

骨折动物模型的研究进展

汤译博, 赵亮, 苏佳灿

(第二军医大学附属长海医院骨科, 上海 200433)

【摘要】 随着传统重工业和交通事业的飞速发展, 骨折的发生率逐年升高。临床上骨折的发生原因、机制、愈合及其影响因素极多, 尤其是骨折愈合是一个长期而复杂的过程, 并且受到稳定性、血供、感染、外部刺激等多因素的影响, 若措施不当会对患者造成伤害。制备正确的动物模型可以准确模拟骨折发生, 有效地指导临床实践。本文就骨折动物模型的材料、制备、应用等做一简要综述, 以期能为正确合理地选择骨折动物模型提供一定的参考。

【关键词】 骨折; 模型, 动物; 骨折愈合; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.01.028

Research progress of animal model of fracture TANG Yi-bo, ZHAO Liang, SU Jia-cai. Department of Orthopaedics, the Affiliated Changhai Hospital of the 2nd Military University, Shanghai 200433, China

ABSTRACT Accompanying with the development of traditional heavy industry and traffic condition, the incidence of fracture appears an upward trend significantly. There are different reasons, mechanisms, healing styles of fracture. Furthermore, the healing of fracture is a long and complex procedure, affected by many contributing factors, such as stability, blood supply, infection. A suitable animal model can copy the clinical situation closely, representing an essential tool to analyze the biology of fracture healing. This article makes a brief review on the material, technique, selection, and development of animal models in fracture-healing research, looking forward to providing some reference on choosing an animal model correctly and reasonably.

KEYWORDS Fractures; Model, animal; Fracture healing; Review literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(1):91-93 www.zggszz.com

动物模型是进行科学实验的重要工具, 骨折动物模型的建立是研究骨折相关问题的基础。临床上骨折的发生原因、机制、愈合及其影响因素极多, 尤其是骨折愈合是一个长期而复杂的过程, 受到稳定性、血供、感染、外部刺激等多方面因素的影响, 若措施不当会对患者造成伤害。动物模型可以模拟人类骨折发生时的各种状态, 在此基础上进行骨折预防、机制和治疗的研究, 可以有效地指导临床实践。尽管动物模型在科学实验中普遍存在, 并且在骨折模型研究方面起步也比较早, 形成了许多经典实用的动物模型。但随着科学的进步及研究的深入, 一些临床模拟性较低的模型不再适用, 需要创造与实际更加相符的动物模型。另一方面, 根据临床不断出现出的新问题, 更需要制备合适的动物模型对其进行研究。

1 骨折动物模型分类

1.1 鼠模型 鼠价格低廉、喂养方便、生长周期短, 并且基因组图谱详尽, 可以更好地研究骨修复分子机制, 是常用的骨折愈合动物模型。鼠的骺板终生存在, 可用于制作婴幼儿骨骺坏死的模型。并且鼠没有呕吐反射, 在进行口服给药并且需要定量的实验中较为适用。但是鼠原始的骨结构中不含有哈佛系

统, 不能完全模拟人类的骨骼重建过程, 因此不能用于观察哈佛氏系统的形态、功能和组织性质的研究, 鼠的骨代谢与人类差异也较大^[1]。另外, 鼠的体型小, 一些方法特别是手术操作不易实施。早期鼠骨折愈合模型主要是利用三点受力原理, 在大鼠胫骨^[2]和股骨^[3]上制备横形骨折模型。这种模型可重复性高、操作简便, 但需要较复杂设备支持。Hiltunen 等^[4]改良了股骨模型装置, 专门用于建立稳定性骨折模型。Thompson 等^[5]依靠牵引骨生成技术, 制备了胫骨外固定模型, 以研究膜内骨化的过程。

1.2 犬模型 犬是制备骨折愈合模型最常用的动物, 在骨成分、骨密度、骨质及股骨的灰分、胶原、可提取蛋白和胰岛素样生长因子-1 的含量等方面, 成年犬与人类骨骼相似程度最高, 并且根据骨块机械性能的检测, 犬的骨折强度也与人类相似^[1]。此外, 犬骨折愈合过程中哈佛系统的重建与人接近且重建速度较快。另一方面, 犬是杂食类动物, 其消化系统与人相似, 可进行口服给药。但非甾体类抗炎药对犬类有毒性效应, 服用阿司匹林等药物后会引引起胃肠道溃疡、失血、甚至死亡^[6]。

