

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.009

幼兔腓骨切除后再生腓骨的功能研究

韦 露,罗高斌[△],薄占东,周志广,阮中坚
(广西医科大学第一附属医院骨关节外科,南宁 530021)

[摘要] **目的** 通过建立幼兔大段腓骨切除模型,探讨再生的腓骨与健侧腓骨在组织形态、成骨能力、生物应力等方面是否存在差异。**方法** 3月龄新西兰小白兔20只,随机编号。取右侧腓骨(1.5 cm),X线监测其再生情况(15 d、30 d、60 d)。术后60 d取再生及健侧同位置腓骨(1.5 cm)。苏木素-伊红(HE)染色观察两者组织形态的差异、碱性磷酸酶(ALP)染色检测其成骨能力、3点弯曲试验测定两组骨生物力学。**结果** X线监测:15 d缺损区两端有新骨形成,取骨区有少许模糊影;30 d新生骨长入取骨区;60 d取骨区形成完整的新骨。生物应力检测:两侧腓骨差异无统计学意义($P>0.05$);HE染色、ALP染色:两侧腓骨在组织形态、成骨能力上未见明显差异。**结论** 幼兔腓骨切除后保留骨膜可原位再生腓骨,且再生腓骨与健侧腓骨在组织形态、成骨能力、生物应力无差异。

[关键词] 腓骨移植;再生骨组织;生物力学;碱性磷酸酶

[中图分类号] R681.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3337-04

The functional study of anagenetic fibula after removing of young rabbits
Wei Lu ,Luo Gaobin[△] ,Bo Zhandong ,Zhou Zhiguang ,Ruan Zhongjian
(*Department of Bone and Joint Surgery ,First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University ,Nanning ,Guangxi 530021 ,China*)

[Abstract] **Objective** To investigate the difference between anagenetic fibula with normal fibula in mechanical parameters, osteogenesis and tissue morphology, through establishing the model of fibula defect in rabbit. **Methods** Twenty New Zealand white rabbits were randomly divided. Model group were cuted the right fibula bone with 1.5 cm length. X-ray was used to observe the anagenetic fibula(half month, one month, two months). Stumped the anagenetic and normal fibula(1.5 cm) after two months. Three-point bending test was used to test the mechanical properties;alkaline phosphatase staining was checked the bone-formation ability;HE staining to check the tissue morphology. **Results** After half month a few new bone were formed at the edges of resection area, one month later new bone were growed in the donor site, and after two month new fibula were completely formed. The three point bending test of fibula showed;there was no statistically significant difference between anagenetic fibula and normal fibula($P>0.05$);alkaline phosphatase staining and HE staining showed the anagenetic fibula bone forming ability, histology had no significant difference compared with normal fibula. **Conclusion** Fibula were regenerated successfully after removing which retaining the periosteum. Compared with the normal fibula, there were no remarkable differences in mechanical parameters, osteogenesis and tissue morphology.

[Key words] fibula transplantation;anagenetic bone;biomechanic;salkaline phosphatase

自体骨被认为是骨移植材料的“金标准”,因为它结合了骨移植材料所需特性:成骨、骨诱导和骨传导^[1]。腓骨移植作为自体骨移植的重要组织来源,已广泛应用于治疗骨不连、关节融合、修复骨缺损^[2-5]。腓骨通过上、下胫腓韧带及骨间膜与胫骨联结在一起形成一个完整的力学结构,参与支撑体质量,维持踝关节的正常功能。临床上腓骨作为移植骨源移植后,保留其原有骨膜,使腓骨具有再生能力,对于儿童尤其重要。但是再生的腓骨组织与正常腓骨组织在形态、功能、生物应力、组织结构上是否存在差异,国内外研究很少。本研究通过建立幼兔腓骨移植的动物模型,观察移植后再生的腓骨组织与健侧腓骨组织在组织形态、成骨能力及生物应力等方面是否存在差异,为临床上进行自体腓骨移植提供相关的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂和设备 碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(南

