

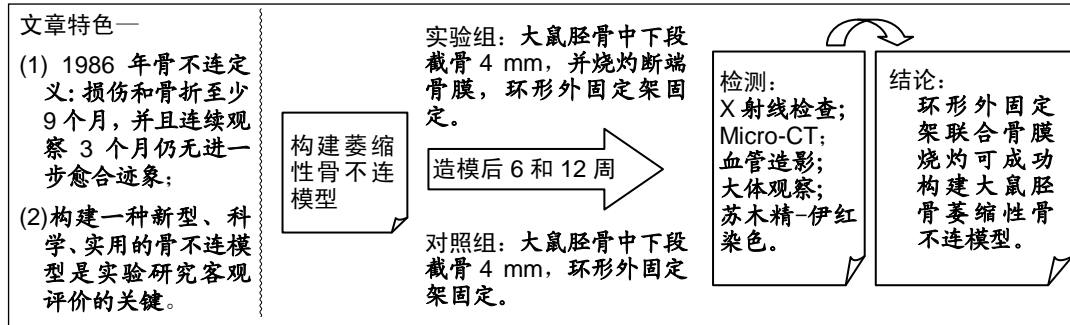
# 环形外固定架联合骨膜烧灼构建大鼠胫骨萎缩性骨不连的新模型

张 严<sup>1</sup>, 申 震<sup>1</sup>, 李紫阁<sup>1</sup>, 黄敏玲<sup>1</sup>, 冯俊铭<sup>1</sup>, 谢 磊<sup>1</sup>, 高怡加<sup>2</sup>, 曾展鹏<sup>2</sup>, 姜自伟<sup>2</sup> (<sup>1</sup>广州中医药大学, 广东省广州市 510405; <sup>2</sup>广州中医药大学第一附属医院一骨科, 广东省广州市 510405)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2788

ORCID: 0000-0002-9406-3242(张严)

文章快速阅读:



张严, 男, 1994 年生, 山西省临汾市人, 汉族, 广州中医药大学在读硕士, 主要从事中医药防治骨与关节损伤方面的研究。

通讯作者: 姜自伟, 博士, 副主任医师, 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

文献标识码: B

投稿日期: 2019-12-03

送审日期: 2019-12-10

采用日期: 2020-01-17

在线日期: 2020-04-30



文题释义:

**萎缩性骨不连:** 骨折修复过程完全停止, 骨端萎缩吸收, 骨痂无明显生长, 髓腔封闭不通, 断端之间无骨性连接, 是骨折术后常见的并发症之一, 其发生与骨折端周围血供破坏明显、固定不稳、感染、口服药物及全身因素相关。

**动物模型:** 在医学研究中, 在动物身上建立或形成类似人类疾病的模型, 通过动物模型可直接或间接反映疾病的发生或发展过程, 在了解疾病的基础上开创或改进疾病的治疗。

摘要

**背景:** 建立标准萎缩性骨不连动物模型是研究萎缩性骨不连的发生机制与治疗的必要条件, 而目前常见的造模方法不能准确模拟萎缩性骨不连的临床实际。

**目的:** 构建一种新型萎缩性骨不连动物模型。

**方法:** 30 只雄性 SD 大鼠随机分成实验组和对照组, 均行右侧胫骨中下段截骨, 采用环形外固定架固定, 维持 4 mm 缺损间距; 其中实验组烧灼截骨端周围 1 mm 骨膜, 对照组不处理骨膜。实验于 2018-01-02 经广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准, 批号: TCMF1-2018002。

**结果与结论:** 造模后每组分别出现 1 例外固定架松动, 2 组均未发生感染; 影像学检查显示造模后 6 周, 2 组胫骨骨折断端间均无骨性连接, 且无进一步愈合迹象; 实验组第 12 周时影像学显示呈典型萎缩性骨不连表现; 对照组第 12 周影像学显示 8 只模型呈现肥大性骨不连特征, 6 只模型影像学具有萎缩性骨不连特征。提示采用环形外固定架配合烧灼断端骨膜可成功构建萎缩性胫骨骨不连模型。

**关键词:**

萎缩性骨不连; 肥大性骨不连; 环形外固定架; 烧灼骨膜; 动物模型; 胫骨; 截骨; 骨缺损模型

中图分类号: R456; R318; R683.42

基金资助:

国家自然科学基金项目(81774337), 项目负责人: 姜自伟; 广东省自然科学基金项目(2018A030313369), 项目负责人: 高怡加

## Establishing a rat model of atrophic nonunion by using circular external fixator combined with periosteum cauterization

Zhang Yan<sup>1</sup>, Shen Zhen<sup>1</sup>, Li Zige<sup>1</sup>, Huang Minling<sup>1</sup>, Feng Junming<sup>1</sup>, Xie Lei<sup>1</sup>, Gao Yijia<sup>2</sup>, Zeng Zhanpeng<sup>2</sup>, Jiang Ziwei<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China)

Zhang Yan, Master candidate, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

**Abstract**

**BACKGROUND:** Establishment of a standard experimental animal model of atrophic nonunion is necessary for experimental study and related treatment of atrophic nonunion. However, the common modeling methods cannot accurately simulate atrophic nonunion in the clinical practice.

