论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0418-04

兔异体骨-前交叉韧带-骨移植重建前交叉韧带术后早期组织学与生物力学观察

郭珊成,张 峡,郝 勇 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

【摘要】 **目的** 对兔同种异体骨-前交叉韧带-骨(bone-anterior cruciate ligament-bone,B-ACL-B)移植重建ACL术后早期(12周)移植物进行组织学观察及生物力学测试。**方法** 24只骨骼成熟新西兰大白兔,用新鲜冰冻异体B-ACL-B移植重建兔前交叉韧带,术中及术后均不使用免疫抑制剂。分别于术后3、6、12周对重建后的移植物进行大体观察、组织学观察及生物力学测试,对照组为自体正常侧ACL。**结果** 重建术后早期移植物在关节内经历了植入物坏死、细胞长入、胶原纤维再生过程。术后移植物内大量成纤维细胞增殖,6周时最明显。术后原胶原纤维变性坏死,皱褶明显,小胶原纤维再生,12周时新生小胶原纤维排列较规律、致密。术后3、6、12周移植物最大抗拉载荷分别为(5.6±0.9)、(14.9±2.3)、(42.6±3.7)N,分别是正常ACL[(102.6±7.8)N]的5.5%、14.5%、41.5%,4组最大抗拉载荷的总体变异差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 应用相同解剖学及组织学类型的兔异体B-ACL-B重建ACL,术后早期移植物组织学及生物力学表现良好。

【关键词】 兔;前交叉韧带;重建;同种异体;组织学;生物力学
【中图法分类号】 R-332;R686.5;R687.3 【文献标志码】 A

Reconstruction of anterior cruciate ligament with bone-anterior cruciate ligament-bone allograft in rabbits: a prophase study with histology and biomechanics

Guo Shancheng, Zhang Xia, Hao Yong (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the prophase histology and biomechanics in the reconstructed anterior cruciate ligament (ACL) with bone-anterior cruciate ligament-bone (B-ACL-B) allograft in rabbits. **Methods** Based on the study of anatomy, histology and biomechanics of normal rabbit ruciate ligaments, ACLs were reconstructed with B-ACL-B complex allografts in rabbits. Twenty-four skeletally matured New Zealand white rabbits underwent ACL reconstruction with aseptically harvested fresh-frozen B-ACL-B allograft on one knee randomly. No any immunosuppressive agent was used intra-operative and post-operatively. Gross observation, histological examination and biomechanics test were performed in these groups at 3, 6 and 12 weeks after operation. The opposite side of normal ACL served as control. **Results** In the early period, the allograft tissue underwent a gradually healing process including the graft necrosis, cellular migration and collagen formation. After operation, a lot of fibroblasts were found in each period, especially at 6 weeks. The virgin collagen fibers crimped and degenerated, and the new collagen fibers were formed. At 12 weeks, the new collagen fibers organized regularly and tightly. The maximum loads of the allograft was 5.5% (5.6±0.9 N) after 3 weeks, and 14.5% (14.9±2.3 N) after 6 weeks, and 41.5% (42.6±3.7 N) after 12 weeks. The maximum loads of the control group was 102.6±7.8. There was significant difference among 4 groups in maximum loads ($P<0.05$). **Conclusion** The ACL reconstructed with graft of same anatomic and histological tissue can achieve a good result in prophase histological and biomechanics.

