论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0404-04

小鼠胫骨稳定性骨折模型制作及评价

温 轩,谢杨丽,苏 楠,陈思宇,罗凤涛,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,骨代谢修复中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 建立稳定的小鼠稳定性胫骨骨折模型。**方法** 通过骨髓穿钢针的方法,建立了小鼠稳定性胫骨骨折模型,取建模后7、14、21 d 3个时间点小鼠,其中每个时间点6只,分别通过X线片、Micro CT以及病理切片来分析骨折愈合中骨痂大小变化及骨痂中细胞类型以评估骨折愈合过程。**结果** 本实验建立的小鼠胫骨稳定性骨折模型愈合,骨折后7 d骨折断端存在极少量软骨痂,基本由未分化间充质细胞构成;第14天软骨痂开始钙化,骨痂中存在大量肥大软骨细胞;第21天骨折已基本愈合,新生骨形成,含有大量成骨细胞及骨细胞。**结论** 通过本方法所制作的骨折模型愈合过程良好,与临床的骨折愈合过程类似,能更客观地观察骨折愈合过程。

[关键词] 胫骨骨折;稳定性;小鼠;骨折愈合

[中图法分类号] R-332; R683.42 [文献标志码] A

Preparation and evaluation of mouse model of stable tibial fracture

Wen Xuan, Xie Yangli, Su Nan, Chen Siyu, Luo Fengtao, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Laboratory of Trauma, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a mouse model of stable tibial fracture and observe the procedure of fracture healing. **Methods** A total of 24 C57BL/6J mice at an age of 6 to 8 weeks and weighing 18 to 25 g were randomly divided into sham-operation group, and 3 groups of tibial fracture for 7, 14 and 21 d ($n=6$). After all mice were anesthetized with 10% sodium pentobarbital at 1 mL/kg, and cut an incision of 0.5 cm, the mice from the later 3 groups had their tibial shaft cut and then fixed with intramedullary nail. X-ray radiology and micro-CT scanning were used to observe the healing in 7, 14 and 21 d after the operation. Histological analysis was also used to observe the morphological changes of the healing. **Results** A mouse model of stable tibial fracture was established. At day 7 after fracture, there were few cartilage calluses at the fracture site, which were mainly composed of undifferentiated mesenchymal cells. At day 14 after fracture, cartilage callus was mainly composed with hypertrophy chondrocytes and began to calcify. At day 21 after fracture, the cartilage had disappeared and new bone formed, which contained a lot of osteoblasts and osteocytes. **Conclusion** A mouse model of stable tibial fracture is established successfully, whose healing process is similar to the process of clinical fracture healing. This model may be more suitable to study fracture healing.

[**Key words**] tibial fracture; stabilized; mouse; fracture healing

Supported by the National Basic Research Program (973 program, 2011CB964701), the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA1468), and the Autonomous Research Project of State Key Laboratory (SKLZZ201017). Corresponding author: Chen Lin, Tel: 86-23-68757041, E-mail: linchen70@163.com

骨折是临床上最常见的创伤性疾病之一。其发生率高,愈合周期长,治疗难度大,给患者带来的经济负担重。同时,在外科手术治疗过程中,因各种原因导致的骨不连也是影响骨折愈合、功能恢复的重要因素。近几十年来,各种不同类型的手术、中医及物理治疗等措施不断发展,但是治疗效果却不甚理想。因此寻找更有效的治疗措施非常必要。良好的骨折愈合动物模型是评价治疗方法优劣的关键。骨折模型包含稳定性骨折和非稳定性骨折。稳定性骨折主要通过膜内成骨方式愈合;非稳定性骨折则主要通过软骨内成骨方式愈合。近年来对于稳定性及非稳定性骨折的模型争议较多[1-2]。

非稳定性骨折制作方便,但创伤大,周期长,人为技术原因导致骨折程度不一致等因素而不易统一标准。此外,非稳定性骨折愈合过程中软骨痂形成较多,与临床骨折愈合过程有一定差异。相反,稳定性骨折愈合模型创伤小,周期短,骨折愈合过程中软骨痂形成

