

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240078

· 论 著 ·

SD大鼠股骨慢性骨髓炎模型构建与评价

孙智[△], 隋钧皓[△], 章浩^{*}

海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院创伤骨科, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立并评价SD大鼠股骨慢性骨髓炎动物模型。**方法** 取雄性SD大鼠24只, 暴露大鼠右股骨髁间沟, 用电钻于股骨髁间沟处钻1个直径0.5 mm的小孔直通股骨髓腔, 向髓腔内注入50 μL细菌密度为 1×10^6 /mL的金黄色葡萄球菌悬液, 用无菌骨蜡密封孔洞。观察大鼠术后行为学、切口愈合、体温、病灶大体感染等情况; 术后2、4、8周, 取大鼠造模股骨周围软组织进行细菌培养, 采用小动物CT机观察股骨影像学表现; 术后2、8周, 取造模股骨组织制成病理学切片, 进行H-E染色、吉姆萨染色及Masson染色。**结果** 造模后大鼠右后肢勾悬、不能负重, 术后第10天左右手术切口完全愈合, 第12天恢复至正常活动水平, 第15天以后活动水平稍有下降。术后大鼠体温逐渐升高, 感染部位局部红肿; 2周以后体温虽下降, 但仍然高于正常体温, 部分大鼠右膝关节局部出现包块; 4周后所有大鼠均有局部红肿和体温升高等症状。大鼠造模股骨周围软组织细菌培养可见均匀分布的金黄色葡萄球菌菌落, 且随时间延长而增多。小动物CT机检查结果显示, 术后8周大鼠造模股骨髓腔内炎症反应明显, 骨质破坏累及骨皮质全层, 死骨形成并伴有新骨生成。造模股骨组织病理学分析结果显示, 术后2周骨髓腔内有大量炎症细胞浸润, 炎症局限于骨髓腔内, 可见皮质骨中胶原纤维连续排列, 组织内含有大量的金黄色葡萄球菌; 术后8周炎症迁延, 皮质骨中胶原纤维大量断裂, 皮质骨大量破坏且有窦道与外界相连, 组织内金黄色葡萄球菌数量进一步增多。**结论** SD大鼠股骨慢性骨髓炎模型造模成功, 可较好地模拟临床骨髓炎病理生理变化, 具有高度可复制性。

[关键词] 慢性股骨骨髓炎; 动物模型; 金黄色葡萄球菌; 行为学; 病理学

[引用本文] 孙智, 隋钧皓, 章浩. SD大鼠股骨慢性骨髓炎模型构建与评价[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(5): 552-557. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240078.

Construction and evaluation of an animal model of chronic osteomyelitis of femur in SD rats

SUN Zhi[△], SUI Junhao[△], ZHANG Hao^{*}

Department of Orthopaedics Trauma, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish and evaluate an animal model of chronic osteomyelitis of femur in SD rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were used to construct the osteomyelitis model. The intercondylar groove of the femur was exposed in rats, and a small hole with diameter of 0.5 mm was drilled by electric drill into the intercondylar groove of femur through the femoral bone marrow cavity. *Staphylococcus aureus* suspension of 50 μL with concentration of 1×10^6 /mL was injected into the right femoral bone marrow cavity of rats, and then the hole was sealed with sterile bone wax. The behavior, wound healing, body temperature, healing of the incision, and gross infection of the lesion were observed after operation. At 2, 4 and 8 weeks after operation, the soft tissue around the femur of rats was taken for bacterial culture, and micro-CT findings of the molded femur were observed. Histopathological sections were analyzed by hematoxylin-eosin, Giemsa and Masson staining at 2 and 8 weeks after surgery. **Results** The right lower limb of the osteomyelitis rats was suspended without weight bearing after operation, and the surgical incision completely healed about 10 d later. The animal returned to normal activity level on day 12, and 15 d after surgery the activity level decreased slightly. The body temperature of the rats began to rise after operation, and local redness and swelling occurred. After 2 weeks, the body temperature gradually decreased, but still higher than normal. The local swelling of right knee joint appeared in some rats. After 4 weeks, local swelling and body temperature increased in all the osteomyelitis rats. *Staphylococcus aureus* colonies were evenly distributed

[收稿日期] 2024-01-29 [接受日期] 2024-04-18

[作者简介] 孙智, 硕士生. E-mail: 13262732493@163.com; 隋钧皓, 住院医师. E-mail: junhaosui@163.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

