维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)05－0588－04

离体时间对自体骨移植愈合影响的实验研究

周爱国, 安 洪

(重庆医科大学临床学院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨自体移植骨离体 4h 内对移植骨成骨能力的影响。方法:取兔髂骨常温下置于 0.9%生理盐水中,分别于取骨后 0、1、2、3、4h 行异位肌袋植骨,植骨分冲洗与不冲洗骨髓两种。异位肌袋植骨行 ALP 染色、PAS 染色和 HE 染色等组织形态学检查和形态计量学分析。结果:组织学检查显示术后 3 天各组移植骨中均有骨细胞和成骨细胞成活,但无新骨形成。术后 1 周各组均有新骨样组织形成,2 周新骨组织增多,其后新骨组织增多并逐渐向编织骨和板层骨组织转变。形态计量学分析结果显示异位肌袋植骨各组没有显著性差异。结论:取骨后置于 0.9%生理盐水中 4h 内对自体移植骨本身的成骨能力没有影响,冲洗骨髓并不影响移植骨的成活以及成骨能力,故将移植骨取下后置于 0.9%生理盐水中是合理的方法,取骨后立即植骨或取骨后 4h 内再植入对自体移植骨的愈合没有明显影响。

【关键词】骨移植;自体;骨愈合

【中国图书分类法分类号】R687.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－10－08

Experimental study on influence of storage time in vitro on bone autograft healing

ZHOU Aiguo, et al

(*Department of Orthopaedics, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To discover the influence within four hours of different storage time in vitro on the osteogenic capability in bone autograft. *Methods*: The ilium blocks in 0.9% saline were kept at room temperature for 0、1、2、3 or 4 hours before replacement to extra－skeletal muscle gaps in the same rabbit. The grafts transplanted to muscle gaps were divided into two types: irrigating bone marrow with saline and non－irrigating bone marrow. The histological specimens of the autograft in extra－skeletal muscle gaps were taken at the 3rd day and 1、2、4、6 weeks after operation, stained by ALP. PAS and HE, and analysed by histomorphometry. *Results*: There were survival osteocytes and osteoblasts in all ectopic graft groups three days after operation, but no new bone formation. New osteoid tissues were formed one week after operation, and they increased at the second week and were gradually transformed into woven bone and lamellar bone tissues in all ectopic graft groups. The results of histomorphometry analysis showed there was no remarkable difference among all ectopic graft groups. *Conclusion*: Storage of the bone blocks in 0.9% saline for four hours before implant has no remarkable influence on the capacity of bone formation in bone autograft. Irrigating bone marrow with saline would not influence the survival of autograft and the capacity of new bone formation. Therefore, it is a reasonable method to keep bone blocks in saline before implant.

【Key words】 Bone graft; Autograft; Bone healing

骨移植在临床中被广泛应用。自体骨移植愈合同时具有骨生成、骨诱导和骨传导 3 种机制[1,2]。经适当处理的新鲜自体骨表面的成骨细胞和骨细胞能存活,并具有形成新骨的能力[3~6]。由移植骨的活细胞形成的早期骨对术后最初 4～8 周的骨痂形成极为重要[7]。若植入时移植骨无活细胞成分,新骨形成完全由受植区细胞衍生,则新骨形成将延迟[8,9]。临床中行自体骨移植时,有先处理病灶,取骨后立即植骨;也有先取骨备用,待处理病灶后再植骨,从而导致两者移植骨离体时间不同。本实验就自体移植骨离体 4h 内对移植骨成骨能力的影响进行探讨。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

成年新西兰大白兔 15 只,体重 2.0～2.5kg,雌雄不限。

作者介绍:周爱国(1971－),男,主治医师,硕士,主要研究方向:骨愈合,骨移植。

维普资讯 http://www.cqvip.com

各兔均自身对照,按骨离体 0～4h 分为 A～E 五组,A、B、C、D、E 分别表示在生理盐水中保留 0、1、2、3、4h。另外,以 M 表示未冲洗骨髓的移植骨,N 表示已经冲洗掉骨髓的移植骨。

