

· 基础研究 ·

含自体富集骨髓干细胞松质骨移植与自体松质骨镶嵌移植修复关节软骨缺损的对比研究

石仕元, 应小樟, 胡德新, 郑琦, 魏威
(浙江省中西医结合医院骨科, 浙江 杭州 310003)

【摘要】 目的: 评价含富集骨髓干细胞松质骨镶嵌移植与自体松质骨镶嵌移植两种方法修复兔膝关节骨软骨缺损的修复效果, 为临床应用提供实验依据。**方法:** 选健康 3 月龄新西兰兔 16 只, 随机分成 A、B 两组, 每组 8 只 16 膝。A 组采用含富集自体骨髓干细胞的自体松质骨移植, B 组采用自体松质骨移植。术后第 12 周处死动物取材, 分别进行大体观察、光镜观察, 并对观察指标采用 Wakitani 组织学评分法进行评分和秩和检验。**结果:** 大体观察及光镜观察显示含富集骨髓干细胞松质骨镶嵌移植组大体观察关节面大多呈乳白色, 表面比较平整, 与周围软骨融合较好, 未发现裂隙; 光镜检查见关节软骨的厚度为正常软骨的 2/3 左右, 表面较光滑, 与周围组织接合较好, 大多为透明软骨细胞; 组织学评分为(4.44±1.41)分。自体松质骨镶嵌移植组大体观察见关节面呈灰白色, 表面稍有凹陷, 欠平整; 光镜检查见关节软骨的厚度较薄, 为正常软骨的 1/3~1/2, 移植体中央区域厚度更薄, 见成纤维细胞和极少量透明软骨细胞; 组织学评分为(8.93±1.18)分。两组组织学评分比较差异有统计学意义(P<0.01)。**结论:** 含富集骨髓干细胞松质骨镶嵌移植能以类透明软骨组织修复全层关节软骨缺损, 可用于较大面积软骨缺损的修复。自体松质骨移植修复软骨缺损的能力较差。

【关键词】 膝关节; 软骨, 关节; 骨移植; 创伤和损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.04.019

Experiment on articular cartilage defect repaired with autologous cancellous bone or cancellous bone enriching bone marrow stem cell SHI Shi-yuan, YING Xiao-zhang, HU De-xin, ZHENG Qi, WEI Wei. Department of Orthopaedics, Hospital of Integrative Medicine of Zhejiang, Hangzhou 310003, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To compare and evaluate the effect of autologous cancellous bone and cancellous bone enriching bone marrow stem cell for the repairing the defects of articular cartilage, and purpose the experimental basis for clinical application. **Methods:** By using the completely random design, 16 adult rabbits were divided into two groups randomly. Autologous cancellous bone and cancellous bone enriching bone marrow stem cells were applied for repairing size-matched, full-thickness articular cartilage defects on the femoral condyle of the knees. The reconstructed tissues were observed by gross, optical and microscopy view and Wakitani score at 12 weeks respectively. **Results:** In cancellous bone enriching bone marrow stem cells group, articular surface was ivory white and relative evenness, the regenerated tissues integrated well with the surrounding normal cartilage with obscure boundary between them. The thickness of regenerated tissues was two-third of normal cartilage, the Wakitani score was 4.44±1.41. In autologous cancellous bone group, articular surface was gray and introcession, the regenerated tissues was very thin, the thickness of regenerated tissues was one thirds or one half of normal cartilage, the Wakitani score was 8.93±1.18. The differences between two groups were significant(P<0.01). **Conclusion:** Cancellous bone enriching bone marrow stem cells are feasible for repairing of large articular cartilage defects with hyaline cartilage. The repairing ability of autologous cancellous bone is inferior.

