

一种改良大鼠颅骨缺损动物模型的构建及应用

张雅雯¹, 朱光旭², 李雅喆³, 李昊⁴, 王绍晔⁴, 张皓云¹, 王凤斌¹

(1. 潍坊医学院基础医学院, 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院临床医学院, 潍坊 261053;

3. 华中农业大学动物科学技术学院/动物医学院, 武汉 430070;

4. 潍坊医学院生物科学与技术学院, 潍坊 261053)

[摘要] 目的 探讨理想的大鼠颅骨缺损模型构建方法, 提高骨缺损动物模型成功率。方法 选取成年雄性SD大鼠40只, 随机分为对照组和实验组, 对照组应用传统的颅骨缺损模型手术方法, 只用空心环钻头, 垂直于颅骨表面用力, 钻取颅骨全层缺损; 实验组应用改良的手术方法, 用空心环和实心两种钻头, 而且在钻取颅骨过程的不同阶段改变钻头的用力方向。比较两组模型的手术钻孔时间, 以及术中是否有骨膜、硬脑膜、脑组织损伤和出血等并发症, 术后8周观察两组模型中植入的氧化铝生物陶瓷材料有无移位、松动以及与骨结合的情况, 并比较两组造模成功率。结果 与对照组相比, 实验组手术钻孔时间明显缩短($P<0.01$), 术中骨膜、硬脑膜、脑组织损伤和出血等并发症显著减少($P<0.05$), 且术后氧化铝生物陶瓷材料无移位和松动情况发生($P<0.05$), 材料与颅骨结合良好, 造模成功率明显提高($P<0.05$)。结论 改良的大鼠颅骨缺损模型构建方法具有手术钻孔时间短、并发症少等优点, 可大大提高造模成功率, 并能有效评价骨科植入材料在体内的骨修复性能。

[关键词] 颅骨缺损; 动物模型; 氧化铝生物陶瓷; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)03-0227-05

大段骨缺损是临床骨科的一大难题, 研发理想的骨科材料对于骨缺损的修复有着广阔的发展前景。大鼠颅骨缺损模型具有可重复性强、适宜于多种不同类型骨科材料的应用评估等优点, 现已广泛应用于骨组织工程实验研究^[1-2]。临界骨缺损(critical size defects, CSD)是指在特定骨和动物中, 活体动物不会自发愈合的最小骨缺损^[3]。双侧直径5 mm的骨缺损是最典型的大鼠颅骨CSD。与体内其他骨相比, 颅骨中血液供应及骨再生能

力均较差, 因此, 颅骨CSD动物模型是评价骨科材料体内骨修复性能的理想模型^[4], 但在构建模型过程中出血、硬脑膜和脑组织损伤等并发症会影响骨科植入材料在体内的骨修复过程, 甚至导致动物死亡率增加。本研究改良了动物模型制备方法, 以期建立损伤小、成功率高、能有效评价骨科材料性能的大鼠颅骨缺损模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级12周龄雄性SD大鼠40只, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[SCXK(鲁)2019-0003], 体质量300~350 g, 随机分为对照组16只和实验组24只。大鼠饲养于潍坊医学院动物实验中心[SYXK(鲁)2019-0016]。本课题所有实验步骤均经潍坊医学院实验动物伦理委员会核准(准字

[收稿日期] 2019-10-21

[基金项目] 潍坊医学院博士启动基金(2017BSQD25); 大学生创新创业训练项目(S201910438003)

