短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)12-1366-03

# 折叠式骨膜-骨复合组织游离移植修复关节软骨缺损的实验研究

谢 昀,叶君健,陈春永,林章雄,林 曦 (350004 福州,福建医科大学附属第一医院创伤骨科)

**[摘要]** **目的** 观察游离折叠式骨-骨膜复合组织移植修复全层软骨缺损的效果及再生软骨的特性。**方法** 新西兰大白兔实验动物48只,建立全层软骨缺损模型,设计折叠骨-骨膜复合组织游离移植为实验组,单纯骨膜游离移植为对照组,未作任何修复处理为空白组,每组16只。术后2、4、8、12周进行大体标本观察、HE染色、甲苯胺蓝染色组织学观察、免疫组化观察、扫描电镜观测和关节软骨组织学半定量分析。**结果** 术后实验组修复组织为透明软骨,且与周围正常软骨融合良好,甲苯胺蓝染色深;细胞质和细胞外基质中Ⅱ型胶原的表达呈强阳性;电镜显示包埋在软骨细胞囊中的软骨细胞排列整齐,胶原纤维呈多孔结构,孔隙均匀;软骨组织学半定量评分实验组各时间点明显优于对照组和空白组($P<0.05$)。**结论** 折叠式骨-骨膜复合组织游离移植是对以往单纯游离骨膜移植的改进,为修复全层软骨缺损的提供更有效的方法。

**[关键词]** 关节;软骨;骨膜;移植

**[中图法分类号]** R681.305; R687.34 **[文献标志码]** A

游离骨膜移植被认为是目前修复关节软骨缺损的重要方法之一,有关其基础理论和临床应用亦得到广泛和深入的研究[1-3]。但近几年的临床远期随访疗效却不尽如人意[4]。其主要原因为成年骨膜单位面积生发层细胞数量少,新生软骨组织较薄;且与受区基底愈合过程为纤维结缔组织连接,易剥脱,故导致新生的软骨组织退变,为此项技术的瓶颈所在。我们设计折叠式骨膜-骨复合组织游离移植用于修复软骨缺损,探讨该种设计能否克服以上不足。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及分组

选取6~8月龄新西兰大白兔48只,雌雄不拘。体质量2.2~2.5 kg(福建医科大学实验动物中心提供)。随机数字表法分为实验组(折叠式骨-骨膜复合组织块移植)、对照组(单纯骨膜移植组)和空白组(未做任何干预),每组16只。

### 1.2 术前准备和麻醉

取一雌兔用脱毛剂(硫化钠、肥皂粉、淀粉按需3∶1∶7加水调成糊状)将下肢脱毛,观察1 d后局部无明显炎症反应及皮疹。3%的戊巴比妥钠30 mg/kg耳缘静脉麻醉成功后,将仰卧位固定于手术台,常规消毒铺巾。

### 1.3 手术方法

取膝内侧弧形切口,逐层切开皮肤、皮下组织,沿髌骨内缘纵行切开深筋膜,向下延伸至胫骨结节水平下3 cm。将髌骨向外侧脱位,显露髌股关节之股骨滑车关节面。于屈膝60°位之与髌骨相对处,用骨凿作一5.0 mm×5.0 mm×3.0 mm的立方体骨软骨组织缺损区。于同侧胫骨近端前内侧取相同面积的骨-骨膜复合组织块,骨膜一边的长度为骨块长度的2倍,沿远端骨块边缘将骨膜翻转折叠缝合,构成有2层厚度的骨膜的复合组织块,将此组织块移植于股骨软骨缺损区,并紧密嵌压,使骨块略低1 mm。对照组只行单纯骨膜游离移植。空白组未做任何干预。

### 1.4 观测指标

分别在术后2、4、8、12周不同时期每组处死4只动物:①观察关节活动度、移植骨膜是否有脱落、关节软骨缺损区充填组织性状及与正常关节软骨结合的情况。②光镜观察,标本组织切片HE染色和甲苯胺蓝染色,做组织学观察。③S-P免疫组化观察(S-P试剂盒:北京中山生物技术公司;鼠抗兔Ⅱ型胶原单克隆抗体:Oncogene公司,德国)。④电镜扫描观察。⑤按O'Driscoll法的评分标准对各组软骨修复区的组织学行半定量评分[5]。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件分析,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,按完全随机设计进行方差分析。