京建成生物研究所提供);乙二胺四乙酸(EDTA,成都化学试剂厂提供);骨科切片机;岛津AGX万能材料试验机。

1.1.2 实验动物 新西兰小白兔40只(广西医科大学动物实验中心提供),3月龄、体质量2.00~2.45 kg、平均(2.2±0.28)kg,雌性未孕产。20只动物随机分组编号,以右侧腓骨为实验组,左侧为对照组。同时为了验证保留骨膜与否对腓骨1.5 cm骨缺损模型愈合的作用,本实验设置不保留骨膜组,每组实验动物4只。

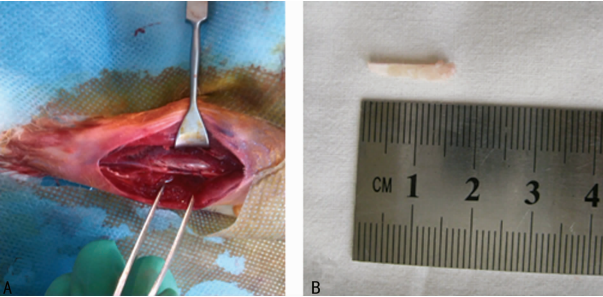
1.2 方法

1.2.1 动物模型

1.2.1.1 麻醉 小白兔仰卧位固定,经耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠溶液,剂量1 mL/kg。

1.2.1.2 切除方法 实验组:取每只幼兔右侧腓骨作为实验组,常规消毒,铺巾。自腓骨头向下沿外踝作纵行切口,切开皮肤、皮下组织和筋膜后,自比目鱼肌与腓骨长短肌之间进入。

在腓骨中上将腓骨长短肌、比目鱼肌向前后侧分离,用骨膜剥离器自下向上剥离腓骨骨膜,使腓骨斜向起始肌纤维连同骨膜一起剥开。在腓骨中段量取约 1.5 cm 长度^[6],一般认为缺损值达到骨直径的 1.5~2.0 倍即可认为是缺损临界值^[7]。腓骨近端及远端用尖嘴咬骨钳剪断(注意保护骨膜),取出骨块(图 1)。仔细止血,依次缝合深筋膜、皮下组织及皮肤。对照组:取每只幼兔左侧腓骨,腓骨不切除,作为实验自身对照。不保留骨膜实验组:手术步骤基本同切除腓骨,在切取腓骨时不保留骨膜将腓骨及骨膜完整切除。



A:保留骨膜取出腓骨;B:取出腓骨组织(1.5 cm)。

图 1 术中保留骨膜切取腓骨

1.2.1.3 X 线片监测腓骨再生的情况 分别于术后 15、30、60 d 同时摄双侧小腿照片,观察再生腓骨的生长情况及形态变化,并进行影像学分析。

1.2.1.4 取材 实验过程中,4 只兔子术后出现切口感染、患疥螨等并发症,治疗未果,死亡,未达到实验终点,予以剔除。其余兔子于术后 60 d 用 3% 戊巴比妥钠(1 mL/kg)静脉麻醉后,截取原位再生腓骨组织(约 1.5 cm),同时截取对侧相同部位的腓骨组织(约 1.5 cm),见图 2。用生理盐水湿纱布将取下腓骨组织包裹,置于一 20 ℃ 的冰箱中,以备实验使用。

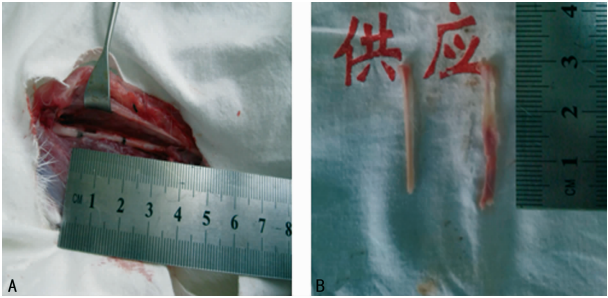
1.2.2 生物应力测定 采用岛津万能材料试验机进行 3 点弯曲试验,将包裹好的小白鼠腓骨标本固定在 2 个支撑点上,连接传感器的马鞍形压头于腓骨中点处施加压力。其中跨距为 15 mm,加载速度以 1 mm/min 下压腓骨,试验以腓骨断裂为终点。从计算机软件上记录荷载-跨中挠度曲线数据:最大荷载、弹性荷载、最大挠度、弹性挠度、弹性模量。

