

改良兔股骨骨缺损并骨延长模型的建立

蔡立雄¹, 霍志谦¹, 孙丙银², 吴峰¹, 温建强¹, 郑扬康¹, 杨海韵¹

(1. 广东省佛山市中医院, 广东 佛山 528000; 2. 佛山健翔医院, 广东 佛山 528000)

摘要 目的:探讨建立兔股骨骨缺损并骨延长模型的有效方法。**方法:**将 36 只 3~4 月龄健康新西兰白兔随机分为实验组和对照组。将自制骨延长牵张器安装于 2 组动物左侧股骨上后,于股骨中段截骨,做长约 12 mm 的骨缺损,其中实验组截骨时保护股骨外侧骨膜的连续性,对照组行全层截骨而未保护骨膜。静息期 1 周后开始进行骨延长。于骨延长结束后第 28 天,摄股骨 X 线片,观察骨痂生长情况,并取股骨标本进行肉眼大体观察。**结果:**①股骨标本 X 线检查结果。实验组股骨干延长区域呈高密度、均匀影像,新生骨质区与两断端边界模糊,外层皮质连续,可见大量新生骨痂生长;对照组股骨干延长区域呈较高密度、不均匀影像,新生骨质区与股骨近端骨干连接部分边界模糊,与股骨远端骨干连接部分边界较清,尚存台阶,外层皮质尚未完全连续,可见新生骨痂生长。②股骨标本肉眼观察结果。实验组骨延长区域骨质连续,连接完整,骨痂量多,新生骨两端界线模糊;对照组骨延长区域骨质相对连续,连接相对完整,见骨痂生长,新生骨远端尚有部分缺损,未完全填充骨缺损区。**结论:**在股骨截骨过程中保留部分骨膜,可以更有效地建立兔股骨骨缺损并骨延长模型。

关键词 骨膜;骨延长术;骨缺损;兔;模型;动物

Establishment of improved rabbit model of femoral defect and lengthening

CAI Lixiong¹, HUO Zhiqian¹, SUN Bingyin², WU Feng¹, WEN Jianqiang¹, ZHENG Yangkang¹, YANG Haiyun¹

1. Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, Guangdong, China

2. Foshan Jianxiang Hospital, Foshan 528000, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To explore the effective method of building rabbit model of femoral defect and lengthening. **Methods:** Thirty-six 3-4-month-old healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into experimental group and control group. The self-made bone lengthening-stretching device was fixed in the left femur of the rabbit, and osteotomy of middle femur was performed to make 12 mm long bone defect. The continuity of femoral lateral periosteum was protected when osteotomy was performed in experimental group, while the periosteum was not protected and full-thickness osteotomy was performed in control group. The bone lengthening surgery was carried out after one-week rest period. At the 28th day after the end of bone lengthening, the femoral X-ray films were taken, and the bony callus growth was observed, and then macroscopic observation was performed on the specimens of femurs. **Results:** The X-ray examination results of femur specimens demonstrated that in experimental group the bone lengthening area of femoral shaft presented with high density and homogeneous imaging, and the boundary between newly formed bone region and the two broken ends was fuzzy, meanwhile, the continuous outer cortex and a large number of newly formed bony calluses were found; while in control group the bone lengthening area of femoral shaft presented with high density and inhomogeneous imaging, and the boundary between newly formed bone region and the proximal femoral shaft was fuzzy, and the boundary between newly formed bone region and the distal femoral shaft was clear, meanwhile, the discontinuous outer cortex and some newly formed bony calluses were found. The results of macroscopic observation on femur specimens demonstrated that continuous bone tissues and a large number of bony calluses were found in the bone lengthening area of femoral shaft in experimental group, and the two ends of the newly formed bone were fuzzy; while partly continuous bone tissues and some bony calluses were found in the bone lengthening area of femoral shaft in control group, and partial bone defects could be found in the distal end of newly formed bone. **Conclusion:** The femoral defect and lengthening rabbit model can be built more effectively by preserving some periosteum in the process of the femoral osteotomy.

