

不同处理方法同种异体半月板移植修复兔膝关节软骨的远期效果比较*

李学金, 李群, 张知博, 严宏践

Long-term effects of meniscal allograft transplantation to repair rabbit knee cartilage by different methods

Li Xue-jin, Li Qun, Zhang Zhi-bo, Yan Hong-jian

Department of
Orthopedics, First
Hospital of
Qinhuangdao,
Qinhuangdao
066000, Hebei
Province, ChinaLi Xue-jin★, Master,
Attending physician,
Department of
Orthopedics, First
Hospital of
Qinhuangdao,
Qinhuangdao
066000, Hebei
Province, China
lxj729260@163.comReceived: 2009-08-02
Accepted: 2009-09-17

Abstract

BACKGROUND: There are no ideal substitutes for meniscus. Meniscal allograft transplantation has become a feasible method to retain meniscal function following injury. Currently, the meniscus conservancy methods include fresh meniscus, low temperature preserved meniscus; freeze-dried meniscus.**OBJECTIVE:** To observe the long-term effects of meniscus allograft transplantation by different methods.**METHODS:** A total of 70 adult New Zealand rabbits were used, and 30 were selected as meniscus donors. The remaining 40 rabbits were divided into 4 groups ($n=10$): after meniscectomy, control group was not treated; fresh group underwent fresh meniscus allograft transplantation; low temperature group underwent low temperature preserved meniscus allograft transplantation; freeze-dried group underwent freeze-dried meniscus allograft transplantation. Of 30 donors, 10 received fresh meniscus transplantation, and the other received temperature preserved meniscus and freeze-dried meniscus transplantation 1 week after low temperature and freeze dried preservation. The rabbits were sacrificed 12 months after surgery for gross and histological observation.**RESULTS AND CONCLUSION:** The meniscus allografts of rabbits healed well, and no rabbits died. Gross observation showed that the appearance and elasticity of fresh meniscus group was similar to normal meniscus; tibial plateau was covered well, with no additional wearing in the cartilage of tibial plateau or condyles of femur. In low temperature and freeze-dried preservation groups, the meniscus grafts healed well, but their volume was small and the elasticity was poor; tibial plateau was only partially covered. Pathological observation suggested that fresh meniscus group had orderly arranged collagen fiber and similar chondrocyte appearance, number and distribution to normal meniscus, while sparse collagen fiber and small number of meniscus grafts were observed in the other groups. Results show that meniscal allografting can survive, retain certain function and structure and prevent the degenerative changes of the knee joint. Moreover, fresh meniscal grafts exhibit best effects, as the grafts following low temperature or freeze-dried preservation degenerate and their volume diminish 1 year following meniscectomy.Li XJ, Li Q, Zhang ZB, Yan HJ. Long-term effects of meniscal allograft transplantation to repair rabbit knee cartilage by different methods. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(7): 1170-1173.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前尚无理想的材料来替代半月板, 半月板移植就成为半月板损伤保留半月板功能较为可行的治疗方法。目前移植半月板的保存方法主要是新鲜半月板、低温保存的半月板和冻干保存的半月板。**目的:** 观察经不同方法处理后的兔半月板移植后的远期效果差异。**方法:** 成年新西兰大白兔 70 只, 其中 30 只作为供体取出半月板。将原有的半月板切除制成半月板缺失模型。随机将大白兔分为 4 组, 每组 10 只。①半月板缺失组作为对照。②新鲜半月板组移植新鲜半月板。③低温半月板组移植低温保存的半月板。④冻干半月板组移植冻干保存的半月板。30 个供体其中 10 个行新鲜移植, 另 20 个分别行低温保存、冻干保存 1 周后移植。术后 12 个月处死兔取标本, 进行动物一般观察。半月板大体观察和组织学观察。**结果与结论:** 移植兔切口均愈合好, 无死亡。大体观察: 新鲜半月板移植组外形、质地和弹性均接近正常半月板。胫骨平台覆盖好, 胫骨平台和股骨髁软骨无额外磨损。低温保存、冻干保存半月板移植组半月板边缘愈合好, 但是体积缩小, 弹性差。胫骨平台有部分没有半月板覆盖。病理观察: 新鲜移植半月板切片显示胶原纤维排列、软骨细胞的形态、数量和分布, 均与正常半月板相近, 而低温保存、冻干保存半月板移植组的半月板切片显示胶原纤维稀疏, 数量较新鲜移植的半月板少。结果表明, 同种异体半月板移植能够成活, 并且能具有一定的结构和功能, 防止膝关节退变。但是以新鲜移植的半月板效果最好。低温保存和冻干保存的半月板术后 1 年出现不同程度的退变和体积缩小。**关键词:** 半月板; 同种异体移植; 兔; 低温保存; 冻干保存; 软骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.07.007