1.3 兔模型 兔性情温顺, 便于饲养, 耳缘静脉便于取血, 也是制备模型时较为常用的动物。兔的骨骼转化速度快, 约达到了人类的 3 倍, 因此可以在短期内观察骨折愈合时骨组织的变化。其骨骺多数钙化或消失, 与成年人相似, 可用于模拟成年人股骨头坏死的模型。但兔是草食类动物, 消化系统与人差异较大, 不应用于骨折愈合的药物实验。兔的后肢发达, 股骨粗大, 可用于股骨头坏死的动物模型制备, 也多用于疲劳性骨折的模型制备^[7]。

基金项目: 上海市科委纳米专项基金(编号: 0852nm04300); 上海市人事局人才发展资金(编号: 2009003); 上海市卫生局专项基金(编号: 2009S018)

Fund programs: Supported by Science Technical Committee of Shanghai for Nanometer Technique (No: 0582nm04300)

通讯作者: 苏佳灿 E-mail: sujiaican@yahoo.com.cn

1.4 其他动物模型 骨折动物模型中常用的还有猪、羊、马、猫及灵长类动物等。羊、马的体型较大,获取相对不易,不宜用于大样本动物实验。羊具有特殊的消化系统,有反刍现象,不适合口服给药。而灵长类动物的骨骼结构及性能等方面与人类最接近,适合模拟人类各种情况的骨折模型,但由于其饲养比较困难,周期较长,因而用于研究模型受到一定限制。

2 骨折动物模型的应用

2.1 长骨干骨折模型 长骨干横形骨折在车祸、训练中发生概率很高,成功的动物模型有助于研究骨折愈合的机制、条件等,有极高的临床意义。

2.1.1 闭合骨折模型 闭合模型主要利用三点受力原理模拟长骨干骨折时的受力情况,可借由专用的折骨器造成^[2-4]。小鼠麻醉后固定在动物台上,使带有重物的钝性铡刀从高处落下,折断胫骨或股骨,则模型即制作成功。这种模型操作简单,可重复性高,与临床实际情况相似度高,是应用比较广泛的模型,用于骨折后愈合过程的研究,特别是软骨组织在骨修复中的作用。但是造模时打击部位可能不同,受力不均匀,有可能造成粉碎性骨折,并对长骨周围软组织的损伤不一,而且可控性较差,操作过程中易损伤骨干周围的组织、神经及一些大血管。其他闭合造模也可以用棍棒直接击打或徒手^[8]掰断胫骨,这种方法虽然比较简单,但只用于体态较小、性情温驯的动物,对绵羊、马等大型动物较难实施。

2.1.2 开放骨折模型 开放模型可提高造模的可控性,将动物麻醉后,股骨内侧从髌骨内侧缘中点开始向近侧做切口,切口大小依据动物体型大小而定,在股骨中段用线锯或摆锯行股骨干截骨,造成横形骨折^[9]。开放造模所得到的各组动物模型类型均一,骨折部位一致,对骨干周围的组织、神经、血管等损伤较小。然而开放性模型断端平整,固定相对不稳定,导致骨折端易滑动,从而引起不同的愈合反应^[10],并且这种模型与临床实际情况区别较大,因此除用于研究骨折愈合的机制、分子及条件影响外,还可通过造成部分骨缺损用于人造材料的应用等研究。闭合骨折模型和开放骨折模型在实施操作前,可向计划折断的骨中插入髓内针进行内固定,即可制备稳定性骨折模型^[11],可用于骨折后膜内成骨的研究。但其断端仍有一定程度的活动,愈合过程中会出现部分软骨,愈合方式多样,因此一般不用于研究单一某种因素或分子对骨折后膜内成骨的影响。

2.1.3 基因骨折模型 文献报道^[12-14]有特殊发育阶段骨生长障碍和骨折的鼠模型,其基因型为常染色体隐性突变,形成自发性骨折。SFX 鼠直到停止哺乳后未见机体异常,至 7~8 周时,X 线显示股骨远端的自发性不完全性骨折,并显示骨痂形成,而完全性骨折较少观察到。该模型可用于研究青春期的骨生长机制。

2.2 骨不连动物模型

2.2.1 骨缺损模型 早期骨不连模型通过扩大骨缺损的程度,即增大骨折两断端间隙来建立。由于间隙扩大后影响组织分化和再血管化程度,骨膜也受到较大损害,使骨愈合不完全^[15]。但这种模型与临床实际相差较大,可重复性低,现在已较少使用。

2.2.2 不稳定性模型 固定是骨折愈合过程中极为重要的一步,断端稳定性差易使两断端产生滑动,影响组织、血管的再生和成骨细胞的活动^[16]。Volpon^[17]在成年犬桡骨骨干中段