KEYWORDS Knee joint; Cartilage, articular; Bone transplantation; Wounds and injuries

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(4): 332-335 www.zggszz.com

关节软骨损伤的修复, 一直是困扰骨科基础研究与临床治疗的棘手问题。研究关节软骨损伤及其修复具有十分重要的意义, 本研究以兔为研究对象, 分别采用含自体富集骨髓基质干细胞的松质骨、单纯自体松质骨软骨镶嵌移植两种不同的移植方法修复膝关节股骨髁软骨缺损, 并进行对比研究, 为临

床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 采用健康成年纯种新西兰大白兔 16 只, 雌雄不限, 体质量 3.0~4.5 kg, 由浙江中医药大学提供, 饲养环境温度 18~22 ℃。实验动物随机分为 A、B 两组, 每组 8 只 16 膝, A 组采用含富集自体骨髓干细胞的自体松质骨移植, B 组采用自体松质骨移植。

1.2 富集骨髓基质干细胞的提取 用 2.5%戊巴比妥钠 40 mg/kg 耳静脉麻醉,于髂前或髂后上棘备皮、消毒铺巾,用 15 号 20 ml 的注射器穿入髂骨的松质骨内,在不同的深度采集约 15 ml 骨髓血;用同样方法在另一侧抽取 15 ml 的骨髓血,共 30~40 ml,放入含肝素(25 000 U)的储血袋中。通过全封闭血细胞分选系统(COBE 2991 Cell Processor, 美国 GAMBRO BCT, Inc),利用密度梯度离心原理对采集的骨髓血进行快速细胞分选。速度 3 000 r/min,离心 5~7 min。骨髓成分随密度梯度分层,由内至外分别为血浆层、骨髓有核细胞(nucleated cells, NCS)层、骨髓成熟红细胞层。骨髓基质干细胞在离心中逐步富集在骨髓有核细胞层。通过分流管路,将不同骨髓成分在离心中逐一输出,分装回收备用。

1.3 移植物的准备 自制一套圆形骨软骨镶嵌移植工具,取骨套管直径 4.0 mm。每兔采用取骨套管切取髂骨松质骨圆柱 2 条,直径 4.0 mm,高 5.0 mm,用生理盐水将血液冲洗干净,并用纱布吸干备用。

1.4 移植手术 全部实验手术于 2 d 内完成。A 组(含富集骨髓干细胞松质骨移植组)将预先制作的富集自体骨髓干细胞用注射器缓慢注入松质骨内备用,切开双膝关节,用取骨套管切取滑车内侧相同大小的骨软骨条,造成骨软骨缺损模型,用生理盐水冲洗缺损区,吸干,用注射器注入富集自体骨髓干细胞,再将含富集自体骨髓干细胞的自体松质骨条镶嵌在缺损区,保持表面平整。B 组(自体松质骨移植组)从双膝滑车内侧关节面上切取出同样大小的骨软骨条,造成骨软骨缺损模型后,将预制的松质骨条植入缺损区中,保持表面平整。移植后均缝合关节囊,缝合创口,消毒棉球覆盖包扎,每天注射青霉素 80 万 U,连续用 1 周,动物分笼饲养,自由活动。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大体观察 各组动物于术后 12 周时用空气栓塞处死,取出 16 只膝关节标本,观察关节腔有无积液,缺损区形状、色泽、质地等,修复组织与周围界限的整合。

1.5.2 组织学光镜观察 连同软骨下骨和周围正常骨软骨组织取材,并用 4%多聚甲醛固定 24 h 后脱钙,石蜡包埋并切片,常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察。

1.5.3 按照 Wakitani 法评分标准 对组织学结果进行评分 修复组织按 Wakitani 等^[1]评分进行量化

处理。共 5 项观察指标:细胞形态学,基质染色(异染性),表面规则性,软骨厚度,与周围软骨整合度。其中,细胞形态学评分为:透明软骨 0 分,透明软骨为主 1 分,纤维软骨为主 2 分,少量软骨 3 分,无软骨 4 分;基质染色(异染性)评分为:正常 0 分,轻度减少 1 分,明显减少 2 分,无异染性颜色 3 分;表面规则性评分:光滑 0 分,中等 1 分,不规则 2 分,极度不规则 3 分;软骨厚度评分为:>2/3 为 0 分,1/3~2/3 为 1 分,<1/3 为 2 分;周围软骨整合度评分为:边缘完全整合 0 分,一侧边缘整合 1 分,未整合 2 分。

1.6 统计学分析 统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,处理采用 SPSS 13.0 统计学软件,各组评分数据使用两独立样本比较的 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 大体标本观察 A 组:关节腔无粘连、无积液,关节液淡黄色半透明,关节内无退变增生。关节面大多呈乳白色,和周围软骨色泽肉眼难以区别,偶见灰白色,表面比较平整,与周围软骨融合较好,未发现裂隙(图 1a)。B 组:关节腔无粘连、无积液,关节液淡黄色半透明,关节内无退变增生。关节软骨面较薄,呈灰白色,表面稍有凹陷,欠光整,偶见纤维絮状物覆盖(图 1b)。

