

· 基础研究 ·

体外冲击波治疗对组织工程化骨修复
节段性骨缺损的影响

李章华 许涛 彭昊 孙素改 张玉富 廖文 赵强 王常勇

【摘要】目的 探讨体外冲击波对组织工程化骨修复节段性骨缺损的影响及其作用机制。方法 18 只健康成年绵羊随机分为实验组与对照组,每组 9 只。对照组在骨缺损区植入 β -磷酸三钙陶瓷与自体间充质干细胞复合体,实验组植入复合体后再适时进行体外冲击波(ESW)治疗。治疗后 4,8,12 周分批处死动物,行 X 线摄片、组织学、生物力学和扫描电镜观察。结果 术后 8 周 2 组动物骨缺损愈合未见明显差异,12 周后实验组动物骨缺损基本愈合,骨痂面积和密度均比对照组明显增高。结论 冲击波疗法能促进组织工程化骨的成骨能力,其作用机制在于促进间充质干细胞向成骨细胞分化,加速陶瓷降解,改善血供。

【关键词】 体外冲击波; 组织工程化骨; 节段性骨缺损

The effect of extracorporeal shock waves on bone repair at segmental bone defects LI Zhang-hua*, XU Tao, PENG Hao, SUN Su-gai, ZHANG Yu-fu, LIAO Wen, ZHAO Qiang, WANG Chang-yong. * Department of Orthopedics, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of extracorporeal shock wave (ESW) treatment on bone repair at segmental bone defects, and to study the underlying mechanism. Methods Bone defects were induced in 18 sheep, which were then randomly divided into two groups: one group implanted tissue-engineering bone in bone defects, another group treated with ESW after implantation of the tissue-engineering bone. The sheep were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks after the operation. Radiography, histology, biomechanical testing and scanning electron microscopy were used to observe changes at the defects. Results At the 8th week, there was no observable difference between the two groups. After 12 weeks, all results revealed almost complete repair in the experimental group. The osteotylus area and density were both higher than in the controls. Conclusion ESW was able to enhance osteogenesis around artificial bone. It may promote mesenchymal stem cell differentiation, accelerate the degradation of the ceramic and improve blood supply.

【Key words】 Extracorporeal shock waves; Tissue engineering; Artificial bone; Segmental bone defects

据报道,我国每年因疾病、创伤、肿瘤等造成的骨缺损患者超过 100 万^[1]。长节段骨缺损的修复目前仍是十分棘手的问题。治疗骨缺损有许多方法,如采用自、异体骨移植或人工生物材料植入等,但这些方法都有一定的缺陷。近年来,随着组织工程技术的逐步成熟,骨缺损的修复已由传统骨移植修复的方式向组织工程学修复的方向发展。动物实验证实,高能冲击波可以激活成骨细胞,从而促进新骨形成^[2]。本实验旨在探讨体外冲击波(extracorporeal shock wave, ESW)在组织工程骨修复骨缺损过程中的作用,并阐述其可能的作用机制。

材料与方法

一、实验动物

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院骨科(李章华、彭昊);华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(许涛);河北省保定市第一医院肾移植科(孙素改);北京大学医学部积水潭医院(张玉富);天津市天津医院创伤骨科(廖文);中国军事医学科学院基础医学研究所组织工程中心(赵强、王常勇)

18 只健康成年绵羊,雌、雄不限,年龄为 2~2.5 岁,体重为 35~50 kg,由北京军事医学科学院实验动物中心提供。予以标准的动物饲料和流动水,室内保持良好通风,室温控制在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

二、动物分组

根据实验要求将 18 只绵羊随机分成实验组与对照组,每组 9 只。对照组在骨缺损区植入 β -磷酸三钙陶瓷与自体间充质干细胞复合体,实验组在骨缺损区植入 β -磷酸三钙陶瓷与自体间充质干细胞复合体后适时进行冲击波治疗。

三、动物模型的制备

以戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)静脉注射麻醉后,左后肢脱毛、消毒,在跖骨外侧正中切口,切开皮肤和软组织,钝性剥离骨膜至可安放加压钢板(钢板长 110 mm,钢板上螺钉孔的直径为 3.5 mm)。用线锯在跖骨中段锯取 21 mm 长的骨干缺损(包括附着其上的骨膜)。无菌生理盐水冲洗骨缺损区,加压钢板固定,按实验计划植入复合体,关闭切口。术后第 1,

