

骨折断端的微动与小鼠胫骨骨折愈合方向的影响关系研究

李良刚¹, 田少奇¹, 刘永山², 王鸿宇¹, 丁岚峰¹, 赵恒心¹, 曾国波^{2*}

¹青岛大学附属医院关节外科, 山东 青岛

²安顺市西秀区人民医院骨科, 贵州 安顺

收稿日期: 2023年7月13日; 录用日期: 2023年8月7日; 发布日期: 2023年8月14日

摘要

目的: 探究骨折断端的微动与小鼠胫骨骨折愈合方向的影响关系。方法: 将18只C57BL/6小鼠分为假手术对照组(A组)、不稳定固定组(B组)及稳定固定组(C组), 每组各6只, 其中B、C组制作胫骨骨折模型, A组不做骨折处理, 术后7 d、14 d及21 d对三组进行X线摄影、染色及PCR基因检测, 以观察骨折断端髓内针固定情况、骨折线情况、骨痂生长情况、骨与软骨细胞的生长比例的差异及成骨标志性基因ALP、Runx2和软骨形成标志性基因Aggrecan、Sox-9分布比例的不同。结果: X线扫描发现, B组: 骨折处髓内针插入情况良好, 术后7 d、14 d及21 d小鼠骨痂形成少且缓慢, 骨折线2周内始终较为清晰, 3周后稍模糊; C组: 骨折处髓内针插入情况良好, 术后7 d、14 d及21 d小鼠钙化骨痂形成较快且多, 骨折线模糊; A组为假手术对照组。染色及PCR基因检测分析发现, B组第7 d~21 d极少量骨组织被染成红色, 而软骨呈条状被染成蓝色, 软骨逐步形成出现, 软骨细胞的标志性基因显著升高, 而成骨细胞的标志性基因略有升高, 骨总体呈现出以软骨成骨完成骨折愈合的表现; C组第7 d~21 d骨组织被多染成红色, 极少量为蓝色, 成骨细胞的标志性基因显著增高, 而成软骨细胞的标志性基因略有升高, 可见总体呈现出以成骨细胞增长的骨膜内成骨而进行骨折愈合的表现; A组为假手术对照组。结论: 骨折断端较低的机械应力可以促进骨折愈合更多地向成骨细胞增长的骨膜内成骨方向演进, 这可有效减少骨折不愈合与延迟愈合的发生。

关键词

机械应力, 胫骨骨折, 骨折愈合, 成骨细胞, 软骨细胞

*通讯作者。

Study on the Relationship between Micromotion of Fracture Ends and the Direction of Tibial Fracture Healing in Mice

Lianggang Li¹, Shaoqi Tian¹, Yongshan Liu², Hongyu Wang¹, Lanfeng Ding¹, Hengxin Zhao¹, Guobo Zeng^{2*}

¹Department of Joint Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Orthopaedics, Anshun Xixiu District People's Hospital, Anshun Guizhou