2.2 组织学光镜观察 A 组:骨组织与受区骨性愈合,关节软骨的厚度为正常软骨的 2/3 左右,表面较光滑,与周围组织接合较好,基质染色接近正常,软骨细胞数量较多,大多为透明软骨细胞,可见潮线(图 2a)。B 组:骨组织与受区骨性愈合,关节软骨的厚度较薄,为正常软骨的 1/3~1/2,移植中央区域厚度更薄,见成纤维细胞和极少量透明软骨细胞,细胞排列较紊乱,基质染色性差,未见潮线(图 2b)。

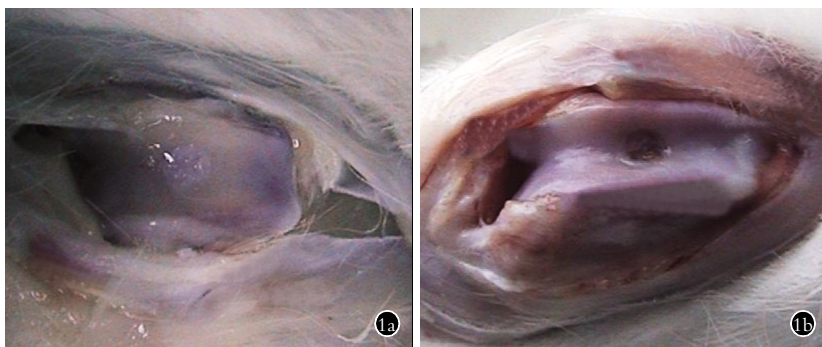


图 1 术后 12 周大体观 1a.含富集骨髓干细胞松质骨移植组,关节面呈乳白色,表面比较平整,与周围软骨融合较好,未发现裂隙 1b.自体松质骨移植组,关节软骨面较薄,呈灰白色,表面稍有凹陷,见纤维絮状物覆盖

Fig.1 Macroscopic appearance at 12 weeks after operation 1a. Cancellous bone enriching bone marrow stem cells, articular surface is ivory white and relative evenness, the regenerated tissues integrated well with the surrounding normal cartilage with obscure boundary between them 1b. Autologous cancellous bone, articular surface is gray and introcession, the regenerated tissues is very thin and the surface is covered by fiber-floccus

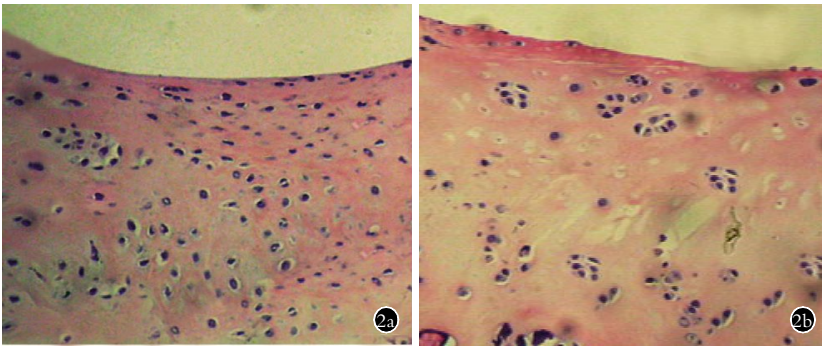


图 2 术后 12 周光镜观察(甲苯胺蓝染色×100) **2a.**含富集骨髓干细胞松质骨移植组,关节软骨的厚度为正常软骨的 2/3 左右,软骨细胞数量较多,大多为透明软骨细胞,可见潮线 **2b.**自体松质骨移植组,关节软骨的厚度较薄,为正常软骨的 1/3~1/2,见成纤维细胞和极少量透明软骨细胞,细胞排列较紊乱,未见潮线