2 天伤肢严禁负重,2 d 后开放性圈养,允许其在疼痛可忍受的程度下活动,羊饲料和流动水饲养。术后 4,8,12 周分批处死动物,取出标本(长 10 cm,包含植入材料及两端部分正常骨),去除钢板、螺钉和周围的软组织。需进行四环素荧光标记者按以下方案进行:分别在动物处死前 15 d 和前 7 d 口服四环素,剂量为每天 50 mg/kg 体重,服用 3 d。

四、治疗方法

1. 实验组:参考李明亮等^[3]的治疗方案进行治疗,第 1 次冲击波治疗在术后 1 周进行,间隔 2 周再治疗 1 次,共治疗 2 次,每次治疗时间约 20~30 min。治疗前用脱毛剂(8% 的硫化钠和甘油配制)将羊左后肢绒毛脱净,全麻后绑扎固定于自制羊台上,羊台置于 MZ-ESWL 型电磁式体外冲击波碎石机的治疗床上,X 线精确定位,第 2 焦点对准左侧跖骨缺损区,采用工作电压为 12 kV,冲击波能量为 0.54 mJ/mm²,频率为 60 次/min,冲击量为 2 000 次,冲击波聚焦后能量集中在 1.5 mm² 范围内,治疗中通过闭路电视监测能量聚焦位置并随时调整。

2. 对照组:术后不作冲击波治疗,余同实验组。

五、观察项目

1. 放射学分析:术后立即摄取手术肢体侧位片,以后分别在术后 4,8,12 周时摄片。根据 X 线片上骨与植入物界面的骨连接情况、植入物表面的骨痂生长情况和骨桥的生长情况进行评价。骨缺损区每有一面骨桥连接得 1 分,最低分为 0 分(在缺损区的任一面上均无骨连接),最高分为 4 分(缺损区的前、后、侧面及中央均形成骨连接)。测量骨痂最厚时的厚度并记下时间,计算出术后 4,8,12 周时骨痂的平均厚度。

2. 组织学观察:脱钙切片,标本置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 值 7.2)中固定 24 h 后,10% 甲酸脱钙,然后梯度酒精逐级脱水、清洗、石蜡包埋,Masson 三色染色观察骨缺损修复过程中各种细胞生长变化情况,并应用 IM 50 图像分析软件动态观察不同时期陶瓷、骨和软组织各自所占的百分比。部分切片同时行天狼星红染色(需在偏振光显微镜下观察),以观察胶原的类型,I/Ⅲ型胶原的形态和分布的动态变化。不脱钙切片,标本在 4% 的中性多聚甲醛液中固定 2 周,流动水冲洗后梯度酒精逐级脱水,聚甲基丙烯酸甲酯包埋。等聚甲基丙烯酸甲酯凝固后切片,片厚为 200

~300 μm,用胶水将其粘在一个塑料支架上,手工磨至(50±5)μm,直接在光学显微镜和荧光显微镜下观察,通过观察可以清晰地看到骨缺损修复过程中新骨的生成和哈佛系统的形成。另取 3 mm×3 mm×2 mm 大小标本,2.5% 戊二醛(pH 值 7.2~7.4)固定 24 h,梯度丙酮逐级脱水。真空干燥、旋转喷镀金膜后在扫描电镜下观察标本表面骨单位和胶原纤维形成情况。

3. 生物力学测试:收集标本后,立即去除软组织,进行生物力学测试。在 858Mini Bionix II 生物力学试验机(MTS, USA)上行压缩试验,负荷 10 N,速度为 10 mm/min。根据图表记录器获得的压应变曲线图,计算出每个标本的压缩应力及弹性模量,再计算出每组标本的平均压缩应力和弹性模量。

六、统计学分析

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。采用两因素三水平的析因分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 SAS 6.12 统计软件进行统计学处理。

结 果

一、一般情况

所有实验动物中除 2 只羊(每组 1 只)因麻醉原因死亡并及时补充外,其余均存活。术后切口无感染,内固定无松动或断裂,皮肤无坏死。术后 1 周内伤肢能落地,但不能负重,2 周后可以部分负重,3 周后有轻微跛行,4 周后恢复自由活动,无跛行。

二、放射学分析

结果显示,术后 4 周实验组与对照组骨愈合速度无明显差异;8 周后,实验组骨痂面积和密度较对照组略有增大与增高;12 周后,实验组的骨-材料界面骨桥形成,β-磷酸三钙(β-tricalcium phosphate, β-TCP)颗粒较对照组明显减少,而骨痂面积和密度明显增大与增高(图 1,2),2 组评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。说明冲击波治疗对新骨生成具有明显的促进作用。