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2011CB964701);重庆市自然基金面上项目(CSCT2011jjA1468);国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ201017)

[通信作者] 陈 林,电话:(023)68757041,E-mail:linchen70@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130201.1715.006.html(2013-02-01)

少,更多的是硬骨痂的形成,可以更好地模拟临床情况[3],同时有助于排除周围组织影响进而单一研究骨折愈合的细胞和分子机制,也有利于更好地筛选促进骨折愈合的分子和相关措施[4]。

本实验通过在骨髓腔中插入固定针的方法,模拟临床手术情况,制作了 C57 小鼠稳定性胫骨骨折模型,通过 X 线片、Micro CT 等手段分析观察骨折后 7、14、21 d 3 个具有代表性时相点[5]的骨折愈合情况。该模型可以为更好地研究骨折愈合机制和相关治疗措施提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

石蜡切片机(Leica,德国),Micro CT(Scanco viva40,瑞士),小型工具锯及锯片(Dremel Stylus™ Lithium-ion Cordless,Robert Bosch Tool Corporation,墨西哥),X 线扫描仪(第三军医大学大坪医院野战外科研究所放射科),番红-O(上海生工),快绿(上海沃凯),苏木精(上海生工),伊红(上海生工)。

1.2 实验动物及模型分组

6~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)共 24 只,体质量 18~25 g。结合以往研究者们提出的胫骨骨折模型方案[10-13]进行改良,将小鼠按随机数字表法分为 4 组(建模后 7、14、21 d 及假手术对照组),每组 6 只,使用 1% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 腹腔注射,待小鼠完全麻醉后,备皮、消毒小鼠右下肢,在小鼠右侧膝关节下切开约 0.5 cm 纵行切口,假手术组使用 0.9% 生理盐水冲洗后逐层缝合伤口;实验组则首先由腓腱处插入 22 G/0.41 mm 髓内固定针,于胫骨中上 1/3 处分离肌肉及筋膜,使用锯片锯断胫骨骨干后立即使用 0.9% 生理盐水冲洗胫骨表面,再将髓内固定针完全插入并对合。逐层缝合切口,制成小鼠右侧胫骨干性骨折模型。术后清洁环境下单笼饲养,室温 22~24 ℃,湿度 60%,定期紫外线消毒与排风[6]。常规给水及饮食,小鼠可自由活动。

1.3 骨折术后愈合及处理

手术当天,观察其苏醒情况。于骨折后 7、14、21 d 行 X 线(30 kV,8 mAs)照片后处死小鼠,取其骨折术后胫骨 4% PFA 固定,CT 扫描(70 kV,114 μA,8 W)后用 15% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙[7],梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚 5 mm,常规藏红固绿、HE 染色,光镜观察其组织病理改变。

1.4 形态测量及统计学处理

使用 SpotCam 软件对切片进行形态计量统计,采用 SPSS 12.0 统计软件对计量资料进行 t 检验。

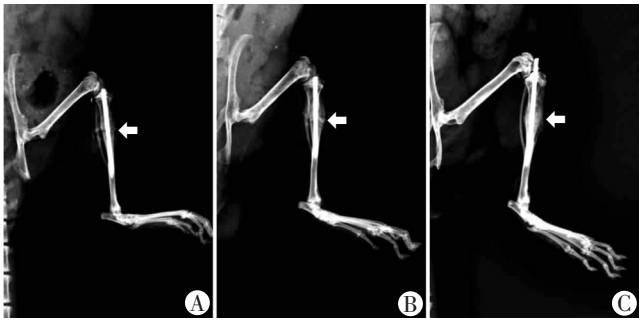
2 结果

2.1 小鼠稳定性胫骨骨折模型效果观察

因手术切开损伤较小,髓内针固定较稳固。小鼠苏醒后活动正常,术后无死亡,进食正常;假手术组至术后 21 d 无死亡,X 线扫描骨折断端对合良好,无明显移位;髓内固定针无弯曲。