1.2.3 骨组织形态染色 制作骨组织切片。(1)取材固定:取骨干骨皮质,用锯子取 1.5 cm×1.0 cm×0.5 cm 骨组织固定于 10% 甲醛固定液内 24 h;(2)脱钙:将固定好的骨组织放入 10% EDTA 脱钙液,37 ℃ 恒温下脱钙 48 h,用细针能刺入骨头内无阻力表示脱钙完毕;(3)脱水:利用脱水机自动脱水;(4)包埋:骨组织按常规包埋入蜡;(5)切片:利用骨科切片机切取

4 μm 的切片。

1.2.3.1 苏木素-伊红(HE)染色采用常规方法

1.2.3.2 ALP 染色 应用 ALP 染色试剂盒按说明书进行染色,ALP 着色呈灰黑色,光学显微镜下观察。



A:原位再生的腓骨组织;B:再生的腓骨组织与健侧腓骨组织。

图 2 再生的腓骨组织

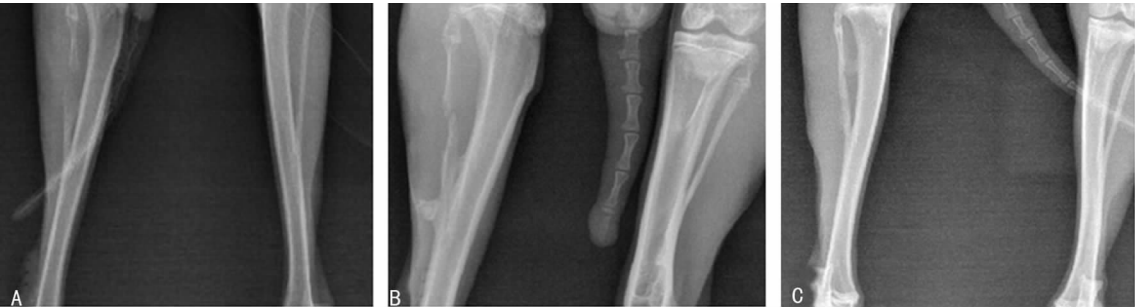
1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 X 射线监测结果 保留骨膜切取腓骨术后 15 d:移植区两端有新骨形成,骨皮质连续性中断,移植区有少许模糊影,骨痂影开始沿向由界面两端向间隙中央生长,局部骨痂连接,间隙内呈低密度影像;30 d:新生骨长入移植区,骨皮质连续性基本恢复,骨端界面较清晰,新生骨小梁充满间隙;60 d:取骨区形成完整的新骨,骨皮质完整连续,间隙内密度显著增加,难以辨认骨端界面,骨纹理呈极向性排列,见图 3。不保留骨膜组术后 15 d:骨折两端出现明显骨痂生成;30 d:骨痂从骨缺损两端向中央推进,由高渐低呈楔形或斜坡状,呈“推进形”骨痂;60 d:随着骨缺损进一步修复与骨缺损封闭,骨痂表损相邻的胫骨侧可见部分新生骨痂,形成类似截面“碗状”骨缺损状态,两端新生骨面有大量骨痂成不规则状,见图 4。

2.2 生物应力测定 与对健侧腓骨比较,再生腓骨骨干的最大荷载、弹性荷载、最大挠度、弹性挠度、弹性模量均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 组织学观察 HE 染色:实验组骨组织骨皮质板层骨结构完整,骨陷窝内见骨细胞,哈弗斯管结构清晰、通畅,板层骨沿哈弗斯管排列,成熟骨皮质结构已经完成,与对照组比较差异无统计学意义。ALP 染色:实验组与对照组骨皮质内侧周边及骨陷窝内散在染色均呈灰黑色,ALP 的活性较活跃,显示成骨细胞成骨能力强,ALP 着色两者差异无统计学意义,见图 5。