三、组织学观察

1. 骨的变化:术后 8 周实验组可见大量新生骨组织沿着陶瓷材料孔隙及其连接径从材料四周向中央长入,横切面和纵切面上均有编织骨和哈佛系统存在,而对照组材料中央仍然空缺或由纤维组织填充。术后 12 周,实验组植入材料中央和表面都可见成熟的骨细胞和重建的板状骨,少有 β-TCP 颗粒存在,对照组植

表 1 放射学与生物力学评价($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	放射学评分(分)			最大压缩应力(MPa)		弹性模量(GPa)	
		术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周	术后 8 周	术后 12 周	术后 8 周	术后 12 周
对照组	9	1.3±0.3	2.3±0.3*	2.8±0.5*△	69.9±3.3	85.9±5.8△	7.1±1.2	10.4±1.3△
实验组	9	1.4±0.4	2.5±0.5*	3.6±0.5*#△	74.1±4.5	94.1±6.6△	7.5±0.9	11.5±1.9△

注:与术后 4 周时比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,# $P < 0.05$;与术后 8 周时比较,△ $P < 0.05$

入材料中偶尔有成熟的骨细胞出现,仍有少量未被吸收的陶瓷颗粒,新生的编织骨占主导地位(图 3~6)。术后 12 周,实验组新生骨占据了 78.3% 的范围,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。荧光显微镜下,术后 12 周对照组同样可见植入材料颗粒,新生骨荧光带窄,光亮度差,两条荧光带间距小,界限不清,实验组的切片内呈广泛的黄绿色,哈佛管壁边缘光带明亮清晰,荧光带宽度较对照组明显增大,带间距也明显增宽(图 7,8)。

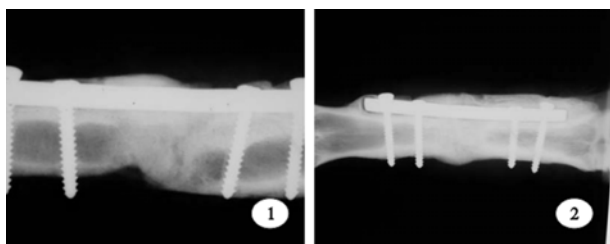
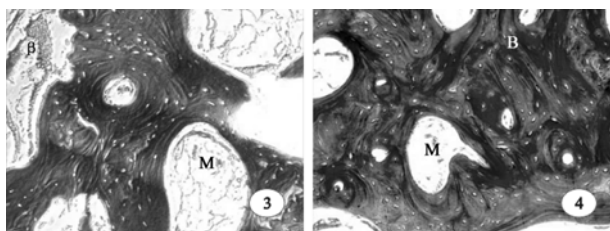


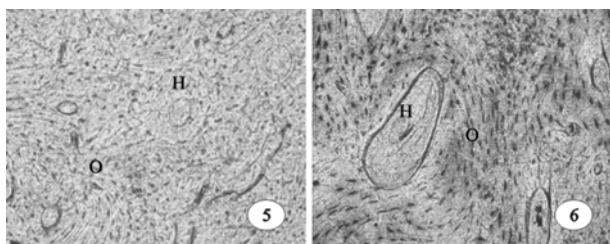
图 1 对照组术后 12 周 X 线摄片 图 2 实验组术后 12 周 X 线摄片



注:骨组织呈红色,软骨与纤维组织呈绿色。N 代表新生骨;C 代表软骨细胞;M 代表髓腔;B 代表宿主的正常骨; β 代表 β -TCP

图 3 对照组术后 12 周组织学观察(Masson 染色, $\times 10$)

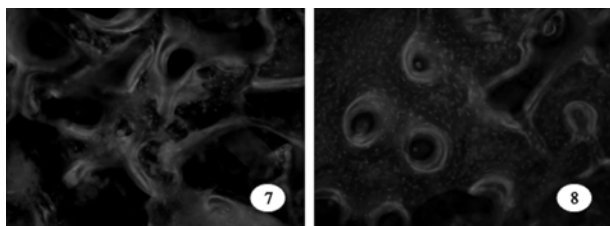
图 4 实验组术后 12 周组织学观察(Masson 染色, $\times 10$)



注:O 代表成骨细胞;H 代表哈佛系统

图 5 对照组术后 12 周组织学观察(骨磨片, $\times 10$)

图 6 实验组术后 12 周组织学观察(骨磨片, $\times 10$)



注:两条荧光带代表两次标记,荧光带间的空隙代表两次标记间新生的骨组织

图 7 对照组术后 12 周组织学观察(荧光显微镜观察, $\times 10$)

