

• 基础研究 •

同种异体半月板联合骨软骨移植的实验研究

周预¹, 刘玉杰², 侯树勋¹

(1. 解放军总医院第一附属医院骨科, 北京 100048; 2. 解放军总医院骨科, 北京 100048)

【摘要】 目的: 探讨新鲜同种异体半月板骨软骨联合移植治疗胫骨平台毁损伤后骨关节炎的疗效。方法: 成年新西兰大白兔 36 只, 随机分为 A、B、C 3 组, 各 12 只。A 组行右膝内侧半月板连同胫骨平台骨软骨移植, 克氏针交叉固定骨块。B 组行右膝内侧半月板移植, 左膝内侧半月板取出制备新鲜冷冻半月板。C 组行左膝内侧新鲜冷冻半月板移植。术后 4、8、12 周分批取材行大体观察、组织学检查和胫骨平台软骨氨基己糖(GAG)测定。结果: 12 周时 A 组移植胫骨平台软骨与 B、C 组半月板移植术后的内侧胫骨平台软骨氨基己糖含量差异无统计学意义; A、B 组移植的半月板纤维软骨细胞数差异无统计学意义; A 组半月板移植的纤维软骨细胞数多于 C 组。结论: 新鲜同种异体半月板骨软骨联合移植能修复胫骨平台毁损伤。

【关键词】 移植, 同种; 半月板, 胫骨; 软骨; 骨关节炎; 兔

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.10.016

Experimental study on fresh meniscal allografts combined with osteochondral allografts transplantation ZHOU Yu*, LIU Yu-jie, HOU Shu-xun. *Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of fresh meniscal allografts combined with osteochondral allografts transplantation for treatment of osteoarthritis. **Methods:** Thirty-six rabbits were used in the experiment and were randomly divided into 3 groups; in group A, the fresh medial meniscal allografts combined with osteochondral allografts from medial tibial plateau were implanted into medial articular meniscal and medial tibial plateau osteochondral defects; in group B, the fresh medial meniscal allografts were implanted into medial meniscal allografts defects; in group C, the freezing medial meniscal allografts were implanted into medial meniscal allografts defects. General observation, histology examination and glycosaminoglycan (GAG) examination in cartilage of medial tibial plateau were performed at the 4th, 8th and 12th week after operation. **Results:** There were no significant differences in cellular counting and amount of GAG between group A and group B, but the cellular amount of group A was significantly more than that of group C at the 12th week. **Conclusion:** Fresh meniscal allografts combined with osteochondral allografts transplantation can repair meniscal and osteochondral defects.

KEYWORDS Transplantation, homologous; Menisci, tibial; Cartilage; Osteoarthritis; Rabbits

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(10): 852-855 www.zggszz.com

胫骨平台粉碎骨折合并半月板损伤发生率达 44%~91%^[1]。目前针对胫骨平台骨软骨骨折合并半月板损伤的治疗尚无更有效的方法。本实验探讨新鲜同种异体半月板和胫骨平台骨软骨联合移植, 修复胫骨平台骨折合并严重半月板损伤, 为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要仪器和试剂 健康新西兰白兔 36 只, 雌雄不拘, 体重 2.4~2.6 kg, 髌骨下缘至足跟 123~127 mm。动物合格证号: SCXK-(京 2007-0003), 由解放军总医院实验动物中心提供。BMJ-1 组织包埋机(天利航空机电有限公司, 天津); 病理切片机(Leica 公司, 德国); X51 生物显微和 DP70 数码

照相设备(Olympus 公司, 日本); DU640 紫外分光光度计和 Allegra X-22R 高速低温离心机(Beckman 公司, 德国); 木瓜蛋白酶(Sigma 公司, 美国); 硫酸软骨素(Bioszune 公司, 美国)。

1.2 实验分组及方法 将 36 只兔随机分为 A、B、C 3 组, 各 12 只。A 组行右膝内侧半月板连同其下的胫骨平台骨软骨移植: 常规备皮后, 1:1 速眠新氯胺酮混合液(0.3 ml/kg)肌肉注射麻醉。右膝关节内侧纵行切口长约 2.5 cm, 横断内侧副韧带, 显露内侧半月板。在内侧胫骨平台下方 3 mm 及髌间脊内侧缘行内侧平台截骨, 将内侧半月板及内侧胫骨平台一并切取出来, 保留半月板与胫骨平台相连的组织, 将移植植物大量生理盐水冲洗。将异体半月板骨软骨联合移植植物植于另一兔子的相应位置的受区, 2 枚直径 1 mm 克氏针平行胫骨平台由内向外交叉固定骨

