DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.029
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0563-04

论著

细胞-支架复合体构建及其异体移植修复关节软骨缺损的形态学观察

戴 刚,李起鸿,周 强,石国华 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨应用组织工程技术进行异体移植修复关节软骨缺损的有效性和可行性。方法 采用动态倒置显微镜与扫描显微镜观察及大体、组织学和免疫组织化学观察方法,以优化获取的单层传代培养幼兔关节软骨细胞及结构与性能优化的CPPf(Calcium polyphosphate fibers, CPPf)/PLLA(poly-L-lactic acid, PLLA)自制支架复合材料,进行细胞-支架复合体体外构建与培养及其异体移植修复关节软骨缺损的病理形态学实验研究。结果 将适宜密度培养细胞种植于支架材料中,细胞密集,分布均匀;经一定时间体外培养,其种植细胞与支架材料粘附、生长繁殖并分泌细胞外基质;支架材料保持培养前的外形与内部微结构。其细胞-支架复合体异体移植修复关节软骨缺损的病理形态学特征为:①修复后的关节面光滑,与周围组织整合良好;②软骨细胞呈柱状排列;③Ⅱ型胶原及硫化糖胺多糖在空间上分布均匀;④软骨下板得以重建;⑤修复组织与其下方骨质紧密结合;⑥支架材料逐渐降解吸收。结论 应用细胞-支架复合体异体移植进行关节软骨缺损修复,具有种植细胞来源广泛、可根据缺损大小和形状设计支架外形、使缺损完全生物学再生修复的优点。这一组织工程技术为关节软骨缺损完全再生修复提供了一条新的有效途径。

关键词:组织工程;关节软骨;细胞-支架复合体;异体移植;缺损修复
中图法分类号:R318.08;R617;R684 文献标识码:A

Construction of articular chondrocyte-scaffold construction and morphologic observation of allograft to repair articular cartilage defect

DAI Gang, LI Qi-hong, ZHOU Qiang, SHI Guo-hua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effectiveness and feasibility of the articular chondrocyte-scaffold construct as allograft to repair articular cartilage defect based on tissue engineering. **Methods** After the passaged rabbit articular cartilage cells in monolayer culture accumulated optimally were seeded in the scaffold by CPPf(calcium polyphosphate fibers, CPPf)/PLLA (poly-L-lactic acid, PLLA) which was prepare with structure and properties optimization, the cells-scaffold constructs were cultured in vitro and then transplanted to repair articular cartilage defect in established rabbit models. The morphology of the seeded cells in the scaffold construct and the repair of articular cartilage defect were observed with naked eyes, and dynamic inverted and scanning electron microscopy. **Results** After the cells at optimal density were seeded in the scaffolds, the cells were glomerate in a uniform distribution and in further culture, they were adhesive to the scaffold and grew, proliferated and secreted extracellular matrices. The original gross shapes and inner microstructure scaffold composites were intact. The gross and histological features of the allograft cells-scaffold constructs were as follows: ①the articular surface was smooth and well-integrated with adjacent tissues; ②the chondrocytes were arranged in columns; ③S-GAG and type Ⅱ collagen distributed in uniform in the space; ④The bone plate posterior to cartilage was reconstructed; ⑤the repaired tissues were well bond with its below bone. ⑥the scaffold composites were gradually degraded and absorbed. **Conclusion** The approach of the articular cartilage cells— scaffold construct as allograft to repair articular cartilage defect enjoys the advantages of adequate sources of seeding cells, changeable shape of scaffold composites in accordance with the defect size and shape, absolute regeneration and reparation of the defects, and convenient implant with aid of arthroscope.