**OBJECTIVE:** To construct a standard animal model of atrophic nonunion.

**METHODS:** Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into experimental and control groups. All animals were subjected to bone cutting at the middle-lower segment of the right tibia and the circular external

Corresponding author: Jiang Ziwei, MD, Associate chief physician, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

fixator was applied to keep a 4 mm defect interval. The animals in the experimental group were subjected to an additional cauterization of the periosteum at the fracture end of the tibia with a length of 1mm. The periosteum was not treated in the control group. The study protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine on January 01, 2018, with approval No. TCMF1-2018002.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After modeling, there was one case of loose external fixation in each group, and no infection occurred in both groups. Imaging examination showed no bone connection and no sign of healing between the fractures of the tibia in the two groups at 6 weeks after modeling. Imaging and histological findings showed no healing at the end of fracture but typical atrophic nonunion in the experimental group at 12 weeks after modeling. By contrast, six animals had atrophic nonunion, and eight had hypertrophic nonunion in the control group. Overall, the animal model of atrophic tibial nonunion can be successfully constructed using circular external fixator combined with periosteal cauterization at the fracture end.

**Key words:** atrophic nonunion; hypertrophic nonunion; circular external fixator; periosteal cauterization; animal model; tibia; osteotomy; bone defect model

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81774337 (to JZW); the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2018A030313369 (to GYJ)

## 0 引言 Introduction

骨折治疗的目的是在最短的时间内获得骨愈合,并尽可能恢复最佳的功能<sup>[1]</sup>,同时治疗应尽可能减少并发症的发生。尽管外科技术已发生了飞跃,但是骨折手术后骨不连的发生率仍高达5%-10%<sup>[2]</sup>。目前关于骨不连的诊断标准尚不一致,但在临床中一般认为发生骨折超过3个月未愈合即为延迟愈合,而6个月以上仍未完全愈合则被称为骨不连<sup>[3]</sup>。骨不连在所有骨折类型中发生率不同,由于胫骨常累及高能量开放性骨折,并且血液供应较薄弱,导致骨不连发生率可达18.7%<sup>[4]</sup>,是骨科医师亟待解决的难题。

骨不连可分为感染性与非感染性两大类<sup>[5]</sup>。在非感染性骨不连中,依据影像学及病理学特征表现又可分为萎缩性与肥大性骨不连<sup>[6-7]</sup>;其中萎缩性骨不连治疗最为困难<sup>[8]</sup>,其影像学及病理学特征为骨折断端萎缩吸收,骨痂增生不明显以及断端之间软组织填充<sup>[9]</sup>。

在骨不连的动物模型中,主要为兔桡骨与大鼠股骨模型<sup>[10-11]</sup>,而胫骨模型较少,且大多为髓内针固定,缺少锁定装置,髓内针抗旋转能力较弱<sup>[12]</sup>,使得模型缺乏稳定性,不能准确反映临床的实际情况<sup>[8]</sup>。采用环形外固定架构建萎缩性骨不连模型的方法,目前国内外鲜有报道,作者拟采取胫骨中下段截骨4 mm,并烧灼断端骨膜,以环形外固定架固定构建新型萎缩性骨不连大鼠模型,其可能成为研究萎缩性骨不连的发病机制、病理特点以及治疗方法可靠的动物模型。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 动物实验于2018年12月至2019年6月在广州中医药大学第一附属医院SPF级实验动物中心进行。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠30只,鼠龄16周,体重300-320 g,平均(309.50±6.00) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号SCXK(粤)2013-0001。所有大鼠行普通饲料喂养。

此次实验于2018-01-02经广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准,批号:TCMF1-2018002。

实验操作及日常饲养与管理严格遵守国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规的规定,符合动物福利以及动物伦理原则的要求。

