

幼兔桡骨临界性骨缺损动物模型的建立

芮敏¹ 郑欣¹ 王帆² 李东亚¹ 李成宇¹ 曹伟² 刘洪² 郭开今¹

【摘要】 目的 建立幼兔桡骨不同尺寸骨缺损模型,确定幼兔桡骨临界性骨缺损长度。 **方法** 选取健康 3 月龄雄性新西兰兔 20 只(2.2~2.5 kg),采用左右侧配对设计的方法在双侧桡骨中段分别制作 15 mm 及 20 mm 桡骨骨缺损模型,按骨缺损长度分为 A 组(15 mm)及 B 组(20 mm),每组各 20 侧。分别于术后第 1 天,术后第 4、8、12 周行 CT 检查,应用 CT-Hedberg 评分评估骨愈合情况。于术后 12 周处死所有实验兔,取出尺桡骨标本,通过大体观察及 HE 染色组织学观察分析缺损区骨愈合情况。 **结果** 术后实验兔均存活,术后第 12 周大体观察: A 组 19 例(95%)桡骨断端有连续性骨痂生成,新生骨表面光滑,塑形良好; B 组缺损断端髓腔封闭,缺损区由纤维组织填充。术后第 12 周 CT 图像可见 A 组皮质骨塑性完全, B 组断端及缺损尺侧均有新骨生成,髓腔封闭。术后各时间点 CT-Hedberg 评分: A 组(3.0±0.6, 3.9±0.3, 4.0±0.2)与 B 组(1.6±0.5, 2.7±0.6, 2.9±0.6)间差异有统计学意义($P<0.05$)。组织学结果: A 组缺损已修复完全,新生骨组织内可见血管再生, B 组缺损区由纤维组织填充。 **结论** 在进行幼龄兔骨缺损研究时,可选择 3 月龄雄性新西兰兔桡骨干构建 20 mm 长骨缺损。 **【关键词】** 桡骨; 骨/损伤; 模型,动物; 兔

Establishment of a model of radial critical-size defect in juvenile rabbits. Rui Min¹, Zheng Xin¹, Wang Fan², Li Dongya¹, Li Chenghu¹, Cao Wei², Liu Hong², Guo Kaijin. 1, Department of Orthopedics; 2Department of Radiology, Affiliated Municipal Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China. Corresponding author: Guo Kaijin, E-mail: xzgj@sina.com

【Abstract】 Objective To establish a radial defect model with different lengths and determine the optimal length of bone critical – size defects in juvenile rabbits. **Methods** Twenty healthy male New Zealand white rabbits aged 3 months (2.2~2.5 kg) were selected. And 15 mm and 20 mm radial bone defects were made randomly in bilateral radius respectively. Based upon defect length, radiuses were divided into group A (15 mm) and group B (20 mm) ($n=20$ each). At Day 1 and 4 – week intervals postoperatively, computed tomography (CT) scans were performed. The healing of bone defect was evaluated with CT-Hedberg scores. The rabbits were sacrificed at 12 weeks postoperatively and forearms were harvested for gross observations and histological analysis of new bone formation. **Results** All rabbits survived after operation. Continuous bridged callus with a smooth surface were observed in 19 (95%) in group A. However, both ends were closed in group B and defect area was filled with fibrous tissue. In group A, perfectly plastic cortical bone was observed on CT images at 12 weeks postoperatively. And small amount of callus was found at both ends and ulnar side of radius in group B with closed marrow cavity. CT-Hedberg score comparison showed a significant difference between groups A and B at each timepoint postoperatively ($3.0\pm0.6, 3.9\pm0.3, 4.0\pm0.2$ vs $1.6\pm0.5, 2.7\pm0.6, 2.9\pm0.6, P<0.05$). Histological analysis showed that bone defect in group A had been repaired perfectly and neonatal revascularization was also present. In group B, the ends of defects were closed and defect area was filled with fibrous tissue. **Conclusion** A model of radial bone defect has been established in juvenile rabbits. And 20 mm is the most ideal length.

