

· 基础研究 ·

不同比例骨软骨镶嵌成形术联合基因增强组织工程方法治疗骨软骨缺损

孙骏¹, 侯筱魁², 匡勇¹, 卫晓恩¹, 史萌¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院骨伤科, 上海 200021; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科)

【摘要】 目的:研究骨软骨镶嵌成形术与联合基因增强组织工程方法治疗急性骨软骨缺损,并观察在不同比例下的组织修复情况,以期发现两者间的最佳组合。**方法:**对携带 hTGF-β1 的重组腺病毒转染 BMSCs(hTGF-β1 转染组),与采用 Adv-βgal 转染 BMSCs(Adv-βgal 转染组)及未转染 BMSCs(未转染空白对照组)进行 Western Blot 检测 hTGF-β1、II 型胶原及 Aggrecan 表达。雄性 6 月龄崇明山羊 18 只,体重 22~25 kg,取自体骨髓进行 BMSCs 分离及培养,传至第 3 代。每只动物双膝股骨内髁进行实验,分为 AR、AL、BR、BL、CR、CL 6 组。AR 为骨软骨移植覆盖面积为 44.44% 单纯组,AL 为 44.44% 联合组,BR 为 33.33% 单纯组,BL 为 33.33% 联合组,CR 为 22.22% 单纯组,CL 为 22.22% 联合组。于双膝股骨内髁负重区采用骨钻制备直径为 9 mm,深为 3 mm 的骨软骨缺损后,单纯组采用骨软骨镶嵌成形术的自体骨软骨柱修复,联合组同时将转染 hTGF-β1 的 BMSCs 藻酸钠混合液注入空隙,加入氯化钙产生凝胶。术后 24 周取材,行大体及组织学观察,并参照 O'Driscoll, Keeley and Salter 组织形态学评分标准进行评分,行免疫组织化学及透射电镜观察。**结果:**hTGF-β1 转染组细胞 hTGF-β1、II 型胶原及 Aggrecan 表达均强于 Adv-βgal 转染组及未转染空白对照组。大体观察,组织学染色以及透射电镜检查显示各组的缺损有不同程度的修复。33.33% 联合组、44.44% 单纯组、44.44% 联合组的整体修复效果差别无统计学意义,33.33% 单纯组、22.22% 单纯组、22.22% 联合组的整体修复效果差于前 3 组。**结论:**骨软骨镶嵌成形术联合基因增强组织工程的方法可以有效修复骨软骨缺损。随着自体骨软骨移植覆盖缺损面积的减少,骨软骨镶嵌成形术联合基因增强组织工程方法的修复优越性可以得到更好的体现。

【关键词】 软骨; 修复外科手术; 组织工程; 创伤和损伤

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2011.09.018

Research on the repair of acute large osteochondral defects with Mosaicplasty associated with genes-enhanced tissue engineering in different proportion SUN Jun*, HOU Xiao-kui, KUANG Yong, WEI Xiao-en, SHI Meng. *Department of Orthopaedics, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

ABSTRACT Objective:To investigate the optimum proportion of Mosaicplasty and genes-enhanced tissue engineering for the repair of acute osteochondral defects. **Methods:** Western blot test was conducted to detect the expression of hTGF-beta1, Col II and Aggrecan in 3 groups, including hTGF-beta1, transduction group, Adv-beta1gal transduction group and control group without transduction. Eighteen 6-month-old Shanghai male goats (weight: 22 to 25 kg) were used. BMSCs were isolated from the autologous bone marrow, and were subcultured to get the cells at passage 3. Thirty-six medial femoral condyles were used and divided into 6 groups named AR, AL, BR, BL, CR, and CL. Acute cylindrical defects (9 mm in diameter and 3 mm in depth) were created in the weight bearing area of the medial femoral condyle of hind limbs. In the single group, the autologous osteochondral mosaicplasty was performed to repair the defect; in the combination group, besides the mosaicplasty, the dead space between the cylindrical grafts and the host cartilage were injected with the suspension of hTGF-beta1, gene enhanced autogenous BMSCs in sodium alginate, and CaCl₂ was dropped into it to form calcium alginate gels. The autologous osteochondral transplantation cover rates of group AR was 44.44% single group, AL was 44.44% combination group, BR was 33.33% single group, BL was 33.33% combination group, CR was 22.22% single group, and CL was 22.22% combination group. The goats were killed 24 weeks after operation to receive gross and histology observation, which was evaluated by the histological grading scale of O'Driscoll, Keeley and Salter. Immunohistochemistry and TEM observation were also performed. **Results:** Western blot test showed the expression of the hTGF-beta1, Col II and the Aggrecan in the hTGF-beta1 transduction group were significantly higher than that of the Adv-beta1gal transduction and the blank control groups. The gross and histology observation revealed that each defects of six groups had different degrees of repairing. There was no significantly difference among the BL, AR, and AL groups. But the scores of the other three groups (BR, CR, and CL) were significantly poorer than the former three groups. **Conclusion:** Mosaicplasty associated with genes enhanced tissue engineering could repair the osteochondral

defects effectively. With the autologous osteochondral transplantation coverage reducing, the advantage of the combination could have a better representation.

