

· 基础研究 ·

兔自体耳软骨膜复合游离移植形成工程化软骨的实验研究

毕洪森^① 李健宁 薛红宇 张培礼^②

北京大学第三医院成形科(北京, 100083)

【摘要】 目的 探求用软骨膜复合移植的方法形成自体软骨的可行性。方法 将兔自体耳软骨膜包裹自体耳软骨脱细胞基质材料复合游离移植于兔背部皮下(I 组),并在移植物附近皮下游离移植双层耳软骨膜(II a 组)及单纯脱细胞的自体耳软骨基质(II b 组)作为对照。在术后 3 周、6 周分别取标本进行研究。结果 在 3 周、6 周时, I 组与 II a 组成软骨细胞的增殖变化情况差异有显著性($P < 0.05$), I 组比 II a 组成软骨细胞的增殖明显旺盛,有的已经向软骨细胞转化,并有少量细胞外基质分泌,基质内软骨囊出现。II b 组无成软骨细胞及软骨囊出现。结论 自体耳软骨膜与自体耳软骨脱细胞后的基质材料复合移植促进自体软骨生成。提示该基质材料有促进软骨膜细胞分化和生长的作用。

【关键词】 软骨膜 脱细胞基质 复合游离移植

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2002)04-0244-03

Experimental study on efficacy of perichondrium and an acellular cartilage matrix for generating cartilage.

Bi Hongsen, Li Jianning, Xue Hongyu, et al. Department of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To study the possibility of generating cartilage with a free composite graft of perichondrium and matrix. **Methods** A composite graft of a free perichondrium flap wrapped around acellular auricular cartilage matrix was implanted in the back subcutaneously of young New Zealand rabbits (Group I). As controls, double folded perichondrium free flap (Group II a) and acellular auricular cartilage matrix without perichondrium cover (Group II b) were implanted. **Results** 3 weeks and 6 weeks after implantation, obvious differences of chondroblasts derived from the perichondrium were observed between the Group I and Group II a ($P < 0.05$), and the chondroblasts in Group I were more productive than that in Group II a, some cells have transformed into chondrocytes with secretion of matrix, even the appearance of cartilage cysts in Group I. No chondroblasts and cartilage appeared in Group II b. **Conclusions** A composite graft consisting of acellular auricular cartilage matrix in an envelop of perichondrium is capable of heterotopic cartilage formation and that acellular auricular cartilage matrix serves as inductor for the perichondrium to produce chondrogenetic cells and promotes cartilage formation were proposed.

【Key words】 Perichondrium Acellular matrix Free composite graft

临床上用软骨移植物来修复软骨缺损时,用自体软骨是最好的,以避免移植性疾病和预防免疫排斥反应^[1]。然而,供区继发病变、进行性供区结构异常、移植物早期吸收、有限的可供使用的软骨块体积及移植软骨与受区结合能力差等是传统自体软骨移植术中最主要的缺点^[2]。软骨膜生发层细胞具有分化、增殖形成新软骨的特性,实验证明软骨膜具有生成软骨的潜能^[3,4]。然而,单纯软骨膜移植形成软骨的量,即使有,也是不均一旦有限的^[5]。因而软骨膜复合移植^[6]及组织工程技术的应用得到开发,本实验选用兔自体耳软骨膜包裹脱细胞的自体耳软骨基质复合移植,旨在探讨自体软骨形成的可行性。

材料与方法

一、实验动物:

健康三月龄新西兰大耳白兔 10 只,雄性,体重 2.5~3.0 公斤。

二、所需材料:

自体兔耳软骨脱细胞基质材料。

三、实验设计:

1. 实验分组:在每只兔的背部皮下分别游离移植自体耳软骨膜包裹自体耳软骨基质复合体为实验组(I 组);自体耳软骨膜双层对折(软骨膜生发层相对)(II a 组)和单纯基质材料(II b 组)也分别移植在邻近的背部皮下,作为对照组。每只兔移植两批共 6 个标本。

2. 保证在实验过程中有 6 只兔存活,共获得 36 个标本。

3. 于术后三周、六周分批取标本,每次从 6 只兔共取 18 个标本进行研究。

四、实验研究方法:

① 秦皇岛市第一医院(066000)

② 包头市第七医院(014030)