Keywords periosteum; bone lengthening; bone defect; rabbits; models, animal

严重创伤、骨髓炎或肿瘤等导致的大段骨缺损,

临床治疗难度大、周期长、费用高。Ilizarov 技术是目前治疗大段骨缺损较常用的方法。骨膜具有较好的弹性和良好的柔韧性,在大部分外伤引起的长骨大段骨缺损中绝大多数骨膜能保留在原骨缺损部位^[1]。

基金项目:广东省佛山市科学技术局科研项目(2015AB00350)

通讯作者:杨海韵 E-mail:13809210960@139.com

目前最为常用的骨缺损模型是去除骨膜或未保护骨膜的动物模型,关于保护骨膜的动物模型较少,且多为桡骨、胫骨或下颌骨等骨缺损模型^[2-3],而对于保留骨膜的兔股骨骨缺损动物模型更是鲜见报道。临床上行骨延长截骨术时,多采用小切口、低能量截骨,尽可能保护骨膜,但临床操作难度大。建立有效的骨缺损模型是研究新的大段骨缺损治疗方法的基础。本实验拟建立保护骨膜的兔股骨骨缺损并骨延长模型,以期为临床治疗大段骨缺损提供实验基础。

1 材料和仪器

1.1 实验动物 3~4 月龄健康新西兰白兔 36 只,雌雄不限,体质量 2.2~2.5 kg,购于广州中医药大学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0020。实验方案经医学伦理委员会审查通过。

1.2 实验药物和仪器 青霉素钠(南京都莱生物技术有限公司),水合氯醛(常州市海拓实验仪器有限公司),骨延长牵张器^[4-5](自行研制,见图 1),克氏针(深圳佰慕斯精密科技有限公司),电钻(盐城瑞奥科技有限公司),无菌手术包(合肥高贝斯医疗卫生用品有限公司),医用线锯(深圳保科医疗器械有限公司),常规手术器械(广州中医药大学动物实验室提供),医用 X 线机(南京利昂医疗设备制造有限公司)。

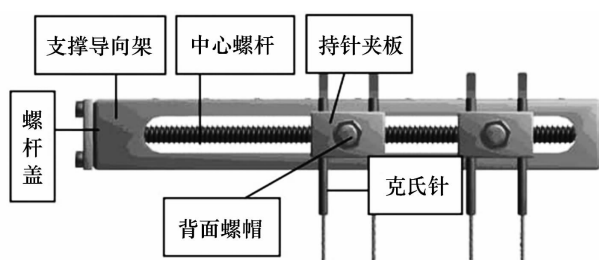


图 1 骨延长牵张器^[4]

2 方法

2.1 动物分组 将 36 只 3~4 月龄健康新西兰白兔随机分为实验组与对照组。

2.2 动物造模 前期准备及手术操作方式参考文献^[4-6]。术前肌肉注射青霉素钠(4×10^5 国际单位 $\cdot \text{kg}^{-1}$)预防感染。将兔右侧卧位固定于手术台上,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉。在 X 线机下为骨延长牵张器定位,以股骨大转子为参照,在左侧股骨远近端,分别用低能量电钻将直径 2.0 mm 的 4 枚克氏针闭合钻入股骨,保证 4 枚克氏针平行,然后安装螺杆,将 4 枚螺帽分别拧入。取兔股骨中段前外侧入路,于中间 2

枚钉之间切开皮肤、皮下组织,显露骨膜及股骨。实验组用直径 1.0 mm 的克氏针于截骨端低能量从股骨后侧向前侧开孔后,将医用线锯从股骨后侧小心穿入对侧后进行截骨,截至股骨直径的 3/4 时停止截骨[图 2(1)],折断股骨,注意保护股骨外侧骨膜的连续性,线锯从原入口退出[图 2(2)];对照组操作同上,未对骨膜采取特殊保护,全层截骨[图 2(3)]。两组均于股骨中段做长约 12 mm 的骨缺损[图 2(4)]。直视下见截骨后的股骨近端与远端对线良好后,拧紧骨延长牵张器,缝合关闭切口[图 2(5)]。经 1 周静息期后开始进行骨延长,通过精确测量后,用内六角扳手逆时针旋转支架尾端牵引螺母 3/4 圈,牵引距离为 0.5 mm,牵引速度为 $1 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,每天 2 次。

2.3 指标观察 于骨延长结束后第 28 天,2 组动物摄股骨 X 线片,观察骨痂生长情况;采用过量麻醉处死动物后,取股骨干标本进行肉眼大体观察。

3 结果

3.1 股骨标本 X 线检查结果 骨延长结束后第 28 天,实验组股骨干延长区域呈高密度、均匀影像,新生骨质区与两断端边界模糊,外层皮质连续,可见大量新生骨痂生长[图 3(1)];对照组股骨干延长区域呈较高密度、不均匀影像,新生骨质区与股骨近端骨干连接部分边界模糊,与股骨远端骨干连接部分边界较清,尚存台阶,外层皮质尚未完全连续,可见新生骨痂生长[图 3(2)]。

