维普资讯 http://www.cqvip.com

81-84

骨特异性生长因子对促进骨折愈合的实验研究

R683.420.5

赵宝东* 王化州** 齐志敏** 赵春玉*** 李德荣* 任 颖*

提 要 本文通过给股骨骨折的小鼠口服从新鲜猪骨提取的骨特异性生长因子后，观察骨痂的组织结构变化。结果发现高剂量组的动物骨折处在骨痂、成纤细胞、毛细血管以及骨生成细胞数量等方面比低剂量组的有明显优势。

关键词 股骨骨折 骨痂 骨特异性生长因子

长期以来，人们从骨折愈合过程中已观察到了骨的代谢，即骨的形成、吸收、再建过程，并逐渐认识到了这种代谢受着体内多种活性物质的调节。近年来，研究结果发现骨和软骨内亦含有多种生长因子，并已证实骨生长因子的缺乏或活性不足及骨痂组织的血循环障碍，是延迟骨愈合乃至骨不连接的重要原因。因此，用骨生长因子治疗骨折、骨缺损及骨不连是骨科领域预攻克的课题。但在国内这方面的报道较少，为了进一步观察其作用和探讨其机理，我们用新鲜猪骨提取骨特异性生长因子，对骨折动物进行了实验研究，用 X 线摄片和组织学检查方法，观察其成骨效应及组织学反应，为临床应用奠定了基础。

材料与方法

一、制剂的制备

取新鲜猪四肢骨，去软组织、骨髓和干骺端，洗净，氯仿、甲醇脱脂，打碎，称重，每 100g 原料加双蒸水 200ml，热提取 1 小时，过滤，高速离心(1500r/min)30 分，取上清液，相继两次 Bio－Gelp 60 柱层析，洗脱液用 SS－3 型超滤器超滤(分子量 11KDa)，浓缩。经测定是含有 112 个氨基酸的小分子多肽，其内含有骨源性生长因子(bone－derived growth factor, BDGF)和骨生长因子(skeletal growth factor, SGF)两种成分。其特点是可溶于水和 75% 以下乙醇，可被 10 倍量丙酮沉淀，水溶液 pH4 和 8.5 不产生沉淀，对热稳定，较长时间加热不失去其药理作用。本制剂制成浓度为 0.12mg/ml 的口服液，高压灭菌，4℃冰箱保存。

二、对骨折修复作用的观察

取昆明小鼠 60 只，雌雄各半，体重 18～20g。将每只小鼠右后肢股骨定点制成骨折模型并外固定，同时随机分为甲、乙、丙三组，每组 20 只，雌雄各半。甲、乙两组分别供给生长因子口服液 1.0ml/20g 和 0.5ml/20g，丙组供给生理盐水 1.0ml/20g 为对照。每日上午定时灌胃，连续 21 天。在第 7、14、21 天分别进行 X 线摄片，以观察成骨过程和效果。每次同时各组随机杀死 5 只小鼠，取下右后肢对骨折处进行切片，观察骨痂中的微细结构变化及发展规律。

结 果

一、X 线所见

给药后 14 天，大剂量组(1.0ml/20g)实验动物在下肢骨折处已有明显骨性骨痂形成，局部增粗，密度较高，骨折线已模糊不清，但断端骨髓腔未通。而乙组(低剂量实验组)在骨折处仅见纤维性骨痂，骨痂密度较低，局部亦增粗，

* 作者单位：121001 辽宁省锦州市锦州医学院解剖学教研室
** 锦州医学院药理教研室
*** 锦州医学院第一附属医院

维普资讯 http://www.cqvip.com

但骨折线仍清楚可见，断端未愈合。而丙组（对照组）动物伤肢局部软组织肿胀明显，未见有骨痂形成，断端无骨连接，骨折线存在。给药后21天，大剂量实验组（甲组）动物伤肢完全愈合，骨折线消失，两断端骨髓腔再通，骨干皮质厚度与健侧完全相同，双下肢活动自如。低剂量实验组（乙组）伤肢局部形成了明显骨性骨痂，局部增粗，密度增大，骨髓腔未通，仍可见骨折线。而丙组（对照组）伤部仅发现有少量纤维性骨痂，密度较低，两断端清楚可见，根本未愈合（见图片1～3）。

