

成年与幼年猪半月板损伤愈合的体外实验**

戴 祝¹, 杨乐忠², 陈志伟¹, 刘春磊¹

In vitro experimental study on the healing of meniscus injury between mature and immature swines

Dai Zhu¹, Yang Le-zhong², Chen Zhi-wei¹, Liu Chun-lei¹

文章亮点:

将成年猪与幼年猪半月板从体内分离出来, 建立全层纵裂模型, 进行体外器官培养, 排除血运的影响, 观察成年猪及幼年猪半月板损伤愈合情况, 结果证明幼年半月板愈合优于成年半月板。

Abstract

BACKGROUND: The reason why the healing of immature meniscus injury is better than that of mature meniscus is the richer blood supply in immature meniscus than in mature meniscus in traditional opinion.

OBJECTIVE: To observe the differences in the interface healing of meniscus injury between mature and immature swine through *in vitro* organ culture models and to investigate the underlying mechanism of the healing of meniscus injury.

METHODS: The medial and lateral menisci were harvested from the posterior knees of local mature swine (6 months old) and local immature swine (1 month old) after death. The specimens were divided into mature group and immature group with 32 specimens in each group. A full-thickness tear model was established. The specimens were cultured *in vitro* for 0, 2, 4 and 6 weeks. Tear interface healing was investigated by using histology analysis and semi-quantitative scores were recorded.

RESULTS AND CONCLUSION: In the mature group, no reparative response was observed in all specimens except two specimens showed little reparative tissue at the interface at week 6 after culture. In the immature group: a few reparative tissues could be observed in three specimens at week 2 after culture; reparative response was observed in all specimens and bridge linking could be found in three specimens at week 4 after culture; the defects vanished in five specimens and bridge linking could be found in another three specimens at week 6 after culture. Semi-quantitative scores in the immature group were both higher than those in the mature group at weeks 4 and 6 after culture ($P < 0.05$). Significant differences could be found at all the time points except for 0 and 2 weeks ($P < 0.05$). These findings suggest that excluding the influence of vascular supply, synovium and cell factors in *in vitro* organ culture models, the reason why the healing potential in the immature meniscus is superior may contribute to its better meniscal healing than mature meniscus.

Dai Z, Yang LZ, Chen ZW, Liu CL. *In vitro* experimental study on the healing of meniscus injury between mature and immature swines. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(33): 6107-6110. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

摘要

背景: 幼年半月板损伤后的愈合能力要优于成年半月板, 以往认为是由于幼年半月板血运较成年半月板丰富。

目的: 通过在体外器官培养模型中观察成年及幼年猪半月板损伤界面愈合的差异, 探讨半月板损伤愈合的机制。

方法: 6月龄成年猪、1月龄幼年猪处死后取双侧膝关节内、外侧半月板, 每组32份标本, 建立全层纵裂模型。标本行体外器官培养, 培养0, 2, 4, 6周后观察纵裂界面愈合情况并半定量评分。

结果与结论: 成年组培养6周后, 2份标本有少量修复组织产生。幼年组培养2周后, 3份标本已有少量修复组织产生; 4周后所有标本有修复反应, 其中3份有桥接; 6周后5份标本裂隙消失, 其余3份有桥接。培养4, 6周后, 幼年组组织学半定量得分高于成年组($P < 0.05$); 幼年组除0周与2周以外, 其余各时间点比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。说明体外器官培养模型排除了血运、滑膜、细胞因子等的影响, 幼年半月板愈合优于成年半月板是由于其内在愈合能力强于成年半月板。

关键词: 半月板; 损伤; 器官培养模型; 愈合; 体外实验; 猪; 组织构建

戴祝, 杨乐忠, 陈志伟, 刘春磊. 成年与幼年猪半月板损伤愈合的体外实验[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(33): 6107-6110. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

¹Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of the University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ²Department of Orthopedics, South Branch of Yongzhou Central Hospital, Yongzhou 425006, Hunan Province, China

Dai Zhu★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of the University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China
oliverdaizhu@sina.com.cn

