

甘油常温保存肌腱的两种方法比较*★

韩冰, 宋一平, 王和洪, 陈烁, 童讯, 赵日光, 孙隼炎, 冯晖

Comparison of two methods of tendon preservation at normal temperature in glycerine

Han Bing, Song Yi-ping, Wang He-hong, Chen Shuo, Tong Xun, Zhao Ri-guang, Sun Yi-yan, Feng Hui

Abstract

BACKGROUND: The greatest degree to obtain the biological activity of tendon is the conditions for allograft tendon transplantation.

OBJECTIVE: To select the best tendon preservation method at room temperature.

METHODS: The rabbit tendons were randomly divided into four groups using the aseptic technique: Control group of fresh tendon, normal saline group, anhydrous glycerol group I (tendons were preserved in anhydrous glycerol after gradient dehydration), anhydrous glycerol group II (tendons were preserved in anhydrous glycerol directly). Tendons in each group were performed with examination at 2, 4 and 7 months.

RESULTS AND CONCLUSION: Hematoxylin-eosin staining showed that the cell integrity of anhydrous glycerol group I was higher than that of anhydrous glycerol group II. Electron microscope observation showed that the morphology of most tendon cells in anhydrous glycerol group I was normal, the structure of tendon tissue was integrated; After the tendons were preserved in anhydrous glycerol group II for 4 and 7 months, the nucleus were coagulation, condensation and collapse-like. The activity of superoxide dismutase in anhydrous glycerol group I was obviously higher than that in the anhydrous glycerol group II. It indicates that the tendon performed with gradient dehydration can be preserved in anhydrous glycerol effectively.

Han B, Song YP, Wang HH, Chen S, Tong X, Zhao RG, Sun YY, Feng H. Comparison of two methods of tendon preservation at normal temperature in glycerine. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 863-866. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Wound Healing Centers of Nanjing Military Region, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Han Bing★, Master, Physician, Wound Healing Centers of Nanjing Military Region, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China hanbingxsx@163.com

Correspondence to: Song Yi-ping, Chief physician, Wound Healing Centers of Nanjing Military Region, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China songyipingsx@163.com

Supported by: "Eleventh Five-Year" Plan Project of Medical Science and Technology Research of Nanjing Military Region, No.06z17*

Received: 2011-07-30 Accepted: 2011-10-20

摘要

背景: 最大程度保留肌腱的生物活性是进行同种异体肌腱移植的条件。

目的: 通过比较选择出最佳的肌腱常温保存方法。

方法: 使用无菌操作的方法将兔肌腱随机分为4组: 新鲜肌腱对照组、生理盐水组、无水甘油I组(肌腱梯度脱水后在无水甘油中保存)、无水甘油II组(肌腱直接在无水甘油中保存), 分别于保存的第2, 4, 7个月进行检测。

结果与结论: 苏木精-伊红染色显示: 无水甘油I组肌腱细胞完整率明显高于无水甘油II组。电镜观察发现, 无水甘油I组大部分肌腱细胞形态正常, 肌腱组织结构完整; 无水甘油II组保存4, 7个月后细胞核凝固、固缩、崩解状。无水甘油I组的超氧化物歧化酶活性也明显高于无水甘油II组。说明肌腱经梯度脱水后在无水甘油中常温保存效果更佳。

关键词: 肌腱; 活性; 甘油; 常温保存; 脱水; 比较

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.025

韩冰, 宋一平, 王和洪, 陈烁, 童讯, 赵日光, 孙隼炎, 冯晖. 甘油常温保存肌腱的两种方法比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 863-866. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

与自体肌腱相比, 同种异体肌腱的来源丰富, 取材方便, 在临床上具有广泛的应用前景。因此异体肌腱的移植和保存逐渐成为人们关注的焦点。理想的处理方法应该是尽可能保持肌腱细胞的活性, 移植后肌腱细胞可以通过自我增殖分裂且分泌基质及胶原, 从而使肌腱正常愈合可以防止粘连的发生。深低温保存的肌腱能保留大部分肌腱细胞的活性, 移植后的肌腱再生、质地和力学性能良好^[1-3], 但费用高、操作复杂、肌腱的携带运输不方便, 不利于战时急用。实验分别将同种异体肌腱直接浸泡在无水甘油中保存或将其梯度脱水后保存在无水甘油中, 选择较优的一种保存方法。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

