

髓内固定构建大鼠股骨骨不连模型

吕利军^{1, 2}, 彭伟³, 李闯兵², 叶铄², 高秋明²<https://doi.org/10.12307/2024.435>

投稿日期: 2023-07-17

采用日期: 2023-08-09

修回日期: 2023-08-22

在线日期: 2023-09-05

中图分类号:

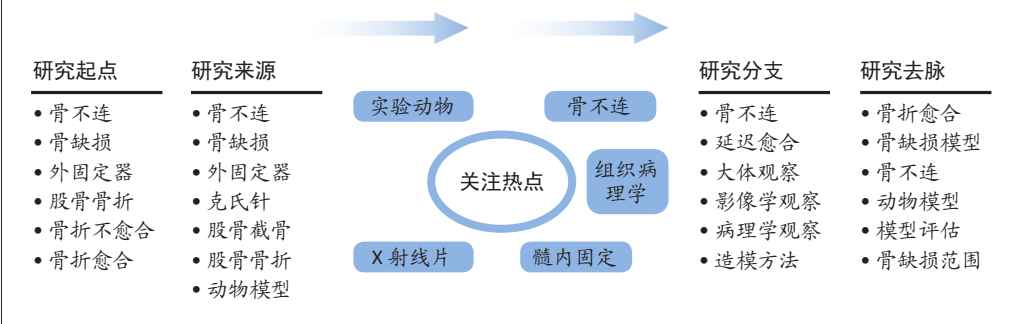
R496; R318; R683

文章编号:

2095-4344(2024)26-04189-05

文献标识码: B

文章快速阅读: 建立一种简易、稳定、可靠的骨不连动物模型



文题释义:

骨不连: 骨折后9个月并连续3个月观察骨折未见明显愈合征象。

动物模型: 指在生物医学领域中使用的一种生物模型, 通过模拟或人工制造动物或人类的疾病模型, 主要在研究人员更好地理解疾病的病理机制、寻找新的治疗方法、测试新药物的有效性和安全性等方面发挥作用。

摘要

背景: 建立客观标准的骨不连动物模型是骨不连的实验研究及探索骨不连治疗的必备条件。

目的: 为骨不连的实验研究建立一种客观的动物模型。

方法: 选取SPF级雄性Wistar大鼠, 采用大鼠股骨中段截除5 mm、进行大段骨膜剥离及骨髓去除的方法制备大鼠股骨骨不连模型, 使用1.2 mm克氏针进行固定。术后1, 4, 8周通过大体标本观察、X射线片检查、组织病理学观察骨不连形成情况。

结果与结论: 造模后8周大体标本及X射线拍片、组织病理学检查显示大鼠骨缺损区无骨痂形成, 断端纤维组织填充, 骨性骨痂稀少, 甚至不可见。结果说明, 股骨中段骨髓截除、大段骨膜剥离及骨髓去除法能够成功制备大鼠骨不连动物模型, 该方法简单、可靠、有效。

