

· 基础研究 ·

关节面不平整程度对骨软骨愈合的影响

孙骏¹, 侯筱魁², 匡勇¹, 卫晓恩¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院骨科, 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: 探讨关节面不同程度的不平整是否会对骨软骨的修复产生影响。方法: 选取雄性 6 月龄 25 kg 崇明山羊 8 只, 对山羊股骨内髁负重区制造骨软骨缺损, 并通过骨软骨移植修复, 形成 0.5、1.0、2.0 mm 关节软骨凸出和凹陷。术后 12 周处死动物, 进行大体观察、组织学 HE 染色以及透射电镜检查。参照 O' Driscoll, Keeley and Salter 组织形态学评分标准进行评分。结果: 0.5 mm 和 1.0 mm 的凸出性和凹陷性软骨台阶的大体观察及组织学染色显示关节面恢复平整, 透射电镜示修复组织与正常软骨一致。2.0 mm 的台阶不能使关节面的平整获得修复, 透射电镜示纤维束增生, 软骨细胞变性。2.0 mm 台阶的组织学评分低于 0.5 mm 和 1.0 mm 台阶, 差异均有统计学意义。结论: 关节面的不平整对修复会有影响, 在一定范围内的台阶样不平整可以自身修复。

【关键词】 软骨, 关节; 修复外科手术; 骨移植; 组织学

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.06.020

Influence of the unevenness of articular surface on the osteochondral repair SUN Jun*, HOU Xiao-kui, KUANG Yong, WEI Xiao-en. *Department of Orthopaedics, Shuguang Hospital, Shanghai Traditional Chinese Medical University, Shanghai 200021, China

ABSTRACT Objective: To investigate whether the unevenness of articular surface would affect the osteochondral repair. **Methods:** Eight Shanghai Chongming 6-months-old masculine goats with a mean weight of 25 kg were used in this study. Different unevenness, which were 0.5 mm, 1.0 mm, 2.0 mm protrude or concavity, were created on the weight-bearing portion of the medial femoral condyles of the goats. The goats were sacrificed 12 weeks later and were observed with the general observation, HE staining and transmission electron microscope. To evaluate the microscopic morphology, a histological grading scale described by O' Driscoll, Keeley and Salter was used. **Results:** The general observation and HE staining showed that the unevenness of 0.5 mm or 1.0 mm protrudes or concavity could be repaired to get the surface smooth on the whole. The transmission electron microscope showed that the reparative tissues were the same as the normal cartilage. The 2.0 mm depth couldn't be repaired satisfactorily. The transmission electron microscope showed that the fiber bundle proliferated and the chondrocytes degenerated. The scores of the 2.0 mm depth were significantly lower than that of the 0.5 mm or 1.0 mm ($P < 0.05$). **Conclusion:** The unevenness could have an influence on the repair. The limited unevenness could be repaired by itself.

KEYWORDS Cartilage, articular; Reconstructive surgical procedures; Bone transplantation; Histology

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(6): 505-508 www.zggszz.com

临床上因为急性创伤而引起的关节面不平整十分常见, 需要手术恢复关节面的平整还是进行早期康复锻炼, 目前还没有定论。为此, 我们通过动物实验以寻求一个尺度, 人为制造了不同程度的凸出性和凹陷性不平整, 探讨机体对关节面不同程度不平整的自身修复情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 雄性 6 月龄 25 kg 崇明山羊 8 只。通过造模及修复, 分为右侧膝关节股骨内髁负重区的 0.5、1.0、2.0 mm 凸出组, 及左侧膝关节股骨内髁负重区的 0.5、1.0、2.0 mm 凹陷组。

