

失神经状态下胫骨骨折断端骨痂成骨的组织学变化

林基

Histological changes of callus osteogenesis at tibial fracture site in denervated rats

Lin Ji

Abstract

BACKGROUND: Previous study showed that nervous system plays an important role in the fracture reconstruction. However, the concrete mechanism has not been totally expounded yet. The effect of central nervous and nerve growth factor on callus was rarely reported.

OBJECTIVE: To observe histological changes of callus osteogenesis at tibial fracture site in denervated rats.

METHODS: SD rats were prepared for closed fracture with left tibial intramedullary fixation models and were randomly assigned into 3 groups: Simple left tibial fractures group, T₁₀ spinal cord transection group: Based on the tibial fracture models, 0.3 cm T₁₀ spinal cord was transected and removed. Nerve growth factor group: Based on the frontal models, intramuscular injecting nerve growth factor. The morphological changes of bone tissues were observed by hematoxylin-eosin staining. The condition of osteogenesis in callus was observed by osteocalcin immunohistochemistry and the microstructure of osteoblasts was detected under a transmission electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The osteoblasts quantity was decreased, osteocalcin decreased and osteoblasts organelle functions lowered in the T₁₀ spinal cord transection group. Compared with the T₁₀ spinal cord transection group, these indexes in the nerve growth factor group were improved. The findings demonstrated that nerve growth factor can partly improve bone tissue regeneration in denervate state.

The People's Hospital of Wenchang City, Wenchang 571300, Hainan Province, China

Lin Ji, Attending physician, the People's Hospital of Wenchang City, Wenchang 571300, Hainan Province, China
454021106@qq.com

Received: 2010-08-06
Accepted: 2010-11-13

Lin J. Histological changes of callus osteogenesis at tibial fracture site in denervated rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(50): 9317-9320. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 有研究表明神经系统在骨折的修复重建中发挥重要的作用,但其具体机制尚未阐明,中枢神经及神经生长因子对骨痂中成骨的影响至今少有报道。

目的: 观察失神经状态下胫骨骨折断端骨痂成骨的组织学变化。

方法: 用SD大鼠建立左胫骨闭合骨折髓内固定大鼠模型,建模成功后随机为3组,左胫骨骨折组;T₁₀脊髓横断组:于左胫骨骨折后,横断切除T₁₀段脊髓约0.3 cm,制成T₁₀脊髓完全性损伤大鼠胫骨骨折模型;神经生长因子治疗组:建立T₁₀脊髓完全性损伤大鼠胫骨骨折模型后,肌注神经生长因子。术后各组均用苏木精伊红染色法观察骨组织形态变化,骨钙素免疫组织化学法观察骨痂中成骨情况,透射电镜观察成骨细胞内微结构变化。

结果与结论: T₁₀脊髓横断组大鼠在失神经状态下,骨痂中成骨细胞的数量减少,骨钙素表达减少,成骨细胞内细胞器功能低下。神经生长因子治疗组的以上各组织学观察指标均较T₁₀脊髓横断组均有不同程度的改善。结果显示,神经生长因子可部分改善脊髓横断失神经状态下的骨组织再生情况。

关键词: 失神经;胫骨骨折;断端骨痂骨化;大鼠;骨组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.50.002

林基. 失神经状态下胫骨骨折断端骨痂成骨的组织学变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50):9317-9320. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在骨折愈合过程中,骨痂的形成和重建是在神经系统的调节下进行的,完整的神经支配对正常的骨折愈合是十分重要的^[1]。神经纤维除了动作电位传导信息外,也通过快速轴突运输或突触释放多种神经递质、调节因子通过旁分泌作用于骨组织^[2]。失神经状态下骨折愈合早中期骨痂大量生长,但后期力学强度差,说明软骨性骨痂向骨性骨痂转化时存在障碍。实验以此观察脊髓完全性损伤对大鼠胫骨骨折断端骨痂骨化的影响,以期明确失神经对骨折愈合的影响,进一步探讨中枢神经对骨组织再生的作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-01/2010-02在文昌市人民医院动物实验室完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级3月龄Sprague-Dawley雄性大鼠30只,体质量250~300 g,由解放军第二军医大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0003。实验中对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[3]。

