

实验研究

动态压应力对离体培养骨组织骨折愈合的作用研究

李可心 张碧辉* 钱民全** 陈楚楚* 董福慧 尚天裕 贝时璋*

中国中医研究院骨伤科研究所 (100700 北京)

Study of the Dynamic Compressive Stress Effects on Fracture Healings of Cultured Bone Organ in Vitro.

Li Kexin, Zhang Bihui, Qian Mingquan et al.

Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700, China

ABSTRACT: A mechanical apparatus was designed, which could offer intermittent compressive forces to the half-fractured bone organ cultured on the chick chorioallantoic membrane (CAM). The samples, cultured for a period of time, were harvested and in which we observed the process of fracture healing under the naked eyes, optical microscope, and electron scanning microscope. And the element concentration of the calcium and phosphorus in the callus of the fractured bone organ were also measured by the energy spectrometry. Results indicate, the model could eliminate the disturbances of the other biophysiological factors effectively except the forces offered by the model and advantage determining the effect of compressive force to fracture healing, and the compressive force offered by this model could improve fracture healing obviously.

KEY WORDS: compressive stress, cultivation in vitro, bone organ, fracture healing.

内容摘要: 采用鸡胚绒毛尿囊膜上培养经人工骨折的鸡胚胫骨,以自行设计机械加压装置施力于骨折线骨段。经培养后取出标本,行大体、光镜及扫描电镜观察骨折愈合情况,并运用能谱分析仪检测骨折修复组织钙磷元素的含量。结果表明:该模型可有效地排除其他生理因素的干扰,有利于单纯确定压应力对骨折的作用;本模型所提供的压力对骨折愈合有明显的促进作用。

关键词: 压应力,离体培养,骨组织,骨折愈合。

本实验模型采用鸡胚绒毛尿囊膜上培养经人工骨折的鸡胚胫骨,并设计了一套施加机械压力的装置,直接施加于骨折线两侧骨

段,实现骨折端的纵向挤压,以观察机械压应力对骨折愈合过程的影响。

* 中国科学院生物物理所 (100101 北京)
** 中国科学院力学所 (100080 北京)

材料与方法

1. 材料

1.1. 供体鸡胚: 孵育 15 天来亨鸡胚。

1.2. 受体鸡胚: 孵育 8 天来亨鸡胚。

2. 培养方法

取孵育 15 天来亨鸡胚作供体, 在无菌条件下取出鸡胚胫骨, 去除两端干骺端, 保留骨干长约 0.8~1.0cm, 以 11 号小尖刀在骨干中段作半离断, 造成实验性骨折, 将机械加压装置之两针分别插入骨折线两侧的骨段, 两针距离 0.6cm, 然后将其移植在孵育 8 天的同种受体的鸡胚绒毛尿囊膜上。受体鸡胚要预先在照蛋灯上选择开窗位置, 以微型钻砂轮打磨开窗。移植后以环氧树脂胶封闭窗口。将受体鸡胚安放在蛋座上, 稳固好机械加压装置, 放入有一定湿度(20%~25%), 温度在 38℃ 的培养箱中培养(图 1 见封二)。

3. 机械加压装置及加压

我们设计的机械加压装置通过传力杠杆上的两针可直接作用于培养骨器官骨折线两侧, 实现骨折端的纵向挤压。整套装置由一个定时电源, 脉冲控制系统, 电磁—机械力转换系统, 机械力传导杠杆和力的测量系统组成。这一装置可以通过信号发生转换提供间断压应力(3.10~5.10g), 施加力的值可以通过应力应变仪记录, 间断力值的记录波型为脉冲循环波型。

4. 病理切片

标本直接进入 4℃、40% 冷酒精, 后逐级以冷酒精脱水, 在 4℃ 二甲苯中透明后以甲基丙烯酸甲酯包埋。用 Rechat Jung S 重型切片机以钨钢刀切成 5μm 厚切片, 甲苯胺兰染色。

5. 扫描电镜标本制作

取培养第十天骨标本以生理盐水冲洗干净, 用 AO 恒冷箱(-25℃)切片机纵行切至矢状中位面, 以 3% 戊二醛固定, 逐级脱水后再以醋酸异戊酯脱脂, 真空临界点干燥并喷

金。扫描电镜(HITACHIS-570)观察, 并以与该镜相匹配的 EDA×9100 能谱仪测量骨折处元素含量。

结果

在模型的建立中, 以间断压应力(1HZ, 4 次/天, 30 分/次, 3.10~5.10g)施加于实验组。对照组为实验组同一鸡胚的对侧胚骨, 除未加力外, 其他条件同实验组, 每组获标本不少于 5 个。

