

· 基础研究 ·

# 软骨膜和脱钙骨基质联合移植修复鼻翼软骨缺损

赵晓明, 郭杰峰, 刘谦虚, 程梅, 窦晓辉, 汪志伟, 熊彬彬, 罗彬

(暨南大学医学院第三附属医院耳鼻咽喉科, 广东珠海 519000)

**摘要:** 目的 探讨软骨膜与同种异体脱钙骨基质 (demineralized bone matrix, DBM) 联合移植对鼻软骨缺损的修复效果。方法 新西兰兔 18 只随机分为 3 组, 每组 6 只。制作鼻翼软骨和软骨膜缺损模型, 于缺损处移植修复组织。A 组为自体耳软骨膜包裹同种异体 DBM; B 组为自体耳软骨; C 组为自体耳软骨膜。10 周后取缺损处软骨行大体和病理组织学观察, S100 (Soluble protein-100)、转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 免疫组化染色, 评价修复效果。结果 A、B 两组所得软骨细胞和基质与正常软骨相类似, 两组比较差异不明显。C 组所得软骨细胞少, 基质浅淡, S100、TGF- $\beta 1$  染色阳性细胞少, 与 A、B 组比较均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论 软骨膜与同种异体 DBM 联合移植对鼻软骨缺损的修复效果与自体软骨基本一致, 明显优于自体软骨膜移植。

**关键词:** 软骨膜; 脱钙骨基质; 鼻软骨; 组织修复

中图分类号: R782.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)03-0176-05

## Repair of nasal cartilage defect with associated graft of perichondrium and demineralized bone matrix

ZHAO Xiao-ming, GUO Jie-feng, LIU Qian-xu, et al.

(Department of Otorhinolaryngology, the Third Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University, Zuhai 519000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the repairing effect on nasal cartilage defect with associated graft of perichondrium and allogenic demineralized bone matrix (DBM). **Methods** Eighteen New Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups (in each group,  $n = 6$ ). Nasal alar cartilage and perichondrium were ablated in each rabbit. Autogenic auricular perichondrium wrapped by allogenic DBM was grafted into the defect in group A, autogenic auricular cartilage in group B and autogenic auricular perichondrium in group C. At the 10<sup>th</sup> week after repair, the effect was evaluated by gross inspection, histopathology, immunohistochemical detection of Soluble protein-100 (S100) and transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) antibodies of the cartilage from the defect. **Results** The cartilage cell and matrix from group A and B were similar to those of the normal cartilage with no obvious differences between group A and group B. Being compared with the cartilage cells from group A and group B, the cell number, cytoplasm, and positive S100 and TGF- $\beta 1$  cells were significantly reduced in group C ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The repairing effect on nasal cartilage defect with associated graft of perichondrium and allogenic DBM is coincide with autogenic cartilage and surpass the autogenic perichondrium.

**Key words:** Perichondrium; Decalcified bone matrix; Nasal cartilage; Tissue repair

由于软骨组织再生能力差, 临床上因外伤或疾病导致的软骨缺损, 通常难以自行修复, 需要外科重建<sup>[1]</sup>。移植物通常为自体软

基金项目: 广东省珠海市科技局基金资助项目 (pc20081017)。

作者简介: 赵晓明, 男, 主任医师。

通讯作者: 赵晓明, Email: hongruizhao@yahoo.com.cn.

骨、同种异体去细胞软骨或人工填充物,这些移植物都存在二次创伤、免疫排斥或传播疾病的风险。软骨膜可以生成软骨细胞, DBM 具有软骨诱导能力和支撑作用,两者联合移植有利于软骨的修复。本实验通过对比软骨膜 + DBM、软骨、软骨膜移植对鼻软骨缺损的修复效果,探讨软骨修复的有效途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

1.1.1 实验动物及分组 健康 6 月龄新西兰大耳白兔 20 只由中南大学湘雅医学院动物实验室提供,雌雄不限,体重 2.0 ~ 3.6 kg,平均 2.52 kg,随机取 2 只作为 DBM 供体,其余 18 只随机分为 3 组,每组 6 只。