Key words: tissue engineering; articular cartilage; cell-scaffold construct; defect reparation; allograft

因创伤或骨病引起的关节软骨缺损在医学临床十分常见。目前临床用于修复其缺损的主要方法都不同程度地存在着某些缺陷[1~3]。组织工程技术为其完全再生修复提供了一条新的途径。在完成关节软骨组织工程种子细胞优化获取及新型支架复合材料制备与性能研究基础上,选用以适宜密度接种、Vit-C+BMP-2促增殖作用的单层传代培养幼兔关节软骨细胞,以及生物相容性和生物降解性良好,抗压模量优于国外同类材料、结构与性能优化的CPPf(Calcium polyphosphate fibers, CPPf)/PLLA(poly-L-lactic acid, PLLA)自制高孔隙度、纤维网状复合材料支架,进行了关节软骨细胞-新型支架材料复合体体外构建及其异体移植修复关节软骨缺损的实验研究,并以形态学为主的实验观察,对其有效性和可行性进行了评定和探讨。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介:戴 刚(1960—),男,甘肃省秦安市人,博士,副主任医师,主要从事脊柱外科及组织工程方面的研究,现在北京军区总医院骨科,北京 100700。电话:(010)64029345
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

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

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 种子细胞 按文献[4]的方法，接种密度为 3×10^4 个细胞/cm^2、经 Vit-C＋BMP_2 促增殖作用的第 3、4 代单层培养的 4～5 周龄日本大耳白兔关节软骨细胞。

1.1.2 支架材料 直径 4 mm、厚度 2 mm 和孔隙度 93.24％的自制 70％ CPPf/PLLA 纤维网状支架材料；经环氧乙烷熏蒸消毒 6 h，常温常压换气 24 h 备用[5]。

1.1.3 受体动物及分组 4～5 月龄、体重 2.0～2.5 kg 健康日本大耳白兔 9 只，随机分 3 组，每组 3 只；实验侧植入体外培养 3 周的细胞-支架复合体，空白对照侧不作任何植入，单纯支架侧植入 70％ CPPf/PLLA 支架材料。

1.1.4 主要试剂 鼠抗兔Ⅰ型胶原单抗（北京中山生物制剂公司）；鼠抗兔Ⅱ型胶原单抗（美国基因公司）；免疫组织化学检测试剂盒（武汉博士德公司）；DAB 显色剂（武汉博士德公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞-支架复合体构建及其体外培养 常规传代细胞培养液（DMEM＋10％胎牛血清＋0.1％青、链霉素）调整种子细胞（活度＞90％）密度为 3×10^7 个细胞/ml。将其接种于预湿支架，置于 12 孔板、37 ℃、5％CO_2 细胞培养箱孵育 8～10 h；镜下观察种植细胞与支架材料粘附后，分次添加培养液至 2.0 ml，连续培养 3 周。培养液每周更换 2 次。定时倒置显微镜下观察记录细胞生长情况及支架形貌变化。培养至第 3 周样品，PBS 液漂洗，2.5％戊二醛固定，扫描电子显微镜观察。

1.2.2 细胞-支架复合体异体移植修复关节软骨缺损实验研究

1.2.2.1 手术方法与术后处理 膝关节内侧纵形切口，显露股骨滑车关节面；在其中部制备直径＞3 mm、深 2 mm 的全层关节软骨缺损模型[6]。按实验分组嵌入植入物。缝合关节囊和皮肤。术后肢体不固定，任其自由活动。于术后第 4、8、12 周行大体和组织学观察。

1.2.2.2 观察指标 ①术后一般情况：观察动物肢体活动、饮食量及伤口愈合情况。②大体观察：关节内有无粘连、修复组织色泽与平整程度及与周围组织整合情况。③组织学观察：取修复部位组织，4％多聚甲醛溶液固定，12.5％EDTA-Na_2 脱钙[7]3 周（每周换液 2 次）。常规脱水，包埋，切片。分别采用 HE 染色及甲苯胺蓝染色，光镜下观察记录。④Ⅰ、Ⅱ型胶原免疫组织化学观察：采用免疫组织化学 ABC 法[7]。

2 结果

2.1 细胞-支架复合体体外培养

2.1.1 倒置显微镜观察 种子细胞接种于支架后 24 h，均以圆球形、密集附着于 PLLA 包被的 CPPf 上，呈单层串珠样；培养板底面可见极少数脱落细胞贴壁。

培养 1～2 周时，种植细胞呈复层串珠样，细胞密度较前增大。

培养 3 周时，种植细胞密度无明显改变。支架保持培养前的形貌。

2.1.2 扫描电子显微镜观察 培养 3 周时，支架 CPPf 上可见复层圆球形细胞，且呈串珠样排列，细胞密集；PLLA 包被表面可见散在微小颗粒，支架材料网状结构仍然存在，偶见 CPPf 降解后残留的 PLLA 中空条索。