1.2 造模及修复方法 氯胺酮 10 mg/kg 麻醉, 右

膝髌内侧切口, 显露股骨内髁负重区。选用空心圆锯制成直径 5 mm 及深度 3 mm 的缺损。用直径 2 mm 的骨钻在缺损区内钻 3 个深度为 2 mm 的骨孔, 孔底距离关节面 5 mm。使用内径 2 mm 空心圆锯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分别为 6、6.5、7.5 mm 的 3 块骨软骨柱, 使用移植柱推进器将 3 块骨软骨移植柱徐徐推入骨孔, 轻度加压使骨质压缩 0.5 mm, 最终使得 3 块骨软骨柱分别凸出周围正常软骨 0.5、1.0、2.0 mm (图 1a)。同样的方法在左股骨内髁使用内径 2 mm 空心圆锯获取长度分别为 5、4.5、3.5 mm 的 3 块骨软骨柱, 移植修复直径 5 mm 及深度 3 mm 的缺损, 使 3 块骨软骨柱分别凹陷周围正常软骨 0.5、1.0、2.0 mm (图 1b)。植入完成后, 活动膝关节, 确保移植物的稳定。术后

给予右膝固定,禁止负重 6 周,避免因负重而挤压凸出的骨软骨柱。6 周后软骨下骨愈合,去除固定,恢复右膝的负重和活动。左膝术后不限活动。

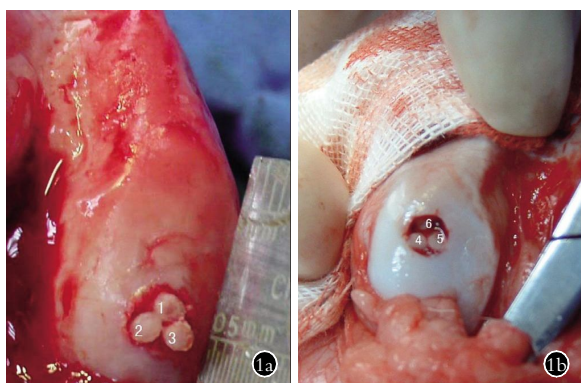


图 1 造模方法 1a. 骨软骨柱分别凸出周围正常软骨 0.5 mm(1)、1.0 mm(2)和 2.0 mm(3) 1b. 骨软骨柱分别凹陷周围正常软骨 0.5 mm(4)、1.0 mm(5)和 2.0 mm(6)

Fig.1 Modeling method 1a. Osteochondral grafts protruded with 0.5 mm (1), 1.0 mm (2) and 2.0 mm (3) 1b. Osteochondral grafts depressed 0.5 mm (4), 1.0 mm (5) and 2.0 mm (6)

1.3 观测指标 术后 12 周处死动物,进行各组的大体观察,组织学 HE 染色以及透射电镜检查。参照 O’Driscoll, Keeley and Salter^[1]组织形态学评分标准进行评分。

1.4 统计处理方法 采用 SAS 统计软件包对评分进行分析,数据以均数±标准差表示,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 大体观察结果 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有灰白色组织覆盖,与周围组织边界模糊。

右膝软骨柱台阶样凸出趋向平缓,其中原 2.0 mm 凸出软骨已经消失,代替为暗红色的组织,表面粗糙,与周围组织边界清楚;原 1.0 mm 凸出软骨呈灰色,色泽暗,表面不甚光滑;原 0.5 mm 凸出软骨已经与周围软骨处于同一平面,呈暗白色,质地软。移植骨软骨柱间的空隙内有组织增生填充,但可见有裂隙存在(图 2a)。左膝的凹陷也趋于平坦,原 2.0 mm 凹陷软骨仍处于凹陷状,软骨面上有黄色增生的组织覆盖,与周围组织边界清楚;原 1.0 mm 和 0.5 mm 凹陷软骨已经达到了关节面的相对平整,软骨乳白色,有弹性,表面基本光滑。移植骨软骨柱间的空隙内亦有组织增生填充及裂隙的存在(图 2b)。