Corresponding author: Yang Le-zhong, Master, Physician, Department of Orthopedics, South Branch of Yongzhou Central Hospital, Yongzhou 425006, Hunan Province, China
toulanyingwang@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No.10JJ3094*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.33.006

Received: 2011-12-09
Accepted: 2012-01-09

¹ 南华大学附属第一医院骨科, 湖南省衡阳市 421001; ² 永州市中心医院南院骨科, 湖南省永州市 425006

戴祝★, 男, 1980年生, 湖南省望城县人, 汉族, 2005年中南大学湘雅医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事关节外科与运动医学研究。oliverdaizhu@sina.com.cn

通讯作者: 杨乐忠, 硕士, 医师, 永州市中心医院南院骨科, 湖南省永州市 425006 toulangyingwang@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)33-06107-04

收稿日期: 2011-12-09
修回日期: 2012-01-09
(20111009010/D·T)

0 引言

膝关节半月板损伤后的愈合一直是运动医学领域内研究的一个热点^[1]。以往认为半月板损伤后能否愈合主要依赖于血运^[2], 即有血运区损伤能自然愈合, 可以缝合, 而无血运区损伤不能自然愈合, 需行半月板成形或切除。动物实验和临床观察发现^[3], 幼年半月板损伤后的愈合能力要优于成年半月板, 以往认为主要是由于幼年半月板血运较成年半月板丰富。然而, 除了血供不同, 两者的内在愈合潜能是否也不同呢? 为了解决这一疑问, 本实验将成年猪与幼年猪半月板从体内分离出来, 进行体外器官培养, 排除血运的影响, 观察成年猪及幼年猪半月板损伤愈合情况。

1 材料和方法

设计: 开放性实验。

时间及地点: 2010-09/2011-03在南华大学附属第一医院临床研究所完成。

材料:

实验动物: 6月龄本地成年猪8头, 体质量75~85 kg, 雌雄不限, 购自本地屠宰场; 1月龄幼年猪8头, 体质量5.5~7.5 kg, 雌雄不限, 购自本地饲养场。经检查所有半月板均没有退变或撕裂, 试验过程中符合医学伦理学标准。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养液(1:1)	美国 Hyclone 公司
无支原体胎牛血清	浙江天杭生物科技有限公司
两性霉素 B	美国 Amresco 公司
6孔培养板	美国 Costar 公司
K60-4-1型 CO ₂ 培养箱	美国 Thermo 公司
TS100-F 型倒置相差显微镜	日本 Nikon 公司

方法:

半月板损伤模型的制作: 所有猪处死后, 立即取下双侧膝关节, 用双氧水、生理盐水冲洗, 络合碘消毒, 无菌巾包裹后冰敷, 迅速带回实验室。稀释络合碘, 双氧水, 生理盐水冲洗,

络合碘消毒, 铺无菌巾单, 去除皮肤及膝关节周围软组织, 再次络合碘, 双氧水, 生理盐水冲洗, 加盖无菌巾单, 切开关节, 完整取出内、外侧半月板, 切除周边滑膜, PBS冲洗5遍。每个半月板体部由外向内切取宽约8 mm大小的标本1份, 成年半月板标本32份, 幼年半月板标本32份。用尖刀片在标本中、内1/3交界处造长约4 mm的全层纵裂模型。

体外器官培养: 将制作好的标本放入6孔培养板内, 每孔1份标本。加入DMEM/F12(1:1)培养液至完全浸没标本, 培养液的配制参照 Kobayashi等^[4]的方法: 含体积分数10%胎牛血清、10 000 U/mL青霉素、10 g/L链霉素、25 mg/L两性霉素B。置于体积分数5%CO₂、37℃恒温培养箱内培养。第24小时更换培养液1次, 此后每3 d更换培养液1次, 每周更换培养板1次。分别于培养0, 2, 4, 6周后每组随机取8份标本进行检测。