通讯作者: 周预 E-mail: zhouyu9711@126.com

块,缝合内侧副韧带、关节囊及皮肤。术后青霉素 80 万单位肌肉注射 3 d。

B 组行右膝内侧同种异体半月板移植,麻醉、手术入路同 A 组。分别切取内侧半月板,大量盐水冲洗后即交叉移植。用 5 个 0 号线将前角缝合于前交叉韧带胫骨止点,后角缝合于后交叉韧带胫骨止点,体部缝合于内侧副韧带,逐层缝合内侧副韧带及切口。无菌切取左膝内侧半月板,术后治疗同 A 组。将切取的半月板置于-80℃下快速冰冻,2 周后转入-20℃冻存待用。移植前 2.5 Mrad γ 射线照射消毒。

C 组行左膝内侧冷冻半月板移植,入路及冷冻半月板固定方法同 B 组,术后治疗同 A 组。各组术后未行外固定,笼养。

1.3 观察指标 术后 4、8、12 周每组各取 4 只兔子进行观察。

1.3.1 一般情况 观察动物术后精神、饮食及切口愈合情况。

1.3.2 大体观察 空气栓塞处死动物,髌骨下缘横行切开关节,切断交叉韧带,观察滑膜、半月板、胫骨软骨。

1.3.3 软骨氨基己糖(GAG)测定 取 A 组右膝内侧胫骨平台前半部软骨与 B、C 组移植半月板下方的胫骨平台前半部软骨,参照 Qiang 等^[2]的方法测定每毫克干重软骨中氨基己糖含量。

1.3.4 组织学观察 取移植侧胫骨平台及半月板固定于 4%多聚甲醛 1 周,15%EDTA-2Na 溶液脱钙 4 周,石蜡包埋,做 5 μ m 厚连续切片,切片行 HE 和甲苯胺蓝染色。取半月板前角、体部和后角高倍镜下由浅层到深层各 3 个视野,用 Image-ProPlus 5.0 image-analysis software 图像分析软件行细胞计数。

1.3.5 循环重建检测 4 周时对 A 组 2 只兔子行股动脉明胶墨水灌注^[3]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件包进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示,同时期组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 所有动物无异常死亡,未见明显免疫排斥反应。A 组术后 3 d 动物活动减少,关节肿胀;术后 5~7 d 动物跛行;10 d 时自由行走,肿胀消失。除 1 只切口被咬开外,其余切口愈合良好,无意外死亡。B、C 组术后 1~3 d 动物活动少,7~10 d 后自由行走。

2.2 大体观察 A 组动物 4 周时滑膜增生覆盖移植半月板,半月板正常,移植的平台色灰白,骨块愈合,关节液少;8 周时半月板上覆盖的滑膜减少,半

月板萎缩,软骨表面略皱缩,关节液增多;12 周时半月板上滑膜微少,半月板萎缩略减轻,软骨近正常,关节液丰富。B 组动物 4 周时滑膜增生覆盖移植半月板,半月板萎缩,半月板与滑膜交界处明显,软骨正常;8 周时半月板与滑膜愈合,软骨轻度退变;12 周时半月板萎缩减轻,软骨退变减轻。C 组动物 4 周时移植半月板轻度萎缩,无正常的光泽,胫骨平台在半月板未覆盖的区域有轻度退变;8 周时移植半月板仍未恢复正常光泽,胫骨平台退变的软骨较前有一定的修复;12 周时半月板上滑膜增生,光泽近正常,胫骨平台软骨修复近正常。

2.3 软骨氨基己糖测定 4 周时 B、C 组 GAG 含量高于 A 组,8 周时 B、C 组 GAG 含量低于 A 组,12 周时 3 组 GAG 含量差异无统计学意义。各时间点 B、C 组 GAG 含量差异无统计学意义(见表 1)。