2.2 组织学检查

2.2.1 组织学染色结果 骨软骨供区的组织学检查显示有圆形的细胞增生,散在分布,排列紊乱,表面基本光滑。

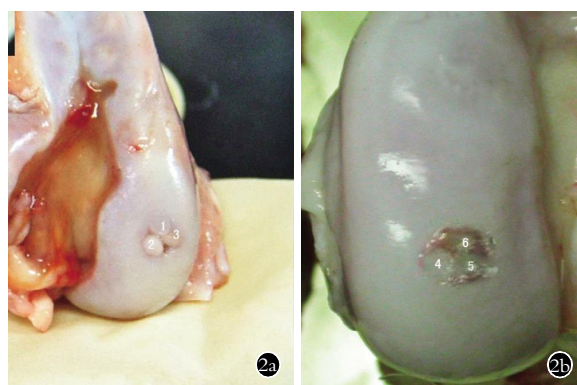


图 2 大体观察结果 2a. 2.0 mm 凸出软骨消失,被暗红色的组织替代(3);1.0 mm 凸出软骨呈灰色(2);0.5 mm 凸出软骨与周围软骨处于同一平面,可见有裂隙存在(1) 2b. 2.0 mm 凹陷软骨仍处于凹陷状,表面被黄色增生的组织覆盖(6);1.0 mm 和 0.5 mm 凹陷软骨达到了关节面的相对平整,空隙内有组织增生填充,可见裂隙存在(4-5)

Fig.2 General observation 2a. The 2.0 mm protruded cartilage disappeared and was replaced with the dark red tissue (3);the color of the 1.0 mm protruded cartilage was gray (2);the 0.5 mm protruded cartilage was in the same level with the surrounding cartilage. The gap existed(1) 2b. The 2.0 mm depressed cartilage was still in the concavity, and the surface was covered with the yellow hyperplastic tissue (6);the 1.0 mm and 0.5 mm depressed cartilages reached the relative smooth, and the gap was filled with the hyperplastic tissue. The gap still existed(4-5)

HE 染色见 2.0 mm 凸出移植骨软骨反而呈现凹陷状,软骨层消失,表面有不平整的纤维组织增生,软骨下骨硬化,出现囊腔,相邻软骨退变,软骨细胞减少,簇状聚集,基质浅染(图 3a);1.0 mm 凸出软骨的细胞有少量减少,并可见部分细胞的簇状聚集,软骨表面不光滑,基质有异染着色,相邻的相对凹陷的软骨出现了增生增厚,使关节面的平整有所恢复(图 3b);0.5 mm 凸出部分的软骨表面略见不平整,交界区少量软骨细胞簇状聚集,细胞数量略有减少,软骨下骨整合良好,基质异染着色基本正常。移植骨软骨柱间的空隙见有纤维组织或纤维软骨样组织填充,并有裂隙(图 3c)。

HE 染色见 2.0 mm 凹陷软骨仍呈现凹陷状,细胞数量有所减少,表层软骨基质淡染,软骨表面增生不平整,有纤维组织覆盖,临近的正常软骨细胞簇状排列(图 4a);1.0 mm 凹陷软骨有增生增厚,基本恢复了关节面的平整,交界区有裂隙和少许的凹陷,细胞形态排列基本正常,有部分细胞簇状聚集,基质异染着色正常(图 4b);0.5 mm 凹陷软骨增生增厚,恢复了关节面的平整,细胞数量略增多,排列基本正常,有少量细胞簇状聚集,基质异染着色基本正常。交界区有裂隙存在,并有纤维组织或纤维软骨样组织填充(图 4c)。

2.2.2 组织形态学评分结果 参照 O’Driscoll, Keeley and Salter 组织形态学评分标准进行评分:

