

· 论 著 ·

微骨折技术修复羊膝关节软骨缺损组织学观察*

张 颖, 王富友, 谭洪波, 杨 柳[△]

(第三军医大学西南医院关节外科中心, 重庆 400038)

摘要:目的 观察动物模型中微骨折技术对软骨缺损的组织学修复。方法 以 12 个月龄青山羊为实验动物, 选取膝关节股骨内侧髁为软骨缺损处, 制备 6 mm 缺损模型。实验设定空白对照组及微骨折组, 分别于 12、16 周取标本进行 Safran-O 染色及改良 Wakitani 评分, 比较组间差异。结果 组织学观察可见空白对照组缺损处无明显软骨修复, 微骨折组缺损处组织填充。改良 Wakitani 评分提示两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$), 微骨折组优于空白对照组。结论 微骨折技术是一种简单、有效的治疗关节软骨缺损的方式, 修复组织为混合性软骨。

关键词: 关节软骨; 软骨修复; 微骨折

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.008

中图分类号: R684; R361.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2565-02

Microfracture technique in the treatment of articular cartilage defect: a goat model*

ZHANG Ying, WANG Fu-you, TAN Hong-bo, et al.

(Centre for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of microfracture in the treatment of articular defect of a goat model. **Methods** To use 12 months-old goat as experimental animal, prepare 6mm defect of the femur medial condyle as the model of articular cartilage defect. Setting two groups which contained blank control and microfracture group. The observation index focus on Safran-O staining and modified Wakitani score in 12 week and 16 week specimens, respectively. To use statistical analysis to compare the difference between the two groups. **Results** The blank control defects had not clearly cartilage reappear by general observation, microfracture group defects had tissue filled. There was a significant difference between two groups by statistic. The microfracture group was superior to the blank control. **Conclusion** Microfracture technique is a simple and effective method to repair the articular cartilage defect, the type of repaired tissue was multi-cartilage.

Key words: articular cartilage; cartilage repair; microfracture

临床常见关节软骨缺损, 由于软骨组织没有神经、血管及软骨细胞再生能力差等原因, 直径超过 4 mm 的软骨缺损难以自身修复。如何实现直径超过 4 mm 的软骨缺损再生修复是临床医生研究的热点问题。目前, 临床用于治疗软骨缺损的方法约 10 多种, 其中微骨折技术作为一种最为简单、有效的软骨修复方法得到学者公认。20 世纪 80 年代 Steadman 等^[1]在以往骨髓刺激术的基础上, 提出微骨折技术, 经过长期随访, 临床疗效确切, 但尚缺乏组织学证据。本文建立青山羊膝关节软骨缺损模型, 采用微骨折技术进行修复, 术后不同时间取材, 从组织学层面阐明微骨折技术修复软骨缺损的机制。

1 材料与方

1.1 材料 12 个月龄青山羊 10 只由第三军医大学动物实验中心提供, 体质量 20~25 kg, 平均 22.9 kg。术前均经 X 线确认骨髓线已闭合, 排除骨科相关疾病。微骨折专用手锥为美国施乐辉公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将 10 只山羊随机分为两组, 每组 5 只, A 组为软骨缺损空白对照组, B 组为微骨折修复组。山羊关节软骨缺损模型参照 Jackson 等^[2]方法建立。

1.2.2 手术方法 速眠新(0.15 mL/kg)肌肉注射麻醉, 取仰

卧位, 四肢固定于专用固定架上。膝关节常规备皮、消毒、铺单, 取正中切口经髌内侧入路进入关节腔, 使髌骨向外侧脱位后显露股骨内侧髁。于股骨内侧髁用模具刀制造出直径为 6 mm 圆形全厚软骨缺损, 深度约 2 mm。实验组用 90°微骨折手锥在缺损处制备微骨折孔, 孔间距约为 2~3 mm, 深度约为 3~4 mm, 微骨折孔深度以直视下可见脂肪滴或孔中渗血为度。A 组不做任何处理。复位髌骨, 逐层缝合关节囊、皮下组织及皮肤, 关闭切口。术后常规饲养。

1.2.3 观测指标 术后 12、16 周取材, 进行大体和组织学观察, 切片行 Safran-O 染色, 并用改良 Wakitani 评分方法对 A、B 组软骨修复结果进行半定量分析^[3]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间对比采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察 术后 12 周, A 组可见缺损处大量滑膜增生、包裹, 清理后缺损处未见明显填充; B 组可见缺损处填充, 与周围正常关节软骨颜色较为一致。

2.2 组织学观察 术后 12 周, B 组修复区由透明软骨样组织构成, 细胞周围出现软骨陷窝, 数量多, 排列不规则, 表层细胞

* 基金项目: 重庆市科技攻关计划基金资助项目(CSTC, 2009AC5018); 第三军医大学科研创新基金资助项目(2009XQN24)。△ 通讯作者, 电话: (023)68765280; E-mail: jointsurgery@mail.tmmu.com.cn。

