

· 基础研究 ·

两种方法保存人体透明软骨行异种移植的实验研究*

栾保华 薛文君 王永前 薛峰 吕仁荣 张健 初晓莲 马晓东 褚莹莹

山东省立医院 山东大学临床医学院美容整形外科(济南 250021)

【摘要】目的 探讨不同方法保存的人体透明软骨,异种移植后软骨存活的动态变化及在整形外科应用的可行性。方法 选择 48 只新西兰种成年白兔,随机分为两组,每组 24 只,分别接受 -198°C 液氮冷冻和 75% 酒精灭活法保存的人体透明软骨移植,观察一年。术后每 3 个月比较两组血清 IgG、IgM、IgA、C₃、C₄、PFB(补体 B 因子)含量,每月随机抽取两组各两只兔子取移植软骨块观察其外形、色泽,测重量。比较光学显微镜和透射电镜下的组织学变化。结果 两实验组各时间点 IgG、IgM、IgA、C₃、C₄、PFB 含量与术前相比无显著性差异, $P > 0.05$ 。深低温保存法软骨移植后 1~2 个月内重量略有增加,3 个月重量开始减少,至 1 年达最低点。光学显微镜下观察 2 个月可见新生不成熟软骨细胞。3 个月时软骨开始出现退行性变,至 6 个月时明显加重。酒精灭活移植软骨重量无明显变化,仅在 6 个月时开始出现轻度退行性变。透射电镜下观察的变化规律基本与光学显微镜下的观察结果相一致。结论 酒精灭活法保存的人体透明软骨用于异种移植后,外型变化小,提示其临床应用可行性优于液氮冷冻保存法。

【关键词】透明软骨 异种移植

中图分类号 R-332

文献标识 A

文章编号:1009-6604(2002)04-0241-03

A study on heterotransplant between two kinds of methods in conserving hyaline cartilage. Luan Baohua, Xue Wenjun, Wang Yongqian, et al. Department of aesthetic plastic surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China.

【Abstract】Objective To compare the effects of heterotransplant between two kinds of methods in conserving hyaline cartilage. Methods 48 adult white rabbit of New Zealand species were divided into two groups randomly. Each groups received human hyaline cartilage preserved by methods of -198°C liquid nitrogen cryopreservation or 75% alcohol inactivation. Serum IgG, IgM, IgA, C₃, C₄, PFB levels were compared each 3 months with that before operation. The contour, color and luster change of histology of hyaline cartilage were examined in light microscope and electron microscope and the gravity were weight each month. Results IgG, IgM, IgA, C₃, C₄, PFB had no significant change after transplant ($P > 0.05$). The weights of transplanted hyaline cartilage began to increase in 1~2 months and then decreased after 3 months in methods of liquid nitrogen cryopreservation and reached their minimum gravity at the end of one year. Neoformative immature hyaline cartilage were observed after 2 months, slight degeneration were observed after 3 months and degeneration reached their zenith in light microscope after 6 months. The weights had no change in methods of alcohol inactivation and slight degeneration began to occur after 6 months and which were similar in electron microscope. Conclusions Human hyaline cartilage preserved by methods of alcohol inactivation had slight change in contour and had no rejection when they were heterotransplanted. So it suggested that their clinical application feasibility may be better than that of liquid nitrogen cryopreservation.

【Key words】heterotransplant hyaline cartilage

在器官修复与重建过程中,异体软骨是最常用的充填材料之一^[1,2]。本研究选择不同方法保存的人体软骨用于异体移植,旨在研究一种能使异体软骨抗原性降低到最小,生物学性能稳定、植入体内后不变形的保存方法,为临床应用异体软骨替代自体软骨提供科学依据。

材料和方法

一、材料

1. 供体软骨制备及保存:无菌条件下取新鲜成人尸体透明肋软骨,1%新洁尔灭冲洗两遍,再用生理盐水冲洗后,用两种方法分别保存三个月:1)深低温保存法:将制备好的新

鲜软骨无菌条件下密封于塑料袋内,浸泡于 -198°C 液氮溶液中。2)酒精灭活法:将制备好的新鲜软骨浸泡于 75% 酒精溶液中,常温下保存。

2. 受体动物及分组:用我院动物实验室提供并饲养的新西兰成年白兔 48 只雌雄不限,体重(2~3.5)kg,随机分成 A、B 两组,每组 24 只。每只实验动物分别植入 2 块同组软骨。

