文章编号:1000-5404(2008)14-1349-04

论著

持续动态压应力对骨折愈合时环氧合酶mRNA表达及愈合骨机械特性的影响

任 可[1],张春才[2],汪光晔[2],张俊杰[1],赵建宁[1],李 波[2] ([1]南京军区南京总医院骨科,南京 210002;[2]第二军医大学长海医院骨科,上海 200433)

摘 要:目的 探讨持续动态压应力环境下骨折愈合时环氧合酶转录水平的变化以及愈合过程中机械性能的改变。**方法** 新西兰兔行单侧肱骨干横断截骨,试验组以天鹅记忆接骨器内固定,在骨折端造成持续动态压应力,对照组以加压钢板内固定。分别于术后第3、7、14、21、28、56天时在骨折间隙内取材,行Real-time PCR研究。术后2、4、8、12周时另取肱骨标本用作骨密度和生物力学测试。**结果** 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) mRNA的表达量较骨折前显著上升,且试验组术后3~4周时明显高于对照组($P<0.05$),生物力学结果则显示愈合4周和8周时试验组的弯曲刚度、扭转刚度、最大扭转和弯距均显著高于对照组($P<0.05$),而此时试验组局部骨密度也相对较高($P<0.01$)。**结论** 天鹅记忆接骨器产生的持续动态压应力诱导了COX-2的转录,而COX-2 mRNA的高表达则促进了成骨细胞的分化和骨痂矿物质的沉积,加速了骨折的愈合和机械性能的恢复。

关键词: 骨折内固定术; 骨折愈合; 应力; 环氧合酶; 形状记忆合金
中图法分类号: R318.01;R336;R683.41 **文献标识码:** A

Effect of continuous dynamic pressure stress on cyclooxygenase mRNA expression, bone mass and mechanical properties during fracture healing process in rabbits

REN Ke[1], ZHANG Chun-cai[2], WANG Guang-ye[2], ZHANG Jun-jie[1], ZHAO Jian-ning[1], LI Bo[2] ([1]Department of Orthopaedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002; [2]Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To explore the effect of continuous dynamic pressure on cyclooxygenase mRNA expression, bone mass and mechanical properties during experimental fracture healing. **Methods** Unilateral osteotomy of left humeral diaphysis was performed on adult New Zealand rabbits. The humeral fracture was fixed by shape memory connector (SMC) in Study Group and by 4-hole dynamic compression plate (DCP) in Control Group. Samples from the fracture gaps were obtained on day 3, 7, 14, 21, 28 and 56 and the temporal expression patterns of cyclooxygenase mRNA during the healing process were examined by real-time PCR. The humeri were harvested and sent for biomechanical tests as well as dual-energy X-ray absorptiometry in 2, 4, 8 and 12 weeks postoperatively. **Results** The relative levels of COX-2 mRNA were elevated after fracture and were significantly higher in Study Group than in Control Group at 3 and 4 weeks postoperatively. The BMD values of the Study Group were significantly higher than those in the Control Group from 4 to 12 weeks postoperatively. With regard to bone mechanical parameters, the Study Group showed significantly higher maximum torque, torsional stiffness, bending strength and bending rigidity than those in the Control Group at 4 and 8 weeks postoperatively. **Conclusion** The persistent dynamic longitudinal pressure produced by SMC may accelerate bone healing with increased bone mass and bone strength after fractures in this rabbit model by promoting the proliferation activity of the osteoblasts and callus mineralization, which may be closely related with a higher COX-2 mRNA expression.

Key words: internal fixation; fracture healing; stress; cyclooxygenase; shape memory alloy

---

作者简介: 任 可,男,江苏省南京市人,博士,主治医师,主要从事创伤骨科方面的研究,发表论文10篇。电话:(025)80860035,E-mail: rk4587@sina.com.cn
收稿日期: 2007-07-30;**修回日期:** 2007-09-24

