DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.033
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0571-04

论著

组织工程法修复兔肌腱缺损

何清义,李起鸿,许建中,杨 柳 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 应用组织工程的原则,种植成纤维细胞于人羊膜细胞外基质(HA-ECM)以修复兔的肌腱缺损。方法 从胎兔分离的成纤维细胞用5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记后种植于人羊膜细胞外基质上。以1 cm长的兔跟腱缺损为修复对象,用聚酯聚二氧杂环己烷缝线(PDS)轴心桥接肌腱缺损,外包种植有成纤维细胞的HA·ECM膜。术后进行功能锻炼。结果 成纤维细胞在HA·ECM上生长良好,放射状或平行排列。成纤维细胞-HA-ECM组能够修复肌腱缺损并且腱化的速度和质量明显优于仅用PDS和HA-ECM(无成纤维细胞)修复组,与正常肌腱相似,抗张强度达正常腱的81.8%。BrdU免疫组化显示成纤维细胞在腱化过程中起了重要的作用。术后的功能锻炼促进了修复腱的腱化及抗张强度的提高。结论 成纤维细胞-HA·ECM膜能够有效修复肌腱缺损,可作为肌腱修复的另一种选择方法。

关键词:肌腱缺损;人羊膜;组织工程
中图法分类号:R318;R686.05 文献标识码:A

Repair of tendon defects in rabbits with tissue engineering method

HE Qing-yi, LI Qi-hong, XU Jian-zhong, YANG Liu (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of the implantation of the complex of fibroblasts seeded on human amnion extracellular matrix (HA·ECM) in the reparation of tendon defects in rabbits with tissue engineering method. Methods The third passage 5-bromo-2' deoxyuridine (BrdU) labeled fibroblasts which were isolated from fetal rabbits were seeded on HA·ECM. The rabbit models of 1 cm-long Achilles tendon defect were established as experimental subjects and defect control. In experimental group, tendon defects were connected with core bridge by using polydioxanone (PDS) suture and then capsulated with the complex of fibroblasts —HA·ECM. In control group Ⅰ, defect tendons were ligated with PDS suture by using core bridge and enveloped with HA·ECM without fibroblasts seeding. In control group Ⅱ, only PDS was applied to core bridge the defect tendons. The gross examination, light microscopy, scanning electron microscopy, immunohistochemical examination and mechanic measurement of the repaired tendons were respectively performed in postoperative 1, 2, and 3 months. Results The fibroblasts, seeded at 3.5×10^6 cells/ml as optimal concentration, grew well and radiated or paralleled in HA·ECM. Immunohistochemistry showed that the labeled fibroblasts played an important role in tendonization. The results of light microscopy, electron microscopy and mechanic assessment were suggested as follows: the rate and quality of tendonization in experimental group was superior to that of in control group Ⅰ and Ⅱ. The tensile strength in experimental group was the most excellent, then the control group Ⅰ next, and the control group Ⅱ worst ($P<0.05$). Conclusion HA·ECM can serve as an excellent carrier for fibroblasts. Fibroblasts-HA·ECM complex has the capability to repair tendon defect and tendonize with rapid rate and good outcomes 3 months after operation with tensile strength reaching 81.8% of that of normal tendon.

Key words: tendon defect; human amnion membrane; tissue engineering

肌腱缺损后,肌腱的移植已成为常用的一项技术[1~3],但自体肌腱移植来源有限,肌腱与腱鞘粘连,关节僵硬,且造成供区功能障碍[4~6],而同种异体或异种肌腱移植因排斥反应较大而应用不多[7]。70年代以来,人工替代用品有硅橡胶、尼龙聚酯材料、碳纤维等,但上述肌腱代用品存在很多问题[8]。人羊膜(HAM)等生物膜已被广泛用于组织、角膜上皮缺损的修复及伤口的覆盖[9~12],但HAM用于肌腱缺损的修复尚未见报道。组织工程是利用种子细胞与生物材料复合后移植于体内以形成有功能的组织[13]。种植较高浓度有活力的细胞在HAM上移植于动物体内,我们成功地修复了兔肌腱缺损。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)
作者简介:何清义(1973-),重庆市巴县人,博士研究生,主治医师,主要从事组织工程方面的研究,发表论文6篇。电话:68754000-73076
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

