

细胞外三磷酸腺苷对大鼠桡骨骨折愈合的影响

杜深星¹, 徐守宇^{1,2}, 储利胜¹, 何帮剑²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310005)

摘要 目的:研究细胞外三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)对大鼠桡骨骨折愈合的影响。**方法:**100 只 SD 大鼠随机平均分成 ATP 组和对照组, 各组大鼠均采用顾氏造模法造成右侧桡骨骨折模型。ATP 组于造模时断端注入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ATP, 术后第 1 天、1 周、2 周、4 周断端注入 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ATP, 剂量均为 $0.05 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, 对照组断端注入等体积生理盐水。术后第 1 周、2 周、4 周、6 周取材, 进行放射学、组织学、生物力学检查。**结果:**放射学检查术后第 4 周 ATP 组大多数骨折线趋于消失, 其中有 60% 的标本显示骨折线完全消失, 骨痂密度与骨密质基本相同, 达到骨性愈合; 对照组骨折线模糊, 骨折断端有骨痂填充, 且大多数已桥接。术后第 6 周 ATP 组骨折线基本消失, 骨痂密度与骨密质基本相同, 达到骨性愈合; 对照组骨折线趋于消失, 骨折断端被骨痂填充并桥接。组织学检查术后第 4 周 ATP 组骨折断端骨性骨痂融合形成板层骨, 不规则骨髓腔亦融合形成新的再通的骨髓腔, 达到骨性愈合; 对照组断端可见大量骨性骨痂, 形成不规则的骨髓腔。生物力学测定术后第 4 周和第 6 周 ATP 组骨痂的最大载荷、最大位移和弹性模量与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**细胞外 ATP 具有促进骨折愈合的作用。

关键词 三磷酸腺苷 骨折 再生 大鼠

Effect of extracellular ATP on the radial fracture repair in rats DU Shen-xing*, XU Shou-yu, CHU Li-sheng, et al. * Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To study the effect of extracellular ATP on the radial fracture repair in rats. **Methods:** 100 SD rats were randomly divided into two groups: the ATP group ($n = 50$) and the control group ($n = 50$). All rats were established into right radius fracture rats models and the ATP group were injected $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP ($0.05 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) through fracture site in the same time. Then the ATP group were injected $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP ($0.05 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) on these days: the day after the operation, 1 week after the operation, 2 weeks after the operation and 4 weeks after the operation. The control group were injected equal volume of NS through fracture site on the time listed above. All the rats were taken postoperative radiographic examination, histological examination and biomechanics measurements on these days: 1 week after the operation, 2 weeks after the operation, 4 weeks after the operation and 6 weeks after the operation. **Results:** The result of postoperative radiographic examination for the ATP group 4 weeks after the operation was that most fracture line tended to disappear and 60% of rat models in the ATP group showed a complete disappearance of their fracture lines with the density of poroma closing to the bone cortex which means the bones were basically healed. The control group's fracture lines tended to be blurred. The fracture site was filled with callus and most of them had already been bridged. After 6 weeks, the fracture lines of ATP group were disappeared basically with the density of poroma closing to the bone cortex. Fracture lines of the control group tend to disappear. The fracture site was filled with callus and had been bridged. After 4 weeks, histological examination showed that the osseouscallus formed into lamellar bone, and the marrow cavity revascularized. The fracture site of the control group showed that a lot of osseouscallus formed into irregular bone medullary cavity. Biomechanics measurements after 4 weeks and 6 weeks show that the poroma of the ATP group has a maximum of load, the biggest displacement and the greatest elastic modulus ($P < 0.01$) compared to the control group. **Conclusion:** Extracellular ATP can promote fracture repairment.

Key words Adenosine Triphosphate; Fracture; Regeneration; Rat

骨折是骨伤科最为常见的疾病之一, 其自然愈合需要较长的时间, 因此促进骨折愈合达到功能的正常

化理所当然地成为了骨科领域中十分活跃的课题。在复位、固定与功能锻炼三大传统的治疗原则基础上, 大多数再施加物理刺激、口服药物等方法。然而随着骨折愈合相关机制基础理论的研究发展, 促进骨折愈合的方法已于实验室中得到广泛开展, 如局部注

基金项目: 浙江省科技厅“新苗人才计划”资助项目(2010R410010)