骨折愈合通过再生作用恢复骨组织原有的结构和性能,而合适的生物力学环境则是骨折愈合的必需条件[1]。我们根据临床使用的人体肱骨干镍钛合金天鹅型记忆接骨器按比例缩小制成了兔肱骨干的形状记忆接骨器(shape memory connector,SMC)。该器械的几何构型及其材质的形状记忆效应可在骨折端产生持续动态的纵向压应力[2]。这种力学环境与其他常见内固定物明显不同,临床应用于上肢长骨干骨折200多例显示其骨折愈合速度快,成功率高[3]。我们通过考察兔肱骨干骨折间隙内环氧合酶1(cyclooxygenase-1,COX-1)、环氧合酶2(cyclooxygenase-2,COX-2)的转录情况和愈合骨机械性能的变化,旨在探讨持续动态压应力环境下骨折愈合的特点及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 SMC的制作及作用原理 取含镍50%~53%的镍钛合金板材,厚1.5 mm,依据兔肱骨干中段解剖特征,制成由体部、尾钩、轴向加压支和持骨部组成的SMC。体部近端宽8 mm,远端宽6 mm,持骨部远、近端内径分别为5 mm和7 mm,内固定器长度30 mm。热处理取向单程,形状恢复温度(33±2)℃。

将SMC置于0~4 ℃的冰水中降温塑变,持针器展开持骨部,展距略大于骨骼直径。向背侧拉展加压钩,暂架于体部背侧,复位骨折端并将体部中点对准骨折处,比拟尾钩在近折段处的位置钻孔,置入SMC,再依伸展后的加压钩所在皮质骨处钻孔并插入加压钩。用40~50 ℃温水复温,完成固定。

1.1.2 兔肱骨干骨折4孔加压钢板的制作 兔肱骨干骨折4孔加压接骨板(dynamic compression plate,DCP)及配套螺钉由上海浦卫医疗器械公司制造。其材料为316L不锈钢,长、宽、厚分别为38、4、1.6 mm。

1.1.3 试剂 DRR041S Real-time PCR试剂盒和DRR019A RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,LightCycler Ⅱ实时定量PCR扩增仪购自Roche公司。兔COX-1、COX-2和5-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase,GAPDH)的PCR引物委托北京奥科公司合成,序列如下。

COX-1:上游5′-GGCTCGCAGGAGTACAGCTAC-3′
下游5′-AGGACGTGGTGGTCAATGTTC-3′
COX-2:上游5′-TCCCTCATCTGCAACAATGTG-3′
下游5′-GCAGGACTGTGGGATTGATGT-3′
GAPDH:上游5′-CACCCACTCCTCTACCTTCG-3′
下游5′-CGTCCTCCTCTGGTGCTCT-3′

NJ-50B型扭转试验机由上海青山实验器材厂制造。BZ 2.5/TS1S型材料试验机为Zwick GmbH & Co.产品。骨密度测定采用美国Norland-XR36双能X线骨密度仪。

1.2 方法

1.2.1 手术操作 成年雄性新西兰兔170只,体质量(2.4±0.3) kg。2.5%硫喷妥钠(25 mg/kg)耳缘静脉注射诱导后,40%氯安合剂(氯胺酮/安定,2 ml/kg)腹腔麻醉。俯卧位消毒铺巾,经外侧切口暴露左侧肱骨干中部,线锯横形截骨。随机选取70只兔以SMC内固定(实验组),70只以DCP内固定(对照组)。术后分笼饲养,自由活动,并肌注青霉素钠20万U/d,共5 d。

1.2.2 Real-time PCR分析 术后第3、7、14、21、28、56天时,两组各处死5只兔,取骨折断端间隙内的骨痂组织留作标本,注意防止RNA酶污染。另外,两组各取5只兔,未经截骨手术即处死,取其肱骨干中段骨质留作空白对照标本。术后3~56 d时每只动物骨折间隙各取50 mg骨痂标本,液氮中迅速研磨至粉末状,再加入2 ml Trizol,氯仿分离,水相层经异丙醇沉淀,RNA产物溶解于DEPC处理的双蒸水中。取总RNA 1 μg,按TaKaRa公司DRR019A试剂盒要求配制反转录反应液10 μl,65 ℃水浴1 min,30 ℃放置5 min,65 ℃孵育15 min,98 ℃灭活逆转录酶,低温保存。配制PCR反应液:SYBR Premix *Ex Taq* 10 μl,上、下游引物各0.5 μl,RNase Free ddH_2O 8 μl。分别取1 μl反转录产物加入含3种基因引物的PCR反应液中,按以下条件反应:95 ℃预变性3 min;95 ℃ 2 s、56 ℃ 8 s、72 ℃ 11 s扩增,循环40次;绘制熔解曲线。以双ΔCt值法计算两组各时间点COX-1和COX-2 cDNA模板数与GAPDH模板数比值相对于术前的变化趋势。

