

大鼠股骨髁临界性骨缺损模型制备及临界值

陈仁杰^{1,2}, 于腾波^{2*}

¹青岛大学青岛医学院, 山东 青岛

²青岛大学运动与康复研究院, 山东 青岛

收稿日期: 2023年3月11日; 录用日期: 2023年4月7日; 发布日期: 2023年4月14日

摘要

目的: 建立不同尺寸的大鼠股骨髁骨缺损模型, 并明确大鼠的股骨髁缺损模型的临界值。方法: 8周雄性SD大鼠20只, 随机数字表法分为4组, 每组各5只, 分别在建立股骨髁骨缺损模型, 缺损直径分别为2, 3, 3.5, 4 mm, 深度均为4 mm, 每只大鼠均双侧手术, 每组共10侧。在术后28天(4周)进行Micro-CT扫描, 并进行三维重建进行观察, 并采用CT-Hedberg评分来评价骨缺损的愈合情况。结果: 术后无动物死亡, 缺损直径为4 mm组大鼠有2只共4侧在手术中出现股骨髁骨折; 术后4周大体观察: 直径2 mm组缺损处新生组织填充较多, 未见明显凹陷; 直径3 mm组缺损处可见部分新生组织填充, 有较明显凹陷; 直径3.5 mm组缺损处少量新生组织填充, 可见明显凹陷; 直径4 mm组股骨髁缺损处可见骨折, 均出现骨折移位或骨折块脱落, 关节周围骨赘形成。CT-Hedberg评分显示, 术后4周时, 直径2 mm组评分显著高于3 mm组($P < 0.05$), 直径3 mm组评分显著高于直径3.5 mm组($P < 0.05$), 直径4 mm组评分最低。结论: 当股骨髁缺损直径大于3.5 mm时, 骨缺损难以自行愈合, 而缺损直径在3.5 mm以下时, 股骨髁缺损处可自行愈合, 因此直径3.5 mm为大鼠股骨髁临界骨缺损值。

关键词

大鼠, 股骨髁, 临界骨缺损, 动物模型

Preparation and Critical Value of Critical Bone Defect Model of Femoral Condyle in Rats

Renjie Chen^{1,2}, Tengbo Yu^{2*}

¹Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

²Institute of Sports and Rehabilitation, Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Mar. 11th, 2023; accepted: Apr. 7th, 2023; published: Apr. 14th, 2023

*通讯作者。

Abstract

Objective: To establish rat models of femoral condylar defect with different sizes and determine the critical value of the model. **Methods:** Twenty eight-week male SD rats were randomly divided into four groups with five in each group by random number table method. The models of femoral condylar bone defects were respectively established, with the diameter of 2, 3, 3.5, 4 mm and depth of 4 mm. Each rat was operated bilaterally, with a total of 10 sides in each group. Micro-CT scanning and three-dimensional reconstruction were performed 28 days (4 weeks) after operation, and the healing of bone defects was evaluated by CT-Hedberg score. **Results:** There was no animal death after the operation. In the group with defect diameter of 4 mm, 2 rats (4 sides in total) had femoral condylar fracture during the operation; The gross observation at 4 weeks after operation showed that the defect in the 2 mm diameter group was filled with more new tissue, and no obvious depression was found; In the 3 mm diameter group, part of the defect was filled with new tissue with obvious depression; In the 3.5 mm diameter group, the defect was filled with a small amount of new tissue and obvious depression was visible; Fracture can be seen at the defect of femoral condyle in the 4 mm diameter group, with fracture displacement or fracture block falling off, and osteophyte formation around the joint. The CT-Hedberg score showed that at 4 weeks after operation, the score of the 2 mm diameter group was significantly higher than that of the 3 mm diameter group ($P < 0.05$), the score of the 3 mm diameter group was significantly higher than that of the 3.5 mm diameter group ($P < 0.05$), and the score of the 4 mm diameter group was the lowest. **Conclusion:** When the diameter of the femoral condyle defect is greater than 3.5 mm, the bone defect is difficult to heal itself, while when the diameter of the defect is less than 3.5 mm; the femoral condyle defect can heal itself, so the diameter of 3.5 mm is the critical bone defect value of the rat femoral condyle.