【**Key words**】 rabbits; anterior cruciate ligament; reconstruction; allograft; histology; biomechanics

Corresponding author: Zhang Xia, Email: zhangsw199254330@163.com

前交叉韧带(anterior cruciate ligament,ACL)是膝关节重要的静力稳定结构,同时也是具有独特解剖功能的动力性稳定结构。运动及日常生活中多种因素可导致其损伤,产生明显的膝关节前向不稳、半月板撕裂、关节软骨退行性变等,导致膝关节疼痛和功能障

【通信作者】 张 峡,E-mail:zhangsw199254330@163.com

碍。由于膝关节内特殊的生物学环境和ACL的血供限制,ACL自身愈合能力差。对于前交叉韧带损伤的治疗,无论是回顾性研究还是前瞻性研究均表明保守治疗50%~60%是失败的,直接缝合修补对大部分前交叉韧带损伤患者是不合适的,而手术重建80%~90%可获得良好的临床效果[1]。本实验应用深低温冰冻兔同种异体骨-前交叉韧带-骨(bone-anterior cruciate ligament-bone,B-ACL-B)重建ACL,术后对移植物进行大体观察、组织学观察及生物力学测试,旨在了解相同解剖学及组织类型移植物重建ACL后移植物的组织学转归、生物力学性能,为临床移植B-ACL-B解剖重建ACL提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24只成年新西兰大白兔(购于第三军医大学新桥医院实验动物中心),均为雄性,体质量2.1~2.5 kg。手术前实验动物运动良好,可奔跑,未见关节肿胀、跛行及其他异常。膝关节前抽屉试验均为阴性。

1.2 移植物的取材与制备

异体移植物不在本组研究的实验动物中取材。另取12只新西兰大白兔,体质量2.1~2.5 kg。无菌条件下取兔股骨-ACL-胫骨复合体,保留ACL的解剖结构,用尖嘴咬骨钳及骨挫修整两端骨块,修整后移植物胫骨端骨块大小为4 mm×4 mm×4 mm,股骨端骨块大小为3.5 mm×4 mm×3 mm(图1)。装入双层无菌塑料袋,-80%深低温冰箱保存2周,备用。记录每只兔的体质量。

1.3 手术步骤及术后处理

按照取材动物与实验动物体质量基本一致的原则。术前2 h,取与手术动物体质量相似的异体移植物B-ACL-B(其供体与手术动物体质量相似),置于等渗盐水内自然复温。分别在移植物两端的骨块平行钻孔,用直径0.1 mm细钢丝U型穿过骨块。随机取一侧后肢膝前内侧切口,沿髌韧带内侧打开关节腔(关节腔内未见明显积液、滑膜炎表现),髌骨向外侧脱位,显露关节腔内结构,切除滑膜、髌下脂肪垫、内侧半月板前角及半月板横韧带,显露ACL及起止点,切除ACL。术中做前抽屉试验发现胫骨前向明显失稳。沿ACL走行,用电钻在原ACL胫骨及股骨残迹处成型骨隧道,修整骨隧道形状,使之与移植物两端骨块相匹配。用直径1.0 mm克氏针自股骨ACL附着点向股骨外髁平行钻两小孔,调整移植物位置,分别自内下向外上方穿出ACL股骨端钢丝,使ACL股骨端骨块原位复位后拧紧钢丝。同样方法使ACL胫骨端骨块原位固定(图2)。庆大霉素盐水冲洗关节,关闭切口。术后石膏固定3周,每天肌注青霉素2次(40万U/次),连续1周。笼内饲养,自由活动。

1.4 实验观察

分别于术后3、6、12周处死兔各8只,取材时对新鲜组织标本行大体观察,其中3只用于组织学观察,5只用于生物力学测试。12周时取对侧ACL行对比研究。

1.4.1 大体观察 观察移植后不同时期ACL的形态,滑膜情况,ACL与胫骨、股骨的愈合及关节软骨破坏情况。

1.4.2 组织学观察 切取ACL组织,沿ACL走行在中央及外周各切取组织2块,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,制成6 μm厚切片,行HE及Masson染色,在光学显微镜下观察ACL的细胞形态结构及胶原排列分布。

1.4.3 生物力学测试 保留ACL,两端各保留长约5 cm的胫骨和股骨,清除其他韧带及关节囊组织,制作试件。试件两端分别用夹具固定,测量韧带的前后径和左右径,拉伸速度为3 mm/min,试验过程中用生理盐水保持标本湿润,测试环境温度为26℃,相对湿度为65%,记录最大抗拉载荷,即载荷-位移曲线的最高点。并记录股骨-移植物—胫骨复合体断裂部位。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件包进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间总体变异采用单因素方差分析,如果差异有显著性,则用SNK检验对各组的样本均数进行两两比较并分析其差异。