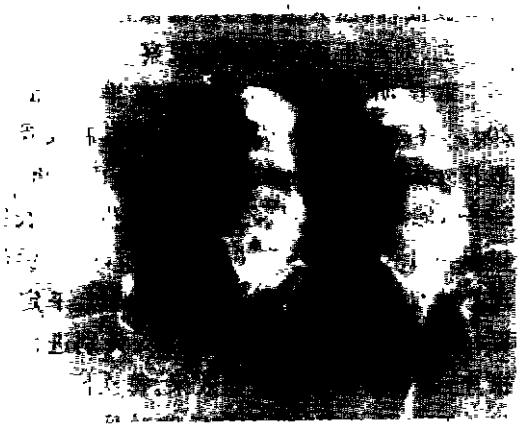


图1～3

一示骨折处

图1示低剂量实验组骨折后21天生长情况

图2示高剂量实验组骨折后21天生长情况

图3示对照组骨折后21天生长情况

二、镜下所见

将术后1、2、3周的实验动物右下肢骨经甲醛固定、脱钙、脱水、石蜡包埋，纵向切成6μm厚切片，HE染色，镜下观察。

骨折后一周，实验组外骨痂中含有较多的成纤维细胞和纤维结缔组织，小血管和毛细血管。骨生成细胞数量多，呈不规则卵圆形，成群存在，胞质少，核大、圆形。高剂量组外骨痂中已形成幼稚的片状骨小梁，骨小梁边缘围有大量成骨细胞，呈方形，成层存在，胞体大，功能活跃。有些成纤维细胞被丰富的胶原纤维包埋，并有类骨质沉积，有演变为成骨细胞的趋势。而对照组在骨折两端仅见有大量淋巴细胞浸润，未见有成骨细胞出现。

骨折后2周，高剂量组外骨痂骨小梁进一步成熟，呈网状或海绵状，网眼内充满红骨髓。功能活跃的成骨细胞、成纤维细胞与功能活跃的破骨细胞同期发挥作用，进行内、外骨痂的改建和塑建，其结果部分骨小梁被吸收。低剂量组外骨痂中含有大量成纤维结缔组织和成纤维细胞，仅见少量散在的骨生成细胞和成骨细胞，未见骨小梁。

骨折后3周，高剂量实验组对外、内骨痂的改建、塑建进一步完善，骨髓腔已通，骨折线已不明显，成骨细胞和破骨细胞明显减少，此时相当于对照组第6周时的图像。

三、骨痂内骨系细胞立体定量分析

在HE染色切片上，取外滑痂远、中、近端3个视野，应用微机图像处理系统处理切片图像。据细胞立体定量学原理，编制计算机程序，分别计算得出骨折后第1、2、3周时骨痂内骨生成细胞、成骨细胞的以下参数：体积密度（V_{vt}）、平均体积（V_v）、数量密度（N_v）。计算资料经方差齐性检验后，进行方差分析，t检验。①骨生成细胞　对组织切片中的骨生成细胞进行微机图像分析、处理并计算，得出各参数值，如表1。②成骨细胞　对已形成完整骨小梁雏形，光镜下易被识别的成骨细胞的第2、3周骨痂组织切片，进行微机图像处理，得出各参数值，如表2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同期骨痂内骨生成细胞体视学分析 (x±s)

项目	W_1			W_2			W_3		
	对照组	低剂量组	高剂量组	对照组	低剂量组	高剂量组	对照组	低剂量组	高剂量组
$V\bar{v}t$ (%)	0.6±0.01	0.10±0.03*	0.22±0.04**	0.80±0.02△△	0.12±0.01	0.18±0.02**	0.21±0.03△△	0.13±0.01*	0.14±0.01**
$N\bar{v}$ (个/mm³)	2456±125	42185±1324**	64426±2689**	6754±346△	53648±4416**	61345±1229**	43268±7612△△	54768±3481	51296±2961
$V\bar{v}$ (μm³)	525±24	874±67	1085±46*	1087±28△	885±26	912±42	1127±106△	815±46*	927±67*

*实验组与对照组比较 $P<0.05$，**$P<0.01$

△与对照组第一周比较 $P<0.05$，△△$P<0.01$

表 2 不同期骨痂内成骨细胞体视学分析 (x±s)

项目	W_2			W_3		
	对照组	低剂量组	高剂量组	对照组	低剂量组	高剂量组
$V\bar{v}t$ (%)	0.06±0.02	0.12±0.03*	0.24±0.05**	0.08±0.04	0.14±0.02*	0.18±0.02**
$N\bar{v}$ (个/mm³)	5436±425	64761±236**	168716±3264**	58964±1244	78986±1647	43562±4658
$V\bar{v}$ (μm³)	1085±468	1425±417*	1612±223*	1175±356	1576±384*	1497±423

*实验组与对照组比较 $P<0.05$，**$P<0.01$

$V\bar{v}t$ 和 $V\bar{v}$ 骨折后 2、3 周，实验组均大于对照组；$N\bar{v}$ 于骨折后第 2 周，实验组大于对照组，而第 3 周，对照组大于高剂量组。

讨 论

临床上一旦发生骨折，在断端部位很快就会出现纤维组织增生，血管增加，细胞分裂、增殖活跃。这种骨的再建过程受着体内多种激素等活性物质的调节，同时也受骨和软骨内含有的多种多肽生长因子的调控。它们作为局部调节因子，以自分泌或旁分泌的方式调节着骨和软骨内各种细胞的增殖与分化，调节骨和软骨基质的合成与降解[1,2]。骨生长因子的作用机制和其活性的调控，是它们与其他激素共同构成了对骨形成和骨吸收平衡过程的精细调控网络。