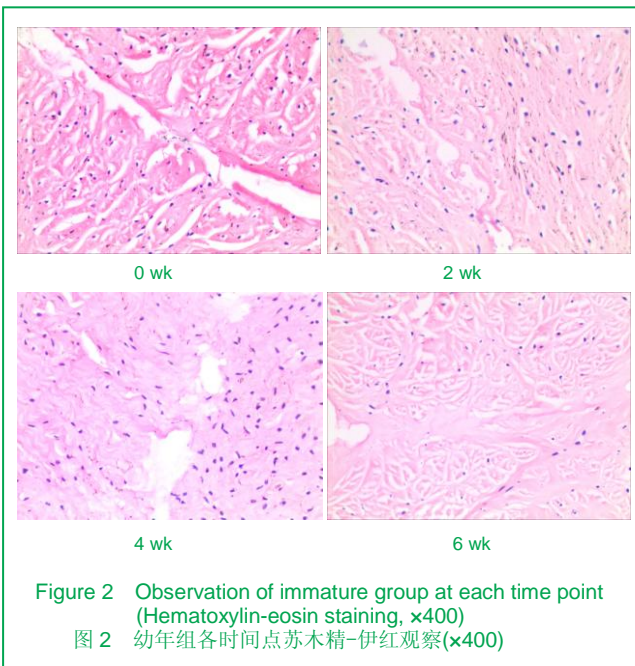
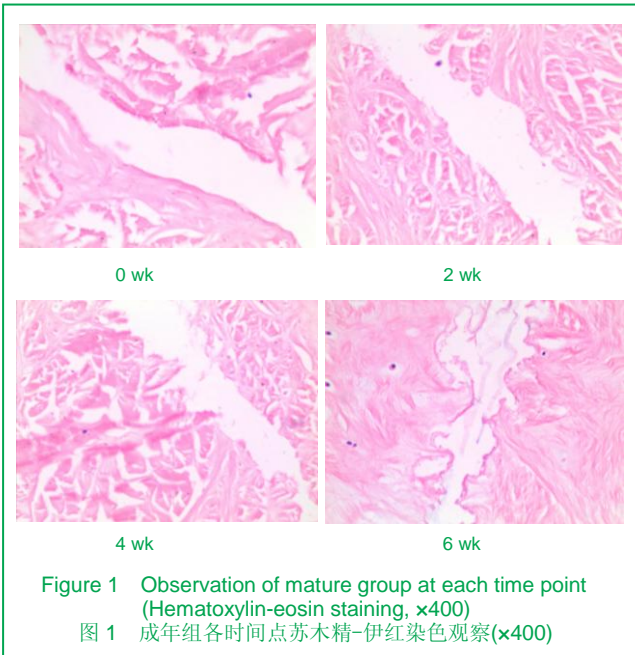
检测指标: 标本用40 g/L多聚甲醛固定24 h, 脱水, 石蜡包埋, 垂直于纵裂切片, 厚5 μm, 纵裂两端及中间各取1个切片, 苏木精-伊红染色, 观察纵裂界面愈合情况, 参照Kobayashi等^[4]的评分标准进行半定量评分: 0分, 无明显修复反应; 1分, 有修复反应, 无桥接; 2分, 有桥接, 但存在裂隙; 3分, 裂隙消失。每份标本取3张切片的最大得分作为该标本得分。

统计学分析: 采用SPSS 17.0统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较非参数秩和Mann-Whitney *U* 检验, 组内各时间点比较采用非参数秩和Kruskal-Wallis *H* 检验, 两两比较采用非参数秩和Mann-Whitney *U* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 成年组样本观察结果 除有1个标本在6周时有少量修复组织产生外, 其余标本在各时间点均无明显修复反应, 见图1。

2.2 幼年组观察结果 培养2周后3份标本已有少量修复组织产生; 4周后所有标本均出现修复反应, 其中3份标本出现桥接, 但仍有裂隙存在; 6周后5份标本裂隙消失其余3份有桥接, 见图2。



2.3 各时间点两组半定量评分结果 见表1。

表1 两组各时间点半定量评分
Table 1 The semi-quantitative scores of the two groups at each time point (x±s, n=8)

Group	0 wk	2 wk	4 wk	6 wk	Statistics	
					H	P
Mature	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.5	6.200	0.10
Immature	0.0±0.0	0.4±0.5	1.4±0.5 ^a	2.6±0.5 ^b	26.550	2
Z	0.000	-1.861	-3.664	-3.520	0.000	
P	1.000	0.063	0.000	0.000		

