

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.44.012 [http://www.crter.org]

沈洪园, 黄华扬, 张余, 郑小飞, 李凭跃, 徐国风, 王泽锦, 王庆. 生物型异种骨软骨移植修复关节软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(44):7729-7732.

生物型异种骨软骨移植修复关节软骨缺损*★

沈洪园¹, 黄华扬¹, 张余¹, 郑小飞¹, 李凭跃¹, 徐国风², 王泽锦¹, 王庆¹ (¹解放军广州军区广州总医院, 广东省广州市 510010; ²广东冠昊生物科技有限公司, 广东省广州市 510663)

文章亮点:

1 同种异体骨软骨移植修复关节面软骨损伤的效果优于生物型异种骨软骨移植, 从软骨的苏木精-伊红染色及大体观察结果可说明这一问题。

2 绝大部分生物型骨软骨移植后软骨并没有与宿主软骨缘有直接愈合连接, 但个别移植体与宿主发生纤维性连接, 在大体标本中观察滑车、股骨内侧髌移植物的愈合情况差别较大。这些实验结果的差别及异种骨软骨作为移植修复关节软骨损伤的可行性仍需进一步实验观察。

关键词:

器官移植; 组织移植; 异种异体; 同种异体; 骨软骨移植; 软骨损伤; 修复; 羊; 猪; 去抗原处理; 省级基金

主题词:

骨移植; 软骨, 关节; 移植, 异种; 山羊; 猪

基金资助:

广东省科技计划项目(2007B031000003)*

摘要

背景: 目前应用的各种软骨修复方法均有其优点和不足, 修复组织多以纤维软骨为主, 缺乏正常透明软骨的组织化学特性和生物力学特性。

目的: 探讨生物型异种骨软骨移植修复关节软骨损伤的可行性。

方法: 实验动物普通山羊随机分成两组, 实验组供体为猪膝关节, 以 Smith & Nephew 骨软骨移植器械, 取直径 4.5 mm、长 10 mm 的圆柱状骨软骨条, 应用专利技术对动物骨软骨进行去抗原, 对照组供体为羊膝关节骨软骨条, 以低温冷冻法保存。分别于股骨滑车及内侧髌负重面的损伤处作骨软骨植入, 术后 16, 32 周处死动物, 进行大体形态及病理切片观察。

结果与结论: 大体观察实验组部分软骨缺损移植处有纤维样的组织覆盖; 部分移植体原表面软骨发黄, 表面与周缘软骨有明显界限; 对照组大体及切片镜下观察软骨缺损区基本被移植软骨覆盖, 移植边缘可见裂隙。结果可见生物型异种骨软骨移植修复关节软骨损伤的作用与同种异体骨软骨比较有差别, 同种异体骨软骨移植修复效果更佳。

Articular cartilage defect treated with biological osteochondral xenogenic graft transplantation

Shen Hong-yuan¹, Huang Hua-yang¹, Zhang Yu¹, Zheng Xiao-fei¹, Li Ping-yue¹, Xu Guo-feng², Wang Ze-jin¹, Wang Qing¹ (¹Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; ²Biological Technology Co., Ltd. of Guangdong Grandhope, Guangzhou 510663, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The methods used to repair articular cartilage defects currently have the cons and pros.

Fibrocartilages are commonly used to repair tissues, and the fibrocartilage lacks of the tissue biomechanical properties and chemical properties of normal hyaline cartilage.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of biological osteochondral xenogenic graft transplantation to repair articular cartilage defects.

METHODS: The normal goats were randomly divided into two groups. The donor pig knee joints were the experimental group. Cylindrical osteochondral with the diameter of 4.5 mm and length of 10 mm were collected with the Smith & Nephew osteochondral transplantation device, and the patented technology was used for deantigen. The donor goat knee joint osteochondrals were the control group and preserved with cryopreservation. The lesions on femoral trochlea and weight-bearing surface of medial condyle were selected respectively for osteochondral implantation, and the animals were sacrificed at 16 and 32 weeks after operation for the general and pathological section observation.

