

一种牵张成骨大鼠实验模型的建立

曾景奇¹, 黄枫², 姜自伟^{2*}, 王凡¹, 李悦², 虎群胜¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】 目的 建立一种新型 SD 大鼠胫骨牵张成骨模型的方法。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠右侧胫骨截骨并短缩 4 mm, 以自行研究设计的环状牵张外固定器固定, 于骨折修复期予以牵张外固定器恢复胫骨高度, 术后通过大体观察、影像学观察以及组织形态学方法观察截骨部位的愈合与恢复情况。**结果** 术后外固定器稳定有效, 对大鼠功能活动无明显影响。胫骨高度恢复, 骨性愈合。**结论** 实验所建立的大鼠胫骨牵张成骨模型可靠实用, 具有可重复性。

【关键词】 牵张成骨; SD 大鼠; 实验模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0043-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.008

Establishment of a novel rat model of distraction osteogenesis

ZENG Jing-qi¹, HUANG Feng², JIANG Zi-wei^{2*}, WANG Fan¹, LI Yue², HU Qun-sheng¹

(1. Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510006, China.

2. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To establish a new model of distraction osteogenesis in rat tibia. **Methods** A customized external fixation device was attached to the right tibia of 40 male Sprague-Dawley rats. A 4-mm bone block was resected and the tibia was shortened. To investigate the bone healing during the distraction osteogenesis period and reconstruction period, and general observation, x-ray analysis, and histological examination were performed. **Results** The device was stable and effective without hindrance. The tibia length was recovered and bone union was achieved. **Conclusions** A novel Sprague-Dawley rat model of distraction osteogenesis in tibia is successfully established, and this is a reliable, practical and reproducible model.

【Key words】 Distraction osteogenesis; Sprague-Dawley rats. Animal model

Corresponding author: JIANG Zi-wei, E-mail: ainemylyy@qq.com

牵张成骨(distraction osteogenesis, DO)是指通过对骨切开后仍保留骨膜及软组织及血供的骨段, 利用牵张装置按一定的速度和频率牵开, 促使牵张间隙中新骨形成, 从而达到延长或增宽骨骼外科技术。其基本原理是当机体组织受到缓慢而稳定的牵引和张力时, 细胞的增殖与合成功能随即被激活, 从而促进组织的再生^[1]。牵张成骨技术由于具有无需植骨, 手术操作简单, 创伤和风险小, 成骨期抗感染能力强, 成骨质量好, 软、硬组织同期修复等普通

骨折固定技术无法比拟的优点, 已逐渐成为研究和应用的热点^[2]。由此可见, 建立一种有效的牵张成骨动物模型, 通过动物实验推断和证实牵张成骨的机理及影响因素, 对临床具有相当重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 40 只, 购自广州中医

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81403413)。

[作者简介] 曾景奇(1984-), 男, 博士研究生, 专业: 中医骨伤科学。Email: 846484577@qq.com

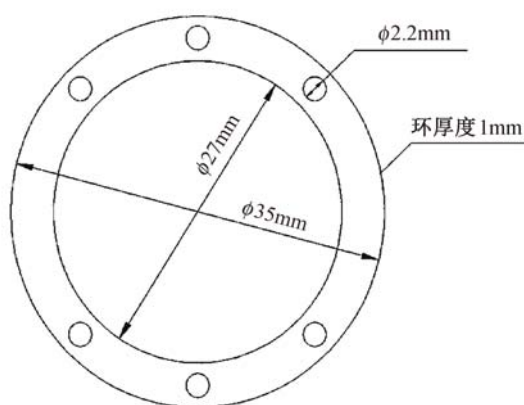
[通讯作者] 姜自伟(1980-), 男, 副主任医师, 专业: 骨与关节损伤。Email: ainemylyy@163.com

药大学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0020】, 2~3 月龄, 约 260~280 g, 在广州中医药大学第一附属医院 SPF 级实验设施中进行实验操作【SYXK(粤)2013-0092】, 常规饮食, 光照保持昼夜节律各 12 h, 温度控制在 24~26℃, 相对湿度控制在 50%~70%。并按照实验动物的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 主要仪器