Received: Jul. 13th, 2023; accepted: Aug. 7th, 2023; published: Aug. 14th, 2023

Abstract

Objective: To explore the relationship between the micro movement of the fractured end and the direction of tibial fracture healing. **Methods:** We divided 18 C57BL/6 mice into three groups: sham operation control group (group A), unstable fixation group (group B) and stable fixation group (Group C), with six mice in each group. The tibial fracture models were made in groups B and C, while the fracture treatment was not made in group A. X-ray photography, staining and PCR gene detection were performed on the 7th, 14th and 21st days after operation in the three groups to observe the fixation of intramedullary nail at the fracture end, fracture line, callus growth, growth ratio difference between bone and chondrocytes, and distribution ratio difference between osteogenic marker genes ALP, Runx2 and chondrogenic marker genes aggrecan and Sox-9. **Results:** In group B, X-ray scanning showed that the insertion of intramedullary needle at the fracture was good, and the callus formation of mice was less as well as slow on the 7th, 14th and 21st days after operation, and the fracture line was always clear within 2 weeks and slightly blurred after 3 weeks. In Group C, X-ray scanning showed that the insertion of intramedullary needle at the fracture was good as well as and the calcified callus of mice formed rapidly and more, and the fracture line was blurred on the 7th, 14th and 21st days after operation. Group A was sham operated control group. In terms of the staining and gene detection analysis, in group B, from the 7th day to the 21st day, a very small amount of bone tissue was stained red, while cartilage was stained blue in strips, and cartilage gradually formed. The marker genes of chondrocytes were significantly increased, while the marker genes of osteoblasts were slightly increased, and bone showed the performance of complete fracture healing with cartilage osteogenesis. In group C, from the 7th day to the 21st day, the bone tissue was mostly stained red, and a very small amount was blue. The marker genes of osteoblasts were significantly increased, while the marker genes of chondroblasts were slightly increased. It can be seen that the overall performance of fracture healing was based on the periosteal osteogenesis of osteoblasts; Group A was sham operated control group. **Conclusion:** Lower mechanical stress of fracture can promote fracture healing to evolve towards the direction of osteogenesis in periosteum where osteoblasts grow, which can reduce the risk of fracture nonunion and delayed healing.

Keywords

Mechanical Stress, Tibial Fracture, Fracture Healing, Synthesis of Bone Cells, Chondrocytes

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来,中国创伤骨折的发生率逐年上升,虽然目前创伤骨折手术内固定技术已经非常成熟与完善,但骨折延迟愈合和不愈合的发病率仍然居高不下[1][2]。据统计有5%~10%的骨折最终会成为骨不连[3]。骨不连在给患者带来了沉重的经济负担的同时,还会降低患者的劳动能力,引发众多并发症,使患者的生活造成较大影响[4]。

骨折愈合通常受全身性因素和局部因素的影响。全身因素包括患者的性别、年龄、代谢和营养状况、活动情况等;局部因素包括:感染、骨质吸收或形成死骨、骨折端分离、骨折端异常活动(机械应力)等[5]。其中,骨折部位的机械环境是影响骨愈合的重要因素之一,其对修复过程的快慢和成功与否有着重要的影响[6]。据骨折部位的稳定性,骨折愈合主要包括两种方式,即原发性骨愈合(直接骨愈合)与继发性骨愈合(间接骨愈合)。若骨折部位的骨折间隙小于0.01 mm,局部应变小于2%,无骨痂愈合过程称为原发性骨愈合(直接骨愈合)[7][8]。继发性骨愈合(间接骨愈合)发生在骨折间隙较大,局部相对活动度大的情况[7][9]。可见,骨折修复中骨折断端力学因素影响骨折愈合方式的观点是毋庸置疑的,但当前力学因素对骨折愈合方向具体影响的相关动物实验研究证据尚不充分。

因此,我们计划选择不同稳定度的髓内针内固定技术,通过对比判断当选择的内固定工具使得骨折断端稳定度不同时,其对骨膜内成骨与软骨成骨的比例影响具体有何不同,从而研究骨折断端的微动与小鼠胫骨骨折愈合方向的影响关系。

