文章编号:1000-5404(2007)04-0287-03

论著

半环槽外固定器建立山羊胫骨缺损模型

简月奎,杨 柳,李起鸿,刘 雷,高春阳 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探索半环槽外固定器建立山羊胫骨段缺损模型。**方法** 山羊9只分3组,制备胫骨中下段20%的骨膜和骨缺损,半环槽外固定器外固定,术后第5、10、15周分别处死1组动物。用放射学、组织学方法评价骨缺损修复情况。**结果** 术后山羊胫骨段缺损处固定稳定,5、10、15周骨缺损处未见骨修复,15周时见骨断端硬化,放射学和组织学检查未见骨形成。**结论** 应用半环槽外固定器建立组织工程用大段骨缺损动物模型效果较好,山羊胫骨20%的骨膜和骨缺损不能自行修复。

关键词:半环槽外固定器;山羊;骨缺损;模型
中图法分类号:R-332;R683.42;R687.1 **文献标识码**:A

Construction of goat tibial diaphyseal defect model by half-ring sulcated external fixator

JIAN Yue-kui, YANG Liu, LI Qi-hong, LIU Lei, GAO Chun-yang (Center for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct goat tibial diaphyseal defect model by using half-ring sulcated external fixator. **Methods** Nine goats were divided into three groups. The 20 percent single tibial diaphyseal defect of every goat was made and fixed with half-ring sulcated external fixator. Animals in each group were killed respectively at 5th, 10th, 15th week postoperatively. Bone formation was evaluated by X-ray and histology. **Results** The fixity was stable in goat tibial diaphyseal defect. No bone repair was found at the 5th, 10th, 15th week postoperatively and sclerization at the broken ends of the fractured bone was observed at the 15th week postoperatively but no bone formation was found. **Conclusion** Half-ring sulcated external fixator is a fair apparatus in constructing long bone defect model for tissue engineering repairing study and 20 percent goat tibial diaphyseal defect cannot be repaired by itself.

Key words: half-ring sulcated external fixator; goat; bone defect; model

应用组织工程方法修复长骨缺损方兴未艾,但在临床上大于30 mm的长骨缺损用组织工程方法修复是极其困难的[1]。寻找合适的组织工程方法修复长骨大段缺损的动物模型是矫形外科研究的一个重要方面。羊、猪、犬等大动物可在长骨缺损修复实验中造成大段缺损,植入较多的生物材料/种子细胞复合物。而半环槽外固定器在临床上治疗骨缺损、骨延长、骨不连和骨髓炎取得了很好的疗效。本研究目的是探索应用大动物与半环槽外固定器结合建立合适的组织工程修复胫骨大段骨缺损研究动物模型。

基金项目:国家高技术研究发展计划重大攻关课题("863"计划)(2003AA205020) Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020)
作者简介:简月奎(1971-),男,贵州省遵义市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程方面的研究。电话:13102399795, E-mail:jianyuekui01@163.com
通讯作者:李起鸿,电话:(023)65340297
收稿日期:2006-03-22;**修回日期**:2006-04-28

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年山羊9只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,分笼喂养,6~12月龄,体质量20~25 kg。随机分3组,每组3只,每只做单侧胫骨20%段缺损(胫骨中下段截骨长度/胫骨总长度×100%),分别于术后5、10、15周随机处死1只进行摄片及组织学检测。

1.1.2 器械 半环槽外固定器(第三军医大学李起鸿教授研制)、骨元针直径2.5 mm(上海医疗器械公司)。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 动物于术前拍双侧胫骨X线片,摄片时将2块铝尺放于胫骨干横纵侧测量胫骨干长度、中段横径,术后直接测锯下的胫骨横径。

1.2.2 手术方法 所有动物骨缺损模型的制备与外固定相同,操作由同一组人员完成。速眠新0.08 ml/kg与氯胺酮2 mg/kg复合麻醉,术中氯胺酮维持,常规备皮,消毒,铺巾。在