1.1.2 主要试剂与设备 S100 和 TGF- $\beta$ 1 抗体、SABC 和 DAB 试剂盒均购自武汉博士德公司,倒置显微镜购自日本 Olympus 公司,Image Pro Plus 6.0 图像分析系统购自美国 Media Cybernetics 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 DBM 的制备 取白兔 2 只活杀,将四肢长骨骨端及椎体剔除骨膜及软组织,剖成 0.3 cm  $\times$  0.4 cm  $\times$  0.4 cm 骨块,洗净骨髓及残血,漂洗、过滤后吹干,梯度脱水、脱脂,过滤,干燥。脱钙,其间多次振荡并换液 1 次,过滤后洗酸至 pH 7.0,脱水、脱脂,过滤后干燥。取较为完整骨块分装,密封,  $2 \times 10^6$  rad 的  $^{60}\text{Co}$  照射消毒,细菌培养无生长,  $-10^\circ\text{C}$  冰箱贮存备用。

1.2.2 手术移植 实验动物 30 mg/kg 戊巴比妥钠静脉麻醉,取左侧为手术侧。无菌条件下从兔耳背侧中后部分切开,暴露耳软骨,剥离软骨膜,距耳根 5 cm 处切除 1.2 cm  $\times$  1.2 cm 组织作为移植组织备用: A、C 组为软骨膜, B 组为软骨,所取组织尽量平整,缝合切口。再于左鼻翼中央作长约 1.2 cm 纵形切口,切开皮肤、皮下组织,切除约 1.0 cm  $\times$  1.0 cm 的鼻翼软骨和软骨膜,制造鼻软骨缺损模型,缺损区尽量平整。将移植物修剪成合适形态和大小,分别植入鼻软骨缺损区: A 组为软骨膜包裹

DBM, B 组为自体软骨, C 组为自体软骨膜(双层对折,生发层相对)。缝合皮肤切口,常规饲养。

实验动物术前术后 3 d 肌注氯霉素 30 mg/kg  $\cdot$  d,以预防感染。

1.2.3 软骨组织制片 10 周后观察鼻翼外形,触摸其硬度。将兔麻醉成功后于原鼻软骨缺损区切开,取出新生组织,大体观察其形态及物理性状,4% 多聚甲醛固定 3 ~ 5 d。EDTA 磷酸缓冲液脱钙。脱水、浸蜡、包埋,切片备用。

1.2.4 病理组织学观察 HE 染色观察标本中软骨膜细胞浸润和分化生长情况,细胞外基质生成情况,以及 DBM 吸收和炎症反应。

1.2.5 免疫组织化学 用 SABC 法,一抗为兔抗鼠 S100、TGF- $\beta$ 1 多克隆抗体,二抗为山羊抗兔抗体。具体如下:组织切片脱蜡、水化, PBS 洗 3 次; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温封闭 5 ~ 10 min,灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次; 枸橼酸钠缓冲溶液中抗原微波热修复, PBS 洗; 滴加山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体; 滴加一抗(1: 100 稀释),  $4^\circ\text{C}$  过夜;  $37^\circ\text{C}$  复温, PBS 洗; 滴加二抗 20 min, PBS 洗; 滴加试剂 SABC 20 min, PBS 洗 4 次; DAB 显色,镜下掌握显色程度; 苏木素复染,盐酸酒精分化; 脱水、透明、封片、镜检。

1.2.6 免疫组化结果分析 光学显微镜下观察切片染色情况,高倍镜( $\times 200$ )下用 Image-pro-plus 6.0 图像分析系统分析染色结果,计算平均光密度(AOD)。

### 1.3 统计学处理

结果用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,细胞阳性率比较采用非参数秩和检验, AOD 比较采用单因素方差分析(ANOVA),以  $P < 0.05$  作为判断有统计学意义标准。

## 2 结果

### 2.1 外观

各组动物全部成活,切口愈合良好。A、B 两组左侧鼻翼表面光滑,无明显凹凸感,外观、触摸硬度与右侧正常鼻翼均无明显差异。C 组左侧鼻翼较右侧鼻翼凹陷,触摸时

原缺损区较薄,有软骨不连续和缺失感。

A、B 两组所得鼻翼软骨呈淡黄色,表面规则,有光泽,质地均匀,弹性好,硬度中等偏软,和周围软骨整合较紧密。C 组所得软骨少而非薄,呈枯黄色,表面不规则,质地不均,弹性差。

