

为人们所重视。本实验采用免疫组化及原位杂交技术,观察 BMP-2、TGF- β 1 基因在相关细胞中的表达,从而揭示微小颗粒骨移植成骨的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型

成年日本大耳白兔 48 只,雌雄不限,体重 2.1~3.0kg。随机分为 A、B 两组,各 24 只。3%戊巴比妥钠(1mg/kg) 静脉麻醉,取左侧髂骨,修成 0.3×0.5×1.0cm 骨块。A 组将所得骨块在无菌条件下,水浴中用磨钻以 2600r/min 磨取颗粒骨。显微镜下测量见颗粒多为 300~500 μ m,再以 2500r/min 离心去液体,植入右侧臀大肌肌袋;B 组将所得骨块直接植入。于术后 1、3、5、7、11、14、21、28d 每组各处死 3 只动物,取材(包括移植骨及周围软组织),4%多聚甲醛固定 4h(4℃)。EDTA 脱钙,石蜡包埋后切 5 μ m 厚片。切片均随机分为两组,即 BMP-2 组和 TGF- β 1 组。整个过程严防 RNAase 污染。

1.2 免疫组织化学(IHC)染色

将石蜡切片至水化后采用常规 ABC 法免疫组化染色,以抗 BMP-2 单克隆抗体和抗 TGF- β 1 单克隆抗体作为一抗,另以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照(单克隆抗体、ABC 免疫试剂盒为中山生物研究所产品)。

1.3 图像分析及统计学处理

400 倍光镜下对各时相点每只动物的两种免疫组化切片随机选取 5 个视野;利用 photoshop 7.0 软件测量平均灰度值,以其来表示阳性细胞表达强度,灰度值越小则阳性表达越强。采用组间样本均数进行比较, t 检验。

2 结果

2.1 BMP-2 免疫组化观察

术后第 1 天两组植入物即有少量间充质细胞 IHC 呈弱阳性反应。术后第 3 天 A 组颗粒内骨细胞胞核完整,较多的未分化间充质细胞呈 IHC 阳性反应;B 组在植入物周边有少量细胞呈 IHC 阳性反应。术后 5~7d, A 组颗粒间形成骨岛,并有软骨团直接形成在骨颗粒上,同时有血管长入, IHC 阳性反应广泛分布于周围的细胞及基质(图 1a, 后插页 IV); B 组移植骨周边有吸收,少许间充质细胞向成骨细胞转化,无新骨形成, IHC 阳性反应

分布与 A 组相同,但颜色较淡(图 1b, 后插页 IV)。术后 11~14d, A 组软骨面积增大,植入物中央部分近于 3~5d 时的表现,由内向外移植骨存在不同的成骨阶段, BMP-2 浓度由高向低分布; B 组移植骨吸收明显,周边附着一层新生成骨细胞, IHC 阳性分布与 A 组相同,但着色弱。术后 21d, A 组形成髓腔,在中央有新生软骨及骨形成, IHC 阳性分布较多的出现于新生区(图 2a, 后插页 IV); B 组仍为旧骨吸收伴新骨形成,植入物体积变小(图 2b, 后插页 IV)。术后 28d, A 组颗粒骨已完全被新骨替代,出现髓腔增大等成熟表现,在周边与软组织相邻处出现骨吸收; B 组无明显变化。

2.2 TGF- β 1 免疫组化观察

术后 1~3d, A 组见基质及周围肌肉 TGF- β 1 阳性染色; B 组在骨块周围 TGF- β 1 染色较强,而骨块中央 TGF- β 1 染色较弱。两组植入骨上存活的骨细胞 TGF- β 1 阳性染色,但颗粒骨组较深。5~11d 时, A 组大量间充质细胞、成软骨细胞及软骨细胞 TGF- β 1 阳性染色,基质 TGF- β 1 阳性染色(图 3a, 后插页 IV); B 组见周围软组织及骨皮质少量 TGF- β 1 阳性细胞,为间充质细胞及存活的骨细胞(图 3b, 后插页 IV)。14d 以后, A 组 TGF- β 1 染色下降,在成骨细胞、骨细胞中表达,肥大软骨细胞阴性(图 4a, 后插页 IV); B 组见骨细胞、间充质细胞、成软骨细胞 TGF- β 1 阳性,量少(图 4b, 后插页 IV)。PBS 液代替一抗的阴性对照未见阳性染色。

