

异种皮质骨内固定器植入后的组织学观察

丁仁奎¹ 倪江东¹ 祝天经²

[摘要] 目的 观察异种皮质骨棒植入骨内后的组织学变化, 为异种皮质骨内固定器的应用提供依据。方法 35只成年新西兰兔, 于股骨髁和胫骨上段钻孔后植入骨棒和克氏针, 分别于术后1、2、4、8、12、26、52周处死动物, 进行组织学观察和免疫组化检查。结果 12周开始骨棒逐渐被宿主吸收并有血管浸润, 植入后细胞浸润主要以淋巴细胞为主, CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺在两组均有表达, 而CD₄₅RB⁺仅在骨棒组有短暂表达。结论 异种皮质骨棒可被宿主吸收替代, 可引起宿主产生排异反应, 但与对照组相比无显著性差异

[关键词] 异种皮质骨内固定器; 植入; 组织学检查

[中图分类号] R318.08 **[文献标识码]** A

Histological examination of heterogenic cortex internal-fixator after imphontation in rabbit

Ding Rènkuí, Ni Jiāngdōng, Zhù Tiānjīng. 1 The 2nd Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha, China 410011

[Abstract] **Objective** To investigate the histological characteristics of the heterogenic cortex internal fixator(HCIF) implanted in rabbit bone and compared with needle. **Methods** Holes were drilled in fumer condyle and proximal tibia of the rabbit and the HCIF and the needle were implanted. The animal were killed at 1, 2, 4, 8, 12, 26, 52 weeks after operation respectively and received x-ray, macroscopic, microscopic and histochemistry examination. **Results** There was nearly no changes in the shape and the construction of the HCIF 8 weeks surgery, after 12weeks the signs showed the HCIF was abosorbed and the capillary infiltrated, immunohistologic chemistry examination shows that the infiltrated cells were CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺ cells predomently at two groups, the CD₄₅RB⁺ cell were temporary expressed at 4 weeks in HICF group. **Conclusion** The implanted HCIF can be absorbed and substutied by bone tissue of the host, there is a immune response after implantation, but there is no significant difference between two groups.

[Key words] Heterogenic cortex internal fixator; implantation; Histologic examination

目前骨科临床治疗中使用的金属内固定器械大多需要二次手术取出, 增加了病人的痛苦, 可吸收材料制作的内固定器械则可避免二次手术。我们用异种皮质骨(牛骨)经过加工、制成内固定材料(已申请专利)进行相关研究, 结果表明在力学强度上基本可以满足治疗需求, 实验证明对松质骨折可获得满意内固定效果^[1]。

异种骨移植用于治疗骨缺损已有很长历史, 国内外均有大量相关报道, 其治疗效果已得到肯定^[2], 但以牛皮质骨作为内固定器则较少, 为了解其对宿主的影响, 我们将牛皮质骨植入兔体内观察其变化, 评价对宿主局部的影响。

1 材料与与方法

1.1 实验材料: 牛皮质骨棒由湖南株州天健科技开发(有限)责任公司提供, 克氏针为江苏金鹿集团器械公司生产(批号2002年2月), 上述材料规格均为 $\phi 2\text{mm} \times 6\text{mm}$ 的圆柱体, 消

毒灭菌后备用。

1.2 实验方法: 成年新西兰大白兔(中南大学湘雅二医院动物中心提供, 清洁级)35只, 雌雄不拘, 体重2.5~3.5kg, 3%戊巴比妥钠40mg·kg⁻¹静脉麻醉, 双膝剪毛, 常规消毒, 铺单, 膝内侧切口, 于股骨髁和胫骨平台下方各植入骨棒(右侧, 实验组)和克氏针(左侧, 对照组), 分层缝合伤口, 分笼饲养, 术后5天每天肌注青霉素10万U·kg⁻¹, 术后1、2、4、8、12、26、52周分批处死动物, 每批5只, 双膝X照片, 4%甲醛固定, 10%EDTA脱钙, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 组织切片, HE染色进行常规组织学观察, 免疫组化染色进行淋巴细胞亚群检查。

