

· 基础研究 ·

幼年猪半月板体外器官培养模型的建立

戴祝, 陈志伟, 杨乐忠, 刘春磊

(南华大学附属第一医院骨科, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 目的: 观察幼年猪半月板在体外器官培养条件下的组织变化特点, 为在体外器官培养下进行半月板研究提供实验依据。方法: 1 月龄幼年猪 8 头, 取双膝内、外侧半月板, 从每个半月板体部横行切取宽约 8 mm 标本 1 份, 共 32 份标本, 进行体外器官培养。分别于培养 0、2、4、6 周后随机取出 8 个标本行组织学检查, HE 染色观察半月板内侧 1/3 区域, 计数每个视野的细胞数, 比较各时间点间的差异; 番红 O 染色观察半月板内侧 1/3 区域, 记录染色程度, 半定量评分, 比较各时间点间的差异。结果: 培养 0、2、4、6 周后, 各时间点间每高倍视野的细胞数差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。培养 0、2、4、6 周后, 各时间点间番红 O 染色半定量评分差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 随体外器官培养时间延长, 幼年半月板软骨细胞密度及活性逐渐下降。体外器官培养模型适合半月板的短期研究。

【关键词】 半月板, 胫骨; 模型, 动物; 软骨细胞; 器官培养技术; 猪

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.11.014

In vitro meniscal culture of juvenile porcine DAI Zhu, CHEN Zhi-wei, YANG Le-zhong, LIU Chun-lei. Department of Orthopaedics, the First Hospital Affiliated to the University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

ABSTRACT **Objective:** To observe the histological changes of juvenile porcine menisci in an in vitro organ culture system. It was hoped that the experiment can provide evidence for the study of menisci in an in vitro organ culture model. **Methods:** Eight juvenile swines of one month old were involves in the study. Thirty-two meniscal specimens with 8 mm in width were obtained from each meniscus in the two posterior extremities. The specimens were incubated in an in vitro organ culture model. At 0, 2, 4 and 6 weeks after culture, 8 specimens were observed. Hematoxylin eosin staining; the cell density of the inner 1/3 zone was measured. Safranin-O staining; the degree of staining in the inner zone was measured and semi-quantitative scores were obtained. **Results:** At 0, 2, 4 and 6 weeks, the cell density were (285.3±12.0)/HPF, (182.8±11.2)/HPF, (129.7±9.9)/HPF, (92.3±9.3)/HPF respectively. Statistically significant differences were found between different time points ($P < 0.05$), Paired comparison showed statistical differences ($P < 0.05$). At 0, 2, 4 and 6 weeks, the semi-quantitative scores of Safranin-O staining were 2.0±0.0, 1.5±0.5, 1.0±0.0, 0.5±0.5, statistically differences were found between different time points ($P < 0.05$). Paired comparison showed statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** In the juvenile meniscus in vitro organ culture model, the cell density and viability diminished along with the cultural time. In vitro organ culture model is suitable for the study of menisci in short term.

KEYWORDS Menisci, tibial; Models, animal; Chondrocytes; Organ culture techniques; Swine

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(11):937-940 www.zggszz.com

半月板损伤临床常见, 以成年患者多见, 而幼年患者很少^[1-2]。有研究认为, 这是由于幼年半月板损伤愈合能力较成年半月板强, 损伤后多能自然愈合^[3]。一般认为这主要是由于幼年半月板血运较成年半月板丰富, 但是除了血运的差异, 两者的内在愈合潜能是否也存在差异, 为解决这个问题, 拟在半月板体外器官培养模型中进行观察。本研究初步建立了幼年猪半月板在体外器官培养模型, 并观察幼年

猪半月板组织细胞密度及细胞活性随培养时间而变化的特点, 为进一步研究其内在愈合能力提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂和设备 1 月龄本地猪 8 头, 购自湖南省衡阳市当地饲养场, 雌雄不限。DMEM/F12 培养液(1:1)(美国 Hyclone); 无支原体胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司); 两性霉素 B(美国 Amresco); 6 孔培养板(美国 Costar); CO₂ 培养箱(美国 Thermo, K60-4-1 型); 组织切片(德国 Microm, HM340E 型); 番红-O(美国 Sigma); 倒置相差显微镜(日本 Nikon, TS100-F 型)。

基金项目: 2010 年湖南省自然科学基金(编号: 10JJ3094)

Fund programs: Provided by Natural Science Foundation of Hunan Province in 2010(No. 10JJ3094)