表 1 术后不同时间 3 组软骨氨基己糖含量比较

Tab.1 GAG amount at each time postoperatively in three groups

组别	兔数(只)	GAG 含量($\bar{x} \pm s$, mg/mg)		
		4 周	8 周	12 周
A 组	4	0.1063 \pm 0.0016	0.1180 \pm 0.0121	0.1005 \pm 0.0083
B 组	4	0.1260 \pm 0.0099 ^{a1}	0.1061 \pm 0.0114 ^{a3}	0.1035 \pm 0.0098 ^{a5}
C 组	4	0.1233 \pm 0.0098 ^{a2b1}	0.1076 \pm 0.0105 ^{a4b2}	0.1018 \pm 0.0086 ^{a6b3}

注:与 A 组比较,^{a1} $q=5.04, P < 0.05$; ^{a2} $q=4.92, P < 0.05$; ^{a3} $q=4.11, P < 0.05$; ^{a4} $q=4.64, P < 0.05$; ^{a5} $q=1.87, P > 0.05$; ^{a6} $q=2.21, P > 0.05$ 。与 B 组比较,^{b1} $q=2.14, P > 0.05$; ^{b2} $q=1.92, P > 0.05$; ^{b3} $q=1.82, P > 0.05$

Note: Compared with group A, ^{a1} $q=5.04, P < 0.05$; ^{a2} $q=4.92, P < 0.05$; ^{a3} $q=4.11, P < 0.05$; ^{a4} $q=4.64, P < 0.05$; ^{a5} $q=1.87, P > 0.05$; ^{a6} $q=2.21, P > 0.05$. Compared with group B, ^{b1} $q=2.14, P > 0.05$; ^{b2} $q=1.92, P > 0.05$; ^{b3} $q=1.82, P > 0.05$

2.4 组织学观察 A 组:4 周时半月板纤维排列紊乱,纤维软骨细胞丰富(图 1),移植软骨表层细胞死亡,移植骨块与宿主愈合(图 2);8 周时半月板纤维软骨细胞减少,细胞间隙增大,软骨表面皱缩,细胞间隙增大,移植软骨的细胞数量增加;12 周时半月板纤维软骨细胞数量恢复,结构接近正常,移植半月板下的胫骨平台软骨细胞排列较规则,已接近正常(图 3),软骨下骨已被自体骨组织替代。

B 组:4 周时半月板结构良好,纤维软骨细胞明显减少(图 4),软骨表面欠平整,表层细胞排列不规则;8 周时半月板纤维软骨细胞数量增多,软骨部分不平整;12 周时半月板纤维软骨细胞数量继续增多,软骨部分修复,移植半月板下的胫骨平台软骨细胞排列欠规则(图 5)。

C 组:4 周时半月板内罕见细胞存在(图 6),软骨部分细胞陷窝空虚;8 周时半月板内增加少量细胞,软骨空陷窝减少;12 周时半月板纤维细胞大量增加,但仍远低于正常,移植半月板下的胫骨平台软

