DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.023
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1187-04

论著

皮下滑膜囊动物模型的建立及其生物学特性实验研究

潘险峰,张正治,苟 俊,程昌志,白贵友 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 建立动物皮下滑液囊模型,研究其功能结构特点,探讨形成的可能机制。方法 在兔皮下埋置硅胶气囊,经扩张按摩刺激,逐渐形成包裹囊腔,通过对大体形态、组织学和超微结构、细胞表型、UDPGD功能性酶以及滑囊液HA浓度的研究,与正常滑膜囊比较。结果 术后2周时,皮下形成"滑囊腔"结构,肉眼见囊腔内表面光滑,扫描电镜见囊壁内表面有微绒毛结构,囊壁表层有A、B型细胞的超微结构特征;细胞分别表达CD68、VCAM-1和UDPGDmRNA,囊壁表层UDPGD酶活性高于深部($P<0.01$);囊内液体清亮透明,未发现细胞成分,透明质酸近似浓度160 ng/ml,高于血清水平($P<0.01$)而接近关节滑液($P>0.05$)。结论 皮下形成的滑囊腔模型,其功能结构在一定程度上类似关节滑囊腔,囊壁表层细胞具有滑膜细胞的表型特征。

关键词:滑膜;滑膜囊;滑液;滑膜细胞
中图法分类号:R-332;R322.72 文献标识码:A

Establishment of an animal model of subcutaneous synovial bursa and its biological features

PAN Xian-feng, ZHANG Zheng-zhi, GOU Jun, CHENG Chang-zhi, BAI Gui-you (Central Lab, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an experimental model of the subcutaneous synovial bursa for the study of the structures and functions of subcutaneous synovial bursa. Methods A silica gel bag was buried in rabbit subcutaneous tissue and was massaged regularly. When the synovial line structure appeared around the silica gel bag, changes in the macroscopic appearance, histological morphology, and ultrastructure were observed; the phenotype and uridine diphosphoglucose dehydrogenase (UDPGD) activity of the lining cells were detected; and the concentration of hyaluronic acid (HA) in subcutaneous synovial bursa liquid was determined. Results At 2 weeks after operation, a synovial bursa structure was found around the silica gel bag. Scanning electron microscopy showed microvilli on the smooth internal surface with the ultrastructural characteristics of Type A and Type B cells. The lining cells expressed VCAM-1, CD68, and UDPGD mRNA, respectively. The activity of UDPGD in lining cells was higher than that in the deep cells ($P<0.01$). The fluid in artificial subcutaneous synovial bursa was transparent, and no cell component was found. The concentration of HA was 160 ng/ml, higher than that in the serum ($P<0.05$), and was close to the synovial fluid of knee joint ($P>0.05$). Conclusion The experimental model of subcutaneous bursa is similar to the joint synovial bursa in structure and function, and the lining cells of bursa have the phenotype characteristics of synoviocytes.

Key words: synovium; synovial bursa; synovial fluid; synoviocyte

滑膜囊可分为遗传性滑膜囊和非遗传性滑膜囊,后者形成的诱因很多。研究表明,在皮下埋置硅胶材料,或者皮下注气,可以在局部诱导产生滑膜样结构[1~3]。本实验设想在动物皮下埋置硅胶囊,通过按摩刺激和气囊注气的方法,人工构建皮下滑膜囊动物模型,为无滑膜肌腱在体滑膜化,寻找合适的培养环境。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

新西兰大白兔24只(第三军医大学实验动物中心提供),体

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970378)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970378)
作者简介:潘险峰(1968-),男,云南省昆明市人,博士,主治医师,主要从事骨与关节损伤方面的研究。电话:(0871)5325463
通信作者:张正治,电话:(023)68752346
收稿日期:2003-05-30;修回日期:2003-09-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质量2.5~3.5 kg，雌雄不拘，按时间（1、2、4、6周）分为4组，每组6只。

1.2 手术方法

3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉（2 ml/kg）。动物肩胛间区作3 cm纵形切口，在皮下组织中埋置硅胶扩张囊，术后每天向扩张囊内注入空气2 ml，使硅胶囊逐渐充盈，注满20 ml停止。每天按摩埋置硅胶囊的部位3次，20 min/次，术后1、2、4、6周处死动物，取出扩张器进行观察。同时取自体膝关节滑膜组织作对照。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 大体观察 滑囊形成的情况、滑囊壁形态和囊腔内液体性状。