距胫骨上关节面 1.5～2.0 cm 的骨松质同一平面各穿 2 针为第 1 组，两针夹角为 40°[2]。在第 1 组下 3.0～5.0 cm 处与第 1 组任 1 针平行穿 1 针为第 2 组。第 4 组穿针处距胫骨下端关节面 2.0 cm 骨松质处。第 3 组与第 4 组任 1 针平行，但与第 2 组交叉成 40°角，两组相距 3.5～5.0 cm，共 6 针。上半环槽外固定器，所有螺母旋紧。在胫骨前外侧切开皮肤、皮下，钝性分离胫前肌与胫骨间隙，保护胫前血管，游离胫骨中段，骨膜与周围软组织分离，保护周围组织。根据 X 线片得到的胫骨长度，在胫骨中下段中间两组穿针处之间用线锯锯断胫骨和骨膜，造成 20% 骨与骨膜缺损，逐层关闭。测量锯下的胫骨干中下段横径。术后每天检查螺母松紧，定期根据 X 线片观察胫骨两折对位对线情况及时调整。1 周内肌注青霉素 160 万 U/d，常规高蛋白饲料圈养，无异常后放养，自由活动。

1.3 放射学检查

所有动物术后、5、10、15 周均摄手术肢体正侧位 X 线片。肌注速眠新 0.08 ml/kg，麻醉后固定，常规条件摄片。所有 X 线片用骨缺损 Lane-Sandhu X 线评分标准[3]评分，对骨缺损自行修复进行量化分析。

1.4 组织学检查

观察时相点为术后、5、10、15 周。取骨缺损部标本，体积分数 10% 的中性甲醛固定，EDTA 脱钙，乙醇逐级脱水，二甲苯透明，HE 染色。用 Lane-Sandhu 组织学评分法计分标准观察骨缺损自行修复成骨情况。

2 结果

2.1 胫骨长度与横径

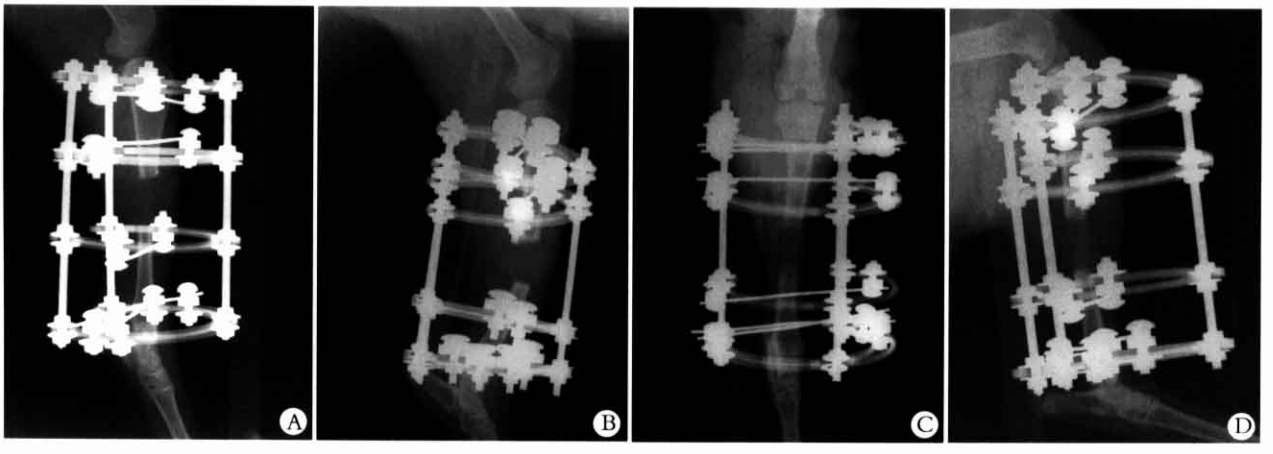
共 18 侧肢体，胫骨长度范围为（138 ± 24）mm、横径（12 ± 1.8）mm。

2.2 一般情况

实验动物除 1 只因术后感染死亡，1 只出现针道感染，已予补充，其余均存活。术后 2～6 h 苏醒，并能站立进食。其余术后切口无感染，螺母松动后及时旋紧，无外固定松动失败，皮肤无坏死。术后 2 d 内伤肢能落地，但不能负重，2 周后可以部分负重，3 周有轻微跛行，4 周后能自由活动，无跛行。