2 结果

2.1 大体观察: 术后1周两组动物在植入口均有软组织增生反应, 但无红肿、流脓及窦道等感染迹象, 骨表面均未见植入物, 2周后局部增生反应开始消退, 4周后局部组织与周围组织无显著差异。

2.2 X线照片: 植入物位置良好, 钢针显示致密影, 牛骨棒于术后1周密度较高(高于兔皮质骨密度), 8周时与兔皮质骨

密度相当, 12周时则示略低于兔皮质骨密度。26周植入物仍可见, 但松质骨内植入物显示模糊, 靠近皮质骨则轮廓清晰, 52周时植入物轮廓完整, 但很模糊, 密度不均。

2.3 组织学观察:

观察方法: 以植入物为中心, 上下左右及远侧部位(随机)选取5个高倍视野进行细胞计数。

术后1周时炎症反应明显, 植入物周围炎性细胞浸润, 主要为淋巴细胞, 其次为多核白细胞及巨噬细胞, 浆细胞极少, 未见巨细胞, 可见红细胞, 植入物周围的宿主骨内可见骨小梁扭曲、变形、排列紊乱、部分小梁骨变性及吸收征象, 高倍镜下可见小梁表面细胞有少量脱落, 尤以植入物周围变化明显, 远侧端则无此现象。实验组和对照组无显著性差异(图1)。

术后2周情况与1周时相似, 但骨小梁表面细胞脱落有所减少, 炎症反应仍较明显(图2), 术后4周时炎症减轻, 有成骨迹象, 可见散在软骨岛, 大小不一, 出血征象消失, 骨小梁排列整齐, 双侧相比无显著性差异(图3)。

术后8周: 炎性细胞浸润程度减轻, 细胞类型与1周所见相同, 骨小梁排列整齐, 小梁骨表面细胞排列规整, 近侧与远侧无差异, 未见点状分布的红细胞, 植入物周围有纤维组织包裹, 实验组纤维化程度较对照组明显。实验组植入物表面有虫蚀样改变, 植入物中央部位孔隙形成及碎片样崩解, 未见脂肪浸润(图4)。

术后12周: 炎性细胞浸润几乎消失, 植入物周围纤维化亦减轻, 骨小梁规整有序, 牛骨棒表面虫蚀样改变与8周相比无显著性变化, 在植入物与宿主骨床之间可见牛骨棒降解碎屑, 大小不一, 散在分布, 其他方面对照组与实验组均无差异(图5)。

术后26周: 对照组边缘整齐、光滑、小梁骨包绕克氏针形成完整的环形结构, 纤维组织极少, 亦未见典型炎性细胞。与其他部位组织结构相似, 而实验组则可见牛骨棒崩解为碎片状(尽管X片示形状完整, 但切片显示仍有变化), 碎片之间有较大空隙, 宿主骨形成一层包膜, 其细胞成份主要为淋巴细胞样细胞和成纤维细胞样细胞, 未见其他类型的炎症细胞(图6)。