通讯作者: 储利胜 E-mail: chulisheng@21cn.com

射骨生长因子对骨折愈合的促进作用^[1]。三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)对骨折愈合的研究,国内外文献报道较为罕见^[2-3]。为探索细胞外 ATP 对骨折愈合的影响,为临床应用提供可靠的依据,本实验以大鼠右侧桡骨骨折模型为观察对象,进行放射学、组织学、生物力学的观察和分析,研究细胞外 ATP 对骨折愈合的影响。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠 100 只,雄性,体重 220 ~ 260 g,由浙江中医药大学动物实验中心提供。

1.1.2 实验药物 ATP:三磷酸腺苷二钠粉末,由美国 amresco 公司生产。实验时将上药用生理盐水和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液配制成 pH 为 7.0,浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.1.3 主要实验仪器和试剂 Rotanode X 射线机(E7252X/RTM 782HS, 韩国);MICROM 组织切片机(HM 335E, 德国);NIKON 显微镜(80i, 日本);Instron 万能材料试验机(5569 型, 美国);水合氯醛(上海化学试剂采购供应五联化工厂, 批号:20090315)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 SD 大鼠 100 只,随机分成 ATP 组(50 只)、对照组(50 只)。ATP 组和对照组在组内又分为术后第 1 周(10 只)、2 周(10 只)、4 周(20 只)、6 周(10 只)4 个时间组。

1.2.2 动物模型制作方法^[1,4] 用 10% 水合氯醛 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔内注射麻醉大鼠,仰卧并固定于手术台上,在右侧前臂前侧用硫化钡脱毛后作直切口,切开皮肤及深筋膜,分离拇展长肌及桡侧腕长伸肌暴露桡骨,用手外科小锯在右侧桡骨中段横形锯断,造成 1 mm 宽骨折间隙的单处骨折。逐层闭合创口,不包扎,不固定。术后庆大霉素 80 万 U 肌肉注射预防感染,待麻醉醒后分笼喂养,自由取食、饮水。

1.2.3 给药方法 ATP 组在建模时于断端注射浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ATP 溶液,术后第 1 天、1 周、2 周、4 周于断端注射浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ATP 溶液,剂量为 $0.05 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ 。对照组也于相同时间断端注射等体积生理盐水。相同条件喂养,于不同给药时间段观察相应指标。

1.2.4 观察指标 ①各组大鼠的一般状况和伤口愈合情况。②放射学检查:术后第 1 周、2 周、4 周、6 周,

以颈椎脱臼法处死大鼠,自上臂中断处将右前臂分离,摄 X 线片观察骨折修复情况。③组织学检查:术后第 2 周及第 4 周,每组各 10 只,去除右侧前臂皮肤及软组织,将尺桡骨联合取出,置于 10% 福尔马林溶液中固定 1 周,分离出桡骨,脱钙完成后以原骨折处和缺损处为中心取桡骨段 10 mm 浸蜡包埋,作常规切片(纵切),HE 染色,观察骨痂的变化。④生物力学测定:术后第 4 周及第 6 周,每组各 10 只,取出桡骨标本,行桡骨三点弯曲力学检测,跨距 20 mm,加载速度为 $3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$,加载于桡骨中段,测量最大载荷、最大位移和弹性模量。

1.3 统计学方法 放射学与组织学数据采用 Ridit 分析及 95% CI(可信区间),与显著性界限 $U_{0.05} = 1.96$ 或 $U_{0.01} = 2.58$ 比较作出统计推断。生物力学数据采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计学处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用 t 检验及 95% CI(可信区间),以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一般情况 各组大鼠麻醉醒后处于正常的蹲伏状态。术后第 1 天均能在笼中自如活动、饮食。手术创缘整齐,创口吻合,无感染。

2.2 放射学检查 术后第 1 周 ATP 组中有部分标本可见超过软组织密度的阴影,见图 1A。对照组少数可见超过软组织密度的阴影,见图 1B($U = 1.936, P > 0.05$)。术后第 2 周 ATP 组大多数已达到临床愈合期,骨折线模糊,骨折断端被骨痂填充并桥接,见图 1C。对照组仅少数处于临床愈合期,骨折线清晰,见图 1D($U = 2.789, P < 0.01$)。术后第 4 周 ATP 组大多数骨折线趋于消失,其中有 60% 的标本显示骨折线完全消失,骨痂密度与骨密质基本相同,达到骨性愈合,见图 1E。对照组骨折线模糊,骨折断端有骨痂填充,且大多数已桥接,见图 1F($U = 3.098, P < 0.01$)。术后第 6 周 ATP 组骨折线基本消失,骨痂密度与骨密质基本相同,达到骨性愈合,见图 1G。对照组骨折线趋于消失,骨折断端被骨痂填充并桥接,见图 1H($U = 2.943, P < 0.01$)。