Fig. 2 Photomicrographs showing at 12 weeks after operation (toluidine blue; original magnification ×100) **2a.**Cancellous bone enriching bone marrow stem cells. The thickness of regenerated tissues is two-thirds of normal cartilage. The cartilage cell population is large and most of them are hyaline cartilage cell. The tidal line is clear **2b.**Autologous cancellous bone, the regenerated tissues is very thin, the thickness of regenerated tissues is one thirds or one half of normal cartilage, many fibroblast and few of hyaline cartilage cell are found. The arrange of cells is disordered. There is no tidal line

2.3 组织学评分结果 结果见表 1。术后 12 周,两组评分比较差异有统计学意义,含自体富集骨髓干细胞松质骨镶嵌移植组比自体松质骨镶嵌移植组修复兔膝关节软骨缺损的修复效果更好。

3 讨论

关节软骨主要是由少量的软骨细胞和细胞外基质组成的无血管组织。软骨损伤后,自我修复能力很弱。当关节软骨缺损面积>2 cm²,深度>4 mm 时,通常不能自行修复,持续发展会导致骨关节炎^[2]。很多学者一直在探索较大面积关节软骨缺损的修复方法。包括微骨折技术:通过穿透软骨下骨板,使包含骨髓多能间充质干细胞的血凝块聚集在软骨缺损区的表面,形成含有 II 型胶原的纤维软骨覆盖缺损区,该技术操作简单、成本低下,常被用作首选治疗方案,但是该方法适用于软骨缺损面积小于 1 cm² 的患者^[3-5]。骨软骨的嵌镶移植术:自体骨软骨移植的方法是通过关节边缘非负重区作为供区,选择软骨厚度适宜的部位,获取一定数量、大小及长度的骨软骨条作为移植物,待处理好受区后予以植入,无须固定,该方法完好地保持了关节软骨和骨床的紧密连接,具有取材方便、植入稳定、愈合成活率高及关节

软骨修复能力强等优点,而且可以在关节镜下完成手术,并有良好的临床报道,但还是存在骨软骨供区不足的情况^[6-8]。同种异体骨软骨嵌镶移植:适用于软骨面积为 3 cm² 以上的关节软骨缺损,由于软骨细胞被相对抗原性较低的基质包埋,移植软骨组织的免疫原性相对较低,但无法完全排除免疫排斥反应,移植物易于感染、退变,且异体软骨最好在从供体取出后 24 h 内应用,供体有限,可操作时间短。

随着软骨组织工程的迅速发展,国内外学者均做了大量的软骨细胞移植载体的研究,许多天然或人工合成的物质都可作为软骨细胞移植载体的原料,如胶原、纤维蛋白胶、藻酸盐等^[9-10]。但是,目前的组织工程修复技术所使用的

软骨细胞培养载体,无论是天然的,还是人工合成的,都存在一定的缺陷:如体内吸收过快过慢,生物相容性问题,人工合成的聚合物植入引起的炎症反应,以及免疫原性和致癌性问题。至今为止,尚未找到一种理想的软骨组织工程支架。

种子细胞目前常用的有软骨细胞、骨髓基质干细胞(BMSCs)和胚胎干细胞(ESs)。生物调控因子繁多,其中以骨形态发生蛋白(BMP)的研究最多,现在采用基因重组技术已成功分离和克隆出近 40 种 BMP,在体外诱导软骨表型分化方面发挥了显著的作用。国内学者以藻酸盐、聚乳酸、骨基质明胶为载体,采用骨髓间充质干细胞或软骨细胞修复兔软骨损伤方面已取得了一定的成果^[8-9]。但上述种子细胞移植需经过长时间的体外培养且操作过程复杂。骨髓基质干细胞具有多项分化潜能,包括具有成软骨的能力,其取材方便、创伤小、分离容易。

自体松质骨生物相容性好,取材方便,其天然的密集微孔结构具有三维立体结构,富有韧性、弹性,可塑性强,具有良好的机械强度,且含大量生物活性物质,对骨髓干细胞有支持和诱导双重作用。本实验

表 1 Wakitani 法软骨缺损修复组织学评分结果($\bar{x} \pm s, n=16$, 分)

Tab1 Results of the Wakitani score for the repair of cartilage defects($\bar{x} \pm s, n=16$, score)