1 材料与方法

1.1 成纤维细胞悬液制备

取新西兰大白孕兔,体重4~5 kg,提前产期1周无菌下行剖宫产,取胎兔皮肤,剪成1mm³大小,以Ⅱ型胶原酶消化并制成细胞悬液配制成不同的细胞浓度:①$1.5\times10^6$ cells/ml ②$2.5\times10^6$ cells/ml ③$3.5\times10^6$ cells/ml ④$4.5\times10^6$ cells/ml,备用。

1.2 HA-ECM玻璃筒制作

1.2.1 HA-ECM制作 参照Davis[11]法,略作修改。

1.2.2 HA-ECM玻璃筒制作 把去掉羊膜上皮的HA-ECM膜蒙于圆柱形玻璃筒上,如羊皮蒙鼓一般,其基质面向内,用丝线紧密捆扎固定HA-ECM膜于圆柱表面的凹槽内,再将其翻转,使HA-ECM膜向下,这样HA-ECM膜的基质面就成为玻璃筒的底面。

1.3 成纤维细胞种植于HA-ECM上

15个HA-ECM玻璃筒分为5组,每组3个筒,对照组为1个组,其余4组为实验组。加入步骤一中的4个细胞浓度各1 ml,再各加入RMPI1640培养液(10%小牛血清)4 ml,对照组中

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

加入 RMPI1640 培养液(10%小牛血清)5 ml,不种植细胞。在玻璃筒外加入 PBS,使筒内外的液面保持平衡,然后把中号培养皿(直径 60 mm)放入大号平皿(直径 90 mm)内,盖上玻璃盖,送入 37 ℃,5%CO_2 孵箱中培养 1 周,每 3 d 换液 1 次。

经过倒置显微镜镜下观察,切片光镜检查观察,发现 3.5×10^6 cells/ml 组成纤维细胞生长最好,放射状或平行排列,且成纤维细胞与 HA·ECM 粘附相当牢固,胞外有较多胶原原纤维。因此以后的种植细胞浓度都选择 3.5×10^6 cells/ml。

1.4 实验动物及分组

新西兰大白兔,75 只,雌雄不限,体重(2.5±2.8)kg,由我校实验动物中心提供。以 1 cm 长的跟腱缺损为修复对象,分为 3 个组,每组 24 只,实验组以 3-0 可吸收 PDS 线改良 kessler 法轴心连接 1 cm 的跟腱缺损,外包成纤维细胞-HA·ECM 复合体膜。两个对照组:对照组Ⅰ,PDS 线改良 Kessler 轴心缝合跟腱缺损,外包 HA·ECM 膜(未种植成纤维细胞);对照Ⅱ,仅以 PDS 线作改良 kessler 轴心缝合。每组又根据观察的时限不同分为 1 月、2 月、3 月三个时限组。

1.5 术后功能锻炼

在 1 周内行被动伸屈术肢脚掌,每天 200 次,上、下午各 100 次。10 d 后让其自由活动。

1.6 细胞脉冲标记及免疫组化染色

第 3 代成纤维细胞从液氮中复苏,悬浮于 RMPI1640(10% FBS)加入 10μmol 的 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU),培养 2 d 后,吸除含 BrdU 的培养液,用预温 37 ℃的 PBS 漂洗 3 次细胞种植方法同 1.3,1 个月后取该实验组动物术侧跟腱及对侧相同部位的正常跟腱(作为阴性对照组),作成切片贴于涂有聚赖氨酸的玻片上,一抗采用抗 BrdU 的单抗(Sigma)并用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶试剂盒,免疫组化过程按照说明书进行。

于术后 1、2、3 月分别进行修复腱的大体形态观察,光镜观察以及电镜观察。

1.7 力学性能测试

于术后 1、2、3 个月处死实验组、对照组Ⅰ、对照组Ⅱ兔各 5 只,取其修复腱(3 个月时,取对侧正常跟腱,作为正常腱对照),在 Instron-1011 自动材料机上以 30 mm/min 的速度做单向拉伸测试,测定其抗张强度。

1.8 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示。采用 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 大体形态观察