文昌市人民医院,海南省文昌市571300

林基,男,1969年生,海南省文昌市人,1996年海南医学院毕业,主治医师,主要从事临床骨科治疗工作。海南省文昌市571300
454021106@qq.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)50-09317-04

收稿日期:2010-08-06
修回日期:2010-11-13
(20100224004/WJ-Z)

主要仪器及试剂:

试剂及仪器	来源
神经生长因子	舒泰神(北京)生物制药股份有限公司
全自动图像分析仪	日本日立公司
透射电镜	荷兰 Philips 公司
兔抗人骨钙素单克隆抗体, 羊抗兔 IgG	上海奇美生物科技有限公司
链霉素抗生物素一过氧化物酶	武汉博士德生物工程有限公司

实验方法:

分组: 将SD大鼠随机分成3组: 左胫骨骨折组; T₁₀脊髓横断组; T₁₀脊髓横断+左胫骨骨折; 神经生长因子治疗组: T₁₀脊髓横断+左胫骨骨折+肌注神经生长因子, 每组10只。

左胫骨骨折模型的制备: SD大鼠30只均以质量浓度为100 g/L水合氯醛300 mg/kg腹腔注射麻醉, 手术时根据角膜反射确定麻醉深度, 如术后麻醉过深则用美解眠腹腔注射拮抗。麻醉生效后大鼠仰卧位固定在大鼠板, 左胫骨中段前内侧切口, 左胫骨前弓状缘上0.3 cm上1/3处咬断胫骨, 咬骨时尽量先咬断一侧皮质, 再横截咬断, 无菌条件下从胫骨平台前缘插入一根预制的消毒医用克氏针0.8 mm(上海医用缝合针厂)行髓内固定插至最大限度, 咬断外端的克氏针, 依次缝合皮下、皮肤, 左下肢石膏固定^[4]。

脊髓完全性损伤动物模型的制备: 将20只左胫骨骨折SD大鼠进行备皮、消毒、定位, 背部正中切口, 用自备特制椎板咬骨钳显露T₁₀段脊髓, 脊髓损伤组用尖刀将脊髓横断, 切除约2 mm。创面撒少量青霉素粉, 逐层缝合肌肉与皮肤, 术后分笼饲养。术后每隔6 h(至少1次/d)脊髓损伤的大鼠挤尿1次, 术后3~5 d内肌注青霉素^[5]。

神经生长因子治疗组肌注神经生长因子2 000 AU, 1次/d, 分别注射两侧腓肠肌, 连续肌注2周^[6]。

苏木精-伊红染色: 所有动物均于术后28 d处死, 处死前用体积分数10%水合氯醛麻醉, 断头处死, 以骨折处为中心取1 cm长大鼠胫骨固定于40 g/L多聚甲醛中24 h, 之后放入体积分数10%二乙胺四乙酸(EDTA)溶液中脱钙, 每周换3次脱钙液, 经三四周脱钙, 用针头能轻易扎穿骨皮质, 则脱钙充分, 拔除髓内针, 骨折远、近端各保留0.5 cm切取骨痂组织。组织经脱水、透明、浸蜡到包埋, 切取5 μm切片行苏木精-伊红染色, 观察骨痂形成情况^[7]。

骨钙素免疫组化染色: 石蜡切片脱蜡至水, 体积分数3% H₂O₂封闭内源性氧化物酶, 加体积分数10%牛血清白蛋白封闭, 倾去血清, 勿洗; 加入稀释后的兔抗人骨钙素一抗工作液, 4 °C冰箱过夜; PBS冲洗, 滴加适量生物素标记的羊抗兔IgG二抗工作液; PBS冲洗, 链霉

素抗生物素一过氧化物酶工作液滴于切片上, 室温30 min; PBS冲洗, 显色, 封片充分水洗, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固^[8]。