李学金, 李群, 张知博, 严宏践. 不同处理方法同种异体半月板移植修复兔膝关节软骨的远期效果比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1170-1173. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

秦皇岛市第一医院
骨科, 河北省秦
皇岛市 066000李学金★, 男,
1972 年, 辽宁省
兴城市人, 满族,
2000 年大连医科
大学毕业, 硕士,
主治医师, 主要从
事关节骨科, 关节
镜研究。
lxj729260@163.
com中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2009)07-01170-04收稿日期:2009-08-02
修回日期:2009-09-17
(20090702014/W·A)

0 引言

半月板在膝关节的生物力学功能中起着重要作用, 如增加胫股关节匹配度, 营养关节软

骨, 维护关节稳定, 均匀传导负荷, 减少关节面的应力等。半月板切除后这些功能随之丧失, 引起关节退变等并发症, 因此如何修复保留半月板越来越受到人们的重视, 但是目前尚无理想的材料可替代半月板。一些动物实验表明异

体半月板移植后可以成活并起到关节保护作用^[1-4]。但是, 半月板移植的供体保存方法较多, 如低温保存、冻干保存、照射保存等。试验以兔为动物模型, 分别进行新鲜半月板移植以及经低温保存、冻干保存后的半月板移植, 比较观察远期效果。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2007-07/2008-10在秦皇岛市第一医院动物实验室完成。

材料: 成年新西兰大白兔70只, 雌雄不限, 体质量3.0~4.0 kg, 购自河北医科大学。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

实验方法:

动物分组: 随机将大白兔分为4组。①半月板缺失组10只, 切除内侧半月板后缝合、笼养, 制成半月板缺失模型, 作为对照, 观察切除半月板后关节软骨损伤情况。②新鲜半月板组10只, 做为新鲜半月板移植的受体。③低温半月板组10只, 做为低温保存的半月板移植的受体。④冻干半月板组10只, 做为冻干保存的半月板移植的受体。剩余30只作为供体, 切取半月板后处死。

标本形态: 兔后足关节类似于人膝关节结构, 但是兔的膝关节半月板内侧为“O”形, 前后角之间距离小, 边缘与关节囊连接。外侧半月板前后角之间距离大, 近似“C”形, 体部与关节囊无连接, 呈游离状态, 故选取内侧半月板进行移植。

供体处理: 将兔用氯胺酮(剂量25 mg/kg)肌肉注射后全身麻醉。术区局部脱毛。取膝前内侧纵行切口, 切开皮肤、筋膜, 然后向两侧剥离, 显露膝前韧带和内侧副韧带, 将内侧副韧带从上止点切断, 从半月板上横行切开关节囊, 显露半月板, 取得供体。其中10个供体行新鲜移植^[1], 另外20个供体随机分为2组, 分别行低温保存^[3]、冻干保存1周后移植。

建立模型及半月板移植: 移植组将原有的半月板切除, 切除时注意尽量保留关节囊完整。然后将移植用的半月板植入。植入时用5-0缝线将半月板的前角与前交叉韧带胫骨平台止点缝合, 后角缝合于后交叉韧带胫骨平台止点, 体部与关节囊相缝合。将内侧副韧带上止点处端吻合后, 缝合关节囊和皮肤。无菌纱布包扎即可。笼养。术后第1, 2, 3天肌肉注射庆大霉素16万单位。未用免疫抑制剂。