^aP < 0.05, vs. 0, 2 wk; ^bP < 0.05, vs. 0, 2, 4 wk

培养0, 2周, 两组间比较差异无显著性意义(P > 0.05); 培养4, 6周, 幼年组得分高于成年组(P <

0.05)。成年组在各时间点间的比较, 差异无显著性意义(P > 0.05)。幼年组中, 0周与2周比较, 差异无显著性意义(P > 0.05); 0周与4周、0周与6周、2周与4周、2周与6周、4周与6周比较, 差异均有显著性意义(P < 0.05)。

3 讨论

半月板组织中的纤维软骨细胞具有一定的惰性, 自身代谢不活跃, 对营养的要求相对较低, 适合在体外进行器官培养^[5-9]。国内外已有少量采用体外器官培养模型进行了半月板损伤修复的研究报道^[10-12]。本实验成功建立了半月板器官培养系统, 部分标本培养达6周, 没有出现组织坏死。本实验很好克服了标本污染的难题, 标本制作过程严格无菌操作, 培养的第24小时换液1次, 培养液抗生素浓度较细胞培养高。半月板器官培养系统能够消除血供、滑膜及生长因子等外部因素对半月板损伤愈合的影响, 为研究半月板内在愈合能力提供了一种理想模型。

成年半月板无血运区损伤不能自然愈合, 临床中半月板损伤在成年患者中多见, 而幼年患者非常少。有研究认为幼年患者半月板损伤其实并不少, 由于其自然愈合能力较强, 多能自然愈合, 因而呈隐性^[13-14]。幼年患者半月板损伤能自然愈合的原因以前认为主要是由于幼年半月板血运较成年半月板丰富, Petersen等^[15]通过免疫组化染色的方法研究半月板的血供, 在新生儿及11个月大的婴儿, 半月板全部区域均有血运, 15岁时半月板中央成为无血运区, 至18岁成年时仅周围1/3存在血运。幼年半月板与成年半月板在组织结构上存在明显差异^[16], 在幼年半月板, 细胞密度高, 胶原束较细小而少, 随着年龄的增长, 细胞密度逐渐降低, 而胶原纤维含量则逐渐增加^[3]。此外, 而半月板损伤愈合还需要滑膜、生长因子、生物力学稳定性等因素的协同作用^[17-20]。本实验成功建立了半月板器官培养系统, 消除了血运、滑膜及生长因子、生物力学稳定性等外部因素的影响, 研究结果能反应成年及幼年半月板内在愈合能力的差异。

半月板内在愈合能力主要与细胞密度及细胞活性相关, 半月板损伤后的愈合过程依赖于纤维软骨细胞的基质合成和胶原交联的形成。幼年半月板纤维软骨细胞密集, 并且具有更高的活性, 在损伤区能够合成更多的胶原和细胞外基质, 有利于损伤的愈合; 成年半月板纤维软骨细胞相对稀疏, 且为分化终末细胞, 活性低。本实验中, 成年组在6周后有2份标本出现了修复反应, 但无有效的桥接形成; 而幼年组在2周时已有修复反应, 4周时已有标本出现

桥接, 6周时大部分标本裂隙已完全被修复组织充填。4, 6周时, 两组比较有统计学差异。但是半月板纤维软骨细胞并非完全惰性, Kobayashi等^[2]在体外器官培养模型中发现, 成年半月板损伤后有潜在的愈合能力。本实验体外培养6周时观察到部分标本有少量修复反应发生。

在本实验中观察到, 幼年半月板产生的愈合方式为瘢痕样愈合, 愈合组织与周围正常半月板在组织学上还有一定的差异。而兔体内实验研究发现, 半月板缝合6周时裂口由纤维组织修复, 可见少量纤维软骨细胞^[21]。这可能是由于器官培养环境只能提供半月板体外存活必需的营养物质, 与体内环境有较大的差异, 这种瘢痕样愈合组织改建为正常的纤维软骨组织可能还需要更长的时间。