将切片在倒置相差显微镜下进行观察, 并行图像采集和分析。用全自动图像分析仪测量阳性表达物: 每张切片随机选取5个不重叠视野, 光区调整灰度, 然后对细胞的阳物物质进行二态化图像修正, 400倍高倍镜下算吸光度值(A)。结果判定: 在光学显微镜下观察并照相, 骨钙素阳性表达为褐色。请两位病理学专业人员依免疫组织化学检查结果按强阳性, 弱阳性, 阴性进行分级^[9]。

透射电镜观察: 各组动物于骨折后第4周, 于水合氯醛麻醉下每组3只大鼠迅速取外骨痂(包括骨外膜骨痂, 桥梁骨痂)小块组织, 将新鲜骨痂尽可能锯成1.0~2.0 mm³大小放入脱钙液中, 每周换2次脱钙液, 直到用针头可刺透标本。经过漂洗, 乙醇梯度脱水, 浸透, 包埋等步骤^[10], 用超薄切片机切片, 枸橼酸铅电子进行染色, 最后用透射电镜进行观察。

主要观察指标: 骨组织形态变化、骨痂中骨钙素表达情况和成骨细胞内微结构变化。

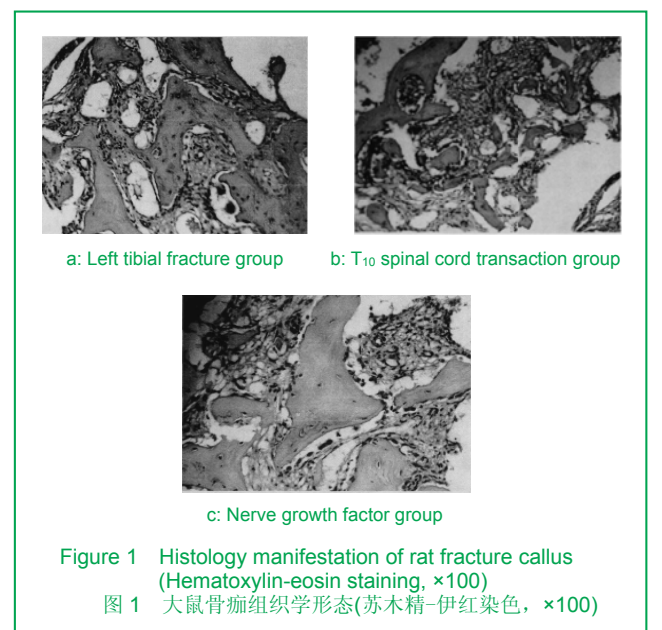
设计、实施、评估者: 实验的设计、实施和评估均由第一作者完成, 受过专业培训。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 12.0软件对结果数据进行方差分析和LSD-*t*检验; 计数资料用 χ^2 检验检测, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 30只大鼠全部进入结果分析, 无脱落。

2.2 失神经状态下骨痂的组织学形态 见图1。



左胫骨骨折组有较多的软骨痂和骨痂形成, 以编织

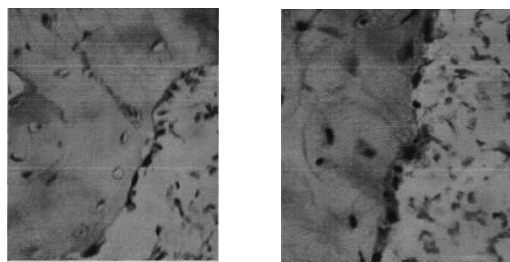
骨为主, 编织骨多且粗, 编织骨边缘可见大量的成骨细胞; 编织骨内可见较多的骨细胞, 骨细胞边缘有陷窝, 陷窝深, 偶见破骨细胞; 编织骨内可见钙盐线, 钙盐线粗大, 色深。T₁₀脊髓横断组仍可见大量纤维骨痂, 软骨团多见, 其内有少许编织骨形成, 编织骨较为纤细, 边缘可以见到成骨细胞, 但数量不多; 编织骨内骨细胞少, 看不到破骨细胞, 钙盐线不清晰。神经生长因子治疗组纤维骨痂与骨痂参半, 编织骨较粗大, 可见成骨细胞在骨痂的边缘, 但是其数量不多, 骨陷窝不深, 未见破骨细胞, 编织骨内可见钙盐线, 钙盐线比较粗, 色浅。