2.2 细胞-支架复合体同种异体移植修复关节软骨缺损

2.2.1 一般情况 修复术后 1 周，缝合伤口均一期愈合，动物饮食量恢复正常；术后 3 周动物活动基本恢复。观察期内，实验动物无关节内感染，无四肢活动受限及跛行出现。

2.2.2 大体观察 术后 4 周，实验侧修复组织色泽灰白，表面较平整，与周围组织界限明显；空白对照侧缺损处为纤维状物覆盖，色泽较暗，表面凹凸不平，边缘清晰；单纯支架侧缺损处色泽深灰，表现稍凹陷，边界明显。

术后 8 周，实验侧修复组织色泽较前略白，表面平整，与周围组织部分整合，界限仍可辨认；空白对照和单纯支架侧缺损处色泽较前变淡，表面不整或凹陷明显，边界清晰。术后 12 周，实验侧关节表面光滑，修复组织与周围软骨基本整合，色泽相近，辨认困难；空白对照侧缺损处被纤维状物覆盖，缺损边缘不整，与周围组织界限清楚；单纯支架侧缺损处凹陷明显，色泽灰白，边缘清楚。

2.2.3 组织学观察 术后 4 周，实验侧缺损处内可见大量增殖的软骨细胞，细胞排列不规则，甲苯胺蓝染色阳性的基质较少，支架材料大部分降解吸收，小部分被包埋在软骨下骨中，修复面尚平整，与周围组织界限尚清，未见淋巴细胞浸润。空白对照侧和单纯支架侧缺损区由纤维组织覆盖，表面凹凸不平，凹陷明显；单纯支架侧支架材料基本降解吸收，软骨下骨中见含支架材料微粒的异物巨细胞。

术后 8 周，实验侧可见不典型的透明软骨组织，软骨细胞位于陷窝中，细胞数量较多，排列仍不规则，甲苯胺蓝染色阳性基质较前增多，修复面平整，修复组织厚度与邻近软骨相近；空白对照侧和单纯支架侧均为纤维组织覆盖，表面凹凸不平，凹陷明显，偶有类纤维软骨形成。

术后 12 周，实验侧修复软骨与邻近软骨整合紧密、厚度相近、细胞位于软骨陷窝中，数量较正常软骨仍多，富含甲苯胺蓝染色阳性基质，修复软骨结构与正常软骨相似，表层细胞呈椭圆形，长轴与关节面平行，中间区细胞呈圆形，放射区内细胞有柱状排列趋势，软骨下板基本修复，见图 1、2；空白对照侧和单纯支架侧缺损区仍由纤维组织覆盖，其下为软骨下骨，修复组织与邻近组织界限明显，表面凹陷不平整，偶见类软骨细胞。

2.2.4 Ⅰ、Ⅱ型胶原免疫组织化学检测结果 观察期内实验侧修复组织均有细胞及基质Ⅱ型胶原阳性表达，见图 3，且术后 12 周的表达强于术后 4 周和 8 周；而其Ⅰ型胶原始终仅有弱的表达。空白对照侧和单纯支架侧修复组织，始终无Ⅱ型胶原阳性表达，而有Ⅰ型胶原阳性表达。

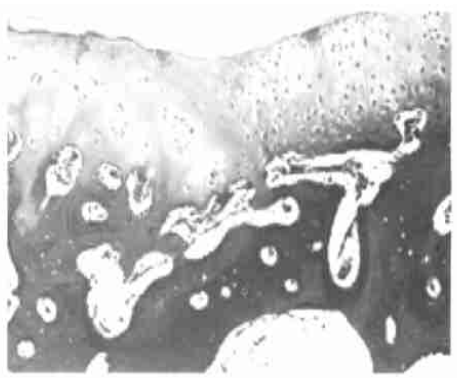


图 1 缺损修复 12 周实验组织学观察 （HE× 100）

Fig 1 Histological observation of repaired articular cartilage 12 weeks after cell-scaffold construct implantation （HE × 100）

