DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.018
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
234 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0234-04

无滑膜肌腱在体滑膜化实验研究

潘险峰,张正治,孙 玮,潘 峰,苟 俊,程昌志,白贵友 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨无滑膜肌腱在皮下滑囊腔内滑膜化的可行性。方法 将兔腓长肌腱段放入预制的自体皮下滑囊腔进行在体培养,通过大体、组织学、超微结构以及免疫组化等观察,对无滑膜肌腱滑膜化改造情况进行研究。结果 无滑膜肌腱在人造皮下滑囊腔存活游离状态,呈其表面形成光滑的膜样结构,超微结构显示滑膜化肌腱表面光滑,有微孔样结构,表层细胞具有滑膜A、B型细胞的超微结构特点,免疫组化显示表达VCAM-1和CD68阳性,UDPGD酶高活性。结论 无滑膜肌腱在人造皮下滑囊腔内可被滑膜化改造。

关键词:肌腱;滑膜;在体培养;新西兰白兔
中图法分类号:R-332;R332.74;R329.2 文献标识码:A

Experimental study of non-synovial tendon synovialized in artificial subcutaneous synovial bursa *in vivo*

PAN Xian-feng, ZHANG Zheng-zhi, SUN Wei, PAN Feng, GOU Jun, CHENG Chang-zhi, BAI Gui-you (Central Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the changes of non-synovial tendon in artificial subcutaneous synovial bursa. Methods Rabbit gastrocnemius muscle segment was put into the artificial autogenous subcutaneous synovial bursa prepared by burying a silica gel bag in rabbit subcutaneous synovial bursa for culture *in vivo*. The changes of tendon were observed and the properties of the surface membrane of synovialized tendon were studied macroscopically, histologically, and ultrastructurally. Results The non-synovial tendon survived in the artificial subcutaneous synovial bursa, and a smooth membrane appeared on the tendon surface. Scanning electron microscopy revealed a smooth surface and micropore structure on it, and transmission electron microscopy showed the ultrastructures of Type A and B cells. The surface cells of synovialized tendon expressed VCAM-1 and CD68, and high activity of uridine diphosphoglucose dehydrogenase (UDPGD). Conclusion Non-synovial tendon can be synovialized after being placed in artificial subcutaneous synovial bursa, and its surface cells have the phenotype character of the synoviocytes.

Key words: tendon; synovial membrane; culture *in vivo*; New Zealand rabbit

无滑膜肌腱作为移植材料的优点是:①它是自体生物材料,其形状、大小、抗张强度等指标均能满足替代移植的要求;②与受体组织具有良好的相容性,不会发生免疫排斥反应;③人体自身能够提供,截取后的供体(区)不会发生明显的功能障碍,所以长期以来被临床上广泛应用。但其最大的问题是粘连形成,导致术后手指功能恢复的障碍[1]。有滑膜肌腱虽然在抗粘连方面明显优于无滑膜肌腱,但其数量少、取材对局部破坏大。能否在移植前将无滑膜肌腱改造为有滑膜肌腱?

研究显示,在关节腔内,游离肌腱不但能成活,而且在肌腱表面形成一完整光滑的滑膜样结构,与周围无粘连发生,但打开关节腔风险较大。本实验尝试以人工预制的皮下滑膜囊替代关节腔,将自体无滑膜肌腱段游离植入,进行在体培养和滑膜化改造,为临床寻求抗粘连效果好的肌腱移植材料。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

新西兰大白兔24只,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供,体质量2.5~3.5 kg,分3、7、14、21 d 4个时相组,每组6只。

1.2 主要试剂

抗VCAM-1多克隆抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司),

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970378)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970378)
作者简介:潘险峰(1968-),男,云南省昆明市人,博士,主治医师,主要从事骨与关节损伤方面的研究。电话:(023)68752345
通信作者:张正治,电话:(023)68752346
收稿日期:2003-06-06;修回日期:2003-08-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抗 CD68 单克隆抗体(北京中山公司), HIGH-SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德公司), UDP 葡萄糖(美国 Sigma 公司)。