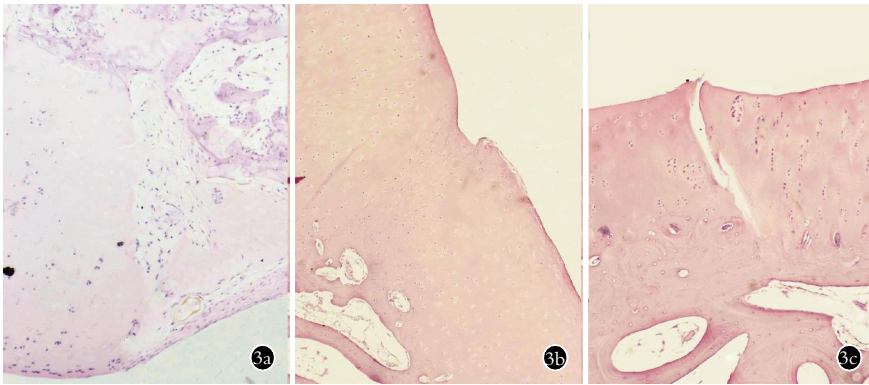


图 3 凸出软骨 HE 染色结果 **3a**. 2.0 mm 凸出的软骨层消失, 表面有不平整的纤维组织增生 (HE 100×) **3b, 3c**. 1.0 mm 及 0.5 mm 凸出软骨的细胞有少量减少, 部分软骨细胞簇状聚集, 软骨表面不光滑 (HE 100×)

Fig. 3 Results of HE staining of the protruded cartilage **3a**. The 2.0 mm protruded cartilage showed the cartilage layer disappeared. On the surface the irregular fibroplastic proliferation could be seen (HE 100×) **3b, 3c**. The cell number of the 1.0 mm and 0.5 mm protruded cartilage decreased a little. Parts of chondrocytes clustered. The surface of the cartilage was unsmooth (HE 100×)

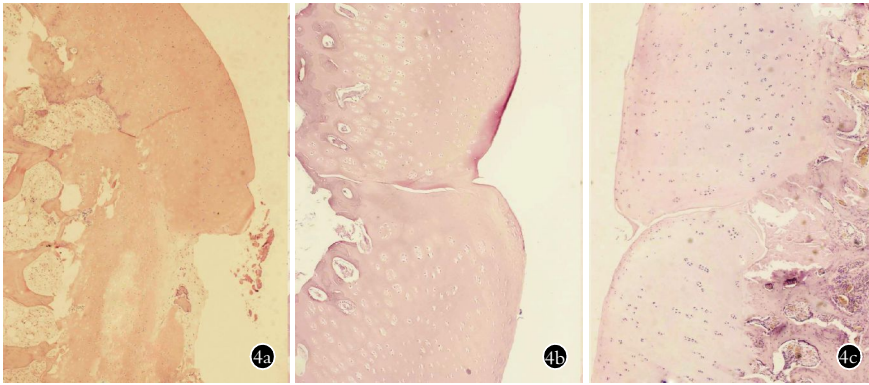


图 4 凹陷软骨 HE 染色结果 **4a**. 2.0 mm 凹陷软骨细胞数量有所减少, 软骨表面增生不平整, 并有纤维组织覆盖 (HE 40×) **4b, 4c**. 1.0 mm 及 0.5 mm 凹陷软骨增生增厚, 交界区有裂隙和少许凹陷, 细胞形态排列基本正常, 部分细胞簇状聚集 (HE 100×)

Fig. 4 Results of HE staining of depressed cartilage **4a**. The 2.0 mm depressed cartilage showed the cell number decreased. The irregular proliferation covered with fibrous tissue could be seen on the surface (HE 40×) **4b, 4c**. The 1.0 mm and 0.5 mm depressed cartilage got thick. Gap and a little concavity could be seen in the junctional zone. The morphological character and the order of the cells were normal on the whole. Parts of chondrocytes clustered (HE 100×)

2.0、1.0、0.5 mm 凸出分别为 (8.375 ± 1.408) 、 (21.875 ± 1.126) 及 (22.375 ± 1.061) 分; 2.0、1.0、0.5 mm 凹陷分别为 (11.875 ± 1.553) 、 (22.000 ± 1.195) 及 (22.625 ± 1.188) 分。统计分析显示, 2.0 mm 凸出和凹陷评分低于 0.5、1.0 mm 凸出和凹陷, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 0.5、1.0 mm 凸出和凹陷之间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 透射电镜检查 1.0、0.5 mm 凸出软骨和 1.0、0.5 mm 凹陷软骨的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与正常软骨一致, 胶原纤维细密, 成网状排列, 无明显周期性横纹。2.0 mm 凸出的软骨已经消失, 镜下示有大量平行或交错排列的纤维束, 纤维束排列整齐、紧密, 细胞小, 呈梭形, 分布于纤维束之间 (图 5a)。2.0 mm 凹陷软骨的