1、形态学大体观察

术后从体表观察移植物的变化情况,在三周、六周取标本时观察其形态及物理性状。

2、组织学检验。

实验组及对照组每批共 18 个标本,均行 HE 染色、阿尔辛兰染色(PH=3.5)和醛品红染色。观察标本中细胞浸润和分化生长情况、软骨膜细胞分化程度和分泌细胞外基质成分(如硫酸软骨素、糖蛋白和蛋白多糖等)的能力及弹力纤维变化与生成情况。

3、统计学分析。

以观察移植中成软骨细胞的出现、分化和增殖情况为目的,因而以显微镜下成软骨细胞的形态学改变及生物学特性为评价的依据,对每个检查标本进行量化评价,作为统计分析的数据。评价标准:无成软骨细胞及软骨细胞为 0;有成软骨细胞样细胞,形态不典型为 1;有成软骨细胞,形态较典型,但无软骨基质分泌为 2;成软骨细胞向软骨细胞转化,且有软骨基质分泌为 3。

结 果

一、大体观察:

1、1 周~3 周:伤口愈合好,I 和 II a 组皮下移植物处微凸,II b 组外观无明显隆起。

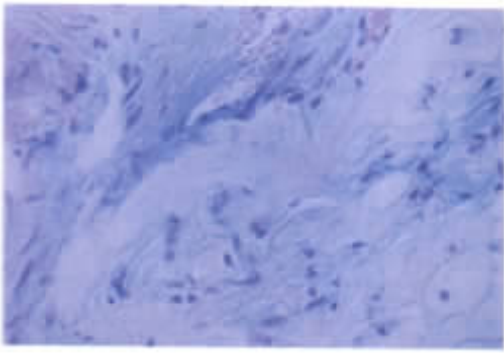


图 1 三周时,兔耳软骨膜加基质复合移植 Alcian-blue、中性红和 HE 复染(200x)显示基质内成软骨细胞浸润

2、6 周时:

I 组:软骨膜变薄,炎症细胞已少见或无,均有典型的成软骨细胞出现,有的已向软骨细胞转化,并有少量细胞外基质分泌,基质内软骨囊出现(图 3)。

II a 组:软骨膜细胞较三周时明显减少,成软骨细胞多见,可见新生血管,炎症细胞也消失。无软骨囊形成及细胞



图 3 六周时,兔耳软骨膜加基质复合移植有软骨囊形成、基质分泌,成软骨细胞分化数据

三周时取标本,可见 I 组、II a 组移植物被一层纤维组织包裹,移植物大小与植入前几乎相同,为 1.0cm×0.5cm 大小;II b 组移植物大小无变化,周围纤维包裹不明显,质地变软。

2、3 周~6 周:3 周后,皮下移植物处外观凸起逐渐变平,变软,6 周时,移植物处外观凸起不明显。

六周时取标本,I 组、II a 组移植物仍为一层纤维组织包裹,移植物大小与植入前几乎相同;II b 组移植物无明显纤维组织包裹,稍变小,约 0.9cm×0.4cm 大小,外观较透明,质地明显变软。

二、组织学观察:

1、3 周时:

I 组:软骨膜增厚,可分内外两层,软骨膜内层细胞数增多、软骨膜增厚,且增厚的软骨膜内有血管形成。软骨基质内细胞浸润少,可见成软骨细胞浸润到基质材料的旋涡结构内。此外,增厚的软骨膜内有一些炎症细胞存在(图 1)。

II a 组:软骨膜增厚,细胞数多,以大量的成纤维细胞为主,也有较典型的成软骨细胞,炎症细胞较多见(图 2)。

II b 组:镜下可见基质表面形成一层膜,有纤维和成纤维细胞,未见成软骨细胞,基质旋涡内可见少量组织细胞浸润。

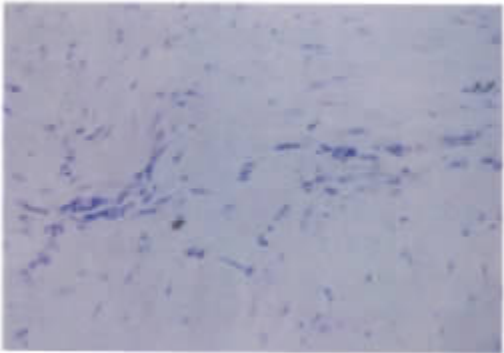


图 2 三周时,双层软骨膜移植 HE 染色(100x)