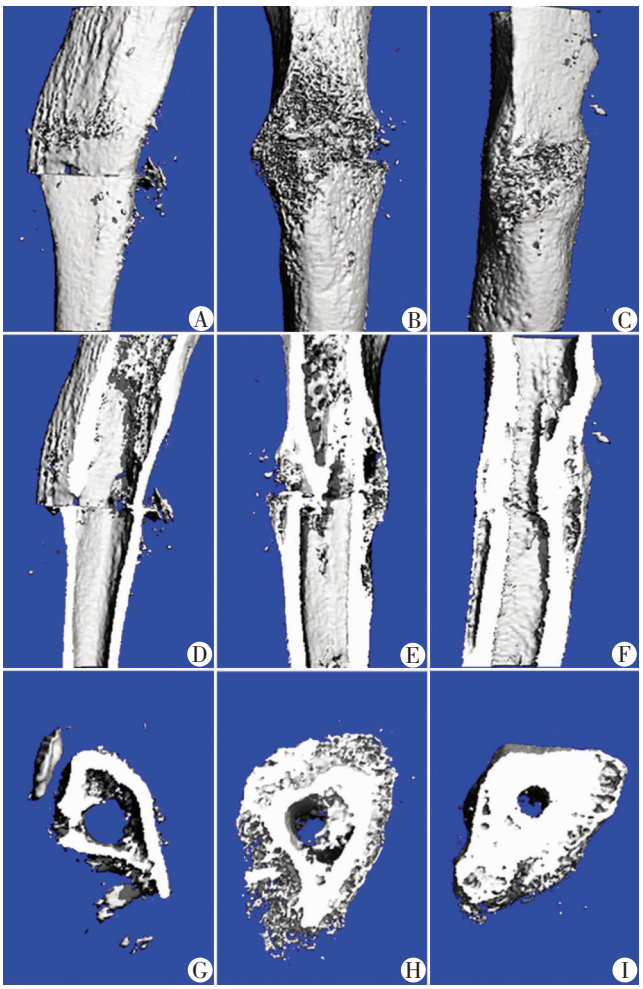
2.2 X 线及 Micro CT 分析

通过 X 线扫描发现,术后 7 d,小鼠钙化骨痂形成极少,骨折线清晰;术后 14 d,小鼠已出现钙化骨痂,呈丘状,骨折断端清晰;术后 21 d 小鼠骨折线模糊,骨痂已较少,骨折断端有骨性骨痂连接,密度较高,连接较好(图 1)。Micro CT 扫描发现,术后 7 d 小鼠无明显钙化骨痂形成,骨折线清晰明显;术后 14 d 小鼠钙化骨痂明显增加;术后 21 d 小鼠骨折断端连接良好,钙化骨痂量少,已接近愈合。冠状切面提示,术后 7 d 组骨折断端外周无钙化骨痂形成,髓腔内存在少量钙化灶;术后 14 d 骨折断端外周存在大量钙化骨痂,断端两侧骨质已有连接,骨折线仍清晰可见;术后 21 d 骨折断端外周骨质丰富,大量皮质骨形成,骨折断端已连接紧密,仅存于少量钙化骨痂,骨折断端已基本愈合(图 2)。Micro CT 扫描分析与 X 线结果一致。