1.3　建立皮下滑膜囊

3%戊巴比妥钠按 1 ml/kg 静脉麻醉大白兔, 在肩胛间区作 3 cm 纵形切口, 皮下埋置硅胶扩张囊, 术后每天向囊内注入空气 2 ml, 使其缓慢充盈, 注满 20 ml 后停止, 辅以适当按摩, 每天 3 次, 每次 20 min。

1.4　无滑膜肌腱在体滑膜化

2 周后取出硅胶囊, 切取 2 cm 自体腓长肌腱, 手术显微镜下剥离附着的腱旁组织, 将肌腱段游离放进皮下囊腔内进行在体培养 2 周。

1.5　大体观察

观察无滑膜肌腱段在皮下滑囊腔内的变化情况。

1.6　组织学结构

培养肌腱经 10%福尔马林固定, 常规脱水、透明, 石蜡切片, HE 和 VG 染色, 光镜下观察肌腱表面和内部组织结构。

1.7　超微结构

培养肌腱经 3%戊二醛固定, 扫描电镜观察肌腱表面膜结构, 透射电镜观察表层细胞的类型, 与正常滑膜组织比较。

1.8　免疫组化检测

培养肌腱经 4%多聚甲醛固定, 冰冻切片, 分别进行 VCAM-1、CD68 的免疫组化和免疫荧光染色, 对滑膜化肌腱表层膜样结构中的细胞表型进行观察。

1.9　酶组织化学

尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶(UDPGD)活性检测: 按文献[1]方法, 取新鲜的滑膜化肌腱标本, 不固定, 冰冻切片低温干燥 1 h, 在预先配制的孵化基质中, 一个标准气压的氮气孵育箱中, 37 ℃孵育 20 min, 以进行酶组织化学的酶-底物反应, 显微镜下观察结果。

2　结果

2.1　大体观察

无滑膜肌腱置入皮下滑囊内 3 d, 外观变化不大; 1 周时, 取出的肌腱仍保持柔软条形, 原来明暗相间的波纹逐渐消失, 腱表面光滑, 覆盖一层半透明的膜样结构; 2 周时, 肌腱体积稍有回缩, 肌腱仍然柔软, 有一定弹性, 肌腱表面有明显的膜包裹, 呈灰白色, 光滑无粘连; 3 周时, 肌腱卷曲, 腱体组织回缩明显。

2.2　组织学观察

3 d 时, 肌腱表面出现少许细胞, 形态不一, 细胞核明显, 胞浆丰富, 肌腱内部组织结构无变化; 1 周时, 腱表面形成一层薄的包膜结构, 由纤维组织和细胞构成, 细胞长梭形, 束间组织有规则的排列; 2 周时, 腱表面膜增厚, 弹性纤维增多, 表面游离边缘光滑, 表层细胞排列整齐, 未发现明显基底膜结构, 束间结缔组织减少, 血管消失, 见图 1; 3 周时, 肌腱表面膜进一步增厚, 呈同心圆排列, 游离缘光滑, 内部无明显坏死。

2.3　超微结构

扫描电镜观察, 经滑膜化改造 1 周后的肌腱, 逐渐不见原来裸露的胶原, 代之以光滑的表面, 隐约可见深面肌腱腱束的走行呈纵向, 肌腱外表面覆盖光滑的膜样结构, 见图 2; 2 周时在膜样结构上可见分布有许多微孔, 与深层相通, 见图 3。

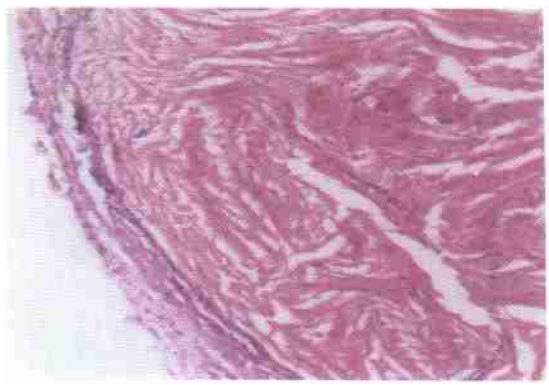


图 1　在滑膜囊内改造 2 周的滑膜化肌腱, 表面有滑膜样结构覆盖　(HE× 200)