KEYWORDS Cartilage; Constructive surgical procedures; Tissue engineering; Wounds and injuries

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(9): 768-774 www.zggszz.com

在临床上骨软骨镶嵌成形术(mosaicplasty)是治疗骨软骨缺损的有效方法,但是由于为自体移植,供区有限,因此对于大面积骨软骨缺损单纯行骨软骨镶嵌成形术就不适合了。为此,我们试图通过动物实验,对山羊股骨内髌的骨软骨缺损进行骨软骨镶嵌成形术联合组织工程方法治疗,并减少自体骨软骨移植的覆盖面积,增大由组织工程材料填充的面积,研究两者之间的比例,以期达到最佳组合。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 主要仪器 荧光光学显微镜:OLYMPUS, PM-10ADS, BH-2, 日本。显微摄影数码相机:KODAK DCS 420C, 美国。超净工作台: BIO-HAZARD, VCM-420, 中国。CO₂ 培养箱: THERMO FORMA 3110, 美国。倒置相差显微镜: LEICA, 德国。液氮罐: BCBS CRYOSYSTEMS 47/11, 美国。-20 °C 冰箱: SANYO, 日本。-80 °C 深低温冰箱: REVCO, 美国。离心机: UNIVERSAL 32R HETTICH, 德国。电子分析天平: METTLER TOLEDO, AB204-E, 瑞士。电磁搅拌器: STUART SM24, 英国。高压蒸汽消毒锅: SANYO LABO MLS-3020, 日本。红外线干燥箱: 766-2, 上海。纯水器: PURELAB CLASSIC, PALL, 美国。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养液: GIBCO, 美国。胎牛血清(FBS): GIBCO, 美国。胰蛋白酶: 华美生工, 中国。II 型胶原酶: SIGMA, 美国。EDTA-Na₂(分析纯): 中国。青链霉素(1×10⁵ U/L, 100 mg/L)HYCLONE, 美国。藻酸钠: SIGMA, 美国。

1.2 动物模型制备与分组方法

1.2.1 腺病毒载体在 293 细胞内扩增 携带 hTGF-β1 的重组腺病毒由上海第九人民医院骨科研究室提供。将 (5~10)×10⁵ 的 293 细胞接种于直径为 100 mm 培养皿中,用含 10%胎牛血清和青霉素及链霉素的 DMEM 培养基培养,待细胞 100%汇合后,加入 1:20 稀释的病毒液 10 ml, 37 °C 培养箱培养 5 d, 所有细胞出现细胞病变反应并浮起。摇晃后收集细胞及培养上清于 50 ml 离心管中,于 -80 °C 及 37 °C 下反复冻溶 3 次, -20 °C 贮存备用。

1.2.2 骨髓基质干细胞(BMSCs)的获取、培养及腺病毒转染 雄性 6 月龄崇明山羊 18 只,体重为 22~25 kg,进行髌骨骨髓穿刺,抽取约 8 ml 自体骨髓,置于 DMEM 完全培养液的离心管并接种于培养皿,于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养。大约 2 周,培

养的细胞近 80%汇合时,用 0.25%胰蛋白酶加 0.02%EDTA 消化,按 1×10⁵/ml 的密度接种到新的培养瓶中,继续培养,细胞生长汇合后再次培养至第 3 代。BMSCs 90%汇合后行病毒转染 hTGF-β1 过夜(MOI=200),换液后继续培养。在手术的当天收集 BMSCs,将 BMSCs 悬于 1.2%藻酸钠中,调至细胞密度为 5×10⁷/ml,吸入 5 ml 注射器中备用。

1.2.3 免疫沉淀法加 Western Blot 检测 hTGF-β1、Aggrecan 及 Collagen II 表达

(1) 免疫沉淀检测细胞 hTGF-β1 的分泌和表达。转染分 3 组:①hTGF-β1 转染组;②Adv-βgal 转染组(Adv-βgal 为携 Lac-Z 报告基因的重组腺病毒,由上海第九人民医院骨科研究室提供,扩增、转染的方法同 hTGF-β1 组);③未转染空白对照组。收集转染后 5 d 各组细胞培养上清液 5 ml,加入兔抗人 hTGF-β1 一抗(1:500,武汉博士德),室温下旋转混匀 4 h,加入 Protein A-Sepharose 4B (100 μl, Santa Cruz), 4 °C 旋转混匀过夜。次日离心去上清,加入上样缓冲液,煮沸离心,所得产物通过 SDS-PAGE 行 Western Blot 检测。

(2) Western Blot 检测胞外基质的表达。转染后 5 d 各组细胞以 500 μl 裂解液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris.Cl, 1% Tween 20, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L 抑蛋白酶肽, 0.1% SDS)充分裂解。15 μl 裂解产物与 15 μl 上样液混匀,上样至 SDS-PAGE, 15 mA 电泳约 3 h。电泳完毕,取下凝胶,蛋白条带电转膜至硝酸纤维素膜,90 V 约 2 h。硝酸纤维素膜置于封闭液中,4 °C 过夜。次日先后加入鼠抗人 II 型胶原一抗(1:500, NeoMarker),羊抗人 Aggrecan 一抗(1:500, Santa Cruz),生物素化二抗(1:100, Vector),碱性磷酸酯酶联生物素亲和素(1:4 000, Tropix),通过抗原-抗体反应互相结合,最后加入化学发光底物,在酶催化作用下,显色于 X 线片。

1.2.4 骨软骨缺损模型的建立及分组修复 取前已经进行自体骨髓抽取, BMSCs 培养的崇明山羊 18 只,每只动物双膝股骨内髌进行实验,分为 AR、AL、BR、BL、CR、CL 6 组。首先进行双膝股骨内髌造模,制造直径为 9 mm,深为 3 mm 的骨软骨缺损,修复方法如下(图 1)。

