

大鼠缺血性骨折延迟愈合模型的建立

陈潮锋¹ 李悦² 直彦亮¹ 姜自伟² 石宇雄¹ 梁锦成¹ 刘锋¹ 何德利¹

[摘要] **目的:**通过一个新型造模为骨折延迟愈合的研究提供新思路。**方法:**选雌大鼠 24 只,随机分为 A 和 B 组,每组 12 只,A 组麻醉后结扎股动脉,用冲撞法制作股骨骨折模型;B 组麻醉后用冲撞法制作股骨骨折模型。分别于 1,4 及 8 周后观察大体标本、骨痂形态、X 线检查确定骨折延迟愈合模型形成情况。**结果:**大体标本肉眼观察、骨组织形态学检查及放射学检查均显示 A 组骨缺损区骨愈合较 B 组慢,A 组骨性连接出现较晚,骨端硬化。**结论:**本实验所建立的动物模型,具有缺血性骨折延迟愈合的病理改变,与缺血性骨折延迟愈合的发生机制相符,符合缺血性骨折延迟愈合模型的要求,故可以认为是一种可靠的实验性缺血性骨折延迟愈合动物模型。

[关键词] 骨折延迟愈合;模型;动物;缺血性

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)12-0001-03

Establishment of Delayed Union Fracture with Ischemia Model in Rats

CHEN Chaofeng¹ LI Yue² ZHI Yanliang¹ JIANG Ziwei²
SHI Yuxiong¹ LIANG Jincheng¹ LIU Feng¹ HE Deli¹

¹Department of Orthopedics,Panyu Hospital of Traditional Chinese Medicine,Guangzhou 511400,China;

² Department of Orthopedics,the First Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405,China.

Abstract Objective: In this paper,we aimed to provide a new idea by establishing a new animal model for experimental study of delayed union of fractures.**Methods:** All 24 female rats were divided into two groups averagely. Group A received femoral artery ligation after an aesthesia to make the model of femur fracture;group B only used Collision method to make the model after an aesthesia. Delayed union of fracture was observed by gross,bone histomorphometry and X-ray examination in 1,4 and 8 weeks respectively after the procedure.**Results:** The bone healing in the group A was slower than group B,bony joints of group A appeared late and bone end sclerosis was demonstrated by gross,bone histomorphometry and X-ray examination.**Conclusion:** The pathological changes of the established animal model met the demands of delayed union of fracture with ischemic. It can serve as a reliable experimental model for the study of delayed union of fracture with ischemic.

Keywords: delayed union of fracture,model;animal;ischemic

创伤性及病理性骨折,其并发症骨折延迟愈合的治疗一直是骨科研究的重点方向之一。有报道指出骨不连的动物模型可以通过形成骨缺损法、断端活动法、组织隔离法、切除骨膜法^[1]等进行操作。但动物模型的制作方法并未获得共识,本实验旨在通过实验方法,为治疗骨折延迟愈合建立一个合适的动物模型。

血管损伤伴随骨折与临床上骨不连的损伤机制存在相关性,然而确切的影响骨愈合的机制仍未阐述清

楚。为了更好地明确机制与促进对缺血性骨不连的研究,本研究拟在大鼠的股骨骨折的模型中加上股动脉结扎,为下一步的研究做好造模的准备。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

缺血性骨折延迟愈合的模型制作:随机挑选 SPF 级雌性 SD 大鼠 24 只,鼠龄 6~8 周,体质量 260~280 g,由广州中医药大学实验中心提供,许可证号为 SCXK(粤)2016-0023。随机分为 A 组与 B 组,A 组行结扎股动脉后,用冲撞法制作股骨骨折模型,B 组用冲撞法制作股骨骨折模型。A 组和 B 组均行双侧卵巢

基金项目:广东省中医药局科研项目(20171202)

¹ 广州市番禺区中医院(广州,511400)

² 广州中医药大学第一附属医院骨科

摘除术。本实验相关的各项操作符合广州中医药大学实验动物伦理委员会规定的实验伦理守则(批准号 2016050)。

1.1.1 股骨干骨折模型制作 行腹腔麻醉(5%水合氯醛,5 mL/kg),常规消毒铺巾,取左下肢髌骨内侧切口,纵行切开皮肤 3 cm,将髌骨往外侧牵使脱位,暴露股骨髁间凹。用 20 号注射针自股骨髁间凹插入髓腔扩髓,然后取出注射针,逆行插入克氏针(直径 0.2 mm),从大转子及皮肤穿出,克氏针远端埋于股骨髁间骨皮质下,近端紧贴大转子将尾部折弯剪除多余部分,随后逐层闭合切口^[2]。依改良 Thamos 法建立股骨干闭合性骨折动物模型^[3],将动物右下肢外展内旋位固定于骨折造模装置的铁砧凹槽上(铁砧凹槽间距为 15 mm),造模支架柱下端骨刀压于大腿中部,助手提起 500 g 的砝码至 35 cm 处,让其自由落体撞击股骨,致股骨中段骨折。期间允许自由负重、活动,分笼标准饲料喂养。