Fig 1　Synovium-like structure on the tendon surface after culture in artificial subcutaneous synovial bursa for 2 weeks (HE× 200)

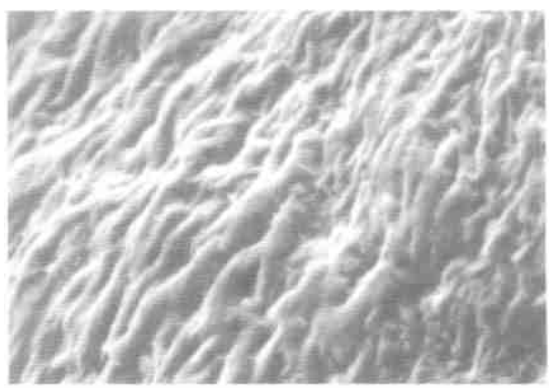


图 2　经滑膜化改造的肌腱, 表面光滑, 无胶原裸露　(SEM× 400)

Fig 2　The smooth surface of synovialized tendon (SEM × 400)



图 3　滑膜化肌腱表面微孔结构　(SEM × 2 000)

Fig 3　Micropore structure on the surface of synovialized tendon (SEM× 2 000)

透射电镜观察, 滑膜化肌腱有明显的细胞表层结构, 表面膜主要由两种形态不同的细胞组成, 一种是靠近包膜最表面细胞, 细胞椭圆形, 胞质内含大量大小不等的吞噬泡和溶酶体, 胞膜向周围伸出许多指状突起, 形态类似吞噬细胞, 为巨噬样细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞(A 细胞),见图 4;另一种细胞位于较深面,细胞呈椭圆形,胞核圆,胞质内含电子密度高的线粒体,高尔基体发达,胞膜一侧有稀疏、粗短的微绒毛,为成纤维样细胞(B 细胞),见图 5。



图 4 滑膜化肌腱表层 A 型细胞 (TEM× 3 000)

Fig 4 Type A cells in the surface layer of synovialized tendon (TEM× 3 000)

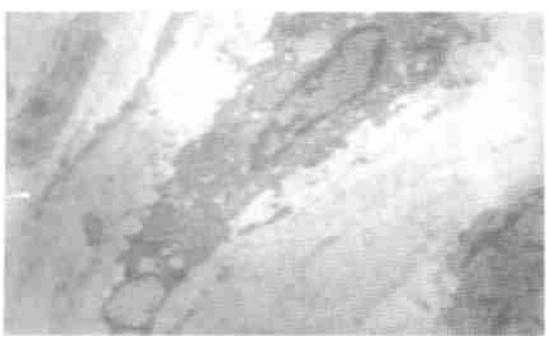


图 5 滑膜化肌腱表层 B 型细胞 (TEM× 5 000)

Fig 5 Type B cells in the surface layer of synovialized tendon (TEM× 5 000)

2.4 免疫组化染色

免疫组化和免疫荧光染色结果显示,滑膜化改造后(1~2 周),肌腱滑膜表层可见 VCAM-1 阳性细胞(图 6)和 CD68 阳性细胞(图 7)。

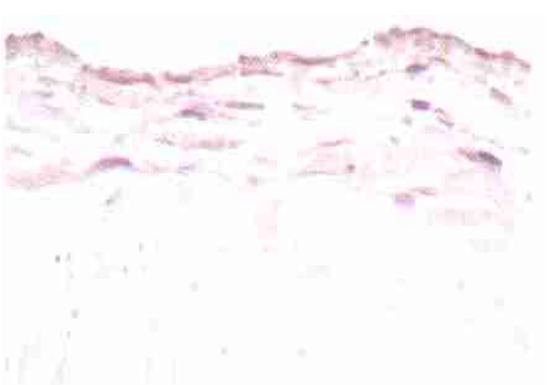


图 6 滑膜化肌腱表层 VCAM-1 阳性细胞 (S-P× 200)

Fig 6 VCAM-1 positive cells in the surface layer of synovialized tendon (S-P× 200)



图 7 滑膜化肌腱表层 CD68 阳性细胞 (FITC× 100)

Fig 7 CD68 positive cells in the surface layer of synovialized tendon (FITC× 100)