关键词: 骨不连; 动物模型; 股骨; 放射学; 病理

Establishment of a rat femoral nonunion model by intramedullary fixation

Lyu Lijun^{1, 2}, Peng Wei³, Li Chuangbing², Ye Shuo², Gao Qiuming²¹The First Clinical Medical School of Gansu University of Chinese Medicine; Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²Orthopedic Center of the 940th Hospital of China People's Liberation Army Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ³Department of Rehabilitation, Gansu Armed Police Corps Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, ChinaLyu Lijun, Master candidate, Attending physician, The First Clinical Medical School of Gansu University of Chinese Medicine; Lanzhou 730000, Gansu Province, China; Orthopedic Center of the 940th Hospital of China People's Liberation Army Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730050, Gansu Province, China**Corresponding author:** Gao Qiuming, Master, Chief physician, The First Clinical Medical School of Gansu University of Chinese Medicine; Lanzhou 730000, Gansu Province, China; Lanzhou 730000, Gansu Province, China; Orthopedic Center of the 940th Hospital of China People's Liberation Army Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Establishing an objective and standard animal model of bone nonunion is essential for experimental studies and treatment of nonunion.**OBJECTIVE:** To establish an objective animal model for experimental studies of nonunion.**METHODS:** Specific pathogen-free male Wistar rats were selected and prepared by cutting off a 5 mm bone defect in the middle femur, peeling off a large periosteum and removing bone marrow. Animal models were fixed with a 1.2 mm Kirschner wire. At 1, 4 and 8 weeks, bone nonunion was observed by gross specimen observation, X-ray examination and histopathological examination.**RESULTS AND CONCLUSION:** The gross specimen, X-ray film and histopathological examination showed that there was no callus formation in the bone defect area, the broken end was filled with fiber tissue, and the bone callus was rare or even invisible. To conclude, the rat model of nonunion can be successfully established by osteotomy of the middle femur, large periosteum peeling and bone marrow removal. This modeling method is simple, reliable and effective.**Key words:** nonunion; animal model; femur; radiology; pathology¹甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃省兰州市 730000; ²中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院骨科中心, 甘肃省兰州市 730050; ³武警甘肃总队医院康复科, 甘肃省兰州市 730000

第一作者: 吕利军, 男, 1991年生, 甘肃省礼县人, 汉族, 甘肃中医药大学在读硕士, 主治医师, 主要从事运动医学、创伤骨科、材料学的研究。

通讯作者: 高秋明, 硕士, 主任医师, 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院骨科中心, 甘肃省兰州市 730000

<https://orcid.org/0000-0003-3044-7025>(吕利军)

基金资助: 甘肃省自然科学基金资助项目(21JR11RA001), 项目负责人: 高秋明; 甘肃省自然科学基金资助项目(22JR5RA009),

项目负责人: 叶铄

引用本文: 吕利军, 彭伟, 李闯兵, 叶铄, 高秋明. 髓内固定构建大鼠股骨骨不连模型 [J]. 中国组织工程研究, 2024,

28(26):4189-4193.



Funding: the Natural Science Foundation of Gansu Province, Nos. 21JR11RA001 (to GQM) and 22JR5RA009 (to YS)

How to cite this article: LYU LJ, PENG W, LI CB, YE S, GAO QM. Establishment of A rat femoral nonunion model by intramedullary fixation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(26):4189-4193.

0 引言 Introduction

骨不连是一种由多种原因导致的骨折无法连接、骨折愈合终止的骨折术后并发症。高能量损伤、骨肿瘤、肢体畸形和骨感染引起的骨缺损能够导致骨延迟愈合和骨不连发生，虽然该病的治疗已经取得较大的进步，但仍有多数患者患病后出现骨折长期无法愈合、肢体功能严重障碍等表现，已成为骨科领域研究的难度和热点。因此，急需寻求有效的治疗方式及明确骨不连发生的分子机制以改善患者预后，避免骨不连的发生。

目前，国内外学者已经尝试使用多种方法制作骨不连动物模型^[1-2]。在制作骨不连动物模型的选择方面，包括山羊、猪、狗、鼠等，其中大鼠因繁育成本低、适应能力强、骨骼体积适中、经济实惠，是最常用于制作骨不连模型的动物^[3]。经典制作骨不连模型的方法主要有：骨缺损法、异物隔离法、断端分离及活动法、骨膜灼烧法等^[4]，以上方法均是单一方法进行模型制作，其成功率报道不尽相同，同时也有出现局部愈合情况。此次研究参考既往学者的造模方法并进行适当的改进，建立一种简易、稳定、可靠的骨不连动物模型，目的是为了更加接近临床，同时为后期进一步的研究提供可靠条件，该造模方式具有均一性强、操作简便、无须异物隔离等优势，成功率高。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 建立骨不连大鼠模型。