1.1.2 结扎股动脉 术前使用 Doppler 血流仪测量双下肢血流灌注情况,在股骨干造模后,取侧卧位,常规剃毛备皮,用 75%酒精消毒左下肢皮肤,常规消毒铺巾。用眼科镊夹起皮肤,用手术刀从左侧腹股沟至大腿内侧作 1.0~1.5 cm 切口,在手术显微镜下依次分离各层组织,于血管鞘内充分分离股动脉、股静脉和股神经,仔细游离出股动脉,注意保护动脉,用 2 根 8 号可吸收线在股动脉远近端分别结扎^[4],上端紧靠股动脉分支,下端距上端约 5 mm(见图 1)。用眼科剪将两结扎点间的股动脉剪断,随后缝合皮肤。术后应用 Doppler 血流仪检测下肢血流情况^[5]。

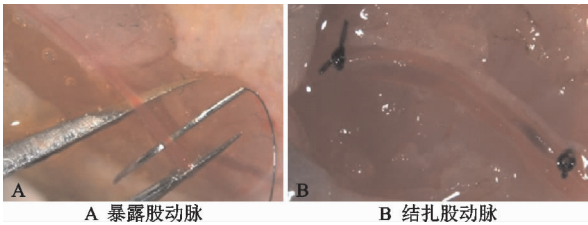


图 1 股动脉结扎示意图

1.2 标本收集和处理

1.2.1 大体标本 观察动物术后饮食、活动的情况,局部伤口愈合情况及肿胀程度。分别在造模 1,4 和 8 周后,分三批处死各 8 只 A 组和 B 组的实验动物,在处死动物进行取材后观察骨折端的连接情况,观察骨痂情况。

1.2.2 组织形态学检查 分离大鼠左侧股骨,剥净软组织,选取中段长约 1 cm 的骨段,固定后逐级脱水,浸

入 3:7 的甲基丙烯酸甲酯中 24 h 真空负压 86~70 kPa,然后以半聚合甲基丙烯酸甲酯包埋制成实验标本。采用硬组织切片机,每个标本连续切 6 张 10 μm 和 4 张 5 μm 厚的不脱钙骨切片,其中 5 μm 薄片采用甲苯胺蓝染色检测^[6],以普通光学显微镜进行观察,10 μm 厚片用于荧光显微镜下观察测量,记录每毫升骨小梁的数目。

1.2.3 X 线检查 大鼠禁食禁水,称体质量,行腹腔麻醉(5%水合氯醛),取俯卧位,四肢展平固定在医用 X 线摄片机(Model 43855C, Wheeling, USA)上,进行 X 线照相。

2 结果

2.1 大体标本肉眼观察

大鼠术后饮食、活动正常,3 d 后消肿,切口愈合良好。术后 1 周,两组标本取出克氏针后,骨折端均有摆动,A 组摆动幅度大于 B 组,两组均未见明显骨痂形成。术后 4 周,取出内固定后,B 组骨折端未见活动,可见大量骨痂形成,可用手折断;A 组骨折端仍存在微动,骨折端可见少量脂肪及纤维填充,未见明显骨痂形成及骨化现象。术后 8 周,取出内固定后,A 组未见明显摆动,骨折端周围可见少量软骨痂形成,可用手术刀切断,骨痂强度低;B 组未见活动,骨缺损处可见骨性愈合,见大量硬骨痂形成,部分髓腔再通。

2.2 骨组织学检查

骨组织形态计量学结果:造模 1 周、4 周、8 周后 A 和 B 两组骨小梁比较,B 较 A 组明显增加(见图 2),差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 骨组织形态计量学比较($\bar{x}\pm s$)

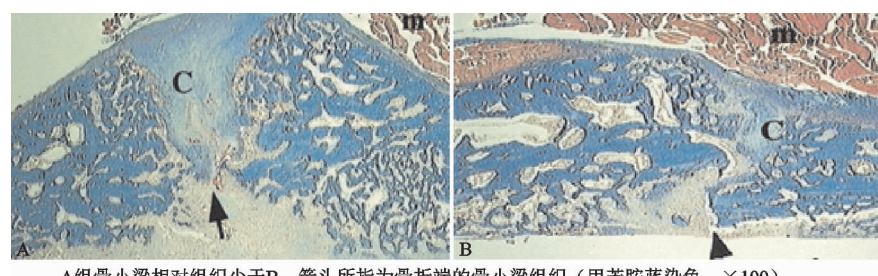
分组	1 周	4 周	8 周
A 组	27.89±2.67	29.87±3.15	38.97±4.56
B 组	36.44±2.34	57.67±3.44	75.69±6.78
<i>t</i>	8.342 5	20.646 4	15.567 8
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