(1) AR、AL 组。右膝(AR)股骨内髌的修复。使用内径 3 mm 空心凿子在股骨的髌股关节面的周围非负重区垂直于关节面获取长度为 5.5 mm 的 4 块骨

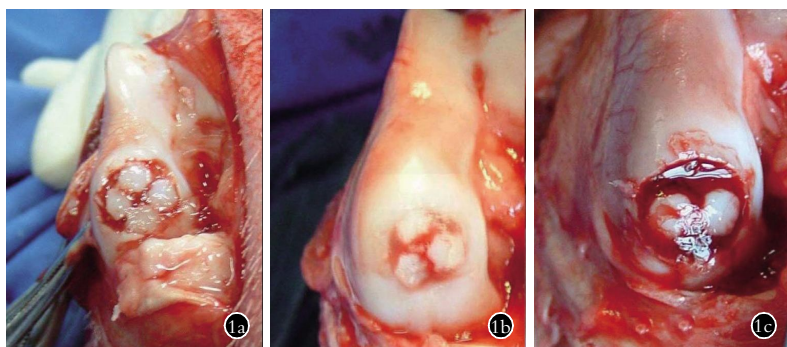


图 1 直径 9 mm, 深度 3 mm 的山羊股骨髁骨软骨缺损, 分别进行 4 块(图 1a), 3 块(图 1b), 2 块(图 1c)直径 3 mm 骨软骨柱的移植, 空隙组织工程材料填充修复
Fig. 1 Repairing the defect 9 mm in diameter and 3 mm in depth in the weight bearing area of the medial femoral condyle by transplanting four (Fig.1a) or three (Fig.1b) or two (Fig.1c) cylindrical osteochondral grafts 3 mm in diameter and filling the dead space with tissue engineering cartilage

软骨柱。直径 3 mm 骨钻在缺损区内钻 4 个深度为 5 mm 的受区骨孔, 使用推进器将 4 块骨软骨移植柱徐徐推入受区骨孔, 轻度加压使骨质压缩 0.5 mm, 使 4 块骨软骨柱与周围的软骨在同一个关节平面, 活动膝关节, 确保移植物的稳定。冲洗关节腔后逐层关闭切口。

左膝(AL)股骨内髁的修复。首先按照右膝股骨内髁的修复方法完成自体骨软骨柱移植(4 块直径为 3 mm 骨软骨柱的移植填充缺损区)。在植入完成后, 将复合 hTGF-β1 转染 BMSCs 的藻酸钠混合液注入骨软骨柱与正常软骨间的空隙, 以及骨软骨柱间的空隙内, 缓慢滴入过量的 102 mM 氯化钙, 使氯化钙与藻酸钠发生交联形成藻酸钙凝胶, 确保凝胶完全填充空隙, 逐层关闭切口。术后圈养, 不限活动。AR 和 AL 组的骨软骨移植的覆盖面积为 44.44%(骨软骨移植的覆盖修复面积比例 $\% = n \times \pi R_1^2 / \pi R_2^2$), 即 AR 为 44.44%单纯组, AL 为 44.44%联合组。

(2)BR、BL 组。3 块直径 3 mm 骨软骨柱的移植填充缺损区, 右膝(BR)为单纯骨软骨柱的移植, 左膝(BL)在骨软骨柱移植的空隙给予含复合 hTGF-β1 转染 BMSCs 的藻酸钙凝胶填充。除移植的骨软骨柱数量不同外, 具体的操作过程同 AR、AL 组。BR 和 BL 组的骨软骨移植的覆盖面积为 33.33%, 即 BR 为 33.33%单纯组, BL 为 33.33%联合组。

(3)CR、CL 组。2 块直径 3 mm 骨软骨柱的移植

填充缺损区, 右膝(CR)为单纯骨软骨柱的移植, 左膝(CL)在骨软骨柱移植的空隙给予含复合 hTGF-β1 转染 BMSCs 的藻酸钙凝胶填充。除移植的骨软骨柱数量不同外, 具体的操作过程同 AR、AL 组。CR 和 CL 组的骨软骨移植的覆盖面积为 22.22%, 即 CR 为 22.22%单纯组, CL 为 22.22%联合组。

1.3 观测指标与方法 进行大体观察, 组织学检查及评分, 免疫组化, 电镜检查。术后 24 周处死动物进行大体观察和组织学甲苯胺蓝染色、II 型胶原免疫组化, 并进行 O'Driscoll, Keeley and Salter^[1]组织形态学评分, 以及透射电镜检查。

1.4 统计处理方法 评分后的数据以均数±标准差表示, 进行多个样本均数间的两两比较, 采用单因素方差分析及 SNK(Student-Newman-Kewls)检验。使用 SAS(6.12)统计软件进行数据的处理。

2 结果

2.1 Western Blot 试验 转染后 5 d, Western Blot 检测显示 hTGF-β1 转染组细胞 hTGF-β1、II 型胶原及 Aggrecan 的表达要明显强于 βgal 转染组及未转染空白组, 亦提示 hTGF-β1 外源基因导入促进了宿主细胞合成和分泌细胞外基质 II 型胶原及 Aggrecan (图 2)。