1.3.2 组织学结构 组织经10%福尔马林固定，石蜡切片，HE染色，光镜下观察组织结构及细胞形态。

1.3.3 超微结构 标本经3%戊二醛固定，超薄切片，透射电镜观察组织超微结构及细胞类型；扫描电镜观察囊壁表面结构。

1.3.4 酶组织化学检测 新鲜组织标本，参照文献[4]报道的方法，在氮气环境下，进行尿二苷磷酸葡萄糖脱氢酶（uridine diphosphoglucose dehydrogenase，UDPGD）酶活性检测，在IMAGE-PLUS分析软件上对结果作图像分析。

1.3.5 免疫组化 组织标本经4%多聚甲醛固定，冰冻切片，参照文献[5]进行VCAM-1（vascular cell adhesion molecule 1，VCAM-1）、CD68免疫组化染色，鉴定囊壁细胞类型。

1.3.6 原位杂交 采用地高辛标记的多相寡核苷酸探针（博士德公司），按试剂盒说明，检测UDPGD mRNA在囊壁细胞中的表达（DAB显色）。

针对UDPGD靶基因的mRNA序列为：

5′-AAGAA GATCT GTTGC ATTGG TGCAG GCTAT-3′

5′-ACAA ATAGT TGTGG ATCTT TCTCA TCCAG-3′

5′-TGGTG AAATT CCGAA GTTTA GTCTT CAAGA-3′

1.3.7 滑囊液检测 采集皮下滑囊内液体标本，观察其外观、透明度、粘稠度等物理性状，500 r/min离心30 min，沉淀用涂片法检测细胞成分。ELISA方法检测HA浓度。

1.3.8 统计学方法 所得数据用SPSS10.0软件对各组数据进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 大体观察

经过皮肤软组织扩张器作用2周，动物肩背部形成完整皮下滑囊，其形态类似关节滑液囊，囊壁呈灰白色，约1 mm厚，内表面光滑，少量血管分布于囊壁的外侧，囊内分泌少许清亮透明、微粘稠的液体（图1）。

2.2 组织学结构

囊壁组织主要由细胞和胶原纤维构成，接近表面有明显的细胞层，无基底膜，细胞呈梭型或椭圆型，细胞核大，染色深。深层囊壁组织与皮下组织界限不明显，主要由弹力纤维、疏松结缔组织、毛细血管以及成纤维细胞组成（图2）。

2.3 超微结构

扫描电镜显示囊壁内表面分布有大量微绒毛突向囊腔，囊表面细胞排列整齐（图3）；透射电镜见囊壁表面大量囊泡样结构及微绒毛，与扫描电镜结果相一致。组成囊壁表面的细胞主要有两种细胞，一种核较大，胞内富含溶酶体以及吞噬小泡，为巨噬样细胞（A细胞），另一种细胞核长梭型，粗面内质网、高尔基体等细胞器发达，为成纤维样细胞（B细胞）。