总之, 本实验成功建立了半月板器官培养模型, 体外器官培养模型排除了血运、滑膜、细胞因子等的影响, 体外器官培养下幼年半月板愈合优于成年半月板是由于其内在愈合能力强于成年半月板。本研究为进一步在体外器官培养模型中研究半月板提供了实验依据。

致谢: 感谢南华大学附属第一医院临床实验室对本研究的大力支持。

4 参考文献

- [1] Dai Z, Chen JW, Chen SY, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2011;25(1):13-16.
戴祝, 陈疾忤, 陈世益, 等. 半月板成形和缝合治疗累及腓肌腱裂孔的盘状软骨损伤[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(1):13-16.
- [2] Makris EA, Hadidi P, Athanasios KA. The knee meniscus: Structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. Biomaterials. 2011;32(30):7411-7431.
- [3] Baker BM, Gee AO, Sheth NP, et al. Meniscus tissue engineering on the nanoscale: from basic principles to clinical application. J Knee Surg. 2009;22(1):45-59.
- [4] Kobayashi K, Fujimoto E, Deie M, et al. Regional differences in the healing potential of the meniscus-an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium. Knee. 2004;11(4):271-278.
- [5] Vickers AE, Fisher RL. Precision-cut organ slices to investigate target organ injury. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2005;1(4):687-699.
- [6] Webber RJ, York JL, Vanderschelden JL, et al. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. Am J Sports Med. 1989;17(3):393-400.
- [7] Armitage WJ. Preservation of Human Cornea. Transfus Med Hemother. 2011;38(2):143-147.
- [8] Feng K, Xie W, Chen BL, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(15):2823-2827.
冯坤, 谢文, 陈宝龙, 等. 淫羊藿提取物对体外软骨器官生长的促进作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(15):2823-2827.
- [9] Niu PY, Xiong W, Li F, et al. Influence of osmotic loading on organ culture model for rabbit intervertebral disc. Zhongguo Jizhu Jisui Zazhi. 2009;19(10):729-734.
牛朋彦, 熊伟, 李锋, 等. 渗透压负荷对兔椎间盘器官培养模型的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2009, 19(10):729-734.
- [10] Narita A, Takahara M, Ogino T, et al. Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. Knee. 2009;16(4):285-289.
- [11] Hennerbichler A, Moutos FT, Hennerbichler D, et al. Repair response of the inner and outer regions of the porcine meniscus in vitro. Am J Sports Med. 2007;35(5):754-762.
- [12] Xu QL, Wu HS, Zhou WJ. Jiefangjun Yixue Zazhi. 1998;23(6):447-449.
徐青镭, 吴海山, 周维江. 体外器官培养模型中纤维软骨组织修复的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23(6):447-449.
- [13] Clark CR, Ogden JA. Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. J Bone Joint Surg Am. 1983;65(4):538-547.
- [14] Bellisari G, Samora W, Klinele K. Meniscus tears in children. Sports Med Arthrosc. 2011;19(1):50-55.
- [15] Petersen W, Tillmann B. Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. Acta Orthop Scand. 1995;66(4):308-312.
- [16] Land YS, Ashhurst DE. Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. Histochem J. 1996;28(4):265-274.
- [17] Horie M, Sekiya I, Muneta T, et al. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. Stem Cells. 2009;27(4):878-87.
- [18] Forriol F. Growth factors in cartilage and meniscus repair. Injury. 2009;40(3):12-16.
- [19] Tumia NS, Johnstone AJ. Regional regenerative potential of meniscal cartilage exposed to recombinant insulin-like growth factor-I in vitro. J Bone Joint Surg Br. 2004;86(7):1077-1081.
- [20] Barber FA, Herbert MA. Meniscal repair devices. Arthroscopy. 2000;16(6):613-618.
- [21] Zhang WJ, Wang YB, Zhang YD, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2000;14(2):77-79.
张伟佳, 王予彬, 章亚东, 等. 半月板缝合修复对半月板愈合影响的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(2):77-79.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 2010 年湖南省自然科学基金项目(批准号: 10JJ3094)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为第一作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 第三作者审校, 第一作者对文章负责。

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。

伦理要求: 实验中对动物处置符合中国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。