RESULTS AND CONCLUSION: General observation in the experimental showed that the lesions were covered by fibroid tissue; some cartilage of the grafts turned yellow and there was clear boundary between the surface

沈洪园★, 男, 1983年生, 广东省揭阳市人, 汉族, 硕士, 医师, 主要从事骨关节运动损伤研究。
438389512@qq.com

通讯作者: 黄华扬, 解放军广州军区广州总医院, 广东省广州市 510010
jionhzy@sina.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)44-07729-04

收稿日期: 2010-01-05
修回日期: 2013-05-22
(20100105015/M·C)

Shen Hong-yuan★, Master, Physician, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
438389512@qq.com

Corresponding author: Huang Hua-yang, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
jionhzy@sina.com

Received: 2010-01-05
Accepted: 2013-05-22

and the peripheral cartilages; the general and section observation under microscope showed that lesions of the control group were covered by the grafts basically, and cracks could be seen on the edge of the transplant part. The results show that there is difference between effects of biological osteochondral xenogenic graft transplantation and osteochondral allograft transplantation for the repairing of articular cartilage defects, and osteochondral allograft transplantation has better effect.

Subject headings: bone transplantation; cartilage, articular; transplantation, heterologous; goats; swine

Funding: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2007B031000003*

Shen HY, Huang HY, Zhang Y, Zheng XF, Li PY, Xu GF, Wang ZJ, Wang Q. Articular cartilage defect treated with biological osteochondral xenogenic graft transplantation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(44):7729-7732.

0 引言 Introduction

1743年Hunter提出软骨一旦破坏即不可自身修复^[1], Shapiro^[2]的实验证明<3 mm的缺损可以被透明软骨修复, Hunziker等^[3]的实验进一步证实了>4 mm的关节软骨在通常情况下不能自行修复。随着人口的老齡化, 因退变引起的关节软骨损伤患者显著增多。同时越来越多的年轻人参加到众多体育活动中, 外伤性的关节软骨损伤已经变得非常常见。国外学者报道关节软骨损伤的发生率为5%, 在特定人群如运动员, 发生率可高达22%~50%^[4]。Curl统计了31 516个膝关节镜检查结果, 约63%的患者存在软骨损害^[5]。如何解决关节软骨修复的问题日益重要。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

材料: 普通山羊8只, 4-8月龄, 体质量15-23 kg, 雌雄不拘, 适应性饲养2周后, 以随机数字表法随机分为实验组与对照组。

实验方法:

移植物制备:

实验组: 以猪膝关节股骨关节面骨软骨为供体, 方格法标志膝关节后, 见图1, 用Smith & Nephew骨软骨移植器械中直径为4.5 mm圆形骨凿分别在猪膝关节股骨滑车、股骨内侧髁负重关节面凿取长度为10 mm或以上的圆柱状骨软骨条, 见图2。



图1 方格法标记猪膝关节股骨关节面骨软骨

Figure 1 The femoral articular surface osteochondral image of pig knee joint labeled with square method



图2 圆柱状猪膝关节骨软骨条, 直径为4.5 mm, 长度为10 mm

Figure 2 The cylindrical osteochondral strips of pig knee joint with the diameter of 4.5 mm and length of 10 mm