2. 材料与方法

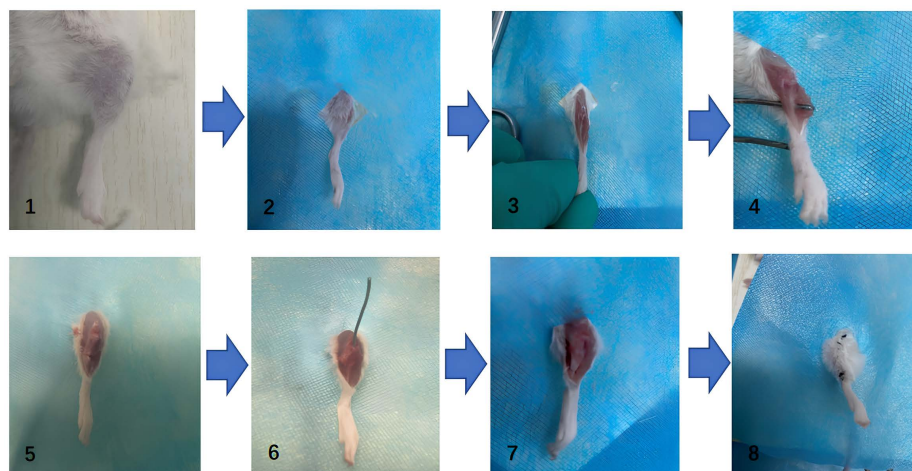
2.1. 材料

2.1.1. 实验材料

动物解剖器械(青岛大学附属医院科研中心骨科研究所)、小鼠髓内针(青岛大学附属医院科研中心骨科研究所)、石蜡切片机(青岛大学附属医院科研中心)、电子显微镜(青岛大学附属医院科研中心骨科研究所);茜素红(青岛大学附属医院科研中心骨科研究所)、阿利新蓝(青岛大学附属医院科研中心骨科研究所)、磷酸缓冲液。

2.1.2. 实验动物及模型分组

4周龄C57BL/6雄性小鼠,共18只,体质量 $21\text{ g} \pm 3\text{ g}$ 。结合以往经验,我们对胫骨骨折模型方案[10][11][12][13]进行了改良,利用随机数字表法将小鼠按分为3组,每组6只,分别为假手术对照组(A组)、不稳定固定组(B组)及稳定固定组(C组),共3组,每组分别使用1%戊巴比妥钠按 1 mL/kg 腹腔注射,待小鼠完全麻醉后,备皮、消毒小鼠右下肢,在小鼠右侧膝关节下切开约1 cm左右的纵行切口,于胫骨中上1/3处分离肌肉及筋膜,不稳定固定组及稳定固定组于胫骨中段使用眼科剪剪断胫骨骨干,假手术对照组不做骨折处理;3组均立即使用生理盐水冲洗胫骨表面,不稳定固定组及稳定固定组分别将0.7 mm、1 mm的髓内固定针自胫骨平台中心插入,使骨折达到功能复位。后将所有小鼠进行逐层缝合,制成小鼠胫骨干骨折模型。在清洁环境下对术后小鼠进行单笼饲养,室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$,湿度55%~60%,定期消毒与排风,常规给水、饮食及止痛药,小鼠可自由活动,小鼠胫骨干骨折模型的制作见图1。



1~2: 备皮消毒; 3~7: 切开 1 cm 纵行切口, 分离胫骨干并冲洗, 切开胫骨中段形成横行骨折, 插入髓内针使其骨折断端达到功能复位; 8: 缝合皮肤

Figure 1. The production process of a mouse tibial fracture model

图 1. 小鼠胫骨骨折模型的制作过程

2.2. 方法

2.2.1. 术后护理与指标获取

手术当天, 观察其苏醒情况。术后 3 d 之内, 在饮用水中添加对乙酰氨基酚混悬滴剂用于术后镇痛。术后 7、14、21 d 为指标获取的时间点。

2.2.2. X 线分析

通过 X 线检查评估骨折模型建立情况、髓内固定针形态及骨折愈合程度。分别于术后 7、14、21 d 用 X 线仪以 5 kV, 7.0 s 曝光时间为固定参数拍摄小鼠右胫腓骨正侧位 X 线片。参数评估由三位研究人员同时观察、讨论并统一意见后详细记录, 作为分析依据。

取其骨折术后胫骨骨痂, 使用 4% PFA 固定, 用 15% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片厚 5 mm, 使用阿利新蓝 - 茜素红染色, 光镜观察其组织病理改变。

2.2.3. 阿利新蓝 - 茜素红染色及 PCR 基因检测

首先取其骨折术后胫骨骨痂 4% PFA 固定, 后 15% EDTA 脱钙, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片厚 5 mm, 用 0.015% 的阿利新蓝染色液染色 20 min, 冲洗后用 3% 茜素红染色液染色 20 min, 再次冲洗, 使用中性和树胶封片, 后显微镜下观察拍片, 之后对骨痂组织进行 PCR 基因检测。

2.2.4. 观察指标

- ① 骨折模型建立情况、髓内固定针形态;
- ② 骨折愈合程度;
- ③ 染色中软骨与骨的分布比例;
- ④ 成骨标志性基因 ALP、Runx2 和软骨形成标志性基因 Aggrecan、Sox-9 分布比例。