二、方法

1. 移植前准备:两组软骨各取一块分别做光学显微镜和透射电镜观察,做细菌培养。将每组每块软骨外形色泽逐一记录,每块软骨重量均为 2g。每只动物抽血测 IgG、IgM、IgA、C₃、C₄、PFB(补体 B 因子)含量。脊柱两侧备皮。

2.手术方法 2%戊巴比妥麻醉下,选择动物背部中线左右各旁开 2cm 处,无菌条件下分别作一垂直 2cm 切口,沿肌膜下向两侧钝性分离,范围约 2cm×3cm,将制备好的同组软骨 2 块分别植入双侧肌膜下,逐层缝合,龙胆紫外涂。

3.术后监测 ①每半月检查一次动物存活状况及植骨区情况,观察有无骨块外露及感染。②每月两组各随机抽取两只动物无菌条件下取出移植骨块,记录外形、重量、色泽、细菌生物学培养,并于光学显微镜和透射电镜下观察其组织学变化,持续至 12 个月。③分别于术后每 3 个月从未取移植软骨动物中抽取静脉血,测 IgG、IgM、IgA、C₃、C₄、PFB 含量。

4.统计学分析,用 SPSS10.0 统计软件行统计学分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

结 果

1.外型、重量、色泽变化。

表 1 不同方法移植后前 6 个月软骨重量的改变 (g)

移植时间	术前 n = 4	术后 1 个月 n = 4	术后 2 个月 n = 4	术后 3 个月 n = 4	术后 4 个月 n = 4	术后 5 个月 n = 4	术后 6 个月 n = 4
冷冻组	2.00±0.00	2.01±0.21	2.01±0.19	1.99±0.20	1.98±0.19	1.98±0.21	1.98±0.17
灭活组	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.11	2.00±0.18	1.98±0.17	1.98±0.21

表 2 不同方法移植后后 6 个月软骨重量的改变 (g)

移植时间	术前 n = 4	术后 7 个月 n = 4	术后 8 个月 n = 4	术后 9 个月 n = 4	术后 10 个月 n = 4	术后 11 个月 n = 4	术后 12 个月 n = 4
冷冻组	2.0±0.0	1.98±0.19	1.97±0.23	1.97±0.25	1.95±0.17	1.94±0.15	1.80±0.28
灭活组	2.0±0.0	1.98±0.19	1.98±0.21	1.97±0.30	1.97±0.31	1.97±0.15	1.96±0.16

用 SPSS10.0 软件行单因素方差分析,冷冻组、灭活组前 6 个月 F 值分别为 2.74、2.49, P 值均 > 0.05 ,表明无显著性差异。

灭活组后 6 个月 F 值 2.86, P 值 > 0.05 ,表明无显著性差异。冷冻法后 6 个月 F 值为 48.13, $P < 0.05$,表明各组间有显著性差异,再用 SNK 法 (Q 检验) 进行均数之间的两两比较,除术后 10、11、12 个月与其它各组有显著性差异,其余均无显著性差异。

2.光学显微镜观察 ①深低温冷冻软骨及酒精灭活软骨植入前均未见明显改变,其软骨细胞呈圆形或椭圆形,居于软骨陷窝内,胞浆蓝染,核居中或偏于一侧,软骨基质呈均匀浅蓝色。②冷冻软骨移植后 1~2 个月与移植前相比可见有新生软骨细胞生长,光学显微镜下细胞数量明显增多,且多为不成熟状 (图 1)。移植后 3 个月出现退行性变,软骨细胞肥大,空变或固缩,软骨基质出现钙化,软骨周围出现少量淋巴细胞浸润。6 个月后软骨骨膜下可见退行性变,淋巴细

胞、巨噬细胞浸润,软骨细胞空变或固缩。③酒精灭活软骨植入 6 个月内几无变化,7 个月始仅出现轻度退行性变。

3.透射电镜观察 ①冷冻软骨 种植前软骨细胞位于软骨陷窝内,呈圆形或椭圆形,胞核呈圆形或马蹄形,胞质丰富 (见图 2)。移植后 1~2 个月,软骨细胞未见明显变化,细胞结构存在,胞质中可见许多大小不一的空泡。移植 3 个月,软骨细胞间质未见明显变化,微纤维和细胞间质颗粒尚存在,软骨细胞膜消失,胞质密度不一,染色深,多数细胞无胞核,少数细胞的结构消失。移植 6 个月后,基质内出现空泡,微纤维较前模糊,大部分软骨陷窝内可见散在的细胞碎片,软骨细胞结构消失,细胞内未见到明显的细胞器存在 (见图 3)。②酒精灭活软骨 种植前软骨细胞位于软骨陷窝内,呈圆形或卵圆形,细胞膜清晰,胞核呈卵圆形或新月形,胞质丰富,见大量显著扩张的粗面内质网或糖原颗粒。种植后软骨仅出现轻度退行性变 (见图 4)。