## 2.2 病理组织学

HE 染色显示 A 组软骨膜变薄,转化为比较成熟的软骨组织,成软骨细胞及软骨细胞代谢旺盛,分布均匀,呈卵圆形,偶见多

角形细胞,软骨陷窝清晰可见,细胞位于陷窝之中,周围是较丰富和均匀的细胞外基质,基质内软骨囊出现,新软骨细胞的密度和形态与 B 组软骨细胞基本相同(图 1)。DBM 明显吸收降解而变薄,其内炎性细胞少。B 组移植耳软骨与鼻软骨间形成的新软骨密度和形态接近正常软骨(图 2)。C 组形成的软骨组织少,且排列紊乱,基质浅淡,成软骨细胞多见,少许软骨细胞形成,可见新生血管,无软骨囊形成(图 3)。

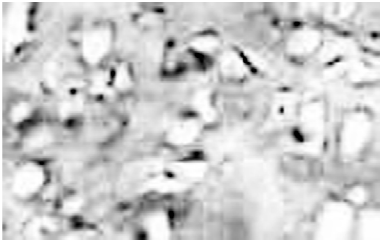


图 1

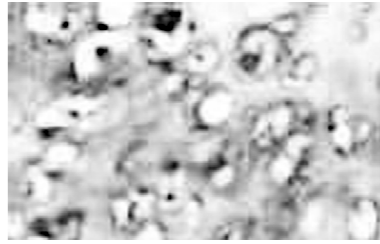


图 2



图 3

图 1 A 组新生软骨细胞多,分布均匀,位于陷窝之中,细胞外基质丰富。图 2 B 组新生软骨密度和形态接近正常软骨。图 3 C 组新生软骨组织少且排列紊乱,基质浅淡,无软骨囊形成(均为 HE 染色,  $\times 200$ )

## 2.3 免疫组化

S100 阳性反应物位于软骨细胞胞浆中, TGF- $\beta$ 1 阳性反应物主要位于软骨细胞胞浆中,少部分位于基质中,呈棕黄色颗粒。S100 和 TGF- $\beta$ 1 染色显示 A、B 两组阳性反应物数量、颜色深度相当, C 组阳性反应物数量明显更少、颜色更浅淡(图 4~9)。在倒置相差显微镜下,以上染色结果每孔选择 10 个非重叠视野,计数染色阳性细胞数和总细胞数,得出阳性细

胞率(表 1)。

表 1 各组软骨细胞 S100、TGF- $\beta$ 1 染色阳性细胞率(%,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	动物例数	S100	TGF- $\beta$ 1
A 组	6	73.59 $\pm$ 9.31	58.93 $\pm$ 7.82
B 组	6	69.76 $\pm$ 8.05	62.66 $\pm$ 8.14
C 组	6	20.84 $\pm$ 3.57*	16.91 $\pm$ 4.08*

\* 示与 A、B 组比较  $P < 0.01$

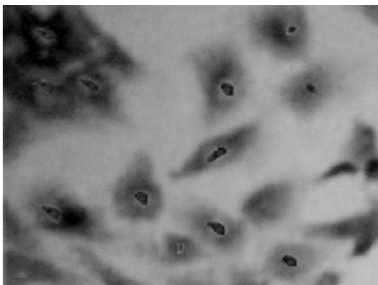


图 4 A 组 S100 染色

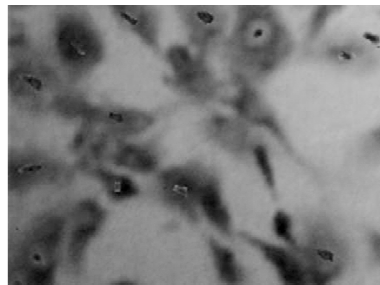


图 5 B 组 S100 染色

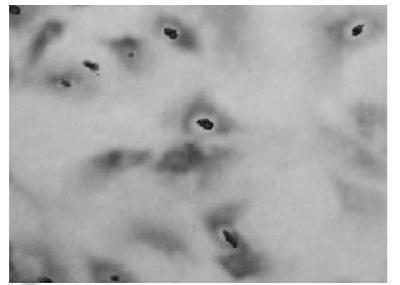


图 6 C 组 S100 染色

图 4、5 阳性反应物数量、颜色深度相当,图 6 阳性反应物数量明显更少、颜色更浅(均为 SABC 法  $\times 200$ )