利用环氧化物作为交联剂及多重蛋白修饰等专利(专利号: US6106555)技术对猪骨软骨进行去抗原处理, 并进行灭菌照射处理。

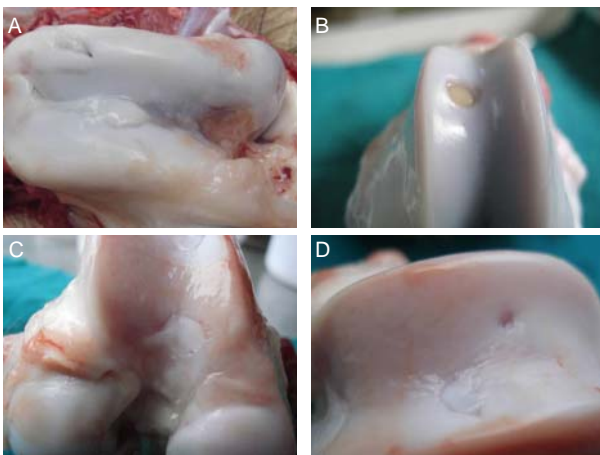
对照组: 同实验组方法, 用直径4.5 mm圆形骨凿取出的羊膝关节骨软骨条浸泡于甘油中, 在4 °C环境下保存30 min; 置于-30 °C冰箱(MEDICALFEWWZER)保存8-12 h, 移入-86 °C SANYOULTAR LOW超低温冰箱内保存。对照组骨软骨条取材遵循无菌操作取出, 无需进行照射灭菌。低温保存1周, 术前1 h从低温环境中取出置于45 °C左右的林格氏液中重新水合。

手术方法: 膝关节前内侧切口, 锐性分离皮下组织, 沿髌骨上缘2 cm至髌骨内侧缘、髌韧带内侧缘、胫骨结节内侧切开深筋膜, 外移髌骨屈膝显露股骨滑车及股骨内侧髁关节面; 以Smith&Nephew骨软骨移植器械, 直径4.5 mm空心圆柱形骨钻分别在膝关节股骨滑车、股骨内侧髁关节面钻取深度为10 mm骨软骨缺损面, 测深棒测量缺损面的深度; 挑选相匹配直径的生物型异种骨软骨或同种异体骨软骨, 修整移植物长度与骨软骨缺损面深度一致, 将移植骨软骨块置入相应内径的骨软骨移植栓推进器, 然后均匀用力将移植骨条缓慢向受区骨洞推入, 用平头棒轻打植骨条, 观察移植后关节面弧面平整; 复位髌股关节, 冲洗术区后缝合深筋膜层、皮下组织及皮肤, 切口缝合敷料覆盖。

主要观察指标: 苏木精-伊红染色及大体观察软骨修复情况。

2 结果 Results

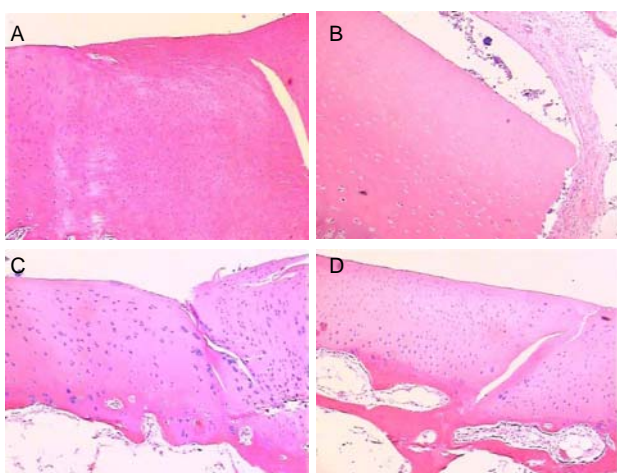
16周和32周时实验组大体及镜下观察部分软骨缺损移植处纤维样组织覆盖, 滑车部移植与宿主间有纤维组织连接; 股骨髁部分移植原表面软骨发黄, 表面与周缘软骨有明显界限, 见图3、4。对照组大体及切片镜下观察软骨缺损区基本被移植软骨覆盖, 移植边缘可见裂隙部分有骨小梁生长现象。



注: 部分软骨缺损移植处有纤维样的组织覆盖; 部分移植原表面软骨发黄, 表面与周缘软骨有明显界限。

图3 大体观察生物型异种骨软骨移植后关节软骨修复情况

Figure 3 General observation of articular cartilage after biological osteochondral xenogenic graft transplantation



