

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.01.028

◇临床医学◇

肌内注射骨折合并脑外伤大鼠血清治疗单纯骨折的放射学及组织形态学观察

杨博元¹, 马勇¹, 郭杨¹, 朱亚亮², 黄浩², 朱爱洪², 方莹²作者单位:¹南京中医药大学第一临床医学院中医骨伤科, 江苏 南京 210023;²常州市金坛区中医医院, 江苏 常州 213200

通信作者: 朱亚亮, 男, 副主任中医师, 研究方向为创伤骨科的临床研究, E-mail: czsjtqzyy@126.com

基金项目: 江苏省金坛市科技计划社会发展项目(JT2013070, JT2014061)

摘要:目的 观察对单纯股骨骨折大鼠肌内注射骨折合并脑外伤大鼠血清(“促骨折愈合血清”)后的放射学及组织形态学变化,以确定该血清是否具备有加速骨折愈合作用。**方法** 2017年3月至2018年3月,制备骨折合并脑外伤模型SD大鼠20只经腹主动脉采血,并分期制备治疗血清;选取20只健康大鼠提取阴性对照血清,全部加标记并冷藏。应用随机数字表进行分组,每组32只,分为实验组,对照组及空白组,96只大鼠均为股骨中段骨折。肌内注射治疗血清用于实验组,肌内注射阴性对照血清用于对照组,空白组肌内注射生理盐水。并于术后第1周、2周、3周、4周各处死8只大鼠,利用放射分析比较三组骨折的愈合情况:X射线照射、双能X线骨密度测量和组织形态学观察。**结果** 术后X线结果提示实验组骨折愈合进程较对照组、空白组明显加快。测量骨痂体积发现:术后第2周,实验组骨痂体积(30.44 ± 2.33)mm³,对照组骨痂体积(22.68 ± 1.95)mm³,空白组骨痂体积(21.66 ± 2.35)mm³,对照组和空白组骨痂体积明显小于实验组($P = 0.000$);术后第3周,实验组骨痂体积(26.46 ± 1.58)mm³,对照组骨痂体积(27.29 ± 1.66)mm³,空白组骨痂体积(26.79 ± 2.02)mm³,三组骨痂体积比较差异无统计学意义($P = 0.669$)mm³;术后4周,实验组骨痂体积(22.15 ± 1.66)mm³,对照组骨痂体积(29.99 ± 1.32)mm³,空白组骨痂体积(29.23 ± 1.29)mm³,对照组及空白组骨痂体积明显大于实验组($P = 0.000$)。术后第1周,实验组骨密度(0.128 ± 0.123)mg/cm³,对照组骨密度(0.222 ± 0.121)mg/cm³,空白组骨密度(0.217 ± 0.103)mg/cm³,对比差异无统计学意义($P = 0.882$);术后第2周,实验组骨密度(0.266 ± 0.100)mg/cm³,对照组骨密度(0.208 ± 0.142)mg/cm³,空白组骨密度(0.206 ± 0.302)mg/cm³;术后第3周,实验组骨密度(0.218 ± 0.007)mg/cm³,对照组骨密度(0.200 ± 0.012)mg/cm³,空白组骨密度(0.189 ± 0.069)mg/cm³;术后第4周,实验组骨密度(0.225 ± 0.009)mg/cm³,对照组骨密度(0.190 ± 0.100)mg/cm³,空白组骨密度(0.202 ± 0.100)mg/cm³;对照组、空白组骨密度第2周起均低于实验组($P < 0.05$)。骨形态学发现实验组较对照组、空白组更早形成骨痂,更早出现板层骨,更早进入塑形期。**结论** 脑外伤合并骨折大鼠的血清对骨折愈合有明显的促进作用,为“促骨折愈合血清”应用临床治疗骨科疾患奠定理论基础。

