DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.005
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1139-04

论著

经离心管培养骺软骨异体修复兔骺板部分损伤的初步观察

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

提 要:目的 初步观察经离心管培养生成的骺软骨异体修复兔胫骨骺板部分损伤。方法 酶消化法分离骺板软骨细胞,以90万细胞离心沉降于15 ml塑料离心管底,培养生成骺软骨组织,大体、倒置显微镜、组织学观察;异体移植修复兔胫骨内侧骺板部分损伤模型,X线摄片、组织学大体和光镜观察。结果 ①离心管内生成的骺软骨外周组织结构类似于骺软骨的生发层,由多层细胞构成,培养3周时有6~8层细胞,随时间的延长而减少;中心部位为肥大的细胞,随培养时间的延长而增多。②X线片示实验组胫骨内翻和短缩畸形轻微,而对照组畸形严重。实验组2周骺板缺损充填区形成比骺板宽的新软骨组织,近骨端侧及中心部结构较紊乱,远骨端侧的组织结构与骺板相同;4周时已改建成了良好的骺板结构,生发层比正常骺板宽,与未损伤区分界清楚,为薄层软骨膜样组织相隔。对照组骺板缺损区有广泛的骨桥形成,4周时骨端变形严重。结论 应用组织工程技术从组织结构和功能上修复骺板损伤是可行的;离心管内骺软骨培养3周是植入体内的较佳时机;体外培养生成的骺软骨组织在骺板缺损区的生理环境作用下可以改建为具有良好定向生长功能的骺板结构。

关键词:生长板;组织工程;软骨细胞
中图法分类号:R329.2;R681.4 文献标识码:A

Preliminary study of repairing defects of partial growth plates with allogeneic epiphyseal cartilage cultured in centrifuge tubes in rabbits

ZHOU Qiang, LI Qi-hong, DAI Gang, YANG Liu (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the reparation of defects of partial tibial growth plates in rabbits with allogeneic epiphyseal cartilage cultured in centrifuge tubes. **Methods** Chondrocytes were isolated by enzyme digestion of growth plates of rabbits. Cartilage was formed after the pelleted mass of 9×10^5 chondrocytes was cultivated in a plastic centrifuge tube. The allogeneic cartilage after the cultivation for three weeks was transplanted into the area of defects of tibial growth plates. The gross anatomy, histological and roentgenographic changes of the engineered cartilage were investigated. **Results** ①The periphery of epiphyseal cartilage formed in a centrifuge tube resembled the germinal layer of a growth plate and consisted of several cellular layers, 6~8 layers of cells existed at the 3rd week after cultivation, and decreased with time. Its central part consisted of hypertrophic chondrocytes, and increased with time. ② Revealed by the roentgenograms, varus and shortening deformation of the tibia in the experimental group was significantly slighter than that in the control. At the 2nd week after operation, defects of growth plates were filled with a new cartilaginous layer which was thicker than the normal growth plate in experimental group, the proximal and middle parts of which had disorganized histological structure and the distal part had the same histological structure as growth plate. At the 4 th week, the structure rebuilt very well in the defects of growth plates, the germinal layer of that was still thicker than the normal. A small gap existed between the rebuilding area and the whole, which was filled with thin periosteum-like tisse. In the control, bone bridge was widely formed in the defects. **Conclusion** The cartilage cultivated in a centrifuge tube for three weeks is suitable for transplantation into the defect of the growth plate, and can be rebuilt into epiphyseal cartilage with good growing function in the local physiological microcircumstance. It is feasible to repair the defects of the growth plate with tissue engineering technique.