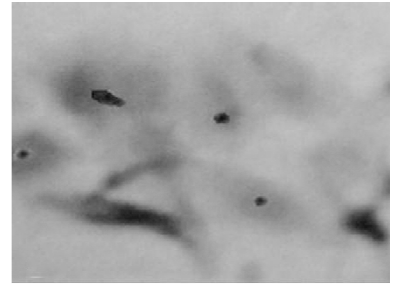
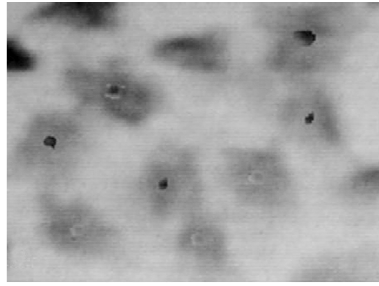
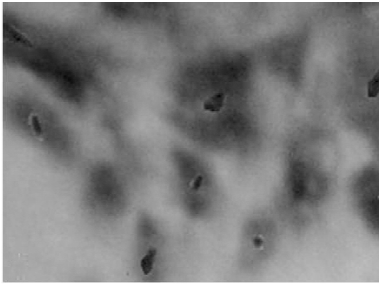
图7 A组 TGF- $\beta$ 1 染色图8 B组 TGF- $\beta$ 1 染色图9 C组 TGF- $\beta$ 1 染色

图7、8 阳性反应物数量、颜色深度相当,图9 阳性反应物数量明显更少、颜色更浅(均为 SABC 法  $\times 200$ )

采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统对免疫组化结果进行分析,计算每组的 AOD 值,得出的结果与上述阳性细胞计数法相同(表 2)。

表 2 各组软骨细胞 S100、TGF- $\beta$ 1 染色平均光密度(%,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	动物例数	S100	TGF- $\beta$ 1
A组	6	47.23 $\pm$ 6.28	40.84 $\pm$ 6.02
B组	6	45.79 $\pm$ 5.73	42.76 $\pm$ 6.41
C组	6	18.21 $\pm$ 3.27*	15.53 $\pm$ 3.19*

\* 示与 A、B 组比较  $P < 0.01$

### 3 讨论

目前认为软骨生长方式有两种:一种为间质生长即软骨内生长,通过周围软骨细胞的分裂而生长,其能力非常有限。另一种为外加生长,即软骨膜等生长分化而成,其过程为前成软骨细胞、成软骨细胞、软骨细胞。由于软骨组织自愈能力差,软骨缺损的修复目前仍是临床上棘手的问题。自体软骨具有软骨传导和诱导能力,是修复软骨缺损的理想材料,也是评价其他方法修复效果的基本标准。本实验 B 组自体耳廓软骨移植后新生软骨与正常软骨无明显区别,理想地修复了鼻软骨缺损,充分证实了这一点。但自体软骨来源有限,取材后又造成新的缺损,限制了其在临床上的广泛应用,因此人们探讨运用外来软骨细胞修复软骨缺损的途径。

软骨膜能有效生成软骨细胞,可作为软骨缺损的修复材料。但单纯软骨膜移植由于软骨膜细胞易受周围组织的挤压而缺乏

三维的生长空间,得不到充足的氧气和养料,导致软骨细胞生成量少,也难以有效修复软骨缺损。本实验 C 组新生的软骨组织少,且性能差,也证实了这一点。如能找到合适的材料与软骨膜联合移植,支撑软骨膜使其免受周围组织挤压而充分分化为软骨细胞,将会更有效修复软骨缺损。理想的软骨组织工程支架材料需要满足以下条件<sup>[2]</sup>: ①良好的生物相容性和孔隙结构,不仅免疫排斥反应低,而且细胞粘附性好。②适宜的力学性能,能起到支撑作用。③诱导功能,能促进移植材料向目的细胞分化。④生物降解性,材料的降解速度与组织再生的速度相匹配。

DBM 制备简单,生物相容性好,适宜细胞在表面粘附、增殖、分化,并有一定的机械支撑性能和软骨诱导能力,移植后可降解,是与软骨膜联合移植的理想材料。DBM 作为软骨组织工程支架的可行性已经为许多学者所证明<sup>[3]</sup>。单纯 DBM 移植可治疗小的软骨缺损,但其愈合时间较长,难以修复较大范围软骨缺损。若将 DBM 和软骨膜联合移植,DBM 的支撑作用使软骨膜不受周围组织挤压而塌陷,其中所含的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)和其他一些软骨生长因子<sup>[4]</sup>还可以刺激软骨膜生发层细胞增殖、分化为软骨细胞,软骨膜则为 DBM 提供了丰富的 BMP 敏感靶细胞,有利于 DBM 软骨诱导活性的充分发挥,两者相互协同、相互促进,大大增强了修复软骨缺损的能力。本实验 A 组将同种异体 DBM 与兔自体耳软骨膜联合移植,新生的软骨细胞多,基质丰富,与正常软骨在形态、组织学和性能等方面均无明显差异,理想地修复