时间和地点: 于2008-01/2010-02在解放军第97医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级日本大耳白兔20只, 体质量(2.0±0.5) kg, 雌雄不拘, 由徐州医学院实验动物中心提供。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
无水甘油	湖南尔康制药有限公司
超氧化物歧化酶测试盒	南京建成生物工程研究所
H-600 透射式电子显微镜	日立公司

解放军第 97 医院
南京军区创伤修
复中心, 江苏省徐
州市 221004

韩冰★, 男, 1973
年生, 江苏省徐州
市人, 汉族, 2006
年徐州医学院毕
业, 硕士, 医师,
主要从事干细胞
培养与移植、组织
工程方面的研究。
hanbingjxsz@
163.com

通讯作者: 宋一
平, 主任医师, 解
放军第 97 医院南
京军区创伤修复
中心, 江苏省徐
州市 221004
songyipingsxz@
163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2012)05-00863-04

收稿日期: 2011-07-30
修回日期: 2011-10-20
(20110517003/WLM
· C)

方法:

肌腱的取材和保存: 无菌取出兔的四肢屈肌腱并随机分为4组: 新鲜肌腱对照组、生理盐水组、无水甘油 I 组、无水甘油 II 组, 每组18条。无水甘油 I 组将肌腱梯度脱水后保存在无水甘油中, 24 h后更换无水甘油, 常温避光密封保存。

无水甘油 II 组将肌腱直接浸入无水甘油中, 24 h后更换无水甘油, 常温避光密封保存。生理盐水组将肌腱放入生理盐水中, 常温避光密封保存。新鲜肌腱组不处理直接进行实验。

苏木精-伊红染色: 取出保存2, 4, 7个月时的无水甘油 I 组、无水甘油 II 组内的肌腱, 将其去甘油化。取保存2个月的生理盐水组肌腱(因2个月时生理盐水组肌腱无细胞结构, 纤维紊乱、减少, 即肌腱细胞结构和组织结构已遭受到毁灭性的破坏, 没有取4, 7个月生理盐水组)。将各组肌腱浸入体积分数4%的甲醛溶液中固定24 h, 石蜡包埋后切片, 片厚4 μm, 进行常规苏木精-伊红染色, 光镜下观察各组肌腱的形态。实验重复6次。

电镜观察: 于相应时间点取各组肌腱, 去甘油化后, 将肌腱组织切成1 mm×1 mm×1 mm大小的组织块, 体积分数4%戊二醛固定4 h, 体积分数1%四氧化锇固定24 h, 不同浓度的乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 半薄切片定位, 做超薄切片, 用透射电镜观察并摄片。实验重复6次。

超氧化物歧化酶活性测定: 于相应时间点取各组肌腱300 mg, 各组使用碾磨玻璃器在碎冰上手工碾碎, 800 r/min离心10 min, 取上清液, 按说明书依次加入试剂盒中各种试剂, 用旋涡混匀器充分混匀, 置37 °C恒温水浴40 min, 加入显色剂, 混匀, 室温放置10 min, 于波长550 nm处, 1 cm光径比色杯, 蒸馏水调零, 比色。读取各组的吸光度值。实验重复6次。

主要观察指标: 各组肌腱的组织学及超微结构改变, 肌腱组织超氧化物歧化酶活性。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 存活率数据先用 $\arcsin \sqrt{P}$ 转换后进行方差齐性检验, 然后行单因素方差分析。P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入20只白兔, 用于制备肌腱, 均进入结果分析。

2.2 各组肌腱的组织学改变 苏木精-伊红染色显示, 保存2, 4, 7个月, 无水甘油 I 组细胞呈梭状, 大部分细胞胞膜完整, 胞核规则, 细胞完整率分别为: (77.14±4.21)%, (74.36±3.24)%, (73.53±4.89)%; 无水甘油 II 组细胞呈梭状, 肌腱组织结构完整, 在2个月内, 大部分细胞胞膜完整, 胞核规则; 保存2, 4, 7个月, 细胞完整率分别为: (74.31±3.64)%, (19.81±4.80)%, (17.90±2.91)%。新鲜肌腱对照组细胞呈梭状, 大部分细胞胞膜完整, 细胞核规则, 完整率为(94.00±3.24)%。生理盐水组在保存2个月时, 肌腱组织结构紊乱, 无细胞结构存在。见图1。