^{*}通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161696, E-mail: zhanghsmmu@126.com

in the soft tissue culture around the femur of rats, and increased with time. Micro-CT results showed that 8 weeks after operation, inflammation reaction was obvious in medullary cavity of rats, with bone fragmentation involving all layers of bone cortex, also with dead bone formation and new bone formation. The histopathological analysis of the femur showed many inflammatory cells infiltrating into the bone marrow cavity with inflammation limited to the bone marrow cavity 2 weeks after operation, the collagen fibers in the cortical bone were arranged continuously, and a large number of *Staphylococcus aureus* were contained in the tissue. Eight weeks after operation, inflammation persisted, the collagen fibers in the cortical bone were broken and the cortical bone was destroyed, sinus channels were connected with the outside in cortical bone, and the number of *Staphylococcus aureus* in the tissue increased. **Conclusion** A model of chronic osteomyelitis of femur has been successfully established in SD rats, which can simulate the pathophysiological change of clinical osteomyelitis and has high replicability.

[**Key words**] chronic osteomyelitis of femur; animal model; *Staphylococcus aureus*; ethology; pathology

[**Citation**] SUN Z, SUI J, ZHANG H. Construction and evaluation of an animal model of chronic osteomyelitis of femur in SD rats[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(5): 552-557. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240078.

慢性骨髓炎是一种慢性炎症性骨病,常由开放性骨折或术后植入物感染引起,目前临床上多采用手术清创联合抗感染治疗^[1]。金黄色葡萄球菌是慢性骨髓炎最常见的病原体之一,通过生物膜形成、毒力因子分泌、代谢模式改变等多种机制干扰免疫应答,降低抗生素和手术清创治疗骨髓炎的有效性^[2-3]。慢性骨髓炎的特点是低度感染、致病菌长期存在、迁延不愈、形成死骨和窦道,病程时间可以持续数月甚至数年,且反复发作^[4]。彻底清创是控制感染的关键,清创范围应包括炎性肉芽组织、窦道和内固定钉道、死骨及血供无法重建的缺血硬化骨。因治疗效果不理想,患者常常需要进行多次手术和长期使用抗生素,部分患者因治疗失败需行截肢手术,这给患者身心带来很大的创伤,也给个人和家庭带来很大的经济负担^[5]。因此,寻找减少慢性骨髓炎复发、缩短治疗疗程的有效方法至关重要。

慢性骨髓炎动物模型是进行慢性骨髓炎实验研究的重要基础,建立稳定、有效、成功率高的慢性骨髓炎标准化动物模型是慢性骨髓炎实验研究的有力保证。然而,如何选择一个既能控制影响不同临床表现的多个变量、又能准确概括人类慢性骨髓炎病理学特征的慢性骨髓炎动物模型目前仍是一个重大挑战^[6]。SD大鼠具有饲养周期短、成本低、繁殖量大、可控性好等优势,以其作为实验对象的股骨骨髓炎模型应用较为广泛^[6]。基于以上考虑,本研究采用在SD大鼠股骨髁间沟钻孔开窗、向股骨髓腔注入金黄色葡萄球菌、再用无菌骨蜡填塞骨窗的方法,制备了SD大鼠股骨慢性骨髓炎模型,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物 48只SPF级6~8周龄、体重286~324g的雄性SD大鼠购自上海吉辉实验动物饲养有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0012]。在实验前1周于海军军医大学(第二军医大学)SPF级动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0033]进行适应性饲养,6只/笼,12h光照、12h黑暗交替,自由进食饮水,室温为(22±2)℃,相对湿度为(45±5)%,每周更换2次垫料及笼盒。实验操作严格按照实验动物管理条例及伦理委员会相关规定执行。

1.2 实验仪器、菌株与试剂 显微手术器械购自上海医疗器械有限公司,小动物CT机为比利时Brucker公司产品,正置光学显微镜为日本Nikon公司产品。金黄色葡萄球菌(ATCC25923)由美国模式菌种收集中心提供。3%戊巴比妥钠购自上海新亚药业有限公司,H-E染液(货号G1003)、中性PBS(货号C0221A)、4%多聚甲醛溶液(货号P0099)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 动物模型制备 SD大鼠称重后,随机分为模型组(24只)和对照组(24只)。用3%戊巴比妥钠溶液按0.1 mL/100 g剂量腹腔注射麻醉大鼠,麻醉显效后右后肢备皮,用碘伏消毒术区,铺无菌一次性治疗巾。取膝关节内侧1 cm纵行切口,切开皮肤、显露股骨髁间沟,用电钻于股骨髁间沟处钻1个直径0.5 mm小孔直通股骨髓腔。之后向模型组大鼠髓腔内注射50 μL细菌密度为1×10⁶/mL的金黄色葡萄球菌悬液,对照组大鼠髓腔内注射50 μL生理盐水,孔洞用无菌骨蜡密封。逐层缝合皮肤软