2.3 图像分析结果

BMP-2 和 TGF- β 1 免疫组化染色图像数据分析结果见表 1。各时相点 A 组 BMP-2 的含量均高于 B 组,二者间差异有显著意义($P<0.01$)。各时

表 1 两组动物术后不同时间点 BMP-2、TGF- β 1 免疫组化染色平均灰度值 ($\bar{x}\pm s$)

时间 (d)	A组		B组	
	BMP-2	TGF- β 1	BMP-2	TGF- β 1
1	101.47 $\pm$ 5.19	87.83 $\pm$ 19.25	114.42 $\pm$ 4.82 ^①	100.17 $\pm$ 12.26 ^①
3	96.81 $\pm$ 7.20	89.20 $\pm$ 14.45	107.56 $\pm$ 5.04 ^①	106.98 $\pm$ 18.81 ^①
5	93.39 $\pm$ 4.61	80.16 $\pm$ 10.40	101.15 $\pm$ 6.09 ^①	112.11 $\pm$ 11.84 ^①
7	88.71 $\pm$ 3.80	78.53 $\pm$ 19.45	98.07 $\pm$ 3.01 ^①	108.57 $\pm$ 10.44 ^①
11	77.06 $\pm$ 4.36	82.18 $\pm$ 15.58	90.94 $\pm$ 2.94 ^①	117.86 $\pm$ 17.64 ^①
14	79.70 $\pm$ 3.74	80.14 $\pm$ 16.54	89.11 $\pm$ 4.42 ^①	97.46 $\pm$ 14.27 ^①
21	82.83 $\pm$ 2.61	93.76 $\pm$ 24.37	89.72 $\pm$ 4.71 ^①	113.59 $\pm$ 17.25 ^①
28	87.55 $\pm$ 5.26	95.96 $\pm$ 13.19	92.89 $\pm$ 5.83 ^①	118.84 $\pm$ 13.73 ^①

①与 A 组同时点比较 $P<0.05$

相点 A 组 TGF- β 1 的含量明显高于 B 组,二者间差异有显著意义($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来颗粒骨移植以其良好的可塑性正逐渐被人们所关注。在“Sloof-Ling”技术中^[3],应用颗粒骨移植解决人工全髋置换术后髋臼松动、溶解,取得了良好效果。党耕町等^[4]将颗粒骨应用于寰枢椎后路融合术,也取得了良好的效果。颗粒骨除了可塑性强以外,就是骨表面积相对于块状骨来说极其巨大,而且颗粒越小表面积越大,与机体接触面积增大,这有利于增殖血管的长入及其营养物质的运输,对骨组织重建有重要意义。本实验观察自体骨移植过程中两种影响成骨的细胞因子 BMP-2 和 TGF- β 1 的表达高峰时间和表达细胞分布规律,通过比较以明确细胞因子的表达和骨接触面积的关系,进一步从分子水平探讨颗粒骨移植成功的机制,以指导临床应用。

3.1 BMP-2 在微小颗粒骨移植中的表达及意义

本实验中,BMP-2 的免疫组化结果显示,两种植骨方式早期即有明显差异,A 组早期 BMP-2 浓度较高,可以诱导相对多的间充质细胞分化并分泌更多量的 BMP-2,产生类似正反馈的效果^[5]。在本实验观察到,A 组在第 7 天,散在肥大的间充质细胞功能活跃,合成 BMP-2 增多,BMP-2 浓度的高峰开始出现,随着骨组织的成熟,在局部 BMP-2 的免疫组化表达随之下降。但因血管向颗粒内的迅速长入,出现移植物由内向外存在不同的成骨阶段,使 BMP-2 浓度在此期间持续较高,到第 28 天移植物基本形成完全成熟骨组织时,才逐渐下降,这使内源性 BMP-2 释放大,高峰持续时间长。块状移植骨只有表面的骨细胞存活,内部的骨细胞基本死亡,其转归需要漫长的爬行替代过程。骨形成过程中 BMP-2 表达阳性,其来源是植骨床周围的间充质细胞^[6]。作为一种蛋白质,BMP-2 生物半衰期较短,而微小颗粒骨中所含的内源性 BMP-2 能在短期内快速释放,达到一个较高的浓度,更好地诱导周围的间充质细胞增生、分化并分泌 BMP-2,产生正反馈。