1.2 时间及地点 实验于2022年9月至2023年6月在中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 30只SPF级雄性Wistar大鼠，体质量240–320 g，10–12周龄，购自联勤保障部队第九四〇医院实验动物中心，动物许可证号：SCXK(军)2017-0023。将Wistar大鼠按照国家SPF级标准的环境进行单笼饲养，饲养温度为20–25℃、湿度为50%–60%，统一饲料喂养。该实验已通过联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会批准，批件编号2023KYL058。

1.3.2 主要试剂和仪器 3%戊巴比妥钠、二甲苯、40 g/L多聚甲醛固定液(国药集团化学试剂有限公司)；注射用青霉素钠(江西科达动物药业有限公司)；苏木精–伊红染色试剂盒、10%乙二胺四乙酸(EDTA)、无水乙醇(武汉Servicebio)；高压蒸汽灭菌器(山东威高)；石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司)；电子精密天平秤(中国梅特勒–托利多)；–80℃低温冰箱(中科美菱)；硬组织切片机(上海徕卡仪器有限公司)；普通光学显微镜(奥林巴斯，日本)；组织切片数字扫描仪(徕卡，德国)；X射线摄片机(美国GE公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 构建大鼠股骨骨不连模型 将30只Wistar大鼠称体质量，按照1，4，8周进行分组，每组10只大鼠，使用3%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉，剂量为1.5 mL/kg。麻醉成功后，备皮、术区消毒、铺无菌洞巾。选择股骨外侧入路，纵向切开皮肤、肌肉，显露股骨中段，进行大段的骨膜剥离，摆锯截除5 mm的股骨，使用盐水进行骨髓腔内骨髓冲洗去除。使用电钻将1.2 cm克氏针自股骨髓间窝逆行钻入股骨骨髓腔固定股骨，近端穿出股骨大转子，远端埋入关节软骨面以下。碘伏及生理盐水冲洗切口，使用4-0缝线逐层缝合皮肤，手术视野进行消毒，无菌敷料包扎后，送回动物饲养室进行单笼喂养，密切观察模型的造模结果。肌肉注射青霉素钠40万单位预防感染，连续注射3 d。所有大鼠正常饮食及正常活动，于造模后1，4，8周通过大体标本、病理学检查及X射线片评估骨折愈合情况，见图1。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的 建立一种客观的动物模型

模型与所研究疾病的关系 大鼠因繁育成本低、适应能力强、骨骼体积适中，是最常用于制作骨不连模型的动物，建立大鼠骨不连模型对研究骨不连的预防及治疗有重要意义

动物品系 SPF级雄性Wistar大鼠，由联勤保障部队第九四〇医院实验动物中心提供

造模技术描述 取大鼠股骨外侧入路，纵向切开皮肤、肌肉，显露股骨中段，进行大段的骨膜剥离，摆锯截除5 mm的股骨，使用盐水进行骨髓腔内骨髓冲洗去除。使用电钻将1.2 cm克氏针自股骨髓间窝逆行钻入股骨骨髓腔固定股骨，近端穿出股骨大转子，远端埋入关节软骨面以下。冲洗切口，逐层缝合皮肤

造模成功评价指标 于造模后1，4，8周通过大体标本、病理学检查及X射线片检查评估骨折愈合情况

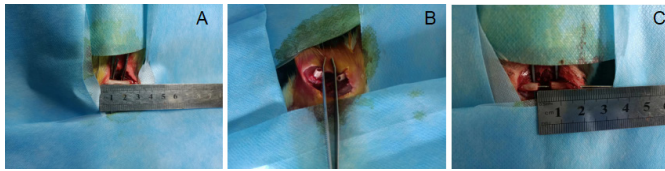
造模后实验观察指标 ①大鼠骨不连标本的大体观察；②骨折愈合X射线片观察；③骨不连组织病理学观察

造模后动物处理 分别于造模后1，4，8周麻醉后处死大鼠，取股骨骨不连组织及两侧正常股骨约1 cm

伦理委员会批准 该实验已通过联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会批准(批准号为2023KYL058)