1.2 实验方法及步骤

3%戊巴比妥(30mg/kg)耳缘静脉麻醉,无菌条件下切取双侧髂骨,去除软组织和外骨膜。用 0.9%生理盐水经皮试针头插入左侧髂骨块内反复冲洗,至冲洗液清亮,骨块发白为止。右侧髂骨块不冲洗。每侧髂骨等分为 5 等份,室温下置 0.9%无菌生理盐水中保存。分别于取骨后立即(0)、1、2、3、4h(A～E)于背部棘突两侧肌肉相应位置作肌袋,左侧植入冲洗掉骨髓的骨块(N),右侧植入未冲洗骨髓的骨块(M),切口细丝线缝合。术后常规喂养,术后 3 天每天肌注青霉素 40 万单位。分别于术后 3 天,及 1,2,4,6 周各处死 3 只动物,取移植骨及周围部分肌肉组织,80%酒精 4℃ 固定,EDTA 二钠脱钙,常规切片,并行 HE 染色、PAS 染色[10]和 ALP 染色[11]。均在 OLYMPUS 光学显微镜下观察。用 CM-2000 生物医学图象分析系统对术后 1 周和 4 周的 PAS 染色切片和 ALP 染色切片的反应产物总面积与背景面积之比(TA/BA)进行测量,所有测量数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS6.12 统计分析软件进行方差分析及 SNK 两两比较。

2 结 果

2.1 HE 染色观察

术后 3 天:各组见骨小梁中央骨陷窝空虚和残留的骨细胞核强嗜碱性,靠近移植骨边缘的细胞大部分成活,骨小梁边缘可见立方形或柱状的成骨细胞(核大,质偏蓝),骨髓基质中见长梭形的间充质细胞。没有见到新生血管长入,没有新骨形成。周围部分肌肉坏死,有少许炎症细胞浸润。

术后 1 周:各组移植骨骨小梁间都有新生骨样组织形成,骨小梁及新骨边缘见成线状排列的立柱状或圆柱状、体积较大,细胞浆嗜碱性的成骨细胞。部分区域偶可见破骨细胞。有新生血管长入移植骨。骨髓腔中可见交织成网状的长梭形的骨髓基质细胞。

术后 2 周:各组移植骨的骨小梁间新骨形成活跃,新骨组织排列不规则,呈巢状。新骨边缘见到成骨细胞。肌肉与移植骨组织间可见由长梭形的原始间充质细胞向梭形的骨祖细胞,再向立方形或柱状的成骨细胞逐渐过渡的现象。骨小梁间新生血管周围见成骨细胞。

术后 4 周:各组见新生骨组织将各骨小梁结构连接在一起。排列紊乱的骨组织逐渐规则,向成熟编织骨和板层骨转变。新生骨组织边缘仍然有成骨细胞。部分地方可见破骨细胞。移植骨外周的新骨边缘有由外向里从长梭形细胞向立方形细胞过渡的现象。

术后 6 周:各组新骨组织完全转变为板层骨组织,仍有新骨形成,新骨边缘见呈线状排列的成骨细胞,骨髓基质细胞变成成骨细胞。

2.2 碱性磷酸酶染色

术后 3 天:骨小梁边缘柱状或立方形成骨细胞的胞浆内有黑色或棕黑色颗粒,髓腔内长梭形骨髓基质细胞胞浆中也有黑色或棕黑色颗粒存在。

术后 1 周:新生骨样组织中的骨细胞碱性磷酸酶染色呈阳性。新骨边缘成骨细胞线形排列,碱性磷酸酶染色强阳性。骨髓中长梭形基质细胞染色呈黑色或棕黑色,周围组织中的长梭形细胞染色阳性,新生血管周围细胞染色阳性。