2.3 放射学变化

术后第 1 天摄 X 线片（侧位片）见远近折端平整（图 1A），Lane 评分均为 0 分；术后 5 周所有动物骨缺损处均未见有密度增高，远近折端模糊，有少许骨膜反应（图 1B），Lane 评分均为 0 分；术后 10 周无骨形成，折端有硬化，髓腔开始有闭合迹象，骨缺损处无密度增高（图 1C），Lane 评分 0 分；术后 15 周见骨缺损处与 5、10 周相比无密度增高，折端密度无明显增高，但残端髓腔闭合，残端骨膜反应未加重（图 1D），Lane 评分 0 分。



A：术后第 1 天；B：术后 5 周；C：术后 10 周；D：术后 15 周

图 1 山羊胫骨术后 X 线表现

2.4 组织学改变

术后 5 周远近端切片有新生骨痂出现，量少，不规则，骨缺损处切片见大量结缔组织，未见骨样组织形成，Lane 评分均为 0 分；术后 10 周折端骨痂量增多，骨痂内有骨小梁形成，骨缺损处仍充填大量结缔组织，无骨组织形成，Lane 评分均为 0 分；术后 15 周折端骨小梁减少，有密质骨形成，骨缺损处结缔组织致密，无骨组织，Lane 评分均为 0 分。

3 讨论

长骨段缺损修复的组织工程研究动物模型有兔、犬、猪、猴、羊等。与其他动物相比，山羊易训练，性情温顺，易喂养，体形大，四肢骨较长；来源不受限制，价格较猴便宜；山羊股骨与胫骨都可以用作骨缺损模型，胫骨更符合要求，临床上骨缺损常伴有周围软组织损伤，血供不充分，这就决定骨缺损模型不宜在局部血供丰富的股骨制备。山羊胫骨下段有 1/3 无肌肉包围，直接位于皮下，中下段达到 1/2～2/3[4]，是比较合适的部位。山羊性成熟为 6 个月，繁殖适龄期为 1 岁半。选择 6～12 月龄山羊，与临床胫骨骨缺损病例多为青壮年一致。太小与临床病例不符，太大喂养时间较长骨缺损生长较慢。山羊颈静脉、下肢静脉浅表而粗大，

易采血，在血清学诊断、免疫学检测等方面较为方便[5]。综合比较，山羊是胫骨缺损研究的较好模型。临床上骨缺损、骨不连、骨髓炎的治疗多采用内或外固定。带锁髓内钉固定除了感染、植入物断裂、术中骨折和脂肪栓塞等并发症以处，骨损部位被植入物填充，植入骨组织工程复合物少。AO(Arbeit fur Osteosyntes)技术固定易产生应力遮挡效应，使骨折端失去了正常的生理性刺激而导致骨质疏松、骨萎缩和再骨折等。单边外固定器易出现关节屈曲功能障碍、成角畸形和针道感染等。半环槽式外固定器属于骨外固定器的一种，结构相对简单，多平面式固定，固定牢靠。与内固定器材相比对骨膜剥离少，对软组织破坏较小，固定后易痊愈；根据受试目的的不同，可对骨缺损部位进行加压固定、弹性固定等[6]。对于构建骨组织工程动物模型来说，植骨量或充填生物材料/种子细胞复合物较大，外固定器不占用相对较小的胫骨缺损模型空间，对于成骨及其成骨量的检测更为直观。所以应用半环槽外固定器构建山羊骨缺损模型有其特有的优势。

与临床半环槽外固定器应用相比，在山羊胫骨缺损固定中有以下特点：缺损上下端均用双半环，最好不用单半环固定，因山羊管理较人困难，易造成成角或侧方移位；缺损近端两半环与远端两半环相距应尽量长，两近端半环与远端半环之间相距尽量靠近；半环缺口在固定缺损时要朝后，否则半环易擦伤对侧小腿造成皮肤损伤。同一平面两针之间夹角宜偏大，否则上环时较困难，且术后摄片时螺杆、螺母、半环成像易与缺损部位重合，造成X线片效果不佳；摄片时多采用侧位片或斜位，正位因中间部位螺杆与骨缺损部影像重合而不便观察；术后换药，肌注抗生素时间相对要长一些。