动物处置: 半月板缺失组和半月板移植组均饲养12个月。然后静注空气处死, 切取移植的半月板进行石蜡切片检查, 切片结果与正常半月板对比。

主要观察指标: ①正常内侧半月板进行石蜡切片检

查。②观察半月板缺失组内侧胫骨平台和股骨髁关节软骨损伤情况。③大体观察半月板移植组半月板愈合情况和关节软骨损伤情况。④各组半月板组织病理观察。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用新西兰大白兔40只, 分为4组, 全部进入结果分析。

2.2 临床观察 术后3~5 d, 动物活动减少, 跛行, 切口处稍有肿胀; 5~7 d后逐渐恢复负重行走, 关节活动范围恢复。实验动物切口愈合好, 无死亡。

2.3 大体观察 正常半月板大体观察见图1。

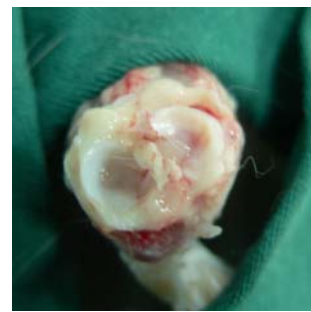


Figure 1 Gross observation of normal meniscus
图1 正常半月板大体观察

半月板缺失组: 胫骨平台形成局灶性关节软骨全层磨损, 深达软骨下骨。股骨髁关节软骨局灶性磨损, 程度较胫骨轻, 软骨下骨未外露。

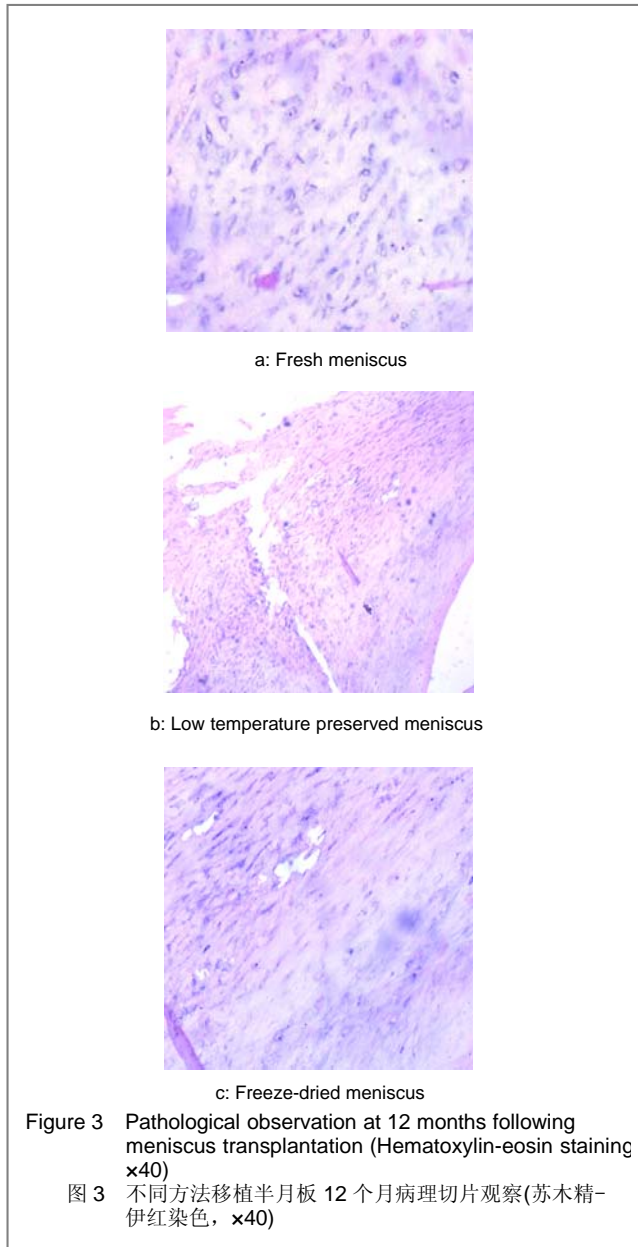
新鲜半月板移植组: 半月板愈合好。外形、质地、和弹性均接近正常半月板。胫骨平台覆盖好, 胫骨平台和股骨髁软骨无额外磨损。新鲜半月板移植12个月后大体观察见图2。