↑:骨折断端 A:术后 7 d;B:术后 14 d;C:术后 21 d

图 1 小鼠术后不同时相点骨折断端愈合程度 X 线表现

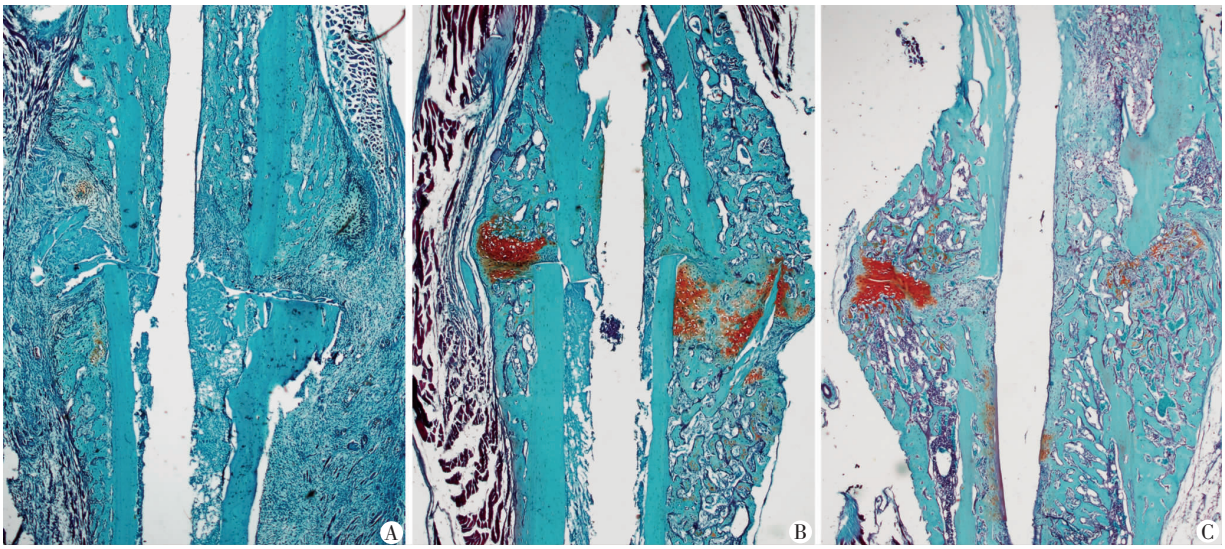


A、D、G:术后 7 d 整体、矢状面、横断面;B、E、H:术后 14 d 整体、矢状面、横断面;C、F、I:术后 21 d 整体、矢状面、横断面

图 2 小鼠术后不同时相点骨折断端骨痂 CT 表现

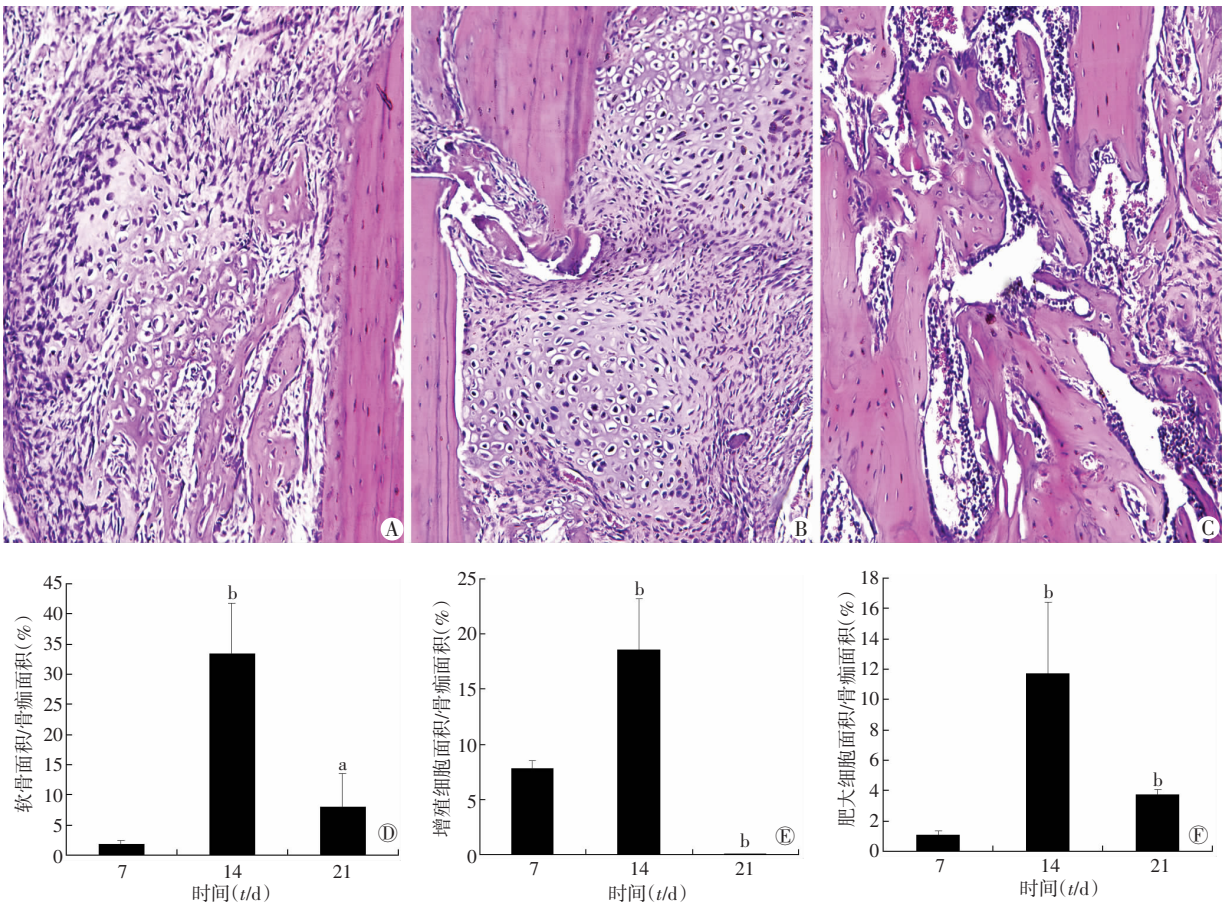
2.3 HE染色及藏红固绿染色

藏红固绿染色提示，术后7 d骨折断端周围存在少量红色软骨性骨痂，软骨基质较少，无明显钙化骨痂形成；术后14 d软骨基质大量形成，骨折断端处同时存在丰富的软骨性骨痂及骨性骨痂，松质小梁骨逐渐形成；术后21 d小鼠以钙化骨痂为主，仅存少量软骨基质，骨折断端形成大量松质小梁骨，皮质骨厚度增加（图3）。HE染色及SpotCam软件测量结果提示，术后7 d小鼠骨折断端聚集有大量未分化间充质及部分静息期、增殖期软骨细胞；术后14 d小鼠骨折断端处存在的大量软骨细胞，主要以肥大软骨细胞居多；而术后21 d小鼠骨折断端处已少见软骨细胞，可见大量成骨细胞及骨质中的骨细胞，残存的软骨痂中则以肥大软骨细胞最多（图4）。