通过我们大量研究证明，骨和软骨组织内含有多种生长因子，其中对骨修复起重要作用的是骨特异性生长因子。这些生长因子由骨和软骨细胞产生，贮存在骨基质中，含量较高，其在一定条件下可被释放或激活，促进骨折区或缺损部的血液循环，促使毛细血管增生，加强 DNA、I 型胶原和非胶原的合成，刺激骨细胞和软骨细胞增殖，抑制破骨细胞性骨吸收，加快骨折或骨缺损的修复[3]。

骨生长因子之所以能发挥其生理活性，是由于受受体介导的。在骨和软骨的细胞膜上存在着与各种生长因子相对应的特异性受体。尽

维普资讯 http://www.cqvip.com

管有些生长因子有多种形式，但他们都分别作用于各自的一种受体。在骨和软骨内、生长因子受体在细胞的分布较广，几乎所有的细胞均含有一种或数种生长因子的特异性受体。这些受体对相应的生长因子有高度亲和力，当血液中某一种生长因子浓度增加时，就会在相应受体介导下到达受伤处，广泛参与骨再建的局部调节作用，促进骨修复。

当前，将骨生长因子作为促进骨折和骨缺损的治疗，用于受累的前成骨细胞，以加强其增殖及功能的恢复，是很有应用前景的。经研究表明，在骨折愈合时，无论在骨膜内成骨期或软骨内成骨期，硬骨痂中 TGF－β_1 的 mRNA 表达明显增高，而且在与间质细胞、软骨细胞增殖分化有关的软骨痂中，TGF－β_1 表达也增高[4]。体外实验证明，TGF－β_1 可刺激骨痂生长及骨痂内表现型基因的表达，促进骨和软骨细胞的分化增殖，加快骨和软骨基质合成，从而加速骨折愈合过程[5]。本实验无论从 X 线宏观上，还是显微镜下微观及细胞立体定量分析，均已证明了骨特异性生长因子生理活性大，诱骨能力强，局部应用 1～5ng 就可诱导出新骨，诱导的骨中 AKP 及 Ca^{++} 含量明显升高[6]，是一种强促分裂因子。另外，因其是小分子多肽类，溶于水，不被酸碱破坏，即可口服全身用又可局部应用，使用方便，无毒无副作用，今后必将广泛应用于骨科临床。

参 考 文 献

1. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair and cancer. J clin Invest, 1986, 78: 329－332.
2. Mayne, Bargeson RE. Structure and function of collagen types. New York, Aca demic, 1987.
3. Canalis E. effect of platelet－derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvariae. Metabolism, 1981, 30: 970－975.
4. Joyce ME, et al. Transforming growth factor－β_1 is exprossed and synthesized during fracture healing. Ann New York Acad Sci, 1990, 593: 347－349.
5. Joyce ME, et al. Role of transforming growth factor－β in fracture repair. Ann New York Acad Sci. 1990, 593: 107－123.
6. Sampath TK, et al. Isolation of osteogeuin . and extracellular matrixassociated bone－induction protein by heparin affinity chromatography. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 7109－7113.

（收稿：1997－06－15）

·个　　案·

胃胰腺组织异位一例报告

钱才友*　何　瑞*

患者，男性，37 岁，住院号 44844，有似胃溃疡病史多年，未做胃镜证实，一周前患者感上腹部饱胀，嗳气、返酸伴有隐痛，昨天少量饮酒后上腹部疼痛加重，解暗红色糊状便 3 次，总量约 1000ml，伴心慌、头昏、四肢乏力，经内科对症保守治疗无效，行胃大部切除术。

病理检查：胃窦部见一肿块 2.5×1cm 突向胃腔，肿块基底部粘膜有一 0.5cm 破裂口，胃其余部分未见异常。镜下见：胃粘膜固有层及粘膜内，有多灶性异位胰腺组织，呈小叶状分布，腺泡上皮分化良好，并见一小中导管，其上皮分化良好，部分管腔扩张呈小囊状，异位组织周围有纤维组织及少量平滑肌细胞增生，并见大量含铁血黄素沉积及少量细胞浸润。

病理诊断：胰腺组织异位伴腺肌瘤样改变。

讨论：胃胰腺组织异位是胃发育异常性疾病，在胃粘膜下或在肌层内出现胰腺组织为其特征，常因胃的其它疾病检查偶然发现，有时临床表现似溃疡病或因异位胰腺组织肿块较大而怀凝为胃肿瘤切除后病检确诊，文献中有少数迷人的胰腺组织发生癌变的报道，临床治疗通常以手术为主。

（收稿：1998－03－09）

* 作者单位：安徽铜陵有色公司职工总医院　244000
病理科