1.4.2 影像学观察骨折愈合情况 分别于造模后1，4，8周，戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后，将大鼠仰卧位，下肢充分伸展，拍摄股骨正侧位X射线片，评估骨折愈合情况及骨折断端周围骨痂生长情况，每只大鼠的X射线片由3位具有经验的放射科主治医师进行阅片，评估骨折愈合情况。

1.4.3 一般大体标本的观察及标本的收集 分别于造模后1，4，8周大鼠拍片后进行取材。麻醉后处死大鼠，按照外科手术的原则进行取材。选择大鼠股骨外侧入路，切开皮肤及皮下组织，小心剥离周围组织及肌肉，防止破坏骨痂，显露整个股骨，取材范围包括大鼠股骨骨不连骨骼与周围相互连接的组织、骨折断端，以及两侧正常股骨约1 cm。将近端



图注：A 为大段骨膜剥离；B 为截除 5 mm 骨质后骨髓去除；C 为髓内钉固定股骨。

图 1 | 大鼠骨不连模型制作过程

Figure 1 | Process of making a nonunion model in rats

股骨头脱出，远端膝关节处离断，完整保留骨不连组织及骨折断端，观察大鼠股骨骨痂生长情况及愈合情况进行记录。

1.4.4 组织病理学评估骨折愈合情况 ①多聚甲酸固定骨骼组织 24 h，10% 乙二胺四乙酸 (EDFA) 脱钙 1 周，使用注射器针头能够轻松刺破骨质，即脱钙完成。②自来水冲洗 24 h，蒸馏水浸泡 24 h。③脱水、透明：标本顺序浸入乙醇，由低浓度向高浓度脱水，乙醇体积分数依次为 10%，30%，50%，70%，80%，95%，100%，脱水时间各为 1 h；再将标本依次浸入乙醇与二甲苯溶液等体积的混合液、二甲苯 I、二甲苯 II 进行透明，浸泡时间分别为 30 min。④透蜡、包埋：逐一将标本浸泡于石蜡与二甲苯溶液等体积的混合液、石蜡液 I、石蜡液 II 进行透蜡，浸泡时间分别为 15 min；将骨骼肌组织于生物组织石蜡包埋机中进行包埋。⑤切片：用病理切片机以厚度为 5 μm 连续切片。⑥贴片：载玻片表面涂一层甘油明胶，将 5 μm 切片置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 的温水中烫平皱折，平铺在载玻片中间，45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。烘干后显微镜下观察骨质改变情况。

1.5 主要观察指标 ①大鼠骨不连标本的大体观察；②骨折愈合 X 射线片观察结果；③骨不连组织病理学观察结果。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用 30 只大鼠进行造模，30 只大鼠均完成造模制备。

2.2 大鼠骨不连标本的大体观察 造模后 1 周发现大鼠精神状态良好，食欲正常，患肢活动受限，健肢正常活动。造模后 1 周取材显示骨折断端清晰可见，周围未见骨痂包绕；可见骨折断端存在 5 mm 的骨缺损，未见愈合迹象，周围血肿填充骨缺损断端，骨折断端骨皮质色泽发白，骨组织无明显活性。造模后 4 周取材显示股骨骨折断端仍可见骨缺损，骨折断端硬化并伴异常活动，周围可见纤维组织连接，无骨痂形成。造模后 8 周取材显示骨折断端纤维组织连接，无骨性连接形成，存在异常活动，见图 2。



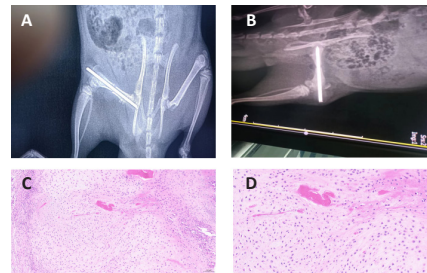
图注：造模后 8 周纤维软骨形成未见骨性骨痂。

图 2 | 大鼠股骨骨不连标本大体观察

Figure 2 | General specimen view of femoral nonunion in rats

2.3 影像学观察骨折愈合结果 造模后 1 周 X 射线片显示，股骨骨折断端可见 5 mm 的骨缺损，局部骨皮质周围未见骨痂包绕，内固定装置固定骨缺损断端，未见明显移位，力线正常。造模后 4 周，股骨骨折断端清晰可见，存在部分骨吸收，未见明显愈合迹象。造模后 8 周，骨折线清晰可见，骨折断端硬化、周围骨质吸收，见图 3A、B。