术后 2 周:新骨形成明显,靠新骨组织边缘的骨细胞胞浆内有黑色或棕黑色颗粒,新骨边缘的成骨细胞染色阳性。

术后 4 周:有部分新生骨向板层骨形成,新骨边缘成骨细胞染色阳性。

术后 6 周:大量板层骨形成,骨小梁边缘和移植骨外周仍见染色阳性的细胞存在。

2.3 PAS 染色

术后 3 天:PAS 染色阴性,移植骨中的部分骨细胞和成骨细胞成活,没有新骨形成。

术后 1 周:骨小梁间新生骨样组织形成 PAS 染色阳性,呈红色或淡红色。新骨边缘成骨细胞的细胞浆染成红色。

术后 2 周:骨髓腔和骨小梁之间大量新生骨组织形成,呈放射状生长,染色阳性。其边缘线状排列的成骨细胞,胞质染成红色。

术后 4 周:骨样组织转化为成熟编织骨和板层骨组织,染色为弱阳性,边缘成骨细胞染色阳性。新骨组织向周围呈放射状延伸。新骨组织将骨小梁连接起来。

术后 6 周:板层骨形成,染色为阴性。仍然有新生骨组织形成,新骨组织 PAS 染色弱阳性,边缘可见成骨细胞。

2.4 形态计量分析和统计分析

2.4.1 术后 1 周和 4 周 ALP 染色的反应产物总面

维普资讯 http://www.cqvip.com

积与背景面积之比(TA/BA)进行测量,所有测量数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,图象定量分析结果见表 1,表 2。

术后 1 周和 4 周的 ALP 染色图象定量分析结果统计学分析表明,术后 1 周 A～E 各植入组以及 M 与 N 各组间比较的 P 值均大于 0.05,各组间没有显著性差异。术后 4 周的统计分析结果各组间比较的 P 值均大于 0.05,没有显著性差异。

2.4.2 术后 1 周和术后 4 周的 PAS 染色的反应产物总面积与背景面积之比(TA/BA)进行测量,所有测量数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其结果见表 3 和表 4。

表 1 术后 1 周碱性磷酸酶染色形态计量学分析结果($\bar{x} \pm s$)

	M	N
A	0.0346±0.0047	0.0351±0.0046
B	0.0349±0.0030	0.0348±0.0032
C	0.0339±0.0045	0.0329±0.0024
D	0.0330±0.0031	0.0343±0.0041
E	0.0338±0.0032	0.0327±0.0049

表 2 术后 4 周碱性磷酸酶染色形态计量学分析结果($\bar{x} \pm s$)

	M	N
A	0.0254±0.0029	0.0218±0.0037
B	0.0243±0.0025	0.0247±0.0035
C	0.0228±0.0028	0.0236±0.0017
D	0.0231±0.0019	0.0229±0.0031
E	0.0236±0.0024	0.0238±0.0022

表 3 术后 1 周 PAS 染色的形态计量学分析结果($\bar{x} \pm s$)

	M	N
A	0.0327±0.0049	0.0360±0.0050
B	0.0347±0.0041	0.0350±0.0035
C	0.0361±0.0061	0.0349±0.0035
D	0.0357±0.0034	0.0394±0.0094
E	0.0354±0.0036	0.0349±0.0034

表 4 术后 4 周 PAS 染色的形态计量学分析结果($\bar{x} \pm s$)

	M	N
A	0.0527±0.0095	0.0586±0.0144
B	0.0527±0.0062	0.0506±0.0029
C	0.0542±0.0054	0.0517±0.0052
D	0.0518±0.0078	0.0536±0.0085
E	0.0519±0.0042	0.0527±0.0052

采用 SAS6.12 统计分析软件对形态计量学分析结果进行统计分析,结果是术后 1 周及术后 4 周 A～E 各植入组以及 M 和 N 各组间的 P 值均大于 0.05,各组间统计学上无显著性差异。