了鼻软骨缺损。

S100 蛋白是一组低分子量钙结合蛋白,与钙调蛋白及其他 EF 手型钙离子结合蛋白具有高度同源性。S100 具有广泛的生物学活性,目前对其具体功能尚不十分清楚,以下功能已得到证实:①调节细胞的生理功能,如细胞的信号传递、增殖和分化、能量代谢、肌细胞收缩等。②促进轴突生长、胶质细胞的增生、钙离子的稳定。③作为阿尔采木病和艾滋病的相关因子。总之,S100 在细胞增殖和分化、能量代谢、基因表达及细胞凋亡等方面发挥重要作用<sup>[5]</sup>。S100 分布广泛,有多个成员,如 S100A1-A13、CP-10 蛋白、S100B、S100P 等。因在脑组织中含丰富,多作为脑损伤的生化标志物<sup>[6]</sup>,还可以作为肿瘤标志物。分布于软骨组织中的是 S100B,可作为软骨细胞表型的标记物之一。本实验各组新生软骨 S100 染色的细胞阳性率和 AOD 值显示:A、B 组间无显著差异,且均明显高于 C 组,说明 A、B 组新生的软骨细胞数量相当,明显多于 C 组。

TGF- $\beta$  是多功能蛋白质,可调节细胞的增殖、分化及细胞外基质的新陈代谢。哺乳动物中至少发现有 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 1 $\beta$ 2 四个亚型。TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 功能相似,区别在于 TGF- $\beta$ 1 与冷凝祖细胞初始作用关系密切,TGF- $\beta$ 2 可调节细胞的肥大性分化,TGF- $\beta$ 3 则对骨髓源性干细胞的分化有较强的影响。TGF- $\beta$  是促进软骨修复最主要的细胞因子之一,它可促进软骨细胞的增殖,增加细胞外基质的合成,对软骨的发育成形有重要作用。实验表明,兔关节透明软骨细胞在 TGF- $\beta$ 1 诱导下,可向软骨细胞分化,形成新的透明软骨<sup>[7]</sup>。Tchetina 等<sup>[8]</sup>发现 TGF- $\beta$ 1 可抑制软骨细胞胶原的降解,促进蛋白多糖合成,并能抑制软骨细胞的肥大分化而减少其骨化,从而治疗骨关节炎。本实验各组新生软骨 TGF- $\beta$ 1 染色细胞阳性率和 AOD 值表明:

A、B 组间差异不显著,且均明显高于 C 组,可见 A、B 组新生软骨所含 TGF- $\beta$ 1 数量相当,明显多于 C 组,这有利于修复软骨缺损。

机体耳、鼻、关节、气管等部位软骨因外伤、疾病均有缺损可能,软骨缺损的修复日渐重要。本实验表明 DBM 和软骨膜联合移植修复软骨缺损效果理想,成功率高,为软骨缺损的修复提供了理想的材料和途径,具有广泛的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Falsafi S, Koch RJ. Growth of Tissue-Engineered Human Nasoseptal Cartilage in Simulated Microgravity [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 126(6): 759 - 765.
- [2] Matsusaki M, Yoshida H, Aashki M. The construction of 3 D-engineered tissues composed of cells and extracellular matrices by hydrogel template approach [J]. Biomaterials, 2007, 28(17): 2729 - 2737.
- [3] Li X, Jin L, Balian G, et al. Demineralized bone marx gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering [J]. Biomaterials, 2006, 27(11): 2426 - 2433.
- [4] Pacaceo DJ, Stern SF. Demineralized bone matrix: basic science and clinical applications [J]. Clin Podiatr Med Surg, 2005, 22(4): 599 - 606.
- [5] Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium binding Proteins of the EF-hand type [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1450(3): 191 - 231.
- [6] Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, et al. S100 protein and neuron specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of Cell damage in human central nervous system [J]. Stroke, 2002, 18(5): 911 - 918.
- [7] Emin N, Koe A, Durkut S, et al. Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: effects of tgf-beta 1 and microgravity bioreactor culture [J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2008, 36(2): 123 - 137.
- [8] Tchetina EV, Antoniou J, Tanzer M, et al. Transforming growth factor-beta1 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduce sex pression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E (2) production [J]. Am J Pathol, 2006, 168(1): 131 - 140.

(修回日期:2010-03-01)