Keywords

Rats, Femoral Condyle, Critical Bone Defect, Animal Model

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

骨缺损为临床中常见的问题, 骨组织工程为组织工程领域的重要部分, 其目的就是将先进骨组织工程材料填充与骨缺损处, 诱导或促进骨的再生。动物模型验证是验证骨组织工程修复材料的重要环节, 可以较为客观准确评价其对骨缺损的修复能力[1]; 因此, 选择一种合适的骨缺损动物模型对材料的评价尤为重要。目前用作骨缺损模型动物有大鼠、兔、狗、羊等, 由于动物成本以及饲养场所的限制, 大鼠为目前最常用的骨缺损模型动物[2] [3]。

常用的大鼠骨缺损模型包括颅骨缺损模型[4], 股骨干缺损模型及股骨髁缺损模型[5]。大鼠股骨髁缺损模型被研究人员广泛应用于骨组织工程材料的评价。但目前对于大鼠股骨髁缺损模型的直径尚无统一标准, 多采用圆柱形骨缺损, 直径分布在 2~4 mm, 深度分布在 3~5 mm [6]-[11]。所以本文对标准大鼠股骨髁缺损模型的尺寸进行了探究。本实验构建了尺寸不同的大鼠股骨髁缺损模型, 并通过大体观察以及影像学评价来评估缺损的愈合情况, 得出适宜的股骨髁缺损造模尺寸, 为大鼠股骨髁缺损模型提供了数据支持。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

2.1.1. 大鼠

选取 8 周龄雄性 SD 大鼠, 体重为 250~300 g, 购自青岛大学实验动物中心。大鼠饲养室内温度维持在 20℃~25℃, 相对湿度适宜, 电子开关控制照明 12 小时昼夜循环, 自由摄取食水。

2.1.2. 实验用物品及仪器

1%戊巴比妥钠注射液(深圳瑞沃德生命科技有限公司), 注射用青霉素钠(江西科达动物药业有限公司), 常规手术器械(上海金钟手术器械公司), 高速磨钻及钻头(深圳瑞沃德生命科技有限公司), 小动物 CT 成像系统(PerkinElmer)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 动物分组

20 只雄性 8 周龄 SD 大鼠, 按照随机数字表法分为 4 组, 骨缺损直径依次为 2, 3, 3.5, 4 mm, 造模深度均为 4 mm, 每组各 5 只, 双侧造模, 每组共 10 侧。

2.2.2. 模型制备

参考王青等报道的方法制备大鼠股骨髁缺损模型[9]。使用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠, 通过大鼠后肢肌张力判断麻醉效果, 待麻醉生效后, 大鼠双侧后肢术区备皮, 固定于动物实验台上, 术区常规消毒铺巾, 在大鼠膝关节内侧作一 1 cm 纵行切口, 逐层分离皮下组织、筋膜、骨膜, 暴露股骨内侧髁, 在内侧髁几何中心处使用高速电钻垂直于骨面造模, 造模时自直径 1 mm 钻头开始, 从小大大更换钻头造模, 按照分组制备直径分别为 2, 3, 3.5, 4 mm, 深度为 4 mm 圆柱状骨缺损。见图 1, 图 2。依次使用稀碘伏水、生理盐水冲洗术区, 确切止血后使用 4-0 手术缝线逐层缝合, 缝合后碘伏消毒伤口, 辅料包扎。术后单笼饲养, 自由摄食进水, 术后即刻注射青霉素 80 万单位, 连续注射青霉素 3 天, 预防感染。