自制的大鼠胫骨环状外固定器(自制专利)(图

1), 电钻(博世电动工具有限公司, 上海), 定制 0.5 mm 克氏针(天津丰翼), 电动理发器(杭州科美), 游标卡尺(台湾宝工); Olympus-BX53 生物显微镜(日本奥林巴斯); Leica TP1020 半自动台式组织脱水机(Leica Biosystems, 德国), KD-BM 生物组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司), KD-202 石蜡切片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司), Leica Autostainer XL 自动染色机(Leica Biosystems, 德国)。



注: 环状压片 4 枚; 25 mm M2 螺钉 4 枚; 5 mm M2 螺钉 4 枚; M2 螺母 16 枚; 0.5 mm 克氏针 4 枚。

图 1 自制大鼠胫骨环状外固定器

Note. Four circle plates; Four 25 mm M2 screws; Four 5 mm M2 screws; Sixteen M2 nuts; Four 0.5 mm Kirschner wires

Fig. 1 The customized external fixation device for tibia of rats

1.2 方法

1.2.1 术前准备

禁食 24 h 不禁水, 术前称重, 5% 水合氯醛麻醉, 用量 6 mg/kg, 右下肢用理发器备皮后反复用 75% 酒精消毒, 备 8 万单位庆大霉素用 250 mL 生理盐水稀释用于冲洗。

1.2.2 手术步骤

助手双手轻柔固定大鼠右侧膝关节及踝关节, 轻轻牵引皮肤。术者取体表标志: 胫骨弧度顶点, 直切口约 1 cm, 钝性分离浅筋膜, 肌间隙处轻轻牵开, 暴露胫骨, 纵向切开骨膜 0.5 cm。沿肌间隙深入探查胫骨后方的腓骨, 剪刀剪断腓骨。丝线缝合切口皮肤。

首先置第一枚环形压片, 电钻装 0.5 克氏针, 胫骨上段前内侧 45° 垂直于胫骨轴线进针, 穿透双侧皮质, 对侧出针。同法用第 2 根克氏针与第一根冠状面成角 30°~45°, 靠近第 1 根进针点穿入。置第二枚环形压片, 用短螺钉固定两压片及其之间的交

叉克氏针, 调整位置, 尽量使大鼠小腿中轴与环形压片中轴重合。

置第三枚环形压片, 上述方法在胫骨中段穿入克氏针 2 枚后置第四枚压片。用长螺钉将固定好的远近两端压片链接。

支架固定牢靠后, 胫骨前端切口拆线, 重新暴露胫骨, 以电钻 1 mm 钻头在胫骨中点穿孔若干(同时用庆大霉素冲洗冷却), 剪开筛孔状胫骨, 测量截骨长度约 4 mm。修剪皮质缘。通过螺钉缩短两端环形压片的距离, 使胫骨截骨断端对合压紧, 拧紧长螺钉螺母。对合满意, 冲洗缝合, 消毒(图 2)。

1.2.3 术后处理

4 万单位青霉素肌注, 连用 3 d。术后禁食 12 h, 不禁水。术后 7 d 内单笼饲养至下肢消肿行走。

1.2.4 牵张

静止期 7 d 后开始通过远端长螺杆螺钉延长, 0.2 mm/d, 连续延长 20 d, 共 4 mm, 恢复胫骨高度。

2 结果

40 只雄性大鼠手术后均能正常饮食排便,伤口愈合良好,手术时间: (87 ± 11.58) min; 术后患肢消肿时间: (3.8 ± 1.45) d, 消肿后大鼠肢体活动正常, 均未出现伤口感染、肌肉萎缩等并发症。牵张期及固定期内外固定器稳定牢靠, 未见断端及针孔松动, 胫骨大体位置符合生理状态, 外固定器对大鼠功能活动无明显影响。