术后52周可见牛骨棒呈松散碎片状, 裂隙增大并有大量血管网形成, 对照组无明显变化(图7)(见表1)。

2.4 免疫组化分析

CD₃、CD₄、CD₈、CD₄₅RB、CD₆₈免疫组化购自上海长岛生物

诊断试剂公司, 采用间接过氧化物酶技术(ABC法)、DAB显色、计数方法与常规组织学相同(见表2)。

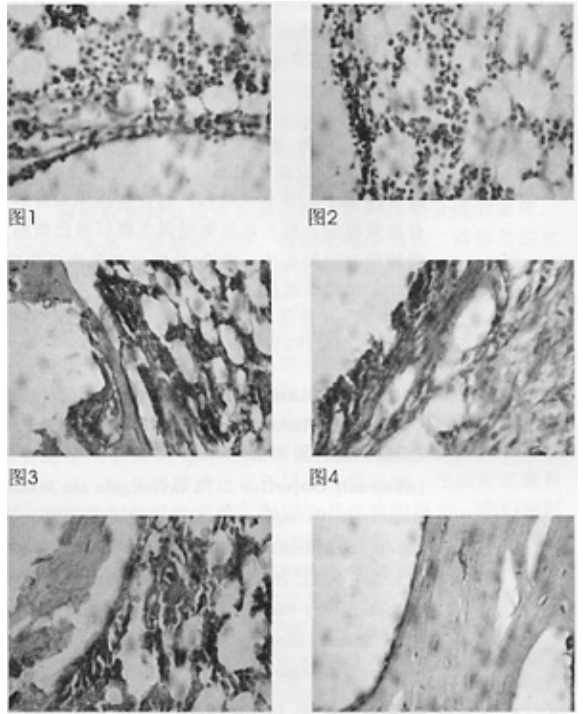


图5

图6

表2 每个高倍视野阳性细胞平均数

| | | 1周 | 2周 | 4周 |
|---------------------|---|----------|----------|-----------|
| CD ₃ | 实 | 19±6.3 | 24±7.2 | 23±5.2 |
| | 对 | 17±5.8 | 20±7.8 | 21±6.7 |
| CD ₄ | 实 | 12.8±4.4 | 16±6.5 | 16.6±4.7 |
| | 对 | 10.3±3.6 | 14.5±5.7 | 16.2±5.9 |
| CD ₈ | 实 | 8.3±3.6 | 10.7±4.4 | 11.2±3.5 |
| | 对 | 6.9±2.4 | 8.8±2.8 | 8.6±2.4 |
| CD ₄₅ RB | 实 | (-) | (-) | 3.8±2.6 |
| | 对 | (-) | (-) | 偶见 |
| | | 8周 | 12周 | 26周 |
| CD ₃ | 实 | 14±4.4 | 6.2±1.3 | 4.27±2.28 |
| | 对 | 13±5.8 | 6.3±10.9 | 3.86±1.94 |
| CD ₄ | 实 | 8.8±2.8 | 3.2±2.1 | 偶见 |
| | 对 | 5.3±2.2 | 2.6±1.7 | 偶见 |
| CD ₈ | 实 | 3.2±2.4 | 偶见 | 偶见 |
| | 对 | 3.5±2.2 | 偶见 | 偶见 |
| CD ₄₅ RB | 实 | 偶见 | 偶见 | (-) |
| | 对 | 偶见 | 偶见 | 偶见 |

实验组: 对照组P>0.05

表1 每个视野炎性细胞数

| | | 1周 | 2周 | 4周 | 8周 |
|-----|-----|----------|----------|----------|----------|
| 实验组 | | 44.5±5.6 | 36.5±6.7 | 22.8±4.4 | 16.2±4.7 |
| | 对照组 | 38.6±7.4 | 37.4±5.9 | 24.1±7.7 | 13.3±5.2 |
| | | 12周 | 26周 | 52周 | / |
| 实验组 | | 7.70±5.4 | 3.5±2.2 | 2.8±1.6 | / |
| | 对照组 | 5.2±2.3 | 3.3±1.7 | 3.0±1.2 | / |

同期 实验组: 对照组 P>0.05

1, 2, 4周: 8, 12, 26, 52周 P<0.05

实验组植入1周时即可见大量淋巴细胞浸润，主要为CD₄⁺、CD₈⁺细胞，至4周仍维持较高水平（图8），8周时缓慢回落，26周后未见典型阳性细胞（图9），而作为B细胞标志物的CD₄₅RB⁺于4周才见到一过性表达（图10），其他时间观察点未见明显阳性表达（图11）。

对照组CD₄⁺、CD₈⁺表达与实验组相似，未见明显CD₄₅RB⁺阳性表达。

3 结论

目前骨折内固定器材仍以金属类钢性固定为主，经过不断改进，其应力遮挡导致的局部骨质疏松和骨质疏松也明显减轻^[3,4]，但由于需要二次取出，因此可吸收材料成为重要发展方向，特别是松质骨骨折和非承重部位的骨折，可吸收材料的机械强度可满足固定要求，并可随着骨折愈合而被宿主吸收，无需二次手术。