依据上海骨科研究所 X 线片评价标准^[5],对每个标本进行评价,并采用 Ridit 分析进行统计学处理,结果见表 1。

2.3 组织学检查 术后第 2 周 ATP 组骨折断端可见大量骨性骨痂和少量软骨性骨痂,形成不规则的骨髓

腔,骨髓腔内可见丰富的毛细血管,见图 2④。对照组断端可见软骨性骨痂及纤维细胞,仅有少量骨性骨痂,见图 2⑤($U=2.479, P<0.05$)。

术后第 4 周 ATP 组骨折断端骨性骨痂融合形成板层骨,不规则骨髓腔亦融合形成新的再通的骨髓腔,

达到骨性愈合,见图 2③。对照组断端可见大量骨性骨痂,形成不规则的骨髓腔,见图 2④($U=2.285, P<0.05$)。

依据 Nillson 等组织学分级标准^[6],对每个标本进行评分,并采用 Ridit 分析进行统计学处理,结果见表 2。

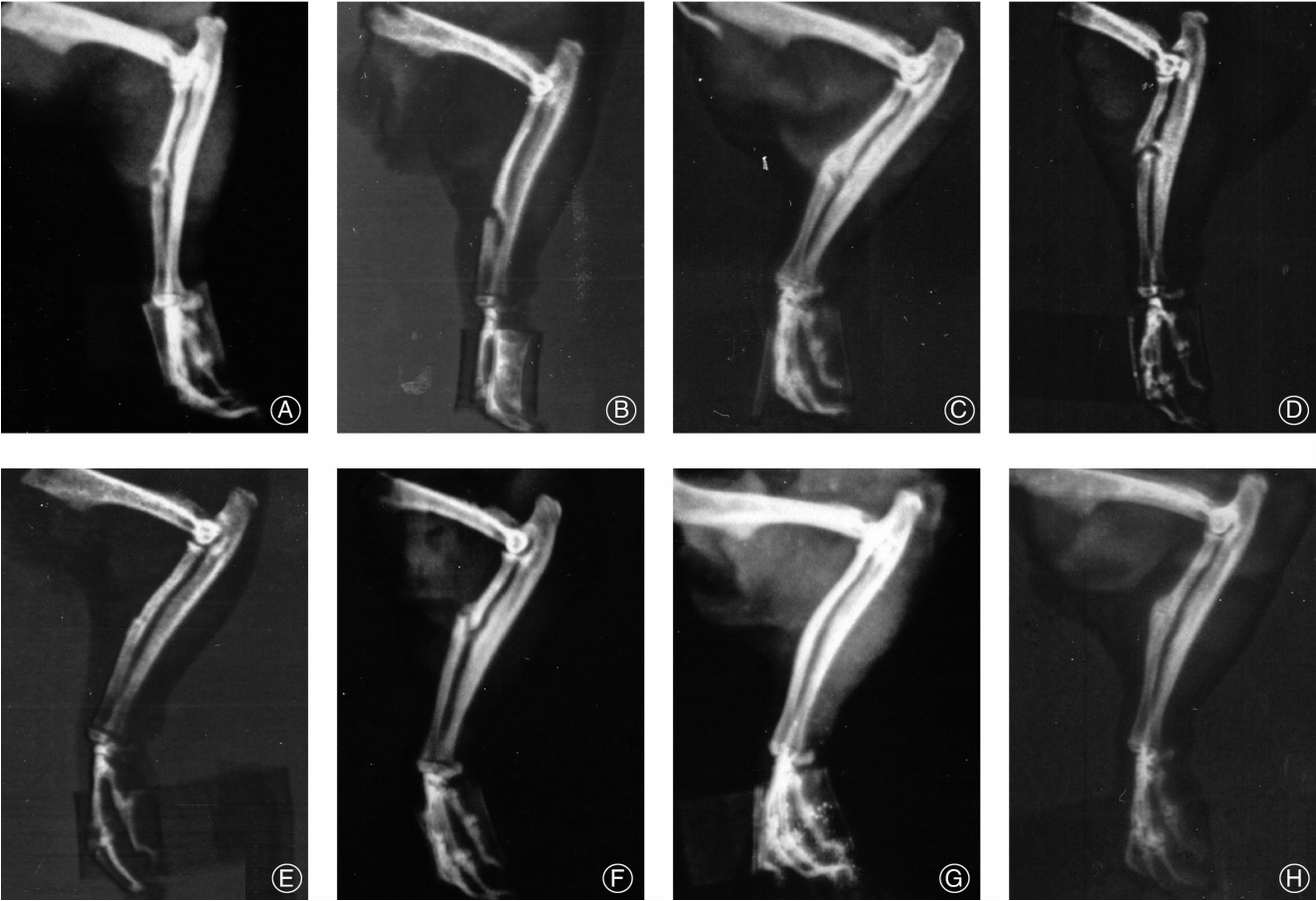


图 1 大鼠右前臂 X 线片

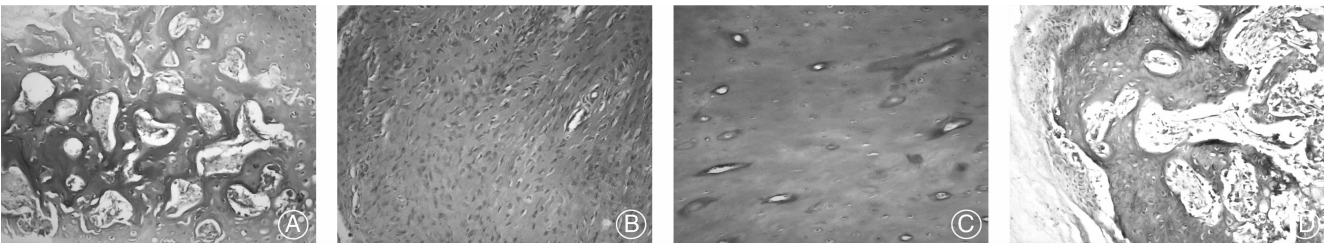


图 2 大鼠骨组织病理切片 HE ×60

④术后第 2 周,ATP 组骨折断端可见大量骨性骨痂和少量软骨性骨痂,形成不规则的骨髓腔,骨髓腔内可见丰富的毛细血管;⑤术后第 2 周,对照组断端可见软骨性骨痂及纤维细胞,仅有少量骨性骨痂;③术后第 4 周,ATP 组骨折断端骨性骨痂融合形成板层骨,不规则骨髓腔亦融合形成新的再通的骨髓腔,达到骨性愈合;④术后第 4 周,对照组断端可见大量骨性骨痂,形成不规则的骨髓腔。

表 1 对骨折愈合的影响 X 线观察结果 只

组别	n	第 1 周				第 2 周				第 4 周				第 6 周			