关键词: 股骨骨折药物疗法; 注射,肌肉内; 血清; 颅脑损伤; 骨折愈合; 骨痂; 骨生成; 骨密度; 大鼠, Sprague-Dawley

The effect of serum therapy on the radiology and histomorphology of intramuscular injection fracture combined with brain trauma in rats

YANG Boyuan¹, MA Yong¹, GUO Yang¹, ZHU Yaliang², HUANG Hao², ZHU Aihong², FANG Ying²

Author Affiliations: ¹Orthop Edics Department of Traditional Chinese Medicine, The First Clinical School of Nanjing University of Traditional Chinese medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China; ²Changzhou Jintan District Hospital of traditional Chinese Medicine, Changzhou, Jiangsu 213200, China

Abstract: Objective To observe the radiological and histomorphological changes of rats with intramuscular injection fractures and brain injury ("fracture-promoting serum") in rats with simple femoral fractures to determine whether the serum has accelerated fracture healing. **Methods** Twenty SD rats with fracture combined with traumatic brain injury were collected from the abdominal aorta and the serum was prepared in stages. 20 healthy rats were randomly selected to extract the negative control serum, all labeled and refrigerated. The others were divided into treatment group, control group and blank group by random number table, with 32 in each group. 96 rats were middle femur fractures. Intramuscular injection of serum was used in the treatment group, intramuscular injection of negative control serum was used for the control group, and blank group was intramuscularly injected with physiological saline. Eight rats were sacrificed at the first week, 2 weeks, 3 weeks, and 4 weeks after operation. The healing of the three groups was compared by radiological analysis: X-ray irradiation, dual-energy X-ray bone density measurement and histomorphological observation.

Results The X-ray results showed that the healing process of the treatment group was significantly faster than that of the control group and the blank group. Measurement of osteophyte volume found: in the second week after surgery, the osteophyte volume (30.44 ± 2.33) mm^3 in the treatment group, the osteophyte volume in the control group (22.68 ± 1.95) mm^3 , and the volume of the epiphysis in the blank group (21.66 ± 2.35) mm^3 . The volume of the callus of the control group was significantly smaller than that of the treatment group ($P=0.000$). At the third week after surgery, the volume of the callus was 26.46 ± 1.58 mm^3 , and the volume of the control group was (27.29 ± 1.66) mm^3 , the volume of the epiphysis in the blank group (26.79 ± 2.02) mm^3 , the difference in the volume of the three groups of osteophytes was not statistically significant ($P=0.669$) mm^3 ; after 4 weeks, the volume of the epiphysis in the treatment group, control group and blank group was (22.15 ± 1.66) mm^3 , (29.99 ± 1.32) mm^3 , (29.23 ± 1.29) mm^3 separately. The volume of the callus in the control group and the blank group was significantly larger than that in the treatment group ($P=0.000$). At the first week after bone mineral density, the bone mineral density in the treatment group, the control group and the blank group was (0.128 ± 0.123) mg/cm^3 , (0.222 ± 0.121) mg/cm^3 in, and (0.217 ± 0.103) mg/cm^3 ($P=0.882$); After 2 week's treatment, bone mineral density (0.266 ± 0.100) mg/cm^3 in the treatment group, bone mineral density (0.208 ± 0.142) mg/cm^3 in the control group, and bone mineral density in the blank group (0.206 ± 0.302) Mg/cm^3 . At the third week after operation, the bone mineral density (0.218 ± 0.007) mg/cm^3 in the treatment group, bone mineral density (0.200 ± 0.012) mg/cm^3 in the control group, and bone mineral density (0.189 ± 0.069) mg/cm^3 in the blank group. After the 4th week, the bone mineral density was (0.225 ± 0.009) mg/cm^3 in the, (0.190 ± 0.100) mg/cm^3 , and (0.202 ± 0.100) mg/cm^3 in the treatment group, the control group blank group. ($P<0.05$). Bone morphology found that the treatment group formed osteophytes earlier than the control group and the blank group, and the lamellar bone appeared earlier, and entered the shaping stage earlier. **Conclusion** The serum of rats with traumatic brain injury and fracture has a significant effect on fracture healing. It lays a theoretical foundation for the clinical application of clinical treatment of orthopedic diseases.