2.2 大体观察 见图 3。双膝关节无畸形及红肿, 活动范围正常; 关节液清亮, 关节内无粘连。股骨的髌股关节面的骨软骨供区凹陷状, 边界十分明晰, 底

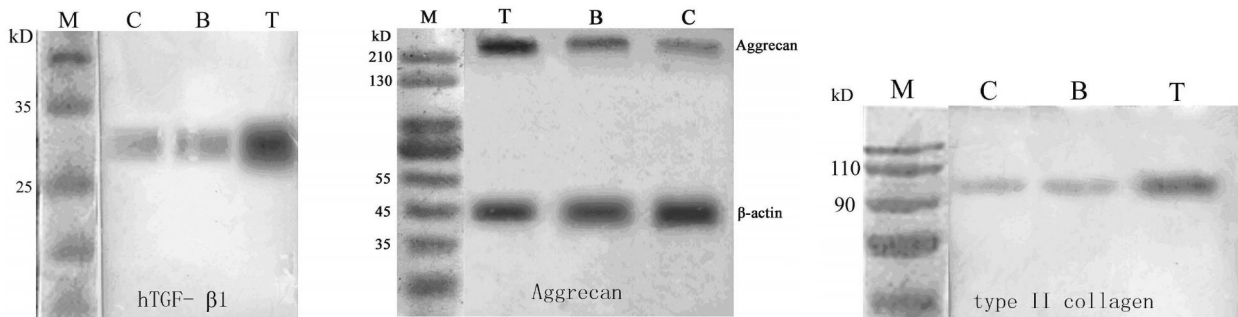


图 2 Western Blot 检测显示转染 hTGF-β1 组细胞 hTGF-β1、II 型胶原及 Aggrecan 的表达要明显强于 Adv-βgal 转染组及未转染空白组。T: hTGF-β1 转染组; B: Adv-βgal 转染组; C: 未转染空白组; M: 标记

Fig.2 Western Blot test showed that the expression of the hTGF-β1, type II collagen and the Aggrecan of the hTGF-β1 gene enhanced cells were significantly obvious than the βgal gene enhanced cells and non-gene enhanced cells. T: hTGF-β1 transduction group; B: Adv-βgal transduction group; C: Blank control group; M: Mark

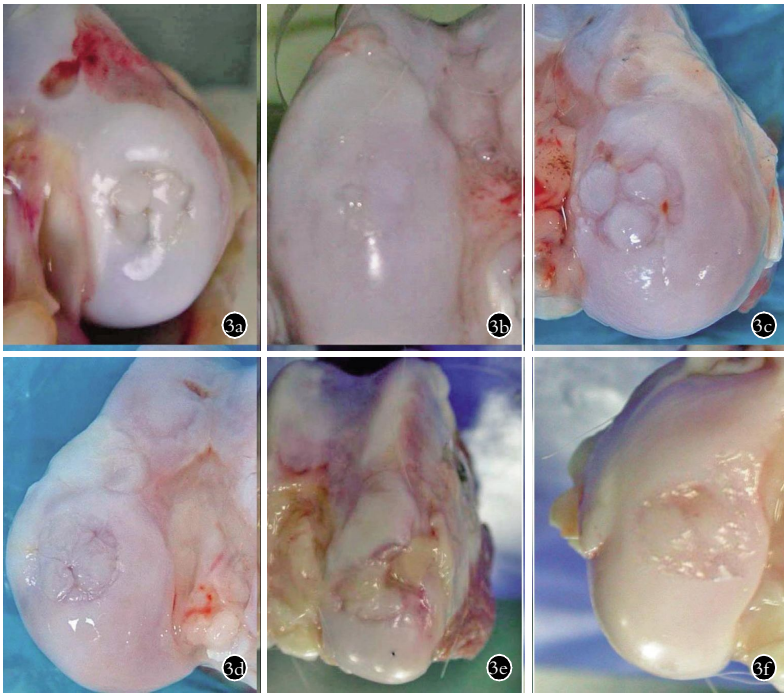


图 3 术后 24 周大体观察 **3a.** AR 组 (44.44%单纯组), 自体骨软骨柱形态清晰且完整, 边界清楚, 与周围组织间有裂隙存在 **3b.** AL 组 (44.44%联合组), 自体骨软骨柱形态完整, 边缘有所不清, 软骨柱间的空隙被白色的类软骨组织替代 **3c.** BR 组 (33.33%单纯组), 移植软骨与周围软骨均有较明显的退变表现, 软骨间的空隙处凹陷明显, 部分组织增生 **3d.** BL 组 (33.33%联合组), 移植的自体骨软骨柱形态完整, 软骨柱间的空隙被白色的类软骨组织替代, 新生组织与周围组织间可见裂纹存在 **3e.** CR 组 (22.22%单纯组), 自体骨软骨柱退变明显, 软骨间的空隙处凹陷明显, 表面粗糙, 不能填充缺损 **3f.** CL 组 (22.22%联合组), 自体骨软骨柱形态完整, 软骨柱间的空隙有组织增生替代, 替代不完整

Fig. 3 Macroscopic findings at 24 weeks after the surgery **3a.** The autologous cylindrical osteochondral grafts of Group AR (44.44% single group) were clear and intact. The border was distinct. Gaps around the implanted plugs were detected **3b.** The configuration of the autologous cylindrical osteochondral grafts of Group AL (44.44% associated group) was with clarity and integrity. The border was indistinct. Gaps were replaced by the white analogous cartilage tissue **3c.** The graft cartilage and surrounding cartilage of Group BR (33.33% single group) had obvious regression. The hollow among the cartilage was obvious. Part tissue proliferated **3d.** The configuration of the autologous cylindrical osteochondral grafts of Group BL (33.33% associated group) was with clarity and integrity. The border was indistinct. Gaps were replaced by the white analogous cartilage tissue. The crackle existed among the neonatal tissue and the surrounding tissue **3e.** The graft cartilage and surrounding cartilage of Group CR (22.22% single group) had obvious regression. The hollow among the cartilage was obvious. The surface was coarse. The defect was not filled **3f.** The configuration of the autologous cylindrical osteochondral grafts of Group CL (22.22% associated group) was with integrity. Gaps were replaced by the proliferative tissue. The replacement was not integrate