体积较小,数量稍多,深层细胞体积稍大,细胞外基质较少,蕃红 O 染色阳性(图 1);A 组缺损区为纤维组织覆盖,表面明显凹陷。术后 16 周,B 组修复区为透明软骨样修复,表面平整,与周围软骨整合紧密,厚度相近,细胞数较术后 8 周减少,但数量较正常软骨仍多,细胞排列趋于一定方向性(图 1);A 组缺损区表面凹陷,与正常软骨连接处表面纤维组织毛糙,细胞外基质排列紊乱。

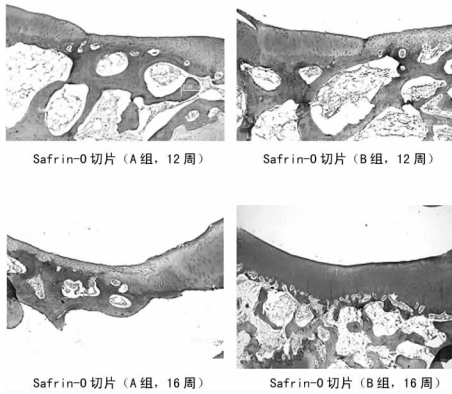


图 1 标本组织学观察

2.3 组织学评分 根据大体标本观察与组织学分级标准,对各标本修复结果进行分级归类。由表 1 可以得知,A 组不完全修复标本,改良 Wakitani 评分为(9.53±0.97)分;B 组修复效果明显好于 A 组,改良 Wakitani 评分为(3.96±1.12)分;两组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组组织学评分比较

组别	n	改良 Wakitani 评分
A 组	5	9.53±0.97
B 组	5	3.96±1.12*

与 A 组比较,* : $P<0.05$ 。

3 讨 论

关节软骨缺损的高发病率越来越受到临床医生的关注,1997 年 Curl 等^[4]就曾经对其 31 516 例膝关节镜手术进行统计学分析,发现 63% 的患者合并有软骨损伤。目前,软骨修复再生一般分为 2 种策略:(1)体外制备软骨或软骨移植术;(2)体内利用细胞修复软骨^[5]。其中第 2 种策略代表技术为微骨折技术及自体软骨细胞移植术(ACI)^[6-7]。

微骨折技术作为一种最为简单、有效的治疗关节软骨的方式目前已经得到公认。该技术由 Steadman 等^[1]在前期的软骨钻孔术的基础上进行创新改良,至今已经使用超过 20 余年。其技术原理为通过钻孔,造成髓腔内小血管破裂,血液在软骨缺损处形成纤维蛋白凝块,继而骨髓内的多分化潜能干细胞到达凝块内,在关节软骨和局部微环境的作用下向软骨细胞分化,并最终形成新的软骨组织。

大动物实验是临床前研究的重要一环,山羊作为关节软骨修复实验模型是既往研究中较为推荐的模型之一,其膝关节活动度较猪、狗等更接近于人类膝关节活动度,Jackson 等^[2]的研究证实山羊股骨远端内侧髌软骨缺损大于或等于 6 mm 将不能自行修复,故而本实验采取 6 mm 的模具制备缺损进行研究。

本研究发现,微骨折技术本身为一种有效的技术,而且其

操作简便、易行。有研究显示,微骨折技术形成的软骨为纤维软骨^[8],通过本研究证实,实际修复组织切片内可见细胞外基质,证实修复组织为混合性软骨。

目前,利用细胞治疗软骨缺损的研究较为热门,其中 1994 年由 Mcnickle 等^[5]提出的 ACI 技术较为风靡。但是,Knutsen 等^[9-10]多项研究显示,无论是修复早期还是随访长达 11 年的观察,两种技术比较差异无统计学意义,临床疗效都同样出色。相比而言,ACI 技术花费昂贵,微骨折技术相对廉价,对操作及手术条件要求都不高,易于开展^[11]。

综上所述,微骨折技术是一项临床疗效确切的外科学技术,为治疗软骨缺损提供了一种简单、易行的办法。目前该技术修复的具体机制,尤其是干细胞如何向软骨细胞分化或是在怎样的特定微环境中才诱导干细胞分化等方面^[12-13]仍然值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, et al. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint[J]. Orthopade, 1999, 28(1): 26.
- [2] Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, et al. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83(1): 53.
- [3] Wakitani S, Goto T, Young RG, et al. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel[J]. Tissue Eng, 1998, 4(4): 429.
- [4] Curl WW, Krome J, Gordon ES, et al. Cartilage injuries: a review of 31, 516 knee arthroscopies[J]. Arthroscopy, 1997, 13(4): 456.
- [5] Mcnickle AG, Provencher MT, Cole BJ. Overview of existing cartilage repair technology[J]. Sports Med Arthrosc, 2008, 16(4): 196.
- [6] Bekkers JE, Inklaar M, Saris DB. Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee; a systematic review [J]. Am J Sports Med, 2009, 37: 148.
- [7] Solheim E, Oyen J, Hegna J, et al. Microfracture treatment of single or multiple articular cartilage defects of the knee; a 5-year median follow-up of 110 patients[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009, 29: 246.
- [8] Ramappa AJ, Gill TJ, Bradford CH, et al. Magnetic resonance imaging to assess knee cartilage repair tissue after microfracture of chondral defects[J]. J Knee Surg, 2007, 20(3): 228.
- [9] Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years[J]. J Bone Joint Surg Am, 2007, 89(10): 2105.
- [10] Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial[J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86(3): 455.