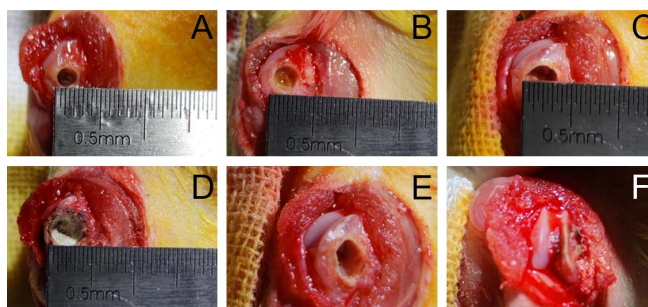


图 A、B、C、D 依次为直径 2 mm、3 mm、3.5 mm 以及 4 mm 的造模后照片, 图 E、F 为侧面观。

Figure 1. Modeling photo of femoral condyle bone defect

图 1. 股骨髁骨缺损造模照片

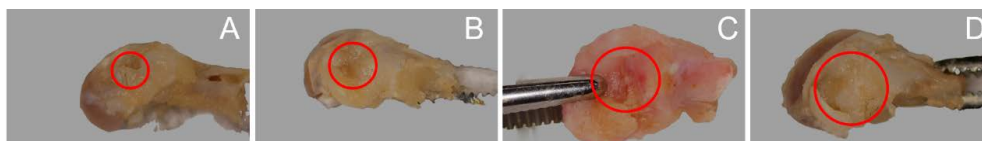


图 A、B、C、D 依次为直径 2 mm、3 mm、3.5 mm 以及 4 mm 的造模后 4 周大体照片, 其中红色圆圈圈出的为造模区域。

Figure 2. Gross photographs of the specimens were obtained at 4 weeks after modeling

图 2. 造模后 4 周获取标本的大体照片

2.2.3. 大体观察

术后每日观察大鼠状态, 及时补充食水, 观察大鼠伤口愈合情况, 观察有无切口开裂、切口感染等。术后 4 周过量麻醉处死动物, 获取股骨髁缺损样本, 大体观察新生组织填充及骨缺损修复情况。

2.2.4. MicroCT 观察

术后 4 周过量麻醉处死大鼠后, 获取大鼠股骨髁标本, 进行 MicroCT 扫描及三维重建观察。工作电压为 50 kV, 工作电流为 100 μ A, 扫描层厚为 36 μ m。分析软件划分感兴趣区后使用 CT 值测量新生骨量, 按照 CT-Hedberg 评分标准进行评分[12]。

2.2.5. 统计学分析

使用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行分析, 每两组间使用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示两组间具有统计学差异。

3. 结果

3.1. 一般情况

术后 1 天大鼠均恢复清醒, 术后前 3 天活动较少, 可正常进食饮水, 术后 1 周后活动正常, 切口均愈合良好, 术后 2 周左右手术缝线自行脱落, 术后 4 周术区未见瘢痕。

3.2. 大体观察

术后 4 周获取大鼠股骨髁大体标本, 直径 2 mm 组缺损处新生组织填充较多, 未见明显凹陷; 直径 3 mm 组缺损处可见部分新生组织填充, 有较明显凹陷; 直径 3.5 mm 组缺损处少量新生组织填充, 可见明显凹陷; 直径 4 mm 组股骨髁缺损处可见骨折, 均出现骨折移位或骨折块脱落, 关节周围骨赘形成。见图 2。

3.3. MicroCT 三维重建观察

术后 4 周, 获取大鼠股骨髁大体标本后进行扫描并重建。直径 2 mm 组缺损区域明显减小, 有明显新生骨长入; 直径 3 mm 组缺损区域减小, 可见部分新生骨; 直径 3.5 mm 组缺损区域略有减小, 少量新生骨长入; 直径 4 mm 缺损组股骨髁破坏, 股骨髁形态差, 骨折碎片脱落, 且有骨赘形成。见图 3。

