

· 基础研究 ·

成纤维细胞在体外冲击波治疗骨不连愈合过程中的作用

钟俊 刘世清 彭昊 明江华

【摘要】目的 探讨成纤维细胞在体外冲击波治疗骨不连愈合过程中的作用。**方法** 将 30 只日本大耳白兔制作骨不连模型(外固定支架固定),12 周后经拍片证实共获得骨不连模型动物 27 只,随机分为治疗组(14 只)和对照组(13 只)。全麻下治疗组动物行体外冲击波治疗,在骨不连两断端相对应部位各冲击 1 000 次,能量为 0.54 mJ/mm^2 ,频率为 60 次/min,冲击波治疗一次完成。对照组仅行外固定支架固定。通过组织学及电镜观察冲击波治疗 2 周、6 周骨不连断端成纤维细胞的成骨情况。**结果** 体外冲击波造成骨不连断端的微骨折,启动骨不连的愈合状态;治疗组 9 例骨不连有 8 例愈合,对照组 9 例骨不连有 3 例愈合,经 χ^2 检验, χ^2 值为 5.84, $P < 0.05$,差异有统计学意义。电镜下发现冲击波治疗 2 周后成纤维细胞与成骨细胞一样能够合成有周期性横纹的胶原纤维,冲击波治疗后 6 周形成骨陷窝,有明显的成骨作用。但在对照组却没有观察到明显的成骨作用。**结论** 成纤维细胞在冲击波刺激下被激活,能够合成胶原纤维并形成骨陷窝,因此在骨不连愈合过程中起重要作用。

【关键词】 成纤维细胞; 体外冲击波; 骨不连; 成骨

The role of fibroblasts in bone healing with extracorporeal shock wave treatment ZHONG Jun, LIU Shi-qing, PENG Hao, MING Jiang-hua. Department of Orthopaedics, Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of fibroblasts in nonunion fracture healing using extracorporeal shock wave (ESW) treatment. **Methods** Thirty healthy rabbits were selected to make the models of non-union fractures of the right tibias, which were then held apart by external fixation. 12 weeks after the operation, hypertrophic non-unions were confirmed in 27 of the rabbits by radiography. These 27 were divided randomly into a treatment group and a control group. The test animals were treated with ESW under general anaesthesia. The two ends of the nonunion fracture were shocked 1 000 times at 0.54 mJ/mm^2 and a frequency of 60 times/minute. The nonunions of the control group were treated with external fixations only. Histological examination and transmission electron microscopy (TEM) were conducted after 2 and 6 weeks. Standardized radiographs were taken after 12 weeks of the shock wave treatment. **Results** ESW induced microfractures, which initiated the healing process of the nonunion fractures. X-rays showed that 8 of the 9 fractures of the treatment group had healed after 12 weeks of EWS treatment, but only 3 of the 9 in the control group had healed. Statistical analysis showed that this difference was significant at the 5% level. After 2 weeks of ESW treatment, TEM showed many collagen fibers around the fibroblasts in the treatment group, with characteristic and periodic transverse lines. This indicated that the fibroblasts had been secreting collagen fibers as osteoblasts. Six weeks later, osteoblasts and fibroblasts had formed bone lacunes, and they had become osteocytes. However osteogenetic activates were not found in the control group. **Conclusions** Fibroblasts are activated by ESW to better form bone tissue. This process plays an important role in rebuilding broken bones.

【Key words】 Fibroblasts; ESW; Non-unions; Osteogenesis

骨不连是临床上的常见病,据统计,约(5~10)%的骨折可因各种因素发生骨折延迟愈合或不愈合^[1]。骨折端形成大量纤维瘢痕组织,骨折处于一种类似休眠的生物学状态。由于局部伤情复杂,缺乏理想的治疗方法,骨不连的治疗一直是困扰临床医生和基础医学工作者的一大难题,目前成纤维细胞作为诱导性骨祖细胞,因其在体内分布广泛、数量巨大、分裂增殖迅

速成为研究的焦点。体外冲击波可造成骨不连断端粉碎性微骨折^[2],骨折后骨折处的炎症和炎症反应可募集骨祖细胞^[1],使其处于静止状态的成骨细胞和来自髓腔及邻近软组织的原始成纤维细胞发生聚集和增殖,从而启动骨愈合而参与骨连接。该实验的目的在于通过动物实验了解体外冲击波治疗骨不连过程中成纤维细胞的作用。

