

实验性骨不连模型的制作

林博文, 徐忠世, 肖德明, 卢小虎, 杨大志

(深圳市人民医院骨科, 广东 深圳 518020)

摘要:【目的】为骨不连的实验研究建立一种客观的动物实验模型。【方法】选取纯种新西兰大白兔, 在前臂桡骨中段截除 1.5 cm 骨段(包括骨膜), 骨断端用骨蜡封闭髓腔, 10 周后经大体标本、病理组织学及 X 线检查确定骨不连形成情况。【结果】大体标本肉眼观察、放射学检查及病理组织学检查均显示骨缺损区无骨性连接, 为纤维瘢痕组织填充, 骨端硬化。【结论】本实验所建立的动物模型, 具有骨不连的病理改变, 符合骨不连的要求, 故可以认为是一种可靠而实用的实验性骨不连动物模型。

关键词: 骨不连; 模型; 动物

中图分类号: R782.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0331-02

Establishment of an Animal Model for Experimental Study of Bone Nonunion LIN Bo-wen, XU Zhong-shi, XIAO De-ming, LU Xiao-fu, YANG Da-zhi. (The Orthopedics Department, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China)

Abstract:【Objective】To establish an objective animal model for experimental study of bone nonunion.【Methods】The bone segment of 1.5 cm in the middle part of radius of New Zealand rabbits was obtained by surgery. The bone marrow cavity was sealed by bone wax. Bone nonunion was observed by gross histological and X-ray examination 10 weeks after the procedure.【Results】The bone defect was filled by fiber scar tissue, without any bone tissue, and bone end sclerosis was demonstrated by gross, histological and X-ray examination.【Conclusion】The pathological changes of the established animal model meet the demands of bone nonunion. It can serve as a reliable experimental model for the study of bone nonunion.

Key word: bone nonunion; model; animal

病理性骨折及创伤性骨折, 其并发症骨不连的治疗一直是骨科研究的热点, 但在动物实验中尚缺少一种客观的动物实验模型^[1], 本实验旨在通过动物实验方法, 为治疗骨不连的实验研究建立一个客观的动物模型。

1 材料与方 法

1.1 骨不连模型的制作

选取纯种新西兰大白兔 20 只(普通级, 广东省实验动物中心提供), 体质量(2.5±0.5) kg, 雌雄不限, 用 25 g/L 硫贲妥钠按 30 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。麻醉后, 取俯卧位, 常规消毒铺巾, 在前臂桡侧沿桡骨作一 2.5 cm 长切口, 显露桡骨, 在距桡骨远端 2 cm 处截骨(此处为骨隆起处), 再向近端距第一截骨线 1.5 cm 处做第 2 个截骨线, 去除截除的 1.5 cm 骨段(包括骨膜), 骨断端用石蜡封闭髓腔, 彻底止血, 依次缝合各层(图 1), 肌注青霉素 8 万单位, 连注 3 d, 不做内外固定, 放入笼内喂养, 10 周后经大体标本、病理组织学及 X 线检查确定

骨不连形成情况。

1.2 检测方法

1.2.1 大体标本 观察骨缺损连接情况, 骨端骨痂增生情况。

1.2.2 病理组织学检查 将 20 只大白兔取出, 用空气栓塞的方法处死, 取出双侧桡骨, 共 40 个标本, 取材包括双侧正常骨端 0.3 cm, 行常规脱钙、脱水、透明及石蜡包埋, 5 μm 连续切片, HE 染色, 光镜下观察。

1.2.3 放射学检查 于 10 周将大白兔进行 X 线照片, 采用日本岛津 1250 型 X 线机, 小焦点, 曝光条件为: 40 kV, 250 mA, 10 mS。

2 结 果

2.1 大体标本肉眼观察

于 10 周后骨缺损区为纤维瘢痕组织填充, 无骨性连接, 骨蜡未吸收, 骨端硬化, 髓腔闭塞, 两侧断端有少量骨痂形成, 骨缺损范围为 0.8~1.2 cm (图 2)。

收稿日期: 2002-01-12

作者简介: 林博文(1958-), 男, 广东揭西人, 副主任医师。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