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

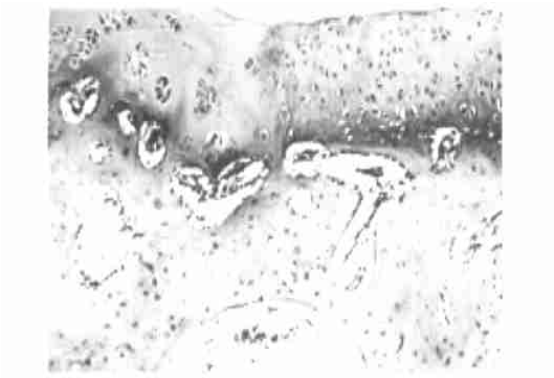


图 2　缺损修复 12 周实验组组织学观察　(甲苯胺蓝×100)

Fig 2　Histological observation of repaired articular cartilage 12 weeks after cell-scaffold construct implantation　(Toluidine blue× 100)

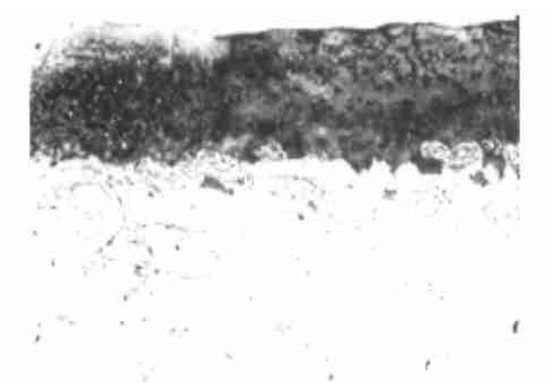


图 3　缺损修复 12 周实验组Ⅱ型胶原免疫组化染色　(S-P×100)

Fig 3　Immunohistochemical staining of type II collagen in repaired articular cartilage 12 weeks after cell—scaffold construct implantation　(S-P×100)

3　讨论

3.1　关节软骨细胞—支架材料复合体构建及其体外培养

组织工程的核心是建立由细胞和支架材料构成的三维空间复合体。这种三维空间结构为种植细胞提供获取营养、气体交换、排泄废物和生长代谢的场所, 同时也是形成新的具有形态和功能的组织、器官的物质基础[1, 8]。Freed[5] 及 Grande 等[9] 为进行软骨组织工程研究, 曾先后将体外消化分离、扩增培养的小牛关节软骨细胞接种于具有一定空间结构的三维立体支架(PLLA 包埋聚羟基乙酸纤维无纺网状支架材料和 PLLA 微孔海绵状支架材料)中进行体外组织培养, 培养期间观察到, 种植细胞相互重叠, 呈圆球状吸附在支架材料上, 并生长繁殖和分泌细胞外基质, 支架材料保持培养前的外形与结构。他们在种植细胞浓度对组织工程化软骨组织形成的影响研究中发现, 种植细胞浓度小于 2×10^7 个/ml, 只产生纤维组织, 当浓度为 2～10×10^7 个/ml 时, 有透明软骨产生, 无纤维组织形成[10]; 此外他们在对种植于聚羟基乙酸纤维无纺网状支架材料中的兔关节软骨传代细胞和原代细胞增殖和分化功能比较研究中发现, 种植在支架中的传代培养细胞和原代培养细胞, 以相近的速度增殖, 而其产生的胶原和硫化糖胺多糖的量明显高于原代培养细胞; 由此提出: 传代培养对种植软骨细胞的增殖功能无异常影响, 而且能够增强其分泌软骨基质的能力[9]。

选用适宜密度接种、并经 Vit-C+BMP-2 促增殖作用的单层传代培养幼兔关节软骨细胞, 并以生物相容性和生物降解性良好、抗压模量优于国外同类材料、结构与性能优化的 CPPf/PLLA 自制高孔隙度、纤维网状复合材料为支架所制备的软骨细胞-支架材料复合体, 其体外培养倒置显微镜和扫描电子显微镜观察结果, 与 Freed[5] 及 Grande 等[9] 的实验结果相近, 种植细胞呈圆球状附着于支架材料上, 相互重叠粘附, 并生长繁殖和分泌细胞外基质, 支架材料保持培养前的外形与结构。有关软骨细胞-CPPf/PLLA 支架复合体体外培养过程中, 种植细胞增殖及基质分泌的定量变化规律尚待进一步研究。