软骨细胞小, 细胞核大, 胞内线粒体、粗面内质网扩张, 胶原纤维粗大, 成束状平行排列; 并可见部分软骨细胞的核膜不清, 核质碎裂, 胞浆肿胀, 细胞器结构消失, 呈变性、死亡改变 (图 5b)。

3 讨论

对于关节面不平整的机体自身修复主要有两种形式: 一为凹陷侧的关节软骨增生肥厚; 二为来自骨髓腔的细胞增生分化。

由于关节软骨缺乏血液供应, 软骨对不平整的修复不同于经典的有血液系统调控的组织损伤修复过程^[2]。一般认为关节软骨细胞为终末分化细胞, 细胞新陈代谢及增殖能力差。但是有研究者发现软骨的修复过程中还是存在基质流动现象, 即产生细小的胶原纤维覆盖软骨的交界区^[3]。虽然正常成熟的软骨细胞缺乏增殖能力, 但是一旦处于适当环境仍可发生所谓的“反分化”, 分泌表达 II 型胶原和蛋白多糖^[4]。此外, 关节软骨的增殖层细胞也被认为是有增殖能力的。在损伤区近软骨边缘处, 均出现软骨细胞反应性增生的现象。但是损伤区临近的软骨细胞的分裂增殖活动是非常低缓的。

在累及到软骨下骨板的全层厚度关节软骨损伤, 往往涉及到软骨下骨质的缺损, 缺损很快被血液所充满, 血肿迅速形成富有纤维蛋白的凝块, 内含有血细胞和骨髓成分。来自骨髓的基质干细胞转变为原始的纤维母细胞, 随后出现众多的血管芽, 肉芽组织从各个方向侵入缺损区。新生骨小梁将骨性缺损修复, 然后修复组织移行至软骨缺损边缘并与其粘连, 最终与其牢固连接将缺损填补。以后增殖的血管逐渐减少, 细胞成分增多, 表面变得平整, 呈现为纤维软骨, 并可能随时间延长, 转变为类软骨组织^[5]。

由于制造的缺损深度为 3 mm, 已涉及软骨下骨并导致出血以及骨髓腔内的骨髓基质干细胞的释放, 因此在本实验中对于不平整的修复, 特别是凹陷

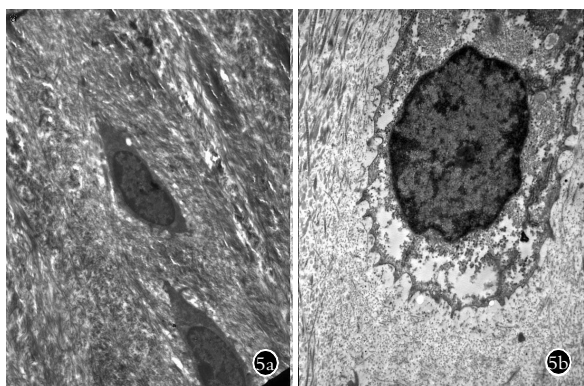


图 5 透射电镜检查结果 **5a.** 2.0 mm 凸出的软骨已经消失, 镜下见大量平行或交错排列的纤维束, 纤维束排列整齐、紧密, 细胞小, 呈梭形, 分布于纤维束之间(TEM 4 200×) **5b.** 2.0 mm 凹陷软骨的软骨细胞内见有多处的胞浆溶解现象, 提示细胞呈变性、死亡改变(TEM 9 700×)

