

小肠黏膜下层在骨科组织工程学中的进展

Progress of small intestine submucosa in bone tissue engineering

王茂源, 赵建宁

WAN G Maoyuan, ZHAO Jianning

关键词 小肠黏膜下层; 组织工程 **Key words** Small intestinal submucosa; Tissue engineering

随着组织工程技术的发展, 小肠黏膜下层 (small intestinal submucosa, SIS) 作为细胞外基质类生物衍生材料, 已广泛用于组织缺损的修复。SIS 是一种不含细胞的细胞外基质材料, 主要由 I、III 型胶原蛋白构成, 还含有少量的 IV、V 型胶原及多种生长因子, 如成纤维细胞生长因子 2、转化生长因子 β 及血管内皮生长因子等^[1]。SIS 植入体内后, 能迅速诱导细胞浸润, 刺激血管的形成和宿主细胞的长入和分化, 再生的组织在结构和功能上与正常组织相似^[2]。SIS 具有良好的组织相容性, 能为宿主细胞提供附着和迁移的环境, 可促进多种细胞在 SIS 支架上黏附、生长及分化^[3]。因 SIS 中不含细胞, 不会引起免疫介导排斥反应。超过 1 000 种交叉种系的移植试验证实 SIS 无免疫原性, 直接激发免疫实验无应答反应^[4]。SIS 作为体内组织工程的材料, 具有适当的机构特性, 能承受周围组织压力, 为再生细胞提供足够的生长空间, 能够提供暂时的机械支撑, 并维持足够的时间, 直到再生组织有足够的支撑力为止^[5]。SIS 还具有抗微生物活性^[6]。近年来 SIS 在骨科组织工程中的应用越来越多, 本文拟就 SIS 在修复骨、软骨、肌腱及韧带缺损中的作用作一综述。

1 骨组织工程

Suckow 等^[7]在评价 SIS 修复长骨骨缺损的研究中, 分别用 SIS 及脱钙松质骨基质来填充挠骨缺损。在术后第 3、6 周时对骨缺损处行放射学检查和组织学检查。在第 3 周时, 用 SIS 及脱钙松质骨基质填充的骨缺损处, 骨组织再塑形均已发生。SIS 修复骨缺损处首先出现单核细胞和细胞外基质的侵入, 而脱钙松质骨基质修复骨缺损处则出现多中心的骨与软骨的再生。SIS 填充骨缺损处术后第 3 周可见软骨的形成, 术后第 6 周可见骨的形成。脱钙松质骨基质修复骨缺损处呈多中心填充骨缺损而 SIS 修复骨缺损时沿骨纵轴方向逐渐发生。这表明 SIS 是通过骨传导来修复骨缺损而不是通过骨诱导。总之, 这项研究表明 SIS 能加快长骨骨缺损的修复, 可作为骨组织工程中的修复材料。

SIS 还可和其他的生物活性材料结合用于骨组织工程。Lee 等^[8]制备了聚乳酸己醇酯 (PLGA) 与 SIS 的混合物。随着 SIS 在 SIS/PLGA 混合物中含量的增加, 骨髓基质干细胞与 SIS/PLGA 混合物的结合能力相应的增加, 并且 SIS/PL-

GA 支架的降解率也与 SIS 的含量有关。分别把单纯的 PLGA 和 SIS/PLGA 支架植入裸鼠背部皮下下来观察两者的骨传导性。结果表明: 在对骨形成的影响上, SIS/PLGA 支架比单纯的 PLGA 支架更大。这也说明了 SIS/PLGA 支架在骨的形成和再塑形过程中起到了一定的作用。但是 Moore 等^[9]在评价 SIS 的骨再生能力的研究中发现: 分别用颗粒松质骨和 SIS 填充大鼠股骨节段性缺损。分别在双周时行放射学和组织学检查。松质骨修复骨缺损处可见大量的新骨形成, 12 只兔子中的 10 只骨缺损已愈合。与此相对, SIS 修复骨缺损处无新骨形成, 仅可发现纤维组织。并且在第 12 周时仍可见到残留的 SIS。机体 SIS 的细胞反应包括: SIS 浅层轻度单核细胞侵入和 SIS 深层很少见到细胞。SIS 在骨组织工程学中的应用还需进一步深入探讨。