3.2　关节软骨细胞-新型支架材料复合体异体移植修复关节软骨缺损

有关组织工程化动物关节软骨同种异体移植修复关节软骨缺损的研究, 近年来报道较多, 并均取得良好效果[2, 6, 9, 10]。应用组织工程技术移植修复关节软骨缺损的优点在于: ①能够形成具有生命力的活性组织, 从而对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代; ②可以最少量的组织细胞, 经体外培养扩增后, 用于修复大块的组织缺损, 达到无损伤修复创伤和真正意义上的功能重建; ③可按组织缺损情况任意塑型, 达到完美的形态修复; ④可通过关节镜植入, 以减小手术创伤影响[8]。

在完成关节软骨细胞-支架材料复合体体外构建与培养基础上所进行的该复合体同种异体移植修复关节软骨缺损的病理形态学观察结果表明, 修复后的关节软骨表面光滑, 与邻近组织整合良好; 放射区软骨细胞呈柱状排列趋势; 硫化糖胺多糖在空间上分布较均匀; 修复组织为透明软骨; 软骨下板得以重建; 修复组织与其下面的骨质结合紧密。实验期间, 植入的同种异体软骨细胞未观察到受体动物的免疫排斥反应。上述结果与 Freed 等利用软骨组织工程技术异体移植修复免关节软骨缺损实验结果基本相同[6, 9, 10]。而其中修复组织中细胞数量较多, 以及新生软骨结构与邻近组织略有差异, 可能与本实验观察时间较短, 新生软骨尚未完全成熟有关。此外, 要确保临床应用同种异体组织工程化软骨移植修复软骨缺损的长期有效性和稳定性, 有必要深入进行其体内转归及移植免疫学的长期观察和研究。

参考文献:

[1] Temenoff J S, Mikos A G. Tissue engineering for regeneration of articular

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

cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21(3): 431—440.
[2] Minas T. The role of cartilage repair techniques, including chondrocyte transplantation, in focal chondral knee damage[J]. AAOS Inst Course Lect, 1999, 48(4): 629—643.
[3] Goldberg V M, Caplan A L. Biologic resurfacing of articular surfaces[J]. AAOS Inst Course Lect, 1999, 48(4): 623—627.
[4] 戴 刚, 李起鸿, 周 强, 等. 关节软骨组织工程种子细胞的优化获取[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 129—131.
[5] Freed L E, Marquis J C, Nohria A, *et al*. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(1): 11—23.
[6] Freed L E, Grande D A, Lingbin Z, *et al*. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biogradable polymer scaffolds[J]. J Biomed Mater Res, 1994, 28(5): 891—899.
[7] 席 越 主编. 骨组织病理解剖学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 136, 165.
[8] Nerem R M, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes[J]. Tissue Eng, 1995, 1(1): 3—13.
[9] Grande D A, Halberstadt C, Naughton G, *et al*. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 34(2): 211—220.
[10] Constance R C, Coutts R D, Yoshika M, *et al*. Articular cartilage repair using allogenetic perichondrocyte-seeded biogradable porous polylactic acid (PLA): a tissue engineering study[J]. J Biomed Mater Res, 1995, 29(6): 1 147—1 156.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)05-0566-01

快速经皮穿刺肺活检对不典型肺结核诊断价值的探讨

Diagnostic value of rapid percutaneous needle lung biopsy for atypical pulmonary tuberculosis

戴晓天, 杨和平, 胡建林 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科, 重庆 400038)

本研究对采用 BARD 可调式自动活检枪快速经皮穿刺肺活检(Percutaneous needle lung biopsy, PNLB)确诊的 8 例不典型肺结核病例进行分析, 旨在初步探讨快速 PNLB 对不典型肺结核的诊断价值。