Figure 2 Gross observation at 12 months following fresh meniscus transplantation
图2 新鲜半月板移植12个月后大体观察

低温保存、冻干保存半月板移植组: 半月板边缘愈合好, 但是体积缩小, 颜色略发黄, 欠光泽, 弹性差。胫骨平台有部分没有半月板覆盖, 胫骨平台和股骨髁均可见表面粗糙, 但是较半月板切除组轻。

2.4 病理切片观察 与正常半月板切片相比较, 新鲜移植12个月后的半月板切片显示胶原纤维排列、软骨细胞的形态、数量和分布, 均与正常半月板相近, 而低温保存、冻干保存半月板移植组的半月板切片显示胶原纤维稀疏, 排列欠规整、软骨细胞的形态正常, 但是数量较新鲜移植的半月板少。见图3。



3 讨论

半月板具有相当重要的作用, 半月板全部切除后关节会迅速产生退行性变, 50%以上的患者会发生关节疼痛、不稳定等症状^[6]。为此, 研究者进行了很多实验研究^[1-4], 如用多聚合碳纤维、髌下脂肪垫、自体软骨膜等作为半月板的替代物, 结果均不理想。鉴于目前无理想的材料来替代半月板, 半月板移植就成为保留半月板功

能较为可行的治疗方法。

3.1 半月板移植的可行性 ①在理论上, 半月板内软骨细胞少, 而且被自身分泌的细胞外基质包围在一个无血运的环境中, 与宿主的免疫系统相隔离, 此外, 软骨组织缺乏血液和淋巴液的供应, 使软骨组织的免疫性较低, 成为移植免疫优势组织^[7-8]。②半月板周围区, 是半月板和关节囊结合部, 富含血管, 组织容易愈合。③半月板的营养很大部分来源于关节内的滑液营养渗透作用, 容易成活。④半月板移植物的选择。

半月板移植大体分为异种异体和同种异体移植。因异种半月板移植在局部形态、厚度与同种异体半月板有一定的差距, 导致异种半月板移植不能与受体关节的结构相匹配, 在膝关节活动中所受的机械性磨损大而效果不好。谢兴等^[9]用猪半月板作为供体, 移植替代兔的内侧半月板, 结果发现移植在半年后溶解吸收。同种半月板移植可避免异种半月板移植物的缺点, 实验效果比异种半月板移植物效果好。

3.2 半月板移植物的保存方法 目前, 半月板移植物的常见保存方法有新鲜保存、低温保存和冻干保存。①新鲜保存: 组织保存在4~37℃的环境中以保持细胞活力, 移植手术应该尽快进行。②低温保存: 使用可控的冰冻技术, 达到既能保存细胞活性又能延长保存期, 已经报道细胞存活率为10%~80%, 保存期最长可达10年。③冻干保存: 冻干保存可杀死所有细胞的生物活性, 移植后的半月板主要起到支架的作用, 诱导其他细胞长入。

所以, 理论上讲, 以新鲜移植为好。因低温或冻干保存会在一定程度上破坏细胞活性。

3.3 半月板移植的意义 目前对于严重的半月板损伤, 只有手术切除。切除后的并发症, 如关节软骨损伤、关节退变加速, 日渐受到重视。目前尚无理想的材料可以替代半月板, 半月板移植可能成为保留半月板功能的较为可行的治疗方法。赵文志等^[10]以家犬为实验对象, 研究了同种异体犬半月板移植后对膝关节生物力学的影响, 结果表明移植的半月板能起到传导载荷、稳定关节、保护关节软骨的作用。

实验结果也表明半月板移植可以获得成功, 并且经过长时间观察, 表明移植的半月板对关节软骨能起到保护作用, 其中以新鲜移植后的半月板效果最好。但是新鲜的半月板在临床实际当中不易获取, 因此继续研究、改进半月板的保存方法, 使其能够最大限度保持细胞活力, 同时又能长期保存, 对临床进行半月板移植具有重要意义。

4 参考文献

- Li XJ, Li Q, Zhang ZB. Chengdu Yixueyuan Xuebao. 2008, 3(4): 277-279.
李学金, 李群, 张知博. 同种异体新鲜半月板移植的长期随访观察[J]. 成都医学院学报, 2008, 3(4): 277-279.