外软骨基质的分泌现象(图 4)。

II b 组:基质内有较多的细胞浸润,包括白细胞、红细胞、成纤维细胞和炎症细胞。随着炎症细胞的浸润,部分软骨旋涡样结构消失。无成软骨细胞及软骨囊出现,无新生的弹力纤维。

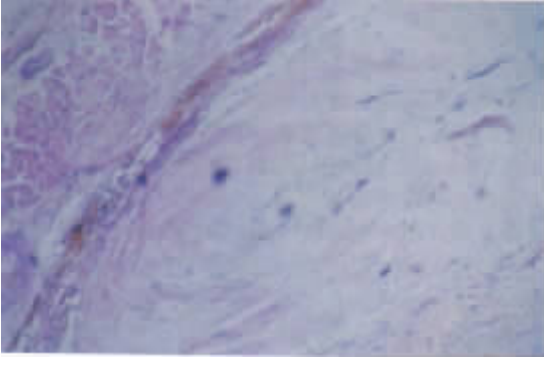


图 4 六周时,双层软骨膜移植 HE 染色(40x)

三、实验结果统计分析：

1、Ⅱ b 组因无成软骨细胞、软骨细胞形成和细胞外基质分泌现象,在评价其结果时评分为 0,不参与结果的统计。
2、Ⅰ 组与 Ⅱ a 组统计分析结果如(Primer 软件,Mann-whitney 秩和检验)表 1：

表 1 三周、六周时不同组成软骨细胞分化程度比较表

	Ⅰ 组(分值)				Ⅱ a 组(分值)				P 值
	0	1	2	3	0	1	2	3	
3 周(例数)	0	0	6	0	0	5	1	0	0.015
6 周(例数)	0	0	1	5	0	2	4	0	0.012*
P 值	0.015				0.242				

注 组间比较用精确概率法(双尾)。* 采用行×列卡方检验。

可见,在 3 周、6 周时,Ⅰ 组与 Ⅱ a 组成软骨细胞的增殖变化情况差异有显著性,Ⅰ 组比 Ⅱ a 组成软骨细胞的增殖明显旺盛。再进行组内比较可见,Ⅰ 组在 6 周时成软骨细胞增殖比 3 周时明显旺盛;Ⅱ a 组在 6 周时成软骨细胞的分化增殖程度与 3 周时相比,则差异无显著性。

讨 论

1、软骨的发育与组成：

软骨由胚胎期的间充质分化而来,由软骨细胞、软骨基质和埋于基质中的纤维所组成,软骨基质呈凝胶状态,具有一定的硬度和弹性,能承受压力和耐摩擦,软骨细胞生活在与细胞形状相同的基质小腔内,这些小腔称软骨旋涡。根据基质内所含纤维成分的不同,将软骨分为三种:透明软骨、弹性软骨和纤维软骨。弹性软骨最大的特点是含有大量交织排列的弹性纤维,此外还含有少量的Ⅱ型胶原原纤维,且其弹性纤维及胶原原纤维均由软骨细胞产生^[7]。在成年后不能再新生软骨,附着于成熟软骨上的软骨膜也无活性,但软骨膜与软骨分离后则又具有高度的成软骨活性^[8]。通过本实验,不仅软骨膜生成软骨的潜能显示出来,我们还观察到软骨膜细胞在脱细胞的异体软骨基质诱导下,表现出较高的成软骨活性。

2、软骨膜成软骨能力及基质载体材料在诱导软骨膜生成软骨中的作用：

软骨膜移植可以生成软骨,目前已为人共知,而且不论是单层软骨膜移植^[3,5],还是双层软骨膜移植^[9]移植植物均不能 100%生成软骨,即使生成,软骨量也少且不恒定。因而,从 90 年代初以来,更多的人开始探索组织工程化软骨的生成,试图发现最理想的可生成供临床应用的软骨的方法,在软骨膜生成软骨组织工程研究中,有多种材料被用作软骨膜细胞载体而与软骨膜复合移植,结果这些材料均有促进软骨生成的作用^[1,6,7,10]。

