

常温下无水甘油保存的同种异体肌腱*

宋一平, 韩冰, 王和洪, 童讯, 赵日光, 孙焱炎, 冯晖, 陈烁

Allograft tendon preserved in pure glycerine under normal temperature

Song Yi-ping, Han Bing, Wang He-hong, Tong Xun, Zhao Ri-guang, Sun Yi-yan, Feng Hui, Chen Shuo

Abstract

BACKGROUND: In order to preserve the greatest bioactivity of the tendon, a kind of allograft preserving liquid is needed.

OBJECTIVE: To observe the cell morphology and tendon bioactivity at different time points, followed by protection of the rabbit tendon in pure glycerine under normal temperature.

METHODS: After special procession, the rabbit tendons were tightly sealed in pure glycerine away from light under normal temperature. The organizational structure and cell morphology of tendon were observed under electron microscope with hemotoxylin and eosin (HE) staining for paraffin section, and the bioactivity was observed by superoxide dismutase zymetology experiment for 2, 4, 7 and 12 months, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: HE stained paraffin section showed that in 2, 4, 7 and 12-month glycerine group, most cell membranes were intact, nucleuses inerratic, and tendon organizational structures existed. The electron microscope showed the cells were in static, and the nucleus patterns were normal. The superoxide dismutase zymetology experiment showed that the tendon owned the superoxide dismutase enzymatic activity. The results indicated that the organizational structure, most of cell morphology and bioactivity of the tendon were remained, following the tendon was specially processed and tightly sealed in pure glycerine away from light under normal temperature for 12 months..

Song YP, Han B, Wang HH, Tong X, Zhao RG, Sun YY, Feng H, Chen S. Allograft tendon preserved in pure glycerine under normal temperature. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(53): 9973-9976. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 寻找一种同种异体组织保存液, 使保存的肌腱具有最大程度的生物活性。

目的: 使用无水甘油在常温下对兔子肌腱进行保存, 观察不同时间点的细胞形态和肌腱活性。

方法: 使用特殊的方法处理兔肌腱, 并常温避光密封保存在无水甘油中, 在保存 2, 4, 7, 12 个月使用苏木精-伊红染色石蜡切片、透射电镜观察肌腱组织结构及细胞形态, 使用超氧化物歧化酶酶学实验观察肌腱的生物活性。

结果与结论: 2, 4, 7, 12 个月苏木精-伊红染色石蜡切片示大部分细胞细胞膜完整, 细胞核规则, 肌腱组织结构存在。透射电镜结果示细胞呈静止状态, 核形态正常。超氧化物歧化酶酶学实验示肌腱具有超氧化物歧化酶活性。结果说明使用特殊的方法处理兔肌腱并在无水甘油中常温避光保存 12 个月, 肌腱的组织结构、大部分细胞的细胞形态和肌腱生物活性得以保存。

关键词: 甘油; 肌腱; 形态学; 超氧化物歧化酶活性; 常温保存

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.53.023

宋一平, 韩冰, 王和洪, 童讯, 赵日光, 孙焱炎, 冯晖, 陈烁. 常温下无水甘油保存的同种异体肌腱[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(53):9973-9976. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

手部肌腱缺损后采用自体肌腱移植效果好, 但自体肌腱的来源有限, 并会对供体带来不同程度的损伤和功能障碍, 从而使其在临床上的应用受到了很大程度的限制。因此, 同种异体肌腱的移植逐渐成为人们关注的焦点并应用到临床上。

如何储存异体肌腱是目前研究的热点。有生物活性的异体肌腱移植到受体后, 肌腱愈合后抗张强度高且不容易发生粘连, 为比较理想的愈合方式; 无生物活性的肌腱移植到受体后, 其为无张力的纤维条索, 肌腱断端愈合为瘢痕形成进程, 抗张强度低且容易产生严重的

粘连^[1-2]。本实验使用无水甘油在常温下对兔子肌腱进行保存, 观察不同时间点的细胞形态和肌腱活性。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2008-01/2010-02 在解放军第 97 医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 日本大耳白兔 18 只, 体质量 (2.0±0.5) kg, 雌雄不拘, 由徐州医学院实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[3]。

Center of Wound Repair, Nanjing Military Region, the 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Song Yi-ping, Chief physician, Center of Wound Repair, Nanjing Military Region, the 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China Hanbingjsxz@163.com

Supported by: Science and Technology Research Financing Project of Health and Medicine of Nanjing Military Region, No.06z17*

Received:2010-06-06 Accepted:2010-07-20 (20100406002/M-FM)