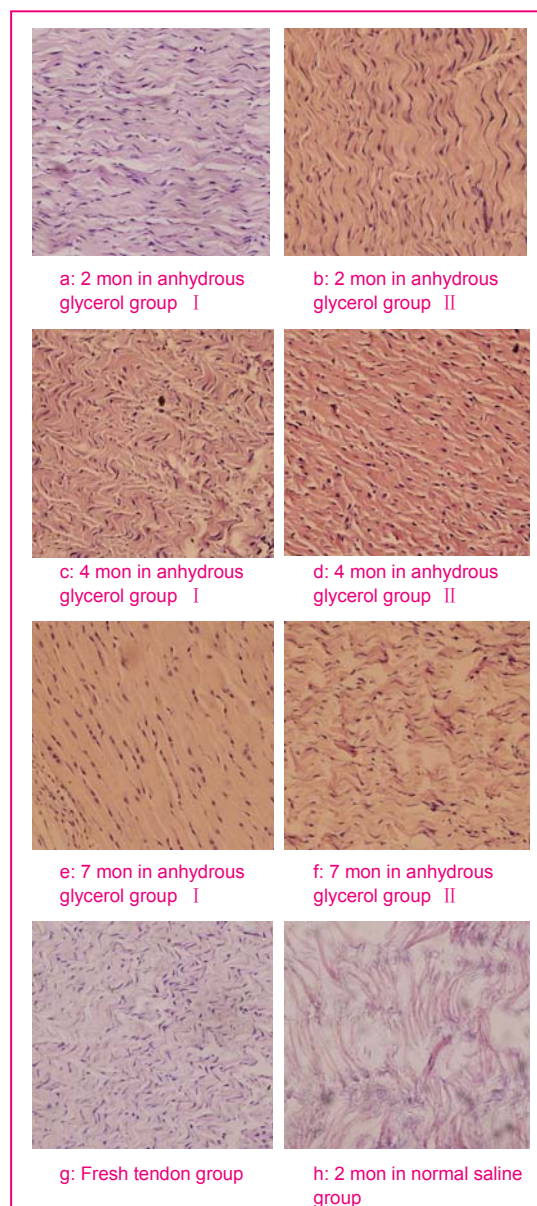


Figure 1 Structure and cell morphology of tendon in each group (Hematoxylin-eosin staining, ×40)
图1 各组肌腱的结构和细胞形态(苏木精-伊红染色, ×40)

2.3 保存不同时间后各组肌腱的超微结果改变 电镜观察发现, 无水甘油 I 组保存7个月内大部分细胞胞膜完整, 核形态正常。无水甘油 II 组2个月内大部分细胞胞膜完整, 核形态正常; 保存4, 7个月时肌腱细胞胞核凝固、固缩、崩解。新鲜肌腱对照组细胞呈2种状态, 即静止态和活跃态, 胞膜完整, 核形态正常。生理盐水组保存2个月时无细胞成分, 纤维混乱。见图2。

