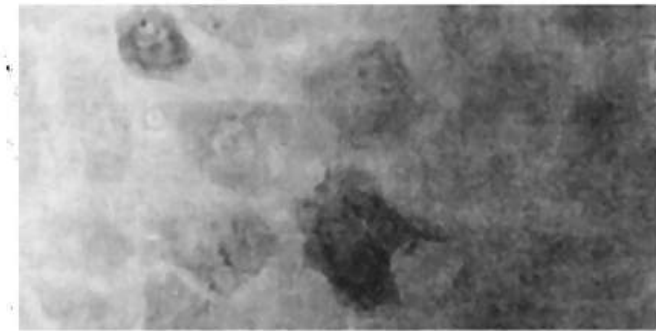


图 2 对照组。成骨细胞分布较稀疏，

碱性磷酸酶染色阳性细胞数量少。(400×)

3. 碱性磷酸酶活性检测：生长贴壁成骨细胞的盖玻片经染色后观察，实验组具有较强酶活性的细胞数较对照组明显增加(图 2, 3)，经细胞分光光度仪测定，实验组的活性酶较对照组显著性增高(表 2)。

表 2 实验组与对照组碱性磷酸酶活性比较

	第 6 天	第 9 天	第 12 天
对照组	1197.26	361.81	403.52
实验组	1746.34*	760.86**	797.90**

与对照组比较，* P<0.05 ** P<0.01

讨 论

对离体培养细胞的加力方式主要有三种：一是通过培养细胞贴附基板的形变带动细胞的变形⁽⁴⁾；二是提高培养容器内气压产生细胞变形⁽⁵⁾；三是将细胞离心，检测其在超重状态下细胞的变化⁽⁶⁾。本研究采用第二种方法。我们曾考虑在恒定浓度的大气压变化下，培养基内的气体分压或 PH 值是否有变化？因此，分别在实验条件开始的第 15 分钟、30 分钟、45 分钟和第 75 分钟检测了培养基内氧分压、二氧化碳分压、和 PH 值，结果未发现有明显变化 (P≥0.1) (图 4)。

Ozawa 等⁽⁵⁾指出：施加于离体培养成骨细胞的机械应力可检测机械力在骨重建 (bone remodelling) 的作

着，Von Kossa 染色后呈黑色，证明有钙的沉积。

2. 细胞计数：培养至第 6 天、第 9 天和第 12 天，对实验组和对照组细胞分别进行计数。结果表明，实验组细胞的增殖较对照组快，尤以开始加压第 9 天(即培养至第 12 天)为明显 (P<0.05)。(表 1)



图 3 实验组。成骨细胞密集，

碱性磷酸酶染色阳性细胞数量多。(400×)

用。他们给予离体培养成骨细胞连续压力 15 天，发现在高压情况下 DNA 的总含量在实验组和对照组之间没有差异，而碱性磷酸酶活性在实验组明显下降。因而他们认为连续的压力抑制细胞的分化，而对细胞增殖没有影响。在本研究中，间断加压实验组其细胞数量明显增加，说明细胞有增殖，其碱性磷酸酶的活性也明显增高。而通常认为碱性磷酸酶是成骨细胞分化的标志⁽⁵⁾。

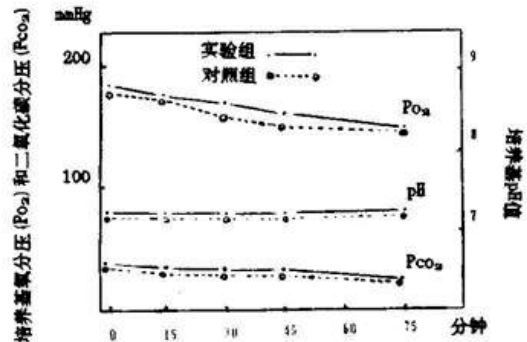


图 4 压力作用下，培养基中 PH 值，P_{O2} 和 P_{CO2} 分压的变化

力作用于细胞后通过什么机制影响细胞增殖与分化，目前尚不清楚。一般认为是通过某些化学因子发生

作用的,如 PGE₂, cAMP 和 cGMP 等。细胞内生物变化可刺激细胞进入细胞周期 S 期,也可能缩短细胞周期的静止期,此外细胞膜的变形可直接激活膜的离子通道开放,通过细胞骨架微丝信号放大促使细胞分裂^[6]

