

# 伤后不同时期髓内固定对骨折愈合影响的实验研究

白 祥 李晓东 马志新

**摘 要** **目的** 探讨伤后不同时期髓内固定对兔胫骨骨折愈合过程的影响。**方法** 清洁剂兔行右侧胫骨中段横形截骨后,随机分为即时固定组(A组)、延迟1周固定组(B组)和延迟2周固定组(C组),均行克氏针( $\Phi=2.5\text{mm}$ )髓内固定术,术后行X线、组织学及BMP-2免疫组化观察。**结果** 术后1、4周时B、C组和A组间差异有统计学意义( $P<0.05$ ),B组和C组相比则差异无统计学意义( $P>0.05$ );术后2周时3组间差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 实验性骨折在一定的时间内延迟切开复位内固定可加速骨折愈合。

**关键词** 延期手术 内固定 骨折愈合 实验研究

**Effect of Early Versus Delayed Internal Fixation on Fracture Healing.** Bai Xiang, Li Xiaodong, Ma Zhixin. Nanhui Branch Hospital, Shanghai Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 201300, China

**Abstract Objective** To detect the effect of early versus delayed internal fixation on fracture healing. **Methods** Rabbits with transverse osteotomy of middle diaphyses of right tibial were divided randomly into three groups: group A (immediate internal fixation on the day of injury), group B (delayed internal fixation at the end of the first week) and group C (delayed internal fixation at the end of the second week). All fractures were immobilized with a 2.5mm - diameter kirsehnner wire as intramedullary nail. The X-ray films, histological and immunohistochemical sections were made for the evaluation of effects on fracture healing after internal fixation. **Results** There was a significant difference between group B or C and A ( $P<0.05$ ), not a significant difference between group B and C ( $P>0.05$ ) at 1, 4 weeks after internal fixation. There was a significant difference among group A, B and C ( $P<0.05$ ) at 2 weeks after internal fixation. **Conclusion** It is beneficial to the healing of fracture that open reduction and internal fixation of the closed tibial fracture is delayed in a limited time.

**Key words** Delayed operation; Internal fixation; Fracture healing; Experimental study

骨折愈合是一个极其复杂的涉及组织细胞学、分子生物学和生物力学的动态过程,受众多因素的影响,其中手术时机是一个很重要的因素。不同时期内固定可以在一定程度上影响骨折愈合,但究竟是早期还是延期内固定有利于骨折愈合,目前尚无统一认识,尤其尚缺乏实验研究的证据(迄今尚未见到有关的实验研究报道)。本实验拟通过观察不同时期内固定后家兔胫骨骨折端的X线的变化,以探讨内固定时机对骨折愈合的影响。

## 材料与方法

1. 实验动物:健康成年大耳白兔120只,雌雄不限,体重 $2.5\sim 3.0\text{kg}$ ,8~10月龄(由内蒙古医学院动物实验中心提供,清洁级)。

2. 主要试剂:BMP-2多克隆抗体,S-P免疫组化染色试剂盒,DAB显色试剂盒(由武汉博士德生物有限公司提供);乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>),磷酸盐缓冲液(PBS)

(由内蒙古医学院分子生物学中心提供)。

3. 主要仪器:JD801图像分析系统,OLYMPUS显微镜,德国产LeicaRM2015切片机,SH010恒定湿热实验箱(由内蒙古医学院分子生物学中心提供)。

4. 动物模型的制作及分组:参照柴本甫等<sup>[1]</sup>制作动物模型后随机分为即时固定组(A组)、延迟1周固定组(B组)、延迟2周固定组(C组),每组40只动物。A组行克氏针( $\Phi=2.5\text{mm}$ )髓内固定,B、C组分别于骨折后1、2周行克氏针髓内固定。(若非特别说明,“术后”皆指髓内固定术后)。

5. 检测指标:(1)X线检查:每组分别于术后1、2、4、6周各处死动物10只,骨折胫骨行X线正侧位检查(100mA、50kV、10ms,靶物距75cm),阅读各组术后不同时期X线片,观察其各个阶段的骨痂量、骨痂密度及骨折线的变化情况。同时,对各组术后不同时期的X线片应用JD801图像分析系统作定量分析,求出该处平均光密度值。平均光密度值反映骨痂中骨矿物的含量,骨痂越致密,其平均光密度值也越高。(2)组织学检查:以胫骨截骨处为中心,包括上下骨端各1cm,截取标本后,制作切片,常规HE染色,光镜下观察对比各组标本骨折端相关组织细胞的演变过程。(3)BMP-2免疫组化染色(S-P法):将免疫组化标本染色切片,经显微镜输入