【Key words】 Radius; Bones/IN; Models, Animal; Rabbits

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2017.02.020
基金项目:江苏省卫生计生委面上科研课题(H201528),江苏省级重点研发专项资金项目(BE2015627),徐州市科技社会发展项目(KC15SH067)
作者单位:1,徐州医科大学附属医院骨科(江苏省徐州市,221000);2,徐州医科大学附属医院徐州市立医院影像科(江苏省徐州市,221000)
通信作者:郭开今, E-mail: xzgj@sina.com

儿童时期骨髓炎清创、严重创伤、巨大骨肿瘤切除术后等,均易导致肢体大段骨缺损,后期可产生肢体短缩、成角畸形,造成肢体功能障碍,严重影响儿童生长发育,如何修复大段骨缺损仍是小儿骨科医生面临的重大难题^[1,2]。理想的骨缺损动物模型能

为实验研究提供有价值的参考数据,其中新西兰兔是应用较为广泛的实验动物^[3,4],但目前关于构建幼龄新西兰兔大段骨缺损模型的实验研究甚少。本实验通过选择 3 月龄新西兰兔,并于桡骨干中段制备不同长度骨缺损,以获得相对可靠的幼龄兔骨缺损模型,为小儿骨缺损临床基础研究提供依据。

材料与方法

一、实验动物

选取 3 月龄健康、清洁级雄性新西兰兔 20 只,体重 2.2~2.5 kg,由江苏省动物实验中心提供[动物合格证:SYXK(苏)2015-0030]。动物饲养室维持恒温 25℃ 左右,相对湿度 40%~60%,单笼饲养,自由进食,活动。

二、动物分组与制备模型

采用左右侧配对设计,在双侧前肢分别制作 15 mm 及 20 mm 桡骨干中段骨缺损。根据骨缺损大小分为 A 组(15 mm 骨缺损组)及 B 组(20 mm 骨缺损组)。取 3% 戊巴比妥钠溶液 1 mL/kg 耳缘静脉注射,麻醉成功后,双侧前臂术区备皮,仰卧位固定于手术台,术区消毒、铺巾,在前臂桡侧中段切开皮肤、皮下组织及深筋膜,经肌间隙暴露桡骨干。剥离部分桡骨干弧顶骨膜后,以其为中心,用小型摆锯分别制作剥离骨膜的 15 mm、20 mm 长度桡骨干骨缺损。截骨时,注意使用小型拉钩牵开以保护两侧软组织,保持锯片与桡骨干纵轴垂直。参照 Zhang YD 等术中处理骨膜的方法^[5]:截除骨段后,仔细分离缺损区游离骨膜,从两侧断端向干骺端剥离 5 mm 长骨膜,残余骨膜管不予缝合,使用无菌生理盐水彻底冲洗断端周围骨屑及积血,逐层缝合关闭皮肤切口,加压包扎手术切口。术后 3 d 每天予以肌注青霉素 40 万单位。术后分笼单独喂养,自由进食水,活动。

三、观察指标

1. 大体观察:术后观察动物精神状态、饮食活动等一般状况及切口有无感染表现,术后第 12 周处死动物,取出双侧尺桡骨标本,肉眼观察各组标本骨痂生成量及断端是否出现骨连接等情况。

2. CT 检查:所有实验兔分别于术后第 1 天及术后第 4 周、第 8 周、第 12 周,使用 128 排 CT 机(Definition Flash,德国 SIEMENS 公司)行双侧前臂 CT 平扫,由相同人员以相同扫描条件行 CT 检查。通过 CT 信号值变化,观察各阶段断端新生骨生成量,并使用 CT-Hedberg 评分^[6]定量分析骨愈合情

况。该评分依据断端新生骨占骨缺损区比例不同,将 0%~25% 计为 1 分,25%~50% 计为 2 分,50%~75% 计为 3 分,75%~100% 计为 4 分。