材料与方法

一、材料

健康雄性日本大耳白兔 30 只(由武汉大学医学院动物实验中心提供),体重 1.8~2.0 kg,月龄 3.5~4.5 个月。HX902III 型多功能冲击波碎石机; Philips EM-400T 型透射电子显微镜; 2% 戊二醛溶液, 1% 锇酸溶液, 脱钙液(甲酸-加酸钠溶液, 按一定比例配制)。

二、方法

1. 骨不连模型制作: 在“切除截骨骨不连模型”的基础上加以改进, 制作骨不连模型。以 3% 戊巴比妥钠按 1 ml/kg 体重行静脉麻醉。于兔右侧胫骨中段截取胫骨 0.8 cm, 保持骨缺损 0.8 cm, 以自制外固定支架固定骨折患处。12 周后, 经 X 光拍片证实为肥大型骨不连(骨折间隙仍存在, 骨折端硬化, 骨髓腔封闭)的白兔 27 只, 随机分为两组, 治疗组 14 只, 对照组 13 只。治疗组行体外冲击波治疗, 对照组不作任何治疗。

2. 体外冲击波治疗: 冲击波治疗为一次性完成。动物在全麻状态下(麻醉方法同前), 患肢剃毛, 湿润, 固定在冲击波碎石机的压缩式水囊上面, 调整冲击波焦点, 分别对准骨不连远、近端边缘相对应部位, 各冲击 1 000 次, 所用能量为 0.54 mJ/mm², 频率为 60 次/min。

3. 冲击波治疗后 2 周、6 周、12 周分别行骨不连即动物右胫骨 X 线拍片——标准正位片。条件为: 电压 50 kV, 时间 0.1 s, 电流 125 mA, 距离为 100 cm。

4. 组织学检查: 分别于冲击波治疗后 2 周、6 周, 每组任取 2 只动物处死, 均取原骨不连部位组织进行脱钙、固定、石蜡包埋, HE 染色后光镜检查。

5. 透射电子显微镜检查: 于组织学检查取标本的同时, 取冲击波治疗后 2 周、6 周的骨不连部位组织进行电镜检查。快速取出标本后立即以 2% 的戊二醛溶液固定, 5 d 后以甲酸-加酸钠溶液行脱钙处理。以针刺法确定完全脱钙后, 用 1% 锇酸后固定, 逐级酒精脱水、浸透、包埋、超薄切片, Philips EM-400T 型透射电镜观察。

三、统计学分析

统计学分析采用 SPSS 11.0 版统计软件行 χ^2 检验。

结 果

一、一般结果

两组动物共 27 只, 分别于治疗 2 周及 6 周每组各处死 2 只动物以供检查。治疗组中 1 只因伤口感染死亡, 冲击波治疗 12 周拍片示剩余 9 只中有 8 只达骨性愈合(图 1), 1 只表现为纤维连接, 有假关节形成。对照组 9 只动物中 3 只骨性愈合, 6 只仍为骨不连。行

χ^2 检验, $\chi^2 = 5.84$, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

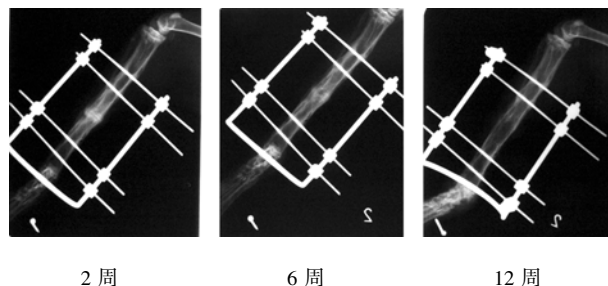


图 1 冲击波治疗后愈合情况

二、组织学检查结果

冲击波治疗 2 周治疗组组织学检查发现: ①骨外膜大量成骨细胞聚集, 呈栅栏状排列, 其胞核大, 深蓝色, 圆形、椭圆形或呈柱状, 处于活跃增生状态, 并见大量的成纤维细胞散在于成骨细胞间, 或在栅栏状排列的成骨细胞的外面不规则排列(图 2)。②原骨不连纤维连接处见间充质细胞呈活跃增生, 大量排列有序的成纤维细胞。细胞核浓染, 细胞处于活跃增生状态。③对照组则显示骨折端仍为纤维组织, 表现为一些均质样物质, 少量的有形细胞, 且其间可见灶性坏死, 大量的慢性炎症细胞(图 3)。