作者单位:201300 上海,复旦大学附属华山医院南汇分院(白祥);  
010030 呼和浩特,内蒙古医学院第二附属医院(李晓东、马志新)

计算机图像分析系统,然后对图像进行二值分割和处理,这时的图像显示为:背景为白色,染色部位为棕黄色,接着测量染色区光密度值,染色的深浅度与光密度值成正比,即组织细胞中 BMP 表达越强,染色越深,所测得的光密度值就越高。

6. 统计学方法:对测得的所有数据均用均数  $\pm$  标准差



图1 术后1周X线片

B、C组X线片上骨折端均可见极少量的外骨痂,呈点状或线状分布,骨折间隙明显,骨折端边缘略显模糊;A组未见外骨痂生长,骨折间隙明显,骨折端边缘清晰

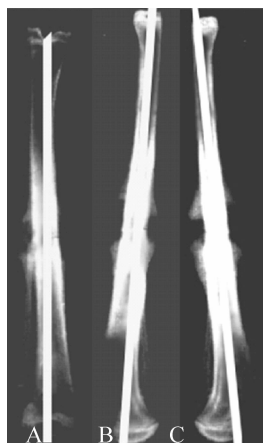


图2 术后2周X线片

外骨痂轮廓清晰,呈梭形膨大,但断端周围骨痂仍未连接;骨折线存在,骨折间隙变小。A组骨折线较为明显,B、C组骨折线模糊;C组骨折端骨痂量最多,B组次之,A组最少

( $\bar{x} \pm s$ )来表示,用SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理。判断组间差异有无统计学意义用方差分析,组与组之间的两两比较行 SNK 检验, $P < 0.05$  表明差异具有统计学意义。

## 结 果

1. X线片观察结果:见图1~图4。

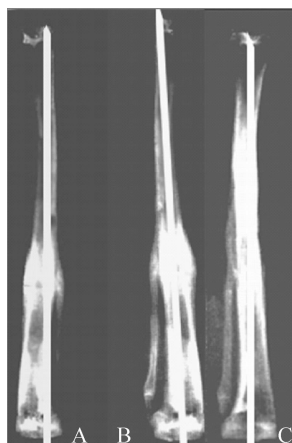


图3 术后4周X线片

外骨痂已完全包绕骨折断端,骨痂面积开始缩小。A组骨折线存在,B组骨折线模糊,C组骨折线消失;B组骨折端骨痂量最多,C组骨痂最致密且髓腔内骨痂有吸收迹象



图4 术后6周X线片

骨折端外骨痂继续缩小,表面较光滑致密,骨折线消失,髓腔内封闭骨痂有吸收改建迹象,尤以B、C组明显

2. X线片骨痂光密度检测:见表1、图5。

表1 术后不同时间3组兔胫骨骨折区域骨痂平均光密度值( $\bar{x} \pm s$ )

| 时间(周) | A组                | B组                | C组                     |
|-------|-------------------|-------------------|------------------------|
| 1     | $0.03 \pm 0.01^*$ | $0.09 \pm 0.05^*$ | $0.10 \pm 0.02^\Delta$ |
| 2     | $0.14 \pm 0.10^*$ | $0.47 \pm 0.17$   | $0.58 \pm 0.05^\Delta$ |
| 4     | $0.27 \pm 0.10^*$ | $0.59 \pm 0.13$   | $0.68 \pm 0.14^\Delta$ |
| 6     | $0.50 \pm 0.13$   | $0.67 \pm 0.09$   | $0.70 \pm 0.18$        |