key words: Femoral fractures/drug therapy; Injections, intramuscular; Serum; Craniocerebral trauma; Fracture healing; Bony callus; Osteogenesis; Bone density; Rats, Sprague-Dawley

骨折是骨科临床最常见的疾病之一,很多促进骨折愈合的制剂也应运而生,如骨形态蛋白^[1]、成骨生长肽^[2]等,但在缩短骨折愈合时间方面,一直未能取得突破性进展。大量临床和实验发现合并脑外伤的骨折愈合速度明显加快^[3-4],这就为加速骨折愈合提供了一种新思路,脑外伤后是否有大量促骨折愈合因子通过脑屏障进入血液^[5],或者颅脑损伤后释放激素有助于产生大量局部骨骼因素^[6],因而加速了骨折愈合。

类比于抗蛇毒血清,骨折合并脑外伤后是否会产生大量“促骨折愈合血清”?是否有可能生产类似于抗蛇毒血清的促骨折愈合血清?本研究起止时间为2017年3月至2018年3月,采用骨折结合创伤性脑损伤大鼠的血清,注入股骨骨折大鼠肌肉,模拟大鼠颅脑损伤后身体的微观环境,运用放射学及组织形态学方法,观察骨折愈合过程,为“促骨折愈合血清”应用临床提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SD大鼠是由南京中医药大学动物中心提供的,重量(314 ± 27)g,分笼饲养,实验室温度 $14^\circ\text{C} \sim 16^\circ\text{C}$,实验过程中自由摄食,自由饮用纯净水。96只大鼠应用随机数字表进行完全随机化的分为三组,每组32只,实验组采用肌肉注射治疗血清,对照组采用肌肉注射阴性对照血清,空白组采用肌肉注射生理盐水。本研究符合一般

动物实验伦理学相关要求。

1.2 主要仪器及试剂 X射线成像系统DR(General Electric Company 美国),双能X线全身骨密度测量仪(MEDILINK 法国),HE染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),Image Pro Plus6.0图像分析系统(Media Cybernetics 美国)

1.3 大鼠股骨骨折及骨折合并脑外伤模型的制作

1.3.1 制作大鼠股骨干骨折模型 大鼠股骨骨折模型改良的Einhorn^[7]:大鼠腹腔注射麻醉采用2.5%戊巴比妥钠($60 \text{ mg}/\text{kg}$),仰卧姿势,备皮、消毒、铺巾,膝关节伸直,在髌骨内侧纵切2 cm,依次切开皮肤、脂肪组织,暴露关节囊并切开,往外侧推挤髌骨,使之脱位,然后膝关节屈曲 90° ,直视下采用直径1 mm克氏针,经股骨髁间凹处进针至股骨大粗隆顶点穿出,大腿肌肉沿着骨膜向上剥离,暴露在股骨的中部。用超薄砂轮切割约1/3的股骨后,股骨沿薄弱部位徒手折断。用生理盐水和过氧化氢反复清洗切口。最后,膝关节伸直,髌骨脱位复位,切口逐层缝合。

1.3.2 骨折合并脑外伤模型的制作 参照Marmarou法^[8]及自行改良的股骨中段骨折模型,制备骨折合并脑外伤模型20只。麻醉妥后,取俯卧位,头部固定,切口取头正中,左侧顶骨暴露在冠状缝后面1.5 mm和矢状缝旁边2.5 mm处。直径为5 mm的空心钻头用于钻直径约为5 mm的圆形骨窗。注意,双侧皮质