2 结果

2.1 大体观察

术后3、6、12周时ACL均有滑膜包裹,均较正常对侧ACL增粗,6周时最明显。3周时移植物原韧带结构依稀可见,6周时原韧带样结构消失(图3A),12周时增生滑膜后侧可见新生韧带样结构出现(图3B)。12周时移植物两端骨块与股骨胫骨已牢固愈合。各个时期未见明显关节软骨破坏区。

2.2 组织学观察

2.2.1 HE染色 ①术后3周,移植物外有薄层的滑膜组织包绕,少量成纤维细胞增生,移植韧带中央区纤维细胞较少,未见明显胶原纤维崩解断裂。②术后6周,移植物外有厚层的滑膜组织包绕;周围区和中心区都有大量成纤维细胞样细胞增殖,较正常ACL明显增多,排列不规律,细胞核主要为圆形和椭圆形;胶原纤维排列紊乱,正常胶原纤维束消失(图4A)。③术后12周,成纤维细胞样细胞较6周时明显减少,周围区域细胞数较中心区多,均多于正常ACL,细胞分布较均匀,排列较6周时明显规律,细胞核主要为杆状、纺锤体状,圆形和椭圆形细胞核明显减少;胶原纤维排列明显规律,出现胶原纤维束(图4B)。

2.2.2 Masson染色 ①术后3周,胶原纤维变性不明显。②术后6周,胶原纤维变性明显,变性胶原纤维有较多皱褶,结构松散,排列紊乱,新生胶原纤维形成不明显(图5A)。③术后12周,新生胶原纤维形成,新生的胶原纤维结构较致密,排列有序(图5B)。

2.3 生物力学测试

术后3、6、12周移植物最大抗拉载荷分别为(5.6±0.9)、(14.9±2.3)、(42.6±3.7) N,分别是正常ACL[(102.6±7.8)N]的5.5%、14.5%、41.5%。4组最大抗拉载荷的总体变异差异有统计学意义($P<0.05$),3周组与6周组、12周组与正常组比较差异均有显著性($P<0.05$)。说明随着移植时间的延长,移植物最大抗拉载荷逐渐增大,12周时移植物最大抗拉载荷较正常时弱。所有移植物断裂部位均位于体部。

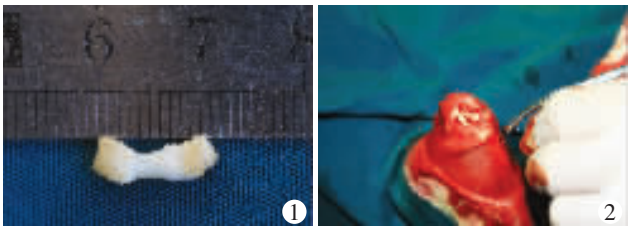
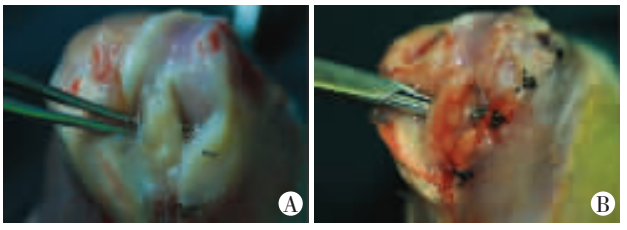