- [2] Shao L,Wang XL,Wei JS,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchong Kangfu.2006;10(5):172-175.
邵林,王新亮,魏劲松,等.低温冻存同种异体半月板与半月板脱细胞基质移植实验效果比较[J].中国组织工程研究与临床康复, 2006, 10(5): 172-175.
- [3] Yang B,Jiang X,Zhang YM,et al.Guoji Gukexue Zazhi. 2009;30(1):48-50.
杨波,姜鑫,张益民,等.同种异体半月板移植临床研究现状[J]. 国际骨科学杂志,2009,30(1):48-50.
- [4] Huangfu XQ,Zhao JZ.Zhonghua Gezazhi. 2006,8(6):570-573.
皇甫小桥,赵金忠.半月板重建的临床研究进展[J]. 中华创伤骨科杂志,2006,8(6):570-573.
- [5] 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.
- [6] Boyd KT,Myers PT.Meniscus preservation ;rationale,repair technique and results.Knee.2003;10(1):1-11.
- [7] Chestman P.Cartilage as a homograft. J Bone Joint Surg(BR). 1974;56:178.
- [8] Meyers M, Chatterjee S.Osteochondral transplation.Surg Clin North Am.1978;58:429.
- [9] Xie X,Yu JK,Zhang JY,et al.Zhongguo Yundong Yixue Zazhi. 2005;24(1):4-8.
谢兴,余家阔,张继英,等.异种异体和同种异体半月板移植术后兔半月板和关节软骨中I、II、III、X型胶原表达和免疫排斥研究[J].中国运动医学杂志,2005,24(1):4-8.
- [10] Zhao WZ,Chen WJ,Yun DZ,et al.Zhongguo Yundong Yixue. 2001;20(4):375-377.
赵文志,陈维钧,云大真,等.同种异体新鲜半月板移植的实验研究[J].中国运动医学,2001,20(4):375-377.

来自本文课题的更多信息——

课题价值: 半月板在膝关节的生物力学功能中起着重要作用, 切除后引起关节退变等并发症, 一些动物实验研究表明异体半月板移植后可以成活并起到关节保护作用。文章以免为动物模型, 进行新鲜半月板移植以及经低温保存、冻干保存后的半月板移植, 比较3种不同的半月板保存方法对移植效果的影响, 为选择最好的保存方法提供参考。

文章的创新性: 该选题具有一定的先进性。目前半月板损伤是众多临床医生无法良好解决的问题, 关键就在于半月板体部没有血液供应, 无法完成自身修复, 异体半月板的应用是一个方向。

倚或不足: 每个个体的半月板形态和大小都存在差异, 仅靠半月板边缘极少量的血液供应植入体内后怎样完成半月板体部的再造? 文中缺乏必要的说明和依据证实植入半月板具有较好的生物活性。实验动物饲养观察时间较短, 如果能进行更长期的观察比较, 结果应该更好。



组织工程化牙齿的再生与发育: 本刊中文部

1 体外培养人牙髓细胞增殖分化与骨碎补的干预

许彦枝(河北医科大学第四医院口腔科, 石家庄市 050011)

推荐理由: 体外培养人牙髓细胞难度很大, 成功培养出牙髓细胞对于研究牙髓细胞的生物学特性以及作用于牙髓组织药物的筛选建立了技术平台。在国内外已有生长因子对体外培养牙髓细胞增殖分化作用的研究, 而中药对体外培养牙髓细胞的研究未见报道。探讨中药骨碎补对体外培养的人牙髓细胞增殖分化的影响对于开发中药作为盖髓剂促进牙髓组织的修复再生具有重要意义。