解放军第 97 医院南京军区创伤修复中心, 江苏省徐州市 221004

宋一平, 男, 1954 年生, 山东省淄博市人, 主任医师, 主要从事手外科、骨关节及脊柱方面的研究。Hanbingjsxz@163.com

中图分类号:R617 文献标识码:B 文章编号:1673-8225 (2010)53-09973-04

收稿日期: 2010-06-06 修回日期: 2010-07-20 (20100406002/M-F)

主要试剂和仪器:

主要试剂和仪器	来源
无水甘油	湖南尔康制药有限公司
超氧化物歧化酶测试盒	南京建成生物工程研究所
光学显微镜	Olympus 公司
可调式移液器	Finnpipette 公司
LXJ-II 离心机	上海第三分析仪器厂
WSZ-261-79 恒温水箱	北京医疗设备厂
722 型分光光度计	上海第二分析仪器厂
石蜡切片机	LEICA 公司
H-600 透射式电子显微镜	日立公司

实验方法:

肌腱的取材和保存: 空气栓塞方法处死实验动物, 无菌方法取出四肢屈肌腱, 肌腱随机分为 3 大组, 即新鲜肌腱组、生理盐水组、无水甘油组, 每组 18 条。无水甘油组的保存方法: 将肌腱进行特殊处理, 常温密封避光保存在无水甘油中。生理盐水组: 将肌腱放入生理盐水中, 常温避光密封保存。新鲜肌腱取出后进行苏木精-伊红染色、电镜检查和酶学实验。

石蜡切片及苏木精-伊红染色: 取新鲜肌腱、保存 2 个月的生理盐水组肌腱, 保存 2, 4, 7, 12 个月的无水甘油组肌腱, 每组每个时间点 1 条。将无水甘油保存的肌腱去甘油化。肌腱浸入体积分数为 4% 的甲醛溶液中固定 24 h, 石蜡包埋后切片, 片厚 4 μm, 给予苏木精-伊红染色, 在光镜下观察肌腱结构和细胞形态, 通过观察细胞核的形态和细胞膜完整情况判断细胞形态的完整性。完整率=细胞形态完整数/细胞总数×100%。重复实验 6 次。

透射电镜观察: 取新鲜肌腱、保存 2 个月的生理盐水组肌腱, 保存 2, 4, 7, 12 个月的无水甘油组肌腱, 每组每个时间点 1 条。将肌腱组织切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块, 4% 戊二醛固定 4 h, 1% 四氧化锇固定 24 h, 不同体积分数的乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 半薄切片定位, 制作超薄切片, 用透射电镜观察并摄片。重复实验 6 次。

超氧化物歧化酶活性测定: 取 2, 4, 7, 12 个月的无水甘油组肌腱、保存 2 个月的生理盐水组肌腱各 300 mg, 使用碾磨玻璃器在碎冰上手工碾碎, 800 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按说明书依次加入试剂盒中各种试剂, 用旋涡混匀器充分混匀, 置 37 °C 恒温水浴 40 min, 加入显色剂, 混匀, 室温放置 10 min, 于波长 550 nm 处, 1 cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 比色。读取各组的吸光度值。重复实验 6 次。