3. 组织学观察:于术后 12 周处死动物,取双侧尺桡骨标本,缺损断端远近侧各保留长约 5 mm 正常骨组织,10% 甲醛溶液固定 24 h 后用双蒸水冲洗干净,置入盐酸-甲酸-冰醋酸-甲醛混合脱钙液脱钙,标本软化至能以针刺入骨组织为宜。冲洗干净后经乙醇溶液(30%-50%-70%-100%)逐级脱水,石蜡包埋,沿标本纵轴制备骨组织切片,厚度约 5 μm ,经苏木精-伊红(HE)染色后观察骨缺损断端骨愈合情况及缺损区纤维结缔组织增生等情况。

四、统计学处理

应用 SPSS13.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间各时间点 CT-Hedberg 评分结果进行配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、一般情况

术后第 1 天,各组实验兔精神状态好转,活动时跛行,自由觅食饮水。切口周围有不同程度肿胀,3~5 d 肿胀渐消退,术后 10 d 左右切口愈合良好,所有实验动物均如期存活。

二、大体观察

术后 12 周处死动物取材,A 组 20 侧桡骨,19 侧(95%)桡骨断端有连续性桥接骨痂通过,新生骨表面较为光滑,与自身桡骨形态基本一致(图 1A),1 侧(5%)未愈合,可能与术中过多剥离骨膜有关;B 组 20 侧桡骨断端均仅有少量锥形骨痂生成,髓腔闭塞,缺损中央由纤维组织填充(图 1B)。

三、CT 观察结果

术后第一天 CT 图像显示各标本骨缺损区清晰可见,断端整齐,周围无骨屑残留,术区软组织不同程度肿胀。A 组:术后第 4 周,多数标本缺损区充满新生骨痂影,形态不规则,且密度较正常骨组织稍低;术后第 8 周,断端新生骨痂密度增高,形态较前规则,断端可见有连续性皮质骨生成,髓腔内低密度影减少;术后第 12 周,骨痂塑性完全,与正常桡骨形态基本相似(图 2A~D)。B 组:术后第 4 周,断端及邻近尺骨侧有少量低密度新骨生成;术后第 8 周,新生骨密度增高,部分髓腔闭塞;术后第 12 周,断端骨痂硬化,髓腔闭塞,中央缺损区为软组织影(图 3 A~

D)。术后各时间点 CT-Hedberg 评分显示,A 组评分均比 B 组高,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

四、组织学观察

术后第 12 周组织学观察可见,A 组标本骨缺损修复完全,新生骨组织内有大量成熟骨小梁,骨板排列较规则,且可见再生血管(图 4A);B 组缺损断端髓腔封闭,断端有成熟板状骨向缺损中心方向生长,靠近尺骨侧亦有新生骨组织,但骨小梁排列不规则,中央缺损区见缺损空腔及纤维结缔组织(图 4B)。

表 1 术后不同时期 CT-Hedberg 评分表

Table 1 Scores of CT-Hedberg postoperation

组别	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
A(15 mm 骨缺损)	3.0±0.6	3.9±0.3	4.0±0.2
B(20 mm 骨缺损)	1.6±0.5	2.7±0.6	2.9±0.6
<i>t</i> 值	7.310	7.804	6.842
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