1.3.2 实验使用的主要试剂与仪器 伊红、苏木精购自索莱宝试剂公司;甲醛购自碧云天试剂公司;乙二胺四乙酸购自美国Sigma公司;含铅不透射线硅橡胶复合铬酸盐(Microfil MV-122)购自Flow Tech;戊巴比妥钠(F20150922)购自中国医药(集团)上海化学试剂公司;注射用青霉素钠(160万单位/瓶,国药准字:H13020655)购自石家庄市华北制药股份有限公司;直接数字平板X射线成像系统(DR7500)购自日本柯达;Micro-CT机购自瑞士Scanco Medical公司;BKJ-I微型电动摆锯、小型电钻购自江苏省张家港市永康医疗器械有限公司;口腔科粘固粉填充器购自河南文翔医疗器械公司(豫食药监械生产许20170072)。大鼠胫骨牵张装置为作者所在团队自有专利,专利号:ZL201520667-424.3。

1.4 方法

1.4.1 实验动物分组 采用随机数字表法,将30只雄性SD大鼠按照体质量进行编号排序,随机分为实验组与对照组,各15只。

1.4.2 萎缩性骨不连模型的建立 造模前限制饮食饮水8 h,称取得大鼠体质量,腹腔注射1.5 mL浓度为3%戊巴比妥钠麻醉。大鼠侧卧位,固定右下肢,从右胫骨弧度顶点沿胫骨干方向建立长约1 cm切口,逐层切开皮肤与筋膜,将胫骨周围肌肉钝性分离并牵拉,完全暴露胫骨中段。将已灭菌并组装好自制环形外固定架(图1A)套于右下肢,装入直径0.5 mm克氏针,进针点位于胫骨中上1/3部分,垂直于下肢纵轴进针,贯穿胫骨,并使克氏针夹于近端两枚环形圆片之间。相同操作将第2根克氏针进针点贴近第1根针钻入胫骨,并使2根克氏针在冠状面形成30°-45°夹角,拧紧近端两圆片相连接的螺丝。继续同法将远端两枚环形圆片用克氏针固定与胫骨下端,剪断突出克氏针,螺丝加压固定,见图1B。再次显露胫骨,使用微型电动摆锯截取进行截骨,生理盐水冲洗,形成长度为4 mm骨缺损区域,见图1C。其中实验组截骨段使用口腔科粘固粉填充器,在酒精灯外焰加热后行截骨端两端骨膜烧灼,宽度约1 mm。

对照组不予烧灼骨膜。再次用生理盐水清洗手术区域。使用可吸收线缝合胫骨周围肌肉、筋膜, 丝线缝合皮肤, 消毒皮肤。造模后6 h予恢复饮食, 造模后3 d内, 每天肌肉注射青霉素钠8万单位, 避免伤口感染。造模后大鼠自由活动, 分笼饲养, 见图1D。

#### 实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	构建标准的萎缩性骨不连动物模型
借鉴已有标准实施动物造模:	使用环形外固定架构建大鼠胫骨骨不连模型 <sup>[13]</sup>
选择动物的条件:	①SD 大鼠; ②雌性; ③16 周龄; ④体质量 300-320 g; ⑤SPF 级
模型与所研究疾病的关系:	建立标准萎缩性骨不连动物模型是研究萎缩性骨不连的发生机制与治疗的基础
动物来源及品系:	SD 大鼠购自广州中医药大学实验动物中心
造模技术描述:	腹腔注射戊巴比妥钠法麻醉, 行右侧胫骨中下段截骨, 采用环形外固定架固定, 维持 4 mm 缺损间距, 实验组烧灼截骨端周围骨膜 1 mm
动物数量及分组方法:	将 30 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为实验组和对照组
造模后实验观察指标:	①X 射线检查; ②Micro-CT 检查; ③血管造影; ④骨组织切片苏木精-伊红染色; ⑤病理观察
造模后动物处理:	自由活动, 分笼饲养
伦理委员会批准:	实验 2018-01-02 经广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准, 批准号: TCMF1-2018002

1.4.3 影像学检查 选取造模后第1天、第6周、第12周行X射线检查, 观察外固定装置是否稳定以及骨愈合情况, 见图2A。造模后第12周行Micro CT扫描右侧胫骨标本, 观察截骨端骨质变化情况。

1.4.4 血管造影 造模后12周, 使用3%戊巴比妥钠将大鼠麻醉, 左心室灌注含肝素钠生理盐水, 40 g/L多聚甲醛进行全身血管固定, 再行含铅不透射线硅橡胶复合铬酸盐灌注。4 ℃下保存24 h后, 取出右侧胫骨组织, 固定、脱钙后于Micro-CT观测周围5 mm直径区域内血管的空间分布情况, 使用CT-analysis软件计算目标区域血管体积分数。