3 讨 论

3.1 离体时间对成骨细胞活性以及成骨能力的影响

移植骨愈合过程是骨祖细胞的增殖、成骨细胞的分化、骨诱导、骨传导以及移植物的生物力学特性等多方面相互依赖的紧密结合过程。而早期由活的移植骨细胞形成的新骨通常对术后 4～8 周内的骨痂形成是非常重要的[7]。若植入时移植骨无活细胞成分,新骨形成完全由受植区细胞衍生,则新骨形成将延迟[8,9]。经恰当处理的皮质骨和松质骨移植骨表面细胞能成活并产生新骨[3～6]。Puranen[12]发现新鲜自体移植骨比在空气中暴露 1h 的自体移植骨对四环素的吸收能力强,并认为新鲜自体骨较强的骨形成能力与成活的骨生成细胞有关。Bohr[13]等发现植入前在生理盐水中保留 1h 的移植骨对四环素的吸收能力与新鲜自体骨移植没有明显差异,新骨形成没有多大的影响,而空气中暴露 1h 会显著降低早期骨形成。本实验通过兔自体髂骨异位肌袋移植的组织学检查发现术后 3 天 A～E 各组移植骨中的成骨细胞和骨细胞仍成活,碱性磷酸酶染色呈阳性反应,术后 1 周各组都有新生骨样组织形成,2 周时新骨形成活跃,4～6 周新骨逐渐变成板层骨;术后 1 周及 4 周的碱性磷酸酶(ALP)染色和高碘酸雪夫氏(PAS)反应形态计量学统计分析各组没有显著性差异。细胞浆中显示 ALP 活性和出现 PAS 反应是成骨细胞功能旺盛的表现,表明有糖原存在以及合成和分泌骨基质的有机成分活跃[14]。同时,新骨基质中含有大量的酸性粘多糖,PAS 染色阳性,可以反映新骨形成量。说明自体移植骨移植时生理盐水中存放 4h 内对移植骨的成骨能力没有明显影响。本实验利用异位肌袋植入,排除了由周围骨组织向移植骨中长入新骨的骨传导作用的影响,能更准确反应移植骨本身的成骨能力。提示在临床行自体骨移植时取骨后置于 0.9% 生理盐水中 4h 内对移植骨本身的成骨活性没有影响。

3.2 冲洗骨髓后对自体移植骨成骨能力的影响

有大量研究已证明骨髓具有成骨能力[15～17],骨髓移植后的坏死部分释放出成骨诱导物质,刺激受区非特异性间充质细胞分化为成骨细胞,继而形成新骨;骨髓移植后幸存下来的基质细胞受坏死骨髓细胞释放的因子或活骨髓细胞分泌的成骨因子刺激,以及受区邻近骨的影响,分化为成骨细胞[17]。本实验中部分骨髓基质细胞碱性磷酸酶染色阳性,且有转变为成骨细胞的现象,证实自体移植骨骨髓具有成骨能力;但冲洗掉骨髓与含有骨髓的自体移植骨在移植后的成骨作用没有明显的差异,与以往的研究结论不一致。其原因可能为骨髓是一个具有

维普资讯 http://www.cqvip.com

多种细胞成分的复杂器官,有造血和成骨功能,可分为造血和基质两大系统。骨髓的成骨能力来源于骨髓基质系统的基质干细胞,它能自动分化为成骨细胞,而骨髓中的造血细胞对骨形成没有作用。骨髓基质由网状细胞,窦状血管和脂肪细胞所组成的网构成。基质间隔可以伸进骨内膜,哈佛氏管及骨膜生发层[15,18]。生理盐水冲洗掉的细胞主要为造血细胞,基质因成网状相互交织,不容易被冲洗掉,所以成骨作用没有受到影响。另外,骨髓细胞的数量对其成骨作用有直接影响,Salama[17]报道,移植的骨髓量越大,诱导生成的新骨量越多。也可能因为本实验中异位移植的自体骨块的体积小,骨髓成分较少,冲洗与没有冲洗掉骨髓的移植骨中的骨髓细胞数量差异小,因而在成骨方面没有显示出明显的差别。