3.2 股骨标本肉眼观察结果 骨延长结束后第 28 天,实验组骨延长区域见骨质连续,连接完整,骨痂量多,新生骨两端界线模糊[图 4(1)];对照组骨延长区域骨质相对连续,连接相对完整,见骨痂生长,新生骨远端尚有部分缺损,未完全填充骨缺损区[图 4(2)]。

4 讨论

精准、成熟、可重复的动物模型,是所有实验研究的基础,因此动物模型应尽可能接近临床实际情况,为临床研究提供科学依据。在临床上进行手术时非常强调对骨质周围软组织的保护,尤其是对骨膜的保护。常规的创伤骨折在行切开复位内固定术时,若过多剥离骨膜有可能损伤残留的血供,进而导致骨不连、骨坏死等并发症的发生。因此,如何有效保护骨膜,显得尤为重要。骨膜是被覆在骨表面(除关节外)的结构复杂而有序的结缔组织包膜,含有多种具有成骨潜能的细胞和丰富的血供,具有很强的成骨能力,

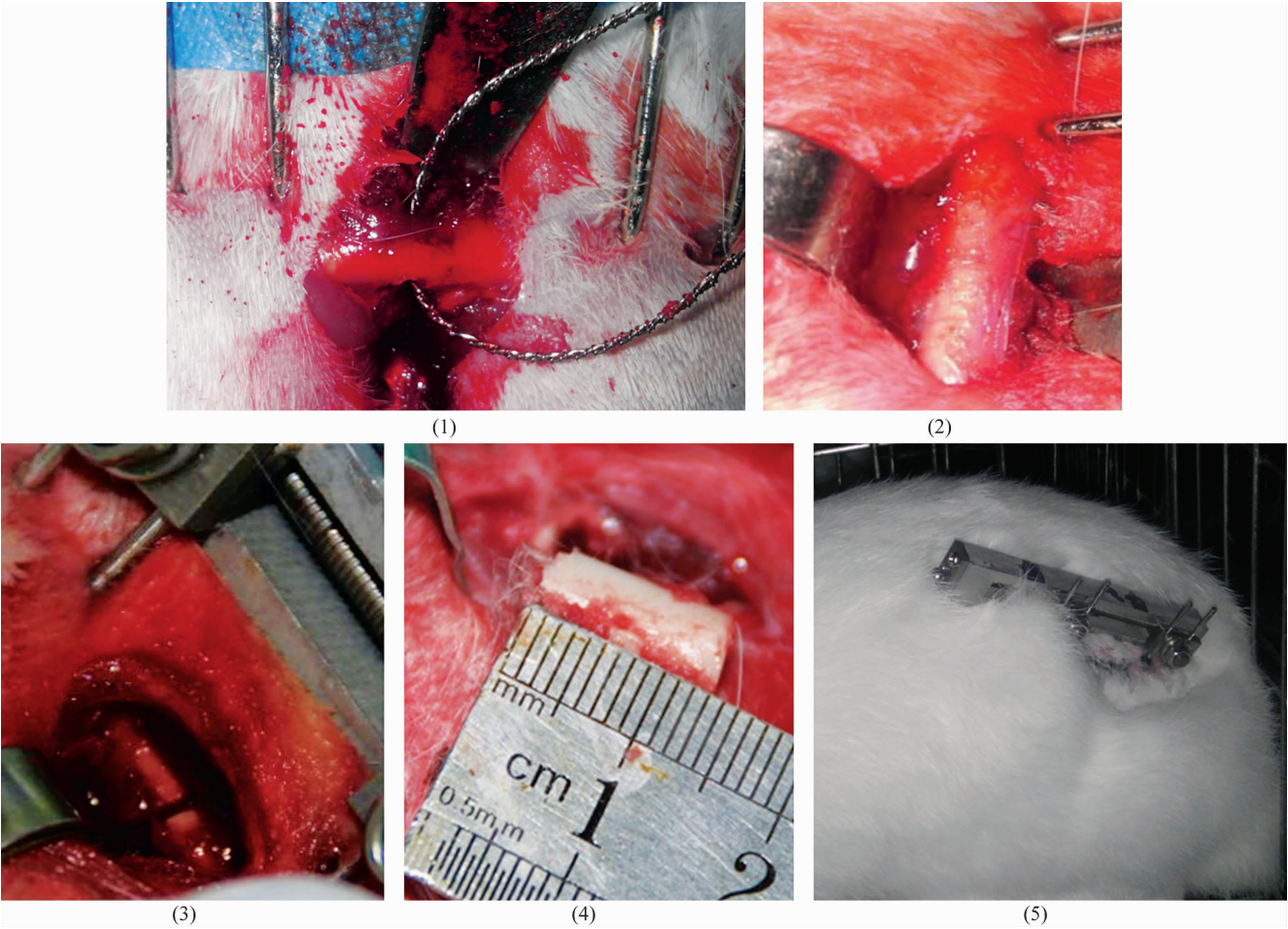


图 2 股骨骨缺损模型

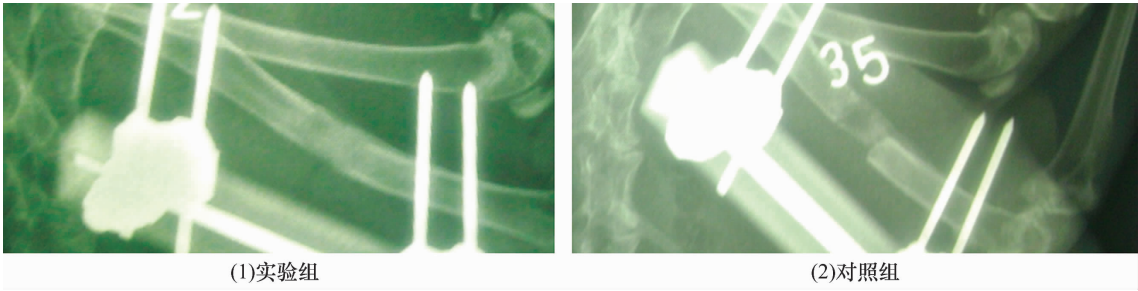