2.3 失神经骨痂中骨钙素的表达 大鼠胫骨骨痂骨钙素免疫组化中可见成骨细胞及骨陷窝里的骨细胞均为阳性, 左胫骨骨折组骨钙素表达信号明显高于其他两组, 阳性染色呈深褐色。T₁₀脊髓横断组、神经生长因子治疗组骨钙素信号强度显著低于左胫骨骨折组 ($P < 0.05$), 神经生长因子治疗组骨钙素信号强度显著高于T₁₀脊髓横断组 ($P < 0.05$), 见表1, 图2。

表1 骨钙素免疫组化信号强度
Table 1 Comparison of immunohistochemistry osteocalcin signal intensity among three groups

Group	Osteocalcin signal number (n)		
	Strongly positive	Weakly positive	Negative
Left tibial fracture	9	2	0
T ₁₀ spinal cord transection	7 ^a	3	2
Nerve growth factor	8 ^{ab}	2	1

^a $P < 0.05$, vs. left tibial fracture group; ^b $P < 0.05$, vs. T₁₀ spinal cord transection group



a: Left tibial fracture group b: T₁₀ spinal cord transection group



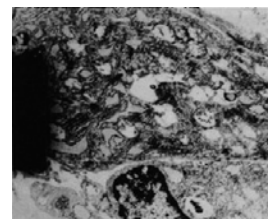
c: Nerve growth factor group

Figure 2 Expression of osteocalcin in denervated callus (Immunohistochemistry staining, $\times 100$)

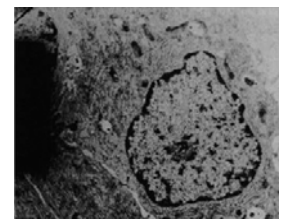
图2 失神经骨痂中骨钙素的表达(免疫组织化学染色, $\times 100$)

2.4 失神经状态下成骨细胞的超微结构 透射电镜下

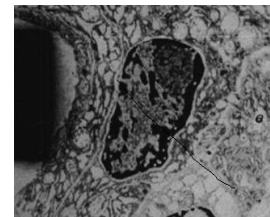
示脱钙骨痂中的成骨细胞结构: 3种骨痂中的成骨细胞有明显不同, 细胞的形态上, 左胫骨骨折组的成骨细胞呈突起显著, 细胞边缘不光滑, 皱折明显。T₁₀脊髓横断组细胞突起少, 细胞缘平整, 神经生长因子治疗组的细胞突起细长, 细胞边缘略有皱折, 细胞内的细胞器主要表现在粗面内质网数量及形态上有不同, 左胫骨骨折组, 粗面内质网粗大, 扩张明显, 同时线粒体发达。T₁₀脊髓横断组粗面内质网无明显扩张, 不发达, 还可以见到数量较多溶酶体, 神经生长因子治疗组粗面内质网形态介于以上两组之间, 粗面内质网扩张, 并可见到大量的高尔基, 见图3。



a: Left tibial fracture group



b: T₁₀ spinal cord transection group



c: Nerve growth factor group

Figure 3 Ultrastructure of osteoblasts (Electron microscopic observation, $\times 6000$)

图3 成骨细胞的超微结构(电镜观察, $\times 6000$)

3 讨论

实验成功建立了失神经大鼠骨折模型, 造成胫骨骨折和髓内固定, 有效减少了骨折端微动及肢体负重对骨折愈合的影响, 类似于骨折修复的一期愈合; 动物选择合理, 模型稳定、有效而可行, 真实地模拟了临床胫骨骨折的愈合及治疗, 符合实验要求。