部有暗黄色的组织增生, 表面粗糙, 不能填充缺损。
①AR 组 (44.44%单纯组): 自体骨软骨柱形态清晰且完整, 边界清楚。移植软骨与周围软骨均略有退变, 色泽较暗, 略有不平整以及磨损。软骨间的空隙处基本平整, 增生的组织质地软、色灰暗, 与周围组织间有裂隙存在。
②AL 组 (44.44%联合组): 自体骨软骨柱形态完整, 但边缘有所不清, 软骨乳白色, 未见移植软骨与周围软骨有退变的表现。软骨柱间的

空隙被白色的类软骨组织替代。新生组织与周围组织间整合良好, 也见细小的裂纹存在。
③BR 组 (33.33%单纯组): 移植软骨与周围软骨均有较明显的退变表现, 色泽暗, 表面不平整。软骨间的空隙处凹陷明显, 部分组织增生, 与周围组织间有裂隙存在。
④BL 组 (33.33%联合组): 移植的自体骨软骨柱形态完整, 色泽与周围的正常软骨相似, 部分移植软骨与周围软骨有退变表现。软骨柱间的空隙被白色的类软骨组织替代, 基本完整, 新生组织与周围组织间可见裂纹存在, 也见有部分整合区域。
⑤CR 组 (22.22%单纯组): 自体骨软骨柱存在, 但退变明显, 出现有裂隙, 表面磨损, 失去原有的色泽。周围邻近的软骨也有明显的退变表现, 相对应的胫骨关节面也出现退变表现。软骨间空隙处的凹陷明显, 表面粗糙, 不能填充缺损。
⑥CL 组 (22.22%联合组): 自体骨软骨柱形态完整, 移植软骨与周围软骨均有退变表现。软骨柱间的空隙有组织增生替代, 替代不完整, 色泽灰暗, 新生组织与周围组织间有明显裂纹存在。

2.3 组织学检查 见图 4。
①AR 组 (44.44%单纯组): 自体软骨及周围的软骨有退变的表现, 表面不平整, 软骨细胞数量有少量减少, 簇状细胞聚集。软骨间的空隙处表面凹陷, 纤维组织或纤维软骨样组织增生。
②AL 组 (44.44%联合组): 自体软骨及周围的软骨保留了原有透明软骨的特性。软骨间的空隙区有新生的软骨细胞, 形态圆形, 周围有软骨陷窝形成, 细胞数量较正常多, 细胞排列较紊乱, 修复组织下部细胞已经形成了成熟的骨小梁结构, 与周围骨组织难以分辨。修复组织与周围正常软骨以及自体移植骨软骨的交界区大部分整合良好, 可见有小裂隙以及周围有簇集状软骨细胞增生。Ⅱ型胶原免疫组化染色示软骨间的修复组织呈棕黄色, 较周围正常软骨明显, 以软骨细胞和陷窝周围明显, 胶原粗大 (图 5)。
③BR 组 (33.33%单纯组), 自体软骨及周围的软骨有较明显的退变表现, 部分区域出现纤维化, 纤维束与关节软骨面呈纵向排列, 并出现垂直于软骨表面的裂隙, 软骨细胞排