[作者简介] 张雅雯(1995—), 女, 硕士研究生。

E-mail: 1972670016@qq.com

[通信作者] 王凤斌(1962—), 女, 硕士生导师, 教授, 从事神经与运动相关疾病的基础研究。

E-mail: wfb1962@163.com

号:2019SDL033)。

1.2 主要仪器与试剂

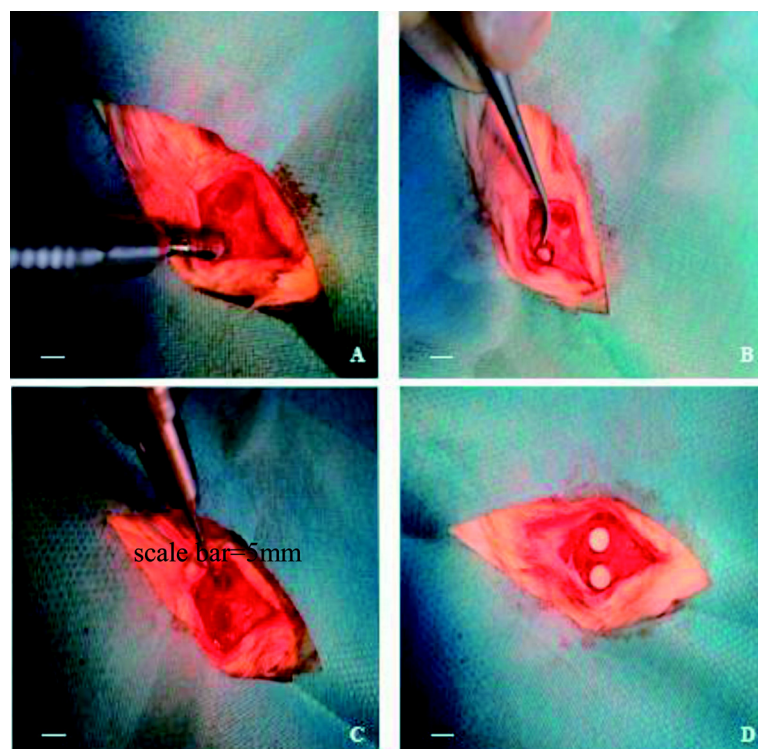
小动物骨钻(南京卡尔文生物科技有限公司, KW-LGZ), 配套空心环钻头(外径 5 mm, 内径 4 mm), 实心磨钻头(直径 1 mm); 水合氯醛(北京西浓科技有限公司); 氧化铝生物陶瓷(直径 5 mm, 厚度 2 mm), 由北京中材高新材料股份有限公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 对照组大鼠颅骨缺损模型构建 将对照组 16 只大鼠用质量分数为 10% 的水合氯醛(3.0~3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉, 俯卧位固定于手术台上。对照组大鼠常规手术^[5], 只用空心环钻头垂直于颅骨表面用力, 在矢状缝左右两侧的顶骨各钻取直径 5 mm 的圆形全层骨缺损。从骨缺损处分别植入氧化铝生物陶瓷, 逐层缝合。术后动物侧卧位, 注意保温, 连续 3 d 每日每只肌肉注射青霉素(20 万单位)以防止感染。

1.3.2 实验组大鼠颅骨缺损模型构建

1.3.2.1 暴露颅骨



A: 用空心环头钻穿颅骨; B: 用眼科镊子去除颅骨; C: 用实心磨钻头打磨残留骨组织; D: 植入氧化铝生物陶瓷材料。标尺 = 5 mm。

图 1 改良大鼠颅骨缺损模型构建手术过程

Figure 1 The construction process of modified rat skull defect model

始, 沿头顶部正中中线纵行皮肤切口 1.5~2.0 cm, 用手术刀柄轻轻分离皮下组织。然后沿颅骨矢状缝整齐切开骨膜, 手术刀柄仔细剥离骨膜下组织, 充分暴露双侧顶骨、枕骨和部分额骨。

1.3.2.2 颅骨钻孔及材料植入 手术中用无菌生理盐水滴注降温(1~2 滴/s), 于大鼠颅骨顶中线两侧各钻取一个直径为 5 mm 的圆形全层骨缺损。开始先用空心环钻头低速(1 400~1 500 r/min)垂直方向钻取颅骨, 避免转速过快不易控制而导致钻头伤及硬脑膜。开始时可稍微附加外力, 以增加颅骨钻取速度并缩短手术时间。接近颅骨钻穿时需动作轻柔, 钻头由垂直位分别向前、后、左、右四个方向倾斜 20°~30°, 不再附加外力, 单纯凭借电钻的自然重力使大部分颅骨间断钻穿(图 1A), 保留少部分颅骨的连接。然后用眼科镊子测试颅骨有松动后, 沿着周边圆形缺损将颅骨去除(图 1B)。再用实心磨钻头仔细打磨骨缺损周边少量残留骨组织(图 1C)。植入氧化铝生物陶瓷(图 1D), 然后逐层缝合。