2.1 组织切片

术后 60 d 拆除外固定架, 取大鼠右侧胫骨, 去掉克氏针固定端两侧骨质, 仅留牵张成骨区域, 置

4% 中性甲醛溶液中固定 48 h, 于 Plank 脱钙液中脱钙 24 h, 流水冲洗 24 h, 全自动脱水机内脱水、透明、浸蜡, 石蜡包埋, 切片, 切片厚度 $5 \mu\text{m}$, 全自动染色机内行 HE 染色。显微镜下观察发现牵张成骨区域纤维骨痂形成, 出现少量软骨, 部分纤维骨痂被类骨质替代, 逐渐形成编织骨 (图 3)。

2.2 影像学

X 线片 (广州中医药大学第一附属医院影像科, 柯达 DR7500, 管电压 50 kV, 毫安秒 4 mA) (图 4) 术后 2 d 见断端对合良好, 2 周后可见实验大鼠胫骨断端原始骨痂填充。牵张期 20 d 后, 胫骨高度恢复。术后 8 周后断端有连续骨痂通过, 骨性愈合。



注: A: 用克氏针及环状压片固定胫骨; B: 截断腓骨; C: 游标卡尺确定胫骨截骨长度 4 mm; D: 术后功能活动。

图 2 手术步骤

Note. A: Holding tibia with Kirschner wires and circle plates. B: Fibula osteotomy. C: To confirm the 4-mm bone block was resected from tibia with a Vernier caliper. D: Functional activity after operation

Fig. 2 Illustration of the operating procedure

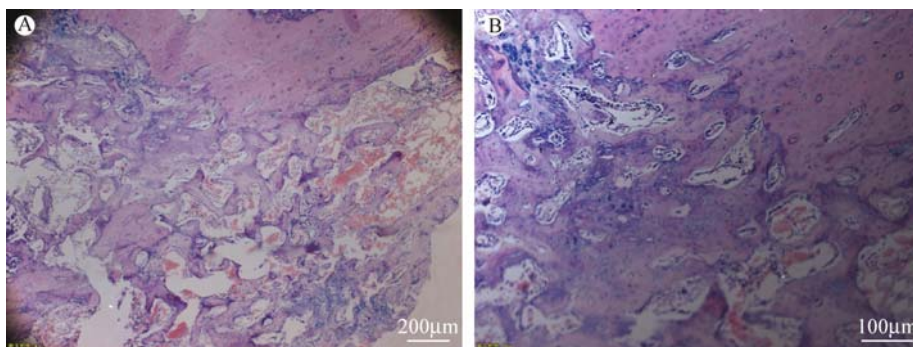
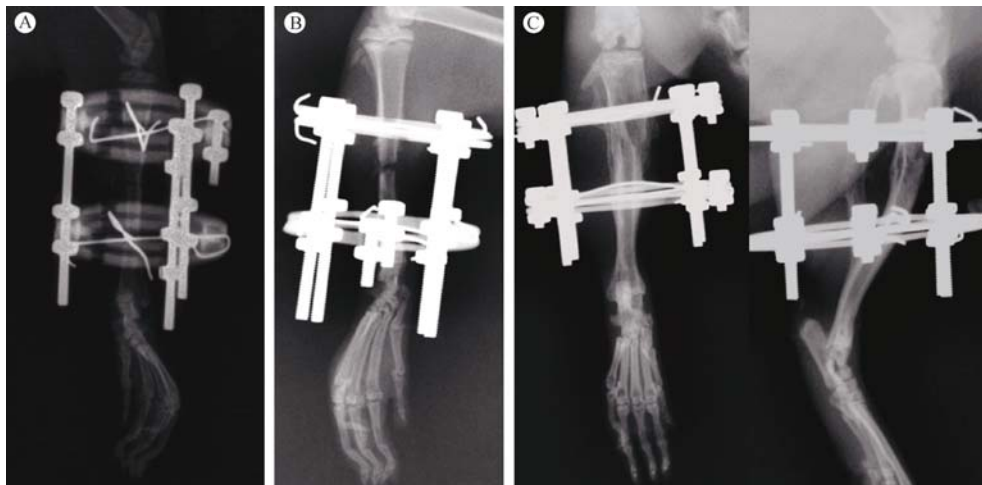


图 3 组织切片 HE 染色结果 (A. $\times 40$; B. $\times 100$)

Fig. 3 Histological pictures of the bone structure



注:A:术后 2 d;B:术后 14 d;C:术后 60 d。

图 4 X 线结果

Note. A: 2 days after operation. B: 14 days after operation. C: 60 days after operation.