2.2 病理组织学检查

光镜下骨断端髓腔封闭,有软骨细胞及骨细胞,细胞呈无序排列,纤维膜覆盖,缺损区为纤维瘢痕组织(图3)。

2.3 放射学检查

于10周照片见骨缺损区无骨性连接,断端硬化,髓腔封闭,两侧断端有少量骨痂形成,骨痂形成不规则(图4)。

3 讨论

3.1 本实验设计的机制与科学性

骨折后新骨的形成过程,大体是骨折端血肿形成,血肿转化为肉芽组织,然后机化,形成纤维软骨,再经矿物质沉积,血管长入,成骨细胞增生,刺激成骨作用,同时胶原纤维合成,最后形成新骨。骨折端因某种原因丧失了一些骨质,形成较大的间隙,在新骨生成过程,由于组织学的改变使已形成的纤维软骨萎缩,成骨受阻,缺损间隙由纤维组织填充,骨端未能达到骨性愈合,则形成骨不连^[1]。骨不连的原因甚为复杂,从局部考虑,主要有3个因素:①骨折断端的缺损距离较远,又未获得有效的固定,力的传导作用消失,各种细胞(纤维母细胞、软骨细胞及骨母细胞)出现规律失常,杂乱无章地出现在骨痂中,尤其是纤维母细胞不能化生为骨细胞和骨组织,而是化生为纤维细胞,在骨折端形成瘢痕,同时纤维母细胞产生胶原及骨母细胞产生骨基质的功能受阻,影响成骨作用,致骨性骨痂无法形成,而由纤维瘢痕组织将骨折端连接起来^[3],骨折不能愈合;②骨外膜丧失严重;③骨髓腔闭塞;后两者影响骨外膜与骨髓腔中有关细胞的成骨机能,骨外膜的成骨细胞转变为骨母细胞和软骨细胞的数量不足,同时骨内膜的成骨细胞及骨髓间叶细胞的成骨作用也受阻,从而导致骨不连。骨不连的主要X线表现:①骨折端存在间隙;②骨折端硬化,骨髓腔封闭;③骨痂间无骨小梁形成;④假关节形成。基于这些机制,设计本实验,因此,具有一定的科学性。

3.2 本实验模型的可靠性

本实验选取20只新西兰大白兔作为实验对象,10周后处死动物,取双侧桡骨进行大体标本,组织学检查及放射检查,以证明本造模方法的可靠性。

于骨生长的环境中进行,包括缺损超过骨干直径3~4倍,即不能自行修复的长度,解剖部位上肌肉覆盖较少,红骨髓含量少,相对骨祖细胞不活跃的成年动物。在本实验中,我们选用6~8月龄成年兔,测量兔桡骨中段直径为 (3.39 ± 0.32) mm($n=10$),造成15mm骨缺损,达其骨干直径的4~5倍,中段缺损远离红骨髓较丰富的干骺端,加上桡骨中段位置表浅,表面为较薄的伸趾肌腹与肌腱移行处,只有少量肌肉覆盖,这些均不利于骨缺损的修复;同时,我们在截骨时连同骨膜一并去除,用骨蜡将骨端髓腔封闭,消除了骨外膜成骨及骨髓腔成骨因素;不作内外固定,使稳定传导机制消除。于术后10周,取材行组织学检查,光镜下见骨断端增生不良,髓腔封闭,有软骨细胞及骨细胞增生,纤维膜覆盖,而缺损区纤维瘢痕组织代替了骨细胞,符合骨不连病理组织学特征;大体标本见骨缺损区为纤维瘢痕组织填充,无骨性连接,存在骨的异常活动,骨端硬化,髓腔封闭,两侧断端有少量骨痂形成,与骨不连的临床表现一致;照X线片,见骨缺损区无骨性连接,断端硬化,髓腔封闭,两侧断端有少量骨痂形成,符合骨不连X线表现。上述表现,说明骨不连确定无疑。因此,本实验的造模方法符合骨不连的要求,反映了骨不连的一般特征,是可靠而实用的。

3.3 骨不连模型的意义

骨不连的治疗,至今仍是一个难题,人们对此作了许多研究。有采用物理方法,如体外冲击波、磁场体外诱导等,但其作用机制仍在研究之中;有使用药物治疗,特别是中药的临床使用,尽管有许多临床病例说明其有效性,但仍未找到其确切的作用原理;手术方法也在不断地探索,骨外固定技术多采用骨断端间的加压结合延长或骨节段延长移位;骨内固定技术则强调固定的有效性以及修复材料(骨材料,骨替代材料)在缺损区的运用。最佳的修复材料,仍然是自体骨的移植以及同种异体骨的运用,但受到一定条件的限制;自1965年Urist发现骨形态蛋白(BMPs)这一具有骨诱导活性的局部生长因子,对其研究不断深入,目前已达其亚型的基因克隆、体外重组表达。但是BMPs的骨诱导活性作用与其在局部的浓度和缓放过程是否适当,以及与其它相关因素协同作用密切相关,人们把注意力集中在与其复合的骨替代材料的研究和临床应

Johnson^[4]指出实验性骨不连需要在一些不利

(下转第335页 to page 335)