A:术后 15 d;B:术后 30 d;C:术后 60 d。

图 3 保留骨膜术后 15、30、60 d X 线片

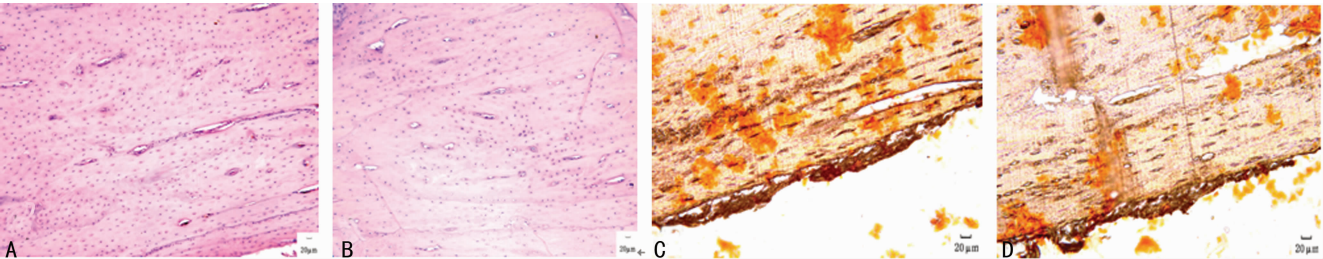
表 1 腓骨 3 点弯曲实验($\bar{x}\pm s$)

组别	n	最大荷载(N)	弹性荷载(N)	最大挠度(mm)	弹性挠度(mm)	弹性模量(MPa)
对照组	16	82.3±30.4	64.5±28.1	0.44±0.08	0.43±0.06	148.7±52.2
实验组	16	80.5±24.5	59.7±20.8	0.41±0.07	0.41±0.09	146.4±48.4



A: 术后 15 d; B: 术后 30 d; C: 术后 60 d。

图 4 不保留骨膜术后 15、30、60 d X 线片



A: 实验组(HE×10); B: 对照组(HE×10); C: 实验组(ALP 染色×20); D: 对照组(ALP 染色×20)。

图 5 各组组织学观察

3 讨 论

在骨再生及愈合过程中年龄具有重要的影响, 幼兔处于生长期, 其骨再生能力较成年及老年兔较强, 因此本实验采用 3 月龄骨再生能力较强的幼兔进行实验。国内外关于骨缺损模型的长度存在一定的差异。有研究建立了骨缺损 1.0、1.2、1.4、1.6 和 2.0 cm 组, 结果桡骨中段缺损(包括骨膜)尺寸大于或等于 1.4 cm 骨愈合低, 模型更加可靠。Niemeyer 等^[8]截除桡骨远端 1.5 cm 骨段(包括骨膜)造骨缺损模型, 术后骨缺损区, 无骨性连接, 骨缺损范围 0.8~1.2 cm。而目前还没有文献报道腓骨骨缺损模型, 在骨缺损模型建立中, 腓骨和桡骨在解剖上都有胫骨和尺骨伴行, 两者在骨缺损愈合过程相近, 故本研究选择缺损 1.5 cm 腓骨制作模型。本实验切取腓骨组织后, 通过 X 线片监测, 术后 15 d: 移植区两端有新骨形成, 骨皮质连续性中断, 移植区有少许模糊影; 术后 30 d: 骨皮质连续性基本恢复; 术后 60 d: 骨皮质完整连续, 取骨区形成完整的新骨。腓骨移植后移植区骨缺损的骨再生是 1 种特殊的过程, 不仅是骨愈合的过程而且是骨再生的过程, 其再生机制与骨折愈合相似, 存在膜内成骨和软骨成骨两种方式^[9], 但其又有所特点以膜内成骨为主, 软骨成骨为辅^[10-11]。实验组不保留骨膜完整切除腓骨及周围骨膜后, 术后 X 线片监测结果提示缺损区未见骨性连接, 缺损两端可见大量骨痂形成。说明本实验建立的骨缺损模型是可行的, 同时也验证了保留骨膜在骨缺损骨再生愈合中具有重要作用。