1. 外观

成活供体骨都有绒毛尿囊膜包裹, 有丰富血管。培养至第 3 天, 供体骨骨折线明显, 第 6 天后变浅, 培养至第 8 天和第 10 天后, 骨折线多不清晰, 实验组常见隆起的白色骨痂。

2. 病理切片观察

培养至第 3 天的供体骨, 骨折线明显, 有血性物质和纤维组织充填, 实验组与对照组差别不大。至第 6 天, 实验组骨折端相互靠拢, 由纤维性组织连接, 骨膜大部愈合, 而对照组骨折端较分离, 骨膜未连接。培养至第 6 天的骨组织呈成骨活跃期, 成骨细胞丰富, 活跃, 血管也较丰富。培养至第 8 天, 实验组的骨折处已为骨性连接, 但排列尚不完好, 骨折线依稀可见, 对照组骨折线则较明显, 此时实验组的骨膜较厚, 皮质骨也较丰满。培养至第 10 天, 实验组骨折处排列基本正常, 但也可见血肿尚不完全吸收者, 骨皮质厚度明显大于对照组, 骨小梁也较宽大。在某些标本可见外骨痂的形成(图 2, 3 见封三)。

3. 扫描电镜观察

培养第 10 天的骨标本, 对照组中偶见骨端不连接现象(图 4 见封三), 而实验组愈合良好(图 5 见封三)。

4. 骨折修复组织元素含量分析

我们用能谱分析仪分析了培养第 10 天的骨组织骨折修复处钙、磷、铁、铜、锌五种元素的含量, 但只发现钙、磷两种元素含量与对

对照组有明显差异。

表1 骨折修复组织磷元素含量

P-CPK	CONTROL	EXPERIMENT
1	44.0369	72.8508
2	95.7069	127.4962
3	64.2459	211.3152
4	80.9084	179.0060
5	31.9116	89.6190
MEAN	63.3619	136.0575

经t检验,实验组与对照组间均数有明显差异(P<0.01)

表2 骨折修复组织钙元素含量

CA-CPK	CONTROL	EXPERIMENT
1	19.0862	160.6630
2	68.2014	146.1559
3	91.6363	228.7397
4	78.0766	243.9955
5	102.2215	76.6558
MEAN	71.8448	171.2620

经t检验,实验组与对照组间均数有明显差异(P<0.01)

讨论

正如 Glucksmann^[1]所说,由于实验动物存在着复杂的生理环境,如肌肉、神经、内分泌等诸多因素,故单纯确定应力对骨的作用几乎是不可能的,离体骨组织培养却可有效地排除复杂的生理因素干扰。但是,由于组织培养只能采用细小的骨组织,因而给骨组织施加压应力是比较困难的,特别是直接对培养骨组织人工骨折处施以纵向压力在现有文献中尚未见有报导。本实验采用的新模型较为满意地解决了这一问题。

绒毛尿囊膜培养骨组织,成活率在本实验可达60%以上,与 Takahashi^[2]报导相似

(70%),骨折愈合快且质量好,方法简单,可省去合成培养基所需换液等程序。这些优点适合于运用机械压力装置直接作用于骨组织进行骨组织生长、修复效应的研究。我们将加力装置稳固在蛋壳上而不必另行支具。但操作精细,需要助手配合,且有一定死亡率。死亡原因一是受体鸡胚死亡,二是供体骨未安放在绒毛尿囊膜上或移植前即已死亡。其中操作时间过长造成受体和供体鸡胚死亡,以及培养过程中污染是重要致死因素。

从实验中观察,间断压应力对培养骨组织人工骨折愈合过程有明显的促进作用,既可影响骨的连接,也可影响骨内元素含量。对照组中出现骨不连接可反映临床中在失却应力刺激和应力替代情况下常常发生迟缓愈合和不愈合的现象。

小结

离体培养骨组织骨折愈合生物力学模型的建立,使骨折愈合生物力学研究深入到组织培养水平。这一模型可去除复杂生理因素的干扰,易于控制处理因素,有利于骨折愈合的机理研究。从实验中观察到,在生理范围内压应力可以促进骨折愈合,并加速骨修复组织的钙磷沉积。

参考文献

1. Glucksmann A; The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. J of Anat. 1942;76:231.
2. Takhashi K, Shanahan M, Coulton L, et al; Fracture healing of chick femurs in tissue. Acta orthop Scand. 1991;62(4):352.

(收稿日期:1995年11月11日)

(国家自然科学基金资助项目)