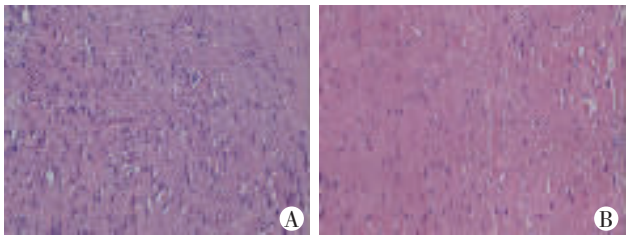
图1 深低温冰冻复温后兔B-ACL-B

图2 兔ACL重建完成后情况



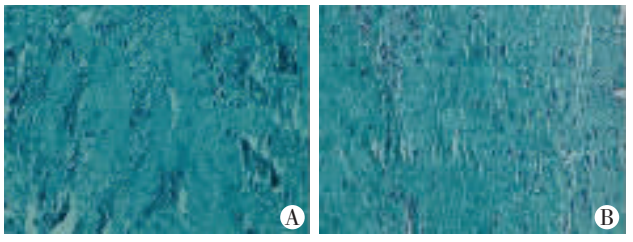
A:术后6周;B:术后12周

图3 术后不同时间组织标本大体观察



A:术后6周;B:术后12周

图4 术后不同时间ACL组织学观察 (HE×200)



A:术后6周;B:术后12周

图5 术后不同时间ACL Masson染色观察 (×200)

3 讨论

尽管自体腱性组织移植及人工替代材料重建前交叉韧带已广泛应用于临床,但由于自体移植存在供区并发症,人工材料没有很好地解决强度衰减及疲劳断裂的问题,其应用受到限制。同种异体移植重建ACL越来越受到人们的关注。B-ACL-B是目前最为常用的异体ACL重建材料,亦取得了满意的临床疗效[2-4]。但从ACL解剖学和组织学的角度来看,采用同种异体骨-ACL-骨重建损伤的ACL可能是更为合理的选择。重建ACL的目的是最大限度恢复其生理功能,而重建ACL的解剖结构对于恢复韧带的生理功能尤为重要。ACL和肌腱在解剖结构存在着差异,肌腱对牵拉仅在平行纤维的方向上提供较强的抵抗力,而ACL在平行负载的主要纤维方向之间存在很多交叉纤维,具有多轴向抵抗力。膝关节ACL是一种较为特殊的结缔组织,主要含Ⅰ型和Ⅲ型胶原,其中Ⅲ型胶原成分较其他韧带多[5]。蒋青等[6]研究证实正常髌腱组织内所含Ⅲ型胶原纤维含量小于5%,而正常ACL所含Ⅲ型胶原纤维含量为9%~12%。从ACL细胞的形态来看,它既不同于一般的致密结缔组织,也不同于典型的纤维软骨组织。致密结缔组织的细胞在纵切面上呈梭形,纤维软骨组织的细胞为短杆状或椭圆并有陷窝,ACL细胞为短杆状的无陷窝的细胞,从细胞成串排列和甲苯胺蓝异染阳性的结果来看,ACL细胞具有一定的纤维软骨细胞的特征[7]。目前常用的同种异体移植材料(包括骨-髌腱-骨、股四头肌腱-骨、腘绳肌、跟腱-骨等)均为肌腱组织,不具备ACL这种解剖学及组织学特性,无法解剖重建ACL,理论上只有应用B-ACL-B才能解剖重建ACL,最大限度恢复其生理功能。