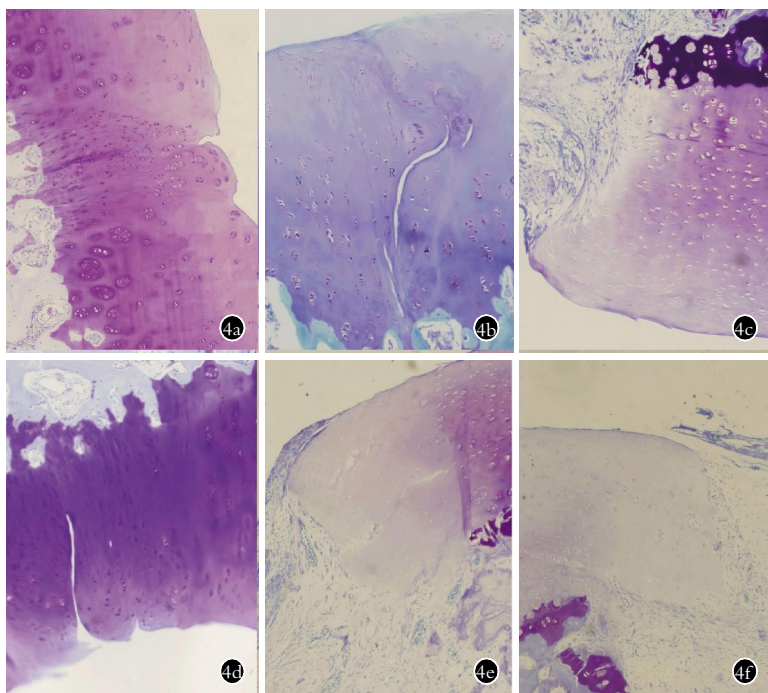


图 4 术后 24 周组织学甲苯胺蓝染色(R: 修复组织;N: 正常软骨。甲苯胺蓝 100×)
4a. AR 组(44.44%单纯组), 自体软骨及周围的软骨表面不平整, 簇状细胞聚集, 软骨间的空隙处表面凹陷, 纤维组织或纤维软骨样组织增生 **4b.** AL 组(44.44%联合组), 自体软骨及周围的软骨保留了原有透明软骨的特性, 修复组织染色稍淡, 软骨深层染色浓, 细胞形态大, 交界区大部分整合良好, 可见有裂隙 **4c.** BR 组(33.33%单纯组), 自体软骨及周围的软骨有较明显的退变表现, 软骨间的空隙处表面凹陷, 纤维组织增生, 基质中可见纺锤形的成纤维细胞 **4d.** BL 组(33.33%联合组), 自体软骨及周围的软骨基本保留了原有透明软骨的特性, 修复组织染色较正常为淡, 基质纤维较为粗大, 交界区有裂隙, 周围有簇集状软骨细胞增生 **4e.** CR 组(22.22%单纯组), 自体软骨及周围软骨有明显退变表现, 软骨间的空隙处表面凹陷明显, 部分纤维组织增生 **4f.** CL 组(22.22%联合组), 自体软骨及周围软骨的软骨细胞减少, 细胞聚集, 基质明显浅染, 软骨间的空隙区呈凹陷状, 纤维组织增生, 基质中可见纺锤形细胞

Fig. 4 Histological findings of toluidine blue dyeing at 24 weeks after the surgery (R: Reparative tissue;N: Normal cartilage. Toluidine blue 100×) **4a.** The surface of the graft cartilage and the surrounding cartilage of Group AR (44.44% single group) was irregular. The gap around the implanted plugs was depressed. Fibrous tissue proliferated **4b.** The graft cartilage and the surrounding cartilage of Group AL (44.44% associated group) maintained the character of hyaline cartilage. The dying of the reparative tissue was light. Most of the borders had a good integration. Gaps existed **4c.** The graft cartilage and surrounding cartilage of Group BR (33.33% single group) had obvious regression. The hollow among the cartilage was obvious. Fibrous tissue proliferated. Fibroblast cells existed **4d.** The graft cartilage and the surrounding cartilage of Group BL (33.33% associated group) on the whole maintained the character of hyaline cartilage. The dying of the reparative tissue was light. Gaps existed in the borders. Clusters of chondrocytes proliferated around **4e.** The graft cartilage and surrounding cartilage of Group CR (22.22% single group) had obvious regression. The hollow among the cartilage was obvious. Fibrous tissue partly proliferated **4f.** The chondrocytes of the autologous cylindrical osteochondral grafts of Group CL (22.22% associated group) decreased. The gap was depressed. Fibrous tissue proliferated. Spindle cells existed in the matrix

列不均。软骨间的空隙处表面凹陷, 纤维组织增生, 基质中可见纺锤形的成纤维细胞。④BL 组(33.33%联合组): 自体软骨及周围的软骨基本保留了原有透明软骨的特性, 部分区域出现了软骨细胞减少、细胞

聚集的退变表现。软骨间的空隙区部分区域内有纺锤形的细胞增生, 数量多, 排列紊乱。修复组织与周围正常软骨以及自体移植骨软骨的交界区有裂隙, 周围有簇集状软骨细胞增生。Ⅱ型胶原免疫组化染色示软骨间的修复组织呈棕黄色, 胶原粗大(图 5)。⑤CR 组(22.22%单纯组): 自体软骨及周围的软骨有明显的退变表现, 软骨变薄、破裂, 表面不平整, 软骨细胞数量严重减少, 簇状细胞聚集, 软骨下骨硬化, 出现囊肿。软骨间的空隙处表面凹陷明显, 部分纤维组织增生, 基质中可见纺锤形的成纤维细胞。⑥CL 组(22.22%联合组): 左膝股骨内髁移植的自体软骨及周围的软骨也出现了软骨细胞减少, 细胞聚集的退变表现, 基质明显浅染。软骨间的空隙区呈凹陷状, 纤维组织增生, 基质中可见纺锤形细胞。

2.4 电镜检查 取 AL、BL 组标本的软骨间修复组织行透射电镜检查(图 6)。AL 组(44.44%联合组): 软骨间的修复组织可见具有典型褶皱状小突起的软骨细胞, 软骨陷窝清晰, 软骨细胞形态结构与正常软骨一致。软骨细胞大小及胞内线粒体、内质网、高尔基复合体等细胞器正常, 软骨细胞周围的间质由一束束的胶原纤维所组成, 纤维排列较为紊乱, 可见周期横纹。BL 组(33.33%联合组): 软骨间的修复组织可见有平行或交错排列的胶原纤维束, 纤维束排列较为整齐, 可见较明显的周期横纹, 软骨细胞较小, 分布于纤维束之间。

2.5 统计分析 将修复的组织作为一个整体, 进行 O'Driscoll, Keeley and Salter 组织形态学评分。AR 组平均(18.667±1.506)分, AL 组平均(20.167±1.169)分, BR 组平均(8.167±0.753)分, BL 组平均(19.833±1.169)分, CR 组平均(5.667±1.211)分, CL 组平均(6.333±1.633)分。统计结果显示, AR、AL、BL 3 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而 BR、CR、CL 3 组与前 3 组间差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 表示自体骨软骨移植的覆盖面积为 33.33%的联合组、44.44%的单纯组、44.44%的联合组的整体修复效果没有明显差别, 而 33.33%的单纯