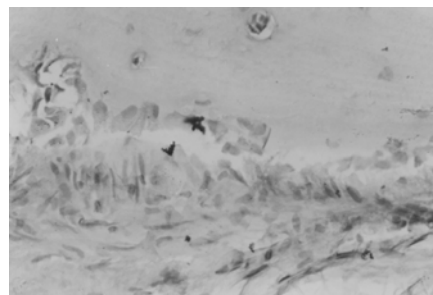


图 2 骨膜外成骨细胞及成纤维细胞聚集(HE 染色, ×400)

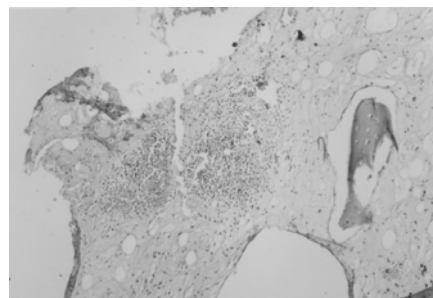


图 3 骨不连处灶性坏死, 大量慢性炎症细胞(HE 染色, ×100)

冲击波治疗 6 周组织学检查发现: 治疗组表现新生骨小梁开始形成, 成骨细胞和成纤维细胞成骨, 逐渐包埋于骨陷窝内。对照组新生骨小梁稀疏, 仍主要为慢性炎症反应和纤维组织。

三、透射电镜检查结果

冲击波治疗 2 周透射电镜检查发现: ①大量成骨细胞, 胞体和胞核均呈卵圆形, 功能活跃, 胞质内线粒

体、粗面内质网和高尔基体丰富,并可见成骨细胞的有丝分裂,成骨细胞周围见大量排列有序有周期性横纹的胶原纤维。②大量增生活跃的成纤维细胞,胞体、胞核细长,胞核占细胞的大部分,胞质内可见大量粗面内质网,其间有大量待分泌物质,胞质内同时可见功能活跃的线粒体和高尔基体(图 4)。成纤维细胞有单独存在,也有多个聚集,其周围有大量的排列有序的周期性横纹的胶原纤维。③对照组镜下见有间充质细胞存在,多为静止期,可见破骨细胞,其胞质内见大量的溶酶体(图 5);细胞间胶原少,排列紊乱。

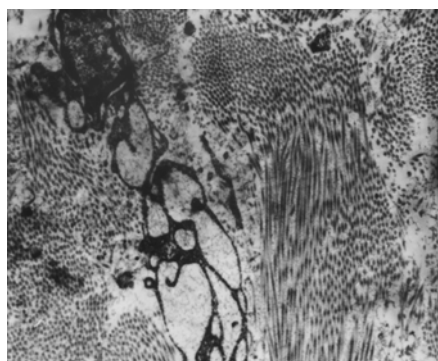


图 4 成纤维细胞内细胞器丰富,周围有大量排列有序的周期性横纹胶原纤维(TEM, $\times 10\ 000$)

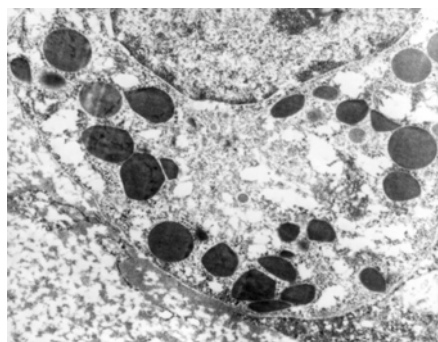


图 5 破骨细胞内大量的溶酶体(TEM, $\times 10\ 000$)

冲击波治疗 6 周电镜发现,成骨细胞及成纤维细胞内线粒体等细胞器减少,其周围胶原纤维变模糊,形成骨陷窝(图 6)。与 2 周时比较,对照组改变不明显。

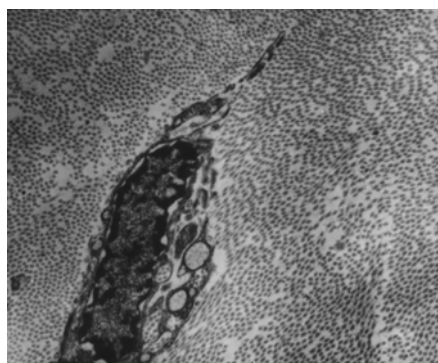


图 6 成纤维细胞形成骨陷窝(TEM, $\times 10\ 000$)