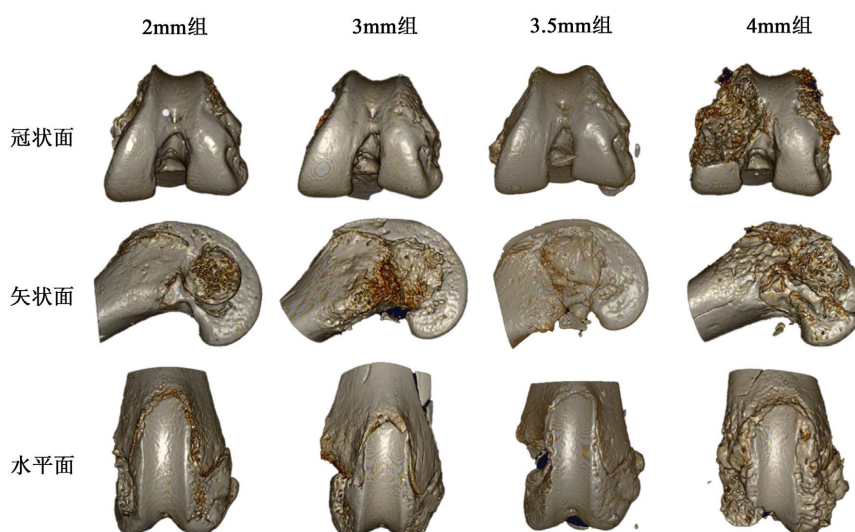


Figure 3. Micro CT three-dimensional reconstruction images of each group at 4 weeks after modeling
图 3. 造模后 4 周各组的 Micro CT 三维重建图像

CT-Hedberg 评分示: 术后 4 周时, 直径 2 mm 组评分显著高于 3 mm 组($P < 0.001$), 直径 3 mm 组评分显著高于直径 3.5 mm 组($P < 0.001$), 直径 4 mm 组评分最低。见图 4。

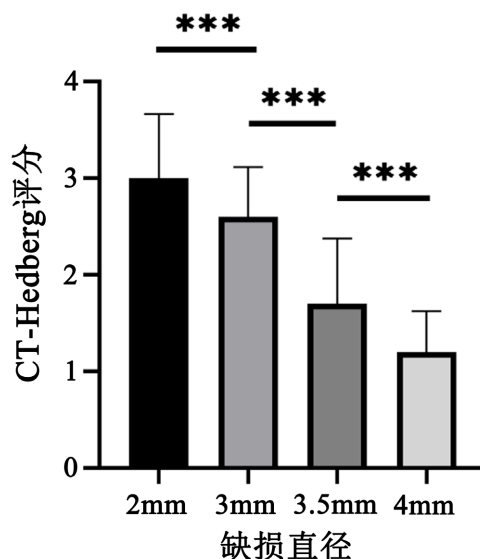


Figure 4. The CT scores of each group were scored at 4 weeks after modeling
图 4. 造模后 4 周各组 CT 评分

4. 讨论

随着科技的发展与进步, 工厂挤压伤、车祸伤等各种高能量损伤的外伤病人逐渐增多, 导致越来越多的病人出现严重的骨折, 进而出现大段甚至临界骨缺损, 外科技的发展也导致了许多的医源性骨缺损的发生。临界骨缺损是指在无外部干预的自然条件下无法自行愈合的骨缺损[13], 骨缺损是常困扰骨科大夫的手术并发症之一, 目前常用的处理方法主要是自体骨移植、人工骨填充以及骨延长、骨搬运技术等[14] [15], 但目前常用的技术仍存在医源性损伤、花费较高、术后护理不便等问题; 自体骨移植常取自体髂骨作为移植物, 需在髂前上嵴处做取骨切口, 给患者带来额外痛苦; 人工骨是一种价格高昂的骨缺损填充材料, 给患者带来较大的经济负担; 而骨延长、骨搬运技术一般需要患者进行外固定架固定, 术后护理不便, 且患者后续需要再次或者多次手术, 造成较大的心理、经济负担。

近年来, 随着组织工程技术的发展, 各种应用于骨缺损修复的人工材料研究如火如荼, 目前最常用的动物模型为大鼠的颅骨缺损模型, 其主要优点是模型动物易于麻醉及操作, 价格较低, 饲养方便。但该模型也有明显缺点, 大鼠颅骨的厚度较薄, 只有一毫米左右, 无法模仿临界立体骨缺损, 应用于该模型的骨缺损修复材料也有限制, 只可以应用水凝胶、薄膜等材料, 不适用于体积较大的立体材料[4] [15]。因此部分研究者选择使用大鼠股骨髁骨缺损模型进行研究, 但对于骨缺损造模尺寸的大小尚无统一标准, 直径分布在 2~4 mm, 深度分布在 3~5 mm 之间; 因此建立大鼠股骨髁临界骨缺损的标准是很有意义的。