主要观察指标: ①苏木精-伊红染色中各组肌腱细胞结构的完整率以及纤维形态。②透射电镜观察细胞形态及纤维形态。③各组超氧化物歧化酶活性的吸光度值。

设计、实施、评估者: 设计及实施为第一、二作者, 评估为第三~八作者, 评估采用盲法。

2 结果

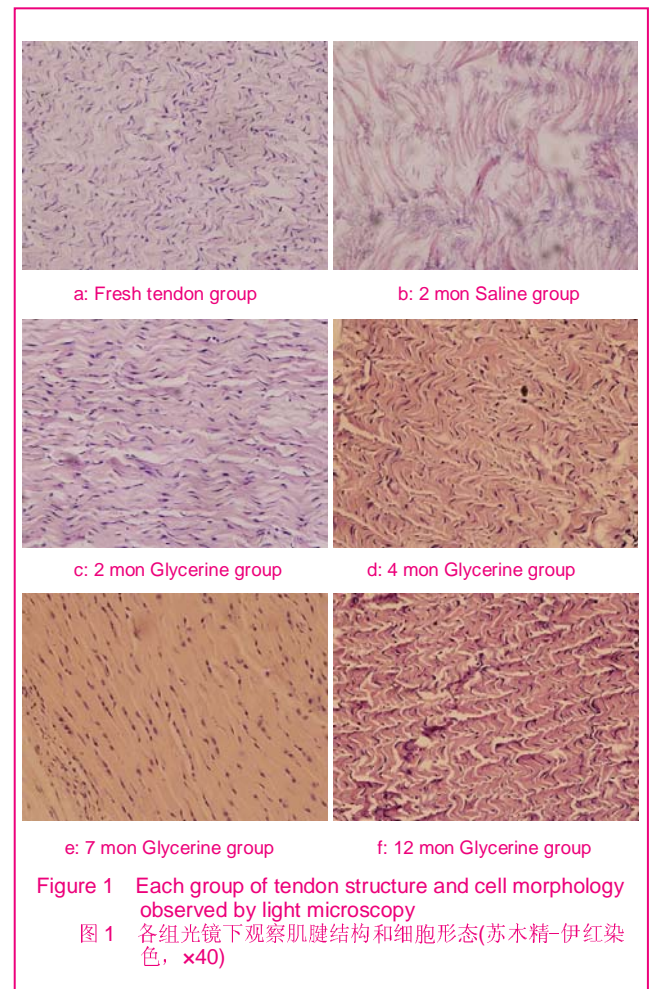
2.1 实验动物数量分析 18 只日本大耳白兔均进入结果分析。

2.2 各时间点苏木精-伊红染色石蜡切片结果

新鲜肌腱组: 细胞呈梭状, 大部分细胞细胞膜完整, 细胞核规则, 完整率(94.0±2.6)%。见图 1a。

生理盐水组: 在 2 个月行苏木精-伊红染色石蜡切片, 结果示: 肌腱组织结构紊乱, 无细胞结构存在。见图 1b。

无水甘油组: 在 2, 4, 7, 12 个月行苏木精-伊红染色石蜡切片, 结果显示: 肌腱组织结构存在, 肌腱细胞呈梭状, 大部分细胞的细胞膜完整, 细胞核规则, 细胞完整率分别为: (77.14±4.2)%、(74.36±3.24)%、(73.53±4.89)%、(70.87±3.72)%。见图 1c~f。



2.3 各时间点透射电镜观察结果

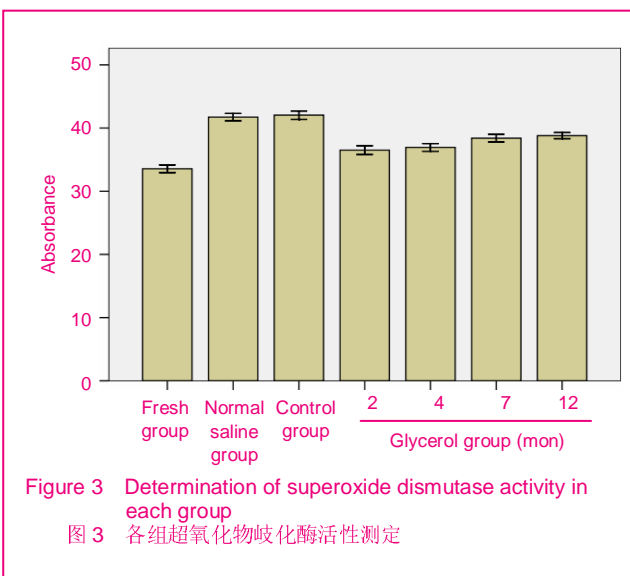
新鲜肌腱组: 见细胞呈 2 种状态, 即静止态和活跃态, 胞膜完整, 核形态正常。见图 2a。

生理盐水组: 在 2 个月行电镜检查, 结果示无细胞成分, 纤维混乱。见图 2b。

无水甘油组: 电镜视野内甘油组细胞呈静止状态, 胞膜完整, 核形态正常。见图 2c~f。



2.4 超氧化物歧化酶活性 新鲜肌腱组吸光度值为 33.55 ± 0.58 , 生理盐水组为 41.73 ± 0.55 , 空白对照组为 42.04 ± 0.64 , 无水甘油 2 个月组 36.50 ± 0.66 , 无水甘油 4 个月组 36.94 ± 0.58 , 无水甘油 7 个月组 38.39 ± 0.60 , 无水甘油 12 个月组 38.79 ± 0.46 。见图 3。