小 结

以离体培养成骨细胞为对象进行骨的生物力学研究,在国内尚未见报导。Ozawa 等的实验报导连续压力增高,抑制成骨细胞分化,对成骨细胞增殖无影响。本实验结果表明:间断压力增高既可促进成骨细胞分化,也可促进其增殖。

参考文献

1. Bourne GH. The biochemistry and physiology of bone. Vol 3. New York. Academic Press Inc, 1971: 1-76.
2. Wong G, et al. Separation of PTH and calcitonin-sensitive cells from nonresponse bone cells. Nature 1974; 252 (5485): 713.
3. 鄂征. 组织培养技术. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 112-233.
4. Hasegawa S, et al. Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. Calcif Tissue Int 1985; 37 (4): 431.
5. Ozawa H, et al. Effect of a continuously applied compressive pressure on mouseosteoblast-like cells (MC3T-EL) in vitro. J Cell Physiol 1990; 142 (1): 177.
6. Buckley MJ, et al. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. Bone and Mineral 1988; 4 (3): 225.

(收稿: 1995-04-30; 修回: 1996-03-22)

角形自身加压钢板内固定的临床应用

福建省福安市医院骨科 (355001) 黄伟松

我院自 1992 年 7 月至 1994 年 2 月应用角形自身加压钢板(简称角钢)治疗四肢长管骨骨折 120 例,效果满意,报告如下:

临床资料 本组 120 例,男 100 例,女 20 例。年龄 18-65 岁,开放性骨折 25 例,闭合性骨折 95 例,其中陈旧性 20 例,骨不连 3 例。骨折部位:肱骨 13 例,股骨 80 例,胫腓骨 25 例,尺桡骨 2 例。其中同一股骨二处发生骨折 1 例。骨折类型:横形 47 例,斜形 20 例,粉碎性 53 例。

治疗方法 角钢有 8 孔,长 6 孔,短 6 孔及 4 孔。四种规格分别适用于成人股骨、胫骨、肱骨及尺桡骨骨折。具体操作技术与普通钢板相同,固定配套的螺钉直径为 4.5mm,适用直径为 4mm 钻头钻孔,不需加压器,操作过程严格遵循骨折内固定原则,对股骨及肱骨骨折角钢置于骨折处的前外侧,对于小腿骨折钢板置于胫骨外侧,术后一般不需外固定。开放性骨折视其软组织损伤的严重程度而决定是否用角钢。对于小腿开放性骨折如果小腿伤口难以闭合,需行减张切口或各种皮瓣植皮闭合创口,防止张力的情况下勉强缝合伤口。3 例骨不连采用内固定时同时进行髓骨植骨。

治疗结果 本组 120 例中,除了 4 例开放性骨折

皮肤挫伤严重而出现皮瓣坏死伤口Ⅱ期愈合外,其余均为Ⅰ期愈合,经过 8~19 个月随访,120 例骨折愈合时间为 9~16 周,无延迟愈合及不愈合、再骨折、钢板弯曲、折断等。97 例在术后 10~12 个月取出钢板无再骨折。5 例取钢板术中发现钢板螺钉间有明显的电解现象,局部骨髓及骨痂生长良好,所有患者邻近骨折处关节主被动活动均正常。

体会 角钢由解放军 175 医院杨立民研制^[1]。应用角钢的注意点:①角形钢板体积较大,在用于小腿骨折时候应注意无张力缝合,防止患肢术后肿胀,我们认为由于胫骨前外侧肌肉丰满,安放钢板后不致直接顶于皮下,较它在胫骨内侧安放钢板好,可以减少皮肤坏死和感染机会。②角钢用于肱骨骨折时,注意将桡神经游离并加以保护,防止误伤。③角钢强度大、体积大、不易弯曲变形钢板与股骨胫骨下段不能紧贴,因此,在靠近关节的上下段骨折应用相对小 1 号的钢板。如股骨下段骨折离关节较近可采用长 6 孔角钢固定。

参考文献

1. 杨立民,等.角形接骨板的研制与应用.中华骨科杂志 1992; 12: 69.

