

可吸收聚消旋乳酸棒对兔骺板生长的影响

叶艳平, 陈爱民* (第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨不同直径可吸收聚消旋乳酸棒(poly-D,L-lactide acid, PDLLA)植入对幼兔股骨远端骺板生长的影响。**方法:**采用封闭群系5周龄新西兰大白兔75只,随机分为3组,每组25只。在幼兔右侧股骨远端跨骺板中心分别植入直径为1.5、2.2、3.2 mm的PDLLA棒;在左侧骺板造成同样大小的钻洞,不植入PDLLA棒,作为对照。术前计算骺板损伤面积,术后3、6、9、12、24周处死动物。通过测量双侧股骨长度、双侧膝关节外翻角、组织病理学和透射电镜等方法观察PDLLA棒对骺板生长的影响。**结果:**1.5、2.2、3.2 mm组钻洞所造成的骺板损伤分别占骺板面积的(1.86±0.10)%、(4.03±0.52)%、(7.52±1.02)%;术后24周实验侧和对照侧的股骨长度(单位:mm)分别为:90.60±0.55、90.27±0.84、87.53±0.67、87.06±0.78、85.30±1.39、84.91±1.40;双侧膝关节外翻角(单位:°)分别为:7.86±1.26、8.11±1.18、8.86±1.30、9.45±1.95、11.90±2.80、14.45±5.17。各组内实验侧和对照侧相比,双侧股骨长度、外翻畸形无明显差异($P>0.05$),但3.2 mm组较1.5 mm、2.2 mm组双侧股骨长度出现短缩。镜下各组实验侧和对照侧软骨细胞生长形态无异常,没有发现明显的炎症反应,仅可见轻微非特异的异物反应,部分巨噬细胞浸润。**结论:**PDLLA棒本身不会对骺板生长造成不良的影响。骺板生长是否出现阻滞,取决于骺板损伤面积的大小,超过骺板横截面积约7%,就可能导致骺板生长受到抑制。

[关键词] 聚消旋乳酸;骺板;生长**[中图分类号]** R 683**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0978-05

Effect of absorbable poly-D,L-lactide acid rod on development of rabbit epiphyseal plate

YE Yan-ping, CHEN Ai-min* (Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To assess the influence of absorbable poly-D,L-lactide acid (PDLLA) rods on the development of epiphyseal plate after implanted into the distal femoral epiphysis in skeletally immature New Zealand white rabbits. **Methods:** Seventy-five New Zealand white rabbits were evenly randomized into 3 groups according to the diameter of rods: 1.5 mm PDLLA rod group, 2.2 mm PDLLA rod group, and 3.2 mm PDLLA rod group. The absorbable PDLLA rods were placed into a drill hole of equal size in the intercondylar portion of the right femur, crossing the central portion of epiphyseal plate; empty drill holes of same size were made across the left femoral physis, which served as a control. The area of injured epiphyseal plates was calculated before operation. The animals were sacrificed at 3, 6, 9, 12 and 24 weeks after operation. Measurement of femur bone length, radiographic measurement of both knee joint valgus angles, histology sections and transmission electron microscopic examination of the physis and adjacent bones were performed to evaluate the influence of implanted rods on epiphyseal plate. **Results:** The proportions of injured area caused by the drill holes in 1.5 mm group, 2.2 mm group, and 3.2 mm group were (1.86±0.10)%, (4.03±0.52)% and (7.52±1.02)%, respectively. At 24 weeks after operation, femur bone lengths (mm) of experimental and control sides were 90.60±0.55 and 90.27±0.84 in 1.5 mm group, 87.53±0.67 and 87.06±0.78 in 2.2 mm group, and 85.30±1.39 and 84.91±1.40 in 3.2 mm groups, respectively; their knee joint valgus angles (°) were 7.863±1.26 and 8.110±1.18 in 1.5 mm group, 8.858±1.30 and 9.453±1.95 in 2.2 mm group, and 11.90±2.80 and 14.448±5.17 in 3.2 mm group, respectively. There was no significant difference in femur lengths and valgus angles between 2 sides in each group ($P>0.05$). Both femur bone lengths in 3.2 mm group were shorter than those in the 1.5 mm and 2.2 mm groups. No abnormalities of cartilage cells were observed, without obvious histological evidence of inflammation; only nonspecific foreign body reaction and macrophage infiltration were noticed. **Conclusion:** PDLLA rod itself does not cause any disturbance to the development of the epiphyseal plate. The growth disturbance of epiphyseal plate depends on the area of injured epiphyseal plate; a injured area over 7% of epiphyseal plate may cause the growth disturbance of epiphyseal plate.