本研究中, 直径 3.5 mm, 深度为 4 mm 被认为是大鼠股骨髁临界骨缺损的值, 当直径小于该值时, 骨缺损部位产生了愈合现象, 当缺损直径大于该值时, 出现了股骨髁的骨折, 这可能与大鼠造模术后未限制其活动有关, 缺损处周围骨质薄弱, 活动造成了股骨髁的骨折, 破坏了骨缺损处的形态, 因此 4 mm 直径的骨缺损不适宜用于构建大鼠股骨髁临界骨缺损模型。

本研究存在着部分局限性, 比如观察时间较短, 未对动物模型骨缺损愈合进行较长时间的观察评估, 评价手段较为单一, 未进行组织病理学的观察比较, 在后面的工作中, 我们将进一步完成这部分内容。

参考文献

- [1] 何通文, 徐庚池, 韩耀辉, 等. 构建兔颅顶骨临界骨缺损模型: 确立颅顶临界骨缺损的参考值[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(18): 2789-2794.
- [2] 卢嘉蕊, 权晶晶. 骨缺损动物模型的研究进展[J]. 口腔医学研究, 2021, 37(9): 783-786.
- [3] McGovern, J.A., McGovern, M. and Hutmacher, D.W. (2018) Animal Models for Bone Tissue Engineering and Modelling Disease. *Disease Models & Mechanisms*, **11**, Article ID: Dmm033084. <https://doi.org/10.1242/dmm.033084>
- [4] Liu, G., Guo, Y., Zhang, L., et al. (2019) A Standardized Rat Burr Hole Defect Model to Study Maxillofacial Bone Regeneration. *Acta Biomaterialia*, **86**, 450-464. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.049>
- [5] Mahon, O.R., Browe, D.C., Gonzalez-Fernandez, T., et al. (2020) Nano-Particle Mediated M2 Macrophage Polarization Enhances Bone Formation and Msc Osteogenesis in an IL-10 Dependent Manner. *Biomaterials*, **239**, Article ID: 119833. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119833>
- [6] Chen, Z., Yan, X., Yin, S., et al. (2020) Influence of the Pore Size and Porosity of Selective Laser Melted Ti6Al4V ELI Porous Scaffold on Cell Proliferation, Osteogenesis and Bone Ingrowth. *Materials Science and Engineering: C*, **106**, Article ID: 110289. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110289>
- [7] 宋会平, 李琪佳, 李宝兴, 王志强. 组织工程骨促进大鼠骨缺损修复的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(10): 1250-1253.
- [8] 张亚男, 肖鹏, 孙瑞, 等. WE43 镁合金骨植入对大鼠血液指标、脏器组织学的影响及其体内降解情况[J]. 广西医学, 2022, 44(14): 1624-1628, 1635.
- [9] 王青, 王伟, 姜达君, 贾伟涛. 钙磷涂层的 JDBM 镁合金多孔支架促进血管新生及骨缺损修复的效果评估[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(6): 732-740.
- [10] 张志明, 刘椿, 伍国锋, 等. 外周血间充质干细胞联合可吸收明胶海绵-自聚合肽修复大鼠股骨髁缺损[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(6): 924-928, 932.
- [11] 马翰斐, 赖俊成, 汪清华, 等. 快速成型技术构建胶原丝素仿生骨支架治疗大鼠股骨髁缺损[J]. 临床骨科杂志, 2018, 21(1): 117-120.
- [12] 徐石庄, 王进, 潘文振, 等. 兔股骨髁临界性骨缺损动物模型制备及临界骨缺损值[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(20): 3191-3195.
- [13] Schmitz, J.P. and Hollinger, J.O. (1986) The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **205**, 299-308. <https://doi.org/10.1097/00003086-198604000-00036>
- [14] Zhu, Y.-L., Guo, B.-F., Zang, J.-C., et al. (2022) Ilizarov Technology in China: A Historic Review of Thirty-One Years. *International Orthopaedics*, **46**, 661-668. <https://doi.org/10.1007/s00264-021-05238-4>
- [15] Myeroff, C. and Archdeacon, M. (2011) Autogenous Bone Graft: Donor Sites and Techniques. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, **93**, 2227-2236. <https://doi.org/10.2106/JBJS.J.01513>