图 3 骨延长结束后第 28 天兔股骨 X 线片

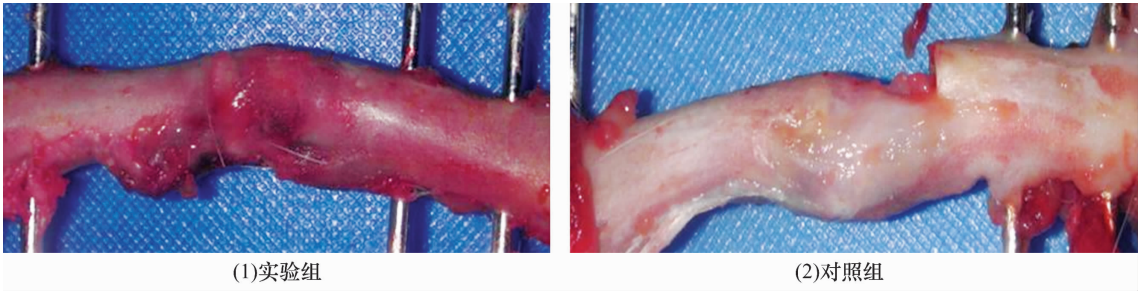


图 4 骨延长结束后第 28 天兔股骨干标本外观

在骨折愈合和新骨生成过程中起着极为重要的作用。在骨折愈合或骨缺损的修复过程中,许多生长因子均有不同程度的表达,而在骨膜中含有极丰富的生长因

子,如骨形态发生蛋白、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子、血管内皮细胞生长因子、胰岛素样生长因子等^[7]。保留骨膜能促进成骨,手术 1 个月后骨膜

成骨的效果更明显^[3]。骨膜外截骨有利于骨膜早期活跃性成骨^[8]。韦露等^[9]研究结果证明,兔腓骨切除后保留骨膜可原位再生腓骨,且在组织形态、成骨能力、生物应力上再生腓骨与健侧腓骨并无差异。骨膜在术后第 12 周时能修复大段骨缺损及重建成熟的骨组织结构^[10]。由于骨膜具有良好的柔韧性,临床上由创伤所致骨缺损时,骨膜常能得到较好保护^[11]。因此,探索与临床实际接近的骨缺损动物模型,具有重要的意义。