1.4.5 病理观察 造模后12周, 腹腔注射过量3%戊巴比妥钠处死大鼠, 拆除固定装置, 切开右下肢皮肤与软组织, 分离出胫骨, 剔除软组织, 观察胫骨标本形态结构以及截骨区骨质连续性。胫骨缺损区周围组织予以体积分数10%甲醛固定, EDTA脱钙, 去酸, 石蜡包埋, 行苏木精-伊红染色, 在光学显微镜下观察骨组织形态学改变情况。

1.5 主要观察指标 缺损区域成骨情况以及血管体积分数。

1.6 统计学分析 用SPSS 23.0软件分析处理数据, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。计量资料组间比较采用 $t$ 检验(方差不齐采用 $t$ 检验或秩和检验),  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。选用GraphPad Prism 5.0软件绘图。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析及造模成功率 实验组与对照组分别有1只大鼠出现右下肢外固定架松脱情况, 见图2B。经X射线鉴定, 实验组造模成功率为93%(14/15), 对照组造模成功率为40%(6/15)。两组大鼠均未发现感染以及行为学异常。

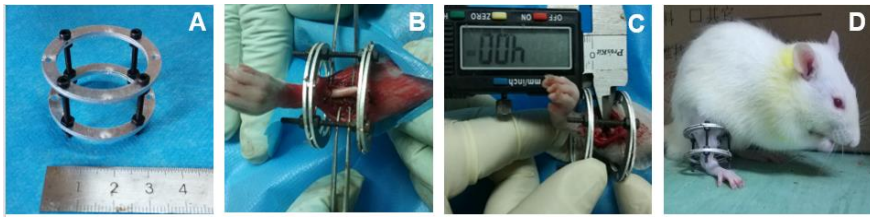
2.2 X射线结果 实验组造模后14只大鼠第6周均可观察到右胫骨截骨线清晰, 截骨区无明显骨痂生成, 无骨折进一步愈合指征。造模后12周时可看到胫骨截骨区无明显骨性连接, 断端骨痂稀疏, 周围骨质萎缩硬化, 见图3A, B。对照组中8只大鼠造模后6周可看到截骨线, 胫骨截骨端周围大量骨痂不规则生成, 无骨性连接, 无骨折进一步愈合指征; 造模后12周时可看到胫骨截骨端无明显骨性连接, 骨折断端肥大, 呈象足样改变, 见图3C, D; 对照组其余6只大鼠模型造模后12周X射线观察到目标区域无明显骨性连接, 周围骨痂稀疏, 骨折断端周围萎缩, 呈萎缩性骨不连表现。

2.3 血管造影与Micro-CT结果 与对照组相比, 实验组比对照组血管分布更稀疏, 见图4A, B, 且相应的血管体积分数也低于对照组( $P < 0.05$ ), 见图5。造模后第12周实验组胫骨Micro-CT可观察到骨缺损区域无骨性连接, 骨折端周围光滑、萎缩, 髓腔关闭, 呈萎缩性骨不连特征, 见图4D; 对照组骨缺损区域无骨性连接, 骨髓腔封闭不通, 骨折端周围骨质大量增生、硬化明显, 有大量骨痂生成, 呈象足样改变, 具有肥大性骨不连特征, 见图4C。

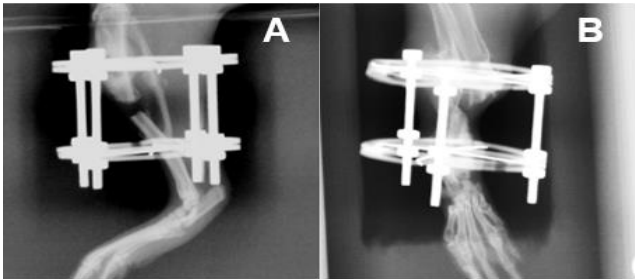
2.4 大体与组织学观察 实验组胫骨缺损区之间无骨连接, 截骨端骨质萎缩, 纤维结缔组织充填缺损区域, 断端可明显活动, 形成假关节, 见图6A。对照组骨缺损区域可见明显分离, 骨髓腔无连通, 骨折端周围骨质膨出呈象足样改变, 见图6B。光镜下2组胫骨均可见大量纤维软组织嵌入骨缺损区, 见图6C, D。