通讯作者: 戴祝 E-mail: oliverdaizhu@sina.com.cn

1.2 半月板标本制作 猪处死后,立即取下双侧膝关节,用双氧水、生理盐水冲洗,络合碘消毒,无菌巾包裹后冰敷,迅速带回实验室。稀释络合碘,双氧水、生理盐水冲洗,络合碘消毒。铺无菌巾单,去除皮肤及膝关节周围软组织,再次络合碘、双氧水、生理盐水冲洗。加盖无菌巾单,切开关节,完整取出内、外侧半月板,切除周边滑膜,PBS 冲洗 5 遍。每个半月板体部由外向内切取宽约 8 mm 大小的标本 1 份,共 32 份标本。

1.3 半月板器官培养 将制作好的标本放入 6 孔培养板内,每孔内 1 份标本。培养环境参照 Kobayashi 等^[4]的方法,每孔内加入 5 ml DMEM/F12 (1:1) 培养液(含 10%胎牛血清、10 000 U/ml 青霉素、10 mg/ml 链霉素、25 μg/ml 两性霉素 B),置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内培养。培养 24 h 换液 1 次,此后每 3 d 更换培养液 1 次,培养板每周更换 1 次。

1.4 观察指标与方法 分别于培养 0、2、4、6 周后每组随机取出 8 份标本,4%多聚甲醛固定 24 h,脱水,石蜡包埋,5 μm 切片。每份标本于 2 个表面及中间部分分别取连续 2 张切片(每份标本 6 张切片),1 张切片行 HE 染色(每份标本 3 张切片),倒置相差显微镜观察,每张切片在半月板内侧 1/3 区域随机观察 2 个高倍视野(10×40 倍),计数每个视野的细胞数。相邻的另 1 张切片行番红 O 染色(每份标本 3 张切片),在半月板内侧 1/3 区域随机观察 2 个高倍视野(10×40 倍),观察每个视野的染色程度。参照 Ishida 等^[5]的评分标准进行半定量评分:标本深染,2 分;淡染,1 分;无染色,0 分,每份标本记录最高评分。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,细胞密度及番红 O 染色结果采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 组织学观察 正常幼年猪

半月板中胶原纤维束较细小,纤维软骨细胞密集,呈圆形、椭圆形或梭形,形态大小基本一致,胞核蓝染。随着培养时间的延长,半月板细胞数量都逐渐减少,细胞体积变小,部分胞核收缩变形(图 1)。各时间点细胞密度结果见表 1,随时间延长,细胞密度降低。

2.2 番红 O 染色 随着培养时间的延长,标本的番红 O 染色程度逐渐变淡(图 2),半定量评分逐渐降低。

3 讨论

3.1 半月板体外器官培养的优势 器官培养是指

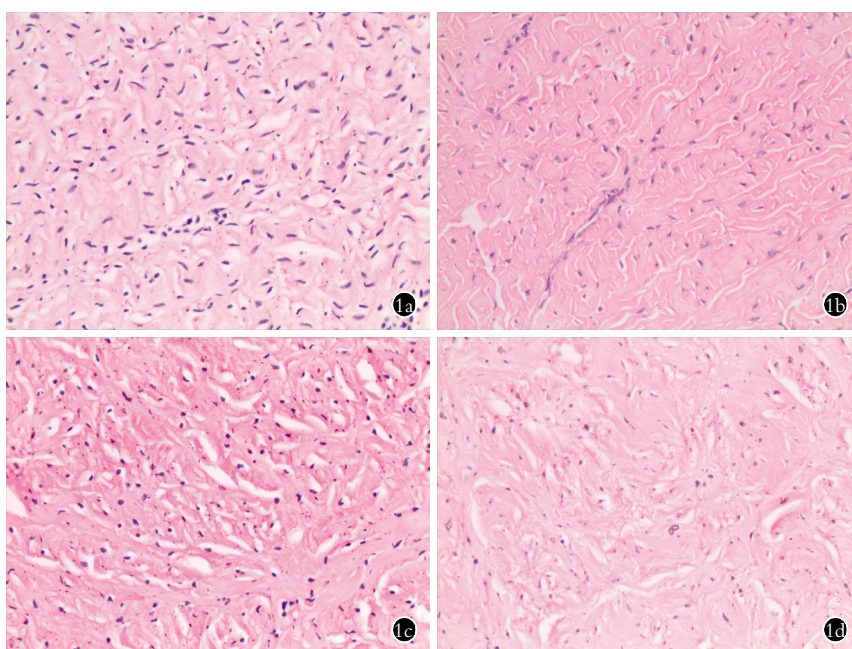


图 1 组织学观察结果 1a-1d. 分别为 0、2、4、6 周组织学观察结果(HE ×400)