组织,用无菌敷料覆盖包扎,按统一标准饲养。

1.4 行为学观察与评估 术后每天观察大鼠的活动能力,通过敲击震动鼠笼对大鼠的反应能力及活动范围进行综合评估。将大鼠依次置于安静房间的鼠笼中,待其适应环境 1 h 后以木棒轻敲鼠笼体一侧产生震动与声响,同时运行 Sound Meter 噪声测试软件进行声响的简易标准化限定,控制声音响度在 55~70 dB。活动能力评分标准如下:大鼠可快速完成从鼠笼一侧活动至另一侧或活动同等距离,且活动期间无跛行,右后肢无勾悬,计 5 分;可在较短时间内从鼠笼一侧活动至另一侧或活动同等距离,但活动期间出现跛行,右后肢无勾悬,计 4 分;可从鼠笼一侧活动至另一侧或活动,同等距离,但所需时间较长且活动期间有右后肢勾悬,计 3 分;无法从鼠笼一侧活动至另一侧或活动同等距离,但可完成同等距离一半以上的活动,且活动期间有右后肢勾悬,计 2 分;有部分位移活动,但无法完成从鼠笼一侧至另一侧一半的活动或不足同等距离的一半,计 1 分;无明显位移活动,计 0 分。以上计分由 3 名研究者在同一时间点独立完成,以平均值作为分析数据。

1.5 体温和体重测量 术后每天用电子体温计测量大鼠肛门温度,将电子体温计插入肛门,深度为 2.0 cm,待体温计发出“嘀嘀嘀”声之后再测 30 s,记录读数。术前及术后第 1、2、4 周,分别测量大鼠体重。

1.6 感染部位局部症状观察和细菌培养 术后每天观察感染部位局部红肿、包块等症状。术后 2、4、8 周,从模型组和对照组分别随机抽取 8 只大鼠,过量麻醉处死后,取造模周围软组织做细菌培养,取模型组大鼠右股骨标本放入液氮中保存待测。将造模周围软组织放入无菌研磨器中研磨后,置入 15 mL 离心管中,加入 10 mL 无菌 PBS 混匀,以 $800\times g$ 的离心加速度离心 3 min;取上清液 10 μ L 用无菌 PBS 稀释 100 倍后在胰蛋白胨大豆琼脂平板上涂板,然后放入恒温孵育箱,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,拍照并进行细菌菌落计数。

1.7 影像学观察及组织病理学检测 术后 2、4、8 周,取模型组大鼠右股骨标本进行小动物 CT 观察。术后 2、8 周,取模型组大鼠右股骨标本制成组织病理学切片,进行 H-E 染色、Masson 染色及吉姆萨染色分析。

1.8 统计学处理 应用 Excel 2016 软件进行统计学分析,应用 ImageJ 5.0 软件进行图像分析。服从正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 或 \bar{x} 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 两组大鼠行为学变化 两组大鼠术后行为学改变包括舔舐右后肢及手术切口、右后肢勾悬、跛行、活动减少等。随着时间推移,对照组大鼠逐渐恢复如常,手术切口逐渐愈合,在第 7 天时所有大鼠伤口均愈合,右后肢行走状态逐步恢复,第 8 天恢复正常活动水平;模型组大鼠右后肢勾悬,不能负重,手术切口逐渐愈合,术后第 10 天左右手术切口完全愈合;术后第 12 天恢复正常活动水平,第 15 天以后活动水平稍有下降。两组大鼠术后的活动能力评分见图 1。