术后伤口愈合良好,术后 1、2、3 个月时实验组和对照组Ⅰ的肌腱大体形态很相似,具体描述如下,术后 1 个月时,腱吻合处可见膜样组织桥接肌腱缺损,与周围组织粘连较少,桥接物表面尚光滑,直径比正常腱略小,在远、近侧断端吻合处,略增大、突起,见图 1。术后 2 个月肌腱缺损处有索状物桥接,颜色雪白,与周围组织有少许粘连,可轻轻钝性剥离,桥接物表面光滑,触之有一定的弹性和韧性,直径基本与正常腱相似,见图 2。术后 3 个月肌腱缺损处桥接物扁平条状,光洁度很好,表面有一层薄膜包绕,与周围组织无任何连粘,直径也基本和正常腱一样,与正常肌腱很相似,见图 3。对照组Ⅱ与实验组和对照组Ⅰ区别较大,术后 1 个月时,腱缺损处几乎无桥接物,PDS 线尚在。2 个月时,腱缺损处被腱四周组织紧密粘连在一起,不能钝性分离,用手术刀切开分离后,仅有一小条索状物桥接缺损,术后 3 个月与术后 2 个月类似。

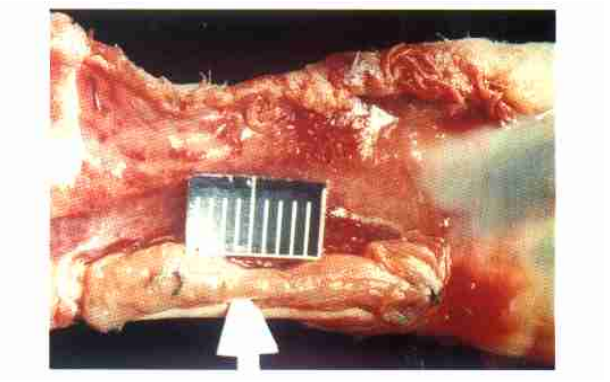


图 1 实验组 1 个月时移植腱呈膜状联结肌腱缺损,移植腱表面平滑,PDS 线隐约可见

Fig 1 Two tendon stumps are united by the smooth-surfaced graft (arrow) as fibriform membranes, and the PDS sutures are obscurely seen in the experimental group 1 month postoperatively

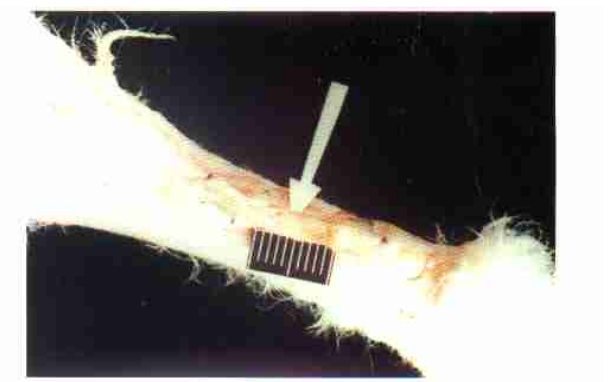


图 2 实验组 2 个月时移植腱呈条索状,颜色雪白、表面光滑,直径略小于正常腱且与周围组织有少许粘连但可钝性剥离

Fig 2 White cord-shaped graft with smooth surface and less diameter than normal one is adhesive with adjacent tissues (arrow) though able to be detached bluntly in the experimental group 2 months postoperatively

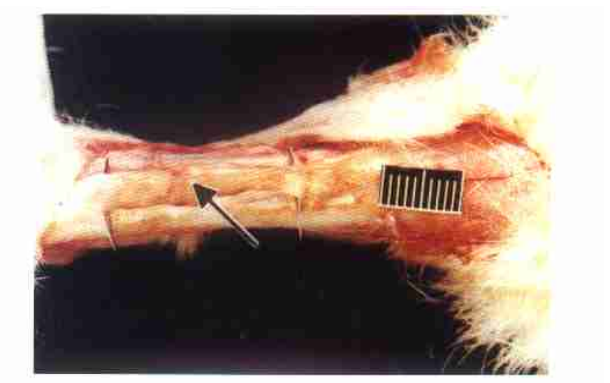


图 3 实验组 3 个月时移植腱呈扁平条状,与正常腱很相似

Fig 3 Graft appears tough flat cords in experimental group 3 months postoperatively, resembling normal tendon