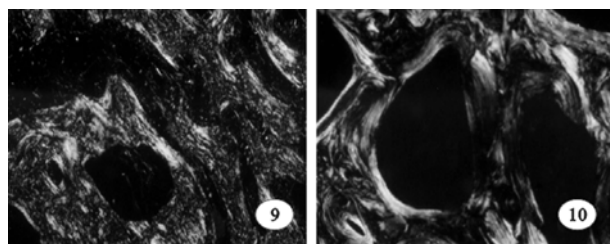
图 8 实验组术后 12 周组织学观察(荧光显微镜观察, $\times 10$)

表 2 组织学观察结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	所占比例(%)			骨痂厚度(mm)
		陶瓷	骨	软组织	
对照组	9				
术后 4 周		77.2 $\pm$ 2.1	3.5 $\pm$ 0.4	19.3 $\pm$ 2.3	0.46
术后 8 周		57.1 $\pm$ 1.8	29.8 $\pm$ 0.7*	13.1 $\pm$ 1.6	1.65
术后 12 周		24.9 $\pm$ 1.7	66.4 $\pm$ 1.3*#	8.7 $\pm$ 1.1	3.38
实验组	9				
术后 4 周		75.3 $\pm$ 1.8	5.9 $\pm$ 0.5	18.8 $\pm$ 0.9	1.56
术后 8 周		49.2 $\pm$ 1.6	39.5 $\pm$ 1.1*	11.3 $\pm$ 0.8	5.62
术后 12 周		16.5 $\pm$ 1.4	78.3 $\pm$ 1.9*# Δ	5.2 $\pm$ 0.6	9.38

注:与术后 4 周时比较, * $P < 0.05$; 与术后 8 周时比较, # $P < 0.05$; 与对照组比较, Δ $P < 0.05$

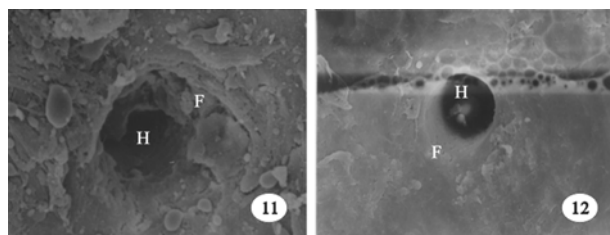
2. 胶原纤维的变化:术后 4 周实验组骨缺损区主要由Ⅲ型胶原纤维占据,术后 8 周Ⅰ型胶原纤维增加明显,但呈无序状排列,12 周时粗大的Ⅰ型胶原纤维占据了全部骨缺损区,排列紧密、有序,Ⅲ型胶原纤维已看不见(图 9 和图 11)。对照组动物直到术后 12 周,Ⅲ型胶原纤维仍占据了骨缺损区的部分区域,Ⅰ型胶原纤维密集排列,但仍较紊乱,有一定的方向性(图 10 和图 12)。



注:偏振光下Ⅲ型胶原表现为细小的绿色纤维;Ⅰ型胶原表现为黄色或红色的粗纤维

图 9 对照组术后 12 周组织学观察(偏振光显微镜观察, $\times 20$)

图 10 实验组术后 12 周组织学观察(偏振光显微镜观察, $\times 20$)



注:F 代表Ⅰ型胶原纤维;H 代表哈佛系统

图 11 对照组术后 12 周组织学观察(扫描电镜观察, $\times 350$)

图 12 实验组术后 12 周组织学观察(扫描电镜观察, $\times 350$)

四、生物力学测试

标本的压缩强度随时间逐步增加。术后 12 周时,实验组标本压缩强度接近正常骨的压缩强度。2 组动物标本在 3 个时间点数值间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组标本无论是压缩强度还是弹性模量均大于对照组标本,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

讨 论

随着科学技术的发展,临床骨缺损的治疗正从传

统的自/异体骨移植方式,向基于生物材料的骨组织工程和异种移植的方向发展,通过将有成骨潜能的活体细胞复合到生物材料上构建组织工程化骨无疑为骨缺损修复提供了全新的思路。但如何促进植入细胞较快、较多地向成骨细胞转化却始终是骨组织工程研究的难点。本实验期望通过 ESW 的方法达到促进间充质干细胞转化、增强成骨能力的目的。

近几年,冲击波疗法被逐渐应用于骨不连、骨折延迟愈合和股骨头坏死的治疗,并取得了较好的疗效,在世界范围内,已有数以万计的患者接受了这项治疗。然而 ESW 对骨折后延迟愈合、骨不连以及无菌性骨坏死的治疗机制尚不清楚。因此,阐明冲击波对骨生长和骨形成的基本生物学效应是非常有意义的。