3.3 TGF- β 1 在微小颗粒骨移植中的表达及意义

本实验中,早期即见 TGF- β 1 的阳性染色,这与董玉峰等^[6]发现骨折早期血肿内基质有 TGF- β 1 表达相符。颗粒骨组中 TGF- β 1 含量大于块骨组,说明可能在血小板脱颗粒释放 TGF- β 1 的基

础上颗粒骨本身释放的 TGF- β 1 多于块骨组。第 5~14 天,TGF- β 1 的染色迅速加深,在其作用下间充质细胞大量增殖、分化为软骨细胞、成骨细胞,产生大量基质。软骨开始向骨转化,而块骨组只见到部分间充质细胞表达 TGF- β 1,细胞分化及基质合成量少。21d 以后,随着骨化进行细胞活动渐趋静止,两组细胞内 TGF- β 1 有所下降。实验中发现,颗粒骨组中,新生骨主要分布在移植的颗粒骨中间,在外周骨与肌肉接触处无新生骨。这可能是因为颗粒骨间隙适中,建立了一个有利于毛细血管、修复细胞长入的三维结构。另外,微小的骨颗粒表面积大,利于营养物质渗入,使骨细胞存活,加速成骨过程,可使 TGF- β 1 得以早期激活,启动异位成骨。Marcellic 等^[7]也发现在鼠股骨骨膜下注射 TGF- β 1 能刺激间充质细胞增殖并促进其分化为成骨细胞、软骨细胞,并加速细胞外基质蛋白合成。

3.4 自体微小颗粒骨植骨的优势

本实验中,由于植入骨体积相同,所以 BMP-2 和 TGF- β 1 含量基本相同,而在自体微小颗粒骨组异位成骨过程中,TGF- β 1、BMP-2 释放多于块骨组。这可能是因为微小颗粒骨表面积大、炎细胞及血管可以轻易长入,吸收快,导致相同时间内 BMP-2 和 TGF- β 1 释放较块状骨多。微小骨颗粒内可见成活的骨细胞,除爬行替代外,尚有部分骨粒的表面出现成骨现象,与颗粒间成骨共存,逐渐连接成片,融合成新骨。这与 Malinin 等^[8]试验结果一致,即诱导成骨方式主要表现为移植骨的骨吸收和新骨形成是同时发生,并逐步被新骨所替代。同时由于其颗粒间存在较大间隙,利于血管的长入,不但诱导的骨量多,还可迅速替代旧骨。但颗粒骨缺乏支撑和定作用。另外,颗粒骨移植成骨是一个复杂的过程,是多因素作用的结果,本研究只从一个方面探讨了颗粒骨成骨的机制,还有待于进一步的研究。

4 参考文献

1. Erebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, et al. Osteoblastic responses to TGF β 2 during bone remodeling [J]. Mol Biol Cell, 1998, 9 (7): 1903-1918.
2. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing: effects on osteoblasts, osteocytes, and implants fixation [J]. Acta Orthop Scand Suppl, 1998, 283(10): 28-37.
3. Tagil M. The morselized and impacted bone graft: animals ex-