[KEY WORDS] poly-DL-lactic acid; epiphyseal plate; growth

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 978-982]

儿童骨骺骨折临床多采用保守治疗,但某些类型骨骺骨折为维持骨折复位的稳定性必须进行内固定。金属内固定装置需二次手术去除,且有发生脱

[作者简介] 叶艳平,硕士,主治医师。E-mail: yeypyw@163.com

* Corresponding author. E-mail: chenaiming6403@yahoo.com.cn

落或钉道感染等并发症的可能。而采用可吸收内固定材料治疗骨骺骨折则可避免二次手术取出内固定装置,有利于减轻患儿的身心痛苦。自1989年Bostman报道了首例生物降解可吸收材料用于儿童临床骨骺骨折的固定以来^[1],目前临床应用较多的治疗骨骺骨折的可吸收内固定材料主要是自加强聚乙交酯(SR-PGA)和自加强左旋聚丙交酯SR-PLLA)^[2-4]。可吸收聚消旋乳酸棒(poly-D, L-lactide acid, PDLA)作为一种较为新颖的骨科内固定材料,已成功应用于松质骨和关节内骨折等非负重骨的治疗^[5-8],但目前国内外尚无其应用于骨骺骨折的报道。本研究通过跨幼兔股骨骺板植入PDLA棒,探讨其对骺板生长的影响,为其在儿童骨骺骨折的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料、动物 可吸收PDLA棒(我院与四川成都迪康生物材料有限公司合作研制,已获得国家医药管理局批文),规格:直径分别为1.5、2.2、3.2 mm,长25 mm,环氧乙烷消毒,无菌塑料袋封装备用。5~6周龄的新西兰大白兔,雌雄不拘,第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 实验分组和动物处理 新西兰大白兔75只,根据所使用的PDLA棒直径大小(1.5、2.2、3.2 mm)随机分为3组,每组25只。采用氯氨酮(50 mg/kg)肌内麻醉注射后,取髌旁内侧切口,将髌骨拉向外侧脱位显露股骨远端,根据所使用的PDLA直径大小采用不同直径克氏针钻洞,钻洞方式为从股骨髁间窝垂直纵行穿过股骨远端骺板中心达到干骺端,钻入约25 mm,造成骺板损伤。冲洗后右侧打入PDLA棒,左侧同样大小钻孔不放置PDLA棒作为对照,将髌骨复位,用4-0可吸收线逐层缝合关节囊及手术切口。术后将兔子放入实验室笼中,肌注青霉素3 d,正常喂养,在笼中自由活动,术后3、6、9、12、24周每组分别随机取5只,以注射过量水合氯醛法处死,解剖出双侧股骨。每只兔子术前均常规摄双侧股骨前后位及侧位X线片。

1.3 检测方法及指标

1.3.1 骺板损伤面积的估算 骺板损伤面积的估算采用下列公式^[9]: $P = S_w / S_g \times 100\%$, $S_w = \pi c^2 / 4$, $S_g = \pi ab / 4$ (P :骺板损伤面积百分比; S_w :克氏针横截面积; S_g :股骨远端骺板表面积; a :股骨远

端骺板前后位直径; b :股骨远端骺板侧位直径; c :克氏针直径)。根据术前所摄双侧股骨X线前后位和侧位片,测量双侧股骨远端骺板正位和侧位直径。

1.3.2 一般情况观察 术后每日观察兔子的进食和饮水情况、切口愈合情况、活动功能情况。

1.3.3 股骨形态测量 双侧股骨标本取下后均用精确度为0.02 mm游标卡尺测量双侧股骨长度(股骨大粗隆顶端到股骨内侧髁的垂直距离)。取下的双侧股骨标本行双平面X线摄片后,在片上测量兔双侧膝关节外翻角。所得数据采用SPSS 11.0统计软件进行配对 t 检验。

1.3.4 组织学观察 新鲜标本10%甲醛固定1周,10% EDTA液脱钙3周、常规脱水、包埋、平行于长骨纵轴冠状位作系列切片, H-E染色,镜下观察骺板损伤后的病理改变。