注: 移植物软骨帽及松质骨周缘未发现明确的淋巴细胞、浆细胞浸润。

图4 生物型异种骨软骨移植后关节软骨组织苏木精-伊红染色($\times 40$)

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of articular cartilage after biological osteochondral xenogenic graft transplantation ($\times 40$)

3 讨论 Discussion

局灶性软骨或者骨软骨病变的治疗方法众多, 涵盖范围广泛, 可分为4大类: ①旨在减轻临床症状的症状性治疗, 例如冲洗和清理术。②采用源于骨髓的干细胞或者纤维母细胞治疗, 包括钻孔术、微骨折术、关节磨削成形术以及海绵样骨外露术。③诱导软骨细胞再生, 包括骨膜移植、软骨膜移植或者自体软骨细胞移植术。O'Driscoll等^[6-7]在动物实验中将骨膜的生发层朝向关节腔, 结合使用CPM, 58%的兔子显示出透明关节软骨修复, 但是该技术的临床应用结果并未出现如此引人注目的结果。Mithofer等^[8]对45例行自体软骨细胞移植术的足球运动员进行了平均41个月的随访, 就其运动能力、折返跑时间、技术水平以及Tegner运动等级评分等指标进行评价, 结果显示72%的运动员恢复良好, 33%的运动员重返赛场。1999年, Behrens等^[9]报道了基质诱导的自体软骨细胞移植术。④异体或者自体骨软骨移植术。1993年Matsusue等^[10]首次报道从股骨外侧壁上获取多个圆柱状移植, 施行自体骨软骨移植治疗骨软骨缺损。黄华扬等^[11]2002年采用关节镜下带骨软骨镶嵌移植修复软骨病损, 提示对于治疗关节应力局限性软骨病损及创伤性软骨缺损的45岁以下患者是一个效果确实、值得推广的方法。

目前关于软骨修复后的长期临床随访报道较少, 各种方法间缺乏多中心随机化的比较研究, 应用的各种软骨修复方法均有其优点和不足, 迄今为止还没有任何一种方法表现出较其他方法更大的优越性, 多数关节软骨全层损伤修复方法疗效不尽如人意, 修复组织也多以纤维软骨为主, 缺乏正常透明软骨的组织化学特性和生物力学特性。

3.1 动物模型的制作 实验选用的山羊为4-8月龄, 其机体代谢旺盛, 有利于损伤组织的修复; 临床上适于接受软骨移植手术的患者一般为年轻患者, 年龄偏大是影响疗效的主要因素之一。此外, 因山羊股骨外侧髁前方有肌腱阻挡, 为避免更大创伤, 每只动物修复的部位均为股骨内侧髁负重关节面及股骨滑车关节面。

3.2 去抗原处理方案的选择 本课题与广东冠昊生物科技股份有限公司合作, 利用其自主知识产权的美国专利技术(专利号: US6107555), 该技术应用环氧化物作为交联剂, 加上多种蛋白修饰技术, 使处理后的人工材料不但更彻底地去除异种蛋白的免疫原性, 保留组织的天然机械性能, 且无毒性残留物。已有前期实验证明其具有良好的生物支架作用^[12-13]。本实验利用此技术制备出生物型异种骨软骨移植进行软骨移植。在16、32周大体观察时, 未见关节发生滑膜侵蚀关节面现象, 苏木精-伊红染色镜下观察移植物软骨帽及松质骨周缘未

发现明确的淋巴细胞、浆细胞浸润,提示上述时间段宿主并未发生明显的排斥反应。但是在移植早期动物体内是否发生了免疫应答,尚不能肯定,不过可以推测,即使发生了免疫应答,亦不是致命性的免疫排斥。