讨 论

成纤维细胞存在于软组织、血肿和骨髓腔内,由胚胎时期的间充质细胞分化而来。在结缔组织中,成纤维细胞还以其成熟状态——纤维细胞的形式存在,由于外伤等因素的刺激,使原来相对“静止”的纤维细胞又回到成纤维细胞状态,它的功能活动也被再次激活^[3]。最近的研究发现,在骨折的愈合过程中,成纤维细胞具有成骨作用,其有两种成骨方式^[4],一是成纤维细胞变形、固缩、碎裂、消失,留下骨陷窝,最后被骨质替代;一是成纤维细胞直接成骨而被包埋形成骨陷窝,这时成纤维细胞就变为骨细胞。成纤维细胞可出现于骨折后 3 d 的血肿中,10 d 左右可进入高潮,成纤维细胞的出现标志着骨折愈合的开始^[5],它是参与纤维骨痂阶段的主要成分。

体外冲击波对骨不连两断端的冲击,可造成其断端的粉碎性微骨折,即形成无数 0.1 ~ 3 mm 大小的微骨折片,类似于新鲜骨折——即出现骨折愈合的创伤阶段,起到重新启动骨不连愈合过程的作用。微骨折所造成的血肿和炎症反应可募集骨祖细胞,骨不连断端的纤维细胞、成纤维细胞、成骨细胞等被重新激活^[6]。有实验表明,体外冲击波治疗骨不连的机理是冲击波刺激了血管生成相关生长因子、血管内皮因子等的早期表达^[7],以及 P 物质、前列腺素 2 释放^[8],从而诱导骨不连局部血管再生而改善了血循环,并促使细胞增殖^[7]。在该实验中,冲击波治疗后 2 周,在骨不连部位出现大量密集排列的成纤维细胞,并处于活跃增生期,细胞呈梭形。电镜下发现单个或多个成纤维细胞聚集,成纤维细胞内大量线粒体和粗面内质网等细胞器,内质网内充满待分泌物质,其周围有大量排列有序的周期性胶原纤维。柴本甫等^[9]的实验已证实,这些胶原纤维最终钙化成骨,这些钙主要来自成骨细胞和成纤维细胞内的基质小泡。同时,冲击波治疗 6 周观察到大量成纤维细胞被包埋而形成骨陷窝。这说明成纤维细胞和成骨细胞具有相同的成骨功能。

实验证明体外冲击波对成骨细胞和成纤维细胞均具有刺激作用和抑制作用。其对组织的抑制作用并不会导致所有的细胞的破坏,并且这种抑制作用是立即效应,而其对组织的刺激作用却是持续效应^[10]。因此从长远的角度来说,刺激作用强于抑制作用。在骨不连的纤维瘢痕组织中有丰富的纤维细胞和成纤维细胞,在受到冲击波的治疗和新形成血肿的刺激下可迅速分化增殖,分泌胶原纤维而钙化成骨。这就解释了为什么这种由无数成纤维细胞和丰富肉芽组织为主体构成的纤维组织在骨折愈合过程中不会演变为在其它组织创伤修复时常见的瘢痕组织,而是通过钙盐结晶

在其内部不断沉积,逐渐演变为骨性骨痂,使骨折局部的修复达到骨性愈合,恢复骨组织的结构。

因此,该实验结果说明对于骨不连的治疗,可以采用物理疗法,只要能够启动骨折愈合过程,同样可以达到骨不连愈合的目的。体外冲击波治疗可改变骨不连的生物学状态,并刺激组织细胞的分化增殖,尤其是骨不连断端存在大量的纤维细胞,在受到冲击波的刺激后可被激活为成纤维细胞,从而在骨不连的愈合过程中发挥着重要作用。Wang 等^[11]报道体外冲击波治疗骨不连与外科手术有相似的成功率,即均在 80% 左右。但体外冲击波治疗骨不连的并发症却明显少于外科手术,而且即使治疗不成功还可以再采用外科手术,因此体外冲击波作为一种物理治疗方法,安全可靠,因其可一次完成治疗,费用也大大降低,还免去手术创伤和感染的危险。