Fig. 4 Results of X-ray examination

3 讨论

目前牵张成骨研究的热门集中在口腔颌面科方面,动物如犬、山羊、兔等^[3-5]。对于负重长骨的大鼠牵张成骨模型,由于大鼠本身体格较小,并且生长过程中体型变化较大,规格没有统一的标准。作者前期实验中尝试了文献中提到过的各种规格外固定器如 Tay 等^[6]设计的固定器,发现对于成年雄性 SD 大鼠,外固定环过小会导致小腿软组织嵌顿,术后肿胀持续,不利于功能活动,影响造模效果。分析目前已有的外固定器,主要问题集中在以下几个方面:①器械复杂,金属环的结构不是规整的圆或方形结构,需要重新造模,大范围的成批应用标准难以统一,工作量较大,后期调整牵引长度不易控制;②器械过重,术后可能影响大鼠的活动;③操作复杂,大鼠小腿本身操作范围局限,十分考验设计以及术者的操作技术,造模成功率无法保证。

根据以上结论,我们重新设计和尝试,最后实施在 SD 大鼠上,极大程度避免了以上问题,也是本实验成功的原因,本方法的优势体现在:①器械简单;②器械较轻,重量不超过 10 g,术后不影响大鼠的活动;③操作相对简单,经试验证明 3 个月后亦牢固无松动。④切口较小,手术损伤较小,术后大部分 3 d 之内消肿,活动自如。

研究表明^[7,8],牵张成骨过程中,牵张器稳定性较好,可以很好地诱导新骨形成,而且经过 10 周的固定期后可彻底完成骨改建。反之,若牵张器稳定性差,则将导致胶原介体的形成及骨改建的滞后。

本次实验通过观察大鼠的步态可以发现患处并无假关节形成,牵张时检查亦未发现针口及支架松动的迹象,最后的 X 线片中断端成功完成骨改建可间接证明器械的牢固可靠。总之,本实验中本实验采用的手术方式及术后处理均能被 SD 大鼠很好耐受,且具有相对简单,损伤较小等优势,本方法的大鼠胫骨牵张成骨模型成功率较高,具有很好的可重复性。

(致谢:本实验由广州中医药大学国家重点学科中医骨伤科学实验室提供技术及部分科研试剂耗材支持。)

参 考 文 献

- [1] 孙溪饶. 牵引速率及频率对牵张成骨的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41): 7727-7730.
- [2] Rubio-Bueno P, Naval L, Rodriguez Campo F, et al. Internal distraction osteogenesis with a unidirectional device for reconstruction of mandibular segmental defects [J]. Oral Maxillofac Surg. 2005, 63(5): 598-608.
- [3] 魏奉才, 张东, 刘少华, 等. 兔双侧下颌骨牵张成骨实验动物模型的建立 [J]. 上海口腔医学, 2004, 13(6): 502-505.
- [4] 郑晓辉, 田卫东, 龙洁, 等. 山羊下颌骨牵张成骨术的实验研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(3): 386-389.
- [5] 吴琳, 王禄增, 哈斯达来, 等. 应力对大段骨缺损修复影响的实验兔模型探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 26-29.
- [6] Tay BK, Le AX, Gould SE, et al. Histochemical and molecular analyses of distraction osteogenesis in a mouse model [J]. Orthop Res, 1998, 16(5): 636-640.
- [7] Klotch DW, Ganey TM, Slater-Haase A, et al. Assessment of bone formation during osteoneogenesis: a canine model [J]. Otolaryngol Head-Neck Surg, 1995, 112(2): 291-302.
- [8] Costantino PD, Friedman CD, Shindo ML, et al. Experimental mandibular regrowth by distraction osteogenesis: long-term results [J]. Arch Otolaryngol Head-Neck Surg, 1993, 119(5): B511-516.

[收稿日期] 2015-08-23