(收稿: 1996-02-06)

Abstract of Original Articles

Surgical treatment of the severe thoraco-lumbar burst fracture *Chen Fen-yong, Song Jian-rong, Lin Jia-jun, et al Union Hospital of Fujian Medical College (350001)*

The authors reported 51 cases of severe thoracolumbar burst fracture treated with surgery. According to Frankel grades, there were 13 cases of grade A, 7 cases of grade B, 14 cases of grade C, 5 cases of grade D and 2 cases of grade 3 in 11 cases, and total laminectomy decompression was done in 30 cases. The recovery rate was 73% in the incomplete paraplegia and 15.4% in complete paraplegia. It was concluded 1. Burst fractures mainly injure the middle column of the spinal cord, and spinal canal decompression as well as internal fixation should be done, if the fragments of vertebra had compressed about 1/3 of the spinal canal and the sagittal diameter of the later was less than 10 mm; 2. Internal fixation should be selected according to the condition and range of the injured vertebra, It is reasonable to choose the internal fixation procedure which can cause less injury of the spinal segment and get good results in reduction and fixation; 3. The recovery rate of the incomplete paraplegia group was significantly higher than that of the complete paraplegia group when surgical treatment was applied.

Key words Thoracolumbar vertebrae Burst fracture Surgical treatment

(Original article on page 3)

The following-up analysis on the patients with artificial hip-prosthesis *Zhai Ming-yu, Zhao Yu-gui, Wang Chun-ping, et al. Zhengzhou Hospital of Orthopaedics, Henan Province (450052)*

108 cases (112 hips), applied with artificial prosthesis have been followed up after operation, for the average years of 6.8. It was discovered that 37 cases of complication (about 33%) were produced due to the unproper operation; 46 cases of post-operational complication (41.1%); and the satisfactory therapeutic effective rate being about 74.1%.

The frequently encountered reasons and treatments of the various kinds of complications were put into stress

to be analysed and discussed in this paper.

KEY WORDS Artificial prosthesis Disease of the hip region

(Original article on page 5)

Study of the effect of intermittent compressive pressure to the osteoblasts in vitro. *Li Ke-xin, Shang Tian-yu, Dong Fu-hui, et al. Institute of Orthopaedics & Traumatology, Chinese Academy of TCM (100700)*

The experiment imitated the physiological changes of the cellular external circumstances, existed during skeletal functional movement, and supplied a intermittent compressive pressure (0.098 MPa, 15 minutes pressure, 15 minutes relax, 2 cycles/one hour, 8 hours/day) to the osteoblasts of experimental groups in vitro. It was discovered that the numbers of osteoblasts and the reaction of alkaline phosphatase in the experimental group were markedly elevated than that of the control groups. The results indicate that the intermittent compressive pressure is able to improve the proliferation and differentiation of the osteoblasts.

KEY WORDS Intermittent compressive pressure Osteoblast in vitro

(Original article on page 7)

Experimental research on the restoration of bone defect with the complex of heterogenous deproteinized bone and the bone morphogenetic protein. *Bai Meng-hai, Ge Bao-feng, Wang Yong, et al. Institute of Orthopaedics & Traumatology, Lanzhou General Hospital of the Military Region (730050)*

The failure of the implantation of the heterogenous deproteinized bone is always due to the intensive immune rejection. A new method for treating heterogenous bone was described in this paper. The bone of calf was deproteinized, i. e. extracted the main antigens and combined with bovine bone morphogenetic protein (BMMP) and then produced a kind of heterogenous deproteinized bone, not only without antigenicity, but also advantageous to the bone formation. Implanting this kinds of bone complex into the artificial defect (2cm) of the radius of Newzeland rabbit, the observation on the recovery with immunological, radioactive, and histological