排除全身性疾病、营养和局部感染等原因，骨缺损能否自行愈合首先是由缺损长度决定的，Schmitz 等[7]总结实验动物不能自愈的骨缺损模型，得出不能自愈的临界值为长度的1/10以上。山羊胫骨骨缺损制备的长度报道不一，根据羊种属、研究目的等不同有30～50 mm[8]。因为还要考虑到羊的年龄与个体大小及固定因素等。有的山羊体形较大，体质量较重，胫骨较长。胫骨长度范围为(138±24) mm、横径(12±1.8) mm，采用6～12月龄、体质量20～25 kg山羊，在胫骨中段距胫骨结节57.0～62.5 mm处制备20%骨与骨膜缺损。术后15周内的X线与组织学检查都证实20%缺损对于山羊是不能自行愈合的，15周后髓腔几近闭合，更无愈合的可能。目前羊胫骨多长骨缺损不能自行愈合，尚少见文献报道，采用较大长度固然可以，但缺损长度增加将带来固定困难等一系列问题。本实验采用胫骨长度的20%，不采用15、30 mm，排除了因山羊个体差异导致骨缺损占胫骨长度百分比不同，相同长度缺损在大体形山羊胫骨所占比例小，较易愈合，反之亦然。另一方面，比较山羊胫骨平均长度及杨柳等[9]对山羊胫骨不同缺损长度的肢体远端血流影响与外固定方法的选择来确定的。胫骨长度范围为(138±24) mm，其20%远大于Schmitz等[7]总结实验动物不能自愈的骨缺损模型临界值为长度的1/10的标准。大体动物实验存在着动物个体差异大，影响因素多等不足。又由于羊胫骨中段无明显的骨性标志，且腓骨缺如，先截骨后固定很容易发生旋转与分离、短缩移位，且上外固定架困难。本实验先在完整胫骨上好外固定架，半旋紧各螺母，后截骨，最后完全旋紧，则较容易。术后感染率较高，可能与穿针部位暴露及山羊术后喂养过程中环境条件易感染有关，与临床上骨外固定针道感染并发症较高一致[10]。

本实验模型确定了半环槽外固定架在山羊胫骨缺损模型的一般情况、操作细节，尽可能的减少了误差，具有可操作性、可重复性，是检验骨组织工程中生物材料/种子细胞复合物成骨能力较好的模型，值得在犬、猪或猿等大动物的长骨骨缺损实验研究中推广运用。

参考文献：

[1] Li X, Feng Q, Liu X, *et al*. Collagen-based implants reinforced by chitin fibres in a goat shank bone defect model[J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1917－1923.

[2] 李起鸿，曾宪政，区伯平，等. 半环槽式外固定器的研制与临床应用[J]. 中华骨科杂志，1984，4(6)：332－336.

[3] Lane J M, Sandhu H S. Current approaches to experimental bone grafting[J]. Orthop Clin North Am, 1987, 18(2): 213－225.

[4] 王　珂，裴国献，陈　滨，等. 组织工程用山羊胫骨骨缺损模型的制备[J]. 中国矫形外科杂志，2002，9(7)：664－666.

[5] 魏　泓. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社，1998：239.

[6] 李起鸿. 骨外固定原理与临床应用[M]. 成都：四川科学技术出版社，1992：12－13.

[7] Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions[J]. Clin Orthop Relat Res, 1986, (205): 299－308.

[8] Den-Boer F C, Patka P, Bakker F C, *et al*. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry[J]. J Orthop Res, 1999, 17(5): 654－660.

[9] 杨　柳，李起鸿，周仲安. 骨外固定治疗长骨缺损对肢体血液循环影响的实验研究[J]. 中华外科杂志，2000，38(2)：145－147.

[10] 李起鸿. 骨外固定技术临床应用中的几个问题[J]. 中华骨科杂志，1996，16(10)：604.

(编辑　陈聪连)