形成骨缺损,并不用任何内外固定,使两断端能产生任意旋转或滑动,破坏了断端稳定性,同时造成了增生性骨不连和萎缩性骨不连两种模型。然而同时有文献报道,骨折端适度的轴向旋转运动能刺激骨痂形成,有助于骨折愈合,但断端的剪切滑动会损伤周围组织,促进纤维组织增生,形成增生性骨不连^[18]。

2.2.3 骨膜切除模型 Eckardt 等^[19]改良 Borwnlow 的方法,将新西兰大白兔胫骨截断后,去除相当于骨干直径长度的断端骨膜和髓腔内组织,用钢板固定骨折端,使之保持 2 mm 间隙,造成萎缩性骨不连模型。由于在临床工作中常常出现骨折端骨膜过度剥离和扩髓的情况,这种通过切除骨膜和扩髓髓腔内组织来削弱骨愈合能力,形成骨不连的模型,临床模拟性较强,具有较高的临床指导意义。

2.3 骨质疏松动物模型 骨质疏松以骨量减少、骨脆性增加为主要表现,是老年人及绝经后妇女发生骨折的主要原因之一。建立合适的动物模型是开展骨质疏松病因、药物治疗以及愈合研究的关键。

2.3.1 全身性骨质疏松模型 全身性骨质丢失模型利用调节动物体内雌激素含量,使其分泌不足,模拟绝经后的状态。主要有手术摘除动物双侧卵巢和药物抑制两种方法。手术一般取 6~9 月龄的雌性大鼠,切除其双侧卵巢后进行观察,可见其血清雌二醇水平迅速下降,由此引起骨转化加快、骨量减少、骨强度下降,造成骨质疏松。并且在自然发生骨折时骨量减少部位上也与人类相似^[20]。这种模型成功率大,可控性强,且重复性高,是比较成功且应用广泛的骨质疏松引起骨折的模型。雌犬卵巢摘除后雌激素耗竭,但不会引起明显的骨丢失,骨组织形态及生化参数也变化不大,所以制备此类模型时应慎用犬作为实验动物。

非手术模型采取口服或皮下注射药物,抑制雌激素分泌或直接对骨造成影响。如给动物口服维甲酸,可观察到骨松质和骨皮质容量明显减少,骨组织微结构的病理改变,骨小梁数量下降,骨髓腔增大,皮质骨变薄。这种模型在症状及组织形态学上与人类都较为相似^[21]。此外,使用过量的糖皮质激素可直接抑制成骨细胞的活性,可在约 10 d 后见到明显的骨质丢失,是急性骨质疏松的造模方法。但是,某些使用药物所制备的模型需在实验过程中持续给药,否则在停药后,动物丢失的骨量会恢复至正常。

此外,还有报道通过对大鼠食物中钙与蛋白含量的干预,采用高蛋白低钙饲料饲养,可造成营养性骨质疏松模型^[22]。

2.3.2 局部骨质疏松模型 废用性骨质疏松模型,固定动物的某一肢体,例如用石膏固定动物肢体或用螺钉固定动物关节,人为制动造成动物肢体废退现象。对于防治瘫痪、骨折、术后长期卧床的患者出现骨质疏松有重要意义。并且这种模型可以将未制动肢体进行自身对照,减少了其他个体因素带来的干扰。悬吊模型采用将大鼠尾部悬吊,使其后肢悬空,造成机体骨矿化水平降低,钙磷代谢负平衡,导致骨质流失^[23]。

3 问题与展望

动物模型是否合适,需要从多个方面进行评价^[24-25]。首先,动物模型是否与临床实际相符,因为动物模型是用于对人类疾病的研究,只有尽可能符合临床实际情况,才使实验结果具有最大的可靠性,如果动物模型与相关的人类疾病差异过大,就失去了模型的意义。动物模型虽然能够较好地模拟人类骨折时的状态,但由于动物机体与人存在一定差异,并且骨折

愈合并不是局部过程^[26],因此在动物模型上得到的实验结果还需要进行临床试验。其次,模型的重复性、造模方法是否能制备出稳定均一的状态也是制备动物模型是否成功的关键之一,动物实验同样需要遵循重复的实验原则,其实验结果才真实有效,因此造模方法必须能稳定地模拟实际情况并且是制备得到的模型尽量相同,减少随机条件产生的差异。第三,造模方法是否易行,实验过程中往往样本量较大,需要实验人员重复造模,如果造模方法过于复杂,会加重实验人员的负担,并且增加造模过程中的不稳定因素,降低了可控性。