2.5 细胞酶化学

肌腱滑膜化改造 1~2 周,肌腱表层有明显的着色带(图 8),而深层组织着色较浅。

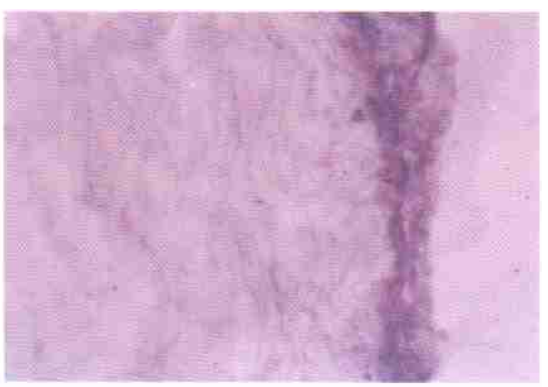


图 8 滑膜化肌腱表面膜 UDPGD 高活性 (酶组化法× 100)

Fig 8 High activity of UDPGD expressed in the surface layer of synovialized tendon (NBT× 100)

3 讨论

3.1 有滑膜肌腱与无滑膜肌腱的结构差异

根据肌腱所在部位和结构特点,尤其是被覆组织的不同,可将其分为有滑膜肌腱和无滑膜肌腱,也称鞘内肌腱和鞘外肌腱[3,4]。有滑膜肌腱主要位于腱鞘内和关节运动度大的部位,除传导肌肉产生的牵张应力外,还要承受因关节屈曲运动和腱鞘(滑车)产生的巨大挤压形成的剪切应力。有滑膜肌腱由致密的胶原纤维束组成,束间结缔组织和血管相对较少,对缺血有较强的耐受力[5],属滑液依赖型组织[6,7]。滑膜层扩展了有滑膜肌腱的功能,有利于滑动和抗粘连。无滑膜肌腱表面没有滑膜,被疏松结缔组织包裹,其滑动性差,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

主要传导肌肉收缩产生的直线牵张应力。无滑膜肌腱束间结缔组织较多, 血管丰富, 对缺血耐受差, 属血供依赖型组织, 这类肌腱移植后, 当环境发生改变, 容易造成肌腱缺血以及周围结缔组织长入形成粘连。

由于有滑膜肌腱分布在腱鞘内, 取材对供区影响较大, 会造成新的残指(趾), 故而限制了其应用; 而无滑膜肌腱取材相对容易, 故临床应用较多。但是两类肌腱愈合方式不同, 而且无滑膜肌腱抗粘连能力差, 术后功能恢复不如有滑膜肌腱[8, 9]。

3.2　滑囊腔对肌腱的作用

有研究显示, 在动物膝关节腔放置鞘内肌腱段一定时间后, 肌腱断端出现光滑的帽状结构[10, 11]。张正治等[12]将无滑膜肌腱放入动物的膝关节腔内, 发现在滑液环境中, 肌腱不但能成活, 而且在腱的外表面还出现了光滑的、类似滑膜层的结构。

但是, 打开关节腔风险较大, 容易引起关节感染、粘连、甚至关节强直等并发症, 而且, 在关节内放置肌腱, 也容易破坏关节的正常生理结构, 所以, 寻找合适的滑膜腔替代关节腔, 显得非常必要。

本实验尝试以人造皮下滑囊腔替代关节腔, 并且观察到: 无滑膜肌腱在皮下滑囊腔"培养"一段时间后, 肌腱表面和内部发生了一系列适应性变化, 表现为肌腱外覆盖一层膜样结构, 组织学证实具有滑膜样结构特征; 从超微结构上看, 这层膜上出现许多微孔样结构, 孔道与肌腱深层相通, 可能是滑膜化肌腱与滑液交换营养物质的通道[5], 原来的血供依赖型无滑膜肌腱, 没有发生变性、坏死, 而且逐渐转变成为滑液依赖型肌腱, 这可能是适应环境的结果, 说明人造皮下滑膜囊可以完成无滑膜肌腱滑膜化改造。