1.3.3 观测指标

观测和比较对照组和实验组手

术中颅骨钻孔 (每只大鼠钻 2 个孔) 时间, 以及出血 (≥ 0.1 mL)、硬脑膜损伤(脑组织暴露)和脑组织损伤(钻头触及脑组织)等并发症发生情况; 手术后 1 周观察大鼠切口有无红肿和渗出; 手术后 8 周, 麻醉动物, 沿着原来手术切口暴露颅骨缺损部位, 大体观察氧化铝生物陶瓷有无松动或者移位。在构建模型手术中无硬脑膜和脑组织损伤, 术后材料无移位, 即确定造模成功。

1.4 数据统计分析

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验和 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颅骨钻孔时间

实验组每只大鼠颅骨钻 2 个孔的时间为 $(6.00 \pm 2.47)\text{min}$, 与对照组的 $(9.25 \pm 3.49)\text{min}$ 比较, 时间明显缩短 ($P < 0.01$)。

2.2 手术中和手术后观察指标

实验组手术中的出血、硬脑膜损伤和脑组织损伤等并发症发生率较对照组明显减少 ($P < 0.05$)。实验组手术后 7 d, 大鼠伤口愈合情况良好, 无皮下渗出和肿胀; 手术后 8 周骨科材料固定位置良好, 无移位和松动, 与周围骨组织连接紧密。实验组造模成功率为 95% (23/24), 明显高于对照组的 62% (10/16), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

由创伤及疾病所导致的骨缺损是目前临床较难解决的问题之一, 而骨缺损修复已成为人们研究的一个热点。组织工程技术为治疗骨缺损提供了新的研究方向和思路^[6-7], 不同的骨修复材料首先需要进行动物实验体内评估与检测才能应用于临床。大鼠具有容易饲养、生长较快、对传染病的抵抗力较强等优点, 通常选择成年雄性大鼠进行实验, 以避免大鼠本身的激素水平和年龄对骨缺损组织修复能力的影响。Bosch 等^[8]认为, 大鼠颅骨缺损直径为 5 mm 时, 除了在缺损边缘处有少量的骨形成之外, 直到术后 12 个月都不能完成骨性修复。在颅骨矢状缝的左右两侧建立

表 1 两组大鼠手术中、手术后出现并发症及造模成功情况

Table 1 Comparison of complications during and after surgery and successful modeling between the two groups of rats (例)

观察项目	实验组(n=24)	对照组(n=16)	P
术中出血			0.042
有	2	6	
无	22	10	
硬脑膜损伤			0.011
有	1	6	
无	23	10	
脑组织损伤			0.007
有	0	5	
无	24	11	
切口肿胀渗出			0.020
有	0	4	
无	24	12	
材料松动移位			0.020
有	0	4	
无	24	12	
造模成功			0.011
有	23	10	
无	1	6	

CSD 可以避免损伤矢状窦, 此大鼠颅骨缺损模型应用比较广泛。然而在传统的颅骨钻取过程中很容易出现硬脑膜、脑组织损伤及出血等并发症, 影响骨修复过程。

生物陶瓷材料结构稳定, 分子中的键合力较强, 而且都具有较高的强度、耐磨性及化学稳定性等特点, 因此被广泛应用于组织工程和生物医学研究^[9]。氧化铝是目前临床常用的生物陶瓷材料^[10], 具有化学性能稳定、耐磨损、耐腐蚀和良好的生物学相容性等优点, 已广泛应用于人工关节、整形外科和牙科等医学领域^[11]。本实验将氧化铝生物陶瓷材料植入骨缺损处, 评估传统与改良大鼠颅骨缺损模型制备方法对骨修复作用的影响。

本实验模型的改良关键在于: ①手术中采用 2 种钻头, 空心环钻头用于钻取颅骨, 实心磨钻头用于打磨骨缺损周边少量残留骨组织, 改变了一种钻头直接钻穿颅骨后容易损伤硬脑膜和脑组织的情况, 缩短了手术时间, 同时保证颅骨缺损尺寸与植入材料相匹配。②用手术刀片整齐切开

骨膜,一方面利于术后缝合,缝合好的骨膜和颅骨下的完整硬脑膜能较好固定植入的生物材料,另一方面能充分发挥骨膜和硬脑膜在骨组织修复过程中的骨诱导和促进新骨形成的作用。③手术中,当颅骨接近钻穿时,不再施加外力,而且将空心钻头倾斜 $20^{\circ}\sim 30^{\circ}$,首先使骨缺损边缘大部分颅骨间断被钻穿,但还保留少部分颅骨的连接,避免颅骨组织同时完全被钻穿后钻头直接接触及颅骨下组织而导致损伤和出血。④避免损伤后血液中间充质干细胞、成骨细胞因子等进入骨缺损处干扰实验结果,而且同一大鼠颅顶骨两侧分别制作的5 mm CSD可用于自身对照研究,减少其他干扰因素对于骨缺损修复的影响。