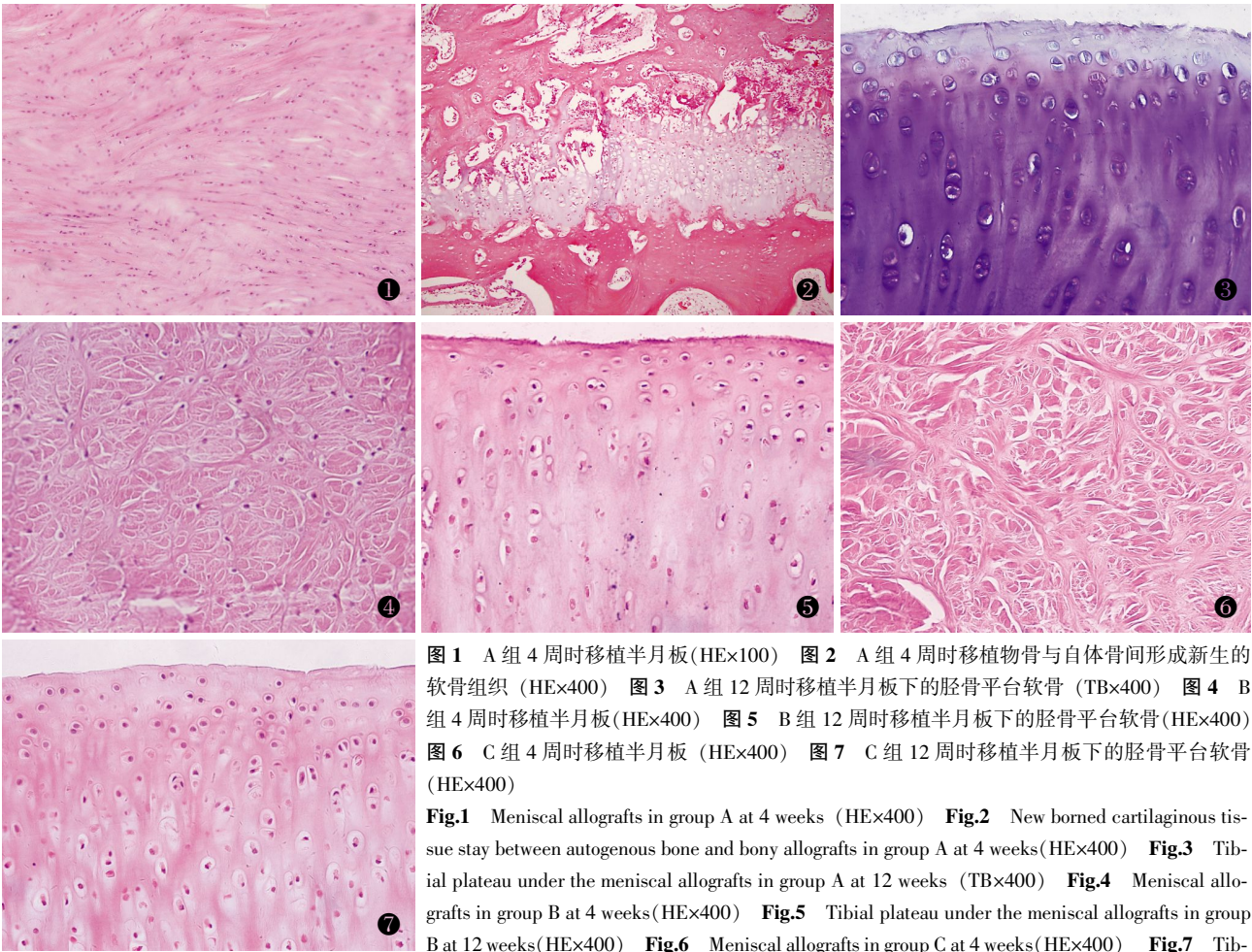


图 1 A 组 4 周时移植半月板(HE×100) 图 2 A 组 4 周时移植物骨与自体骨间形成新生的软骨组织 (HE×400) 图 3 A 组 12 周时移植半月板下的胫骨平台软骨 (TB×400) 图 4 B 组 4 周时移植半月板(HE×400) 图 5 B 组 12 周时移植半月板下的胫骨平台软骨(HE×400) 图 6 C 组 4 周时移植半月板 (HE×400) 图 7 C 组 12 周时移植半月板下的胫骨平台软骨 (HE×400)

Fig.1 Meniscal allografts in group A at 4 weeks (HE×400) Fig.2 New borned cartilaginous tissue stay between autogenous bone and bony allografts in group A at 4 weeks(HE×400) Fig.3 Tibial plateau under the meniscal allografts in group A at 12 weeks (TB×400) Fig.4 Meniscal allografts in group B at 4 weeks(HE×400) Fig.5 Tibial plateau under the meniscal allografts in group B at 12 weeks(HE×400) Fig.6 Meniscal allografts in group C at 4 weeks(HE×400) Fig.7 Tibial plateau under the meniscal allografts in group C at 12 weeks(HE×400)

骨细胞未恢复规则排列(图 7)。

4 周时 A、B 组半月板纤维软骨细胞计数高于 C 组,且 A 组高于 B 组;8、12 周时,A、B 组半月板纤维软骨细胞计数高于 C 组,A 组与 B 组间差异无统计学意义(见表 2)。