A组与B组相比较, $^*P < 0.05$ ;A组与C组相比较, $^\Delta P < 0.05$ ;B组与C组相比较, $^*P < 0.05$

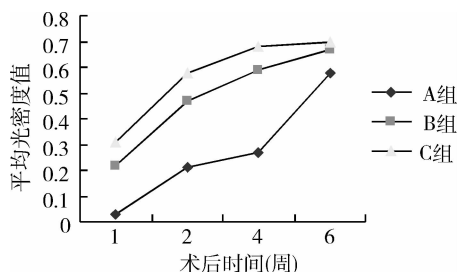


图5 术后不同时间3组兔胫骨骨折区域骨痂平均光密度值对比

3. 组织学观察结果:术后1周,B、C组组织切片可见大量增生密集的成纤维细胞和散在的炎性细胞,并可见少量软骨细胞;A组只见到大量增生密集的成纤维细胞和少量的炎性细胞,未见软骨细胞。术后2周,C组成纤维细胞明显减少,软骨细胞及成骨细胞明显增多;A组可见大量增生密集的成纤维细胞,同时可见软骨细胞及成骨细胞,但较C组为少;B组介于二者之间。术后4周,B、C组可见成纤维细胞及软骨细胞减少,而新生骨小梁增多,排列不规则,同时,C组可见重建的哈佛氏系统;A组可见大量成纤维细胞,其间可见软骨岛,并有新生骨小梁出现,但数量较少,排列较疏松。术后6周,B、C组骨小梁明显增多,此期未见成纤维细胞和软骨细胞,骨痂显示较成熟并开始向板层骨转化;A组骨小梁形成增多,但仍有少量软骨细胞,未见成纤维细胞,骨痂开始向编织骨转化。

4. BMP-2 免疫组化染色结果:见表2、图6。

## 讨 论

闭合性骨折手术时机一直是个有争议的问题。Sprague S 和张宏志等通过临床观察认为早期手术较

表 2 术后不同时间 3 组兔胫骨骨折区域 BMP-2 阳性表达平均光密度值( $\bar{x} \pm s$ )

| 时间(周) | A 组           | B 组           | C 组                  |
|-------|---------------|---------------|----------------------|
| 1     | 1.01 ± 0.22 * | 2.13 ± 0.53   | 2.54 ± 0.15 $\Delta$ |
| 2     | 1.42 ± 0.31 * | 2.53 ± 0.57 * | 3.04 ± 0.24 $\Delta$ |
| 4     | 0.47 ± 0.41 * | 1.01 ± 0.36   | 1.33 ± 0.33 $\Delta$ |
| 6     | 0.17 ± 0.49   | 0.29 ± 0.36   | 0.41 ± 0.19          |

A 组与 B 组相比较, \*  $P < 0.05$ ; A 组与 C 组相比较,  $\Delta P < 0.05$ ; B 组与 C 组相比较, \*  $P < 0.05$

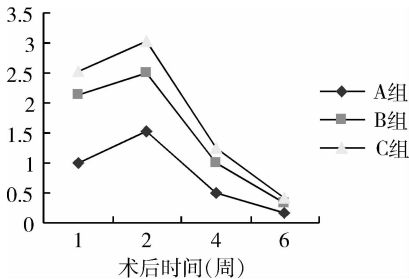


图 6 术后不同时间 3 组兔胫骨骨折区域 BMP-2 阳性表达平均光密度值对比

延期手术对于骨折愈合有明显优势<sup>[2-5]</sup>;而张耀旋、Nutz V 和 Charnley 等则认为延迟切开复位内固定意味着骨痂再骨折,可再次激活骨折局部释放成骨活性物质的能力,这有利于骨折愈合<sup>[6-9]</sup>。本实验研究结果显示,一定时间内延期手术(特别是延期 2 周)可加速骨折愈合,这与 Nutz V 等人的研究结果一致。延迟手术为什么能加速骨折愈合?确切机制仍不清楚,作者认为可能与下列因素有关:

1. 延期手术能加强和延长炎症反应:一些研究结果证实,骨折局部的创伤性炎症反应可加速骨愈合的进程,如果没有局部组织的炎症反应,骨愈合的时间将延长 2 ~ 10 倍<sup>[11]</sup>。骨折修复的炎症期,细胞和毛细血管的增殖最旺盛,这是因为骨及组织损伤局部可释放大量化趋化因子、血管形成因子和生长因子等活性物质,同时,炎性渗出液中含有细胞碎屑、坏死细胞、红细胞和血小板等,这些均为初期新生血管形成的必需品<sup>[8,12]</sup>。延期手术的二次损伤刺激能延长骨折部位的炎症期,并能加强骨折区域的创伤性炎症反应,由此而激发细胞增殖和新生血管的生长,同时还能促使血管周围细胞分化,成为成骨细胞及软骨细胞的源泉<sup>[12]</sup>。近年来研究显示,一些炎症因子参与调节 BMP-2 的表达,如 PGE<sub>2</sub>。Arikawa T 等通过研究发现,PGE<sub>2</sub> 可促进了 BMP-2 的表达<sup>[13]</sup>。有人于骨折后早期在骨膜下注射 PGE<sub>2</sub>,发现其能促进新骨形

成,在骨折愈合期应用 PGE<sub>2</sub> 抑制剂则能导致骨折延迟愈合<sup>[14]</sup>。此外,前炎症因子 IL-1、TNF- $\alpha$  也能上调 BMP-2 的表达<sup>[13]</sup>。