众多动物实验研究[8-10]证实异体移植与自体移植重建ACL的愈合过程是相似的,经历植入物的坏死、细胞长入、再血管化和胶原重塑,最终被小胶原纤维与受体成纤维细胞形成新韧带样结构所取代。移植重建ACL后,移植物发生缺血坏死,仅保留胶原纤维支架以便血管及宿主细胞长入,并最终形成韧带样结构。本实验所观察到的移植物早期转归与文献报道是一致的。术后6周时大体观察见移植物增粗最明显,组织学观察提示成纤维细胞增殖最明显,原胶原纤维变性坏死,皱褶明显,新生胶原纤维形成不明显,移植物处于细胞增殖期,细胞功能未完善;术后12周,大体观察可见韧带样结构出现,组织学观察见成纤维细胞数目较6周时明显减少,出现新生胶原纤维,新生胶原纤维及细胞排列明显规律,移植物处于胶原纤维增殖期,细胞功能明显改善,细胞核由圆形、椭圆形向杆状和椭圆形过渡,说明细胞逐渐向成熟期过渡。但以往的动物实验均报道术后6周时移植物中仍存在较明显的坏死区,新生细胞分布不均匀[11-13]。本实验中6周时移植物内细胞增殖水平最高,高于以往研究报道的其他类型移植物在6周时的细胞增殖水平。这与刘平等[14]采用异体B-ACL-B移植重建后交叉韧带的组织学观察结果相似。最有可能的原因是采用的移植物与ACL完全相同的解剖结构及组织学类型,移植物发生坏死后残留的胶原纤维支架结构更适合成纤维细胞的长入和增殖,导致移植物中央区与周围区的细胞分布在术后6周时已无明显区别。

国外少量文献对采用B-ACL-B移植重建ACL术后移植物的生物力学进行了报道。Goertzen等[15]应用

深低温冰冻同种异体 B-ACL-B 对猎狐犬进行 ACL 重建，术后辅以韧带加强装置（LAD），12 周最大抗拉载荷为正常 ACL 的 34.3%（387.2 N）。Ho 等[16]对 15 只犬行同种异体骨-髌腱-骨和 B-ACL-B 移植重建前交叉韧带，观察术后移植物生物力学性能，结果骨-前交叉韧带-骨移植组术后 12 周最大抗拉伸载荷为正常 ACL 的 31.4%（458.7 N），骨-髌腱-骨移植组为 8.0%（117.1 N），正常对照组为 1461.7 N，实验结果提示骨-前交叉韧带-骨移植在生物力学性能上优于骨-髌腱-骨。本研究中术后 12 周移植物的最大抗拉载荷为正常 ACL 的 41.5%［(42.6 ± 3.7) N］，高于 Goertzen 及 Ho 等的报道，分析原因可能为：①实验动物的不同；②固定方式不同导致移植物不同的生物力学性能[17-18]，上述文献中采用的是挤压螺钉固定移植物两端骨块，挤压螺钉在骨隧道内占有一定空间，导致骨-骨接触界面减少，不利于骨愈合。本实验通过钢丝固定，骨-骨界面充分接触，有利于骨-骨界面愈合。Meller 等[19]对骨骼不成熟的羊应用软组织进行 ACL 重建，术后 3、6、12 周最大抗拉载荷分别为 5%、15.2%、41.2%，本次实验结果与其是相似的，这亦说明应用异体 B-ACL-B 移植重建 ACL 的生物力学优越性。

本研究通过对兔同种异体 B-ACL-B 移植重建 ACL 术后早期移植物的组织学观察，异体 B-ACL-B 移植物在移植重建 ACL 后早期经历的成熟过程与其他移植物类似。它所具有的与原 ACL 完全相同的解剖学及组织学特性在成熟过程中起到了重要作用，成纤维细胞更容易长入、增殖，细胞与新生的胶原纤维构架关系更符合生理，加速了移植物的成熟过程，术后早期生物力学性能表现良好。这些都为临床应用 B-ACL-B 移植重建 ACL 提供了一定的实验依据。但由于实验观察时间较短，移植物最终的转归及生物力学性能有待进一步研究。

参考文献：

[1] Fu F H, Bennett C H, Ma C B, *et al*. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part II. Operative procedures and clinical correlations[J]. Am J Sports Med, 2000, 28(1): 124-130.

[2] Han H S, Seong S C, Lee S, *et al*. Anterior cruciate ligament reconstruction: Quadriceps versus patellar autograft[J]. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(1): 198-204.

[3] 郑小飞、黄华扬，张余，等. 关节镜下自体、异体骨-髌腱-骨与半腱肌腱 3 种重建前交叉韧带方法的疗效比较[J]. 中国组织工程研究及临床康复，2009，13(20)：3903-3906.