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

2.2　光镜观察

术后不同时间段 3 组修复腱组织切片观察: 实验组, 术后 1 个月 HA-ECM 膜内存在大量细胞, 细胞椭圆或梭形, 胞核圆形、蓝染, 胶原纤维形成较少; 术后 2 个月中央部份为 HA-ECM 膜, 里面有大量细胞附着, 由中央向外周渐渐移行为大量较稀疏的细胶原, 平行排列; 其内有较多顺着胶原排列的梭形成纤维细胞, 细胶原之间有较多毛细血管生长; 术后 3 个月已不见 HA-ECM 膜, 切片内为大量平行的胶原, 胶原纤维排列紧密, 其内有大量梭形细胞, 分布均匀, 并顺胶原以及肌腱长轴的方向平行排列。对照组Ⅰ, HA-ECM 膜内无任何细胞附着也无胶原纤维; 术后 2 个月 HA-ECM 膜四周有大量平行稀疏排列的细胶原, 其内有较多圆或椭圆形细胞, 细胞周围组织较疏松, 形似"陷窝"; 术后 3 个月 HA-ECM 膜消失, 胶原纤维形成较术后 2 月时增多, 平行排列, 细胞梭形或椭圆形, 但排列较紊乱。对照组Ⅱ术后 2 个月切片内有大量的毛细血管, 炎症细胞、纤维素等到肉芽组织结构; 术后 3 个月炎症细胞消失, 有大量的细胶原纤维, 排列较紊乱; 细胞梭形, 散乱分布。

2.3　免疫组化染色

实验组: HA-ECM 膜内含大量细胞, 呈指状突起, 被强染成黄色, 证明种植的活的成纤维细胞大量存在于 HA-ECM 膜上, 染色阳性, 见图 4。

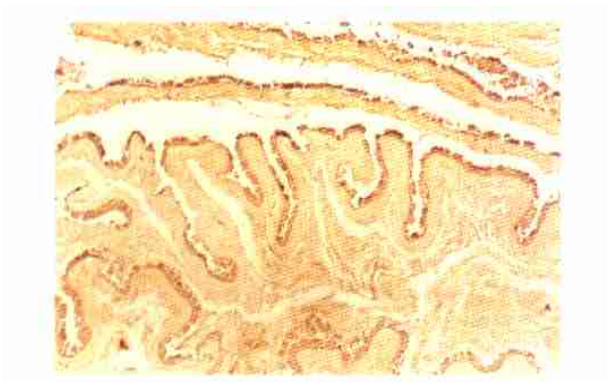


图 **4**　术后 **1** 个月实验组免疫组化染色: 染色阳性的成纤维细胞大量存在于 **HAM** 内　(S-P× 66)

Fig 4　**Massive yellow-stained fibroblasts in HAM in the experimental group 1 month postoperatively**　(S-P× 66)

正常腱对照: 染色呈阴性, 只有一些背景性浅而淡的纤维染色。

2.4　电镜观察

扫描电镜: ①实验组肌腱: 术后 1 个月, 在肌腱的纵面上有排列较为紊乱的细胶原原纤维, 上有若干红细胞附着, 见图 5; 术后 2 个月细胶原原纤维大部分呈平行排列, 间杂有少许排列紊乱的细胶原原纤维, 见图 6; 术后 3 个月胶原纤维增粗、成熟, 排列较为规则平行, 但仍有少部分不成熟的网状纤维, 见图 7。

2.5　力学测试结果

术后 1、2、3 个月实验组、对照组Ⅰ、对照组Ⅱ以及正常肌腱的抗张强度如表 1。其中术后 3 个月实验组, 对照组Ⅰ、对照组Ⅱ肌腱的抗张强度分别相当于正常肌腱的 81.8%, 70.3%, 53.4%。

力学检测表明: 在术后 1 个月时, 实验组、对照组Ⅰ、对照组Ⅱ的抗张强度差异无显著性 ($P>0.05$); 术后 2 个月、3 个月实验组及对照组Ⅰ的抗张强度分别显著大于对照组Ⅱ ($P<0.05$)。但实验组与对照组Ⅰ的抗张强度在术后各时间段时无显著性差异 ($P>0.05$); 即使是在术后 3 个月, 各组肌腱的抗张强度与正常肌腱有显著性差异 ($P<0.05$), 见图 8。