3. 结果及分析

3.1. 小鼠稳定性胫骨骨折模型效果观察

小鼠苏醒后活动正常, 术后无死亡, 进食正常, 骨折术后髓内针固定良好, 髓内固定针无弯曲。

3.2. X 线分析

通过 X 线扫描发现, 不稳定固定组: 术后 7 d, 小鼠钙化骨痂形成极少, 骨折线清晰; 术后 14 d, 小鼠出现少量钙化骨痂, 骨折断端仍清晰; 术后 21 d 小鼠骨折线模糊, 骨痂较少, 骨折断端有骨性骨痂连接, 连接一般。稳定固定组: 术后 7 d, 小鼠钙化骨痂形成较多, 骨折线稍模糊; 术后 14 d, 小鼠出现较多钙化骨痂, 呈明显丘状, 骨折断端模糊; 术后 21 d 小鼠骨折线模糊, 骨痂已较少, 骨折断端有骨性骨痂连接, 密度较高, 连接好, 见图 2。

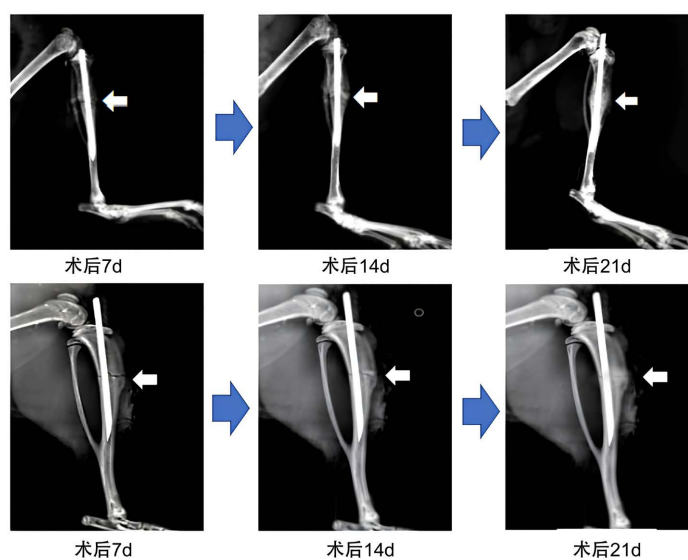


Figure 2. X-ray Findings of stable fixation group (above) and unstable fixation group (below)

图 2. 稳定固定组(上)与不稳定固定组(下) X 线表现

3.3. 阿利新蓝 - 茜素红染色

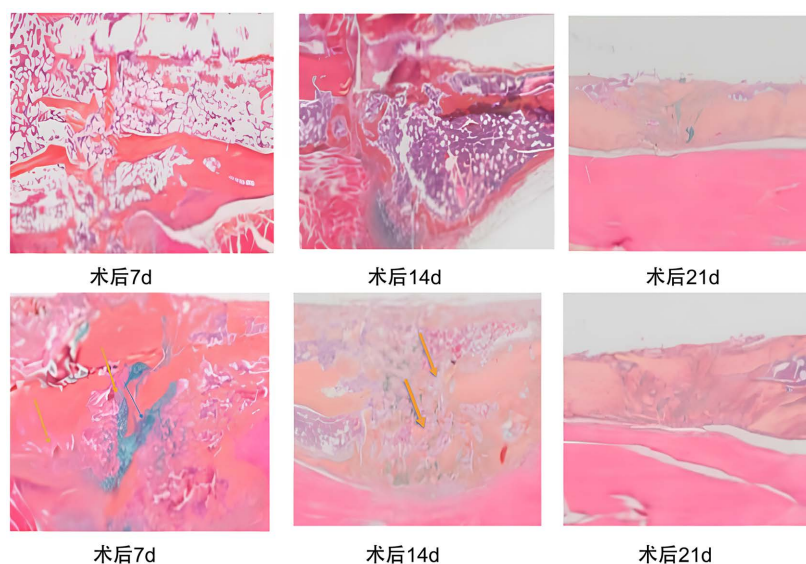


Figure 3. Staining results of stable fixation group (above) and unstable fixation group (below)