2 软骨组织工程

SIS 作为软骨组织工程的生物性支架用于软骨细胞再生前景非常好。Pribitkin 等^[10]将 SIS 植入软骨缺损处, 在术后第 3 个月和第 6 个月行组织学检查。组织学检查显示 SIS 植入可见软骨形成, 并伴有轻微的慢性炎症。而未植入 SIS 处没有任何软骨形成。Beatty 等^[11]的研究也肯定了 SIS 用于修复软骨组织的作用。将软骨细胞分别种植于 SIS 和聚乙醇酸 L-聚乳酸的支架上, 并分别在第 5、8、12 和 34 周移植于裸鼠皮下。结果 SIS 上的软骨样组织、羟脯氨酸、黏多糖含量及剪切模量都优于种植在聚乙醇酸 L-聚乳酸的支架上, 显示了 SIS 作为组织工程生物支架材料的实用性和优越性。但此研究同时表明软骨细胞种植在聚乙醇酸 L-聚乳酸支架上的 I、II 型胶原含量比种植在 SIS 上更多。

作为半月板组织再生的生物性支架, SIS 用于修复半月板缺损取得了较好的效果。Gastel 等^[12]用 SIS 修复半月板缺损, 结果术后第 4 周时 SIS 仍存留于移植处, 较柔软, 呈半透明状。组织学检查表明软骨细胞已侵入 SIS 中。第 12 周时, 移植物呈固体状和不透明状。组织学检查可见宿主半月板纤维软骨细胞出现在移植物周边。术后第 24 周时, 半月板缺损基本已愈合, 与正常的半月板外形、相容性及颜色都是一样的, 移植物已完全被宿主正常组织代替。SIS 还可用于较大、无血管的半月板缺损。Cook 等^[13]用 SIS 修复狗部分切除的半月板。术后 12 周狗的跛行程度比单纯切除而不作处理的旷置组的狗更轻, 前者股骨髁和胫骨髁关节软骨损害程度也

比后者轻。大体标本和超声检查可见修复的半月板与正常半月板相似。组织学检查, 术后第 1 周在所有植入 SIS 的狗中均可见植入的 SIS, 但在术后第 6 周见不到原先的 SIS 组织。免疫组化检查表明 SIS 修复半月板缺损处可见其 I 型和 II 型胶原的含量、分布与正常组织相似。而在旷置组半月板缺损中的关节软骨较 SIS 修复组少。Fox 等^[14]将 SIS 放入狗的膝关节内, 结果伴随细胞的浸润, 残留 SIS 含有较高的胶原酶免疫活性和大量的胶原 I。此研究表明, 无细胞的 SIS 支架在活动关节内能使细胞黏附在支架上并向支架内生长。因 SIS 具有细胞传导性、合适的存留时间及无移植物的免疫原性等特点将广泛用于关节周围软骨组织工程。

3 肌腱组织工程

国内顾延等^[15]用猪黏膜下层制成 SIS, 用制成的 SIS 替代兔跟腱。观察期为术后第 1、4、8、12、16 周。各观察期处死 4 只动物, 进行组织学检查和力学测试。术后 1 周: 光镜下见到密度极高的大量纤维细胞, 细胞间可见到胶原纤维, 虽然这些胶原的走向较紊乱, 但胶原整体构架尚完整, 其主要走向与跟腱纵轴平行。同时还可见到丰富的血管。术后 4 周: 大量纤维细胞聚集成团, 细胞周围有新生胶原形成。有的形成胶原岛, 走向与跟腱纵轴平行。术后 8 周: 胶原岛连接成带, 走向与跟腱纵轴平行。术后 12 周: 细胞较少, 胶原连接成片, 走向与跟腱纵轴平行。术后 16 周: 胶原排列紧密, 与正常肌腱完全相似。力学测试提示从术后第 1 周到 16 周, 植入物的力学强度是逐渐增加的。此研究表明 SIS 代替肌腱的过程是代谢过程, 经过 16 周, SIS 被宿主肌腱完全替代, 其组织结构和力学性能与正常肌腱完全相似。