2.4 组织病理学结果 造模后 1 周骨折线明显，断端可见血肿填充。造模后 4 周骨折断端间隙大，骨折线清晰可见，局部纤维组织填充。造模后 8 周骨折断端骨皮质吸收，周围纤维组织填充，见图 3，D。



图注：图 A、B 为 X 射线片，显示股骨正侧位见骨折线清晰可见，未见愈合；C、D 为病理形态观察，可见大量纤维软骨形成，未见骨性连接，C $\times 100$ ，D $\times 200$ 。

图 3 | 大鼠骨不连造模后 8 周 X 射线片及组织病理观察

Figure 3 | Radiographic and histopathologic observations of femoral nonunion in rats at 8 weeks after modeling

3 讨论 Discussion

随着社会不断发展，骨折修复与内固定技术虽然取得极大的进步，但临床中对骨不连的治疗异常困难，由于缺乏能够使用的动物模型，预防及治疗骨不连的进展受到阻碍，而临床前期骨不连模型对于揭示骨不连发病机制及治疗效果是必不可少的，因此，寻求一种可靠、稳定的动物模型，对探讨骨不连的发生机制及病理生理过程，提高骨不连的治愈率具有重要的临床意义。众所周知，建立一种简单、可靠、重复性强的骨不连动物模型并不容易，主要考虑在造模过程中需要严格的无菌条件、截骨过程中防止发生外源性骨折甚至碎裂、如何选择内固定物避免断端移动等最终可影响模型的结果。

理想的骨不连模型具有以下条件：标准化实施、重复性强、快速、稳定、有效、易于操作、损伤较小等^[1]。此次研究通过借鉴前人的造模方法并加以改进，采用大鼠股骨中段截除 5 mm、大段骨膜剥离及去除骨髓、使用 1.2 mm 克氏针固定骨折端的方法，成功建立了一种大鼠股骨骨不连的动物模型。该模型通过大体标本观察、组织病理学检查、拍摄股骨正侧位 X 射线片证实在造模后 8 周成功建立骨不连大鼠模型，这为后期开展骨不连相关研究及评估各种治疗方案提供了必要条件。

用于构建骨不连模型可选择的动物主要包括山羊、犬、兔等大型动物以及大鼠、小鼠等小型动物^[2-4]。不同的动物其优缺点各不相同，山羊制作骨不连模型比较少见，主要用于构建大段骨缺损，其在组织工程中应用较为广泛^[5-6]。犬在构建骨不连模型已有较久远的历史，早期 KEY^[7] 尝试进行该模型的建立，后期 VOLPON^[8] 与 MARKEL 等^[9] 报道成功构

建了骨不连的模型,但山羊、犬等因价格昂贵,需要更多的时间和精力去护理,因此使用范围较窄。新西兰大白兔因骨组织修复快、实验周期短、便于样本量扩展,应用较多^[10]。国内学者郭征等^[11]和郭树章等^[12]使用兔成功构建骨不连模型,国外学者 BROWNLOW 等^[13]和 BULUT 等^[14]同样使用大白兔成功制备了骨不连模型。然而,大鼠是制备骨不连模型最多见的动物,因为大鼠体积适中、繁殖能力强、操作方便、能够适应各种环境,并且经济实惠,便于样本量扩展,方便实验研究^[15]。小鼠模型目前应用也较为常见,主要用于骨折愈合分子机制的研究,但由于其体积较小,骨骼细小,进行骨折固定难度较大^[16]。目前使用大鼠制备骨不连模型仍有不足之处,无法达到标准化,仍有失败的可能性。