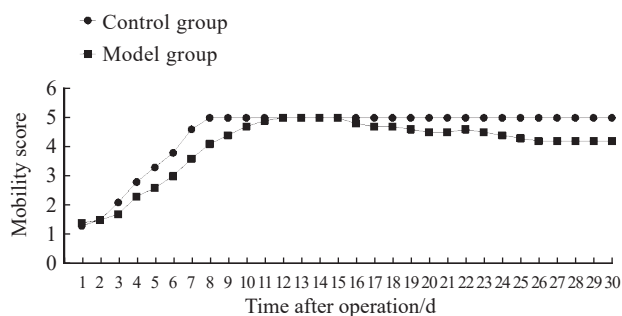


图 1 对照组和股骨慢性骨髓炎模型组大鼠活动能力评分
Fig 1 Mobility scores of rats in control and chronic femur osteomyelitis model groups

$n=24$ in control group; $n=24, 16,$ and 8 in model group 1-14 d, 15-28 d, and 29-30 d after operation, respectively. \bar{x} .

2.2 两组大鼠体温和体重变化 如图 2 所示,模型组大鼠接种细菌后体温逐渐升高,10 d 时达高峰;随后体温逐渐下降,至 2 周后体温基本平稳,但仍高于正常体温。造模前,模型组和对照组大鼠体重分别为 (353.95 ± 6.97) 、 (355.49 ± 5.88) g,差异无统计学意义($P=0.420$);术后 1 周,模型组和对照组大鼠体重分别为 (361.58 ± 7.71) 、 (365.91 ± 7.75) g,差异无统计学意义($P=0.981$);术后 2 周,模型组和对照组大鼠体重分别为 (341.00 ± 5.50) 、 (370.95 ± 6.87) g,模型组低于对照组($P<0.001$);术后 4 周,模型组和对照组大鼠体重分别为 (341.33 ± 7.94) 、 (371.04 ± 8.52) g,模型组低于对照组($P<0.001$)。

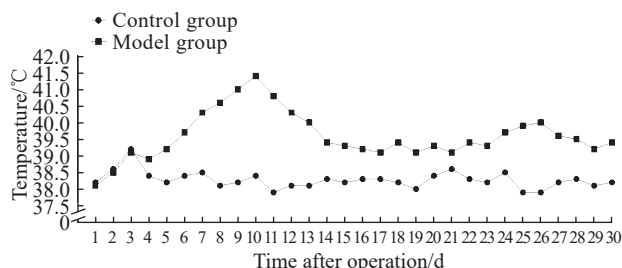


图2 对照组和股骨慢性骨髓炎模型组大鼠体温变化
Fig 2 Changes of body temperature in rats of control and chronic femur osteomyelitis model groups

n=24 in control group; n=24, 16, and 8 in model group 1-14 d, 15-28 d, and 29-30 d after operation, respectively. \bar{x} .

2.3 模型组大鼠感染症状及细菌培养结果 模型组大鼠接种细菌1周后可见感染局部红肿,2周后部分大鼠右膝关节处可触及一包块、包块内有波动感,4周后所有大鼠均有局部红肿和包块。切开大鼠右后肢皮肤后,右膝内侧可见一脓肿,脓肿与周围组织边界较为清晰,局限于造模钻孔处。剥离股骨周围软组织可见股骨外形基本完整,髓腔内可见大量脓性分泌物,在股骨髁间沟处与外界软组织相通。见图3。取造模周围软组织做细菌培养,结果如图4所示,细菌培养皿上可见均匀分布的金黄色葡萄球菌菌落,且随时间延长而增多。

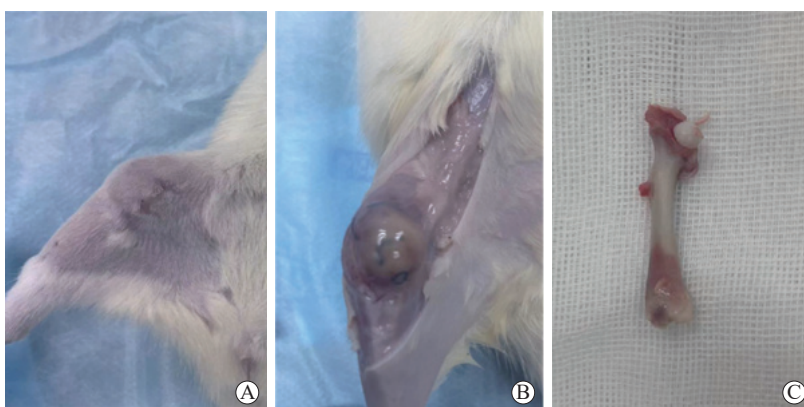


图3 股骨慢性骨髓炎模型大鼠股骨及周围组织大体观察

Fig 3 Gross findings of femur and perifemur tissue in chronic femur osteomyelitis model rats

A: An obvious mass was observed in the knee joint of rats; B: Abscess and surrounding tissue boundaries were clear; C: The soft tissue around the femur was stripped and the femur was basically intact.