Dejardin 等^[16]用 SIS 修复完全切除岗下肌腱造成的缺损中, 同时对侧岗下肌腱抬高后缝合与肱骨大结节处作为对照组。分别在第 3 个月和第 6 个月进行组织学检查和力学测试。结果 SIS 再生的岗下肌腱具有良好的连续性, 与肱骨大结节和岗下肌腱端结合牢固, 与周围组织无明显的粘连及无异物或免疫学反应的组织学表现。再生的岗下肌腱沿轴向排列有序的丰富胶原组织。未见明显的炎性细胞浸润的炎性反应。力学性能测试表明 SIS 再生的岗下肌腱与对照侧相似, 但较正常岗下肌腱稍差。Derwin 等^[17]用 SIS 修复屈肌腱的缺损也有阳性发现。术后第 6 周时, SIS 修复屈肌腱缺损处有宿主炎性细胞浸润, 新生的血管、轴向张力强度及胶原组织排列方式与正常肌腱相似的组织。

4 韧带组织工程

SIS 作为一可吸收的生物性支架已用于修复前交叉韧带。Badylak 等^[18]将山羊的右前交叉韧带切除, 然后用 SIS 和自体髌韧带来修复。术后第 12 周时行力学测试表示 SIS 修复处与自体髌韧带修复处无明显异常。组织学检查表明, 术后早期在 SIS 支架中可见包括巨噬细胞和淋巴细胞在内的混和炎症细胞。术后 12 个月时, SIS 与自体髌韧带修复处均已重塑形, 并且炎症细胞已消失。

含有细胞因子和生长因子的 SIS 已用于修复缺损的脊柱韧带, 能促进脊柱韧带的愈合并且少有瘢痕组织的产生。Ledet 等^[19]将 SIS 植入切除的前纵韧带。术后 12 周时行放射学检查和脱钙组织学检查。结果放射学检查表示, 植入

SIS 组无一椎间盘突出, 而 50% 的旷置组的椎间盘平均突出 10 mm。脱钙组织学检查表明: SIS 植入切除的前纵韧带处可见胶原和纤维组织生成, 还可见与前纵韧带相似的组织。新形成的胶原组织中有少量局部炎症出现, 并且可见少许残留的 SIS。总之, 在此研究中植入的 SIS 能足够阻止椎间盘的突出。SIS 在修复横断的脊柱韧带是有效的。

在 SIS 修复内侧副韧带的研究中也有阳性发现。Musahl 等^[20]在兔右内侧副韧带造一长 6 mm 的缺损, 然后一组兔子植入 SIS, 另外一组兔子不作处理作为对照组。术后 12 周行力学测试和组织学检查。结果力学测试表明 SIS 植入组的力学强度较对照组强。在 SIS 植入组和对照组中的双盲组织学检查显示 SIS 植入组在细胞构成、胶原密度及胶原纤维排列方式上都较对照组好。此研究表明 SIS 能显著促进内侧副韧带的愈合。内侧副韧带的机械力度和组织学形态都得到改善, 这说明 SIS 在韧带组织工程中的应用前景较好。

SIS 作为一种新型的生物材料在实验中已成功用于修复骨、软骨、肌腱及韧带组织缺损, 这预示着其在临床骨组织工程中的前景非常良好。但是 SIS 的生物力学性能, 机械支撑力有待改善。在进一步研究中, 若能将 SIS 同时和其他的组织工程材料合用于组织工程中, 那么 SIS 在修复组织缺损中将发挥更大的作用。