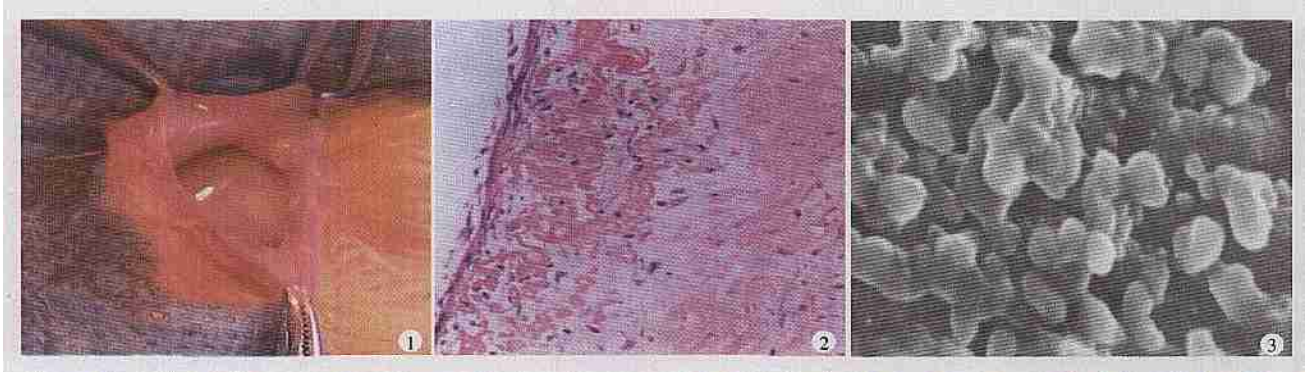


图1 硅胶囊埋置2周，皮下形成滑囊腔，腔内分泌有少量滑液

Fig 1 Formation of synovial bursa structure and some secreted synovial fluid at 2 weeks after burying silica gel bag in rabbit subcutaneous

图2 人工构建的皮下滑膜囊组织学形态 （HE× 100）

Fig 2 Histological structure of the artificial subcutaneous synovial bursa （HE× 100）

图3 滑囊腔面微绒毛 （SEM× 2 000）

Fig 3 Microvillus structure on the internal surface of subcutaneous synovial bursa （SEM× 2 000）

2.4 酶组织化学

囊壁表层细胞UDPGD酶活性明显高于深部及其它组织，经IMAGE-PLUS系统图像分析，囊壁表层细胞IOD值明显高于正常对照（$P<0.01$）（表1）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　UDPGD 活性比较(IOD)

Tab 1　Comparison of UDPGD activity in artificial subcutaneous synovial bursa between the surface and the deep layer (IOD)

Group	n	Surface layer	Deep layer
Artificial subcutaneous synovial bursa	10	11 483.89±6 649.398 *	1 653.186±1 573.741
Synovium	10	19 310.06±5 843.086	1 624.664±1 148.384
Other tissue	10	1 415.667±519.221	

*: $P<0.01$, *vs* other tissue

2.5　免疫组化

囊壁组织表层大部分细胞表达 VCAM-1, 少数表达 CD68, VCAM-1 细胞阳性带与 UDPGD 高表达区域一致(图 4)。

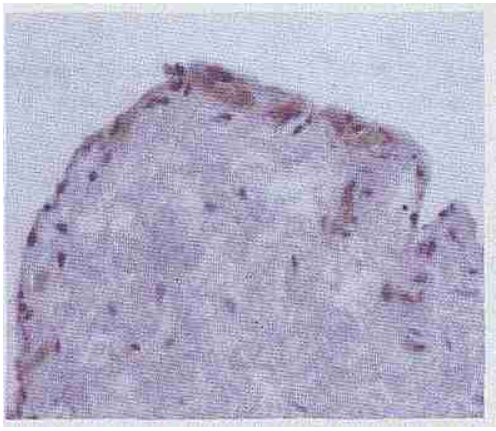


图 4　滑囊壁表层 CD68 阳性细胞　(SABC × 200)

Fig 4　CD68 positive cells in subcutaneous synovial bursa wall (SABC × 200)

2.6　组织原位杂交

UDPGD mRNA 在表层细胞胞浆内高表达(图 5)。



图 5　UDPGD 原位杂交, 滑囊表层细胞胞浆着色棕黄色, UDPGD mRNA 阳性　(DAB× 400)

Fig 5　*In situ* hybridization of UDPGD　UDPGD mRNA positive, cell plasm brownish yellow stained　(DAB × 400)

2.7　滑液检测

滑囊液清亮透明, 稍粘稠, 离心后镜检没有发现细胞成分。经 ELISA 检测所得 D_{450} 值, 在标准曲线上查得的 HA 近似浓度, 滑囊液高于血清水平($F=5.42$, $P<0.01$), 而与正常关节滑液相差不显著($P>0.05$)(表 2)。

表 2　透明质酸 D_{450} 值及近似浓度在滑囊液、关节滑液和血清中的比较(ELISA)

Tab 2　Comparison of HA concentrations in artificial subcutaneous synovial bursa liquid, knee joint synovial liquid and serum (ELISA)