1.2.3 骨密度测定 术后2、4、8、12周时,两组各取10只兔,完整取出肱骨,仔细剔除软组织附丽,保护骨折处骨痂的完整,用湿盐水纱布包裹,-20 ℃冻藏。待全部标本收齐后取出,室温下旷置1 h充分解冻并取下内固定,用干纱布吸干标本表面的水分,以原骨折线为中心,在Norland-XR36双能X线骨密度仪上测量固定段骨密度。

1.2.4 力学测试 拆除内固定并测定骨密度后两组各时间点各取肱骨标本5个,两端分别置于相距4.5 cm的两个内径16 mm的公制内六角金属套筒腔内,牙托粉包埋,使肱骨与套筒成为一个整体试件。包埋时注意保持两个套筒轴线重合并与肱骨的解剖轴线方向一致。将试件两端的套筒分别接入NJ-50B型扭转试验机的两个夹头中测定扭转参数,加载速度为36°/min以尽量减小惯性误差。两组再各取术后4~12周时的肱骨标本5个,在BZ 2.5/TS1S型材料试验机上测定抗弯刚度和最大弯距。测量时保持两端的夹头相距5 cm,中央夹头的加载速率为0.3 mm/min,肱骨内侧面朝向上方。另外,两组各取10只未经手术的兔处死取材作空白对照,其中5例标本用于扭转测试,另5例用于弯曲测试。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.5统计软件分析。同一指标的组别和愈合时间主效应及交互作用以双因素方差分析考察,相同时间点的组间差异行非配对计量资料比较的t检验。

表 1　术后不同时间 COX-1、COX-2 mRNA 相对表达量相对于骨折前升高的倍数($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	56 d
COX-1						
对照组	0.68 ± 0.31	1.10 ± 0.41	1.15 ± 0.49	0.94 ± 0.57	1.56 ± 0.54	0.86 ± 0.28
实验组	0.95 ± 0.35	1.39 ± 0.47	1.04 ± 0.32	1.31 ± 0.51	1.02 ± 0.57	0.83 ± 0.39
COX-2						
对照组	7.01 ± 1.62	4.03 ± 1.27	8.06 ± 2.72	8.70 ± 3.16	8.40 ± 2.81	2.90 ± 1.00
实验组	7.94 ± 2.04	5.98 ± 1.92	11.03 ± 2.92	19.06 ± 5.24[a]	13.86 ± 4.12[a]	3.32 ± 0.84

a: $P<0.05$, 与对照组比较

2　结果

2.1　Real-time PCR 结果

所有实验动物均存活,多数动物术后 2 ~ 3 d 即开始活动患肢,2 周内步态基本恢复正常(图 1)。愈合过程中,COX-1 mRNA 相对表达量在时间、组别两因素上的主效应均无统计学意义,两因素间无交互作用,相同时间点两组之间也未见明显差异。COX-2 mRNA 表达量取对数换元满足方差齐性后显示,组别及愈合时间的主效应均存在统计学意义,但两因素之间无明显交互作用。相同时间点的 t 检验显示术后 3 周及 4 周时实验组 COX-2 mRNA 的表达量明显高于对照组(表 1)。



A:实验组;B:对照组

图 1　实验动物术后 12 周时 X 线片表现

2.2　骨密度

术后 2 周时两组骨密度无明显差异。从术后 4 周开始试验组骨密度明显高于对照组($P<0.01$),12 周时差异有所缩小,但仍有显著差别($P<0.05$)。具体数值见表 2。

表 2　术后不同时间固定下兔肱骨的骨密度(g/cm^2, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	14 d	28 d	56 d	84 d
对照组	0.430 ± 0.027	0.453 ± 0.034	0.498 ± 0.054	0.565 ± 0.046
实验组	0.425 ± 0.023	0.502 ± 0.042[a]	0.562 ± 0.043[a]	0.614 ± 0.052[b]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与对照组比较