- periments on proteins impaction and load [J]. Acta Orthop Scand Suppl, 2000, 71(1): 31-35.
4. 党耕町, 王超, 刘忠军. 使用颗粒状自体松质骨植骨的寰枢椎后路融合术[J]. 中华骨科杂志, 1997, 17(9): 544-546.
5. Wang J. Spatial orientation of the microscopic elements of cortical repair bone[J]. Clin Orthop, 2000, 374: 265-277.
6. 董玉峰, 戴克戎, 汤亭亭. 老年大鼠骨瘤中转化生长因子- β 1 的表达[J]. 临床骨科杂志, 2000, 3(1): 1-3.
7. Marcellic, Yates K, Mundy G. In vivo effects of human recombinant TGF on bone turnover in normal mice [J]. J Bone Mine Res, 1996, (5): 1087-1097.
8. Malinin TI, Mnaymneh W, Lo HK, et al. Cryopreservation of articular cartilage: Ultrastructural observations and longterm resorption experimental distal femoral transplantation [J]. Clin Orthop, 1994, 303: 18-32.
- (收稿日期: 2005-04-06 修回日期: 2005-08-04)
(英文编审 蒋欣)
(本文编辑 卢庆霞)

(上接第 686 页)

开 T5~T10 椎板, 未发现骨质破坏, 可见硬脊膜增厚, 脊髓组织变韧, T5 及 T10 水平脊髓膨胀, 切开脊髓均见一圆形结节, 质韧, 约 0.3×0.4cm 及 0.1×0.2cm, 与周围脊髓组织粘

连紧密, 完整切除结节, 囊内有坏死组织。病理检查为干酪样坏死物质(图 2, 后插页 I), 符合结核改变。术后给予抗结核治疗, 4 周后患者症状明显改善, 双下肢肌力已恢复到 1~2 级。随访半年浅感觉平面达 T6, 肌力无明显恢复。



图 1 a MRI 示 T5、T7、T10 椎体水平椎管内可见类圆形病变 b MRI 示 T5~T12 脊髓广泛空洞形成, 其内可见分隔 c MRI 示 T5、T10 椎体平面脊髓内类圆形病变及空洞

讨论 椎管内结核瘤又称为椎管内结核性肉芽肿, 为脊柱结核的一种并发症, 青年好发。多见于胸椎, 约占 60%, 其次为颈胸椎交界、胸腰椎交界和腰椎。通常结核菌经血行或淋巴侵入脊柱、硬脊膜内外或脊髓内。以硬脊膜外多见, 约 1/10~1/5 的脊柱结核伴发此症, 但单纯椎管内结核少见, 脊髓内结核瘤罕见, Torii^[1]和 Suzer^[2]各报道 1 例, 伴发脊髓空洞症者未见报道。

髓内结核瘤对脊髓造成的损害最为严重, 除了出现的髓内占位作用外, 结核本身的毒性作用对脊髓的损害也非常大, 我们在手术中可见到结核瘤的周围脊髓组织硬变纤维化明显, 空洞粗长, 患者脊髓功能障碍严重。

虽然髓内结核性肉芽肿罕见, 但在脊髓各种病变的鉴别诊断中必须考虑该病^[3]。根据病史、临床表现和 X 线片(脊柱结核变化)一般不难作出诊断。髓内病变可作椎管造影、脊髓 CT 或 MRI 辅助检查, 了解脊髓受压迫或破坏的程度、性质、范围及方位。脑脊液动力学试验呈完全梗阻或不完全梗阻。在治疗髓内结核性肉芽肿时应选用显微外科

切除方法, 同时应考虑抗结核的化学药物治疗^[4]。另外手术后必须注意预防并发症的发生, 还需作全身抗结核治疗, 联合使用抗结核的药物, 避免使用激素类药物^[5], 增强患者营养和防治因脊髓受压或损害产生截瘫后的各种并发症。

脊髓内结核瘤是罕见的实体性占位病变, 当发现髓内占位病变时, 应考虑髓内结核瘤可能性, 特别是患者有肺结核病史时。

参考文献

1. Torii H, Takahashi T, Shimizu H, et al. Intramedullary spinal tuberculoma case report[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2004, 44(5): 266-268.
2. Suzer T, Coskun E, Tahta K, et al. Intramedullary spinal tuberculoma presenting as a conus tumor: a case report and review of the literature[J]. Eur Spine J, 1998, 7(2): 168-171.
3. Kayaoglu CR, Tuzun Y, Boga Z, et al. Intramedullary spinal tuberculoma: a case report[J]. Spine, 2000, 25(17): 2265-2268.

(收稿日期: 2004-10-14 修回日期: 2004-12-20)

(本文编辑 卢庆霞)