因信号传导途径^[13-15], 蛋白 E-cadherin 和 ZO-1 的表达缺失可以通过抑制 Ras 激活 ERK 信号转导通路引起表达上调, 而同样作为细胞黏附分子的 CAR 是否也能通过该通路的改变引起表达的上调呢? 已报道 Raf-MEK-ERK 信号传导途径与许多病毒感染有关, 病毒感染靶细胞可激活该信号传导途径; Raf-MEK-ERK 信号传导途径活化后又可进一步促进病毒的复制增殖, 调节细胞的增殖、分化和存活。作为多种生长因子(EGF、NGF、PDGF 等)的下游蛋白, ERK 信号途径在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用, 一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号, 另一方面通过 ERK 信号级联反应作用于核转录因子如 AP-1、NF- κ B 等, 调控基因表达。许多受体 Tyr 蛋白激酶及与 G 蛋白耦联的细胞因子受体都可激活胞内 Ser-Thr 蛋白激酶, 即 MAPKs(mitogen-activated Protein kinases), 而 CAR 胞内域也存在 Tyr 磷酸化位点。因此, 本文尝试通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径来上调食管癌 EC9706 细胞 CAR 表达。总之, 食管癌 EC9706 细胞表面 CAR 的表达可通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径而上调, 但具体抑制剂的浓度和抑制效果与细胞类型有关

参考文献:

[1] Bruning A, Runnebaum IB. The coxsackie adenovirus receptor inhibits cancer cell migration[J]. *Exp cell Res*, 2004, 298(2):624.

[2] Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to genetherapy[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13):133812.

[3] Douglas JJ, Kim, Sumerel LA, et al. Efficient oncolysis by a replicating adenovirus(ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary adreceptors[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3):813.

[4] 范良生, 陈刚, 马丁. 柯萨奇-腺病毒受体在肿瘤发生发展机制中的研究进展[J]. *癌症*, 2009, 28(3):333.

[5] Manabu Y, Asami I, Kenji K, et al. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121:1690.

[6] Glasgow JN, Bauerschmitz GJ, Curiel DT, et al. Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications[J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(1):1.

[7] Okegawa T, Nutahara K, Pong RC, et al. Enhanced transgene expression in urothelial cancer gene therapy with histone deacetylase inhibitor[J]. *J Urol*, 2005, 174(2):747.

[8] Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, et al. Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase specific replication selective adenoviral agent OBP2301 in human lung cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(3):256.

[9] Krom YD, Gras JC, Frants RR, et al. Efficient targeting of adenoviral vectors to integrin positive vascular cells utilizing a CAR cyclicRGD linker protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2):847.

[10] 吴赞, 郑辉, 陈宏新, 等. CAR 的表达调节对肝癌基因治疗中腺病毒载体感染效率的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 24(3):205.

[11] 王仕忠, 王勇, 关乃富, 等. 肺癌细胞表面 CAR 表达水平与腺病毒转基因治疗的可能性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 17(6):947.

[12] Krasnykh V, Dmitriev I, Navarro JG, et al. Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor independent cellular entry capacity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4):578.

[13] Hemminki A, Kanerva A, Liu B, et al. Modulation of Cox-sackie-Adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:847.

[14] Anders M, Christian C, McMahon M, et al. Inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway up-regulates expression of the coxsackievirus and Adenovirus receptor in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:2088.

[15] Wilcox ME, Yang WQ, Senger D, et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(12):903.

(收稿日期:2010-02-29 修回日期:2010-03-05)

(上接第 2566 页)

[11] Millett PJ, Huffard BH, Horan MP, et al. Outcomes of full-thickness articular cartilage injuries of the shoulder treated with microfracture[J]. *Arthroscopy*, 2009, 25(8):856.

[12] Frank RM, Van Thiel GS, Slabaugh MA, et al. Clinical outcomes after microfracture of the glenohumeral joint

[J]. *Am J Sports Med*, 2010, 21:126.

[13] Asik M, Ciftci F, Sen C, et al. The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee: midterm results[J]. *Arthroscopy*, 2008, 24(11):1214.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-05-09)