Fig.1 Histological results 1a-1d. Results in 0, 2, 4, 6 weeks separately (HE ×400)

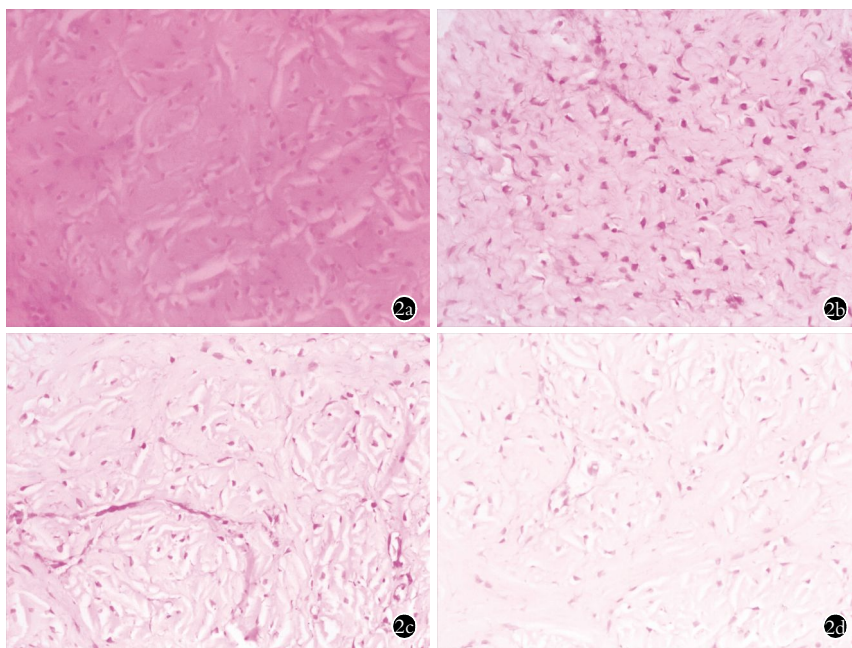


图 2 番红 O 染色结果 2a-2d. 分别为 0、2、4、6 周番红 O 染色结果(×400)

Fig.2 Safranin-O staining results 2a-2d. Results in 0, 2, 4, 6 weeks separately (×400)

表 1 不同时间点细胞密度及番红 O 染色半定量评分结果
($\bar{x} \pm s$)

| 培养时间 | 细胞密度(/HPF) | 番红 O 染色半定量评分(分) |
|------|------------|-----------------|
| 0 周 | 285.3±12.0 | 2.0±0.0 |
| 2 周 | 182.8±11.2 | 1.5±0.5 |
| 4 周 | 129.7±9.9 | 1.0±0.0 |
| 6 周 | 92.3±9.3 | 0.5±0.5 |
| F 值 | 2 982.99 | 23.33 |
| P 值 | 0.00 | 0.00 |

从动物或人体内分离出器官的一部分或整个器官,保持其正常结构,在模拟体内的生理条件下进行体外培养,提供必需的营养和排泄代谢产物,使其生存、增殖和分化,以便在可控条件下进行研究的一种方法。体外器官培养必须提供组织存活所必需的营养物质,被培养器官的细胞靠简单的渗透扩散方式从培养液中获得氧及其他营养物质,也以同样的方式向培养液中排出 CO₂ 及其他代谢废物^[5]。目前,体外器官培养已被广泛应用于角膜等研究中^[6],在半月板中的研究较少。半月板为纤维软骨组织,其中央区域为无血运区,依靠关节滑液的渗透作用获取营养,半月板组织内有输送营养的小孔连接表面至半月板内部,本身具有一定的惰性,自身代谢不活跃,对营养的要求相对较低,半月板的这些特点使其适合在体外器官培养下进行研究。与细胞培养相比,器官培养维持组织中原有的细胞与细胞、细胞与基质间的相互关系,因此能更好地模拟组织在体内时的状态。体外器官培养实验条件容易控制并且易于标准化,结果重复性高,能避免体内实验神经系统和细胞因子等的干扰,利于观察单一因素的影响。体外器官培养周期较细胞培养长,可以培养 6 周,甚至 8 周或更长时间。