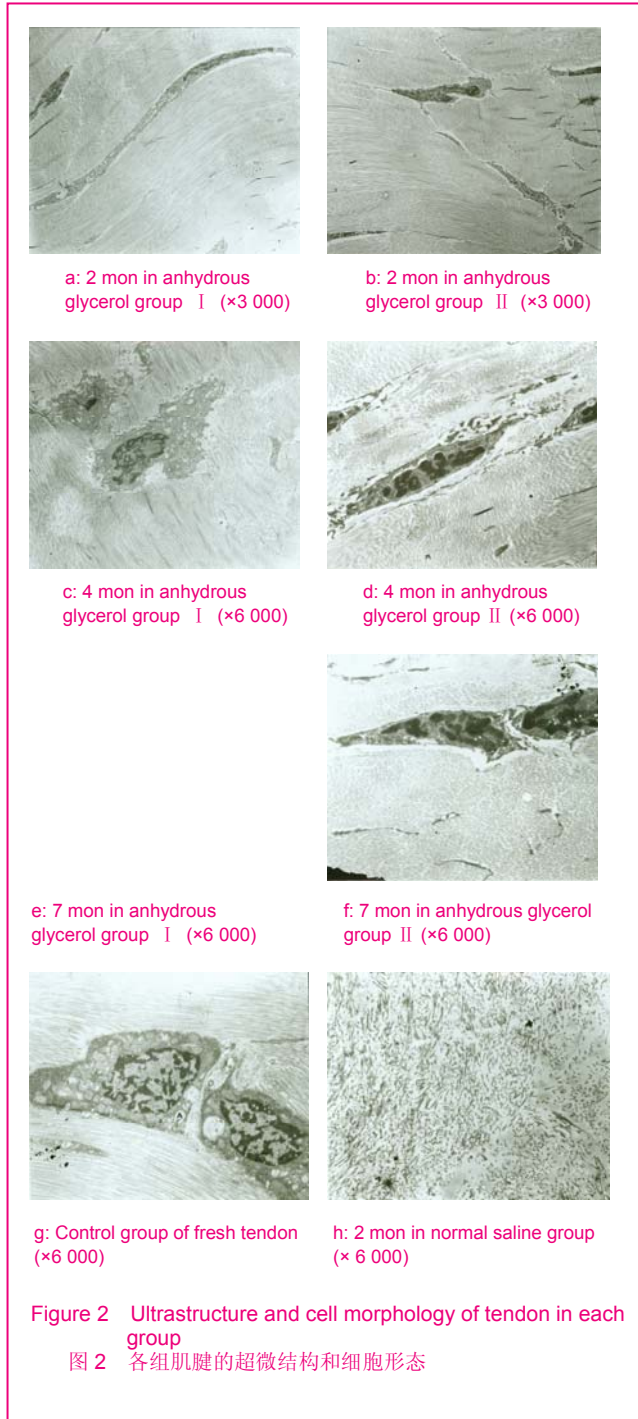
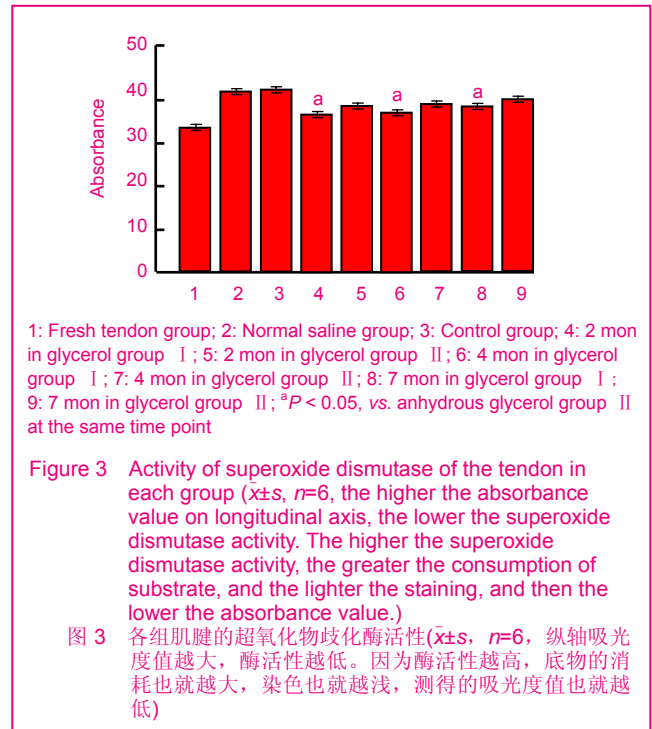


Figure 2 Ultrastructure and cell morphology of tendon in each group
图2 各组肌腱的超微结构和细胞形态

2.4 保存不同时间后各组肌腱的超氧化物歧化酶活性 结果显示, 保存2, 4, 7个月后, 无水甘油 I 组和 II 组均可检测出超氧化物歧化酶活性, 无水甘油 I 组酶活性优于无水甘油 II 组酶活性 ($P < 0.05$), 见图3。



3 讨论

同种异体肌腱的来源较自体肌腱广泛, 为肌腱移植在临床上的应用提供了较充足的来源。移植的肌腱通过两种机制进行愈合, 即内源性愈合和外源性愈合。所谓内源性愈合, 是指移植后, 移植的肌腱保留了部分肌腱细胞活性, 从而加快肌腱愈合的过程。外源性愈合即移植后, 移植的肌腱细胞无细胞活性, 依靠宿主细胞从肌腱缝合处侵入、增殖、分泌胶原纤维。内源性愈合具有肌腱愈合快, 粘连轻等优点。如何进行同种异体肌腱保存, 使保存的肌腱具有一定的活性, 这是临床工作中需要解决的一个难题^[4-5]。

目前较常用的是深低温保存和冻干技术, 深低温保存法即在低温保护剂的保护下, 按照一定的程序将样品放入 -196°C 液氮中或超低温冰箱中保存, 通过深低温抑制细胞的能量代谢, 使之处于休眠状态, 从而达到保存细胞活性的目的, 使用时再进行复苏。这种方法能较长时间保存细胞活性, 但所需设备昂贵且笨重, 细胞复苏过程存在风险, 不便于战时急用及基层医院使用^[6-9]。能于之相比美的储藏细胞的方法便是冻干技术, 冻干技术是指将组织或细胞冷冻后放入真空条件下适当加热, 把水分升华出去, 使组织或细胞干燥, 这种方法处理后的组织或细胞体积几乎不变, 可以在常温下长时间的保存, 使用时进行复水, 大部分的组织或细胞仍具有活性^[10-14]。但这种方法程序复杂, 仪器昂贵, 限制了该技术在储藏肌腱上的使用。