1.3.5 透射电镜观察 动物到期处死后每次每组取1只,取下双侧股骨标本,立即切取骺板与棒交界处标本,约1 mm×1 mm×1 mm大小,每只均取两块标本,以2.5%戊二醛固定和1%饿酸(4℃)固定后、梯度乙醇脱水、浸透包埋、固化、LKB-I型超薄切片机切片、3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色、PHILIPS CM-120透射电镜观察,摄片。

2 结果

2.1 骺板损伤面积的估算 采用前述计算公式,根据算出的股骨的前后径和横径,测算出1.5、2.2、3.2 mm直径的钻洞占骺板面积的百分比分别为(1.86±0.10)%、(4.03±0.52)%、(7.52±1.02)%。

2.2 一般情况观察 1只兔子术后进食差于术后第3日死亡,另1只兔在2周时因腹泻死亡,均另取兔子予以补充。其他兔子切口均一期甲级愈合,未发现切口感染、渗出及异物反应,行走正常,均健康生存至观察时间终点。

2.3 股骨形态学测量 术后双侧股骨长度统计分析显示3组动物各组内实验侧和对照侧长度于各观察点均无明显差异,未见有明显的实验侧或对照侧短缩,各组内实验侧和对照侧膝关节内外翻角对比显示亦无差距(表1,表2);但是组间比较,3.2 mm组双侧股骨长度较1.5 mm和2.2 mm组出现明显的短缩畸形($P < 0.05$),各组双侧膝关节内外翻角无明显差异。

表 1 术后 24 周双侧股骨长度和内外翻角

Tab 1 Femur lengths and femur condylar valgus angles at 24 weeks after operation

(n=25, $\bar{x} \pm s$)

Group	Femur length(l/mm)		Femur condylar valgus angle(°)	
	Experimental	Control	Experimental	Control
1.5 mm	90.60±0.55	90.27±0.84	7.86±1.26	8.11±1.18
2.2 mm	87.53±0.67	87.06±0.78	8.86±1.30	9.45±1.95
3.2 mm	85.30±1.39*	84.91±1.40*	11.90±2.80	14.45±5.17

* P<0.05 vs 1.5 mm and 2.2 mm group

2.4 组织学观察 术后 3 周:实验侧(图 1A) 髌板缺损主要由植入物充填,缺损形态基本同植入时棒的形态一致,在边缘区可见有少量的新生松质骨增生,少量的巨噬细胞,同植入物相邻近的髌板各层与外周相比未见有明显差异。可见有同植入物相近的软骨细胞向干骺端的长入,可能为植入物带入所致。对照侧髌板缺损由大量新生松质骨充填,骨小梁在钻洞里呈纵向排列,在其周围成骨细胞增生活跃,早期骨桥已经形成,骨桥外周可见有新生血管。

术后 6 周:实验侧在缺损区边缘可见新生的松质骨包绕,邻近组织区可见巨噬细胞,同植入物相邻近软骨细胞柱与外周髌板相比,形态完整,未见有变薄或增厚。对照侧可见有大量较成熟的骨小梁生成,完全充填了钻洞,骨桥周围可见到成簇的软骨细胞向干骺端长入,形成“软骨岛”样结构。

术后 9 周:部分植入物可见有向干骺端移位,移位处由骨组织充填,植入物外周可见有较多新生骨

包绕,部分形成骨壳,邻近植入物髌板各层生长同外周相比,未见明显异常。对照侧可见有大量板状骨生成,完全充填了钻洞。骨桥周围仍可见到成簇的软骨细胞向干骺端长入。

术后 12 周:实验侧(图 1B)外周可见有骨壳包绕,邻近组织有少量巨噬细胞浸润,生长板柱状结构完整,但是同前相比明显变薄。对照侧(图 1C)各组均可见成熟的骨桥形成,骨桥与骨骺端软骨下骨板及干骺端骨小梁连成一体,并与周围的髌板软骨之间有密切的结构联系。骨桥周围髌板软骨细胞柱向干骺端弯曲,有的形成典型的圆锥样结构。生长板柱状结构完整未受破坏,邻近钻洞处髌板相比外周变薄。