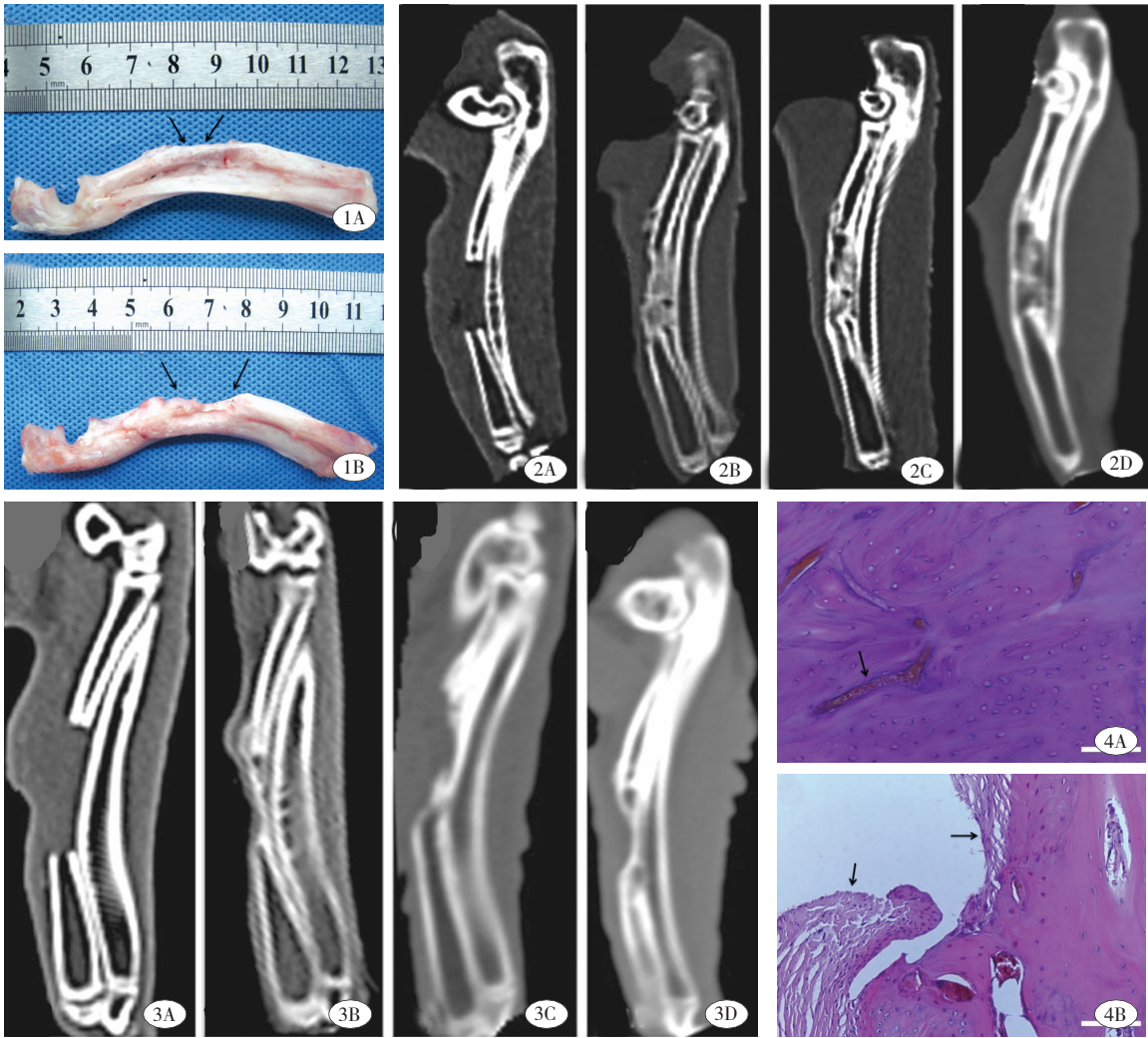


图 1 术后 12 周大体观察图。A:A 组(15 mm 缺损)标本断端有桥接骨痂生成,新生骨形态与正常桡骨基本一致(箭头标记);B:B 组(20 mm 缺损)标本断端及邻近尺骨侧仅有少量新生骨生成,髓腔闭合(右侧箭头标记),中央缺损区为纤维软组织(左侧箭头标记); **图 2** A 组术后各时间点 CT 观察结果。A:术后第 1 天断端平行整齐,切口周围软组织肿胀;B:术后第 4 周断端及邻近尺骨侧可见大量低密度新生骨痂生成;C:术后第 8 周断端低密度骨痂影较前减少,并有连续性皮质骨生成,但形态尚不规则;D:术后第 12 周皮质骨厚度增加,塑性完全,与正常桡骨形态基本一致,髓腔部分再通; **图 3** B 组术后各时间点 CT 观察结果。A:术后第 1 天断端整齐,切口周围软组织肿胀;B:术后第 4 周断端及邻近尺骨侧有少量不规则新生骨痂生成,且密度不均匀,呈云絮状;C:术后第 8 周断端新生骨痂密度较前增高,部分断端髓腔开始闭合;D:术后第 12 周断端新生骨硬化,髓腔闭塞,缺损中央为软组织影,未修复; **图 4** 术后第 12 周断端组织学染色结果,HE 染色图片($\times 20$)。A:A 组(15 mm)可见缺损部位为较成熟的骨组织,骨板排列较为规则,箭头标记处为新生血管;B:B 组(20mm)可见由断端向缺损中心生长的骨组织,靠近边缘处骨板排列杂乱,骨细胞较少,箭头标记处可见中央缺损区为纤维结缔组织

Fig. 1 Gross observations at 12 weeks postoperation; **Fig. 2** CT sectional views of group A postoperation; **Fig. 3** CT sectional views of group B postoperation; **Fig. 4** Histological evaluations of defects at 12 weeks postoperation (HE staining $\times 20$)

讨 论