参考文献

- 1 Voytik Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*, 1997, 67(4): 478-491.
- 2 Hodde JP, Record RD, Liang HA, et al. Vascular endothelial growth factor in porcine derived extracellular matrix. *Endothelium*, 2001, 8(1): 11-24.
- 3 Badylak SF, Record R, Lindberg K, et al. Small intestinal submucosa: A substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1998, 9(8): 863-878.
- 4 Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, et al. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation*, 2001, 71(11): 1631-1640.
- 5 Kim BS, Mooney DJ. Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure. *J Biomed Mater Res*, 1998, 41(2): 322-332.
- 6 Sankaya A, Record R, Wu CC, et al. Antimicrobial activity associated with extracellular matrices. *Tissue Eng*, 2002, 8(1): 63-71.
- 7 Suckow MA, Voytik Harbin SL, Terril LA, et al. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. *J Invest Surg*, 1999, 12(5): 277-287.
- 8 Lee SJ, Lee IW, Lee YM, et al. Macroporous biodegradable natural/synthetic hybrid scaffolds as small intestine submucosa impregnated poly(D, L-lactide or glycolide) for tissue engineered bone. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15(8): 1003-1017.
- 9 Moore DC, Pedrozo HA, Crisco JJ, et al. Prefomed grafts of porcine small intestine submucosa (SIS) for bridging segmental bone defects. *J Biomed Mater Res*, 2004, 69(2): 259-266.
- 10 Prbitkin EA, Ambro BT, Bloeden E, et al. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft. *Laryngoscope*, 2004, 114(9): 119.
- 11 Beatty MW, Ojha AK, Cook JL, et al. Small intestinal submucosa ver

11 sus salt-extracted polyglycolic acid-poly-L-lactic acid: A comparison of neocartilage formed in two scaffold materials. *Tissue Eng*, 2002, 8 (6): 955-968.

12 Gastel JA, Muirhead WR, Lifrak JT, et al. Meniscal tissue regeneration using a collagenous biomaterial derived from porcine small intestine submucosa. *Arthroscopy*, 2001, 17(2): 151-159.

13 Cook JL, Tomlinson JL, Arnoczky SP, et al. Kinetic study of the replacement of porcine small intestinal submucosa grafts and the regeneration of meniscal like tissue in large avascular meniscal defects in dogs. *Tissue Eng*, 2001, 7(3): 321-334.

14 Fox DB, Cook JL, Arnoczky SP, et al. Fibrochondrogenesis of free intra-articular small intestinal submucosa scaffolds. *Tissue Eng*, 2004, 10 (1-2): 129-137.

15 顾延, 戴克戎, 薛文东, 等. 体内组织工程材料-小肠黏膜下层的力学性能. *医用生物力学*, 2001, 16(3): 160.

16 DeJardin LM, Arnoczky SP, Ewers BJ, et al. Tissue engineered meniscus

tor cuff tendon using porcine small intestine submucosa. Histologic and mechanical evaluation in dogs. *Am J Sports Med*, 2001, 29(2): 175-184.

17 Derwin K, Androjna C, Spencer E, et al. Porcine small intestine submucosa as a flexor tendon graft. *Clin Orthop*, 2004, 423: 245-252.

18 Badyaluk S, Arnoczky S, Plouhar P, et al. Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clin Orthop*, 1999, 367(Suppl): 333-343.

19 Ledet EH, Carl AI, DiRisio DJ, et al. A pilot study to evaluate the effectiveness of small intestinal submucosa used to repair spinal ligaments in the goat. *Spine J*, 2002, 2(3): 188-196.

20 Musahl V, Abramowitch SD, Gilbert TW, et al. The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament: a functional tissue engineering study in rabbits. *J Orthop Res*, 2004, 22(1): 214-220.