术后 24 周:股骨髌板已闭合,实验侧缺损边缘较不规则,外周有骨性包壳,邻近组织区仍有巨噬细胞浸润(图 1D)。对照侧缺损为成熟的骨桥充填。

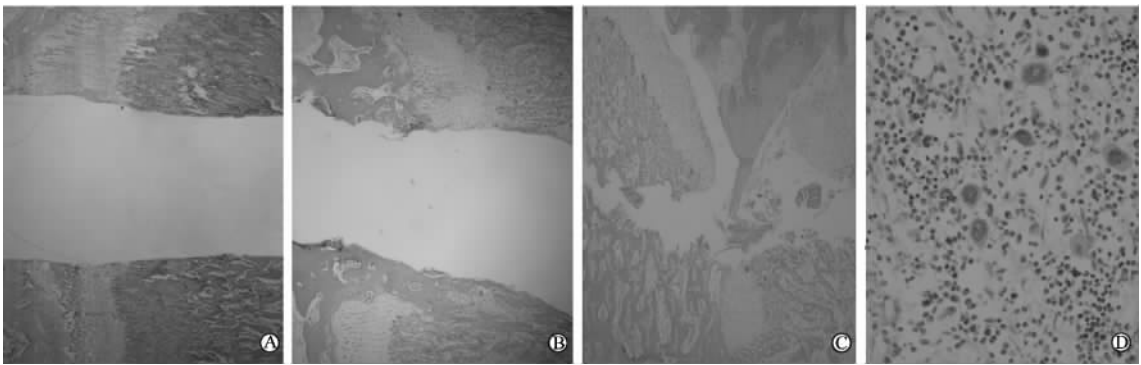


图 1 术后不同时间对兔髌板组织病理学观察

Fig 1 Histopathology observation of rabbit epiphyseal plate at different periods after operation(H-E)

A: A small quantity of new cancellous bone are seen between the implant canals at 3 weeks after operation($\times 20$);B:12 weeks after operation. The epiphyseal plate is thinner and the implant is surrounded by bone wall($\times 20$);C:Tenting epiphyseal plate adjacent to drill hole is seen at 12 weeks after operation;the nest of cartilage cell adjacent to the metaphysis can be seen too($\times 20$);D:The macrophages can be seen near the implant($\times 100$)

2.5 透射电镜观察 在整个观察过程中,髌板细胞的生长未见受植入物的影响,镜下髌板从增殖层到肥大转化层到钙化层,各层次细胞均形态完整,胞质

内细胞器丰富,其周围软骨基质同对侧相比也无明显异常,无异常软骨细胞形态(图 2)。

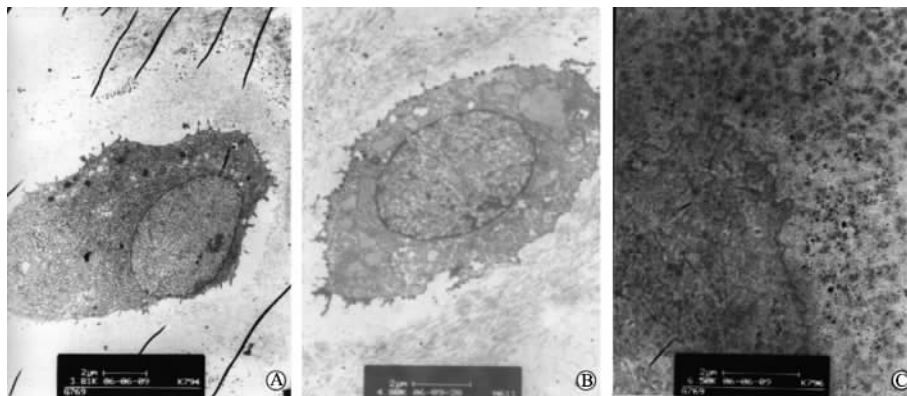


图2 植入术后12周标本透射电镜图片

Fig 2 TEM pictures of adjacent tissues of implants 12 weeks after operation

A: Chondroblast; B: Cartilage cell; C: Cartilage matrix

3 讨论

由于髌板面积的非水平性,有许多突起呈波浪形,直接计算面积较为困难,龟山真等^[9]研究表明兔股骨远端髌板近似于椭圆形,并给出了计算其表面积公式,根据这一计算公式,直径1.5 mm的克氏针占髌板损伤面积约为1.86%;2.2 mm的克氏针占髌板损伤面积约为4.03%;3.2 mm的克氏针占髌板损伤面积约占7.52%。