2.3　力学性能测定

术后 2 周时,两组肱骨断端尚未形成骨性连接,不能测得数据。从术后 4 周起,两组的弯曲和扭转指标数值均逐渐升高。4 周和 8 周时,实验组的弯曲刚度、扭转刚度以及最大扭转和弯距均明显高于对照组($P<0.05$)。至术后 12 周时两组间各力学指标已无显著差异(表 3、4)。

表 3　术后不同时间肱骨标本的抗弯曲性能(%, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	28 d	56 d	84 d
对照组弯曲刚度	33.22 ± 11.82	53.34 ± 9.93	79.52 ± 11.74
实验组弯曲刚度	55.26 ± 8.43[a]	72.47 ± 10.46[a]	85.36 ± 10.12
对照组最大弯距	32.64 ± 9.79	58.42 ± 12.39	87.32 ± 11.46
实验组最大弯距	48.26 ± 7.90[a]	81.50 ± 10.18[a]	95.04 ± 12.77

a: $P<0.05$, 与对照组比较

表 4　术后不同时间肱骨标本的抗扭转性能(%, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	28 d	56 d	84 d
对照组扭转刚度	39.72 ± 8.87	60.42 ± 10.27	81.60 ± 12.09
实验组扭转刚度	61.49 ± 10.99[a]	82.96 ± 9.50[a]	92.32 ± 10.77
对照组最大扭距	24.28 ± 5.45	49.52 ± 9.43	87.42 ± 10.23
实验组最大扭距	41.16 ± 7.15[a]	77.08 ± 10.14[a]	94.34 ± 11.03

a: $P<0.05$, 与对照组比较

3　讨论

骨折愈合的最终目的在于机械性能的恢复,而愈合早期的内固定力学环境对以后的愈合过程具有决定性影响。内固定物轴向弹性适中时愈合骨的机械性能恢复得较好,内固定轴向刚度过大或过低时均不利于骨强度和刚度的增长,其原因是一定的纵向负载有利于骨痂的矿化和骨痂结构的成熟改建[4,5]。为此,我们以 SMC 和 DCP 在兔肱骨干骨折端制造了两种应力环境,并观察了愈合骨 COX 酶转录和机械性能的差异。SMC 在体温驱动下产生形状记忆力学效应,其体部和持骨部的多点抱持固定保证了骨折端的稳定,加压钩则在尾钩的拮抗下对骨折端产生持续的纵向压应力,其力值不因骨折端的吸收而消减[2,3]。镍钛合金弹性模量仅 54.18 Gpa,无明显应力遮挡效应,肢体活动时骨折端承受的压力进一步增加,因此骨折间隙始终处在持续、动态的压应力/应变下,其力值接近生理水平[2]。对照组 DCP 的抗剪及抗弯作用较好,也能维持骨折端的稳定,但由于骨折端的吸收和骨组织本身的粘弹性,DCP 的加压作用会随时间明显减退。又因不锈钢材料刚度高,外加载荷大部分由 DCP 承担,所

以骨折端应力遮挡明显,骨折间隙内纵向应变很低。

骨密度可以反映骨痂矿化程度,折弯和扭转试验则分别反映了骨痂的杨氏弹性模量和剪切弹性模量,均为评价骨机械性能的可靠指标[6]。我们发现愈合骨的刚度及强度总体上随时间呈非同步增长,前 8 周内刚度增加较快,而强度的增加主要位于后期,这可能与骨痂的改建活动有关。组间对比显示骨折后 4 ~ 8 周期间实验组弯曲及扭转的刚度和强度均明显高于对照组,且自术后 4 周起实验组骨折端骨密度也相应较高。因两组动物手术入路相同、血供破坏程度相近,其差异主要在于内固定力学环境,以上结果表明 SMC 产生的生理水平的持续动态纵向压应力负载促进了骨痂基质的矿化和成骨,这加速了骨折处矿物质的沉积和骨痂结构的改建,因此实验组愈合骨的机械性能较好。