骨生物力学研究骨组织在外界作用下的力学特征和骨在受力后的生物学效应是反映骨强度的最敏感、最可靠的评价指标。本次试验中, 采用 3 点弯曲法检测兔子腓骨的力学性能, 此力学试验适用于长骨(皮质骨)力学性能的测定^[12]。本实验中再生的腓骨与对侧腓骨比较, 其生物力学参数差异无统计学意义, 腓骨移植后缺损区再生的腓骨具有良好的刚度、韧性及弹性, 可与胫骨及周围韧带重新形成一个完整的力学结构, 共同参与下肢的负重与活动, 维持踝关节稳定。ALP 通常被认为是成熟的成骨细胞的标志之一, 其活性的高低可反映成骨细胞的成熟状况。本文 ALP 染色结果显示再生的腓骨组织与正常腓骨组织的在成骨能力方面无明显的差异。HE 染色提示两者亦无明显差异, 在组织形态上说明再生腓骨组织具有正常的组织结构, 从内在结构上维持腓骨的功能。

通过本次试验, 发现再生的腓骨组织与正常的腓骨在生物应力、成骨能力、组织形态等方面并无明显差异。从而第 1 次从实验角度验证了保留骨膜后再生的腓骨组织与正常的腓骨组织具有相同的生物功能及形态特点, 可起到原有腓骨的功能。

在小儿骨科的临床实践过程中发现靠近关节的肿瘤、病理性骨折、慢性骨髓炎时常会面临如何选取手术方式的困惑。由于靠近关节, 而小儿骨骼发育尚未完全, 直接放置内固定物会影响骨骼的发育、放置异体骨则产生骨不愈合或免疫排异等并发症^[5,13]。选取自体腓骨移植髓内固定骨折、填充骨缺损作为

一种较为理想的手术方式,已在临床上广泛应用。但是蔡林等^[14]通过对儿童行腓骨切除术后的长期随访中发现儿童腓骨切除后对踝关节的结构有影响,腓骨的稳定性和完整性在防止踝关节外翻和胫骨远端骨骺楔形样改变起着重要作用。在临床实践中通过保留腓骨骨膜,可原位再生腓骨组织。因此,在临床行腓骨移植时,临床医生应注意保留骨膜的完整性以原位再生腓骨,将供区的影响降至最低。

参考文献

[1] Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science[J]. Clin Orthop Relat Res, 2000 (371):10-27.

[2] Dhatt SS, Bhagwat KR, Kumar V, et al. Chondroblastoma in a metatarsal treated with autogenous fibular graft: a case report[J]. J Foot Ankle Surg, 2012, 51(3):356-361.

[3] Lin KC, Tarng YW, Hsu CJ, et al. Free non-vascularized fibular strut bone graft for treatment of post-traumatic lower extremity large bone loss[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2014, 24(4):599-605.

[4] Sen RK, Tripathy SK, Goyal T, et al. Osteosynthesis of femoral-neck nonunion with angle blade plate and autogenous fibular graft[J]. Int Orthop, 2012, 36(4):827-832.

[5] de Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis[J]. J Bone Joint Surg Am, 2007, 89(3):649-658.

[6] 赵明东, 潘志宏, 朱梁豫, 等. 建立桡骨缺损模型:骨缺损标准尺寸的确立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2):213-218.

[7] Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates[J]. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77(5):734-750.

[8] Niemeyer P, Szalay K, Luginbuhl R, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model[J]. Acta Biomater, 2010, 6(3):900-908.

[9] Yu YY, Bahney C, Hu D, et al. Creating rigidly stabilized fractures for assessing intramembranous ossification, distraction osteogenesis, or healing of critical sized defects[J]. J Vis Exp, 2012, 15(62):3552.

[10] 艾田, 张俊德, 程添栋, 等. 伊里扎诺夫技术修复兔胫骨骨缺损成骨机制的研究[J]. 临床骨科杂志, 2012, 15(2):202-204.

[11] 张文涛, 卢世璧, 张浩. 骨缺损修复机制探讨[J]. 中国临床康复, 2002, 6(2):186-187.

[12] 崔伟, 刘成林. 基础骨生物力学(二)动物骨生物力学指标的选择及计算方法[J]. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(1):93-95.

[13] Toy PC, White JR, Scarborough MT, et al. Distal femoral osteoarticular allografts: long-term survival, but frequent complications[J]. Clin Orthop Relat Res, 2010, 468(11):2914-2923.

[14] 蔡林, 王华, 汤华, 等. 儿童腓骨移植对供腿功能影响的长期随访[J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 25(3):264-266.

(收稿日期:2015-02-03 修回日期:2015-08-10)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 三种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。