小儿四肢骨缺损传统治疗方法多采用自体骨或异体骨充填移植。儿童时期可供移植用的骨量较少,当骨缺损病变范围较大时,自体骨无法满足移植的需要,且术后可能造成取骨部位慢性疼痛、切口感染等;异体骨诱导性差,有传播疾病的风险^[4,7]。近年来,骨组织工程技术有望成为修复大段骨缺损的有效途径之一,建立幼龄动物长骨大段骨缺损动物模型对于研究儿童骨缺损修复的实验研究具有重要的意义。

骨缺损实验中,常用动物有羊、犬、猪、鼠、兔等。鼠类虽然实验成本较低,但其骨结构原始,骨损伤后修复机制与人类不同^[3]。兔类具有与人体相似的骨组织结构,建模后能较好地模拟人骨缺损后的生物力学改变及骨修复机制。新西兰兔桡骨结构与人类相似,上下尺桡关节连接紧密,骨干间由骨间膜紧密结合,活动度小。且桡骨不是主要负重骨,制造骨缺损后,临近尺骨可支撑固定,不需额外植入内外固定物,能够避免术后负重及固定物对骨愈合的影响,对动物日常活动影响较小^[4,8]。

合适的大段骨缺损尺寸,即临界性骨缺损(critical size defect, CSD),是动物骨缺损模型的重要参数,它指在一定周期内未经治疗、无法自愈的最短骨缺损长度^[9]。有学者认为动物长骨 CSD 长度应为其周径的 1.5~2.5 倍以上或为长骨长度的 10% 以上^[10]。既往研究中存在多种长骨 CSD 大小,从 10~20 mm 不等^[8,11]。参考李东亚等^[11]在 6 月龄新西兰兔桡骨制备骨缺损的方法,并结合本研究中对兔桡骨影像学相关测量数据,显示桡骨中段周径约为 9 mm,本实验选择了 15 mm 及 20 mm 两种骨缺损尺寸,并未设置更大长度缺损组。本实验 CT 结果显示:术后第 8 周 15 mm 组绝大部分断端有桥接骨痂形成,而 20 mm 组标本仍存在缺损空腔;术后第 12 周,15 mm 组断端基本塑形完全,与正常桡骨形态大致相同,20 mm 组断端髓腔闭合,中央缺损区未见连续性骨痂生长。且术后各时间点,15 mm 组 CT-Hedberg 评分均高于 20 mm 组,差异有统计学意义。Meimandi 等^[8]在实验中选取 10~12 月龄雄性新西兰兔制作 10 mm 桡骨干骨缺损模型,术后 60 d 后组织学结果显示,断端仅有纤维性连接,尚未形成桥接骨痂,且三点弯曲试验显示其生物力学稳定性较正常骨组织差。李东亚等^[11]对桡骨骨缺损大小