		+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
ATP 组	10	5	5	0	0	1	5	3	1	0	1	5	4	0	0	2	8
对照组	10	10	0	0	0	7	3	0	0	2	6	2	0	1	2	6	1

表 2 对骨痂组织学的影响 (Nillson's 组织学评分)

	组别	n	骨痂处于各级水平的动物数 (只)			
			I	II	III	IV
第 2 周	ATP 组	10	0	3	6	1
	对照组	10	4	4	2	0
第 4 周	ATP 组	10	0	0	3	7
	对照组	10	0	3	5	2

2.4 生物力学测定 如表 3 所示,统计学结果表明,术后第 4 周 ATP 组与对照组最大载荷比较($t=2.913$),结

表 3 对骨折愈合的生物力学影响 ($\bar{x} \pm s$)

	组别	n	最大载荷(N)	最大位移(mm)	弹性模量(MPa)
第 4 周	ATP 组	10	8.480 ± 4.660	1.273 ± 0.461	481.992 ± 185.864
	对照组	10	3.670 ± 2.355	0.761 ± 0.337	217.297 ± 102.356
第 6 周	ATP 组	10	26.720 ± 6.661	3.284 ± 1.245	1 181.012 ± 464.006
	对照组	10	18.840 ± 5.079	1.455 ± 0.330	660.080 ± 272.005

3 讨 论

ATP 是一种核苷酸,作为细胞内能量传递的“分子通货”,储存和传递化学能,在核酸合成中也具有重要作用。但与作为能量物质的细胞内 ATP 不同,细胞外 ATP 除了作为一种神经调质发生作用外,还通过受体发挥一种类似于细胞因子的作用^[7-8]。