Fig.5 Results of transmission electron microscope examination **5a.** The 2.0 mm protruded cartilage disappeared. A lot of parallel or interlaced fiber bundles could be seen. The fiber bundles arrayed orderly and tightly. The cell which distributed in the fiber bundles was small and in a spindle shape (TEM 4 200×) **5b.** The plasmolysis could be seen in the 2.0 mm depressed cartilage which suggested the degeneration and death of the cells(TEM 9 700×)

性不平整的修复, 来自骨髓腔的基质干细胞增生分化起了重要的作用。本实验中山羊股骨髁软骨厚度为 1.0 mm。笔者发现 0.5、1.0 mm 的软骨台阶, 即 0.5、1 倍软骨厚度的不平整, 由于其不平整程度轻, 无论是凸出性还是凹陷性均获得了较为满意的自身修复, 并且在关节的运动过程中关节面自行塑形恢复基本平整。虽然软骨有一定程度的退变, 但 12 周后仍维持了透明软骨的特性。而笔者发现 2.0 mm, 即 2 倍软骨厚度的台阶不能获得自身满意修复。

关节面的台阶样不平整, 首先使凸出部分的软骨受到了非生理性压力, 造成了软骨基质胶原框架的破坏。研究发现胶原、蛋白多糖等基质与软骨细胞的关系密切^[6]。软骨细胞受到力学、生长因子等不同刺激后分泌基质, 但也可以产生降解酶分解基质。一旦基质受到破坏, 就失去对软骨细胞的营养和保护, 会导致软骨细胞死亡。因此, 关节软骨的存活和其特有的功能有赖于软骨细胞和基质结构的完整性, 关节软骨的任何破坏都可以引起软骨细胞和基质的解

剖、功能破坏。关节面的台阶样不平整, 影响了软骨细胞和细胞外基质正常的共生关系, 势必使软骨发生退变。2.0 mm 凸出台阶由于难以通过代偿进行自身修复, 承载高负荷, 表面磨损, 引起移植物的不稳定, 并损伤相对应的关节面, 出现明显的退行性骨关节炎表现: 软骨面上的软骨被擦去, 软骨下骨暴露, 产生硬化, 髓腔内有囊肿形成。在 2.0 mm 的凹陷性不平整中, 笔者发现了软骨表面有纤维组织的覆盖, 电镜观察发现有软骨细胞的坏死凋亡, 其原因可能为凹陷的软骨被包埋在增生的修复组织中, 长期缺乏应力的刺激, 而一般认为适当的应力刺激提供软骨营养, 是维持其生理功能所必须的, 无应力的刺激将导致软骨的退变, 并直至软骨细胞的凋亡。

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, 故此对急性膝关节损伤的治疗具有一定的指导意义。笔者认为如果软骨损伤的不平整程度在一个软骨厚度的范围内, 可以不必进行复位, 需要进行早期功能康复锻炼, 在关节的运动过程中自行塑形恢复关节面基本平整。

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(A): 595-606.
- [2] Safran MR, Seiber K. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2010, 18(5): 259-266.
- [3] Ghadially FN, Ailsby RL, Oryschak AF. Scanning electron microscopy of superficial defects in articular cartilage[J]. Ann Rheum Dis, 1974, 33(4): 327-332.
- [4] Harris JD, Brophy RH, Siston RA, et al. Treatment of chondral defects in the athlete's knee[J]. Arthroscopy, 2010, 26(6): 841-852.
- [5] Getgood A, Brooks R, Fortier L, et al. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice [J]. J Bone Joint Surg Br, 2009, 91(5): 565-576.
- [6] Aigner T, Stöve J. Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(12): 1569-1593.

(收稿日期: 2010-12-28 本文编辑: 连智华)

更正启事

由于印刷厂工作失误, 我刊 2011 年第 5 期封 2“盘龙七片”广告的广审文号误排为“陕药广审(文)第 2010030127 号”应据 2011 年第 4 期封 2 改为“陕药广审(文)第 2011030121 号”, 特此更正。

《中国骨伤》杂志社