养4 d后,见SD/-Trp平板上长出白色菌落。将阳性酵母克隆的质粒DNA转化大肠杆菌中放大并行酶切鉴定,结果切下特异的MIF cDNA片段,说明pGBKT7-MIF已导入酵母AH109。将已转化pGBKT7-MIF的酵母AH109分别划在含X- α -Gal的SD/-Trp和SD/-Trp-His平板上。30 $^{\circ}$ C培养5 d,在SD/-Trp平板上长出菌落呈白色;在SD/-Trp-His平板上,无菌落生长,说明MIF未能激活MEL1和HIS3报告基因,无自身转录激活活性。

3 讨论

最早发现MIF是由激活的T淋巴细胞分泌的细胞因子,具有抑制巨噬细胞游走移动,吸引巨噬细胞在迟发型变态反应中浸润、聚集的作用。近年发现,除了激活的T淋巴细胞外,机体许多组织细胞也可产生MIF,如脑垂体前叶,单核巨噬细胞,肾小管上皮细胞,肝细胞及血管内皮细胞等^{2,3}。林曙光等⁴首次报道在动脉粥样硬化过程中,由血管内皮细胞(VECs)和平滑肌细胞(SMCs)分泌的MIF显著升高,推测MIF在巨噬细胞粘连、内皮下移行、聚集及转化为泡沫细胞过程中发挥作用,进而引发并加速动脉粥样硬化过程。因此,认识MIF

受体的分子结构及功能,将为研究MIF发挥生物学功能的信号转导途径,为阐明MIF在动脉粥样硬化及炎症和免疫反应中的作用创造条件。

酵母双杂交系统是研究蛋白质-蛋白质相互作用的强有力工具,它可在体内进行蛋白质-蛋白质相互作用的检测并分析其亲合性。本研究构建了穿梭质粒pGBKT7-MIF并成功转化酵母菌AH109,为下一步从预制的人心脏酵母cDNA文库中筛选MIF受体打下了基础。

参考文献:

- [1] Gietz D, St Jean A, Woods R A, *et al.* Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells [J]. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20(6): 1425.
- [2] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell R A, *et al.* The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor [J]. *J Exp Med.* 1994, 179(6): 1895.
- [3] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell R A, *et al.* MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia [J]. *Nature* 1993, 365(6448): 756.
- [4] Lin S G, Yu X Y, Chen Y X, *et al.* De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherosclerosis in rabbits [J]. *Circ Res.* 2000, 87(12): 1202.

(编辑 黄小延)

(上接第332页 from page 332)

用上,文献^{5,6}报道取得令人满意的进展。但是,在评价某一骨替代材料的作用时,我们首先应认识到自体骨修复能力与骨缺损大小有关,当骨缺损较小时,不需植入任何材料,缺损也可自行愈合,在这种情况下,评价某一种骨替代材料的成骨能力是没有任何意义的⁷。Schmitz^[8]将动物体内终生不能自行修复的最小骨缺损定义为临界骨缺损(critical size defect CSD),在动物CSD模型中其骨缺损区应为纤维性愈合而不能达到骨性愈合;因此,建立一个符合这样条件的动物骨不连模型,在一致的标准下来探讨物理方法、药物治疗的机制,检验手术方式的有效性,评价骨替代材料在骨缺损修复中所起的作用才有其客观性和实际意义,本实验为此提供一个可靠的动物骨不连模型。

(本文图1~4见插页1。 Fig. 1~4 Shown in back coloured page 1)

参考文献:

- [1] Orthop. 1998, (355 suppl): s56.
- [2] 张永刚,卢世壁,王继芳. 利用隔膜技术探讨骨折不愈合原因 [J]. *中华骨科杂志*, 1998, 18(11): 678.
- [3] Peter C P, Cook W O. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs [J]. *J Orthop Res.* 1996, 14(1): 74.
- [4] Johnson E E, Urist M R, Schmalzried T P, *et al.* Autogenic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs [J]. *Clin Orthop.* 1989, (243): 245.
- [5] 侯劲松,黄洪章,李祖兵. 引导骨再生膜复合自体骨移植促进兔下颌骨缺损修复 [J]. *中华医学杂志*, 2000, 21(4): 268.
- [6] 吴成如,董英海,高学纯. 自体外周血干细胞与脱钙骨复合移植治疗兔桡骨缺损的实验研究 [J]. *中华外科杂志*, 2001, 39(2): 144.
- [7] Heckman J D, Ehler W, Brooks B P, *et al.* Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer [J]. *J Bone Joint Surg Am.* 1999, 81(12): 1717.
- [8] Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniofacial nonunions [J]. *Clin Orthop.* 1986 (205): 299.