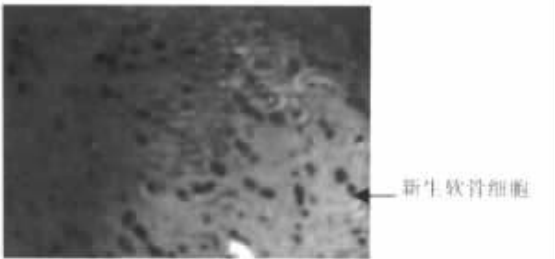


图 1 光镜 冷冻软骨移植后 2 个月 (10 倍)

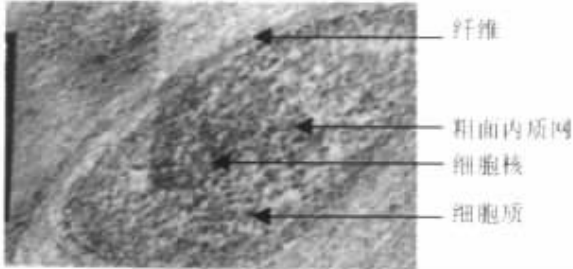


图 2 电镜 冷冻软骨种植前

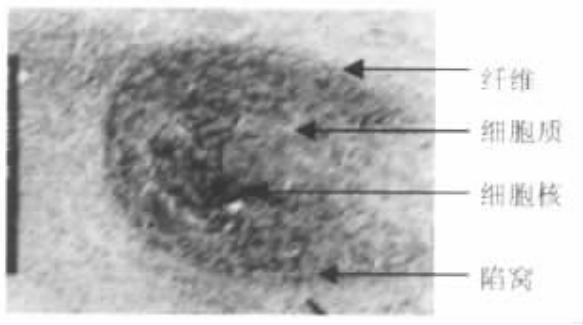


图 3 电镜 冷冻软骨种植 6 个月

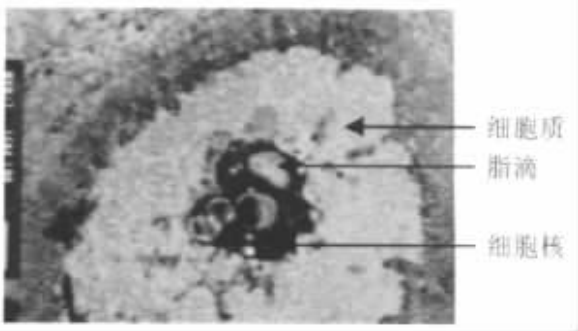


图 4 电镜 酒精灭活软骨种植后 6 个月

4. 免疫球蛋白和补体的变化 ,见表 3.

表 3 软骨移植前后免疫功能的改变 (g/L)

	术前 (n = 24)	术后 1 个月 (n = 24)	术后 3 个月 (n = 20)	术后 6 个月 (n = 14)	术后 9 个月 (n = 8)	术后 12 个月 (n = 2)
冷冻组 IgG	12.17 ± 1.21	12.19 ± 1.26	12.21 ± 1.20	12.23 ± 1.31	12.21 ± 1.19	12.31 ± 1.15
灭活组 IgG	12.29 ± 2.13	12.49 ± 1.63	12.97 ± 1.51	12.35 ± 1.69	12.36 ± 1.54	12.39 ± 1.36
冷冻组 IgM	1.34 ± 0.13	1.31 ± 0.12	1.33 ± 0.09	1.35 ± 0.11	1.32 ± 0.16	1.31 ± 0.22
灭活组 IgM	1.35 ± 0.27	1.19 ± 0.11	1.26 ± 0.10	1.38 ± 0.19	1.48 ± 0.29	1.36 ± 0.31
冷冻组 IgA	1.10 ± 0.09	1.11 ± 0.12	1.09 ± 0.12	1.14 ± 0.13	1.10 ± 0.15	1.12 ± 0.21
灭活组 IgA	1.21 ± 0.13	1.21 ± 0.23	1.16 ± 0.22	1.24 ± 0.21	1.16 ± 0.23	1.22 ± 0.16
冷冻组 C3	1.06 ± 0.09	1.02 ± 0.11	1.03 ± 0.13	1.05 ± 0.10	1.06 ± 0.22	1.05 ± 0.23
灭活组 C3	1.11 ± 0.39	1.27 ± 0.51	1.21 ± 0.23	1.12 ± 0.24	1.14 ± 0.31	1.12 ± 0.13
冷冻组 C4	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.05	0.24 ± 0.06	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.06
灭活组 C4	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.04
冷冻组 PFB	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.36 ± 0.06	0.34 ± 0.08
灭活组 PFB	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.05	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.07	0.38 ± 0.07