有没有一种方便、经济、能长时间在常温下保存肌

腱细胞活性的方法呢? 课题组考虑使用甘油。甘油收载于2005版药典, 为无色、澄清的黏稠液体, 味甜, 能与水或乙醇任意混溶, 在丙酮中微溶, 在三氯甲烷或乙醚中均不溶。甘油与水、乙醇、丙二醇的混合物化学性质稳定。甘油对细胞无毒害作用, 可以通过细胞膜, 不能作为细胞的能量来源, 可以通过排除细胞内水分, 达到液体干燥细胞的效果。

张军等^[15]将羊膜组织直接浸入无水甘油中, 发现羊膜在-4℃纯甘油保存60 d内组织结构、上皮细胞活性稳定。鲁静等^[16]将羊膜放入无水甘油中过夜后更换新的无水甘油在4℃保存, 保存1个月时, 上皮微绒毛存在, 胞膜完整, 核异染色质增多, 边集, 胞质内有较大空泡, 线粒体肿胀, 上皮细胞间隙扩大, 细胞间连接减少, 基底膜疏松; 保存3个月时, 上皮细胞胞核、胞质溶解。范军华等^[17]将角膜直接置于4℃无水甘油中, 然后在-25℃保存2个月, 行同种异体急诊穿透性角膜移植, 证实甘油冷冻保存法可以长期保存角膜内皮细胞活性。邱孝芝等^[18]将眼球保存于纯甘油中, 然后在-20~-30℃保存, 经统计, 内皮存活率在90%, 细胞呈镶嵌六角形, 细胞器较完整。那么能否将样品放在保存液中进行常温保存, 使大部分细胞形态完好且具有生物活性。上述研究者将样品直接甘油化, 导致样品在4℃以上的温度下难以长期保存, 这可能与细胞快速经历膜内外渗透压变化有关, 能否将肌腱梯度脱水再保存在无水甘油中, 并在常温下长期保存, 目前尚未见报道。因超氧化物歧化酶广泛存在于生物体内, 半衰期短, 并且在常温下不稳定, 故选用该酶作为酶学检测指标^[19-21]。实验使用无水甘油常温保存肌腱, 直接将肌腱甘油化后保存, 肌腱细胞在2个月内形态、活性大部分得以保存, 说明传统的甘油保存法在常温下可以短期的保存肌腱细胞。将新鲜肌腱梯度脱水, 最终常温保存在无水甘油中, 实验结果表明, 至少在7个月内肌腱细胞形态、生物活性大部分得以保存。表明这种方法是一种经济、方便、便于保存、携带和运输活体肌腱的方法。

总之, 实验发现未经梯度脱水的肌腱在无水甘油中常温保存, 2个月内肌腱的组织结构、大部分细胞形态、活性得以保存。经梯度脱水的肌腱在无水甘油中常温保存, 7个月内肌腱的组织结构、大部分细胞形态、肌腱活性得以保存。常温保存肌腱, 经梯度脱水后无水甘油中常温保存方法优于直接无水甘油中常温保存方法。

4 参考文献

[1] Sun YK, Zhang YL. Zhonghua Shouwaike Zazhi. 2006;22(3):133-136.
孙燕琨, 张友乐. 深低温冷冻肌腱活性的研究[J]. 中华手外科杂志, 2006, 22(3):133-136.

[2] Deng W, Zhao H, Dong H. Clinical application of allogeneic tendon. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi. 2005;19(8):666-668.

[3] Chick LR, Walton RL. A history of tendon operations. Surg Gynecol Obstet. 1989;168(2):183-188.

[4] Hu HB, Yu BQ, Liu H. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(53):10522-10526.
胡海波, 禹宝庆, 刘辉. 同种异体肌腱移植的前景及问题[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(53): 10522-10526.

[5] Tang JB, Shi D, Shijing YL. Zhonghua Shouwaike Zazhi. 1992; 8(1):31-35.
汤锦波, 侍德, 石井一郎. 各种伤情况下屈肌腱的愈合及粘连形成: 肌腱愈合新理论系统的探讨[J]. 中华手外科杂志, 1992, 8(1):31-35.