(编辑 张恩健)

[1] Nunamaker D M. Experimental models of fracture repair [J]. *Clin*

实验性骨不连模型的制作 (正文见第 331 页)

Establishment of an Animal Model for Experimental Study of Bone Nonunion (Text in page 331)

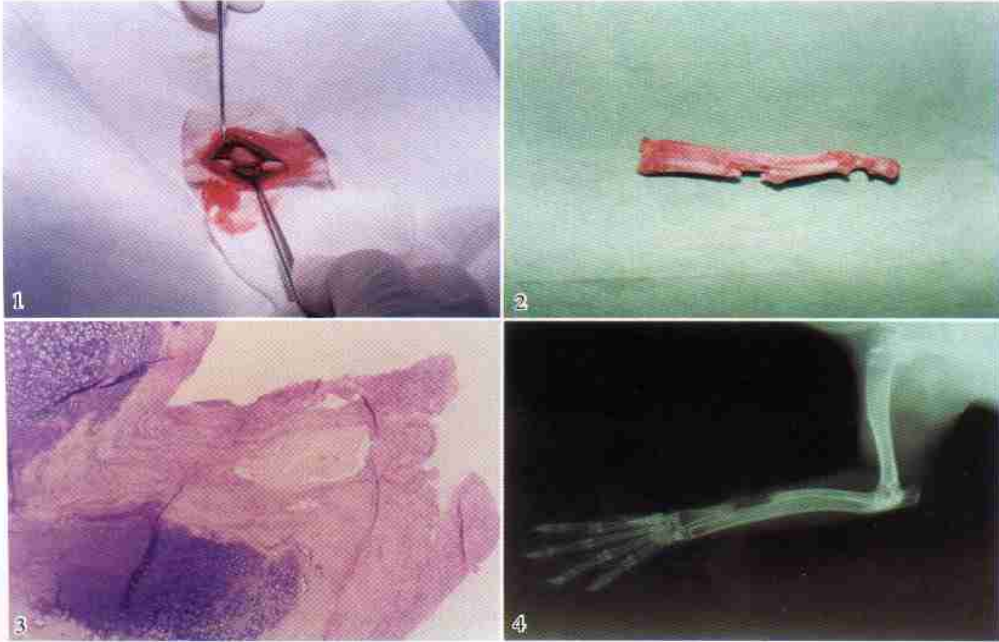


图 1 造模方法

图 2 大体标本观察: 骨缺损区为纤维瘢痕组织填充, 无骨性连接, 骨端硬化, 髓腔闭塞, 两侧断端有少量骨痂形成

图 3 病理组织学检查: 光镜下骨断端存在无序排列的软骨细胞及骨细胞, 缺损区为纤维瘢痕组织充填。HE 40

图 4 放射学检查: 骨缺损区无骨性连接, 断端硬化, 髓腔封闭, 两侧断端有少量不规则骨痂形成

Fig. 1 The methods of manufacture model

Fig. 2 Gross observation: the bone defect was filled by fiber scar tissue, no bone tissue, the bone end was sclerosis, and the bone marrow cavity was sealed. There were very few callus at the bone end

Fig. 3 histological examination: the bone end had cartilage and bone cells, the cells were disorder; the bone defect was filled by fiber scar tissue. HE 40

Fig. 4 X-ray examination: the bone defect had not bone tissue: the bone end was sclerosis, and the bone marrow cavity was sealed

牛 pcDNA₃-bFGF 真核表达重组体的构建与鉴定 (正文见第 336 页)

Construction and Identification of Bovine pcDNA₃-bFGF Eukaryotic Expression Recombinant (Text in page 336)

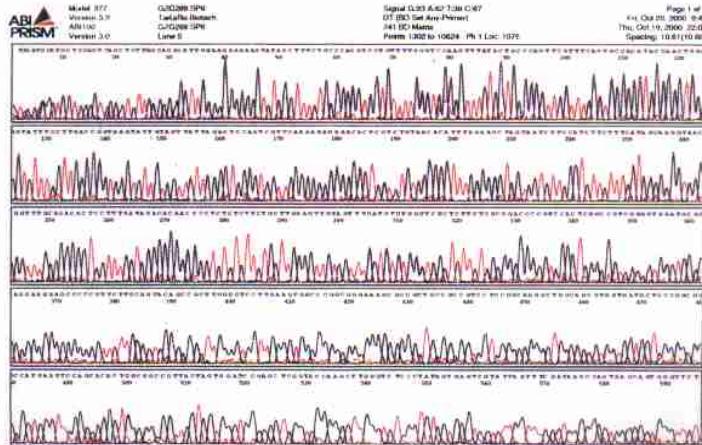


图 3 pcDNA₃-bFGF 插入片段序列测定

Fig. 3 Sequence analysis of pc DNA₃-bFGF insertion fragment