3.3　无滑膜肌腱在体滑膜化改造的意义

屈指肌腱损伤发生率甚高, 且容易发生肌腱粘连, 引起伤指功能障碍。研究表明, 肌腱愈合和滑动功能的恢复主要与移植材料的选择有关[13, 14]。目前临床用于肌腱移植的材料有自体肌腱、同种异体肌腱和人工合成材料。人工合成材料与组织相容性差, 只能作为暂时代用品, 而同种异体肌腱移存在免疫排斥问题, 所以自体肌腱应用最多, 但由于取材的关系, 有滑膜肌腱难以获得, 临床多用如掌长肌腱、趾长伸肌腱、阔筋膜等无滑膜肌腱作为鞘内肌腱移植供体, 但粘连问题难以解决。究其原因可能无滑膜肌腱表面缺乏滑膜屏障, 与周围纤维结缔组织有亲和性, 容易形成粘连。有滑膜肌腱在抗粘连方面有明显优越性[15, 16], 但其来源有限。因此, 本实验采用取材容易的无滑膜肌腱, 经皮下滑膜囊内在体滑膜化改造, 使其成为有滑膜肌腱的移植材料代用品, 以期达到促进愈合, 减轻粘连, 改善手指功能的目的。

参考文献:

[1] 顾玉东. 我国手外科进展[J]. 中华手外科杂志, 1994, 10(3): 29—132.

[2] Mehdizadeh S, Bitensky L, Chayen J. The assay of uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity: discrimination from xanthine dehydrogenase activity[J]. Cell Biochem Funct, 1991, 9(2): 103—110.

[3] Takahashi M. Micro-constructive studies of human digital flexor tendon and tendon sheath-observation by scanning electron microscope and light microscope[J]. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1982, 56(2): 133—147.

[4] Cohen M J, Kaplan L. Histology and ultrastructure of the human flexor tendon sheath[J]. J Hand Surg Am, 1987, 12(1): 25—29.

[5] Ark J W, Gelberman R H, Abrahamsson S O. Cellular survival and proliferation in autogenous flexor tendon grafts[J]. J Hand Surg Am, 1994, 19(2): 249—258.

[6] Lundburg G. Experimental flexor tendon healing without adhesion formation—A new concept of tendon nutrition and intrinsic healing mechanisms. A preliminary report[J]. Hand, 1976, 8(3): 235—238.

[7] Lundburg G, Rank F. Experimental intrinsic healing of flexor tendons based on synovial fluid nutrition[J]. J Hand Surg, 1978, 3(1): 21—31.

[8] Seiler J G 3rd, Gelberman R H, Williams C S. Autogenous flexor-tendon grafts. A biomechanical and morphological study in dogs[J]. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(7): 1004—1014.

[9] 胡必寺, 顾玉东. 腱鞘内肌腱与腱鞘外肌腱移植的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(9): 520—522.

[10] Eiken O, Lundborg G, Rank F. The role of the digital synovial sheath in tendon grafting: an experimental and clinical study on autologous tendon grafting in the digit[J]. Scand J Plast Reconstr Surg, 1975, 9: 182.

[11] Lundborg G, Rank F. Experimental studies on cellular mechanisms involved in healing of animal and human flexor tendon in synovial environment[J]. Hand, 1980, 12(1): 3—11.

[12] 张正治, 刘正津, 宋一平, 等. 滑液对无滑膜肌腱作用的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(9): 517—519.

[13] Gelberman R H, Seiler J G 3rd, Rosenberg A E, *et al*. Intercalary flexor tendon grafts. A morphological study of intrasynovial and extrasynovial donor tendons[J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1992, 26(3): 257—264.

[14] 张正治, 刘正津, 宋一平, 等. 鞘内肌腱移植的实验研究[J]. 中华手外科杂志, 1995, 11(2): 99—102.

[15] Amiel D, Harwood F L, Gelberman R H, *et al*. Autogenous intrasynovial and extrasynovial tendon grafts: an experimental study of pro alpha 1(Ⅰ) collagen mRNA expression in dogs[J]. J Orthop Res, 1995, 13(3): 459—463.

[16] Abrahamsson S O, Gelberman R. Maintenance of the gliding surface of tendon autografts in dogs[J]. Acta Orthop Scand, 1994, 65(5): 548—552.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net