图 3. 稳定固定组(上)与不稳定固定组(下)染色结果

通过染色发现, 稳定固定组: 术后第 7 d~21 d, 骨组织被多染成红色, 极少量为蓝色, 总体呈现骨膜成骨的趋势; 不稳定固定组: 术后第 7 d~21 d, 极少量骨组织被染成红色, 而软骨呈条状被染成蓝色, 软骨逐步形成出现, 总体呈现软骨成骨的趋势, 见图 3。

3.4. PCR 基因检测

基因检测分析, 我们发现在不稳定固定组, 由于存在机械刺激的影响, 成软骨细胞的标志性基因显著升高, 而成骨细胞的标志性基因略有升高, 骨折以软骨成骨为主, 总体呈现出以成软骨细胞完成骨折愈合的表现。在稳定固定组, 由于缺少了机械刺激的影响, 成骨细胞的标志性基因显著增高, 而成软骨细胞的标志性基因略有升高, 骨折愈合多以骨膜内成骨为主, 可见总体呈现出以成骨细胞增长而进行骨折愈合的表现, 见图 4。

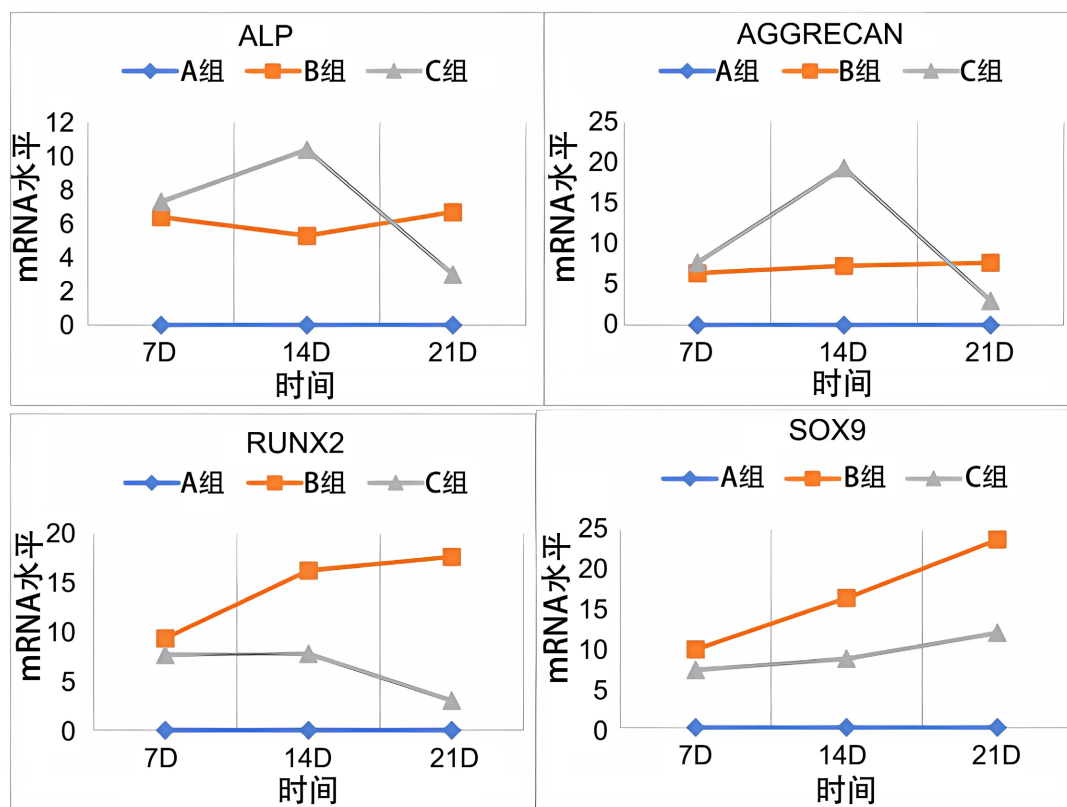


Figure 4. Comparison of the number of cartilage osteogenic marker genes and osteogenic marker genes in the Sham surgery control group (Group A), unstable fixation group (Group B) and stable fixation group (Group C)