本实验数据表明,造模后第 1 周,ATP 组与对照组标本 X 线片差异无统计学意义($P>0.05$),其原因可能是由于骨折后用药时间尚短,骨折端存在血肿,炎性细胞浸润,血供未完全建立,致骨痂生长缓慢。骨本身所具有的生物力学特性是反映骨生长代谢情况的重要指标,其生物力学强度基本取决于骨折断端愈合后的骨的质量^[9]。本实验的生物力学测定表明随着骨折愈合时间的延长,骨的质量会有较大的提高,其生物力学强度会明显增强。骨重吸收过程涉及三个连续的反应步骤,其中第三步,破骨细胞通过膜 H^+ /ATP 酶向细胞外骨重吸收间隙排出 H^+ ,而对侧通过膜 Cl^-/HCO_3^- 转运体排出 HCO_3^- ,当破骨细胞暴露于细胞外 ATP 时,可引起短暂而迅速的细胞内 Ca^{2+} 上升,也可引起 pH 值波动性降低;在成骨细胞方面,激动 P2 受体通过 PL-C 途径,可促进磷酸肌醇的生成和细胞内钙的释放^[10]。本实验造模后第 4 周、6 周,ATP 组与对照组标本 X 线片差异有统计学意义,且组织学检查显示 ATP 组骨折断端骨痂桥接速度及骨性骨痂比例均优于对照组,证实了细胞外 ATP 具有提高骨痂的再生速度,促进骨基质的形成与钙化,从而缩短骨折愈合达到功能正常化所需时间的功能,这些功能可能与骨细胞膜上的 P2X7 受体密切

果有统计学意义($P=0.009$),最大位移比较($t=2.836$),结果有统计学意义($P=0.012$),弹性模量比较($t=3.945$),结果有统计学意义($P=0.001$);第 6 周时 ATP 组与对照组最大载荷比较($t=2.975$),结果有统计学意义($P=0.009$),最大位移比较($t=4.490$),结果有统计学意义($P=0.001$),弹性模量比较($t=3.063$),结果有统计学意义($P=0.007$)。

相关^[11-13]。

在骨折愈合能量代谢过程中,软骨性骨痂 ATP 含量比正常皮质骨高千倍,而与骨髓板的 ATP 含量很接近。此后含量下降,到了海绵骨痂期,ATP 含量与正常干骺端接近,塑形期 ATP 含量与正常皮质骨接近^[14-15]。因此,我们推测细胞外 ATP 在骨折愈合过程中,除具有类似细胞因子的作用外,还可能为骨折愈合提供能量。我们的研究结果为临床使用细胞外 ATP 促进骨折愈合提供了初步实验基础。

4 参考文献

- [1] 顾坚毅. 实验性骨折愈合的研究方法[J]. 中医正骨, 2001,13(11):47-49.
- [2] Nakahara M. A study on pharmacological effect of ATP and cysteine on fracture healing[J]. Sapporo Igaku Zasshi, 1961,20:40-42.
- [3] Fantato S. Experimental research on the action of ATP and phosphocreatine in osteogenesis of fracture callus[J]. Minerva Ortop,1967,18(4):206-210.
- [4] Spector JA, Mechrara BJ, Greenwald JA, et al. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2000,280(1):72-80.
- [5] 贵阳中医学院骨伤科研组. 中药“接骨 I 号”促进骨折愈合作用的实验研究[J]. 中华医学杂志,1987,11(4):670.
- [6] Nisson OS, Urist MR, Dawson EG, et al. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar adfects in dogs[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery,1986,68B(4):635-642.

- [7] Nearya JT, Rathboneb MP, Cattabeni F, et al. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells[J]. Trends in Neurosciences, 1996, 19(1): 13-18.
- [8] Shimegi S. ATP and adenosine act as a mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1)[J]. Calcif Tissue Int, 1996, 58(2): 109-113.
- [9] Smith SM, Heer M. Calcium and bone metabolism during space flight[J]. Nutrition, 2002, 18(10): 849-852.
- [10] 任雷鸣, 张森, 姚树坤, 等. 疾病干预的新靶点: 嘌呤与嘧啶受体[J]. 生理科学进展, 2003, 34(2): 116-120.
- [11] Hoebertz A, Townsend-Nicholson A, Glass R, et al. Expression of P2 receptors in bone and cultured bone cells[J]. Bone, 2000, 27(4): 503-510.
- [12] Jørgensen NR, Henriksen Z, Sørensen OH, et al. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors[J]. J of Biol Chem, 2002, 277(9): 7574-7580.
- [13] Li J, Meyer R, Duncan RL, et al. P2X7 nucleotide receptor plays an important role in callus remodeling during fracture repair[J]. Calcif Tissue Int, 2009, 84(5): 405-412.
- [14] Leung KS, Sher AH, Lam TS, et al. Energy metabolism in fracture healing[J]. J of Bone Joint Surg, 1989, 71(4): 657-660.
- [15] Buchholz J, Huber FX, Meeder PJ, et al. Detection of high-energy phosphates in cortical bone as an indicator of bone healing and remodelling: use of a rabbit model[J]. J Orthop Surg, 2004, 12(2): 205-209.