3 讨论

较长时间储藏并保持细胞的活性, 目前较为常用的是深低温保存和冻干技术, 深低温保存法即在低温保护剂的保护下, 按照一定的程序将样品放入 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中或超低温冰箱中保存, 通过深低温抑制细胞的能量代谢, 使之处于休眠状态, 从而达到保存细胞活性的目的, 使用时再进行复苏^[4-6]。这种方法能较长时间保存细胞活性, 但所需设备昂贵且笨重, 细胞复苏过程存在风险, 不便于战时急救。冻干技术是指将组织或细胞冷冻后放入真空条件下通过升华和解吸, 使组织或细胞干燥, 这种方法处理后的组织或细胞体积几乎不变, 可以在常温下长时间的保存, 使用时进行复水, 大部分的组织或细胞仍具有活性^[7-8], 比较适合战时及平时急救使用, 但这种方法程序复杂, 仪器昂贵, 限制了该技术在储藏肌腱上的使用。

作者仔细研究了冻干技术, 其本质是干燥, 干燥后使细胞含水量控制在 5% 以下, 从而能长期保存细胞。可不可以使用其他的方法进行干燥呢? 能用液体的方法排除水分进行干燥吗? 这种液体必需要满足以下条件: ①对细胞无毒性作用。②不能被细胞利用来供能。③能与水任意比例的互溶。④能过细胞膜。甘油收载于 2005 版药典, 为无色、澄清的黏稠液体, 味甜, 能与水或乙醇任意混溶, 在丙酮中微溶, 在三氯甲烷或乙醚中均不溶。甘油与水、乙醇、丙二醇的混合物化学稳定。甘油对细胞无毒害作用, 可以和水任意比例互溶, 可以通过细胞膜, 不能作为细胞的能量来源, 使甘油作为液体干燥剂成为可能。

张军等^[9]报道将羊膜组织直接浸入无水甘油中, 并置于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 结果认为: 羊膜在 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 纯甘油保存 60 d 内, 组织结构、上皮细胞活性稳定。鲁静等^[10]将羊膜放入无水甘油中过夜后更换新的无水甘油在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 保存 1 个月时, 上皮微绒毛存在, 胞膜完整, 核异染色质增多, 边集, 胞质内有较大空泡, 线粒体肿胀, 上皮细胞间隙扩大, 细胞间连接减少, 基底膜疏松; 保存 3 个月时, 上皮细胞胞核、胞质溶解。范军华等^[11]将角膜直接置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无水甘油中, 然后在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 2 个月, 行同种异体 PKP 术, 术后以裂隙灯显微镜、A 超以及锥蓝-茜素红活性染色等测植片透明率、厚度及角膜内皮细胞存活率等指标, 认为甘油冷冻保存法可以长期保存角膜内皮细胞活性。邱孝芝等^[12]将眼球保存于纯甘油中, 然后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 经统计, 内皮存活率在 90%, 细胞呈镶嵌六角形, 细胞器较完整。

综上所述, 作者发现存在 2 个问题: ①研究者多将样品置于低温或超低温保存, 能否将样品放在保存液中进行常温保存, 使大部分细胞形态完好且具有生物活

性, 尚未见有报道。②研究者将样品直接甘油化, 导致样品在 4℃ 以上的温度下难以长期保存, 这可能于细胞快速经历膜内外渗透压变化是有关系的, 能否使用特殊的方法处理肌腱, 并在无水甘油中常温避光长期保存, 尚未见有报道。本实验对新鲜肌腱进行特殊处理, 常温避光保存在无水甘油中, 从形态学和酶学实验来评估肌腱的生物活性。超氧化物歧化酶广泛的存在于生物体内, 起到平衡氧自由基的作用, 是细胞中最主要的抗氧化酶。1938 年, Mann 和 Keilin 首次从牛红细胞中分离出一种蓝色的含 Cu 蛋白质, 1969 年, Mccord 及 Fridovich 陆续发现血铜蛋白、肝铜蛋白、脑铜蛋白均有氧自由基歧化活性, 故将该酶命名为超氧化物歧化酶。自然的未加以修饰的超氧化物酶半衰期短, 在常温下不稳定, 故选用此酶作为酶学检测指标^[13-18]。本实验结果表明, 至少在 12 个月内肌腱细胞形态、酶活性大部分得以保存, 即保存的肌腱具有生物活性。为同种异体肌腱的保存、携带及移植提供了一种新的方法和思路。