Makela及Cady等^[10-13]研究了PDS、SR-PGA、Polylactin910等对骨龄不成熟的新西兰大白兔股骨远端髌板生长影响,发现这些可吸收材料本身不会扰乱髌板生长,髌板生长紊乱同材料穿越髌板损伤面积有关,垂直穿过股骨远端髌板的2 mm以下的钻洞造成髌板损伤面积小于3%,不会对髌板生长造成影响,而3.2 mm的钻洞造成髌板损伤面积大于7%,能造成明显的生长紊乱,股骨的短缩畸形。本次研究发现在整个观察期,不论是1.5 mm、2.2 mm还是3.2 mm组,各组内实验侧和对侧股骨长度没有明显的差异($P>0.05$),各组组长内实验侧和对侧内外翻成角相比亦无差异($P>0.05$),在1.5 mm组和2.2 mm组也没有发现有股骨短缩或生长紊乱的证据,但是在3.2 mm组,同正常兔股骨生长模式^[14]及1.5 mm组和2.2 mm组相比,双侧股骨短缩比较明显,提示PDLLA其本身不会扰乱髌板生长,3.2 mm组双侧股骨短缩应是和髌板损伤面积相关,实验结果同目前研究是相符的。

实验发现,右侧PDLLA棒植入组标本均没有发现有显著骨桥的形成,也没有发现有生长板向缺损区的显著再生,但在边缘可见有骨性组织的增生

包绕形成骨壳,而对照侧缺损则完全由骨桥充填。目前研究认为^[15-16]骨桥形成可能和局部的血液积聚、髌板血运屏障的破坏有关。各种形式的髌板贯穿伤直接破坏了髌板局部的血运屏障功能,髌板两端血运通过损伤裂隙迅速相互吻合交通,在早期形成纤维血管桥,以后周围骨组织内的骨发生细胞随血运而至,骨的沉积使骨桥逐渐代替了纤维桥,随着骨桥的逐渐成熟,两端血运的吻合又会逐渐减少。术后3周我们发现在左侧钻洞完全由骨桥充填,并可见新生成骨细胞,说明随着血运的吻合,随血运而至或是钻洞时从软骨下骨板带入的成骨细胞由于有丰富的血液供应,迅速形成新骨,连接软骨下骨板和干髌端,形成骨桥,骨桥的形成,将对髌板造成牵拉,造成邻近骨桥的髌板向干髌端弯曲。其后的观察期,骨桥进一步发育成熟,形成骨小梁,板状骨,中间骨髓腔形成。在观察期,PDLLA实验侧标本大部分未见有骨桥的形成,这应是由于PDLLA的存在阻碍了血液的积聚,影响到了随后纤维血管桥及进一步的骨桥的形成,这种阻碍作用有利于防止髌板损伤后形成的骨桥对髌板生长的牵拉。

研究表明骨桥的形成可造成对髌板生长的牵拉阻碍,当这种牵拉作用足够大超过髌板自身的纵向生长力时,即造成髌板的生长阻滞^[17-18]。实验发现3.2 mm组对照侧较1.5 mm及2.2 mm组对照侧明显短缩应是和髌板软骨细胞生长层损伤较大及后续形成骨桥对髌板牵拉有关,而1.5 mm和2.2 mm两组无明显差异说明当髌板损伤面积较小时,形成的骨桥面积较小不足以造成对髌板生长的影响。各组实验侧均没有发现显著的骨桥形成,3.2 mm组实验侧股骨的短缩应是和髌板软骨细胞受损较多自

身生长力不足所致,而 1.5 mm 和 2.2 mm 组形态学上无显著差别提示当骺板受损面积小于 4% 时,部分软骨细胞的损伤尚不足以造成对骺板生长显著影响。

实验发现 PDLLA 棒周围可见有骨壳包绕,目前有研究认为 PDLLA 植入物在局部的降解,酸性代谢产物的堆积,造成局部微环境的改变,可能诱导局部的原始间质细胞,转变成成骨细胞或成软骨细胞,但对这一点,目前尚有争议^[19-20]。

文献报道^[21-23],可吸收植入物可引起机体的非特异性异物反应,认为非特异性组织异物反应的发生是机体的清除和植入物的降解速率相互作用的结果,伴随着植入物的降解,释放的酸性产物在局部积聚,在局部血运较差,降解产物不能及时被带走的情况下,积聚的产物,局部理化环境的改变,再加上降解物本身的毒性作用,致单核巨噬细胞积聚,镜下主要为单核细胞和多核巨细胞浸润。本次研究发现 PDLLA 棒在观察期未引起显著可见的炎性异物反应,切口愈合良好,未见急性红肿渗出、窦道等,镜下仅见部分巨噬细胞浸润,组织病理及电镜观察未发现有关节软骨细胞的损害,提示 PDLLA 棒在骨组织和骺板处有较好的生物相容性。