骨没有完全穿透。一小部分骨质仍然相连。轻轻翘起用镊子,取下骨瓣,露出大脑皮层,需轻柔动作操作,对硬脑膜及脑组织不要造成损伤。把直径4 mm,厚度约2 mm的圆形垫片放置在骨窗处,高30 cm处。用20 g重物沿外周导管垂直下落,直接冲击垫圈,并进行打击(冲击能量为600 g/cm²)导致左侧大脑皮层的挫伤和撕裂。出现局部出血和水肿。伤口用双氧水和生理盐水反复冲洗,切口要逐层缝合。麻醉清醒后,放回笼中。术后第2天清晨,按照改良的股骨骨折模型行右股骨骨折髓内克氏针固定。

1.3.3 纳入及剔除标准 术后2~3 h,大鼠清醒建立脑损伤模型。神经功能缺损评分^[9]根据Zea Longa^[9]:没有任何神经缺损征象为0分;不能完全伸展对侧前爪为1分;向对侧转圈为2分;向对侧倾倒3分;不能自发行走,意识水平下降为4分。小于1分或死亡的动物剔除;大于等于1分视为颅脑损伤造模成功。

股骨干骨折模型于术后立即进行X线透视,确定克氏针位于髓内,骨折为横断或短斜型骨折。剔除长倾斜、粉碎性骨折和死亡动物。可以随机补充去除标本,最终必须保证分析中包含的动物数量。

1.4 采集标本和指标观察 手术后第2、第5、第8、第12、第15、第19、第22和第26天,分别取骨折合并脑损伤大鼠4、4、3、3、2、2、1和1只,取腹部主动脉的血,静置于室温下2~3 h,离心6 min 4 ℃(1 500 r/min),制备血清并冷藏,供不同时期使用。20只健康大鼠腹主动脉采血,静置、离心制备阴性对照血清。实验组在术后第2、5、8、12、15、19、22、26天相应时间点肌内注射治疗血清。相应时间点,对照组肌内注射阴性对照血清,空白组肌内注射生理盐水。

每组术后第1周、2周、3周、4周各处死8只大鼠,采集三组骨折的股骨标本,进行DR摄片,测量骨痂体积;双能X线全身骨密度测量仪测定骨折端骨密度;HE染色观察各组骨折端骨组织形态学差异。

1.5 统计学方法 使用SPSS 22.0来分析统计数据,使用的是 $\bar{x} \pm s$ 。使用完全随机的设计差异分析进行了多组比较,两组比较使用SNK测试。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射学观察

2.1.1 骨折端X线对比 术后1周各组均未见明显骨痂形成,各组骨折线均清晰。术后2周,实验组骨折线稍微模糊,对照组、空白组骨折线尚清晰。术后3周,对照组、空白组骨折线略模糊,实验组骨折线进一步模糊。术后4周,对照组、空白组骨折线模

糊,实验组骨折线基本消失。见图1~3。

2.1.2 骨折端骨痂体积比较 术后2周,三组间骨痂体积比较差异有统计学意义($P < 0.05$),实验组骨痂体积明显大于对照组、空白组。术后3周,三组间骨痂体积对比大致相仿,差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后4周,对照组、空白组骨痂体积明显大于实验组($P < 0.05$)。见表1。

表1 单纯股骨干骨折大鼠不同治疗方法术后第2、3、4周骨痂体积的比较/(mm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第2周	第3周	第4周
空白组	8	21.66 ± 2.35	26.79 ± 2.02	29.23 ± 1.29
对照组	8	22.68 ± 1.95	27.29 ± 1.66	29.99 ± 1.32
实验组	8	30.44 ± 2.33 ^{ab}	26.46 ± 1.58	22.15 ± 1.66 ^{ab}
F值		36.224	0.399	82.184
P值		0.0011	0.579	0.002