组别	细胞形态	基质染色	表面平整	软骨厚度	周围接合	总分
含富集骨髓干细胞松质骨移植组	1.13±0.34	1.38±0.50	0.50±0.52	0.75±0.45	0.69±0.48	4.44±1.41
自体松质骨移植组	2.13±0.34	2.25±0.45	1.88±0.34	1.69±0.48	1.00±0.52	8.93±1.18
U	4.83	3.90	4.85	4.11	1.68	4.89
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.09	<0.01

以自体松质骨为软骨组织工程支架富集自体骨髓干细胞修复兔较大面积骨软骨缺损,采用多种指标观察含自体富集骨髓干细胞松质骨镶嵌移植修复骨软骨的效果。证实了含自体富集骨髓干细胞的松质骨镶嵌移植在修复较大面积的关节软骨缺损可行。

将自体松质骨组织作为移植载体的镶嵌移植,具有生物相容性好、生物力学特性匹配、无须内固定等优点;以富集的自体骨髓干细胞为种子细胞修复软骨缺损,避免了单纯骨髓血中骨髓干细胞量少的缺点;同时也避免了细胞体外培养增殖对时间、环境、设备、费用上的较高要求及风险。含自体富集骨髓干细胞松质骨镶嵌移植可以作为自体骨软骨供区不足时的一种选择。

参考文献

- [1] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am, 1994, 76(4): 579-592.
- [2] 齐义营, 施培华, 欧阳宏伟. 自体软骨细胞移植治疗关节软骨缺损的进展[J]. 中华骨科杂志, 2008, 28(1): 71-73.
Qi YY, Shi PH, OuYang HW. Autologous chondrocyte transplantation for treatment of cartilage defects[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi, 2008, 28(1): 71-73. Chinese.
- [3] Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, (407): 215-227.
- [4] Sledge SL. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries[J]. Clin Sports Med, 2001, 20(2): 365-377.
- [5] Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesion of the knee with microfracture in a group of athletes[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2005, 13(3): 213-221.
- [6] 董启榕, 郑祖. 自体嵌镶式骨软骨移植修复膝关节软骨缺损[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19: 461-462.
Dong QR, Zheng Z. Repairing cartilage defects of knee joint by using osteochondral autograft[J]. Zhonghua Chuang Shang Za Zhi, 2003, 19: 461-462. Chinese.
- [7] 张维春, 高石军, 陈百成, 等. 关节镜下自体骨软骨移植修复股骨关节面软骨缺损[J]. 中华骨科杂志, 2004, 24: 158-161.
Zhang WC, Gao SJ, Chen BC, et al. The technique of autologous osteochondral mosaicplasty for repair of the cartilaginous defects under arthroscopy[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi, 2004, 24: 158-161. Chinese.
- [8] 石仕元. 关节镜下自体骨软骨移植修复股骨髁软骨缺损[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(11): 863-864.
Shi SY. Arthroscopic autologous cartilage transplantation in the treatment of femur condyles osteochondral injuries[J]. Zhonghua Chuang Shang Za Zhi, 2007, 23(11): 863-864. Chinese.
- [9] 陆宁, 卢世璧, 王维芳, 等. 采用自体成熟关节软骨细胞的软骨组织工程修复[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(3): 293-297.
Lu N, Lu SB, Wang WF, et al. Tissue engineered cartilage repair using autogenous mature hyaline chondrocytes[J]. Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 2005, 22(3): 293-297. Chinese.
- [10] 尹战海, 韩健, 刘森, 等. 骨髓间充质干细胞复合骨基质明胶构建组织工程化软骨[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(3): 170-175.
Yi ZH, Hang J, Liu M, et al. Tissue engineered cartilage constructed by growth factor-induced bone marrow mesenchymal stem cells and allogenic bone matrix gelatin[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi, 2005, 25(3): 170-175. Chinese.

(收稿日期: 2010-08-09 本文编辑: 连智华)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国骨伤》杂志正式启用稿件远程处理系统通知

《中国骨伤》杂志已于 2010 年 1 月正式启用稿件远程处理系统。通过网站 <http://www.zggszz.com> 可实现不限时在线投稿、审稿、编辑、退修、查询等工作。本刊将不再接受纸质版和电子信箱的投稿。欢迎广大的作者、读者和编者登录本刊网站, 进入本系统进行网上投稿、审稿和稿件查询等工作。咨询电话: 010-84020925。

《中国骨伤》杂志社