进行了对照研究,他们选取 18 只雄性 6 月龄新西兰兔随机分为 3 组分别制作 10 mm、15 mm、20 mm 桡骨干骨缺损,术后 12 周大体标本显示 10 mm 组断端愈合完全,而 15 mm、20 mm 组均未愈合,缺损空腔由纤维组织填充,Hedberg 评分显示 15 mm 组评分显著小于 10 mm 组,而与 20 mm 组相比,二者间差异无统计学意义,基于该实验结果,他们认为 6 月龄雄性新西兰兔桡骨 CSD 大小为 15 mm 较合理。Bodde EW 等^[6]认为实验动物月龄是影响骨再生的一个重要因素。3 月龄新西兰兔处于幼龄期,约相当于人类儿童 5~7 岁^[12]。Rivas 研究发现新西兰兔长骨在 19~32 周时停止生长^[12]。本实验骨缺损愈合时间及 CSD 大小与 Meimand Parizi A^[8]及李东亚等^[11]国内外实验结果存在差异,可能是因为本研究选择了骨生长旺盛的幼龄期新西兰兔,而后两者选择了较为成熟的 6 月龄成年兔。王永刚等^[13]选择 4~5 月龄新西兰兔制作股骨干骨缺损,直到术后 12 周断端才形成骨痂桥接;Song 等^[14]选择构建 6 周龄新西兰兔股骨干骨缺损模型,术后 5~6 周 X 线显示断端有大量骨痂生成,术后 7~9 周即形成骨痂桥接,平均骨愈合时间约为 7.3 周,短于本研究中骨愈合时间。

沈凯等^[15]在 5~6 月龄新西兰兔桡骨骨缺损模型建模中,保留了骨膜,并设计 10 mm、15 mm、20 mm、25 mm 及 30 mm 组进行对照研究,结果发现,20 mm 缺损组出现骨愈合。本研究结果与沈凯等^[15]的不同,本研究中 20 mm 组断端并未愈合,可能与术中对缺损两端骨膜进行一定程度的剥离有关。有实验研究发现,桡骨断端骨膜可促进断端骨愈合,应彻底清理断端残余骨膜,以排除其对断端骨愈合的影响^[6]。Zhang YD 等建议术中截断桡骨后,两侧断端骨膜应向干骺端剥离约 5 mm 长,并彻底冲洗断端残余骨膜组织^[5]。

综上所述,本研究所选择尺寸易于控制,手术操作简单,易于推广。选取 3 月龄幼兔构建桡骨干骨缺损模型时,骨缺损长度应选择 20 mm 较为合适。不足之处在于:选择 3 月龄幼兔作为实验对象,相关实验结论类比应用于人类患儿其模型代表性存在争议;实验分组不够详细,考虑到幼兔的实验饲养困难性问题,没有设置 1 月龄及 2 月龄组进行对比以探讨不同月龄对骨缺损愈合的影响;为便于手术操作及误差控制,未细化设置 12 mm、14 mm、18 mm 组等组别。