参 考 文 献

- 1 Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. Bone Joint Surg, 1995, 77:940.
- 2 Birnbaum K, Wirtz DC, Siebert CH, et al. Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of non-unions. A review of the literature. Arch Orthop Trauma Surg, 2002, 122:324-330.
- 3 温光明. 成纤维细胞生物学特性及其成骨作用的研究. 中国临床解剖学杂志, 2000, 18:79-81.
- 4 柴本甫, 汤雪明, 李慧. 骨折二期愈合过程中的成纤维细胞成骨作用. 中华骨科杂志, 1996, 16:245-248.
- 5 胡蕴玉. 成纤维细胞成骨能力的研究. 第四军医大学学报, 2001, 22:961-964.
- 6 Schaden W, Fisher A, Sailler A. Extracorporeal shock therapy of unions or delayed osseous unions. Clin Orthop Relat Res, 2001, 387:90-94.
- 7 Wang CJ. An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders. Chang Gung Med J, 2003, 26:220-232.
- 8 Maier M, Averbeck B, Milz S, et al. Substance P and prostaglandin E2 release after shockwave application to the rabbit femur. Clin Orthop Relat Res, 2003, 406:237-245.
- 9 柴本甫, 汤雪明, 李慧. 实验性骨折愈合中钙化与骨化的超微结构观察(兼论成纤维细胞的成骨作用). 中华创伤杂志, 1995, 11:4-6.
- 10 Johannes EJ, Kaulesar Sukul DM, Bijma AM, et al. Effects of high-energy shock waves on normal human fibroblasts in suspension. J Surg Res, 1994, 57: 677-681.
- 11 Wang CJ, Chen HS, Chen CE, et al. Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. Clin Orthop Relat Res, 2001, 387:95-107.

(修回日期:2006-02-27)

(本文编辑:阮仕衡)

· 研究简报 ·

氦氖激光对葡萄糖、果糖等溶液黏度、电导率的影响

杨颖 计晶晶 苗利 高云飞

近二十多年来,人们在氦氖激光血管内照射领域进行了大量的基础及临床应用研究,发现血液中某些物质吸收氦氖激光能量后能产生多种生物学效应,从而使其治疗某些疾病成为可能^[1-3],如Ⅱ型糖尿病患者经氦氖激光血管内照射治疗后,其血脂、血糖水平较治疗前显著降低,血液流变学特征也得到一定程度改善^[4],但其相关作用机制目前还不十分明确。机体将激光物理能量转化为生物学效应时,与体内环境的物理因素变化密切相关^[5]。人体血液中包含水份、葡萄糖及果糖等多种成份,本实验通过观察氦氖激光对葡萄糖溶液、果糖溶液及蒸馏水黏度、电导率的影响,为深入探讨氦氖激光的生物学效应及相关作用机制提供新的信息。现将结果报道如下。

材料与方法

一、实验材料

本研究所用蒸馏水由本学院制取,葡萄糖溶液及果糖溶液(浓度均为 5%)均为等渗溶液, HJ-1B 型氦氖激光器输出功率

≥1.5 mW, 激光波长为 632.8 nm, DDS-11C 型电导率仪由上海生产, 奥氏黏度计由北京生产。

二、实验方法

采取固定方式进行氦氖激光照射, 设置激光输出功率为 3.0 mW, 光斑直径为 2.0 mm, 照射距离为 15 cm。激光束从试管口竖直向下照射, 装液体的试管要尽可能细, 从而使激光的照射光程尽可能远。

在测量各溶液黏度时, 均首先将待测液体于室温(27~32℃)下静置 24 h 以上, 以避免液体流动及室温所造成的影响。将上述各类液体均分为对照组及照射组。照射组给予不同长度时间的激光照射, 对照组则不给予任何特殊处理。于激光照射结束后, 将待测液体均匀倒入奥氏黏度计中测量。奥氏黏度计置于恒温槽内, 以尽量避免室内空气对流所造成的影响。实验测量数据为液体通过奥氏黏度计毛细管的时间(用秒表计时); 另外还测量激光照射前、后各溶液电导率(室温 27~29℃)的变化情况。照射组每测定一个数据, 对照组也同时测定相应数据, 以尽可能排除非实验因素对数据的影响。

三、统计学分析

本研究所得数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较选用 *t* 检验, *P*

作者单位: 014010 包头, 包头医学院物理教研室(杨颖、计晶晶、高云飞); 包头市第七医院检验科(苗利)