在过去的几十年中,已经引入了多种关于如何构建骨不连的动物模型,主要包括动物的选择、动物受伤的方式、骨折断端固定的方式、处理骨膜、骨髓的方式、如何处理血供、模型评估的方法等均需要综合考虑。动物受伤方式的选择主要有直接截骨、三点折弯装置致伤、砝码高处坠落致伤等,直接截骨能够量化、一致性强,而后两种标准性不足,易出现粉碎性,影响模型结果^[17-19]。骨折断端固定方式的选择主要有外固定架、钢板、髓内针、张力带钢丝等,外固定和钢板效果确切,但因成本高,一般无法满足实验要求,目前髓内针为主要的固定方式,但无法控制轴向运动及旋转^[20]。骨膜处理通常有灼烧、骨膜去除,其中骨膜灼烧无法提供足够的细节标准化骨膜灼烧的过程^[21-22],包括灼烧的时间及输出的温度等存在差异,有学者通过阻断血供制备骨不连模型^[23]。对于模型的评估通过大体标本、X射线片、Micro CT、组织病理学等进行评估^[24]。

骨不连的制备方法差异性较大,目前没有一个统一的执行标准,主要归纳为以下几种:①形成骨缺损法^[25-27]:是通过线锯将骨干截除一部分,使得骨端存在间隙造成骨缺损,从而影响骨组织再生及血管化引起骨不连发生的过程。将动物体内终生不能修复的最小骨缺损称之为临界骨缺损,表现为纤维愈合无法达到骨性愈合的病理变化。该造模方式一般不能单独使用,并且不同动物截骨的距离不尽相同,据文献报道:兔尺骨的临界骨缺损为 15-20 mm,并且尺骨不需要固定。而大鼠的股骨临界骨缺损大约是 5 mm,需要固定装置固定。②骨折断端活动法^[12, 28]:是将断端截断,不进行固定,让其主动或者被动活动造成骨折不愈合的方法。国内以郭征等^[11]为主要代表,主要操作过程是将新西兰大白兔胫骨截断后,使用 2 枚直径 1 mm 的克氏针髓内固定,让其被动活动,200 次/d,持续 1 个月,让其负重自由活动,最终发现存在骨愈合的现象。国外学者 HIETANIEMI 等^[29]将大鼠股骨截骨扩髓,使用 7 mm 的钢针髓内固定,让其自由活动,最终发现肥厚性骨不连模型形成。而 VOLPON^[8]将狗桡骨中段制备截除 5 mm 的骨缺损,不进行固定并自由活动,最终 46% 无骨痂形成,而 54% 有大量骨痂形成。因此,该方法仍然存在较大的差异及不确定性。③骨折断端异物隔离

法^[29-31]:是在骨折断端中间放置隔离物,破坏骨修复的能力达到骨不连的方法。隔离物主要包括硅胶管、金属环、聚乙烯、骨蜡等,放置隔离物的同时部分学者需要联合切除骨膜及去除骨髓,该方法均能形成骨不连动物模型,但该隔离物无法去除,去除后是否愈合存在未知,故该方法差异性较大,目前很少使用。④骨膜损伤及去除骨髓法^[32-35]:该方法与临床工作环境极为相似,有学者通过灼烧骨膜的方式制备该模型,另有一部分学者通过骨膜剥离制备模型,该方法均是一种辅助手段,但灼烧骨膜无法量化,差异性较大,而骨膜剥离目前成功率高,应用较广泛。⑤断端撑开法^[36-37]:不需要将骨干截除一部分,通过钢板或者外骨架将骨折断端分离,形成骨不连的方法。另外还有牵拉分离法、阻断血运法、放射辐照法及药物阻断法等均有报道制备骨不连模型,但目前效果并不明确。