2. 延期手术能加强和延长生物因子的活性:王文良等通过实验研究发现,在骨折修复的早期(3 ~ 14 天),BMP-2 表达水平迅速提高,峰值位于骨折后第 2 周,骨折后第 3 周时 BMP-2 表达量即骤然回降,至第 8 周时已接近正常水平<sup>[15]</sup>。因而在骨折后 2 周,当 BMP-2 活动趋于减弱时,在一定时间内延期手术(特别是延期 2 周)的再次损伤刺激可以增强并延长 BMP-2 的活性,从而加速骨折愈合。这验证了二次损伤现象的确存在。

3. 其他:骨折时骨折区的血供受到损害,早期手术内固定再次损伤骨膜和软组织,又使骨折区血供损害加重,重建血管的时间延迟,对外骨痂生长不利;相反,延期手术内固定可刺激骨表面及其附近组织的血管,使与骨外膜血管恢复联系,进而与骨皮质、骨内膜及骨髓腔内的血管沟通。骨折区的血供得到重建,局部毛细血管及细胞增殖旺盛,骨膜也已增厚,所以手术创伤对局部血供干扰小,骨膜损伤轻,对外骨痂的生长较早期手术有利<sup>[6]</sup>。骨痂的形成是机体对骨折损伤的修复反应,而新骨的形成主要来自骨膜成骨细胞及其周围组织间叶细胞的增殖分化。在正常情况下它们是休止的,创伤刺激才能使它们增殖活跃,故在骨折区血供重建的基础上,延迟手术内固定也可成为骨折修复反应的新刺激,再次促进成骨细胞及间叶细胞的增殖和分化<sup>[6]</sup>。本实验结果也证实,B、C 组较 A 组骨痂出现早,骨痂量多,骨折线消失早,骨痂改建塑型早。

本实验结果从影像学方面已说明,在适当时间内延期手术内固定可加速骨折愈合,其机制主要是延期手术可以加强和延长骨折局部的炎症反应及成骨相关生物因子的活性,从而促进骨折愈合。当然,其促进骨折愈合的原因是多方面的,确切的机制有待于进一步研究。本实验仅将延期固定分为两组,即延期 1 周固定组和延期 2 周固定组,至于究竟延期多长时间最有利于骨折愈合,尚需进一步探讨。

参考文献

- 1 柴本甫,汤雪明. 实验性骨折愈合中毛细血管形成的超微结构研究[J]. 中华外科杂志,1982,20:369-370
- 2 蒋东明,王培民. 三叶形钢板内固定治疗新鲜 pilon 骨折(附 21 例报告)[J]. 骨与关节损伤杂志,2002,17(5):392-393
- 3 Sprague S, Bhandari M. An economic evaluation of early versus delayed operative treatment in patients with closed tibial shaft fractures

- [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2002, 122(6): 315 - 323
- 4 张宏志, 孙福祥, 闫树恒, 等. 股骨折早期与延期内固定的比较[J]. 骨与关节损伤杂志, 1991, 6(4): 208 - 209
  - 5 Bhandari M, Adili A, Leone J, et al. Early versus delayed operative management of closed tibial fractures [J]. Clin Orthop Relat Res, 1999, (368): 230 - 239
  - 6 Boldin C, Fankbauser F, Hoier H P, et al. Three year results of proximal tibia fractures treated with the LrSS [J]. Clin Oaho0 Relat Res, 2006, 445(4): 222 - 229
  - 7 马伯俊, 陈联源, 姜晓锐. 延期切开复位内固定治疗复杂 Pilon 骨折[J]. 中医正骨, 2007, 19(1): 40 - 42
  - 8 Influence of operative time on effect of the Pilon fracture [J]. Zhongguo Gu Shang, 2009, Oct, 22(10): 770 - 772
  - 9 Borrelli J Jr, Ellis E. Pilon fractures: assessment and treatment [J]. Orthop Clin North Am, 2002, 33: 231 - 245
  - 10 刘献祥, 余希杰, 许书亮. 无名异冲剂影响骨折愈合过程的组织学及 X 线定量研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 1998, 6(3): 11 ~ 13
  - 11 朱建民, 金宗达. 骨折愈合的分子生物学进展 [J]. 中华骨科杂志, 1993, 6: 458
  - 12 苏佳灿, 王家林, 张春才. 骨折愈合过程血管形成的影响因素 [J]. 中国骨伤, 2002, 15(3): 187
  - 13 Arikawa T, Omurak, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein - 2 expression by endogenous prostaglandinE - 2 in human mesenchymal stem cells [J]. cell physiol, 2004, 200(3): 400 - 406
  - 14 Goodship AE, Norroddin N, Francis M. The stimulation of prostaglandin synthesis by micromovement in fracture healing micromovement in orthopaedics [M]. London: university of oxford, 1992: 31 - 34
  - 15 王文良, 吴岳嵩, 王新伟, 等. 两种内固定后兔骨髓中成骨细胞内骨形态生成蛋白含量的比较 [J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(5): 321 - 322