[4] Laoruengthana A, Pattayakorn S, Chotanaputhi T, *et al*. Clinical comparison between six-strand hamstring tendon and patellar tendon autograft in arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized clinical trial[J]. J Med Assoc Thai, 2009, 92(4): 491-497.

[5] Amiel D, Frank C, harwood F, *et al*. Tendons and ligaments: A morphological and biomechanical comparison[J]. J Orthop Res, 1984, 1(3): 257-265.

[6] 蒋青，林共同，曲绵域，等. 前交叉韧带重建后Ⅲ型胶原的表达[J]. 中华骨科杂志，1999，19：431-433.

[7] 薛海滨，敖英芳，于长隆. 应用半腱肌腱重建前交叉韧带末端形成的特点[J]. 中国运动医学杂志，2003，21(2)：127-130.

[8] Nikolaou P K, Seaber A V, Glisson R R, *et al*. Anterior cruciate ligament allograft transplantation. Long-term function, histology, revascularization, and operative technique[J]. Am J Sports Med, 1986, 14(5): 348-360.

[9] Scheffler S U, Schmidt T, Gangey I, *et al*. Fresh-frozen free-tendon allografts versus autografts in anterior cruciate ligament reconstruction: delayed remodeling and inferior mechanical function during long-term healing in sheep[J]. Arthroscopy, 2008, 24(4): 448-458.

[10] Dustmann M, Schmidt T, Gangey I, *et al*. The extracellular remodeling of free-soft-tissue autografts and allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: a comparison study in a sheep model[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008, 16(4): 360-369.

[11] Drez D J Jr, DeLee J, Holden J P, *et al*. Anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patelar tendon-bone allografts. A biological and biomechanical evaluation in goats[J]. Am J Sports Med, 1991, 19(3): 256-263.

[12] Papachristou G, Nikolaou V, Efstathopoulos N, *et al*. ACL reconstruction with semitendinosus tendon autograft without detachment of its tibial insertion: a histologic study in a rabbit model[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2007, 15(10): 1175-1780.

[13] Stone K R, Walgenbach A W, Turek T J, *et al*. Anterior cruciate ligament reconstruction with a porcine xenograft: a serologic, histologic, and biomechanical study in primates[J]. Arthroscopy, 2007, 23(4): 411-419.

[14] 刘平，敖英芳，胡跃林，等. 兔异体前交叉韧带移植重建后交叉韧带的组织学研究[J]. 中国运动医学杂志，2006，25(1)：9-11.

[15] Goertzen M, Dellmann A, Gruber J, *et al*. Anterior cruciate ligament allograft transplantation for intraarticular ligamentous reconstruction[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 1992, 111(5): 273-279.

[16] Ho W P, Liau J J, Cheng C K. Biomechanical study of bone-patellar tendon-bone and bone-ACL-bone grafts[J]. Journal of Medical and Biological Engineering, 2002, 22(9): 103-107.

[17] Walsh M P, Wijdicks C A, Parker J B, *et al*. A comparison between a retrograde interference screw, suture button, and combined fixation on the tibial side in an all-inside anterior cruciate ligament reconstruction: a biomechanical study in a porcine model[J]. Am J Sports Med, 2009, 37(1): 160-167.

[18] Zhang A L, Lewicky Y M, Oka R, *et al*. Biomechanical analysis of femoral tunnel pull-out angles for anterior cruciate ligament reconstruction with bioabsorbable and metal interference screws[J]. Am J Sports Med, 2007, 35(4): 637-642.

[19] Meller R, Willbold E, Hesse E, *et al*. Histologic and biomechanical analysis of anterior cruciate ligament graft to bone healing in skeletally immature sheep[J]. Arthroscopy, 2008, 24(11): 1221-1231.

（收稿 2010-10-07 修回 2010-11-04）

（编辑 汪勤俭）