作者通过骨不连模型各个时间节点研究发现,造模后 1 周骨不连模型并未出现骨痂,并且骨不连模型 X 射线片可见骨折端间隙清晰可见,未见愈合迹象,在造模后 4 周骨不连模型仅表现纤维组织填充,未见骨性骨痂形成,造模后 8 周,骨不连模型表现为纤维连接,骨折线清晰可见,达到了骨不连的造模标准。

因此,回顾整个骨不连造模过程发现,软骨的生长与分化受到抑制,形成纤维连接,无法达到骨性连接,使得成骨过程受到阻碍,最终导致骨不连发生。作者通过借鉴 ONISHI 等^[33]造模方式,将 30 只大鼠成功制备骨不连模型,其造模成功的主要原因是:首先,造模过程选择具有较强的标准化、均一性,使用摆锯截骨,并且截骨范围、骨膜剥离、骨髓去除恒定,增加了实验的均一性,便于重复;其次该手术入路创伤较小,沿大腿股骨肌间隙进入,显露股骨,操作简单,无需特殊的手术器械及固定装置;第三,实验前期进行预实验操作,起初先采用闭合穿针,在进行截骨的方式进行预实验,这样容易出现内固定物松动甚至骨折断端碎裂等致使实验失败的可能,通过改进后,先进行大块骨膜剥离后使用摆锯截骨,去除骨髓后穿入克氏针固定骨折断端,这样增加了模型的成功率;第四,该造模方式无需多余的隔离物进行干扰,更加符合临床工作中严重的创伤导致骨折端缺损伴骨膜脱离,再加上手术内固定造成骨膜及骨髓破坏从而导致骨不连出现的病理生理过程。以上原因为该模型的成功构建提供了重要的保障,使得研究结果更加接近临床,更加可靠。另外该项研究有一定的局限性,模型的建立需要更长时间的验证,模型的评估应该进行 microCT 检测更加准确,骨缺损的范围后期尝试采用更小的距离制备骨不连,以上均是后期研究的重点。