Key words: growth plate; tissue engineering; chondrocyde

各种伤病引起的儿童骺板早闭,临床常采用骨桥切除并以不同材料充填以防止骨桥复发,虽有一定疗效,但疗效既不理想也不稳定,尤其是严重的骺板损害[1]。其中重要原因之一是骺板自身再生能力有限,常用充填材料又不具有再生骺板软骨的能力。因此,目前缺乏较理想的充填材料。近年来,新兴的组织工程技术为这一问题的解决带来了契机。本实验对离心管内培养生成的骺软骨组织异体移植修复兔胫骨骺板部分缺损进行了初步观察。

1 材料和方法

1.1 兔骺软骨细胞的分离、培养及观测

解剖分离3周幼兔四肢长骨骺板,剪成约1 mm^3碎块。酶消化后,经70 μm滤网过滤收获原代骺软骨细胞,台盼蓝排除法细胞活性计数。每90万活细胞以1 500 r/min离心沉降于15 ml塑料离心管底,加含10%胎牛血清的IMDM培养液,在5% CO_2、37 ℃条件下培养,隔天2/3量换液。倒置显微镜观察,分

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39830100),全军"十五"医药卫生科研基金重点课题(01Z072)
作者简介:周 强(1965-),男,河北省乐亭县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事组织工程及骨病研究。电话:(023)68754164
收稿日期:2001-07-10;修回日期:2001-08-14

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

别于培养 1、2、3、4、5、6 周采集标本，测量大小，10%中性福尔马林固定，常规石蜡切片、HE 染色，光镜观察。

1.2 动物模型的制作、实验分组及观测

4 周龄的健康日本大耳白兔 18 只(由第三军医大学实验动物中心提供)，体重为 350~450 g。手术取右侧胫骨上端前内侧切口，切除胫骨上端前内侧骺板[1]，约为总面积的 30%。实验组 9 只动物，植入离心管内培养 3 周的骺软骨组织，缝合筋膜及皮肤；对照组 9 只动物，手术操作同实验组，骺板切除区不做充填。对侧胫骨作为正常对照。于术后 2、3、4 周分批处死动物采集标本。双侧胫骨标本摄 X 线正位片，以正常侧为对照测量手术侧胫骨内翻成交畸形角度和短缩畸形的百分率。10%中性福尔马林固定标本，经脱钙后，行剖面大体观察照相，常规石蜡切片、HE 染色，光镜观察。

1.3 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 t 检验。

2 结果

2.1 离心管内培养生成骺软骨组织的观察

2.1.1 大体及倒置显微镜观察　细胞团培养 3~4 d 开始收缩，1 周时体积开始增大，细胞团逐渐变为白色半透明的结节样软骨组织。倒置显微镜下见其细胞呈圆形，有丰富的细胞外基质相隔，3 周时直径为 3~3.5 mm、高为 2.0~2.5 mm，第 4 周直径为 4~4.5 mm 、高为 2.2~3.0 mm，以后无明显增大。

2.1.2 光镜观察　软骨组织块的外周部分组织结构类似于骺软骨的生发层或软骨膜，由多层圆形、卵圆形或梭形细胞组成，细胞间有丰富的胞外基质，培养 3 周时有 6~8 层细胞见图 1，以后随培养时间的延长其宽度变窄、细胞数量减少，6 周时仅有 1~3 层细胞。中心部位与外周界限明显，为肥大的软骨细胞，随时间的延长细胞数量增多，越近中心细胞体积越大，3 周有不规则的同源细胞柱状排列形成，4 周后组织块中心开始出现肥大细胞的坏死溶解。

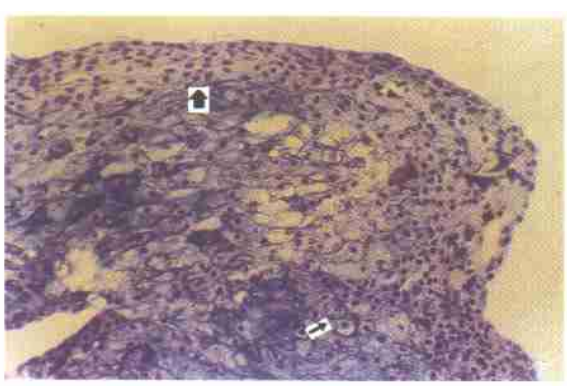


图 1　培养 3 周的骺软骨中心部为肥大的软骨细胞(↑)，外周为较厚的类生发层(⬆)　(HE× 200)