图 4. 假手术对照组(A组)、不稳定固定组(B组)及稳定固定组(C组)三组软骨成骨标志性基因和成骨标志性基因数量的对比

4. 讨论

骨折是指骨的连续性遭到破坏。引起骨折的原因有很多, 可由暴力造成, 也可由轻微损伤引起(主要见于病理性骨折)。骨折之后的修复即为骨折愈合, 骨折愈合和其它组织不同之处在于它能够完全恢复其原有形式而不留有永久疤痕, 但是并非所有的骨折都能达到完美愈合。若骨折在复位和固定后, 骨折愈合所需的时间超过 4 个月仍未达到骨折完全愈合称为骨延迟愈合; 若在骨折发生 8 个月后骨折两端仍未达到骨性连接的称为骨不连, 又称骨折不愈合。

骨修复是指骨和软骨的形成阶段，其通过骨膜内化骨或软骨内化骨方式进行。骨膜内化骨发生在骨折断端固定相对稳固时，比如采用锁定钢板固定，此时由间充质分化成为胚性结缔组织膜，然后在此膜内成骨。软骨内化骨发生在骨折固定不可靠、骨折端相对位移较多时，比如使用髓内钉、外固定等，这种骨愈合包括软骨的持续生长与退化以及软骨组织不断被骨组织取代的过程。软骨内化骨发生、生长与改建穿插交错的情况远较骨膜内成骨复杂[14]。骨膜内化骨和软骨内化骨在继发性骨愈合中依据骨折部位稳定程度，可以单独发生，也可以同时发生。由于原发性骨愈合发生条件苛刻，在临床实际工作中所占比例较低。多数情况是这样的：我们对股骨干骨折采用了锁定钢板固定，术中我们对于骨折固定也感到满意，但在术后随访并不理想，其中在我们随访的47例股骨干骨折患者中，有近50%的患者骨折部位仍会出现大量的骨痂，致使出现骨折延迟愈合和不愈合，其中出现骨折延迟愈合2例，骨折不愈合1例，总发生率达到了6.4%，我们怀疑骨折断端没有确实的稳定，微动的存在刺激了大范围的软骨内化骨的发生，所以在很多暴力骨折中，比如粉碎性骨折，即便我们采用了像锁定钢板这样很稳定的固定技术，仍然不能消除骨折断端的微动，微动会诱发软骨内化骨，导致骨延迟愈合甚至不愈合。通过本次研究我们发现，使用稳定度差的内固定装置进行骨折断端的固定时，我们从骨痂生长情况、染色及基因分析可见骨折断端的骨折修复呈现软骨成骨的趋势，这种方式往往会导致骨折的不愈合或者延迟愈合，而使用较为稳固的内固定器械进行断端的固定可以显著减少微动，促使骨折断端向骨膜内成骨发展。

另外，本次研究结合以往研究者的经验，对骨折愈合模型进行改良并进行随机数字表分组，制作了开放性胫骨骨干横形骨折髓内针固定模型，该模型其优势的优势在于：第一，制作过程允许在直视下完成，我们使用刀片将胫骨骨干中段横向切断，这样可以保证骨折位置及分型的一致性，使得骨折形态不易受同种异体间存在的骨骼相关参数影响，如骨密度不同、骨骼长度不同等影响；第二，髓内针针对术后关节活动影响小，折端固定稳定、确切，无旋转移位的发生。此模型也存在不足，即：在于开放骨折模型局部发生感染甚至骨髓炎的风险高，术中有破坏局部骨膜，影响折端血供，以及手术所致周围软组织损伤的风险，均可影响骨折愈合过程[15]。同时，该实验应用了阿利新蓝-茜素红染色双染色法，其染色原理是阿利新蓝是一种含铜离子的苯二甲蓝染料，可将黏多糖染成蓝色，在骨染色中把软骨染成蓝色；茜素红能与钙结合形成红色沉淀，在骨骼染色中可将钙化的骨基质染成红色，可清晰的观察出软骨与骨的分布[16]。