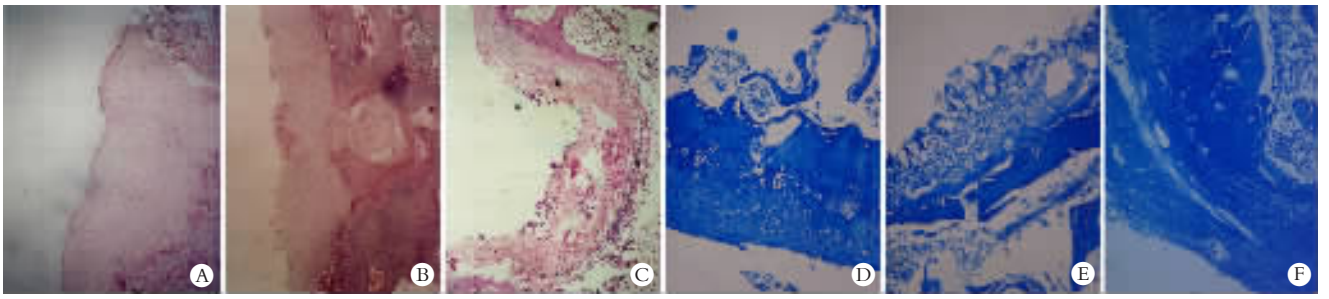
## 2 结果

### 2.1 大体标本观察

实验组:术后4周缺损区修复组织明显隆起,为黄色骨膜样组织,与关节面界限清晰;术后8周移植修复组织与周围正常软骨连接紧密,呈淡白色软骨样组织,高出正常关节面;术后12周,修复组织与周围正常关节面融合良好,色泽接近正常软骨,与正常关节软骨的界限不清。对照组:术后4周缺损区可见薄层黄色骨膜样组织修复,与关节面界限清晰;术后8周缺损

**[基金项目]** 福建省卫生厅青年科研资金资助(2006-1-24)

**[通信作者]** 叶君健:电话:(0591)87982568,E-mail:yejunjian@medmail.com.cn




A～C:HE 染色观察(×200);D～F:甲苯胺蓝染色观察(×200);A、D:实验组;B、E:对照组;C、F:空白组

**图 1　术后 12 周各组软骨组织缺损的修复情况**

区稍凹陷,淡白色软骨样组织充填,与边缘正常软骨面界限明显;术后 12 周缺损区修复组织较平整,色泽与正常软骨较接近,尚可见界限。空白组:术后 4 周缺损区明显凹陷,可见散在肉芽样组织覆盖。第 8、12 周缺损区见凹凸不平纤维样组织覆盖。

## 2.2　组织学观察

实验组:术后 4 周,修复组织内可见大量纤维样细胞成分,少量软骨陷窝散在分布,与周围正常软骨组织呈明显阶梯状。术后 8 周,修复组织内细胞密度明显降低,软骨陷窝已较均匀分布,与周围正常软骨组织部分融合。术后 12 周,修复组织内可见大量软骨细胞,已形成软骨膜,软骨陷窝清晰,呈柱状排列,方向与关节面垂直,与周围正常软骨组织融合良好。甲苯胺蓝染色深,与周围软骨无明显差别。对照组:术后 4 周时,修复组织内可见大量纤维样细胞成分,软骨陷窝散在分布,与周围正常软骨组织界限清晰。第 8 周时,修复组织内细胞密度降低,可见较多软骨陷窝,分布稍散乱,与周围正常软骨组织部分融合。第 12 周时,修复组织内可见大量软骨细胞,软骨陷窝清晰,细胞密集,部分呈放射状排列,与周围正常软骨组织融合明显。甲苯胺蓝着色较浅。空白组:术后 4 周,缺损区明显凹陷,仅见薄层纤维样组织修复。术后 8、12 周,缺损区大部分仍为瘢痕纤维组织填充,边缘可见少量软骨细胞团。甲苯胺蓝染色不明显。具体见图 1。