3.3 自体移植骨的骨诱导作用

骨诱导是在诱导刺激因子作用下,使未分化的原始间充质细胞分化为骨祖细胞和成骨细胞的过程。本实验在自体移植骨周围可见到由长梭形的原始间充质细胞向立方形的成骨细胞逐渐过渡的现象:紧靠移植骨为成骨细胞,再外为短梭形细胞,较远为长梭形的原始间充质细胞,原始间充质细胞碱性磷酸酶染色呈弱阳性,成骨细胞强阳性,提示原始间充质细胞在移植骨的骨诱导因子作用下转化成为成骨性细胞。骨诱导过程中主要的诱导因子是骨形态发生蛋白(BMP)。BMP 除了可从被破骨细胞吸收的移植骨的矿物基质中被释放外[19],也可由成骨细胞合成和分泌,并且在骨形成过程中,成骨细胞能合成并分泌比以前更多的 BMP,增进骨诱导[20]。因此,有成活的成骨细胞的自体移植骨在早期就有成骨细胞合成和分泌的 BMP,能更早发挥骨诱导作用。

3.4 小结

自体骨移植时若处理恰当,移植骨中的成骨性细胞能成活,并通过骨生成和骨诱导作用对早期新骨形成起重要作用。基于过去研究证实将移植骨置于空气中 1h 即会产生不利于存活的影响,本实验证明冲洗骨髓腔并不影响移植骨存活,故将移植骨取下后置于 0.9%生理盐水中是合理的方法。

参 考 文 献

[1] Donald S, Bassam A, Andrei A, et al. Biology of allografting[J]. Orthop Clin North Am, 1998;29(2):199-204.

[2] Cart E, Francine Dietsh. Bone-grafting materials in implant dentistry[J]. Implant Dent, 1993;2(3):158-167.

[3] Burchadt H, Jones H, Glowczewskie F, et al. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs[J]. J Bone Joint Surg Am, 1978;60:1082-1090.

[4] Chalmers J. Transplantation immunity in bone homografting[J]. J Bone Joint Surg Br, 1959;41:160-178.

[5] Bassett CAL. Clinical implications of cell function in bone grafting[J]. Clin Orthop, 1972;87:49-59.

[6] Gray JC, Elves MW. Early osteogenesis in compact bone isografts: A quantitative study of the contributions of the different graft cells[J]. Calcif Tissue Int, 1979;29:225-237.

[7] Sharon Stevenson. Biology of bone grafts[J]. Orthopedic Clinics of North America, 1999;34(4):543-552.

[8] Stevenson S, Frederick RW, Li XQ, et al. Together, the host bed and the properties of the graft determine the outcome of graft incorporation[J]. Trans Orthop Res Soc, 1989;14:463.

[9] Stevenson S, Frederick RW, Zart DJ, et al. The interaction and effects of freezing and histocompatibility on the incorporation of allogeneic cortical graft in rats[J]. Trans Orthop Res Soc, 1989;14:269.

[10] 张 哲,陈 辉. 实用病理组织染色技术[M]. 辽宁:辽宁科学技术出版社,1988;138-140.

[11] 席 越,王戈平,黄啸原,等. 骨组织病理解剖学技术[M]. 北京:人民卫生出版社 1997;255-256.

[12] Puranen, J. Reorganization of fresh and preserved bone transplants[J]. Acta Orthopaedics Scandinavia 1966; Supplement:92.

[13] Bohr, H. et al. The osteogenic of bone transplants in rabbits[J]. J Bone Joint Surg, 1968;50B:866.

[14] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎. 实用骨科学(第 2 版)[M]. 北京:人民军医出版社,2000;15-16.

[15] Reddi AH. Bone morphogenetic protiens, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells[J]. Clin Orthop, 1995;313:115-119.

[16] Bab I, Ashton BA, Gazit D, et al. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chamber in vivo[J]. J Cell Sci, 1986;84:139~151.

[17] Salama R. Xenogeneic bone grafting in humans[J]. Clin Orthop, 1983;174(4):113.

[18] Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats[J]. Cell Tissue Res, 1988;.254(3):317.

[19] Urist MR. Bone: formation by autoinduction[J]. Science, 1965;150:893-899.

[20] Yang Lianjia and Jin Yan. Immunohistochemical obervations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions[J]. Clin Orthop, 1990;249-255.