5. 结论

骨折断端的微动对骨折愈合方式有关键的影响，通过更加稳固的内固定方式，可以减少骨折的机械微动，从而可以促进骨折愈合向骨膜成骨愈合方向演进，可减少骨折术后骨折不愈合与延迟愈合的风险。

致 谢

感谢课题组成员的共同努力及安顺市西秀区人民医院的课题支持。

基金项目

山东省自然科学基金面上项目(ZR202108110040)；青岛市医药卫生科研计划项目(2021-WJZD205)；安顺市科技计划项目(安市科社(2020)06号)。

参考文献

- [1] 常文利, 张英泽, 陈伟. 胫骨中下段骨折不愈合原因的研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2017, 6(9): 713-716.
- [2] 蔡金池, 张通, 袁志发, 等. 股骨干骨折不愈合现状及研究进展[J]. 甘肃医药, 2021, 40(9): 769-772+776.

- [3] 徐永清. 述评——骨不连、骨缺损[J]. 生物骨科材料与临床研究 2019, 16(4): 7-10+3.
- [4] Mills, L.A. and Simpson, A.H. (2013) The Relative Incidence of Fracture Non-Union in the Scottish Population (5.17 Million): A 5-Year Epidemiological Study. *BMJ Open*, **3**, e002276. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002276>
- [5] 孙贤杰. 骨折愈合的影响因素[J]. 中国医药指南, 2012, 10(17): 82-84.
- [6] 胡建威, 彭焯, 张里程, 唐佩福. 骨折端力学环境研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2022, 15(1): 76-80.
- [7] Claes, L., Recknagel, S. and Ignatius, A. (2012) Fracture Healing under Healthy and Inflammatory Conditions. *Nature Reviews Rheumatology*, **8**, 133-143. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>
- [8] Marsell, R. and Einhorn, T.A. (2011) The Biology of Fracture Healing. *Injury*, **42**, 551-555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- [9] Gerstenfeld, L.C., Alkhiary, Y.M., Krall, E.A., *et al.* (2006) Three-Dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **54**, 1215-1228. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A6959.2006>
- [10] Choi, P., Ogilvie, C., Thompson, Z., Miclau, T. and Helms, J.A. (2004) Cellular and Molecular Characterization of a Murine Non-Union Model. *Journal of Orthopaedic Research*, **22**, 1100-1107. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.03.008>
- [11] Le, A.X., Miclau, T., Hu, D. and Helms, J.A. (2001) Molecular Aspects of Healing in Stabilized and Non-Stabilized Fractures. *Journal of Orthopaedic Research*, **19**, 78-84. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(0\)00006-1](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(0)00006-1)
- [12] Holstein, J.H., Garcia, P., Histing, T., *et al.* (2009) Advances in the Establishment of Defined Mouse Models for the Study of Fracture Healing and Bone Regeneration. *Journal of Orthopaedic Trauma*, **23**, S31-S38. <https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e31819f27e5>
- [13] Gardner, M.J., van der Meulen, M.C.H., Demetrakopoulos, D., *et al.* (2006) *In Vivo* Cyclic Axial Compression Affects Bone Healing in the Mouse Tibia. *Journal of Orthopaedic Research*, **24**, 1679-1686. <https://doi.org/10.1002/jor.20230>
- [14] Thompson, Z., Miclau, T., Hu, D. and Helms, J.A. (2002) A Model for Intramembranous Ossification during Fracture Healing. *Journal of Orthopaedic Research*, **20**, 1091-1098. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(2\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(2)00017-7)
- [15] 米萌, 周力, 金红婷, 等. 髓内固定的小鼠胫骨开放骨折模型与股骨闭合骨折模型比较研究[J]. 北京生物医学工程, 2017, 36(4): 383-389+439.
- [16] 赵一松, 钟慧敏, 何志伟, 张国梁. 茜素红与阿利新蓝双染色法对小鼠下颌骨发育的整体观察[J]. 口腔医学研究, 2015, 31(1): 15-17+22.