## 2.3　关节软骨组织学半定量评分

3 组在各时间点两两比较的软骨组织学半定量评分差异均有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

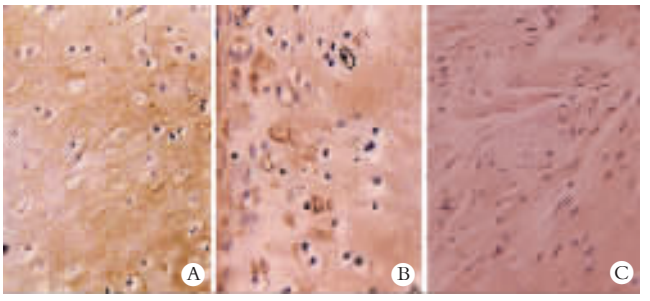
**表 1　各组不同时间点修复软骨的组织学半定量评分($n=8$,$\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 4 周 | 8 周 | 12 周 |
|---|---|---|---|
| 实验组 | 4.780±0.895 | 1.570±0.686 | 0.510±0.203 |
| 对照组 | 9.130±1.464[ab] | 7.245±1.113[ab] | 6.067±1.258[ab] |
| 空白组 | 10.954±1.187[a] | 9.132±1.490[a] | 7.324±0.792[a] |

a:$P<0.05$,与实验组比较;b:$P<0.05$,与空白组比较

## 2.4　免疫组化染色观察

术后 12 周,实验组修复组织中细胞质和细胞外基质中Ⅱ型胶原的表达呈强阳性,出现棕黄色颗粒(图 2A),对照组Ⅱ型胶原的表达呈阳性(图 2B),空白组无Ⅱ型胶原表达(图 2C)。

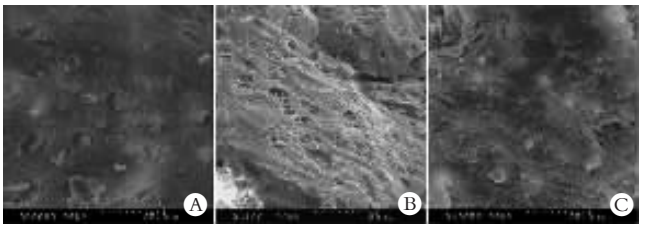



A:实验组;B:对照组;C:空白组

**图 2　免疫组化染色观察术后 12 周各组修复组织中Ⅱ型胶原表达情况**　(S-P ×400)

## 2.5　扫描电镜观察

术后 12 周,实验组:修复组织中可见包埋在软骨细胞囊中的软骨细胞,排列较为整齐,大小均匀,直径约 10 μm,同时可见排列整齐、致密的胶原纤维,呈多孔结构,孔隙均匀(图 3A)。对照组:修复组织中可见包埋在软骨细胞囊中的软骨细胞,排列不规整,大小不均,胶原纤维排列不整齐,孔隙不均(图 3B)。空白组:修复组织中可见少数纤维细胞,胶原纤维排列紊乱(图 3C)。




A:实验组;B:对照组;C:空白组

**图 3　术后 12 周扫描电镜观察各组修复组织的超微结构**

# 3　讨论

## 3.1　折叠式骨-骨膜复合组织移植的固定

骨膜的牢靠固定被认为是影响诱导再生软骨的因素之一。Brittberg 等[6]的研究均证实,术后正常的关节活动,特别是持续被动活动,可促进关节液循环,利于消肿,防止黏连和关节软骨退变,尤其有利于骨膜再

生形成质量好的软骨。游离骨膜移植固定较困难,缝合牵拉程度过大会使单位面积上的骨膜细胞数减少,且在缝线的高张力下会引起骨膜的撕脱和移位;反之,骨膜皱折引起修复组织的不完整。且术后过早活动,移植物有脱落的危险,我们对照组中有两侧移植物术后脱落,与O'Driscoll[5]的实验报道类似。骨-骨膜复合组织移植,使骨膜可平滑均匀覆盖缺损区,且通过骨块与缺损区的嵌压可牢靠固定移植物,可轻易避免单纯游离骨膜移植早期活动而致移植物脱落的风险。本实验组术后无1例发生移植物脱落。