## 3 讨论 Discussion

实验结果显示大鼠行截骨加烧灼骨膜后第12周时, 在环形外固定架的固定作用下, 骨折断端填充大量的纤维软组织, 骨折两端骨髓腔关闭不通, 符合萎缩性骨不连的病理组织学特征表现<sup>[14]</sup>; 影像学结果显示缺损区无骨桥连接, 仅有少量的骨痂形成, 骨髓腔封闭不通, 断端骨质萎缩, 符合萎缩性骨不连特征表现<sup>[15]</sup>; 血管造影提示胫骨缺损区域周围血管分布密度更小, 血管体积分数减小, 这也明显符合萎缩性骨不连的特征<sup>[16]</sup>。实验结束后大鼠体质量在400 g以上, 可以排除营养不良性骨不连。综合分析结果表明, 采用环形外固定架联合骨膜烧灼法可成功构建大鼠胫骨萎缩性骨不连模型。对照组中有8只影像学表现为马蹄样或象足样等肥大性骨不连特征, 有学者认为肥大性骨不连的发生的原因主要是骨折固定不稳以及碎骨片运动导致<sup>[15]</sup>, 而外固定支架稳固性较高, 且无松脱现象, 考虑对照组的肥大

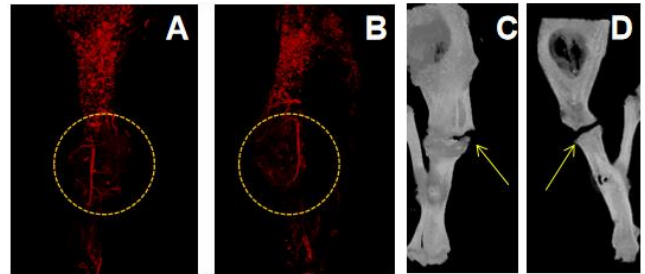


图注：图中 A 为自制外固定架；B 为在建立萎缩性骨不连模型中，暴露胫骨；C 为行 4 mm 截骨；D 为造模后大鼠的自由活动  
图 1 大鼠萎缩性骨不连模型的建立  
Figure 1 The process of making a rat model of atrophic nonunion

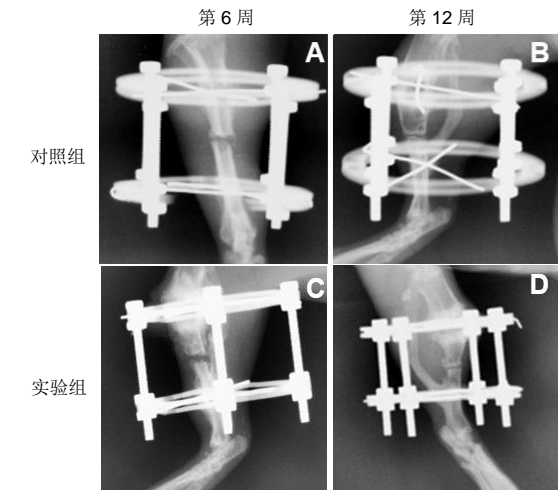
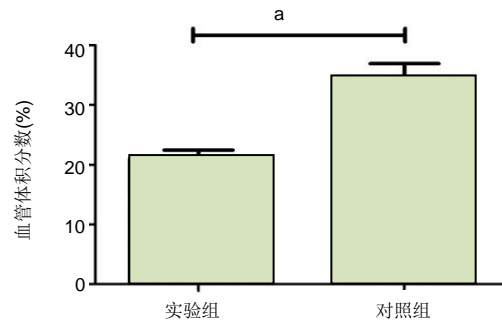


图注：图中 A 为实验组造模后第 1 天右胫骨 X 射线检查结果，可见环形外固定可有效固定骨不连部位；B 为对照组 6 周时，出现外固定松动失效  
图 2 胫骨萎缩性骨不连模型外固定以及愈合情况  
Figure 2 External fixation and healing in an atrophic nonunion model of the rat tibia

图注：图中 A, B 为造模后第 12 周时对照组和实验组右侧胫骨缺损区域血管的分布情况，其中圆形黄色虚线内表示缺损区血管生成情况；C 为对照组胫骨的 Micro-CT 图像，出现肥大性骨不连表现(箭头)；D 为实验组胫骨 Micro-CT 图像，表现出萎缩性骨不连迹象(箭头)  
图 4 环形外固定架联合骨膜烧灼构建萎缩性骨不连大鼠模型的胫骨血管造影与 Micro-CT 表现  
Figure 4 Angiographic and Micro-CT findings of the rat model of atrophic nonunion constructed using circular external fixator combined with periosteal cauterization

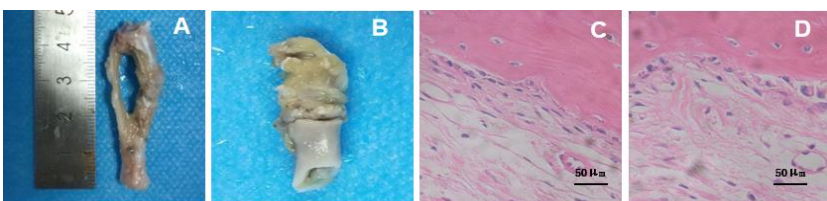


图注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$   
图 5 胫骨骨缺损周围血管体积分数  
Figure 5 Volume fraction of peripheral blood vessels around tibial bone defect