Fig 1　The hypertrophic chondrocydes(↑) in the central part, the wide germinal-like layer (⬆)) in the peripheric part of the epiphyseal cartilage at the 3rd week of cultivation (HE× 200)

2.2 胫骨上端内侧骺板缺损修复的观察

2.2.1 X 线标本摄片观察　实验组植入工程化骺软骨组织 4 周尚未见骺板闭合，见图 2A，而对照组 3~4 周即见典型的骺板早闭，见图 2B。实验组各时相的胫骨内翻成角和短缩畸形均显著小于对照组，各时相 X 线片测量数据见表 1。

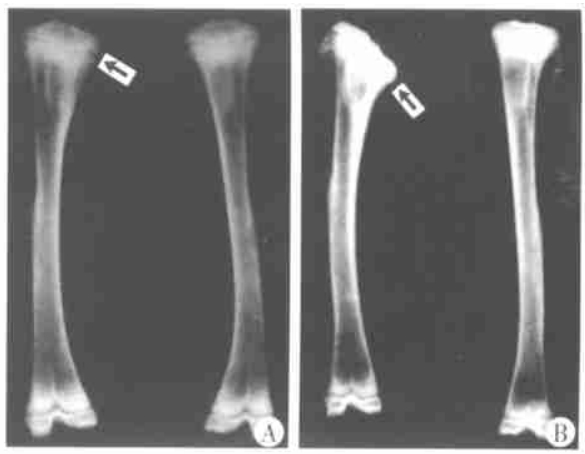


图 2　术后 4 周术侧胫骨(⬆)X 线片

A：实验组；B：对照组

Fig 2　Roentgenogram of tibia 4 weeks after operation(⬆)

A: Experimental group; B: Control

表 1　X 线片胫骨畸形数据

Tab 1　Roentgenographic data of tibial deformaty

	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Varus			
Experimental	1.2°±0.46° *	2.6°±0.72° *	4.0°±0.56° *
Control	10.21°±3.10°	15.5°±3.90°	19.0°±3.29°
Shortening			
Experimental	(2.38±1.50)% **	(2.64±0.57)% *	(2.90±0.52)% *
Control	(7.61±2.08)%	(10.48±2.45)%	(12.11±1.91)%

*：$P<0.01$，　**：$P<0.05$ *vs* control

2.2.2 组织病理观察　大体观察：实验组 2 周骺板缺损充填区形成了外观与骺板相同的组织，但比正常骺板宽得多，见图 3A，3 周后逐渐变窄，4 周时仍比正常骺板稍宽见图 3B。对照组 2 周即见骨组织通过骺板缺损区，4 周时骨端变形严重。

光镜观察：实验组 2 周骺板缺损区为软骨组织所充填，近骨端侧及中心部结构较紊乱，而远骨端侧的组织结构与骺板相同，见图 4。在与骺板未损伤区的临界部有少量骨小梁通过；3 周骺板缺损充填区近骨端侧及中心部软骨组织开始骨化并被松质骨分割为大小不一的软骨岛；4 周已改建为典型的骺板结构，生发层比未损伤部宽，其上部仅残留少量小软骨岛，与未损伤区分界清楚，有薄层软骨膜样组织相隔，缺损区外缘部重建的 Ranvier 骨化沟结构与正常基本相同，见图 5。在实验观察各时相植入物周围均未见明显炎症细胞浸润。对照组骺板缺损区在各观察时相均有广泛的骨桥形成。