(收稿日期: 2005-03-16 本文编辑: 李为农)

• 短篇报道 •

治疗观察距骨骨折 64 例

解自新, 张士军, 尹浩, 李自智

(临沭县中医医院, 山东 临沭 276700)

自 1999-2002 年共收治距骨骨折 64 例, 采用闭合复位或切开复位、空心螺钉或松质骨螺钉固定, 疗效满意, 报告如下。

1 临床资料

本组 64 例, 男 46 例, 女 18 例; 年龄 19~74 岁, 平均 42 岁。受伤原因: 高处坠落伤 15 例, 车祸伤 39 例, 压砸伤 6 例, 其他伤 4 例。其中开放性损伤 15 例, 闭合性损伤 49 例; 新鲜损伤 61 例, 陈旧性损伤 3 例。骨折分型: I 型 26 例(距骨颈或体骨折无移位或轻度移位, 无脱位); II 型 21 例(距骨颈或体骨折合并下关节脱位); III 型 17 例(距骨颈或体骨折合并距骨体完全脱位)。

2 治疗方法

64 例均在 C 形臂 X 线机下采用闭合复位或切开复位、空心松质骨螺钉加压固定。I 型骨折无移位者, 直接做经皮空心松质骨螺钉固定; 有轻度移位的 II 型骨折手法复位或克氏针撬拨复位, 经皮做空心松质骨螺钉固定。闭合复位失败的 II 型和 III 型骨折采用切开复位空心松质骨螺钉内固定, 若距骨颈部骨折采用前内侧切口, 体部骨折采用后外侧切口, 粉碎性骨折配合松质骨螺钉或克氏针内固定, 对有缺损者取松质骨充填。术后可不用外固定, 早期进行功能锻炼。

3 结果

疗效标准: 优, 伤足踝关节及距骨周围关节活动正常, 无疼痛, 步态正常, X 线片正常; 良, 伤足活动度达 50%~90%, 剧烈活动时略有轻微疼痛, X 线示轻度退行性改变; 可, 关节活动度为正常的 25%~50%, 中度活动时可引起疼痛, X 线示

中度退行性改变; 差, 关节活动度不到正常的 25%, 轻度活动即疼痛不适, X 线可见显著退变。经 2~3 年随访, 结果见表 1。本组 8 例发生创伤性关节炎, 其中 1 例发生距骨坏死。

表 1 不同分型距骨骨折疗效结果(例)

骨折类型	例数	优	良	中	差	优良率(%)
I 型	26	25	1	0	0	100
II 型	21	15	4	1	1	90.5
III 型	17	8	6	2	1	82.5

4 讨论

距骨伤后使所构成的各关节面均达到解剖复位较难, 易并发创伤性关节炎, 因此如同其他大关节内骨折一样应尽可能使其达到稳定的解剖复位和固定。I 型骨折闭合复位可达到解剖复位, 如不能达到解剖复位时, 则切开复位, II 型或 III 型骨折大多采用切开复位。在治疗时应该注意以下几点: ①闭合性骨折应尽快复位和固定, 入院后 1~2 d 内即进行; ②手法不能复位的立即切开复位和固定, 不必等肿胀消退后进行, 应用 1~2 枚螺钉固定, 螺钉可从前面或后面钻入(根据骨折的部位而定), 距骨颈骨折多采用前内侧切口, 距骨体骨折多采用后外侧切口; ③如果内固定不够牢固或者骨质疏松则术后使用石膏, 在确定有早期愈合以后再开始负重活动; ④术后 48 h, 在白天可去除石膏或支具, 开始轻柔的主动活动, 但在夜间就保持在 90° 位以防止背屈活动的受限; ⑤对距骨缺血坏死不能修复的可行 Blair 手术, 融合胫-距-跟关节。

(收稿日期: 2005-05-18 本文编辑: 王宏)