图注：实验组造模后 12 周时胫骨截骨区无明显骨性连接，断端骨痂稀疏，周围骨质萎缩硬化；对照组造模后 12 周时可看到胫骨截骨端无明显骨性连接，骨折断端肥大，呈象足样改变  
图 3 环形外固定架联合骨膜烧灼构建萎缩性骨不连大鼠模型的胫骨影像学评价(X 射线片)  
Figure 3 Radiological evaluation (X-ray) of the tibia in the rat model of atrophic nonunion constructed using circular external fixator combined with periosteal cauterization

图注：图中 A 为实验组右侧胫骨，截骨端骨质萎缩，断端可明显活动，形成假关节；B 为对照组胫骨，骨髓腔无连通，骨折端周围骨质膨出呈象足样改变；C 为实验组胫骨骨折端组织病理形态(苏木精-伊红染色， $\times 20$ )；D 为对照组胫骨骨折端组织病理形态(苏木精-伊红染色， $\times 20$ )。两组均显示纤维组织可嵌入骨缺损区，无明显差异  
图 6 环形外固定架联合骨膜烧灼构建萎缩性骨不连大鼠模型的胫骨的大体与组织形态  
Figure 6 Gross and histomorphological observation of the tibia in the rat model of atrophic nonunion constructed using circular external fixator combined with periosteal cauterization



图注：图中 A 为实验组右侧胫骨，截骨端骨质萎缩，断端可明显活动，形成假关节；B 为对照组胫骨，骨髓腔无连通，骨折端周围骨质膨出呈象足样改变；C 为实验组胫骨骨折端组织病理形态(苏木精-伊红染色， $\times 20$ )；D 为对照组胫骨骨折端组织病理形态(苏木精-伊红染色， $\times 20$ )。两组均显示纤维组织可嵌入骨缺损区，无明显差异  
图 6 环形外固定架联合骨膜烧灼构建萎缩性骨不连大鼠模型的胫骨的大体与组织形态  
Figure 6 Gross and histomorphological observation of the tibia in the rat model of atrophic nonunion constructed using circular external fixator combined with periosteal cauterization

性骨不连是由于截骨时残留的碎骨片加之血液供应未明显破坏而共同形成的;因此可以假设在骨折固定物稳定的情况下发生萎缩性骨不连,血液循环供应不足是其主要原因。对照组中有6只大鼠表现为萎缩性骨不连特征,由于对照组未处理骨膜,考虑术中骨折折缺损区域血供破坏较大,从而形成萎缩性骨不连,后续实验可以增加统计出血量等指标验证。实验研究表明,大鼠胫骨骨折愈合平均时间约为4周<sup>[17]</sup>,结合人类胫骨8-12周愈合时间<sup>[18]</sup>,实验中选择造模后6和12周行影像学检测符合临床骨不连诊断的时间要求。

骨不连的发生受多种因素影响<sup>[19]</sup>,不仅取决于局部因素如骨折部位血液循环状况、骨折分型、初始治疗,尤其是是否稳定固定以及有无感染等,还与全身状况,例如老年、营养不良、服用激素或抗凝药和抗炎药等、超重和肥胖、吸烟以及饮酒等因素有关,而萎缩性骨不连的形成则更与骨折断端的血液循环供应遭到破坏紧密相关<sup>[2]</sup>。李德强等<sup>[20]</sup>使用血管造影对长骨萎缩性骨不连骨折周围组织局部血液循环情况进行研究,发现尽管骨折区域主要血管供应情况良好,但局部微循环实际上仍明显薄弱。还有学者提出萎缩性骨不连与骨折端间充质干细胞的刺激与再激活相关,成骨能力不足,从而导致骨不连的发生<sup>[21]</sup>。

骨不连的治疗仍然充满挑战性,目前手术是骨不连最主要的治疗方法<sup>[22]</sup>,自体髂骨移植是治疗骨不连的常用手段<sup>[23-24]</sup>。最新研究表明<sup>[25]</sup>,骨髓间充质干细胞及人脐带源间充质干细胞疗法,将脐带源性间充质干细胞,种植于大鼠的股骨骨不连区域,最终实现骨不连的愈合<sup>[26-27]</sup>,可以为骨不连提供一种崭新的治疗方法。