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

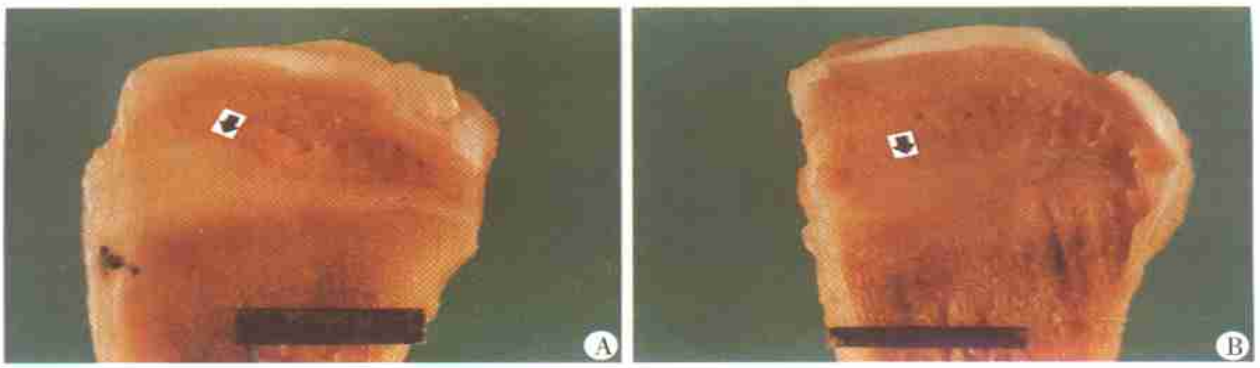


图 3　实验组缺损充填区(⬆)(图条为 0.5 cm)　A: 2 周; B: 4 周

Fig 3　Filling defects of the growth plate (⬆) in the experimental group (the bar is 0.5 cm)　A: 2nd weeks; B: 4th week

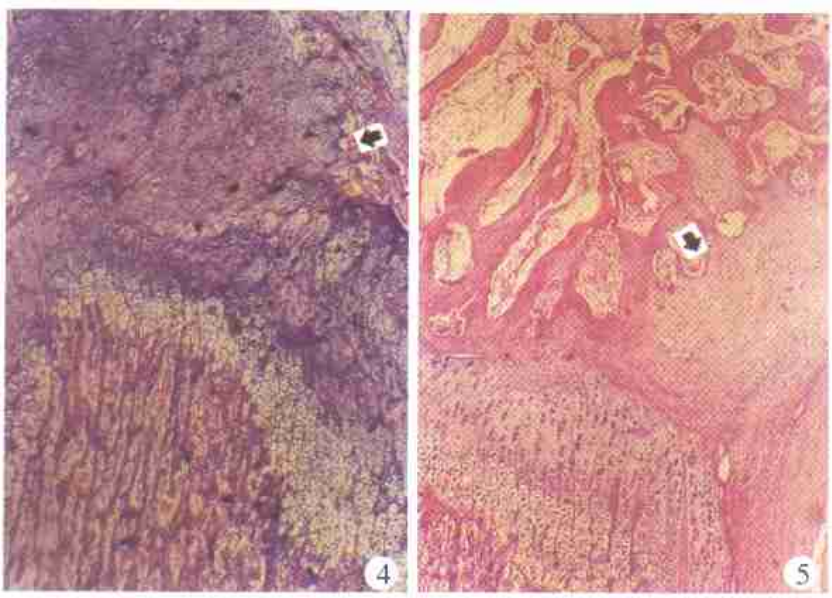


图 4　实验组 2 周骺板缺损区为软骨组织充填(⬆), 远骨端侧(下)组织结构与骺板相同　(HE× 40)

Fig 4　The physeal defect of the experimental group was filled with cartilage (⬆) at the 2nd week, its distal(lower) part had the same histological structure as growth plate　(HE× 40)

图 5　实验组 4 周缺损区外缘部重建的 Ranvier 骨化沟(⬆)　(HE× 40)

Fig 5　The Ranvier's ossification grooves at the outer edge of physeal defects rebuilt(⬆) in the experimental group at the 4th week　(HE× 40)