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与空白组比较,^b $P < 0.05$

2.1.3 骨折端骨密度比较 术后1周,三组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后第2、3、4周,同期三组间骨密度差异有统计学意义($P < 0.05$);在同一时期,实验组中的骨骼密度比对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 单纯股骨干骨折大鼠不同治疗方法术后第1、2、3、4周骨密度BMD值的比较(mg/cm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1周	第2周	第3周	第4周
空白组	8	0.217 ± 0.103	0.206 ± 0.302	0.189 ± 0.069	0.202 ± 0.100
对照组	8	0.222 ± 0.121	0.208 ± 0.142	0.200 ± 0.012	0.190 ± 0.100
实验组	8	0.128 ± 0.123	0.266 ± 0.100 ^{ab}	0.218 ± 0.007 ^{ab}	0.225 ± 0.009 ^{ab}
F值		0.244	16.567	16.789	19.802
P值		0.991	0.010	0.002	0.012

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与空白组比较,^b $P < 0.05$

2.2 骨折端组织形态 术后第2周,实验组形成软骨骨痂和钙化组织,骨小梁排列不规则。同时,对照组和空白组愈合组织生长稀疏,形成典型的小梁结构。软骨骨痂和肥大软骨细胞在骨折端大量呈现。手术后3周,实验组中长了很多坚硬的骨痂,骨小梁增加,排列方法形成了明显的平板骨结构。对照组,空白组大部分是未成熟的编织骨骼,骨小梁增加,序列逐渐变得越来越规律。

术后4周,实验组的外骨痂基本上修复为板骨,可以看到一些软骨存在于外骨痂中。对照组,空白组骨折端编织骨与板层骨融合开始。见图4~6。

3 讨论

1960年Gibson^[10]第一次确认了一名骨折病人,其临床合并颅脑损伤,骨折端有大量骨形成;Kim

等^[11]其他实验表明,大鼠股骨骨折的平均愈合时间为4周,颅脑损伤合并后骨折的平均愈合时间缩短为2周。这一现象引起了许多学者的注意。目前,大多数学者认为骨折愈合的加速是一个复杂的过程,涉及多种因素,如骨形态发生蛋白^[12]、神经生长因子^[13]、胰岛素样生长因子^[14]、血小板衍生生长因子^[15]、血管内皮生长因子^[16]等,其中任何一种因子都不能单独解释这一现象,因此对包含众多因子血清进行研究就显得尤为重要。本实验将血清作为一个不可分割的整体,观察其对骨折愈合的影响,探讨其临床应用的可行性。

本研究进一步证明了在临床上血清加快治疗脑损伤骨折的愈合。X线显示,实验组的骨小梁过骨折线的时间较早,骨折线消失的时间早于对照组和空组。实验组骨痂体积早期的数量迅速增加,随后迅速减少,这可能是因为实验组在第2~3周的某个时间点已经处于骨痂塑形期。根据沃尔夫定律,骨细胞吸收大量无效骨痂并缩小其大小,这并不直接反映骨折愈合速度,但间接表明治疗性血清可以促进早期骨痂形成、后期骨痂塑形和加快骨折愈合。手术后第1周三组骨痂体积差异无统计学意义($P > 0.05$),从第2周开始,对照组和空白组的骨密度明显低于同期实验组的骨密度,手术后第3、4周,实验组的外骨痂基本上变成板层骨痂,进入骨痂塑形期,骨痂数量开始减少。然而,对照组和空白组仅发现少量板层骨,大部分仍然是硬骨痂,这表明合并脑损伤可以促进骨痂尽早变成板层骨痂。

在本研究中,血清分几个阶段处理,不同骨折愈合因子在骨折愈合的不同阶段可能发挥的作用不尽相同;在不同时间收集血清,尽可能模拟骨折合并脑外伤大鼠身体的微环境,就可以在不同时间而不是在同一时间使用治疗血清。我们对传统大鼠股骨骨折模型的操作方法作出了一些改良,采取单一的膝关节内侧切口,取消了骨折端为中心的传统切口,减少了手术操作对肌肉及骨膜的损伤,也就避免了肌肉及骨膜损伤对骨折愈合的影响。