目前关于建立动物骨不连或骨折不愈合模型的技术已趋近于成熟<sup>[28-43]</sup>。大鼠胫骨多采用4 mm骨缺损制作骨折模型<sup>[44]</sup>,但常用的克氏针行髓内固定,因缺少锁定装置,抗旋转能力较弱,易发生内固定失效,从而使得骨折愈合困难;而微型钢板固定则无调节功能,且断端周围有植入物,造成异物刺激。此次实验采用环形外固定架<sup>[13]</sup>,具有较强的抗旋转能力与可调整局部应力的特点,还具备牵张和加压能力<sup>[45]</sup>,可调节或维持骨不连形成所需要的缺损间距,同时方便后续骨不连的干预治疗,并且对动物日常活动的影响较小。因克氏针道与外界空气环境相通<sup>[46]</sup>,因此造模后注意抗生素的应用,整个实验过程中需要密切观察大鼠活动情况以及伤口护理等,在此次实验中未出现感染情况。有2只大鼠造模后出现外固定架螺丝螺杆松脱现象,考虑由于实验初期造模方法不熟练,尚未形成标准流程,造模过程中克氏针钻孔较多,导致针道重叠,破坏了胫骨稳定性,经系统培训及制定标准流程后,其余大鼠外固定架未见松动。

综上,实验成功构建大鼠胫骨萎缩性骨不连模型,且环形外固定架对大鼠的正常活动影响在可接受范围内,并且稳定性较强,有较高的可操作性、可靠性与重复性,为研究骨与血管的再生提供了可靠的动物模型。

**作者贡献:** 姜自伟、张严、申震共同进行实验设计及文献分析,动物实验由张严、李紫阁、冯俊铭和谢磊共同完成,实验评估为高怡加、曾展鹏,张严成文,姜自伟、张严审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81774337)”、“广东省自然科学基金项目(2018A030313369)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经广州中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015; 11(1):45-54.
- [2] KOSTENUIK P, MIRZA FM. Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion. *J Orthop Res*. 2017;35(2):213-223.
- [3] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学[M].北京:人民军医出版社,2012:1153-1154.
- [4] FONG K, TRUONG V, FOOTE CJ, et al. Predictors of nonunion and reoperation in patients with fractures of the tibia: an observational study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013;14: 103.
- [5] 王海,黄游,何晓青,等.感染性骨不连的治疗现状[J].中国矫形外科杂志,2017,25(5):438-441.
- [6] LONG H, ZHU Y, LIN Z, et al. miR-381 modulates human bone mesenchymal stromal cells (BMSCs) osteogenesis via suppressing Wnt signaling pathway during atrophic nonunion development. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):470.
- [7] 王亦璁,姜保国.骨与关节损伤[M].北京:人民卫生出版社,2012: 328.
- [8] BELL A, TEMPLEMAN D, WEINLEIN JC. Nonunion of the Femur and Tibia: An Update. *Orthop Clin North Am*. 2016; 47(2):365-375.
- [9] RAVEN TF, MOGHADDAM A, ERMISCH C, et al. Use of Masquelet technique in treatment of septic and atrophic fracture nonunion. *Injury*. 2019;50 Suppl 3:40-54.
- [10] 房国军,曲志国,崔正宏,等.大鼠胫骨标准实验性骨不连模型的制作[J].中国组织工程研究,2014,18(18):2795-2800.
- [11] 江丽霞,袁瑞娟.骨碎补总黄酮促进骨膜细胞增殖及对兔骨不连的治疗作用[J].中国组织工程研究,2019,23(19):2953-2958.