3　讨论

骺板早闭是小儿骺板损伤常见的严重并发症。Langenskild[2] (1967 年)首次报道了以骨桥切除充填脂肪治疗部份骺板早闭取得了良好疗效。随着临床和实验资料的积累, 发现脂肪充填后也会出现短期内骨桥复发及效果不佳, 认为导致手术失败的主要原因在于术后出血使脂肪漂移及脂肪力学强度差[3]。因此, 人们尝试用骨水泥、硅胶、骨腊、肌肉及明胶海绵等替代脂肪。但疗效报道不一, 且不能确定其效果优于自体脂肪。与上述材料相比, 自体骺板软骨移植能够修复损伤的骺板并恢复其生长功能, 而不依赖于未损伤骺板的再生[4,5]。近年来, 亦有带血管骺软骨移植修复骺板损伤取得良好效果的临床报道[6,7]。但自体骺板移植必然造成新的损伤和畸形, 甚至功能障碍等远期并发症, 且组织来源极有限, 在临床上难以广泛应用。组织工程技术的兴起为骺板损伤修复提供了新的手段。

日本学者 Kato[8] 于 1988 年首先报道以兔肋骨生长板软骨细胞 8 万沉降于塑料离心管底培养生成了软骨组织。而后颜炜群等[9] 将 Kato 的方法加以改进培养生成了骺板样软骨组织。我们以 90 万细胞沉降, 培养生成了组织结构类似于骺软骨的软骨组织, 组织块的体积比前者大, 基本可以满足本实验中骺板损伤修复的要求。从观察结果看, 培养 3 周时组织块中心很少发生细胞坏死, 外周类生发层仍较宽, 有较多具生长潜能的细胞, 组织块形成的大小也满足所用动物模型骺板缺损区的充填要求。因此, 我们选用培养 3 周的骺软骨作为移植对象。

动物实验的结果表明, 实验组虽然有一定短缩和成角畸形出现, 但比对照组轻得多, 在观察时间内疗效是非常显著。组织学观察说明, 经培养的骺软骨在植入区可以逐步被改建为具有良好定向生长功能的骺板结构, 周围的生理环境可能起了关键性的作用。在植入物与未损伤骺板间存在一狭窄间隙, 可能是导致实验组胫骨发生轻度畸形的主要原因。但随着时间的延长这一间隙没有加宽, 而是逐步缩小。可能是由于经

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

离心管培养的骺软骨植入后，表面形成的类软骨膜结构使其具有横向生长能力。我们的观察结果与 Lee[1] 用自体软骨细胞移植修复兔骺板损伤的结果基本一致。

因此，我们初步认为应用组织工程技术从组织结构和功能上修复骺板损伤是基本可行的。但存在一些问题需要进一步深入研究和解决。首先，由于离心管内构建的骺软骨组织形状和大小受到限制，不适合未来临床应用的要求，需要探索适宜的组织工程支架材料和构建方法；其次，植入物与植入区骺板组织间的间隙必然由出血所充填，而这将导致骨桥形成[2]，如何使经体外培养生成的软骨组织与植入区骺板很好融合，是需要解决的技术问题；再者，体外生成软骨组织的异体移植免疫是一个不能回避的问题，需要全面研究和深入探讨。

参考文献：

[1] Lee E H, Chen F, Chan J, *et al*. Treatment of growth arrest by transfer of cultured chondrocytes into physeal defects[J]. J Pediatr Orthop, 1998, 18(2): 155—160.

[2] Langenskiold A. Partial closure of the epiphyseal plate: Principles of treatment[J]. Clin Orthop, 1993, 297: 4—6.

[3] 朱志宏，马承宣，许瑞江，等. 骺板部分早闭的研究进展[J]. 中华小儿外科杂志，1997，18(6)：368—369.

[4] Martiana K, Low C K, Tan S K, *et al*. Comparison of various interpositional materials in the prevention of transphyseal bone bridge formation[J]. Clin Orthop, 1996, 325: 218—224.

[5] Takato T, Harii K, Komuro Y, *et al*. Experimental study on growth of epiphysial plate: free graft in rabbits[J]. Br J Plast Surg, 1993, 46(5): 416—420.