[参考文献]

- [1] Bostman O, Makela E A, Tormala P, et al. Transphyseal fracture fixation using biodegradable pins[J]. *J Bone Joint Surg*, 1989, 71B:706-707.
- [2] Bostman O, Makela E A, Sodergard J, et al. Absorbable polyglycolide pins in internal fixation of fractures in children[J]. *J Pediatr Orthop*, 1993, 13:242-245.
- [3] Partio E K, Tuompo P, Hirvensalo E, et al. Totally absorbable fixation in the treatment of fractures of the distal femoral epiphyses. A prospective clinical study[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1997, 116:213-216.
- [4] Makela E A, Bostman O, Kekomaki M, et al. Biodegradable fixation of distal humeral physeal fractures[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1992, 283:237-243.
- [5] Joukainen A, Partio E K, Waris P, et al. Bioabsorbable screw fixation for the treatment of ankle fractures[J]. *J Orthop Sci*, 2007, 12:28-34.
- [6] 涂强,徐国洲,钟润泉,等.国产聚-DL-乳酸可吸收螺钉治疗松质骨骨折[J]. *临床骨科杂志*, 2004, 7:442-443.
- [7] Pentti U, Rokkanen O, Bostman O, et al. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology[J]. *Biomaterials*, 2000, 21:2607-2613.
- [8] 李进,杨述华,杜靖远,等.PDLLA 可吸收螺钉治疗踝关节骨折的临床研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2003, 5:332-334.
- [9] 龟山真.骨端软骨板损伤に関する实验的研究[J]. *日整会志*, 1993, 67:662-676.
- [10] Makela E, Vainionpaa S, Vihtonen K, et al. The effect of a penetrating biodegradable implant on the growth plate. An experimental study on growing rabbits with special reference to PDS[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1989, 241:300-308.
- [11] Makela E, Vainionpaa S, Vihtonen K, et al. The effect of trauma on the lower femoral epiphyseal plate. An experimental study in rabbits[J]. *J Bone Joint Surg*, 1990, 70B:187-191.
- [12] Makela E A, Bostman O, Kekomaki M, et al. Transphyseal biodegradable fixation of physeal fractures with self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) pins in children[J]. *J Biomechanics*, 1993, 24:464-468.
- [13] Cady RB, Siegel J S, Mathien G, et al. Physeal response to absorbable polydioxanone bone pins in growing rabbits[J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 48:211-215.
- [14] Lerner A L, Kuhn J L. Characterization of regional and age-related variations in the growth of the rabbit distant femur[J]. *J Orthop Res*, 1997, 15:353-361.
- [15] 石峰,陈秋,刘卫东,等.不同直径骺板贯穿伤对骺板发育影响的实验研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2002, 23:53-55.
- [16] Rogers L F, Poznanski A K. Imaging of epiphyseal injuries[J]. *Radiology*, 1994, 191:297-308.
- [17] Inoue T, Naito M, Fujii T, et al. Partial physeal growth arrest treated by bridge resection and artificial dura substitute interposition[J]. *J Pediatr Orthop B*, 2006, 15:65-69.
- [18] Radhakrishnan P, Lewis N T, Mao J J. Zone-specific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage[J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32:284-291.
- [19] Nordstrom P, Pihlajamaki H, Toivonen T, et al. Tissue response to polyglycolide and polylevolute pins in osteotomized cancellous bone[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, 382:247-257.
- [20] Pihlajamaki H, Salminen S, Laitinen O, et al. Tissue response to polyglycolide, polydioxanone, polylevolute, and metallic pins in cancellous bone: An experimental study on rabbits[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24:1597-1606.
- [21] Pihlajamaki H, Bostman O, Tynninen O, et al. Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws: An experimental study[J]. *Bone*, 2006, 39:932-937.
- [22] Nordstrom P, Pihlajamaki H, Toivonen T, et al. Tissue response to polyglycolide and polylevolute pins in osteotomized cancellous bone[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, 382:247-257.
- [23] Bostman O M, Pihlajamaki H K. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices[J]. *Clin Orthop*, 2000, 371:216-227.

[收稿日期] 2007-02-07

[修回日期] 2007-07-12

[本文编辑] 孙岩