为进一步探讨引起两组愈合结果差异的机制,我们考察了 COX 的转录变化。COX 是人体内合成一系列前列腺素的关键酶及限速步骤[7],包括 COX-1 和 COX-2 两种同工酶。研究表明,COX-1 并非骨折愈合所必需,而 COX-2 在出生后的骨折愈合中起着不可或缺的作用[7-9]。本实验两组骨折间隙内 COX-1 mRNA 的表达量不随愈合进程和力学环境变化,再次证实 COX-1 对骨折愈合无明显作用。相反,骨折愈合期间两组 COX-2 的转录水平都显著上升,最高可至骨折前的 19 倍,且均在 3 周时达到高峰,时相规律明显,提示 COX-2 确在该骨折愈合模型中发挥重要作用。COX-2 对骨折愈合的调节是基于其合成的 PGE2 的骨代谢活性[10]。PGE2 可作为信号分子启动一系列成骨相关基因的转录表达以促进成骨细胞增殖分化,刺激骨折处的软骨内成骨和膜内成骨,从而提高局部的骨量和机械强度[11]。选择性抑制 COX-2 蛋白活性或 COX-2 基因敲除均会引起骨痂矿化延迟并使大鼠愈合骨标本的刚度和强度对照组明显降低[10-12]。另有研究显示[13, 14],机械应力可诱导成骨细胞大量合成 COX-2 并通过催生的 PGE2 及其第二信使 cAMP 对骨折愈合进行正向调控。本实验中,愈合 3 ~ 4 周时实验组 COX-2 mRNA 含量明显高于对照组,证实了 SMC 的持续动态压应力提高了 COX-2 的转录水平。再考虑到两组愈合标本折弯和扭转试验以及骨密度检测结果的差异,且 COX-2 的转录高峰早于愈合骨刚度及强度的上升阶段,故实验结果提示 SMC 固定下的持续动态压应力环境系通过诱导 COX-2 基因的转录表达促进了成骨细胞的分化成熟,这激发了局部的成骨反应,有助于骨痂中矿物质的沉积和骨痂结构的成熟改建,进而加速了愈合骨机械性能的恢复。另一方面,DCP 加压作用的减退和过高的刚度则迟滞了骨痂的矿化,延缓了刚度及强度的增长。

参考文献:

[1] Augat P, Simon U, Liedert A, *et al*. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone[J]. Osteoporos Int, 2005, 16(Suppl 2): S36 - S43.

[2] 许硕贵, 张春才, 苏佳灿, 等. 天鹅型记忆接骨器治疗肱骨骨折和骨不连的三维有限元分析[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(10): 943 - 945.

[3] 张春才, 许硕贵, 王家林, 等. 上肢骨干天鹅型记忆接骨器的设计与临床应用[J]. 第二军医学学报, 2001, 22(10): 939 - 942.

[4] Utvag S E, Reikeras O. Effects of nail rigidity on fracture healing. Strength and mineralisation in rat femoral bone[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 1998, 118(1 - 2):7 - 13.

[5] Augat P, Merk J, Wolf S, *et al*. Mechanical stimulation by external application of cyclic tensile strains does not effectively enhance bone healing[J]. J Orthop Trauma, 2001, 15(1):54 - 60.

[6] Adili A, Bhandari M, Schemitsch E H. The biomechanical effect of high-pressure irrigation on diaphyseal fracture healing *in vivo*[J]. J Orthop Trauma, 2002, 16(6): 413 - 417.

[7] Einhorn T A. Cox-2: Where are we in 2003? - The role of cyclooxygenase-2 in bone repair[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(1): 5 - 7.

[8] Seidenberg A B, An Y H. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? [J]. Pharmacol Res, 2004, 50(2): 151 - 156.

[9] Goodman S B, Ma T, Genovese M, *et al*. COX-2 selective inhibitors and bone[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2003, 16(3): 201 - 205.

[10] Zhang X, Schwarz E M, Young D A, *et al*. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair[J]. J Clin Invest, 2002, 109(11): 1405 - 1415.

[11] Simon A M, Manigrasso M B, O'Connor J P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(6): 963 - 976.

[12] Endo K, Sairyo K, Komatsubara S, *et al*. Cyclooxygenase-2 inhibitor inhibits the fracture healing[J]. J Physiol Anthropol Appl Human Sci, 2002, 21(5): 235 - 238.

[13] Chen N X, Ryder K D, Pavalko F M, *et al*. Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(5): C989 - C997.

[14] Chen N X, Geist D J, Genetos D C, *et al*. Fluid shear-induced NFkappaB translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release[J]. Bone, 2003, 33(3): 399 - 410.

(编辑 吴培红)