[6] Teng XR, Zhao YS, Hu GL, et al. Shandong Daxue Xuebao: Yixue Ban. 2008;46(10):945-950.
滕学仁, 赵永生, 胡光亮, 等. 两种方法保存同种异体肌腱移植重建膝关节炎交叉韧带的光镜电镜观察[J]. 山东大学学报: 医学版, 2008, 46(10): 945-950.

[7] Tang LJ, Fang GR, Cheng GL, et al. Zhonghua Shouwaike Zazhi. 2001;17(Z1):1-3.
唐林俊, 方光荣, 程国良, 等. 超深低温处理的异体肌腱移植[J]. 中华手外科杂志, 2001, 17(Z1):1-3.

[8] Henson J, Nyland J, Chang HC, et al. Effect of cryoprotectant incubation time on handling properties of allogeneic tendons prepared for knee ligament reconstruction. J Biomater Appl. 2009; 24(4):343-352.

[9] Park HJ, Urabe K, Naruse K, et al. The effect of cryopreservation or heating on the mechanical properties and histomorphology of rat bone-patellar tendon-bone. Cell Tissue Bank. 2009;10(1): 11-18.

[10] Chen LF, Liu JH. Zhongguo Shuxue Zazhi. 2006;19(6):500-502.
陈麟凤, 刘景汉. 常用细胞冻干保护剂的特性、作用机制及应用进展[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(6):500-502.

[11] Huang YX, Hou MZ, Jia WX, et al. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2003;11(8):527-529.
黄一雄, 侯明钟, 贾万新, 等. 应用冻干异体手指骨关节肌腱鞘复合组织再造拇指[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(8):527-529.

[12] Bechtold JE, Eastlund DT, Butts MK, et al. The effects of freeze-drying and ethylene oxide sterilization on the mechanical properties of human patellar tendon. Am J Sports Med. 1994; 22(4): 562-566.

[13] Tang LJ, Chen GL, Fang GR, et al. Zhonghua Shouwaike Zazhi. 1997;13(2):106-109.
唐林俊, 程国良, 方光荣, 等. 化学处理的冻干异体肌腱移植的实验研究[J]. 中华手外科杂志, 1997, 13(2):106-109.

[14] Leng YX, Lin YQ, Ruan M, et al. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2009;19(22):1704-1706.
冷元曦, 林月秋, 阮默, 等. 肌腱移植材料的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 19(22):1704-1706.

[15] Zhang J, Cui W, Gao W, et al. Guoji Yanke Zazhi. 2007;7(1):83-85.
张军, 崔巍, 高伟, 等. 纯甘油-4℃保存方法对羊膜活性影响的研究[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(1):83-85.

[16] Lu J, Zhao M. Yanke Xinzhan. 2007;27(7):509-513.
鲁静, 赵敏. 四种方法保存羊膜的组织形态学研究[J]. 眼科新进展, 2007, 27(7):509-513.

[17] Fan JH, Jiang H. Waishang Zhiye Yanbing Zazhi. 2007;29(3): 161-164.
范军华, 蒋华. 甘油长期冷冻保存兔角膜用于穿透性角膜移植效果观察[J]. 外伤职业眼病杂志, 2007, 29(3):161-164.

[18] Qiu XZ, Jin YY. Shiyong Yanke Zazhi. 1994;12(7):394-397.
邱孝芝, 金袖云. 甘油冷冻保存眼球的实验研究与临床应用[J]. 实用眼科杂志, 1994, 12(7):394-397.

[19] Pan JR, Zheng GJ, Huang WB, et al. Fuzhou Daxue Xuebao: Ziran Kexue Ban. 2009;37(5):756-759.
潘剑茹, 郑光进, 黄文斌, 等. 不同来源SOD蛋白的稳定性比较[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2009, 37(5):756-759.

[20] Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim Biophys Acta. 2010; 1804(2):245-262.

[21] Yang L, Liao MF, Ji XR, et al. Xiandai Shengwu Yixue Jinzhan. 2010;10(2):396-398.
杨琳, 廖明芳, 季欣然, 等. 超氧化物歧化酶在医学领域的研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2):396-398.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 南京军区医学科学技术研究“十一五”计划课题(06z17), 课题名称: 同种异体肌腱、血管、神经的保存及保存液的研究及临床应用。

作者贡献: 第一作者及通讯作者进行实验设计, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为第三至八作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者及通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。