作者贡献:作者吕利军、李闯兵负责实验实施、论文撰写,为共同一作,作者叶铄、吕利军负责实验数据分析处理,作者高秋明、彭伟负责数据和文章的校对。采用盲法评估。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《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稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] MEMISOGLU K, KESEMENLI CC. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury*. 2008;39:1119-1126.
- [2] 张严, 申震, 李紫阁, 等. 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 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(29): 4650-4655.
- [3] 王俊, 陈一心. 骨不连动物模型的研究进展 [J]. *江苏医药*, 2008, 34(5):509-510.
- [4] KELLY RR, MCCRACKIN MA, RUSSELL DL, et al. Murine Aseptic Surgical Model of Femoral Atrophic Nonunion. *MethodsX*. 2020;7:100898.
- [5] ROBERTO-RODRIGUES M, FERNANDES RM, SENOS R, et al. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit. *Injury*. 2015;46(4): 649-654.
- [6] 郝霖雨, 张中文, 姜先明. 犬骨不连动物模型的建立 [J]. *中国农学通报*, 2007,23(3):37-39.
- [7] KEY JA. The effect of a local calcium depot on osteogenesis and healing of fractures. *J Bone Joint Surg*. 1934;16(1):176-184.
- [8] VOLPON JB. Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1994;113(6):312-317.
- [9] MARKEL MD, BOGDANSKE JJ, XIANG Z, et al. Atrophic nonunion can be predicted with dual energy X-ray absorptiometry in a canine osteotomy model. *J Orthop Res*. 1995;13(6):869-875.
- [10] 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.
- [11] 郭征, 郭霞, 郑振耀. 组织隔离法与机械活动法在兔胫骨骨不连模型建立中的作用 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2004,6(11):1261-1264.
- [12] 郭树章, 季明华, 许刚, 等. 兔骨折延迟愈合动物模型的建立 [J]. *实用骨科杂志*, 2012,18(3):230-232.
- [13] BROWNLOW HC, SIMPSON AHRW. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res*. 2000;18(3):438-442.
- [14] BULUT O, EROHLU M, OZTURK, et al. Extracorporeal shock wave treatment for defective nonunion of the radius: a rabbit model. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2006;14(2):133-137.
- [15] WU XQ, WANG D, LIU Y, et al. Development of a tibial experimental non-union model in rats. *J Orthop Surg Res*. 2021;16:261.
- [16] MENDER MM, STUTZ J, EHNERT S, et al. Development of an ischemic fracture healing model in mice. *Acta Orthop*. 2022;93:466-471.
- [17] 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.
- [18] 李振宇. 大鼠胫骨骨不连模型制作及骨不连骨组织中基底膜蛋白多糖的检测 [D]. 青岛: 青岛大学, 2012.
- [19] HU CT, OFFLEY SC, YASEEN Z, et al. Murine model of oligotrophic tibial nonunion. *J Orthop Trauma*. 2011;25(8):500-505.
- [20] 刘建恒, 张里程, 唐佩福. 骨折延迟愈合和不愈合的诊治现状 [J]. *中华外科杂志*, 2015,53(6):464-467.
- [21] HIXON KR, MILLER AN. Animal models of impaired long bone healing and tissue engineering- and cell-based in vivo interventions. *J Orthop Res*. 2022;40(4):767-778.
- [22] LOZADA-GALLEGOS AR, LETECIPIA-MORENO J, PALMA-LARA I, et al. Development of a bone nonunion in a noncritical segmental tibia defect model in sheep utilizing interlocking nail as an internal fixation system. *J Surg Res*. 2013;183(2):620-628.
- [23] NUSSLER AK, ROLLMANN MF, HERATH SC, et al. Development of an ischemic fracture healing model in mice. *Acta Orthop*. 2022;93: 466-471.
- [24] TAWONSAWATRU T, HAMILTON DF, SIMPSON AH. Validation of the use of radiographic fracture-healing scores in a small animal model. *J Orthop Res*. 2014;32(9):1117-1119.
- [25] LI Y, CHEN SK, LI L, et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat*. 2015;3(3):95-104.
- [26] OHGUSHI H, GOLDBERG VM, CAPLAN AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*. 1989;60(3):334-339.
- [27] BOSEMARK P, PERDIKOURI C, PELKONEN M, et al. The Masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. *J Orthop Res*. 2015;33:488-495.
- [28] KERZNER B, MARTIN HL, WEISER M, et al. A Reliable and Reproducible Critical-Sized Segmental Femoral Defect Model in Rats Stabilized with a Custom External Fixator. *J Vis Exp*. 2019;(145):10.3791/59206.
- [29] HIETANIEMI K, PELTONEN J, PAAVOLAINEN P. An experimental model for nonunion in rats. *Injury*. 1995;26(10):681-686.
- [30] LOZADA-GALLEGOS AR, LETECIPIA-MORENO J, PALMA-LARA I, et al. Development of bone nonunion in a noncritical segmental tibia defect model in sheep utilizing interlocking nail as an internal fixation system. *J Surg Res*. 2013;183(2):620-628.
- [31] ROBERTO-RODRIGUES M, FERNANDES RMP, SENOS R, et al. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit. *Injury*. 2015;46(4): 649-654.
- [32] GARCIA P, HOLSTEIN JH, MAIER S, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res*. 2008;147(1):84-91.
- [33] ONISHI T, SHIMIZU T, AKAHANE M, et al. Robust method to create a standardized and reproducible atrophic non-union model in a rat femur. *J Orthop*. 2020;21:223-227.
- [34] LI Y, CHEN SK, LI L, et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat*. 2015;16(3):95-104.
- [35] ZHANG Z, YANG X, CAO X, et al. Current applications of adipose-derived mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration: A review of cell experiments, animal models, and clinical trials. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:942128.
- [36] 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;26:1-12; discussion 12-14.
- [37] LIN EA, CHUAN-JU L, ALEXA M, et al. Prevention of atrophic nonunion by the systemic administration of parathyroid hormone(PTH 1-34) in an experimental animal model. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):719-723.

(责任编辑: YJ, WZH, ZN, WL)