3.2 半月板体外器官培养污染的控制 有学者认为器官培养主要的问题是细菌污染^[7]。与细胞培养一样,37℃近似生理条件下的培养环境同样有利于细菌的生长繁殖。本实验在早期预实验时发生了污染,都发生在培养的前 24 h,为了控制污染,做了很多努力。标本处理过程的严格无菌操作至关重要,本实验中屠宰现场猪处死后立即切取双侧膝关节,立即用双氧水、生理盐水冲洗,络合碘消毒,无菌巾包裹后冰块冰敷保存,立即转移至实验室,标本制作严格按照外科无菌原则进行,从猪处死至开始培养控制在 4 h 内。本实验培养液中加入了青霉素、链霉素以及两性霉素 B 防止细菌和真菌污染,配制培养液以及更换培养液和培养板在超净操作台内进行,参考 Kobayashi 等^[4]的报道,加入青霉素及链霉素的浓

度为 10 000 U/ml,而细胞培养青霉素及链霉素的浓度为 100 U/ml。开始培养的 24 h 是污染的高发时期,因此本实验在培养 24 h 后换液 1 次,此后 3 d 换培养液 1 次,7 d 换培养板 1 次。

3.3 半月板体外器官培养组织变化的特点 体外器官培养不能完全模拟体内环境,营养物质简单扩散的速率除了与某物质在培养液中的浓度有关以外,更与被培养组织器官的大小相关。培养的器官越大、越厚,物质的渗透扩散越困难,越易发生培养器官中心缺氧性坏死,本实验切取半月板宽约 8 mm,培养 6 周末出现中心性坏死。本实验 3 d 更换培养液 1 次,新鲜培养液呈淡红色,营养物质浓度高,容易渗透入半月板内部,随着培养时间延长,营养物质逐渐消耗,颜色变淡,半月板组织必然出现营养匮乏,直至下一次换液又重新获得丰富营养。因此,体外器官培养下,半月板纤维软骨细胞不可避免地会出现活性降低。本实验观察到随着培养时间的延长,幼年半月板的细胞密度均逐渐降低,各组在不同时间点比较细胞密度均有显著差异。但培养 6 周时仍有软骨细胞存在。蛋白多糖是由纤维软骨细胞合成和分泌的,它是半月板细胞基质中的主要功能成分之一,软骨细胞活性越强,分泌的蛋白多糖越多;反之,软骨细胞活性越弱,分泌的蛋白多糖越少,因此,半月板基质蛋白多糖的含量变化可以反映细胞的新陈代谢活动水平^[8-9]。番红 O 染料能特异性地与蛋白多糖结合,其染色的深浅可以反映蛋白多糖含量的多少,本实验观察到随着培养时间的延长,番红 O 染色都逐渐变淡,各组在不同时间点差异均有统计学意义,这表明随着培养时间的延长,蛋白多糖的含量逐渐减少,细胞活性在逐渐降低。本实验同时观察到,培养的开始阶段培养液颜色褪变速度快,随着培养继续,培养液颜色褪变速度逐渐减慢,这也反应关节软骨细胞活性随着培养时间延长逐渐减低。

本实验成功建立了幼年半月板体外器官培养模型,同时观察到随着培养时间延长,半月板软骨细胞数量逐渐减少,细胞活性逐渐降低。因此,在体外器官培养条件下适合进行半月板的短期研究。本实验为进一步在体外器官培养下进行半月板的研究提供了实验依据,也为进一步在体外器官培养模型中研究幼年半月板的内在愈合能力提供了实验基础。

参考文献

- [1] 戴祝,陈疾忤,陈世益,等.半月板成形和缝合治疗累及胭肌腱裂孔的盘状软骨损伤[J].中国修复重建外科杂志,2011,25(1):13-16.
Dai Z, Chen JW, Chen SY, et al. Meniscal plasty and suture repair for torn lateral discoid involving popliteal hiatus area[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2011, 25(1): 13-16. Chinese.

[2] 黄长征,范伟杰,陈志伟,等. 成形联合修补术在盘状半月板损伤治疗中的应用[J]. 中国骨伤, 2010, 23(6): 409-412.
Huang CZ, Fan WJ, Chen ZW, et al. Application of menisci reformation and repair in the treatment of the discoid meniscus injuries [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23 (6): 409-412. Chinese with abstract in English.

[3] Baker BM, Gee AO, Sheth NP, et al. Meniscus tissue engineering on the nanoscale; from basic principles to clinical application[J]. J Knee Surg, 2009, 22(1): 45-59.

[4] Kobayashi K, Fujimoto E, Deie M, et al. Regional differences in the healing potential of the meniscus-an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium[J]. Knee, 2004, 11(4): 271-278.

[5] Ishida K, Kuroda R, Miwa M, et al. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel[J]. Tissue Eng, 2007, 13 (5): 1103-1112.