骨折动物模型在研究人类骨折中起到非常重要的作用,采用合适的动物模型可以对疾病研究起到事半功倍的效果^[27]。一方面,由于骨折发生时随机性较大,临床实践中会不断遇到新的问题,还需要对实际临床问题进行归纳总结,建立符合实际的新的动物模型;另一方面,对于已经建立的动物模型,还可结合实际与以往经验进行改良,或在原有模型上进行更深层次的研究。

参考文献

- [1] Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research[J]. *Endocrinology*, 1998, 139 (2): 663-670.
- [2] Greif J. A method for the production of an undisplaced reproducible tibial fracture in the rat[J]. *Injury*, 1978, 9(4): 278-281.
- [3] Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone[J]. *J Orthop Res*, 1984, 2(1): 97-101.
- [4] Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia[J]. *J Orthop Res*, 1993, 11: 305-312.
- [5] Thompson Z, Miclan T, Hu D, et al. A model for intramembranous ossification during fracture healing[J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(5): 1091-1098.
- [6] Jones RD, Batnes RE, Nimitz CT, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicosis in dogs and cats: 240 cases (1989-1990)[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1992, 201: 475-477.
- [7] Burr DB, Milgrom C, Boyd RD, et al. Experimental stress fractures of the tibia: Biological and mechanical aetiology in rabbits[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1990, 72: 370-375.
- [8] Imai Y, Terai H, Nomura - Furuwatari C, et al. Hepatocyte growth factor contributes to fracture repair by upregulating the expression of BMP receptors[J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(10): 1723-1730.
- [9] Phieffer LS, Meyer RA Jr, Gruber HE, et al. Effect of interposed periosteum in an animal physeal fracture model[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, (376): 15-25.
- [10] Einhorn TA. The science of fracture healing[J]. *J Orthop Trauma*, 2005, 19(10 Suppl): 4-6.
- [11] Holstein JH, Menger MD, Culemann U, et al. Development of a locking femur nail for mice[J]. *J Biomech*, 2007, 40(1): 215-219.
- [12] Beamer WG, Rosen CJ, Bronson RT, et al. Spontaneous fracture (sfx): a mouse genetic model of defective peripubertal bone formation[J]. *Bone*, 2000, 27(5): 619-626.
- [13] Houdebine LM. Transgenic animal models in biomedical research[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 360: 163-202.
- [14] Smits BM, Mudde JB, Van de Belt J, et al. Generation of gene knockouts and mutant models in the laboratory rat by ENU-driven target-selected mutagenesis[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2006, 16: 159-169.
- [15] Claes L, Eckert Hübner K, Augat P. The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2003, 388(5): 316-322.
- [16] Zilberman Y, Kallai I, Gafni Y, et al. Fluorescence molecular tomography enables in vivo visualization and quantification of nonunion fracture repair induced by genetically engineered mesenchymal stem cells[J]. *J Orthop Res*, 2008, 26: 522-530.
- [17] Volpon JB. Nonunion using a canine model[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1994, 113 (3) : 312-317.
- [18] Augat P, Burger J, Schorlemmer S, et al. Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(6): 1011-1017.
- [19] Eckardt H, Ding M, Lind M, et al. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2005, 87(10): 1434-1438.
- [20] Chachra D, Lee JM, Kasra M, et al. Differential effects of ovariectomy on the mechanical properties of cortical and cancellous bones in rat femora and vertebrae[J]. *Biomed Sci Instrum*, 2000, 36: 123-128.
- [21] Allen SP, Maden M, Price JS. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers[J]. *Dev Biol*, 2002, 251 (2): 409-423.
- [22] 乔伟伟, 许兰文, 杨幼明. 大鼠营养干预性骨质疏松症动物模型的研究[J]. *上海实验动物科学*, 2002, 22(3): 151-157.
- [22] Qiao WW, Xu LW, Yang YM. Study of animal model of osteoporosis caused by interfere in nourishment of rats[J]. *Shang Hai Shi Yan Dong Wu Ke Xue*, 2002, 22(3): 151-157. Chinese.
- [23] Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2005, 16: 129-138.
- [24] O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, et al. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(Suppl 1): 79-84.
- [25] Holstein JH, Matthys R, Histing T, et al. Development of a stable closed femoral fracture model in mice[J]. *J Surg Res*, 2009, 153 (1): 71-75
- [26] Shirley D, Marsh D, Jordan G, et al. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23: 1013-1021.
- [27] Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA, et al. Rodent models for the study of articular fracture healing[J]. *J Invest Surg*, 2007, 20: 87-95.

(收稿日期: 2010-04-13 本文编辑: 连智华)