[6] Innocenti M, Ceruso M, Manfrini M, *et al*. Free vascularized growth-plate transfer after bone tumor resection in children[J]. J Reconstr Microsurg, 1998, 14(2): 137—143.

[7] 王树锋，吕占辉，王明山，等. 带血供腓骨小头骨骺移植的解剖与临床研究[J]. 中华骨科杂志，2000，(12)：99—102.

[8] Kato Y L, Iwamoto M, Koike T, *et al*. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(24): 9 552—9 556.

[9] Yan W Q, Tong M H, Yang T S, *et al*. Reorganization of isolated chondrocytes into growth plate-like tissue in pelleted cultures[J]. J Bone Miner Met, 1995, 13: 77—80.

（编辑 陈聪连）

（上接1138页）

脉，先结扎最粗的静脉，然后到较细的静脉。一助手送镜对准欲结扎的曲张静脉，并使胃镜与曲张静脉欲结扎部位紧密接触，另一助手通过辅助吸管协助术者持续吸引，使之吸入结扎器塑料帽中并出现“红色征”，保持吸引的同时术者向前旋转手柄直至“卡”一声响，而后，术者和助手同时放松吸引、充气，同时稍退出内镜观察结扎情况。同法依次将剩余的橡皮圈结扎曲张的静脉。

1.2.4 术中护理 ①术中密切观察生命体征及病情变化。②按紧牙垫，防止牙垫脱落。③对恶心剧烈者，嘱做深呼吸以减轻症状。④送镜者将患者下巴稍向下压以利呕吐物、分泌物顺嘴角流出。⑤大量呕血影响呼吸时及时退出胃镜严防窒息。

2 结果

近期止血效果18例即刻止血率100%，术后1例患者于结扎后1周进食干饭诱发上消化道大出血死亡，余患者术后2周复查曲张静脉基本消失4例，明显好转13例。

3 手术配合体会

3.1 心理护理

做好心理护理，消除患者紧张、恐惧心情，保持放松状态是确保手术顺利的重要环节。对于病人来说，大多认为手术非同小可，顾虑重重，故应做好术前教育，说明手术的必要性，手术的过程和感受，熟悉配合手术的注意事项，使病人有充分的思想准备。

3.2 改善病人的一般情况，提高耐受力

胃镜套扎是一种侵入性操作，有较粗的插入管置于咽及上食道，对有严重心脏疾患，呼吸困难及血色素过低的病人常不能耐受而发生意外，而食道静脉曲张破裂大出血系粘膜下较大的曲张的深静脉破裂，亦或系与这些深静脉直接沟通的浅表静脉丛较大的交通支破裂所致[1]，因而出血较其他上消化道出血来势凶猛，病人一般情况较差，血色素低，术前适当纠正病人一般情况可减少意外发生。

3.3 安装设备要恰当

①胃镜的外径和活检孔道要适合才能将结扎器套在其上。②旋转手柄与胃镜操作部之间垫上纱布或海绵，然后用绳索扣紧，以防旋转手柄在套扎时摇摆。③拉紧牵引钢丝不能用旋转手柄的做法，因旋转手柄的每一圈距离是固定的，我们在操作过程中因用旋转手柄拉紧钢丝导致橡皮圈滑出至塑料帽前端，影响视野。

3.4 确保吸引压力充足

①旋转手柄一定要紧压在活检孔道阀门处橡皮盖上，不能留出空隙，否则吸引时漏气。②准备新的专用内窥镜吸引器，并盖紧橡皮盖，紧密接好吸引管，确保吸引通道的密闭性。③助手通过辅助吸管加强吸引。④套扎前一定要试吸引。

关键词：食管静脉曲张；曲张静脉破裂出血；内镜套扎治疗
中图法分类号：R571.305 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李益农，陆星华 主编. 消化内镜学[M]. 北京：科学出版社，1998. 177—535.

（编辑 汪勤俭）

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