骨折愈合4周左右是成骨细胞向骨细胞转化重要时期^[11]。实验发现正常大鼠骨折第4周时, 部分骨痂已由软骨性骨痂转变成骨性骨痂, 且开始由编织骨向板层骨转变, 形成骨单位, 成骨细胞大量位于编织骨边缘, 分泌的胶原组织经钙盐沉积并相互融合将成其包围, 形成陷窝, 变成骨细胞。失神经状态下成骨细胞数量少, 部分骨痂仍停于软骨性骨痂, 未形成编织骨, 钙盐线也较浅细, 与力学强度差相吻合^[12]。应用神经生长因子的大鼠, 骨痂形态显著改善, 成骨细胞数量及I型胶原分泌增多, 在骨痂中可见较宽大的钙盐线及板层骨, 但骨痂中陷窝的骨细胞相对较少, 说明其钙化或骨痂的成熟度

较正常的骨折愈合差, 但比单纯失神经状态下的骨痂骨化的成熟度高。

骨钙素是代表骨代谢瞬间变化的一个灵敏、特异和准确的生化标准^[13], 与骨转化有关^[14]。实验结果显示: 3组大鼠胫骨骨折后第4周编织骨骨钙素免疫组中成骨细胞及骨陷窝里的骨细胞均呈阳性反应, 左胫骨骨折组中骨钙素阳性表达信号明显多于其他两组。与左胫骨骨折组比较T₁₀脊髓横断组骨钙素的表达受抑制, 说明失神经状态下成骨活力不强, 骨正常矿化受到影响, 沉积在骨基质中的骨钙素量明显较正常骨痂少, 给予神经生长因子后, 骨痂中骨钙素的表达增加, 说明神经生长因子能促进骨钙素的分泌, 增加骨矿化, 使失神经的骨痂骨化程度有较大提高。

成骨细胞控制破骨细胞的生成、成熟及活化^[15]。实验中左胫骨骨折组成骨细胞呈正常的突起, 细胞边缘不光滑, 皱折明显; 而T₁₀脊髓横断组的细胞突起少, 细胞边缘平整; 神经生长因子治疗组的细胞突起细长, 细胞边缘略有皱折。线粒体上的钙粒经脱钙后虽然不存在, 但仍可见线粒体扩张、内膜加深, 出现开口; 脱钙不彻底时可见钙颗粒向成骨细胞外脱离。T₁₀脊髓横断组线粒体的嵴相对浅, 膜较薄, 线粒体不活跃。神经生长因子治疗组介于两者之间, 线粒体膜相对深, 但扩张不显著。3组细胞器的变化主要体现在粗面内质网的数量及形态差异。左胫骨骨折组: 粗面内质网粗大, 扩张明显; T₁₀脊髓横断组: 粗面内质网扩张小, 不发达, 还可见溶酶体; 出现大量溶酶体可能与失神经状态下细胞内的炎症反应有关, 溶酶体的出现标志着失神经状态下, 成骨细胞的细胞器受到一定的损害。神经生长因子治疗组: 粗面内质网出现扩张形态介于以上两组之间, 并可见到高尔基体, 亦有合成细胞基质的功能。实验结果提示神经系统对骨发育骨形成有影响且骨钙素增加了细胞器的活性。引起骨痂钙化障碍的原因很多, 但脱钙后可清晰的显示细胞内细胞器数量的改变, 提示失神经状态下成骨细胞内的细胞器有损伤。一些体外研究发现, 神经生长因子可直接影响骨细胞的功能状态, 刺激成骨细胞的增殖或抑制破骨细胞的骨吸收作用^[16]。

总之, 失神经状态下成骨细胞的数量减少, 骨钙素形成不足, 抑制骨痂中成骨细胞的细胞器功能, 降低粗面内质网活性, 减少骨基质而影响正常的骨愈合。因此, 神经生长因子可部分改善脊髓横断失神经状态下的骨组织再生情况。

4 参考文献

[1] Giangregorio L, McCartney N. Bone loss and muscle atrophy in spinal cord injury: epidemiology, fracture prediction, and rehabilitation strategies. *J Spinal Cord Med.* 2006;29(5):489-500.
 [2] Jiang SD, Dai LY, Jiang LS. Osteoporosis after spinal cord injury. *Osteoporos Int.* 2006;17(2):180-192.