3.1 异种皮质骨钉的应用

牛皮质骨具有的生理性结构与入骨组织相似，但强度要高于人骨，因此经加工制成的器材不失为一种理想的内固定材料，牛骨来源广泛，取材容易，可以满足临床要

求。

组织学观察表明牛骨钉植入异种动物体内后，1~4周未见明显变化，第8周时表面出现虫蚀改变，表明有骨质吸收，随着时间延长，吸收降解更明显，26周时尽管在X片上形态保持完整，但组织切片显示已崩解为碎片状，同时内部裂隙增大，有宿主血管浸润，最终由自体骨取代，与同种异体骨移植相似^[5]。

3.2 异种皮质骨的抗原性

牛皮质骨的抗原包括 ①天然异种抗原：α-半乳糖基抗原存在于除旧灵长类以外的所有哺乳动物体内，骨中分布相对较少；②主要组织相容性复合物(MHC)决定的细胞表面糖蛋白，主要表达于骨细胞、成骨细胞、破骨细胞等细胞膜表面；③骨中的胶原、基质等成份尽管在种属之间有较高的同源性，但仍有差异性，可引起免疫反应。实验表明，术后第一周即可见植入物周围有大量CD₄⁺、CD₈⁺细胞，一直持续到第8周才开始缓慢回落，而代表体液免疫反应的CD₄₅RB⁺则仅于术后4周有阳性表达。提示异种皮质骨移植主要以细胞免疫反应为主，体液免疫反应可能为一过性反应，但对对照组中也可发现CD₄⁺、CD₈⁺的表达，推测可能与金属局部刺激有关。

综上所述，异种皮质骨移植后随着时间延长可不断降解吸收，同时可引发宿主产生特异反应，主要以细胞免疫反应为主，与对照物相比无明显差异，因此对宿主产生的损害在可以接受的范围之内。

【参考文献】

1. 丁仁奎, 祝天经, 王万春, 等. 牛皮质骨棒治疗兔膝关节内骨折的实验研究. 临床骨科杂志, 1998; 1(2): 89-91.
2. 胡蕴玉, 陆裕朴, 刘玮, 等. 重组异种骨的实验研究和临床应用. 中华外科杂志, 1993; 31: 709-713.
3. 辛暴义, 张铁良, 于顺禄, 等. 桥形钢板的研制与临床研究. 中华骨科杂志, 2000; 20(2): 103-106.
4. O' Sullivan ME, Chao EY, Kelly P; et al. The effects of fixation on fracture-healing. J Bone Joint Surg(Am) 1989; 71: 306-310.
5. 李幼忱, 李宝兴, 孙世奎, 等. 兔骨内植入同种骨钉及聚酯棒与组织学对比观察. 中华创伤杂志, 2000; 16(12): 731-734.

【作者简介】丁仁奎, 硕士, 副研究员, 主要从事骨科临床和基础研究, 研究方向: 骨移植材料, 骨关节炎等。

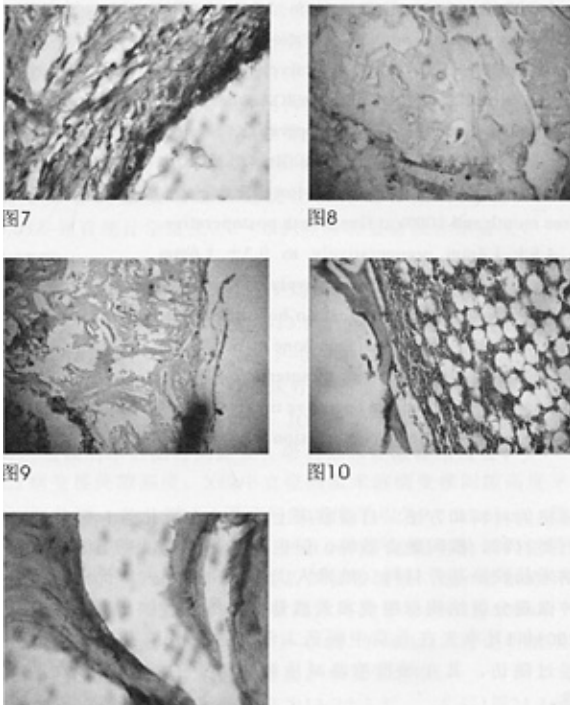


图11