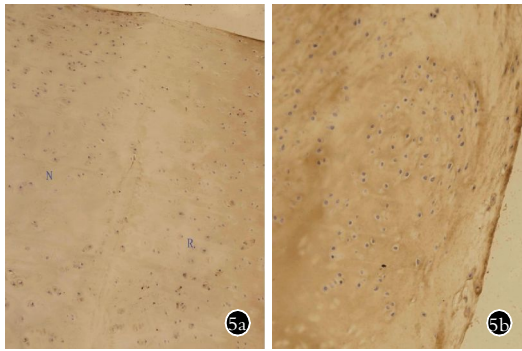


图 5 II 型胶原免疫组化染色(200×) 5a. AL 组(44.44%联合组)修复组织呈棕黄色,较周围正常软骨明显,以软骨细胞和陷窝周围明显,胶原粗大 5b. BL 组(33.33%联合组)软骨间的修复组织呈棕黄色,胶原粗大

Fig. 5 Immunohistochemical staining for type II collagen (200×) 5a. The staining of the reparative tissue of Group AL (44.44% associated group) was brown yellow and obvious relative to the normal cartilage. The chondrocytes and the lacuna arounding were much obvious. The collagen was thick 5b. The staining of the reparative tissue of Group BL (33.33% associated group) was brown yellow. The collagen was thick

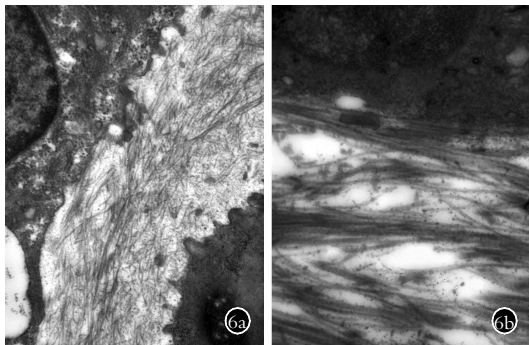


图 6 透射电镜检查(14 500×) 6a. AL 组(44.44%联合组)软骨间的修复组织可见软骨细胞周围的间质由一束束的胶原纤维所组成,纤维排列较为紊乱,可见周期横纹 6b. BL 组(33.33%联合组)软骨间的修复组织可见纤维束排列较为整齐,可见较明显的周期横纹

Fig. 6 Transmission electron microscope findings (14 500×) 6a. Collagen fibers composed the matrix arounding the chondrocytes in the reparative tissue of Group AL (44.44% associated group). The fibers were in disorderly rows. Periodic cross striation could be seen 6b. The fibers in the reparative tissue of Group BL (33.33% associated group) were in tight orderly rows. Periodic cross striation was obvious

组、22.22%的单纯组、22.22%的联合组的整体修复效果差于前 3 组。

3 讨论

3.1 骨软骨镶嵌成形术和组织工程的方法优势互补修复骨软骨缺损 一般临床上面积大于 4 cm^2 的骨软骨缺损称为大面积骨软骨缺损,其治疗是一个非常棘手的问题。目前在临床上应用的主要为自体软骨细胞移植,自体骨软骨柱移植,异体骨软骨移植以及关节置换术。但是临床效果大多不满意,并且不同的手术者之间的结果存在较大差异^[2-3]。相对于其他修复方法,骨软骨镶嵌成形术优势非常明显^[4]。

但是对于面积大且深,火山口样的,需要移植物数量多的大面积损伤,骨软骨镶嵌成形术就不适合^[5]。临床报道^[6-7]多数认为对于大于 4 cm^2 的缺损以及过去有过手术的病例,骨软骨镶嵌成形术的成功率低。并且移植骨软骨柱间的空隙愈合以及移植骨软骨柱与周围正常软骨的整合也是一个潜在因素影响远期的效果。对此,笔者设计了骨软骨镶嵌成形术联合组织工程的方法进行骨软骨缺损的修复,并不是两种治疗方式的简单相加,而是使两者各自的优越性获得充分体现,从而可能获得更佳的修复效果。

笔者首先通过对少量的 BMSCs 进行体外扩增,按照 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞浓度进行修复。在缺损表面的 BMSCs 因受关节腔内乏氧条件和关节应力以及滑液中各种活性因子影响,促使 BMSCs 向软骨细胞方向分化并形成软骨组织;而缺损底部邻近髓腔,丰富血供和高氧分压状态促使 BMSCs 向成骨细胞转化并形成骨小梁^[8]。

接着转染 hTGF- $\beta 1$ 。hTGF- $\beta 1$ 是软骨组织工程中首选生长因子^[9-10],具有多重生物学效应。本研究 Western Blot 检测显示转染 hTGF- $\beta 1$ 组细胞的 hTGF- $\beta 1$ 、II 型胶原及 Aggrecan 均有明显表达,提示 hTGF- $\beta 1$ 外源基因导入促进了宿主细胞不仅表达了 hTGF- $\beta 1$,而且也合成和分泌了细胞外基质 II 型胶原及 Aggrecan。hTGF- $\beta 1$ 转染的 BMSCs 植入体内后,在缺损局部持续表达的 hTGF- $\beta 1$,促进表层 BMSCs 向成软骨方向定向分化,软骨下区 BMSCs 继续向成骨方向分化,从而获得骨软骨两种组织复合缺损的修复,并且获得很好的整合。