3.3 实验结果分析 生物型异种骨软骨移植在这次试验中并没有得到全面的成功,同种异体骨软骨移植修复关节面软骨损伤的效果比实验组好,从软骨的苏木精-伊红染色及大体观察结果可说明这一问题。作者的这次实验使用Smith & Nephew的骨软骨移植器械进行手术,操作方便,未见骨软骨移植物发生松动及脱出。术后移植物骨软骨组织在骨架支持下可进行正常生物应力的传导,术后实验动物早期进行圈养并逐渐过渡为自由活动式放养,移植的软骨面在关节活动时能够活动,有利于关节滑液等营养成分的渗透,虽然绝大部分生物型骨软骨移植后软骨并没有与宿主软骨缘有直接愈合连接,但实验组部分个别移植物与宿主发生纤维性连接,而且大体标本观察实验组滑车、股骨内侧髁移植物愈合情况差别较大。

经深低温冷冻保存的实验方案不仅可有效去除移植物的免疫原性,又可保留软骨细胞的活性。这次实验组的去抗原处理方案由合作单位提供,去抗原后移植物软骨细胞是否仍具有活性并未提供客观实验数据证明,这点将在今后实验中证明完善。实验中发现,在股骨内侧髁负重关节面和股骨滑车关节面观察到的移植物修复的效果差别较大,分析可能的原因:①股骨内侧髁负重关节面移植物在手术后是一个直接承重的状态,因为在手术后并未对术肢进行固定处理,因此内侧髁直接承重受到体质量的机械应力刺激较大。②股骨滑车部由于仅与髌股关节面相作用,移植物并未有一个体质量直接作用的机械应力刺激,其移植修复效果可能优于内侧髁。

综上所述,生物型异种骨软骨移植在此次试验中并没有得到全面的成功,对照组移植效果更佳。经环氧化物处理的生物型骨软骨移植术后在宿主大体及镜下观察并未发现明确的免疫反应;实验组部分关节面有修复迹象,股骨滑车部和股骨内侧髁部之间实验结果的差别及异种骨软骨作为移植修复关节软骨损伤的可行性仍需进一步实验观察。

作者贡献: 实验设计、实施、评估均为本文作者。

利益冲突: 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: 实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 抗原一是指能够刺激机体产生(特异性)免疫应答,并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结

合,发生免疫效应(特异性反应)的物质。抗原的基本特性有两种,一是诱导免疫应答的能力,也就是免疫原性,二是与免疫应答的产物发生反应,也就是抗原性。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Hunter W. On the structure and diseases of articulating cartilage. Phil Trans 1743; 42B:514-521.
- [2] Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am. 1993;75(4):532-553.
- [3] Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. J Bone Joint Surg Am. 1996;78(5):721-733.
- [4] Piasecki DP, Spindler KP, Warren TA, et al. Intraarticular injuries associated with anterior cruciate ligament tear: findings at ligament reconstruction in high school and recreational athletes. An analysis of sex-based differences. Am J Sports Med. 2003;31(4):601-605.
- [5] Curl WW, Krome J, Gordon ES, et al. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. Arthroscopy. 1997;13(4):456-460.
- [6] O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. J Bone Joint Surg Am. 1988; 70(4): 595-606.
- [7] Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, et al. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg Am. 1980;62(8):1232-1251.
- [8] Mithöfer K, Peterson L, Mandelbaum BR, et al. Articular cartilage repair in soccer players with autologous chondrocyte transplantation: functional outcome and return to competition. Am J Sports Med. 2005;33(11):1639-1646.
- [9] Behrens P, Ehlers EM, Köchermann KU, et al. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation. MMW Fortschr Med. 1999;141(45):49-51.
- [10] Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. Arthroscopy. 1993;9(3):318-321.
- [11] 黄华扬,尹庆水,章莹,等.关节镜下带骨软骨镶嵌移植修复软骨病损[J].中华外科杂志,2002,40(9):662-665.
- [12] 智发朝,张兰军,彭秀凡,等.用生物型人工食管进行食管重建的实验研究[J].中华消化杂志,2003,23(3):137-141.
- [13] 史志东,陈明振,郭英,等.生物型硬脑膜原位植入转归的实验研究[J].中华神经精神疾病杂志,2005,31(4):260-263.