- [12] 梁洪杰.股骨干骨折髓内钉固定术后骨不连原因分析及手术治疗[D].唐山:华北理工大学,2015.
- [13] 曾景奇,黄枫,姜自伟,等.一种牵张成骨大鼠实验模型的建立[J].中国实验动物学报,2016,24(1):43-46.
- [14] ROBERTO-RODRIGUES M, FERNANDES RM, SENOS R, et al. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit. *Injury*. 2015;46(4):649-654.
- [15] GÓMEZ-BARRENA E, ROSSET P, LOZANO D, et al. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015;70:93-101.
- [16] GHIASI MS, CHEN J, VAZIRI A, et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep*. 2017;6:87-100.
- [17] GRÖNGRÖFT I, WISSING S, MEEESTERS DM, et al. Development of a novel murine delayed secondary fracture healing in vivo model using periosteal cauterization. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2019;139(12):1743-1753.
- [18] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学[M].北京:人民军医出版社,2012:464.
- [19] 殷建,殷照阳.长骨骨不连的研究进展[J].重庆医科大学学报,2017,42(2):175-179.
- [20] 李德强,李彩霞,李明,等.胫骨萎缩性骨不连骨折局部DSA的初步应用[J].实用放射学杂志,2007(6):781-783.
- [21] SUNG MH,徐佳,汪春阳,等.外固定支架在肱骨干萎缩性骨不连中的应用及疗效[J].生物骨科材料与临床研究,2019,16(4):30-32.
- [22] SEN MK, MICLAU T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?. *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S75-S80.
- [23] CALORI GM, MAZZA EL, MAZZOLA S, et al. Non-unions. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017;14(2):186-188.
- [24] 王海生,李长江,张国学,等.附加锁定接骨板结合自体髂骨植骨治疗股骨干骨折交锁髓内钉固定术后骨不连[J].中国骨与关节损伤杂志,2014,29(2):183-184.
- [25] 赖丽金,莫浩轩.补骨脂素诱导兔骨内膜间充质干细胞增殖构建细胞支架复合体修复骨不连[J].中国组织工程研究,2020,24(1):40-44.
- [26] ZHANG ZY, TEOH SH, CHONG MS, et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*. 2010;31(4):608-620.
- [27] GÓMEZ-BARRENA E, ROSSET P, MÜLLER I, et al. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1266-1286.
- [28] GARCIA P, HISTING T, HOLSTEIN JH, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater*. 2013;26:1-14.
- [29] MARCAZZAN S, WEINSTEIN RL, DEL FABBRO M. Efficacy of platelets in bone healing: A systematic review on animal studies. *Platelets*. 2018;29(4):326-337.
- [30] VUOLTEENAHO K, MOILANEN T, MOILANEN E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102(1):10-14.
- [31] MEYERS CA, CASAMITJANA J, CHANG L, et al. Pericytes for Therapeutic Bone Repair. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1109:21-32.
- [32] GARCIA P, HISTING T, HOLSTEIN JH, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater*. 2013;26:1-14.
- [33] 潘治军,潘静心,杨振邦,等.二次损伤炎症启动犬萎缩性骨不连模型骨痂生长的组织病理学分析[J].中国骨与关节损伤杂志,2019,34(10):1041-1045.
- [34] 赖丽金,莫浩轩.补骨脂素诱导兔骨内膜间充质干细胞增殖构建细胞支架复合体修复骨不连[J].中国组织工程研究,2020,24(1):40-44.
- [35] 樊涛,郭荣,郑彭.体外冲击波结合骨髓间充质干细胞移植治疗兔骨不连的疗效[J].实用医学杂志,2019,35(18):2874-2877.
- [36] 王朋朋.聚焦式冲击波不同治疗次数对骨不连家兔骨愈合的影响及机制研究[D].蚌埠:蚌埠医学院,2018.
- [37] 李月玮.续骨丹外敷疗法对胫骨骨不连大鼠VEGF、TGF- $\beta$ 影响的实验研究[D].南京:南京中医药大学,2018.
- [38] 赵子星,李宏宇,席立成,等.体外冲击波疗法联合仙桃草口服用于兔桡骨骨不连临床效果观察[J].山东医药,2016,56(36):31-33.
- [39] 林坚平.骨生化标志物(NTX、CTX、OC、BSAP)和QCT骨密度测定在早期诊断兔实验性骨不连的作用[D].广州:南方医科大学,2016.
- [40] 李庆虎.骨不连的初步流行病学研究及ADAMTS-7在大鼠骨不连模型中的表达和意义[D].济南:山东大学,2016.
- [41] 陈顺有,林然,林清坚.新西兰大白兔桡骨缺损性骨不连模型制作的实验研究[J].福建医药杂志,2015,37(5):54-56.
- [42] 喻绍顶,倪卫东.体外冲击波联合增强型纤维蛋白胶负载骨生长因子治疗兔骨不连的研究[J].中国免疫学杂志,2015,31(9):1186-1190+1194.
- [43] 刘宇强,李平,赵爱玲.不同时间冲击波干预对骨不连家兔成骨细胞VEGF的影响[J].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(9):1658-1663.
- [44] 申震,姜自伟,李定,等.基于Masquelet诱导膜技术比较不同固定方式构建的胫骨大段骨缺损模型[J].中国实验动物学报,2018,26(6):673-680.
- [45] 姜盛涵,张里程,唐佩福.Illizarov技术治疗骨不连的研究进展[J].解放军医学院学报,2016,37(12):1308-1311.
- [46] ZHANG Z, SWANSON WB, WANG YH, et al. Infection-free rates and Sequelae predict factors in bone transportation for infected tibia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19(1):442.