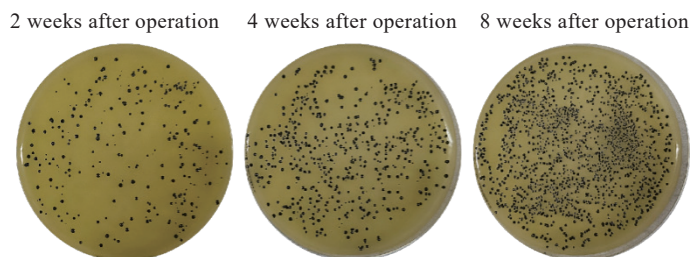


图4 股骨慢性骨髓炎模型大鼠股骨周围软组织细菌培养结果

Fig 4 Results of bacterial culture of soft tissue around femur of chronic femur osteomyelitis model rats

2.4 模型组大鼠股骨影像学检查结果 小动物CT机检查结果(图5)显示,术后2周,模型组大鼠骨髓腔内可见炎症改变,局部皮质破坏,未累及皮质全层,仅局限于骨髓腔表面骨质;术后4周,大鼠骨髓腔内炎症反应加重,骨皮质破坏累及全层,皮质骨中散发脓肿形成;术后8周,大鼠骨髓腔内炎症反应进一步加重,骨质破坏累及骨皮质全层,死骨形成并伴有新骨生成。

2.5 模型组大鼠股骨组织病理学变化 H-E染色结果(图6)显示,术后2周,模型组大鼠骨髓腔内有大量炎症细胞浸润,炎症局限于骨髓腔内,炎症细胞以淋巴细胞、中性粒细胞为主,成纤维细胞数量少,几乎没有肉芽组织,有少量骨质破坏;术后8周,股骨组织可见大量炎症细胞浸润,炎症细胞以中性粒细胞为主,骨髓腔内充满淋巴细胞,伴有肉芽组织形成,有新生的小血管、新生的成纤

维细胞,局部有含铁血黄素的沉积。吉姆萨染色结果(图7)显示,术后2周,模型组大鼠股骨髓腔内有大量炎症细胞浸润,炎症局限于骨髓腔内,组织内含有大量的金黄色葡萄球菌;术后8周,炎症迁延,皮质骨中有窦道与外界相连,组织内含有大量金黄色葡萄球菌。Masson染色结果(图8)显示,术后2周,模型组大鼠股骨皮质骨中胶原纤维连续排列,皮质骨破坏尚不明显;术后8周,皮质骨中胶原纤维大量断裂,皮质骨被大量破坏,胶原纤维间隙有感染灶。

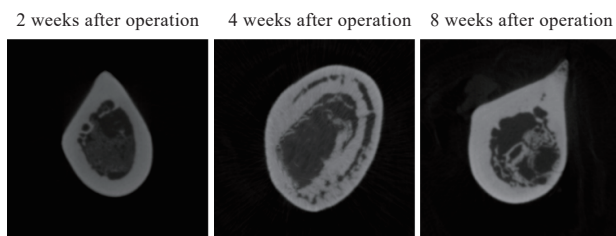


图5 股骨慢性骨髓炎模型大鼠小动物CT机检查结果
Fig 5 Micro-CT results of chronic femur osteomyelitis model rats

CT: Computed tomography.