(收稿: 2010 - 10 - 18)

(修回: 2011 - 06 - 22)

## 高糖通过上调 Axl 受体表达促进心肌成纤维细胞增殖

刘存飞 杨群芳 符江琳 徐 晓 陈星霖 刘承云

**摘 要** **目的** 探讨不同浓度糖在心肌成纤维细胞增殖中的作用及 Axl 酪氨酸激酶受体在血糖调控心肌成纤维细胞增殖中的作用。**方法** 分别用不同浓度糖孵育乳鼠心肌成纤维细胞, 48h 后分别检测细胞增殖、细胞周期以及 Axl mRNA 的表达量。**结果** (1) 高糖组心肌成纤维细胞增殖显著高于正常糖组 [OD490: 正常糖组 (5mmol/L)  $0.358 \pm 0.023$ ; 高糖组 (25mmol/L)  $0.446 \pm 0.036$ ;  $P < 0.01$ ]。 (2) 高糖显著促进 Axl 表达上调 (Ct 值: 正常糖组  $28.996 \pm 0.579$ ; 高糖组  $27.253 \pm 0.548$ ; 相对表达量:  $1: 2.63$ ;  $P < 0.05$ )。 (3) 高糖显著促进心肌成纤维细胞进入增殖周期 (正常糖组  $G_1\%$   $73.89 \pm 5.52$ ;  $G_2 + S + M\%$   $26.11 \pm 5.52$ ; 高糖组  $G_1\%$   $63.22 \pm 6.52$ ;  $G_2 + S + M\%$   $36.78 \pm 6.52$ ;  $P < 0.05$ )。 **结论** 高糖能够通过上调 Axl 受体表达促进离体培养乳鼠心肌成纤维细胞增殖, Axl 受体在糖尿病性心肌病变中有可能扮演重要作用。

**关键词** 心肌成纤维细胞 Axl 酪氨酸激酶受体 高糖 细胞增殖

**High Glucose Promote Cardiac Fibroblast Cell Proliferation by Inducing Up - regulation of Axl Receptor.** Liu Cunfei, Yang Qunfang, Fu Jianglin, Xu Xiao, Chen Xinglin, Liu Chengyun. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430022, China

**Abstract** **Objective** To investigate the effect of high glucose and normal glucose on the proliferation of cardiac fibroblasts and the role of Axl tyrosine kinase receptor in this process. **Methods** Cardiac fibroblasts of SD neonate rats (1 - 3 days) were separated and the 2 ~ 4 passage cardiac fibroblasts were used for experiments. Cultured cardiac fibroblasts were incubated with high concentration glucose (25mmol/L) and normal concentration glucose (5mmol/L). After 48 h, the cell proliferation, cell cycle and mRNA expression of Axl were measured by MTT, flow cytometry and real - time PCR, respectively. **Results** (1) Compared with the group of normal glucose (5mmol/L), cell proliferation was significantly higher in the group of high glucose (25mmol/L) (OD490:  $0.446 \pm 0.036$  vs  $0.358 \pm 0.023$ ;  $P < 0.01$ ). (2) The Ct value of Axl in the group of high glucose was lower and its relative expression was higher than that in the group of normal glucose (Ct value:  $27.253 \pm 0.548$  vs  $28.996 \pm 0.579$ ; relative expression: high glucose vs low glucose  $1: 2.63$ ;  $P < 0.05$ ). (3)  $G_2 + S + M\%$  in the group of high glucose was higher than that in the group of normal glucose ( $36.78 \pm 6.52$  vs  $26.11 \pm 5.52$ ;  $P < 0.05$ ). **Conclusion** High glucose could promote cardiac fibroblast cell proliferation by inducing up - regulation of mRNA of Axl. Axl receptor

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院老年科 (刘存飞、符江琳、徐晓、陈星霖、刘承云); 高压氧中心 (杨群芳)

通讯作者: 刘承云, 电子信箱: lcyun@medmail.com.cn