实验结果有力地证明了这样一种假设,也就是说,大量的骨折愈合血清会产生于骨折与脑损伤同时发生的大鼠体内。从临床应用的角度来看,这为“促骨折愈合血清”治疗骨折延迟愈合、骨质疏松症等骨病的临床应用提供了理论支持,社会效益潜力较大。

尽管有证据表明骨折和脑损伤的血液结合可以促进骨骼的修复和重建,但尚不清楚这种结合是如何工作的。研究的下一步可以是利用蛋白质组

学技术^[17]检测血清中的特定蛋白质,研究这些蛋白质的作用及机制。

(本文图1~6见插图1-2)

参考文献

- [1] 陈启刚,胡永军,胡海,等.锁定接骨板结合重组人骨形态发生蛋白骨修复材料治疗跟骨骨折的临床分析[J].安徽医药, 2018, 22(4): 703-706.
- [2] 侯汝涛.成骨生长肽(OGP_(10-14))改性聚乳酸仿生骨材料的制备及细胞相容性研究[D].重庆:重庆大学, 2015.
- [3] 章冲,余国荣.创伤性中枢神经系统损伤与骨折愈合关系研究的Meta分析[J].生物骨科材料与临床研究, 2018, 15(6): 22-28.
- [4] LOCHER RJ, LÜNNEMANN T, GARBE A, et al. Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2015, 15(4): 309-315.
- [5] 张伟,石海莲,吴晓俊,等.神经退行性疾病状态下血-脑屏障变化机制及中药对血脑屏障的影响研究进展[J].安徽医药, 2016, 20(9): 1621-1625.
- [6] WILDBURGER R, ZARKOVIC N, LEB G, et al. Post-traumatic changes in insulin-like growth factor type 1 and growth hormone in patients with bone fractures and traumatic brain injury [J]. Wien Klin Wochenschr, 2001, 113(3/4): 119-126.
- [7] BONNARENS F, EINHORN TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone [J]. Journal of Orthopaedic Research, 1984, 2(1): 97-101.
- [8] MARMAROU A, FODA MA, VAN DEN BRINK W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics [J]. J Neurosurg, 1994, 80(2): 291-300.
- [9] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] GIBSON JMC. Multiple injuries: management of the patient with a fractured femur and a head injury [J]. bone & Joint Journal, 1960, 42-B (3): 815-817.
- [11] KIM KH, KIM HS, MOON SH, et al. Animal Model and Gene Expression Analysis During the Accelerated Fracture Healing in Traumatic brain Injury [J]. Korean Orthop Res Soc, 2003, 6(2): 177-185.
- [12] 郭启,张柳.脑外伤对骨折愈合中骨形成蛋白2表达的影响[J].中国修复重建外科杂志, 2007, 21(10): 1040-1044.
- [13] 唐昭军,肖纳新.骨折合并脑外伤时NGF对骨折愈合的影响[J].安徽医药, 2009, 13(8): 918-919.
- [14] 田宝鹏,陈雯辉,潘海涛,等.脑外伤后胰岛素样生长因子-I及血小板衍生生长因子对骨折愈合的影响[J].首都医科大学学报, 2008, 29(1): 69-73.
- [15] 杨海,董金波,王维山,等.PDGF-BB在脑外伤合并骨折患者血液中的表达及临床意义[J].系统医学, 2016, 1(11): 7-10.
- [16] 岳春彦.长骨骨折患者合并脊髓损伤对骨折愈合和血清血小板衍生因子、血管内皮生长因子含量的影响[J].中国医学工程, 2018, 26(3): 23-26.
- [17] LOTTSPREICH F, KELLERMANN J, KEIDEL EM. Molecular biology tools: proteomics techniques in biomarker discovery [J]. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2010, 242: 19-22.

(收稿日期:2018-12-06,修回日期,2019-03-23)