参考文献

- 郑学建, 彭爱民, 张保中, 等. Ilizarov 技术治疗感染后小腿短缩畸形一例报[J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(3): 289-290. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2012.03.019.
Zheng XJ, Peng AM, Zhang BZ, et al. Ilizarov technique for the treatment of lower limb shorter deformity post-infection: A case report[J]. Chin J Orthop, 2012, 32(3): 289-290. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2352.2012.03.019.
- 钟明亮, 张湘生, 黎志宏. 外固定支架结合髓内钉治疗儿童伴骨缺损和肢体短缩的股骨骨不连[J]. 临床小儿外科杂志, 2009, 8(4): 44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2009.03.014.
Zhong ML, Zhang XS, Li ZH. External fixator combined with intramedullary nail for the treatment of femoral nonunion with bone defects and limb shorter deformity in children[J]. J Clin Ped Sur, 2009, 8(4): 44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2009.03.014.
- Reifenrath J, Angrisani N, Lalk M, et al. Replacement, refinement, and reduction: necessity of standardization and computational models for long bone fracture repair in animals[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(8): 2884-2900. DOI: 10.1002/jbm.a.34920.
- 芮敏, 郑欣, 李成宇, 等. 兔骨缺损模型构建的研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2016, 9(2): 176-180. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9958.2016.02-19.
Rui M, Zheng X, Li CY, et al. Research progress of bone defect modeling in rabbits[J]. Chin JBJS, 2016, 9(2): 176-180. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9958.2016.02-19.
- Zhang YD, Wang G, Sun Y, et al. Combination of platelet-rich plasma with degradable bioactive borate glass for segmental bone defect repair[J]. Acta Orthop Belg, 2011, 77(1): 110-115.
- Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, et al. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(1): 206-217. DOI: 10.1002/jbm.a.31549.
- 祁新禹, 张学军, 白云松, 等. 小儿脊柱矫形应用同种异体骨移植的免疫学观察[J]. 临床小儿外科杂志, 2009, 8(3): 3-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2009.03.002.
Qi XY, Zhang XJ, Bai YS, et al. Observation of clinical and immune changes after children's spine fusion using homologous bone allograft[J]. J Clin Ped Sur, 2009, 8(3): 3-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2009.03.002.
- Meimandi Parizi A, Oryan A, Haddadi S, et al. Histopathological and biomechanical evaluation of bone healing properties of DBM and DBM-G90 in a rabbit model[J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2015, 49(6): 683-689. DOI: 10.3944/AOTT.2015.15.0129.
- Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines[J]. Clin Oral Implants Res, 2015, 26(8): 915-930. DOI: 10.1111/clr.12406. Epub 2014 Apr 26.
- Schell H, Thompson MS, Bail HJ, et al. Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results[J]. Journal of biomechanics, 2008, 41(14): 3066-3072.
- 李东亚, 郑欣, 邱旭升, 等. 新西兰兔桡骨骨缺损动物模型的制作[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(9): 2012-2012. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.09.089.
Li DY, Zheng X, Qiu XS, et al. Establishment of radius defect model in New Zealand rabbits[J]. Chin J Exp Surg, 2013, 30(9): 2012-2012. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.09.089.
- Rivas R, Shapiro F. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit[J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84-A(1): 85-100.
- 王永刚, 裴国献, 张洪涛, 等. 兔股骨干缺损模型的制备及在组织工程骨实验中的应用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(10): 971-974.
Wang YG, Pei GX, Zhang HY, et al. An experimental model of bone defect at rabbit femoral shaft for bone tissue engineering researches[J]. Chin J Orthop Trauma, 2005, 7(10): 971-974.
- Song HR, Puri A, Lee JH, et al. Spontaneous bone regeneration in surgically induced bone defects in young rabbits[J]. J Pediatr Orthop B, 2002, 11(4): 343-349.
- 沈凯, 沈维军, 廖金辉, 等. 保留骨膜的兔桡骨缺损性骨不连模型中临界骨缺损量的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(12): 2661-2663. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.12.061.
Shen K, Shen WJ, Liao JH, et al. Critical size defect of periosteum-retained bone defect nonunion models in radius of rabbits[J]. Chin J Exp Surg, 2013, 30(12): 2661-2663. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2013.12.061.

(收稿日期: 2016-07-09)

(本文编辑: 仇 君)

本刊引文格式: 芮敏, 郑欣, 王帆, 等. 幼兔桡骨临界性骨缺损动物模型的建立[J]. 临床小儿外科杂志, 2017, 16(2): 189-193. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.02.020.

Citing this article as: Rui M, Zheng X, Wang F, et al. Establishment of a model of radial-size defect in juvenile rabbits[J]. J Clin Ped Sur, 2017, 16(2): 189-193. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2017.02.020.