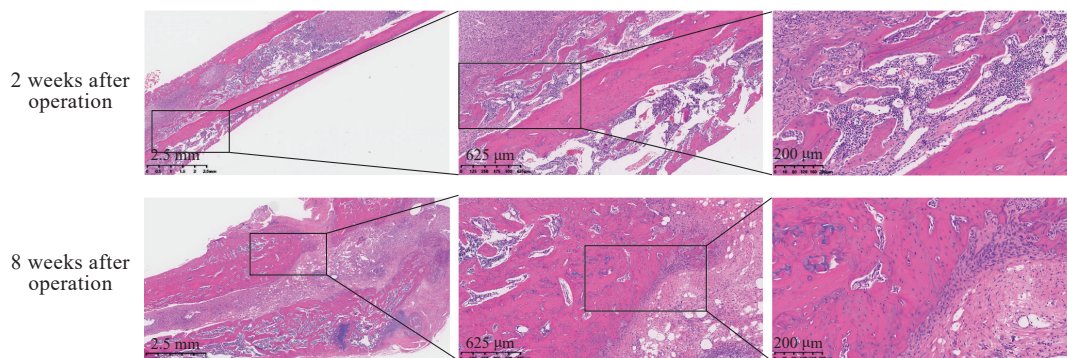


图6 股骨慢性骨髓炎模型大鼠股骨组织切片H-E染色结果

Fig 6 H-E staining results of femur tissue sections of chronic femur osteomyelitis model rats

H-E: Hematoxylin-eosin.

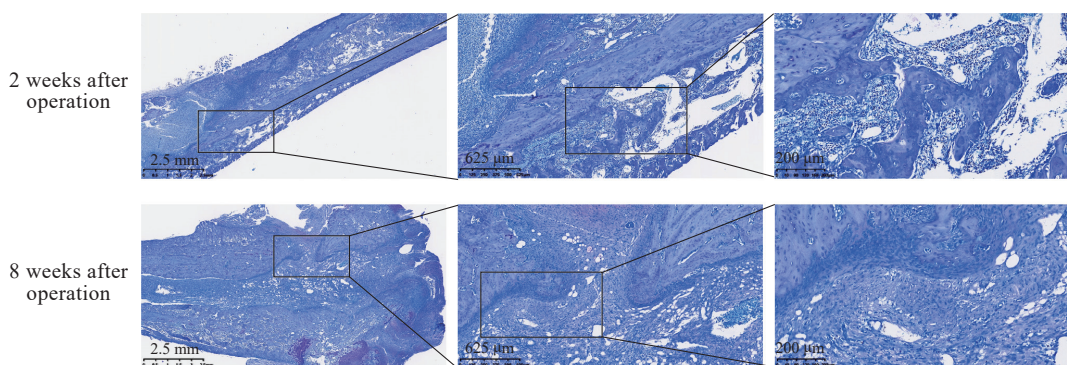


图7 股骨慢性骨髓炎模型大鼠股骨组织切片吉姆萨染色结果

Fig 7 Giemsa staining results of femur tissue sections of chronic femur osteomyelitis model rats

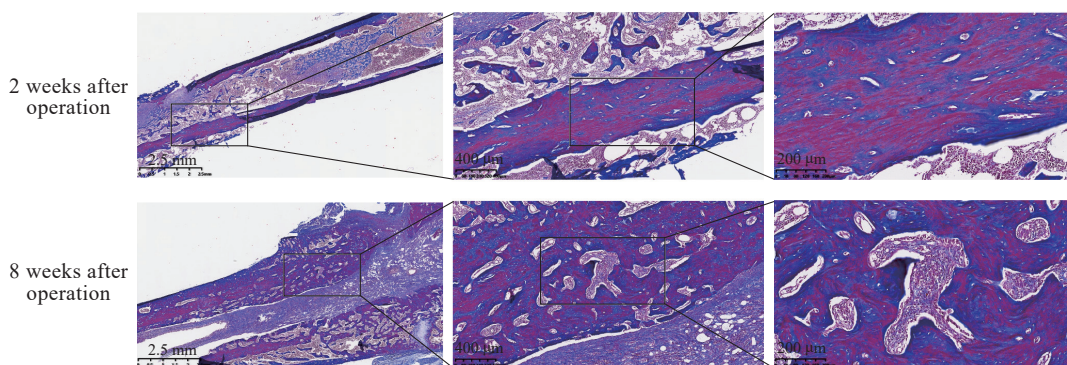


图8 股骨慢性骨髓炎模型大鼠股骨组织切片Masson染色结果

Fig 8 Masson staining results of femur tissue sections of chronic femur osteomyelitis model rats

3 讨论

慢性骨髓炎是骨科常见的难治性疾病之一,其发病机制复杂,具有不同的病理生理学表现。各种炎症因子和白细胞会导致组织坏死及骨小梁和骨基质的破坏,临床上可见窦道形成、局部的持续溃烂和流脓等特征性表现,实验室检查一般表现为白细胞计数、中性粒细胞计数、红细胞沉降率、CRP、降钙素原、IL-6、TNF- α 等感染指标不同程度的增高^[7-8]。一些影像学检查有助于慢性骨髓炎的定性及诊断,包括X线、CT、PET-CT、MRI、放射性核素扫描等^[9]。慢性骨髓炎重在预防,创伤后的彻底清创至关重要,一定要遵循彻底清创、有效抗感染、消灭死腔的治疗原则^[10]。