创新要点: ①选题新颖, 未见有中药提取液对体外培养的牙髓细胞作用的报道。②技术方法, 牙髓组织体外培养难度大, 本研究成功地进行了牙髓细胞培养。由于牙髓组织存在的特殊性, 需要取生活着的牙髓, 必须拔除牙齿劈开牙体硬组织, 而且不损伤活着的牙髓组织, 一颗牙齿的牙髓组织量很少, 这给牙髓细胞的体外培养带来困难。③研究结果表明骨碎补对体外培养的人牙髓细胞有明显的促增殖作用。

2 组织块法培养人牙髓细胞的增殖与分化

姜新朋(吉林大学口腔医学院牙体牙髓病科, 吉林省长春市 130041)

推荐理由: 牙髓细胞的健康状态可以反映牙髓年龄和活力, 抵御外来有害刺激的潜能, 牙髓创伤和切除后, 在无菌条件下会形成牙本质桥, 牙髓自体移植, 牙髓细胞可以分化成造牙本质细胞、成骨细胞、成软骨细胞、成纤维细胞, 但其确切机制仍不清楚。细胞的表面分子表达作为鉴定牙髓细胞的标志之一。角蛋白

I型胶原是构成牙本质基质的主要胶原; 碱性磷酸酶参与骨等钙化组织代谢和再生的一种功能性标志酶, 也常作为鉴定该细胞标志之一。

实验选用易于组织块贴壁的生物膜培养瓶, 经过这样的预处理细胞贴壁率、细胞所得率明显增高, 传代后细胞生长良好。可为后续的其他实验操作提供大量细胞。

实验培养牙髓细胞呈明显波形丝蛋白阳性, 胞浆内染色的波形丝分布均匀, 胞核无着色, 角蛋白染色呈阴性, 胞浆无着色, 不同波形蛋白是中间丝蛋白的一种, 主要表达于非终末分化细胞, 角蛋白阴性, 各组碱性磷酸酶均呈阳性表达, 分泌碱性磷酸酶其活性随培养时间的延长而升高, 提示细胞来源于中胚层, 无上皮细胞混杂。体外培养所获得的人牙髓细胞对于牙髓生物学研究都有着极其重要的意义。

3 在裸鼠肾囊膜培养模式下人牙胚组织的成牙能力

胡雪峰(福建师范大学生命科学学院, 福建省福州市 350007)

推荐理由: 揭示人类牙齿发育的组织学特点是当前牙体生物工程学的热点课题, 该课题将提供人类人体牙齿组织学再生和修复的重要手段, 并最终解决牙体缺失的生物工程治疗。

课题应用已经发育到一定时期的人磨牙牙胚植入到裸鼠肾囊膜下, 在不同的时期观察人牙胚在非牙源环境的成牙情况, 探讨人牙齿在裸鼠肾囊膜下培养的可行性。方法简单易行, 结果明确可靠, 可为更深入进行相关的生物工程学研究建立参考。

牙胚通过此途径可以获得足够支持细胞生长和分化的营养, 但难以获得足够的钙质使分

泌的牙釉质与牙本质钙化, 因而其生成的牙齿结构硬度较低。那么, 如何在培养的过程中如何得到更多的钙质, 促进牙齿的钙化, 有待进一步研究。

4 人乳牙牙髓基质细胞的分离培养

闫征斌(大庆油田总医院口腔科, 黑龙江省大庆市 163001)

5 体外构建组织工程化牙周膜

常秀梅(广东医学院附属医院口腔科, 广东省湛江市 524001)

6 体外培养人牙周膜细胞增殖活性与双黄补的干预

许彦枝(河北医科大学第四医院口腔科, 河北省石家庄市 050011)

7 犬牙龈成纤维细胞的体外分离培养

钟泉(福建医科大学口腔医学院, 福建省福州市 350004)

8 机械牵张人牙周膜钙离子通道的变化

孙苗(哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔正畸科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

9 釉基质蛋白促进牙周组织再生

林维龙(辽宁医学院, 辽宁省锦州市 121000)

全文详见: www.crter.org/sites/MainSite/Detail.aspx?StructID=91930