结论: 使用特殊的方法处理兔肌腱并在无水甘油中常温避光保存, 12 个月内肌腱的组织结构、大部分细胞形态和肌腱生物活性得以保存。

4 参考文献

- [1] Song YP,Zhong GW.Zhongguo Jiaoxing Waikē Zazhi. 1999;6(10):747-748.
宋一平,钟桂午. 同种异体有滑膜肌腱手部鞘内移植的临床应用[J]. 中国矫形外科杂志, 1999,6(10):747-748.
- [2] Zhang H,Xin CT.Shiyong Shouwaikē Zazhi. 1999;13(1):53-55.
张辉,辛畅泰. 同种异体肌腱的移植进展[J]. 实用手外科杂志,1999,13(1):53-55.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [4] Sun YK,Zhang YL.Zhonghua Shouwaikē Zazhi. 2006;22(3):133-136.
孙燕琨,张友乐. 深低温冷冻肌腱活性的研究[J]. 中华手外科杂志, 2006,22(3):133-136.
- [5] Deng W, Zhao H, Dong H. Clinical application of allogeneic tendon. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2005;19(8):666-668.
- [6] Chick LR, Walton RL. A history of tendon operations. Surg Gynecol Obstet. 1989;168(2):183-188.
- [7] Chen LF,Liu JH.Zhongguo Shuxue Zazhi. 2006;19(6): 500-502.
陈麟凤,刘景汉. 常用细胞冻干保护剂的特性、作用机制及应用进展[J]. 中国输血杂志,2006,19(6): 500-502.
- [8] Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F,et al. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. Cryobiology. 2001;42(2):79-87.
- [9] Zhang J,Cui W,Gao W,et al.Guoji Yanke Zazhi. 2007;7(1):83-85.
张军,崔巍,高伟,等. 纯甘油-4℃保存方法对羊膜活性影响的研究[J]. 国际眼科杂志,2007,7(1):83-85.
- [10] Lu J,Zhao M.Yanke Xinjinzhan. 2007;27(7):509-513.
鲁静,赵敏. 四种方法保存羊膜的组织形态学研究[J]. 眼科新进展, 2007,27(7):509-513.
- [11] Fan JH,Jiang H.Waishang Zhiye Yanbing Zazhi. 2007;29(3):161-164.
范军华,蒋华. 甘油长期冷冻保存兔角膜用于穿透性角膜移植效果观察[J]. 外伤职业眼病杂志, 2007,29(3):161-164.
- [12] Qiu XZ,Jin YY.Shiyong Yanke Zazhi. 1994;12(7):394-397.
邱孝芝,金袖云. 甘油冷冻保存眼球的实验研究与临床应用[J]. 实用眼科杂志,1994,12(7):394-397.
- [13] Lin QB,Liao SR,Xiong YH,et al.Huaxue Shijie. 2006;47(6):378-381.
林庆斌,廖升荣,熊亚红,等. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究和应用进展[J]. 化学世界,2006,47(6):378-381.
- [14] Yang L,Liao MF, Ji XR, et al.Xiandai Shengwu Yixue Jinzhan. 2010;0(2):396-398.
杨琳,廖明芳,季欣然,等. 超氧化物歧化酶在医学领域的研究现状[J]. 现代生物医学进展,2010,10(2):396-398.
- [15] Shi CY,Zuo XL,Ding Y,et al.Zhongguo Laonianxue Zazhi. 2009;29(13):1723-1725.
史春艳,左夏林,丁宇,等. 超氧化物歧化酶修饰改造的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2009,29(13):1723-1725.
- [16] Tie CJ,Zhang H,Zhang BR,et al.Weishengwuxue Tongbao. 1999;26(2):96-98.
铁翠娟,张怀,张博润,等. 修饰SOD及未修饰SOD的稳定性比较研究[J]. 微生物学通报,1999,26(2):96-98.
- [17] Pan JR,Zheng GJ,Huang WB,et al.Fuzhou Daxue Xuebao:Ziran Kexueban. 2009;37(5):756-759.
潘剑茹,郑光进,黄文斌,等. 不同来源SOD蛋白的稳定性比较[J]. 福州大学学报:自然科学版,2009,37(5):756-759.
- [18] Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED,et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim Biophys Acta. 2010;1804(2):245-262.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 南京军区医药卫生科研资助项目(06z11)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: ①选择无水甘油作为保存液, 将肌腱在无水甘油中长期常温保存, 使之具有一定的生物活性。
②液体干燥理论。

课题评估的“金标准”: 评估肌腱是否有生物活性可以从形态学和酶学两个方面进行评估, 形态学正常并具有一定的酶活性, 表明肌腱具有一定的生物活性。

设计或课题的偏倚与不足: 实验未进行肌腱力学测试是不足之处。

提供临床借鉴的价值: 选择合适的保存液, 使其能最大程度的保留肌腱生物活性, 为同种异体肌腱的携带及移植提供了一种新的方法和思路。