2.3 X 线检查

术后 1 周:A 组为低密度显影,未见骨痂形成。B 组可见少许低密度阴影,有少量新生骨形成。

术后 4 周:A 组骨折端可见少许骨痂形成,骨折线清晰。B 组可见骨痂形成,但未能完全连接断端,密度较低(见图 3)。

术后 8 周:A 组骨折断端硬化,未见明显连续型骨痂,骨折线较四周模糊。B 组骨痂明显,可完全包围骨折端,骨痂骨密度接近周围骨组织,骨髓腔部分再通。



A组骨小梁相对组织少于B, 箭头所指为骨折端的骨小梁组织(甲苯胺蓝染色, ×100)

图 2 术后 4 周骨组织学检查

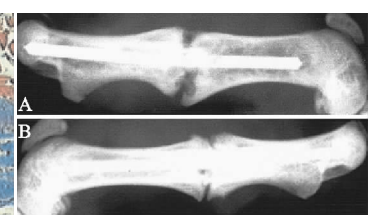
3 讨论

血管的损伤与骨修复的失败存在关系,Fassbender 等^[7]使用涂有抑制血管活性药物的克氏针,对大鼠进行固定,由于血管的抑制导致骨不连,由于血供的干扰进而导致骨折延迟愈合。但为了明确血管损伤后导致骨不连的机制,制作动物模型是必须的。结扎动脉可以模拟人体受到高能量损害时的情况,由于失去血管的供养,使骨折端的愈合延缓。

既往的研究是通过切除骨折端骨膜与刮除髓内组织,削弱骨的愈合能力。Eckardt 等^[8]根据该原则,成功制作出骨不连的模型。Kokubu 等^[9]对上述方法进行改良,制作闭合骨折模型后,暴露骨折两端,将骨折两端的骨膜灼烧,随后进行组织学检查,显示灼烧处均无骨愈合。然而,骨膜及骨髓内提供各种骨生长的细胞及因子在骨修复中发挥关键作用,而在临床情况下应该优先保护骨膜。基于这点,笔者旨在通过制造血管损伤模型对骨折的愈合进行干预。

试验结果表明,骨损伤伴随血管损伤导致缺血环境的形成,与在临床中血管损伤的程度和骨修复失败直接相关,本研究通过结扎股动脉进行血供的控制。持续的缺血导致多发性骨折修复缺陷,骨折后细胞的增殖与生存受到缺血的不良影响,导致之后骨折部位细胞分化出现异常。骨折端大量的非骨组织的损伤,表明由于血供的较少而导致骨与软骨组织细胞生成的减少。而这导致生成的骨痂较小而不能对骨折两端进行桥接,所以导致大量的纤维与脂肪组织侵入邻近的骨间隙中。大量的软组织侵入骨折端中表明在损伤性缺血的状态下,细胞转化为正常骨组织的能力受到了抑制。而这些分析也证明控制骨细胞分化在骨折修复中发挥着至关重要的作用。

临床上缺血引起的血供减少是骨不连发生的重要因素,在本次试验中,通过结扎股动脉制造缺血性环境。股骨骨折模型是由三点折弯法制作的,相比挤压伤,三点折弯法只是破坏骨结构的完整性,而没有造成太多周围软组织的损害。在股骨骨折模型建模前进行



A 骨折端可见少许骨痂形成,骨折线清晰
B 可见骨痂形成,但未能完全连接断端,密度较低

图 3 术后 4 周 X 线检查

血管结扎,创建了一个急性缺血性环境,下肢的软组织在受伤的时候也仍是正常的。因此,该模型允许区分由于缺血对骨折愈合的影响,而避免与挤压伤引起广泛软组织损伤产生混淆。本次研究中,结扎股动脉明显阻碍了骨折的愈合,但没有改变修复方法,只是使骨折的愈合发生了延迟。

骨折延迟模型有利于骨修复的研究更加深入,下一步的目标是探索相关机制,并评估补肾活血中药对于缺血性损伤的骨不连的修复疗效。

参考文献

[1] 王俊,陈一心. 骨不连动物模型的研究进展[J]. 江苏医药,2008,34(5):509-510.
[2] 张志平,白晓春,张忠民,等. 髓内针固定小鼠闭合性股骨骨折模型的建立[J]. 解剖学报,2012,43(1):135-138.
[3] 周晓中,董启榕,张健. 大鼠股骨闭合骨折模型的制作[J]. 东南大学学报:医学版,2007,26(1):60-62.
[4] Nie L,Guo X,Esmailzadeh L,et al. Transmembrane protein ESDN promotes endothelial VEGF signaling and regulates angiogenesis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(12): 5082-5097.
[5] 李晓坤,麻晓婷,聂磊,等. Sirt1 转基因小鼠股动脉结扎后血管新生的初步研究[J]. 河北医科大学学报,2016,37(3):340-342.
[6] 成令忠. 现代组织学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2003.
[7] Fassbender M,Strobel C,Rauhe J S,et al. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model[J]. Eur Cells Mater,2011,22(2):1-11.
[8] Eckardt H,Ding M,Lind M,et al. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model[J]. J Bone Joint Surg Br,2005,87(10):1434-1438.
[9] Kokubu T,Hak D J,Hazelwood S J,et al. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur[J]. J Orthop Res,2003,21(3):503-510.

(收稿日期:2017-08-06)