2.5 循环重建检测 4 周时 A 组墨汁灌注显示移植半月板内部能灌入墨汁。说明循环重建,移植组织成活。

3 讨论

胫骨平台骨折占全身骨折的 1%^[4-5],多数合并半月板严重损伤^[6]。半月板具有重要功能^[7],半月板损伤后将导致关节软骨退变、剥脱,软骨下骨硬化,最终导致膝关节骨关节炎^[7-11]。Rijk 等^[12]发现半月板切除后 6 周出现关节软骨明显破坏的情况。Verma 等^[13]研究发现,内侧半月板全切除后,内侧胫股关节接触应力大幅增加,而内侧半月板移植可使内侧应力接近正常。胫骨平台骨折致关节软骨大面积损伤,胫骨平台塌陷下肢力线改变,伴发严重的骨关节炎,半月板移植难奏效^[9,14]。

半月板不匹配^[15]与移植半月板的治疗效果密切

表 2 术后不同时间 3 组半月板纤维软骨细胞计数

Tab.2 Fibrochondrocyte amount at each time postoperatively in three groups

组别	兔数 (只)	半月板纤维软骨细胞计数(±s)		
		4 周	8 周	12 周
A 组	4	84.444±9.964	80.000±3.640	96.000±6.124
B 组	4	67.778±9.107 ^{a1}	77.778±6.320 ^{a3}	93.333±7.467 ^{a5}
C 组	4	0.667±0.707 ^{a2b1}	2.3330±2121 ^{a4c2}	37.111±5.302 ^{a6c3}

注:与 A 组比较,^{a1}q=4.17, P<0.05;^{a2}q=23.19, P<0.05;^{a3}q=2.12, P>0.05; ^{a4}q=14.12, P<0.05; ^{a5}q=1.97, P>0.05; ^{a6}q=8.64, P<0.05。与 B 组比较, ^{b1}q=19.44, P<0.05; ^{b2}q=11.23, P<0.05; ^{b3}q=8.82, P<0.05

Note: Compared with group A, ^{a1}q=4.17, P<0.05; ^{a2}q=23.19, P<0.05; ^{a3}q=2.12, P>0.05; ^{a4}q=14.12, P<0.05; ^{a5}q=1.97, P>0.05; ^{a6}q=8.64, P<0.05. Compared with group B, ^{b1}q=19.44, P<0.05; ^{b2}q=11.23, P<0.05; ^{b3}q=8.82, P<0.05

相关。移植半月板和原有半月板大小的误差在 10% 以内被认为是可接受的^[16]。一般认为半月板前后角骨性固定具有初步稳定性^[17],半月板移植需要前后骨栓进行固定。半月板胫骨平台骨软骨联合移植,半月板与胫骨平台匹配较好,具有独特的优势。

对于胫骨平台塌陷超 2 mm 的骨折, Tscherne

等^[18]认为需手术治疗恢复胫骨平台的正常高度。而对胫骨平台软骨及软骨下骨严重损伤或已经退变的病例,仍无理想的治疗方法。新鲜骨软骨移植^[19]和新鲜半月板移植^[20]的研究已有报道并在临床进行了实践。本实验采用的新鲜同种异体半月板骨软骨联合移植,不仅可以治疗半月板严重损伤,而且可以同时修复胫骨平台软骨及软骨下骨骨折,恢复胫骨平台的正常高度。4 周时墨汁灌注显示移植半月板已建立新的血供,说明移植组织能够成活。本实验成功修复半月板合并胫骨平台骨软骨缺损,结果说明新鲜半月板联合骨软骨移植能修复胫骨平台损伤,为单髁损伤的治疗提供了新的思路,为将来临床应用打下了基础。

软骨细胞外基质 GAG 是软骨的重要功能成分,它的含量变化反应了软骨功能的变化^[21]。实验结果显示 B、C 组软骨细胞外基质 GAG 含量在 4 周时与 A 组有差异,说明这 2 组软骨处于修复阶段;12 周时 3 组 GAG 含量接近正常软骨,即 $(0.102 2 \pm 0.009 8) \text{ mg/mg}$,说明修复均接近完成。

纤维软骨细胞是半月板的基本功能单位,其数量变化可在一定程度上反应半月板的功能变化。4 周时,C 组移植半月板内纤维软骨细胞因曾被冷冻,故而数量微少,此后缓慢增加,但难以达到 A、B 组的水平。A、B 组移植半月板的纤维软骨细胞均有先减少后增加的趋势。移植后宿主细胞逐渐长入半月板内,可部分恢复半月板的功能。对于如何使新鲜移植的半月板纤维软骨细胞数量恢复到正常水平还有待研究。