Group	n	D_{450}	HA (ng/ml)
Artificial subcutaneous synovial bursa liquid	11	0.215 727±0.040 147 *	160
Synovial liquid of knee joint	8	0.198 375±0.028 38	200
Blood serum	8	0.390 375±0.237 256	40

*: $P<0.05$, *vs* blood serum

3　讨论

3.1　滑膜囊的形成

体内滑囊有两种: 一种在胎儿期已发生, 部位恒定, 也将这类滑囊称为"遗传性"滑囊; 另一种是为适应局部摩擦和压迫在结缔组织中继发的滑囊, 为"非遗传性"滑囊, 其位置不定。一般而言, 非遗传性滑囊是机体适应环境的结果, 在承受摩擦或病理状态下, 由其它组织诱导转变而来。本实验中人工构建的皮下滑液囊模型, 就属于"非遗传性"滑囊的一种。作为一个完整的功能结构单位, 滑膜囊分布于可动关节、肌腱鞘及其他部位, 其主要的的功能是分泌滑液, 减少摩擦, 缓冲和传递压力等。同时, 许多关节滑膜疾病如风湿、类风湿等, 往往通过滑膜病理改变而反映出来[5,6]。

早在 20 世纪 70 年代, Rayner[1] 就发现, 在动物皮下埋置的硅胶棒周围出现包绕的滑膜样纤维隔膜。Edwards 等[2] 通过实验也证实, 在皮下注入一定气体并保持张力的刺激, 1 周后能够在局部形成囊腔, 囊腔内表面覆盖有滑膜细胞层。临床在使用皮下软组织扩张术时, 往往出现皮下"滑液囊肿"[7,8] 并发症。而使用硅胶乳房假体的病人, 在埋置的硅胶材料与周围组织间, 形成了滑膜样结构[3,9,10]。这些现象说明, 通过外加因素的刺激, 如在皮下埋置硅胶材料, 皮下组织可以诱导向滑膜结构分化。

本实验采用硅胶囊埋置于动物皮下, 辅以按摩等机械刺激, 2 周即形成了明显的、具有游离界面的、光滑的囊壁, 进一步证实了机械物理刺激是可以形成皮下类似"滑液囊"的结构。

3.2　滑膜囊的结构特点和滑膜细胞的表型特征

虽然构成滑膜表层的细胞来源至今仍有争议, 且不同部位滑膜囊, 其形态结构有所不同。但不论何种

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

类型，滑膜特征性的结构却是一致的，即滑膜表层（synovial intima）结构，也称滑膜的衬里细胞表层（cellular lining）[11]。Barland 等[12]根据滑膜组织的超微结构，将滑膜表层细胞归类为吞噬样细胞（A 型细胞）和成纤维样细胞（B 型细胞），并指出 B 型细胞是构成滑膜的主要功能细胞，它具有分泌功能。

在本实验中将人工构建的皮下“滑液囊”进行了组织观察，新形成的囊壁中存在类似滑膜 A、B 型细胞的形态结构特征。滑膜 A 型细胞来源于骨髓巨噬细胞系统，对 CD68 表达阳性；滑膜 B 型细胞来源于中胚层间充质细胞，可被 VCAM-1 标记，同时，它还具有 UDPGD 酶高活性表达的特点[13, 14]。

在滑膜的许多生物学特性中，最主要的是合成并分泌滑液进入滑膜腔，以维持粘弹性，减少摩擦。透明质酸（hyaluronic acid，HA）是滑液的功能性成分，尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶是 HA 合成关键酶，其活性的高低，反映 HA 合成的强弱[13]。

本实验对囊壁组织进行了组织化学、免疫组织化学及原位杂交的实验，从滑膜 B 型细胞分泌透明质酸（HA）的功能入手，分别检测了与 HA 合成相关的下游和上游产物，从不同层面证明了人工构建的皮下“滑液囊”也具有类似关节滑膜组织的功能。