注 :各组间用 SPSS10.0 软件行单因素方差分析检验 ,各组 F 值分别为 0.45、0.19、0.16、0.89、1.12、1.23、0.76、1.96、1.49、1.35、0.91、1.05 ,P 均 > 0.05 ,无显著性差异。

讨 论

软骨组织移植在整形外科领域应用比较广泛 ,Hunter 在 1743 年提出“骨软骨一旦破坏 ,即不能再得到恢复”的观点 ,至今已有两个半世纪了。目前 ,使损伤的骨软骨修复至正常骨软骨 ,尚无完善的方法^[3]。

临床上常用的软骨组织缺损修复途径大致有三种 ,即自体组织移植 ,异体组织移植或应用人工代用品^[2]。自体软骨移植 ,可供组织有限 ,必须以牺牲自体部分正常组织为代价 ,且增加受术者的痛苦。人工合成生物材料存在着许多潜在的危险和并发症 ,如感染、外露、断裂、植入体的松脱等 ,同时存在的与宿主免疫系统的反应都限制了它们的使用。近年兴起的组织工程技术为软骨缺损的修复开辟了一条新的途径^[4]。例如用软骨细胞与医用组织引导再生胶原膜或聚羟基乙酸支架体外联合培养 ,再植入体内的组织工程 ,目前仍处于探索和实验阶段 ,过渡到临床尚需时日。

异种或同种异体软骨来源广泛 ,可以提前预制塑型 ,但因存在免疫排斥反应、变形、吸收、感染等弊端 ,而使临床应用受到限制^[5]。因此 ,使用何种方法进行处理和保存异体软骨 ,提高异体软骨临床应用的可行性 ,仍需进行不断的探索和研究。本课题对两种不同方法保存的人透明软骨进行异种移植实验 ,连续观察其近期及远期的变化结果 ,为临床应用提供科学依据。

本研究结果表明 :1、深低温保存法软骨排斥反应较为明显 ,快速复温后 ,其生物学特性与新鲜软骨无差异 ,这与快速

降温时的损伤较轻有关。植入早期可成活并可见新生软骨细胞 ,3 个月后将开始吸收变形 ,且随着时间的延长而逐渐加重 ,甚至仅残余纤维囊。2、75% 酒精灭活法保存的软骨 ,因已被灭活 ,移植后骨周形成纤维囊包绕 ,免疫排斥反应小 ,连续观察至 12 个月时 ,仍能保持其外形不变。

结 论

深低温法保存软骨因其具有新鲜软骨的特性 ,异种异体移植后易被排斥和吸收 ,故不宜应用于临床。75% 酒精灭活法保存软骨 ,生物学特性稳定 ,提示其用于临床替代自体软骨的远期效果可能优于深低温保存法。

参 考 文 献

1 姚小武 ,钟永持 .用弱甲醛处理后异体软骨移植的实验观察 .第一军医大学学报 .1990 ,10 :166 - 170 .
2 张涤生 .组织工程学简经济 .中华整形烧伤外科杂志 ,1998 ,14 :218 - 224 .
3 Mitsuo Ochio ,Yuji Uchio .骨软骨的修复 .中华手外科杂志 ,2000 ,16 :76 - 82 .
4 刘彦春 ,王伟 .软骨细胞 - 支架复合物修复兔耳廓软骨缺损 .中华整形烧伤外科杂志 ,1999 ,15 :180 - 182 .
5 程新德 ,赵天兰 ,李光早等 .低温冷冻同种异体胎软骨移植的应用 .中华整形烧伤外科杂志 ,1999 ,15 (1) :43 - 45 .

(2001 - 10 - 15 收稿)
(2002 - 7 - 3 修回)