慢性骨髓炎动物模型研究经历了长期的发展。1941年,Scheman等^[11]通过将金黄色葡萄球菌和5%鱼肝油酸钠注射进兔胫骨近干骺端,成功建立了可复制的慢性骨髓炎动物模型。在此基础上,后来的研究者创建了多种慢性骨髓炎动物模型。慢性骨髓炎动物模型常使用的动物有大鼠、小鼠、兔、犬、羊及禽类,模型的构建与菌株接种方式、菌液中菌株的密度、植入部位、骨缺损等因素密切相关,即使消除了大多数混杂因素也难以统一量化,近年来研究者们不断进行改进并逐渐量化感染过程^[6,12]。

本实验用电钻于SD大鼠股骨髁间沟处钻1个直径0.5 mm小孔直通骨髓腔,向髓腔内注入50 μ L细菌密度为 1×10^6 /mL的金黄色葡萄球菌(ATCC25923)悬液,孔洞用无菌骨蜡密封,制作了SD大鼠股骨慢性骨髓炎模型。通过行为学观察、体重及体温测量、影像学检查与组织病理学分析评估造模效果,结果表明,此种造模方式所造成的股骨慢性骨髓炎模型具有高度可复制性,病理生理学表现与人体病理生理学改变相似。

[参考文献]

[1] CHEN Y, LIU Z, LIN Z, et al. The effect of *Staphylococcus aureus* on innate and adaptive immunity and potential immunotherapy for *S. aureus*-induced osteomyelitis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1219895.

- DOI: 10.3389/fimmu.2023.1219895.
- [2] GUERRA F E, BORGOGNA T R, PATEL D M, et al. Epic immune battles of history: neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 286. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00286.
- [3] GIMZA B D, CASSAT J E. Mechanisms of antibiotic failure during *Staphylococcus aureus* osteomyelitis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 638085. DOI: 10.3389/fimmu.2021.638085.
- [4] WU H, JIA C, WANG X, et al. The impact of methicillin resistance on clinical outcome among patients with *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: a retrospective cohort study of 482 cases[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 7990. DOI: 10.1038/s41598-023-35111-w.
- [5] PANTELI M, GIANNODIS P V. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know[J]. *EFORT Open Rev*, 2016, 1(5): 128-135. DOI: 10.1302/2058-5241.1.000017.
- [6] HUANG S, WEN J, ZHANG Y, et al. Choosing the right animal model for osteomyelitis research: considerations and challenges[J]. *J Orthop Transl*, 2023, 43: 47-65. DOI: 10.1016/j.jot.2023.10.001.
- [7] BERNARD L, DINH A, GHOUT I, et al. Antibiotic treatment for 6 weeks versus 12 weeks in patients with pyogenic vertebral osteomyelitis: an open-label, non-inferiority, randomised, controlled trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9971): 875-882. DOI: 10.1016/s0140-6736(14)61233-2.
- [8] HWANG J, KELHAM S A. Osteomyelitis[J]. *JAAPA*, 2022, 35(9): 57-58. DOI: 10.1097/01.jaa.0000854520.27186.dd.
- [9] LEE Y J, SADIGH S, MANKAD K, et al. The imaging of osteomyelitis[J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2016, 6(2): 184-198. DOI: 10.21037/qims.2016.04.01.
- [10] JERZY K, FRANCIS H. Chronic osteomyelitis—bacterial flora, antibiotic sensitivity and treatment challenges[J]. *Open Orthop J*, 2018, 12(1): 153-163. DOI: 10.2174/1874325001812010153.
- [11] SCHEMAN L, JANOTA M, LEWIN P. The production of experimental osteomyelitis: preliminary report[J]. *J Am Med Assoc*, 1941, 117(18): 1525-1529. DOI: 10.1001/jama.1941.02820440033008.
- [12] 刘金月,章猛奇,卿明松,等.金黄色葡萄球菌性骨髓炎动物模型构建的研究与进展[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(14): 2256-2262. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2600.

[本文编辑] 尹 茶