3.3 人工构建皮下滑膜囊的意义

屈指肌腱鞘内肌腱缺损修复中存在的主要问题是粘连，克服粘连的关键是滑膜。目前用于肌腱移植的材料有 3 类：自体肌腱、同种异体肌腱和人工合成材料。其中人工合成材料由于异物反应，吻合口最终不能形成纤维愈合而断裂，只能作为暂时代用品，未能取得远期成功；同种异体肌腱因免疫排斥反应受到限制。为了克服合成材料和异体肌腱的这些缺点，临床上广泛采用自体肌腱作为移植材料。自体肌腱又分为有滑膜肌腱和无滑膜肌腱，有滑膜肌腱的来源有限，无滑膜肌腱如掌长肌腱、趾长伸肌腱、阔筋膜等，但仍然存在移植肌腱与周围组织之间广泛的粘连问题。鞘内肌腱移植用有滑膜肌腱作为移植材料最为理想[15]，但自体有滑膜肌腱的来源有限，由于有滑膜肌腱和腱鞘滑膜系统的形态与功能的特殊性，若取自体鞘内有滑膜肌腱作为移植材料，势必引起供体指（趾）的功能障碍，形成新的残指（趾），临床应用必须受到限制。无滑膜肌腱的分布广，可选作供体材料的来源多，切取后一般不致引起供体器官的功能障碍。但由于无滑膜肌腱表面的腱旁组织和周围结缔组织的亲和性强，极易形成粘连，影响伤指的功能恢复。

利用滑膜囊研究各种关节疾病和滑膜病理，一直是一种必要手段[16]。如果能够建立皮下“滑液囊”，可否利用该囊来替代关节滑膜腔，进行无滑膜肌腱在体滑膜化改造，探索新的有滑膜肌腱移植材料的新途径。本实验结果为实现这一设想提供了可行性依据。

参考文献：

[1] Rayner C R. The origin and nature of pseudo-synovium appearing around implanted silastic rods: an experimental study[J]. Hand, 1976, 8(2): 101－109.

[2] Edwards J C, Sedgwick A D, Willoughby D A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system[J]. J Pathol, 1981, 134(2): 147－156.

[3] Emery J A, Spanier S S, Kasnic G Jr, *et al*. The synovial structure of breast-implant-associated bursae[J]. Mod Pathol, 1994, 7(7): 728－733.

[4] Mehdizadeh S, Bitensky L, Chayen J. The assay of uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity[J]. Cell Biochem Funct, 1991, 9(2): 103－110.

[5] O'connell J X. Pathology of the synovium[J]. Am J Clin Pathol, 2000, 114(5): 773－784.

[6] Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, *et al*. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint[J]. Arch Histol Cytol, 2000, 63(1): 17－31.

[7] 夏双印，韩孝明，温宪斌. 扩张器取出后“滑液囊肿”形成 1 例[J]. 中华整形烧伤外科杂志，1997，13(2)：111.

[8] 陈从柏，时安平，罗锦辉. 扩张器取出后包膜囊内积液 1 例[J]. 实用美容整形外科杂志，1999，10(3)：154.

[9] Raso D S, Greene W B. Silicone breast implants: Pathology[J]. Ultrastruct Pathol, 1997, 21(3): 263－271.

[10] Abbondanzo S L, Young V L, Wei M Q, *et al*. Silicone gel-filled breast and testicular implant capsules: a histologic and immunophenotypic study[J]. Mod Pathol, 1999, 12(7): 706－713.

[11] Edwards J C. The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocytes differentiation[J]. J Anat, 1994, 184(Pt 3): 493－501.

[12] Barland P, Novikoff A B, Hamerman D. Electron microscopy of the human synovial membrane[J]. J Cell Biol, 1962, 14(3): 207－216.

[13] Edwards J. Second international meeting on synovium. Cell biology, physiology and pathology 21－23 September, Canterbury, United kingdom[J]. Ann Rheum Dis, 1995, 54(5): 389－391.

[14] Pitsillides A A, Wilkinson L S, Mehdizadeh S, *et al*. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell[J]. Int J Exp Pathol, 1993, 74(1): 27－34.

[15] Gelberman R H, Seiler J G 3rd, Rosenberg A E, *et al*. Intercalary flexor tendon grafts. A morphological study of intrasynovial and extrasynovial donor tendons[J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1992, 26(3): 257－264.

[16] Magilavy D B. Animal models of chronic inflammatory arthritis[J]. Clin Orthop, 1990, 259(10): 38－45.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net