[6] 于涛,蒋华. 器官培养角膜保存的现状 & 展望[J]. 国际眼科杂志, 2008, 8(9): 1882-1884.
Yu T, Jiang H. Present situation and prospect of corneal organ culture preservation[J]. Guo Ji Yan Ke Za Zhi, 2008, 8(9): 1882-1884. Chinese.

[7] Wilusz RE, Weinberg JB, Guilak F, et al. Inhibition of integrative repair of the meniscus following acute exposure to interleukin-1 in vitro[J]. J Orthop Res, 2008, 26(4): 504-512.

[8] Hagenah M, Böhnke M, Engelmann K, et al. Incidence of bacterial and fungal contamination of donor corneas preserved by organ culture[J]. Cornea, 1995, 14(4): 423-426.

[9] Melrose J, Fuller ES, Roughley PJ, et al. Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R79.

(收稿日期: 2012-03-16 本文编辑: 连智华)

• 病例报告 •

伴椎动脉沟环 Jefferson 骨折 1 例

袁波, 梁国钧, 潘山

(新昌县人民医院脊柱外科, 浙江 绍兴 312500)

关键词 Jefferson 骨折; 寰椎; 骨折固定术, 内

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.11.015

Jefferson fracture with foramen arch of vertebral artery of atlas; a case report YUAN Bo, LIANG Guo-jun, PAN Shan.

Department of Spine, People's Hospital of Xinchang County, Shaoxing 312500, Zhejiang, China

KEYWORDS Jefferson fracture; Atlas; Fracture fixation, internal

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(11): 940-941 www.zggszz.com

2012 年 2 月 26 日我院收治 1 例 Jefferson 骨折患者, 男, 42 岁, 主因车祸致颈部疼痛、活动障碍 0.5 h 入院。入院查体: 神志清晰, 头颈部无明显肿胀, 头颈交界部压痛, 压头试验阳性, 颈部旋转活动障碍, 左肩背部稍肿胀、压痛, 未及明显骨擦音及骨擦感, 活动障碍, 左肘内侧肿胀、压痛, 左前臂、左手掌多处皮肤擦伤。颈椎 CT 示寰椎粉碎性骨折(见图 1a-1c)。入院诊断: ① Jefferson 骨折; ② 多处软组织挫擦伤。入院后急诊予颈围固定, 完善检查, 如摄颈椎正侧位 X 线片, 行颈椎 MRI、上颈椎 CT 加冠状位矢状位重建检查等, 予补液、消肿等对症处理。病情稳定后, 于 2012 年 3 月 3 日在全麻下行 C₁ 骨折左侧侧块螺钉、右侧椎弓根螺钉内固定术。手术采用全麻, 垫石膏床俯卧位, 切口自枕骨粗隆纵向下切开 10 cm, 暴露枕骨粗隆、C₁ 后弓、C_{2,3} 关节突关节。因寰枢后弓左侧椎弓根置钉处骨折, 采用自左后弓下缘做左侧块螺钉固定; 因椎动脉沟环存在, 做寰椎右侧椎弓根螺钉自沟环下缘与右后弓下缘狭窄骨性通道置入。以横连固定两侧螺钉, C 形臂 X 线透视及

横截面 CT 示内固定位置满意(图 1d-1f)。术后予以头颈胸支具外固定, 切口放引流管 1 根, 抗生素预防感染, 2 d 后戴颈托下床行走, 术后 1 周指导肩部功能锻炼。

讨论

寰椎骨折占寰椎损伤的 25% 左右、颈椎骨折的 10% 左右、整个脊柱创伤的 2% 左右^[1]。Jefferson 骨折为临床上较为少见的一种骨折, 分为两型: I 型为稳定型, II 型为不稳定型。两者再根据骨折具体部位及数量进一步将稳定型 (I 型) 分为: I a, 单纯前(后) 1/4 骨折; I b, 单纯后 1/2 骨折。将不稳定型 (II 型) 分为: II a, 单纯前 1/2 骨折; II b, 单纯半环骨折(单侧前后弓骨折); II c, 单纯前(后) 3/4 骨折; II d, 前后弓双骨折(典型 Jefferson 骨折); II e, 上述各型骨折合并寰椎横韧带断裂^[2]。本例 Jefferson 骨折为不稳定骨折, 属 II d 型, 具有内固定手术指征。

其受伤机制为: 由于寰椎特殊的解剖结构, 从侧块伸出的前后椎弓在伸出部位为寰椎最薄弱部, 当车祸暴力和反作用力聚积作用于寰椎时, 因寰椎上下关节面的内向性、暴力和反作用力的合力使寰椎侧块受到离心性暴力, 从而在最薄弱处

通讯作者: 袁波 E-mail: 627582584@qq.com