[3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
 [4] Ma C, Gou SH, He F, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;11(10):1854-1857.
 马骋, 苟三怀, 何仿, 等. 大鼠胫骨骨折愈合过程中 I、II 型胶原蛋白的表达: 失神经状态下 Western blot 方法测定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 11(10): 1854-1857.
 [5] Yuan C, Gou SH, Ouyang YP, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;11(10):1854-1857.
 袁春, 苟三怀, 欧阳跃平, 等. 坐骨神经和 T10 椎体部脊髓损伤对大鼠股骨干骨折早期骨痂生成的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(28): 5146-5150.
 [6] Dooley PC, Howgate ML, Schuijers JA, et al. Early callus of fractured rib of rat contracts and relaxes ex vivo. *J Orthop Res.* 2004;22(5):1063-1071.
 [7] Tingart M, Beckmann J, Opolka A, et al. Influence of factors regulating bone formation and remodeling on bone quality in osteonecrosis of the femoral head. *Calcif Tissue Int.* 2008;82(4):300-308.
 [8] Konttinen YT, Imai S, Suda A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. *Acta orthop Scand.* 1996;67(6):632-639.
 [9] Pramanik N, Mishra D, Banerjee J, et al. Chemical synthesis, characterization, and biocompatibility study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications. *Int J Biomater.* 2009;2009: 512417.
 [10] Wang D, Yang Z, Zhang J, et al. Treatment of spinal cord injury by mild hypothermia combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2010;24(7):801-805.
 [11] Sohaskey ML, Jiang Y, Zhao JJ, et al. Osteopotential regulates osteoblast maturation, bone formation, and skeletal integrity in mice. *J Cell Biol.* 2010;189(3):511-525.
 [12] Bolarin DM, Azinge EC. Osteocalcin and specific markers of bone resorption in sickle cell disease. *Acta Physiol Hung.* 2010;97(3):290-296.
 [13] Seidlitz EP, Sharma MK, Singh G. Extracellular glutamate alters mature osteoclast and osteoblast functions. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010;88(9):929-936.
 [14] Shiraki M, Yamazaki Y, Shiraki Y, et al. High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(5):578-584.
 [15] Park YH, Han DW, Suh H, et al. Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured rat calvarial osteoblast. *Cell Biol Toxicol.* 2003;19(5):325-337.
 [16] Halvorson KG, Kubota K, Sevcik MA, et al. A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone. *Cancer Res.* 2005;65(20):9426-9435.

来自本文课题的更多信息--

致谢: 由衷感谢上海第二医科大学细胞生物学教研室的各位老师 在透射电镜检查方面给予的帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 临床骨折治疗中常遇到中枢神经损伤的四肢骨折患者, 骨折愈合过程中骨痂生成很多, 但是力学强度差。本实验通过建立伴中枢神经损伤(T₁₀ 脊髓节段完全性损伤)的 SD 大鼠胫骨骨折模型, 模拟人骨折修复的一期愈合过程; 苏木精伊红染色了解骨组织形态变化, 骨钙素免疫组化观察骨痂中成骨情况, 透射电镜观察成骨细胞内微结构变化, 进一步观察失神经对骨折愈合的影响及神经生长因子的作用, 为临床骨折的治疗提供实验依据。

存在着的偏倚与不足: 神经系统是一种网络式结构, 该课题设计的 T₁₀ 脊髓神经的横断模式, 严格意义上并不是一种完全的失神经支配的状态。此外, 实验大鼠肌注神经生长因子的剂量较为单一, 未形成剂量梯度, 对精确地摸索神经生长因子剂量有一定影响。

提供临床借鉴的价值: 文章对临床上骨折伴脊髓损伤患者的治疗提供了实验依据。