虽然半月板和软骨免疫原性低且兔的免疫反应能力不强,目前尚未发现明显的免疫反应表现,但是随着植骨量的增加和动物种系的变化,半月板、软骨和软骨下骨复合物的免疫原性问题尚不是十分清楚,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Gardener MJ, Yacoubian S, Geller D, et al. The incidence of soft tissue injury in operative tibial plateau fractures; a magnetic resonance imaging analysis of 103 patients[J]. J Orthop Trauma, 2005, 19(2): 79-84.
- [2] Yang Q, Peng J, Guo Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials, 2008, 29(15): 2378-2387.
- [3] Tong JB, Chen D, Zeng LP, et al. Differential changes of local blood supply in rat retinae are involved in the selective loss of retinal ganglion cells following the acute high intraocular pressure[J]. Curr Eye Res, 2010, 35(5): 425-434.
- [4] Hohl M. Managing the challenge of tibial plateau fractures[J]. J Musculoskel Med, 1991, 8: 70-86.
- [5] Watson JT, Wiss DA. Fractures of the proximal tibia and fibula. In: Buchoz RW, Heckman JD. Rockwood and Green's Fractures in Adults[M]. 5th Edit. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2001: 1801-1803.
- [6] Harris ED Jr. The bone and joint decade; a catalyst for progress[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(9): 1969-1970.
- [7] Packer JD, Rodeo SA. Meniscal allograft transplantation[J]. Clin Sports Med, 2009, 28(2): 259-283.
- [8] McKinley TO, English DK, Bay BK. Trabecular bone strain changes resulting from partial and complete meniscectomy[J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, 407: 259-267.
- [9] Matava MJ. Meniscal allograft transplantation[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 455: 142-157.
- [10] Verdonk PC, Demurie A, Almqvist KF, et al. Transplantation of viable meniscal allograft. Surgical technique[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(Suppl 1): 109-118.
- [11] Wyland DJ, Guilak F, Elliott DM, et al. Chondropathy after meniscal tear or partial meniscectomy in a canine model[J]. J Orthop Res, 2002, 20(5): 996-1002.
- [12] Rijk PC, Tigchelaar-Gutter W, Bernoski FP, et al. Functional changes in articular cartilage after meniscal allograft transplantation; a quantitative histochemical evaluation in rabbits[J]. Arthroscopy, 2006, 22(2): 152-158.
- [13] Verma NN, Kolb E, Cole BJ, et al. The effects of medial meniscal transplantation techniques on intra-articular contact pressures[J]. J Knee Surg, 2008, 21(1): 20-26.
- [14] Alford W, Cole BJ. The indications and technique for meniscal transplant[J]. Orthop Clin North Am, 2005, 36(4): 469-484.
- [15] Pollard ME, Kang Qian, Berg EE. Radiographic sizing for meniscal transplantation[J]. Arthroscopy, 1995, 11(6): 684-687.
- [16] Dienst M, Greis PE, Ellis BJ, et al. Effect of lateral meniscal allograft sizing on contact mechanics of the lateral tibial plateau; an experimental study in human cadaveric knee joints[J]. Am J Sports Med, 2007, 35(1): 34-42.
- [17] Sekiya JK, West RV, Groff YJ, et al. Clinical outcomes following isolated lateral meniscal allograft transplantation[J]. Arthroscopy, 2006, 22(7): 771-780.
- [18] Tschernhe H, Lobenhoffer P. Tibial plateau fractures. Management and expected results[J]. Clin Orthop Relat Res, 1993, (292): 87-100.
- [19] Gross AE, Aubin P, Cheah HK, et al. A fresh osteochondral allograft alternative[J]. J Arthroplasty, 2002, 17: 50-53.
- [20] Verdonk PC, Demurie A, Almqvist KF, et al. Transplantation of viable meniscal allograft, Survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases[J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(4): 715-724.
- [21] 黄异飞, 敖英芳. 关节软骨损伤修复研究现状[J]. 国外医学: 骨科学分册, 2004, 25(2): 117-121.
Huang YF, Ao YF. The research on repairing of articular cartilage defects[J]. Guo Wai Yi Xue: Gu Ke Xue Fen Ce, 2004, 25(2): 117-121. Chinese.

(收稿日期: 2011-12-20 本文编辑: 连智华)