(2011-01-09 收稿 2011-04-15 修回)

《中医正骨》杂志读者问卷调查表

尊敬的读者朋友:

您好! 为进一步提高《中医正骨》杂志的质量, 本刊特别组织了这次问卷调查, 希望您在百忙之中抽空填写这份问卷(下载地址: <http://www.zygzgzz.cn> 首页的下载专区)。我们将从参与并认真完成此次问卷调查的读者中选取 20 名读者, 赠阅 2011 年全年《中医正骨》杂志 1 套。感谢您对本刊的关心和支持!

读者基本资料

姓名: _____ 职称: _____ 单位名称: _____ 联系电话: _____ 联系地址及邮政编码: _____
工作性质: ☐ 医生 ☐ 护士 ☐ 科研人员 ☐ 教师 ☐ 学生 ☐ 其他

1 您对《中医正骨》杂志的总体评价? ☐ 很好 ☐ 较好 ☐ 一般 ☐ 较差

2 《中医正骨》杂志内容本身看起来怎么样?

☐ 不错, 挺丰富的 ☐ 还可以, 有些内容挺好的。例如: _____ ☐ 感觉一般 ☐ 不好看, 大部分内容不吸引人

3 您最感兴趣的栏目是哪个(多选)? 您对此栏目感兴趣的原因是什么?

☐ 实验研究 ☐ 临床研究 ☐ 调查研究 ☐ 文献研究 ☐ 学术探讨 ☐ 影像诊断 ☐ 临床报道 ☐ 病例报告
☐ 经验交流 ☐ 骨伤科护理 ☐ 综述 ☐ 诊治失误案例分析 ☐ 流派菁华 ☐ 名老中医经验菁华

对所勾选栏目感兴趣的原因:

4 您认为哪个栏目需要提高质量(多选)? 需要从哪方面提高?

☐ 实验研究 ☐ 临床研究 ☐ 调查研究 ☐ 文献研究 ☐ 学术探讨 ☐ 影像诊断 ☐ 临床报道 ☐ 病例报告
☐ 经验交流 ☐ 骨伤科护理 ☐ 综述 ☐ 诊治失误案例分析 ☐ 流派菁华 ☐ 名老中医经验菁华

对所勾选栏目需要从以下方面提高质量:

5 对本刊的栏目设置, 您是怎么看的?

☐ 栏目设置比较合理 ☐ 一般 ☐ 栏目设置不好, 例如 _____, 理由:

6 您认为还可以开设哪些栏目? 您希望看到哪些方面的文章?

栏目: _____ 专题文章: _____

7 《中医正骨》杂志您最喜欢的文章是?

① _____ (____ 年第 ____ 期) ② _____ (____ 年第 ____ 期) ③ _____ (____ 年第 ____ 期)

8 您对杂志的外观设计是否满意?

☐ 满意 ☐ 一般 ☐ 不满意 如: ☐ 封面 ☐ 内文版式 ☐ 色彩 ☐ 图片 ☐ 其他 _____

9 您认为本刊在哪些方面尚有待提高? 您有哪些建议?

☐ 学术质量 ☐ 编校质量 ☐ 印刷质量 ☐ 读者服务 建议: _____

10 您阅读《中医正骨》杂志的年限? ☐ <1 年 ☐ 1~5 年 ☐ 5~10 年 ☐ >10 年

11 您通过何种方式阅读本刊? 您是否计划继续订阅或购买本刊?

阅读方式: ☐ 邮局订阅 ☐ 网络下载 ☐ 个人邮购 ☐ 赠阅 ☐ 其他方式: _____ 订阅意向: ☐ 是 ☐ 否

12 您对《中医正骨》杂志有何其他意见或建议?

问卷回收: 请您将填好的问卷以 word 文档的方式发送至《中医正骨》编辑部办公邮箱 zyzg1989@126.com, 文件名称请统一设置为“您的姓名+读者问卷调查”。您也可以将此问卷打印出来后填写, 并将填好的问卷邮寄至本刊编辑部。本问卷下载地址: <http://www.zygzgzz.cn> 首页的下载专区。本刊编辑部地址: 河南省洛阳市启明南路 82 号, 邮编 471002。