A：术后7 d；B：术后14 d；C：术后21 d

图3 藏红固绿染色观察小鼠术后不同时相点骨痂愈合情况 （×20）



A：术后7 d（×40）；B：术后14 d（×40）；C：术后21 d（×40）；D：软骨面积/骨痂面积；E：增殖细胞面积/骨痂面积；F：肥大细胞面积/骨痂面积 a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与术后7 d比较

图4 HE染色观察与SpotCam软件测量小鼠术后不同时相点骨痂区域变化

3 讨论

骨折是一个复杂的再生过程,多种类型细胞、生长因子及细胞外基质等参与其中[8-9],经过一系列的生理过程最终能够恢复骨骼功能。骨折愈合包括血肿机化演进期、原始骨痂形成期(软骨性骨痂)和骨痂改造塑型期3个相互交织进行的过程[8]。在骨折愈合过程中,如骨折比较稳定,则以膜内成骨为主,骨折处间充质细胞可直接分化为成骨细胞,在骨折端内外形成骨样组织并逐渐骨化形成新骨。而在不稳定骨折时,骨折愈合以软骨内成骨为主,骨折处的间充质细胞先分化为软骨细胞,形成软骨痂,随后软骨细胞逐渐成熟肥大,凋亡,并伴血管长入,最后发生重建,被骨组织取代。因此,绝大多数骨折愈合都是由膜内化骨和软骨内化骨形成两个过程交替进行来完成的,只是稳定性骨折的修复以膜内化骨为主,而非稳定性骨折的修复以软骨内化骨为主[10]。