1 临床资料

一般资料: 2000 年 10 月至 2001 年 7 月通过快速 PNLB 检查, 并均经病理证实肺结核患者 8 例, 其中 1 例合并其它细菌感染。8 例患者中, 男 6 例, 女 2 例, 平均年龄 49(28～65)岁。

临床表现及实验室检查: 8 例肺结核患者中, 发热 3 例, 均无盗汗, 胸痛 3 例, 咯血 2 例, 咳嗽、咳痰 3 例, 其中咳白色泡沫痰 2 例, 黄脓痰 1 例, 胸闷、气促 2 例。血沉: 4 例增快, 1 例正常, 3 例未查。结核菌素的纯蛋白衍化物(Purified protein derivative, PPD)试验: 5 例(－), 1 例(＋), 2 例未查。痰涂片找抗酸杆菌: 3 例(－), 4 例因无痰未做检查, 1 例于 PNLB 后(＋＋)。纤支镜检查: 6 例纤支镜下未见病变, 2 例支气管腔内见息肉样肿物, 活检为慢性炎, 8 例刷检均未见抗酸杆菌。

影像学检查: 胸部 CT: 病灶分布, 4 例位于下叶背段; 2 例位于上叶前段; 1 例位于舌叶; 1 例位于上叶尖后段及中叶外段。病灶形态, 6 例呈局限片状密度增高影或团块状影(直径＞3 cm); 2 例呈散在小结节影。

快速经皮穿刺肺活检: 经胸透或胸部 CT 定位, 常规消毒铺巾, 局麻后在胸透或胸部 CT 引导下, 将 BARD 一次性活检针(18G)穿刺到病灶内, 接 BARD 可调式自动活检枪进行快速切割, 获取 0.8 mm×(10～15)mm 组织条。常规穿刺 1～2 针, 获取组织 1～2 条, 取材成功率、标本合格率均为 100%(8/8)。术后 3 例少量血痰, 1 例少量气胸, 均未治自愈。

2 讨论

不典型肺结核因可酷似许多其他肺部疾病, 且可能合并有一般细菌感染, 这些均使其临床表现缺乏特异性, 故在临床上易误诊。痰涂片找抗酸杆菌是确诊肺结核的主要依据, 但仍约有 40%的患者痰菌阴性。纤支镜检查对不典型肺结核的诊断具有重要价值[1], 但对肺周边部及管腔外病变的诊断往往较困难。经皮穿刺细针负压吸引活检常因不能获得足够的组织标本, 多只能行细胞学和细菌学检查, 阳性率常较低[2]。本研究 8 例患者临床表现各异, PPD 试验 5 例为阴性, 术前痰中及纤支镜刷检均未找到抗酸杆菌, 纤支镜检查均未能确诊, 影像学检查提示肺癌、结核、肺脓疡。虽然临床上已按标准方案诊断性抗结核治疗, 但缺乏确诊依据。经采用 BARD 可调试自动活检枪快速 PNLB 后, 均获得了结核组织病理学诊断。同时通过对穿刺物送结核菌培养＋药敏检查, 为患者的进一步治疗提供了合理化疗方案。传统观点认为经纤支镜肺活检阳性率与 PNLB 相近, 并发症低于 PNLB, 为首选的肺活检技术。但对 8 例不典型肺结核患者的确诊中体会到, 采用 BARD 可调式自动活检枪进行 PNLB, 取材标本满意, 阳性率高, 且操作简单, 术后并发症少, 耐受性好。因此作者认为对于临床上考虑不典型肺结核的患者, 病灶位于肺周边部, 可优先考虑采用可调式自动活检枪快速 PNLB 明确诊断。

关键词: 肺活检; 肺结核; 诊断
中图法分类号: R521.04 文献标识码: B

参考文献:

[1] 罗慰慈. 现代呼吸病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 547.
[2] 陈晓荣, 杨 瑞. CT 引导下经皮穿刺肺活检的临床应用. 河南职工医学院学报[J], 2000, 12(3): 22.

(编辑 冷怀明)

作者简介: 戴晓天(1973—), 男, 四川省乐山市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事肺癌方面的研究。电话: (023)65310578

收稿日期: 2001-12-10; 修回日期: 2002-04-10

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