骨缺损动物模型的建立对于骨组织工程研究有重要意义。改良的大鼠颅骨缺损模型建立时较好保护了骨膜、硬脑膜和脑组织,尤其是对经验不足的初学者,明显降低手术中并发症的发生,大大提高造模成功率,该模型具有高度的可重复性,更安全有效,可应用于不同类型骨修复材料的评估与检测。

参考文献:

- [1] 尹宏宇,崔磊,曹谊林,等.大鼠颅骨缺损模型在骨组织工程中的应用[J].中国美容医学,2009,18(5):727-729.
- [2] Yu W, Sun T, Ding Z, et al. Copper-doped mesoporous hydroxyapatite microspheres synthesized by a microwave-hydrothermal method using creatine phosphate as an organic phosphorus source: Application in drug delivery and enhanced bone regeneration[J]. J Mater Chem B, 2017, 5:1039-1052.
- [3] Gugala Z, Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: A preliminary study[J]. J Orthop Trauma. 1999, 3(3):187-195.
- [4] Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies[J]. Lab Anim, 2011, 45(1):14-24.
- [5] 李矛,赵彦涛,侯树勋.大鼠颅骨骨缺损模型的建立及相关应用[J].中国骨与关节杂志,2017,6(8):629-632.
- [6] 郭宜姣,李文华.骨缺损修复生物工程研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(8):988-993.
- [7] 宁钰,赵红斌.骨缺损修复方法的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(50):115-117.
- [8] Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials[J]. J Craniofac Surg. 1998, 9(4):310-316.
- [9] Pina S, Oliveira JM, Reis RL. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review[J]. Adv Mater, 2015, 27(7):1143-1169.
- [10] Lau YJ, Sarmah S, Witt JD. 3rd generation ceramicon-ceramic cementless total hip arthroplasty: A minimum 10-year follow-up study[J]. Hip Int, 2018, 28(2):133-138.
- [11] Ghaemi MH, Reichert S, Krupa A, et al. Zirconia ceramics with additions of Alumina for advanced tribological and biomedical applications[J]. Ceram Int, 2017, 43(13):9746-9752.

Construction and Application of an Improved Skull Defect Model in Rats

ZHANG Yawen¹, ZHU Guangxu², LI Yazhe³, LI Hao⁴,
WANG Shaoye⁴, ZHANG Haoyun¹, WANG Fengbin¹

(1. College of Basic Medical Sciences, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

2. College of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

3. College of Animal Science and Technology & Animal Medical School,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

4. College of Biological Sciences and Technology,
Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

[Abstract] **Objective** To explore the construction of an ideal skull defect animal model in rats, and to improve the success rate of skull defect animal model. **Methods** Forty adult male SD rats were randomly divided into the control group and experimental group. In the control group, the traditional surgery method of skull defect model was used, only using a hollow drill and the force was perpendicular to the skull surface to drill the full-thickness defect of the skull. The modified surgical method was used in the experimental group rats, by using both hollow and solid drills, and changing the direction of the drill's force at different stages in the skull drilling process. The drilling time, existence of intraoperative complications such as periosteum, dura mater, brain tissue injury and bleeding, as well as the fixed position and osseointegration of postoperative alumina bioceramic materials implanted were compared, and the modeling success rate was compared after 8 weeks between the two groups. **Results** Compared with the control group, the drilling time of the experimental group was shortened ($P<0.01$), the intraoperative complications such as periosteum, dura mater, brain tissue injury and bleeding were significantly reduced ($P<0.05$), and there was no displacement and loosening of alumina bioceramic materials after operation ($P<0.05$), and the material was well bonded to the skull, and the success rate of modeling was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** The modified method for skull defect model in rats has the advantages of short drilling time and less complications. It can greatly improve the success rate of model establishment and can effectively evaluate the bone repair performance of orthopedic implant materials *in vivo*.

[Key words] Skull defect; Animal model; Alumina bioceramic; Rats