3.2 折叠式骨-骨膜复合组织转化为关节软骨的机制

供体的骨膜下骨组织与受区的软骨下骨组织依靠经典的爬行替代机制完成,而通过哈弗氏管的重建,向骨膜组织提供低氧张力血运。骨髓基质干细胞则因创伤后局部血液中趋化作用而带来的细胞因子如转化生长因子-β、成骨蛋白、骨形态发生蛋白等刺激而进入软骨细胞分化谱系并逐步形成透明软骨样修复组织[7,8]。修复组织的改建在软骨-骨交界处可能与新生血管长入及破骨细胞活动有关,而近关节表面软骨组织则可能与关节滑膜细胞及其分泌的滑膜液有关。由于上述因素,本实验组观察到术后12周再生的软骨组织学半定量明显优于对照组。与许多游离骨-骨膜修复关节软骨缺损的相关研究结果相似。

3.3 折叠骨膜增加生发层细胞数量

单位面积骨膜可供分化的生发层细胞数量越多,修复转化的概率就越高,新生软骨越厚,反之则较薄[9]。利用这一原理,有学者进行通过骨膜延迟2周移植入关节腔,可见骨膜明显增厚,功能活跃的大核细胞数目增多,骨生成细胞及成纤维细胞增殖活跃,二者均具有向成软骨细胞分化的能力。这说明延迟移植前的骨膜已充分活化,从而获得数量更多的功能活跃的骨膜细胞。移植后2周骨膜新生组织已填平缺损,与兔直接移植组比较,增殖速度明显加快,术后12周新生软骨的组织形态近似正常关节软骨,成年兔骨膜修复软骨能力获得明显提高[10]。本实验应用折叠式骨膜-骨复合组织移植,使单位面积的骨膜厚度增加一倍,因此单位面积可分化的生发层细胞的数量亦增加1倍,同时将生发层朝向关节腔,观察到再生的软骨明显增厚,组织学特性优于对照组和空白组。

3.4 折叠式骨-骨膜复合组织移植的优势及展望

综上所述,游离骨-骨膜复合组织移植修复全层软骨缺损,因移植物固定牢靠,骨膜下骨组织而通过哈弗氏管的重建,向骨膜组织提供低氧张力血运,生发层朝向关节腔,单位面积可分化的生发层细胞数量增加等因素,实验证明再生的软骨组织有良好的组织学特性。但目前所有对再生软骨研究只集中在组织细胞学水平,而对再生的软骨细胞所具有的重要功能,即合成和分泌基质的生物学特性知之甚少,对于再生软骨的生物力学功能也涉及较少,故可进一步在分子学水平、生物力学等方面对骨膜移植后再生的软骨进行研究。同时其远期的疗效也有待于进一步观察。

**参考文献:**


[1] Ulutas K, Menderes A, Karaca C, *et al*. Repair of cartilage defects with periosteal grafts[J]. Br J Plast Surg, 2005, 58(1): 65-72.

[2] Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, *et al*. Present status of and future direction for articular cartilage repair[J]. J Bone Miner Metab, 2008, 26(2): 115-122.

[3] Chiang H, Jiang C C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives[J]. J Formos Med Assoc, 2009, 108(2): 87-101.

[4] Madsen B L, Noer H H, Carstensen J P, *et al*. Long-term results of periosteal transplantation in osteochondritis dissecans of the knee[J]. Orthopedics, 2000, 23(3): 223-226.

[5] O'Driscoll S W. Articular cartilage regeneration using periosteum[J]. Clin Orthop Relat Res, 1999, (367 Suppl): S186-S203.

[6] Brittberg M, Sjogren-Jansson E, Thornemo M, *et al*. Clonal growth of human articular cartilage and the functional role of the periosteum in chondrogenesis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(2): 146-153.

[7] Gooding C R, Bartlett W, Bentley G, *et al*. A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type Ⅰ/Ⅲ collagen covered[J]. Knee, 2006, 13(3): 203-210.

[8] Reinholz G G, Fitzsimmons J S, Casper M E, *et al*. Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(6): 723-734.

[9] Carranza-Bencano A, Perez-Tinao M, Ballesteros-Vazquez P, *et al*. Comparative study of the reconstruction of articular cartilage defects with free costal perichondrial grafts and free tibial periosteal grafts: an experimental study on rabbits[J]. Calcif Tissue Int, 1999, 65(3): 402-407.

[10] 白金柱, 刘晓民, 王润生, 等. 自体骨膜延迟游离移植修复成年后关节软骨缺损的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2001, 8(12): 1185-1188.


(**收稿**:2009-12-07;**修回**:2009-12-21)

(编辑 张 维)