目前文献报道兔骨缺损的模型较多^[12-13],多选择胫骨、股骨、桡骨或下颌骨等作为骨缺损部位。针对保留骨膜的骨缺损模型,也偶见报道,但是对于保留骨膜的兔股骨骨缺损模型尚未见相关报道。兔桡骨、胫骨、股骨中点横径分别是 4.18 mm^[14]、5.3 mm^[13] 和 7.4 mm^[12]。因为股骨相对桡骨、胫骨较粗,且无尺骨和腓骨干扰,手术时其骨质易于触及和方便定位,还有利充分显露术野,而且术后对正常活动干扰小,所以本实验选择兔股骨造模。因家兔股骨直径小,骨质脆,易劈裂,故宜选用质地较轻,固定牢靠且易于操作、价格低廉的牵张支架。

本研究实验组骨延长区域新骨形成速度与质量,从大体标本外观及 X 线检查结果看均优于对照组;这可能与骨膜在牵张力的刺激下,释放更多生长因子有密切关系,有待于进一步研究证实。骨膜的成骨方式主要有膜内成骨和软骨内成骨,而膜内成骨是其主要成骨方式,且膜内成骨形成新骨的速度和质量明显优于软骨内成骨;因此,保留骨膜不仅可以修复较大长度的骨缺损,还可缩短治疗周期,促进骨缺损区域新骨的生长^[15]。

对骨膜的小心剥离与保护是此手术造模成功与否的关键。兔骨膜极薄,截骨时要保护好骨膜,术者除了需要对常规手术操作非常熟练之外,还需对兔的解剖结构非常熟悉。此外,进行克氏针低能量开孔、线锯部分截骨等操作时,术者需特别认真细心。

本研究结果显示,在股骨截骨过程中保留部分骨膜,可以更有效地建立兔股骨骨缺损并骨延长模型。但由于课题经费及实验条件的限制,本实验仅从标本大体观及 X 线影像表现评价了此模型的造模效果,而未从组织学、细胞分子学、生物力学等方面综合评价此模型的造模效果,这将是今后研究的重点。

5 参考文献

- [1] 阴彦林. 自体骨髓基质细胞与红骨髓修复保留骨膜骨缺损的比较研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2005.
- [2] 刘昌戎,沈为栋,彭伟,等. 保留骨膜的兔桡骨缺损性骨不连动物模型的制备[J]. 海南医学院学报,2013,19(6):725-727.
- [3] 谢利娜,潘巨利,黄欣. 骨膜原位成骨促进兔下颌骨缺损修复的研究[J]. 北京口腔医学,2009,17(6):110-112.
- [4] 孙丙银,朱洁英,熊建尉,等. 牵张成骨模型兔的建立与评估[J]. 中国组织工程研究,2017,21(16):2576-2581.
- [5] 黄枫,孙丙银,蔡立雄,等. 兔股骨牵张器的研制及其在实验研究中的应用[J]. 中国中医骨伤科杂志,2013,21(8):5-9.
- [6] 蔡立雄. 骨延长临床应用与淫羊藿苷促进牵拉新骨形成的实验研究[D]. 广东:广州中医药大学,2014.
- [7] 詹玉林,侯国柱,安智全,等. 兔骨缺损模型中骨膜对骨形态发生蛋白-2 分泌量及骨愈合影响的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志,2013,15(10):884-888.
- [8] 任志勇,李涛,张维彬,等. 兔胫骨干骺端骨膜外截骨对延长区成骨作用的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(2):150-155.
- [9] 韦露,罗高斌,薄占东,等. 幼兔腓骨切除后再生腓骨的功能研究[J]. 重庆医学,2015,43(24):3337-3340.
- [10] ZHAO L, ZHAO JL, YU JJ, et al. In vivo investigation of tissue-engineered periosteum for the repair of allogeneic critical size bone defects in rabbits[J]. Regen Med, 2017, 12(4):353-364.
- [11] CHASSANIDIS CG, MALIZOS KN, VARITIMIDIS S, et al. Smoking affects mRNA expression of bone morphogenetic proteins in human periosteum[J]. J Bone Joint Surg Bri, 2012, 94(10):1427-1432.
- [12] 王永刚,裴国献,张洪涛,等. 兔股骨干缺损模型的制备及在组织工程骨实验中的应用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(10):971-974.
- [13] 鲍小刚,许国华. 兔胫骨大段完全骨缺损的解剖学模型构建[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24):3508-3515.
- [14] 沈为栋,刘昌戎,张铁洪,等. 新西兰大白兔桡骨的解剖学观测[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(9):1331-1332.
- [15] 马金玲,潘巨利,王东胜. 自发成骨修复小型猪下颌骨缺损的组织病理学研究[J]. 北京口腔医学, 2008, 16(6):304-308.

(收稿日期:2017-09-30 本文编辑:时红磊)