我们的实验也证实了软骨膜与异体脱细胞软骨基质复合移植比单纯软骨膜移植具有较强的生成软骨的能力,提示基质有促生长作用。因为单纯细胞移植时,细胞缺乏三维的生长代谢空间,相互拥挤的细胞缺乏氧气和养料,没有细胞外支架支持细胞的生长与附着,因而难以生长及分泌基质。并且单纯组织移植时细胞易丢失,影响细胞形成组织^[11]。

对软骨的组织工程基质材料研究发现:使用Ⅱ型胶原要比使用Ⅰ型胶原为好。软骨中为Ⅱ型胶原。正常软骨细胞为圆形,在Ⅰ型胶原中为扁型,而在Ⅱ型胶原中保持圆形,这表明软骨细胞能识别基质材料,细胞对基质的化学性质很敏感^[12]。

本实验选用异体耳软骨脱细胞基质,为含胶原的材料,异体移植后表现的抗原性较弱,6 周时只有少量的旋涡结构被破坏,因而能在体内较长时间存留,研究还发现成软骨细胞在基质中黏附性好,且旋涡框架为成软骨细胞生长提供了空间。因而,该材料在时间和空间上为软骨膜细胞的分化、生长提供了有利的场所。

在软骨膜复合物移植形成软骨的过程中,软骨膜是先决条件,可以源源不断地供应成软骨细胞^[6]。在成软骨细胞分化增殖过程中,随软骨基质的不断分泌,基质材料被机体逐步降解,最终形成一个与机体本身在组织学及生化组成上完全相同的组织^[11]。此外,软骨膜基质材料复合物移植后,软骨形成及基质材料吸收时间与移植部位的血液供应有很大关系,血供越丰富的地方,移植物形成软骨越快,基质消失也越快^[1]。至于兔自体耳软骨膜加异体脱细胞软骨基质复合物游离移植后软骨形成的时间与血运的关系尚有待进一步研究。

3、脱细胞基质材料的转归：

脱细胞基质材料单纯移植后,在实验期内未见成软骨细胞生成,6 周时,基质内已有大量各种组织细胞浸润、血管长入,且部分旋涡结构被破坏消失。基质在复合物移植后只起细胞载体和促生长的作用。

参 考 文 献

- 1 Ten Koppel PG, Van Osch GJ, Vervoerd CD et al. Efficacy of perichondrium and a trabecular demineralized bone matrix for generating cartilage. *Plast Reconstr surg*, 1998, 102 :2012 - 2020.
- 2 Ohara K, Nakamura K, Ohta E. Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting. *Plast Resonstr Surg*, 1997, 99 :1030 - 1036.
- 3 Skoog T, Ohlsen L, Sohn S A. Perichondrial potential for cartilaginous regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1972, 62 :123 - 125.
- 4 Ohlsen L. Cartilage formation from free perichondrial grafts: An experimental study on rabbits. *Br J Plast Surg*, 1976, 29 :262 - 267.
- 5 鲍卫汉,朱洪荫,陈东明,等. 家兔自体耳软骨膜游离移植后软骨形成能力的观察. *中华整形烧伤外科杂志*, 1998, 4 :2 :144 - 145.
- 6 van Osch GJ, ten Koppel PG, van der Veen SW et al. The role of trabecular demineralized bone in combination with perichondrium in the generation of cartilage graft. *Biomaterials*, 1999, 20 :233 - 240.
- 7 成令忠,主编. *组织学*. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1993:258 - 291.
- 8 Hosokawa K, Hata Y, Yano K et al. Inhibitory effect of mature cartilage on perichondrial neochondrogenesis. *Ann Plast Surg*, 1989, 23 :155 - 158.
- 9 Matsuda K, Nagasawa N, Suzuki S et al. In vivo chondrogenesis in collagen sponge sandwiched by perichondrium. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1995, 7 :221 - 229.
- 10 Ruuskanen MM, Kallioinen MJ, Kaarela OI et al. The role of polyglycolic acid rods in the regeneration of cartilage from perichondrium in rabbits. *Scand J Reconstr Surg Hand Surg*. 1991, 25 :15 - 18.
- 11 陈付国,曹宜林,商庆新. 关节软骨缺损修复研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 1998, 12 :297 - 300.
- 12 Myron Spector, Ph. D. *Principles of Tissue Engineering*. 组织工程研讨会论文集, 北京. 1997 :3 - 7.

(2002-3-27 修稿)
(2002-5-8 修回)