最后结合载体植入体内,获得大量组织工程化软骨,弥补骨软骨镶嵌成形术的移植修复量不足。选用的载体藻酸钙凝胶为可注射性载体材料^[11],可以修复形状复杂而不规则的缺损,填充残留的空隙,这样就可以确保没有修复的遗漏,从而更可能获得与周围组织的基质高度整合。而骨软骨镶嵌成形术中移植骨软骨柱的早期承载负荷能力,能对组织工程化软骨提供支撑和保护,提高整体机械性能,避免组织工程软骨在形成之前受到破坏。骨软骨镶嵌成形术和组织工程化软骨所形成的共同的软骨表面,可以使缺损区获得与周围正常软骨一致的光滑完整关节面。因此,笔者认为骨软骨镶嵌成形术联合组织工程的方法适合于治疗较大面积骨软骨缺损,并使修复获得良好的预后效果。

3.2 骨软骨镶嵌成形术与组织工程方法的不同修复面积比例共同治疗骨软骨缺损 山羊的股骨内髁的直径约 12 mm ,故此笔者认为 9 mm 的缺损相对于山羊就是相当大面积缺损了。分别进行了 4、3、2 个

直径为 3 mm 的骨软骨柱移植, 理论计算使骨软骨移植的修复面积比例分别为 44.44%, 33.33%, 22.22% (骨软骨移植的修复面积比例 $\times 100\% = n \times \pi R_1^2 / \pi R_2^2$)。每个动物的右膝为单纯的骨软骨柱移植, 而左膝的骨软骨柱空隙进一步由组织工程的材料填充。将修复的组织作为一个整体进行分析, 发现骨软骨移植的修复面积为 44.44% 的 2 组, 虽然骨软骨镶嵌成形术联合组织工程方法比单纯行骨软骨镶嵌成形术获得更好的整合, 且骨软骨柱空隙得到未成熟的软骨组织修复, 但是两者的整体修复效果差异没有统计学意义。说明术后 24 周, 在骨软骨移植的修复面积较大, 而残留的空隙面积小, 组织可以较满意自身修复的情况下, 骨软骨镶嵌成形术联合组织工程方法并不具有优势。骨软骨移植的修复面积为 33.33% 的联合组, 与 44.44% 的单纯组和联合组的整体修复效果差别没有统计学意义, 而 33.33% 的单纯组的整体修复效果差于 33.33% 的联合组, 以及 44.44% 的单纯组和联合组。33.33% 的单纯组因为机体不能对骨软骨柱空隙进行纤维软骨样组织的修复, 纤维组织形成, 凹陷存在, 移植骨软骨柱和周围软骨承受异常应力, 从而导致软骨的明显退变。骨软骨移植的修复面积为 22.22% 的单纯组和联合组的整体修复效果与其他组之间差异均有统计学意义。22.22% 的单纯组的软骨退变更加明显。而 22.22% 的联合组中空隙组织工程化软骨形成失败, 空隙由纤维组织部分填充, 从而引起移植骨软骨柱和周围软骨的退变。笔者认为其原因为藻酸钙强度低, 生物力学性能弱, 而周围的移植骨软骨柱数量少, 不能为之提供保护, 从而导致组织工程化软骨不能有效形成。另外, 空隙缺损大而出血多, 可导致藻酸钙凝胶的流失。

根据结果笔者推论骨软骨镶嵌成形术联合组织工程的方法可以有效修复骨软骨缺损。随着自体骨软骨移植覆盖缺损面积的减少, 骨软骨镶嵌成形术联合组织工程方法的修复优越性可以得到更好的体现。如果自体骨软骨移植的修复面积在 1/3 以上, 剩余的缺损由组织工程方法修复, 仍可以获得较为满

意的修复。但是更大面积的缺损由组织工程方法修复的效果差。虽然实验为山羊的软骨, 但是山羊的组织构成、结构和功能与人类相似, 故此这对我们在急性膝关节损伤的治疗中具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 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]. J Bone Joint Surg Am, 1988, 70(4): 595-606.
- [2] Horas U, Pelinkovic D, Herr G, et al. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85A(2): 185-192.
- [3] Bentley G, Biant LC, Carrington RW. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee[J]. J Bone Joint Surg Br, 2003, 85(2): 223-230.
- [4] Hangody L, Dobos J, Baló E, et al. Clinical experiences with autologous osteochondral mosaicplasty in an athletic population: a 17-year prospective multicenter study[J]. Am J Sports Med, 2010, 38(6): 1125-1133.
- [5] Matricali GA, Dereymaeker GP, Luyten FP. Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: a review[J]. Acta Orthop Belg, 2010, 76(5): 669-674.
- [6] Harris JD, Siston RA, Pan X, et al. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(12): 2220-2233.
- [7] Hangody L, Vásárhelyi G, Hangody LR, et al. Autologous osteochondral grafting—technique and long-term results[J]. Injury, 2008, 39(Suppl 1): S32-39.
- [8] Potier E, Noailly J, Ito K. Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics[J]. J Biomech, 2010, 43(5): 807-817.
- [9] Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair[J]. Injury, 2008, 39(Suppl 1): S97-113.
- [10] Khan WS, Johnson DS, Hardingham TE. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects[J]. Knee, 2010, 17(6): 369-374.
- [11] Chajra H, Rousseau CF, Cortial D, et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects[J]. Biomed Mater Eng, 2008, 18(1 Suppl): S33-45.

(收稿日期: 2011-02-14 本文编辑: 连智华)