目前,小鼠因较其他模式动物而言具有如繁殖周期短,遗传背景明确等优势[4]而得到广泛的运用,且小鼠稳定性骨折能更好模拟临床骨折治疗过程,因此我们选取C57小鼠作为研究对象探讨胫骨骨折愈合情况。

本实验根据以往胫骨骨折模型制作方案[10-13]进行改良,通过在骨髓腔中插入固定针的方法制作了小鼠胫骨稳定性骨折模型。术后7 d骨痂形成较少,骨折断端主要以软骨痂为主,细胞类型以未分化期间充质细胞居多,内有少量的软骨细胞;术后14 d骨痂大量形成,其中钙化骨痂占大多数,骨折断端处细胞以肥大软骨细胞居多;术后21 d骨折进入愈合期,骨痂经过重建已接近消失,骨折断端通过钙化骨痂连接,可观察到大量松质骨形成,局部少见肥大软骨细胞,以成骨细胞、骨细胞为主。而这个过程与临床骨折愈合类似[8,14]。

与近几年来广泛采用的非稳定性胫骨骨折模型不同,本实验采用小鼠胫骨稳定性骨折模型具有如下优势:腓骨作为支撑点刚度更大,对稳定性影响明显[15];肌肉群损伤小,出血不明显,形成骨痂较小,骨折愈合进度提前;可采用内/外固定,受包绕胫骨肌肉组织牵拉力小,胫骨不易沿轴向转动,胫骨两侧断端对合良好,无位移、错位,利于骨折愈合,较好避免周围组织产生各种因子影响骨折愈合。同时,本研究与其他胫骨稳定性骨折模型相比,采用设备仪器简单,制作过程快捷,效果理想,同时因使用工具锯切断胫骨骨干,切面最大程度平整,骨干破裂程度较轻,受其他如缺损较大造成骨不连等干扰因素少。

总之,本实验建立了较好的小鼠稳定性胫骨骨折模型,能更好地模拟临床骨折愈合过程,为今后骨折愈合研究提出了新的研究思路。

参考文献:

[1] Garcia P, Holstein J H, Histing T, *et al*. A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing[J]. J Biomech, 2008, 41(8): 1689-1696.

[2] ChenY, Whetstone H C, Lin A C, *et al*. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing [J]. PLoS Med, 2007, 4(7): e249.

[3] JacenkoO, Olsen B R. Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders[J]. J Rheumatol Suppl, 1995, 43: 39-41.

[4] HistingT, Garcia P, Holstein J H, *et al*. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting [J]. Bone, 2011, 49(4): 591-599.

[5] Einhorn T A. The science of fracture healing[J]. J Orthop Trauma, 2005, 19(10 Suppl): S4-S6.

[6] 周锐, 苏楠, 李灿, 等. 小鼠胫骨骨皮质损伤修复过程中成纤维生长因子受体的表达[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1024-1027.

[7] Su N, Sun Q, Li C, *et al*. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(7): 1199-1210.

[8] Schindeler A, McDonald M M, Bokko P, *et al*. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(5): 459-466.

[9] Einhorn T A. The cell and molecular biology of fracture healing[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998, (355 Suppl): S7-S21.

[10] Le A X, Miclau T, Hu D, *et al*. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1): 78-84.

[11] Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, *et al*. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model[J]. J Orthop Res, 2004, 22(5): 1100-1107.

[12] Holstein J H, Garcia P, Histing T, *et al*. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration[J]. J Orthop Trauma, 2009, 23(5 Suppl): S31-S38.

[13] Gardner M J, van-der-Meulen M C, Demetrakopoulos D, *et al*. *In vivo* cyclic axial compression affects bone healing in the mouse tibia [J]. J Orthop Res, 2006, 24(8): 1679-1686.

[14] Shefelbine S J, Augat P, Claes L, *et al*. Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model[J]. J Orthop Res, 2005, 23(2): 489-493.

(**收稿**:2013-01-04;**修回**:2013-01-29)

(编辑 龙 亮)