我们的实验结果显示,ESW 能促进节段性骨缺损的愈合,但它的效果有一定的时间依赖性,治疗后 12 周时效果明显。实验组材料降解增快,骨缺损愈合快,证明冲击波具有诱导成骨的作用,这与一些学者在临床和实验中得到的结论相同^[4-6]。冲击波诱导成骨的原因可能是:①冲击波携带的巨大能量“激活”了未分化的间充质干细胞向成骨细胞分化^[7],促进成骨细胞表达与成骨相关的细胞外基质蛋白相关基因,加速成骨。其原因在于冲击波这种高能冲击波作用于骨折部位时可造成新的创伤,产生大量碎骨片和骨坏死,碎骨片和骨坏死被吸收而释放骨形态蛋白、转化生长因子- β_1 、上皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞因子、血小板衍生生长因子等细胞因子,这些细胞因子一方面能使大量的间充质干细胞聚集在骨缺损部位并使之发生超极化,引起 Ras 系统激活,从而促进其成骨细胞分化^[8],另一方面能使新生的毛细血管生长旺盛促进新骨生成;②由于血栓和材料孔隙内含有大量微小的气泡,在冲击波的治疗过程中,冲击波的空化作用会使血栓和材料碎裂,血管再通,材料降解加快。我们的实验结果显示,治疗后骨小梁间和髓内的血管增多,可能与冲击波促进某些细胞因子(如上皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞因子、血小板衍生生

长因子)的分泌有关,使新生的毛细血管生长旺盛,向新生骨组织内生长,供血增加,进一步促进新生骨生成。

综上所述,ESW 治疗促进节段性骨缺损愈合的机制可能在于:(1)空化效应促使陶瓷材料崩解、碎裂,血管再通;同时坏死骨组织释放的骨形态发生蛋白使骨髓间充质细胞向成骨细胞分化,重新成骨;(2)冲击波刺激骨折周围组织分泌细胞因子,使材料内微小血管增生,供血增加;(3)冲击波直接促进骨髓间充质细胞向成骨细胞分化,加强成骨作用。另外,冲击波作为一种非侵入性治疗方式,与其它物理疗法不同,在闭路电视监测下定位准确,应用于动物或人体不会引起其它组织的损害。因此,冲击波与组织工程技术相结合不失为一种促进骨缺损愈合的良好方法。

参 考 文 献

- 1 陈锦平,张帆. 骨缺损的治疗研究进展. 中国骨伤,2004,17:767-768.
- 2 Wang CJ, Yang KD, Wang FS, et al. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. Bone, 2004,34:225-230.
- 3 李明亮,高根德. 体外冲击波治疗家兔股骨头坏死的实验研究. 中华物理医学与康复杂志,2004, 26:648-651.
- 4 Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF- β 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. J Orthop Res, 2004,22:526-534.
- 5 Delius M, Draenert K, Al Diek Y, et al. Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. Ultrasound Med Biol,1995,21:1219-1225.
- 6 Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats. Bone,2004,34:466-477.
- 7 Wang FS, Yang KD, Kuo YR, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. Bone, 2003,32:387-396.
- 8 Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, et al. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. Biochem Biophys Res Commun, 2001,287:648-655.

(修回日期:2006-01-13)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

中国康复医学会脑血管病专业委员会 2006 年全国脑血管病康复高级论坛会征文通知

中国康复医学会脑血管病专业委员会拟于 2006 年 8 月 18 日至 8 月 21 日在广东省中山市举办 2006 年全国脑血管病康复高级论坛会。会议将探讨脑血管病康复模式和机构探访,并邀请国内外著名康复专家卓大宏、栗秀初等作专题报告。(1)征文内容:脑血管病康复的基础研究、康复评定方法及应用研究、中国传统脑中风康复研究、心理治疗、康复护理、康复工程及社区康复等。(2)征文要求:论文(包括论著、经验交流、病例报道、综述等)投稿格式为第 1 行文题,第 2 行作者及单位,第 3 行论文摘要(包括目的、方法、结果和结论,字数 $\leq$ 1 000)。采用 Word 电子文稿。电子邮件投稿或邮寄征文软盘。截稿日期为 2006 年 7 月 30 日。(3)联系地址:广东省中山市悦来南南安路 2 号中山市中医院康复科 邮编:528400;联系人:何希俊、王本国;联系电话:(0760)8803661-2908/2907;手机 13925331188,13528265815;投稿 E-mail:rehabforum2006@yahoo.com.cn。