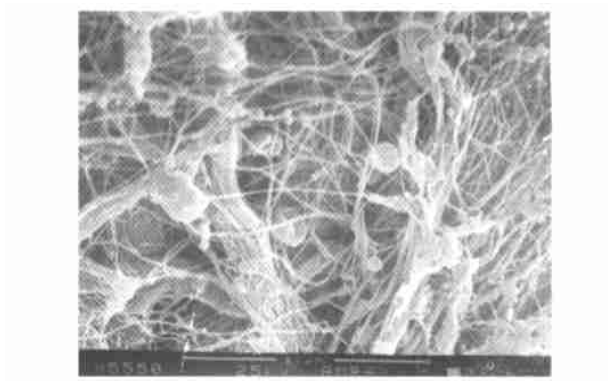


图 **5**　术后 **1** 个月实验组扫描电镜, 修复腱纵表面有排列较为紊乱的细胶原, 上有若干红细胞附着　(× 5 550)

Fig 5　**Graft has irregular arranged thin collagens with some erythrocytes attached on longitudinal surface in the experimental group 1 month postoperatively**　(SEM× 5 550)

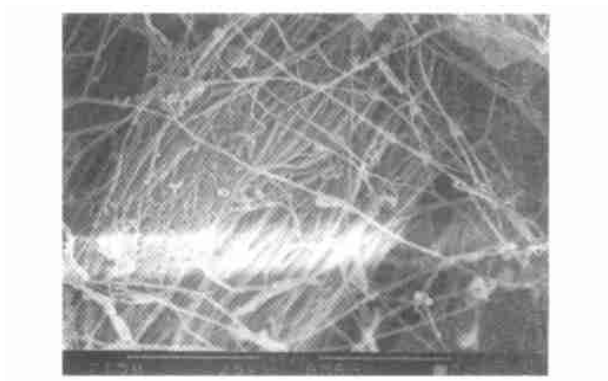


图 **6**　术后 **2** 个月实验组扫描电镜, 细胶原原纤维大部分平行排列, 间杂有少许排列紊乱的细胶原原纤维　(× 7 150)

Fig 6　**Most thin collagens longitudinally-oriented though some disorganized in the experimental group 2 months postoperatively** (SEM× 7 150)

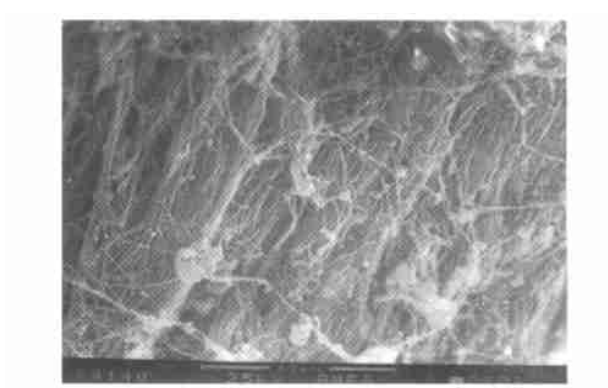


图 **7**　术后 **3** 个月实验组扫描电镜, 胶原原纤维渐成熟, 排列较为规则平行　(× 4 140)

Fig 7　**Gradually-matured collages in well parallel order in the experimental group 3 months postoperatively**　(SEM× 4 140)

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

表 1 术后 1、2、3 个月各组动物肌腱的抗张强度[牛顿(N), $\bar{x}\pm s$]

Tab 1 Tensile strengths of every group in 1, 2 and 3 months after operation (N, $\bar{x}\pm s$)

Group	1 month	2 month	3 month
Experimental	20.010±3.446	45.799±6.041	60.433±8.677
Control Ⅰ	18.654±2.400 *	40.670±3.371 *	51.940±5.880 *
Control Ⅱ	19.371±3.283 **	30.053±4.053△	39.429±1.632△
Normal	—	—	73.892±6.099▲

*: Control Ⅰ versus experimental group, $P>0.05$, $t=0.615$. **: Control Ⅱ versus control Ⅰ and experimental group, $P>0.05$, $t=0.225$. △: Control Ⅱ versus control Ⅰ and experimental group, $P<0.05$ $t=2.572$. ▲: Normal tendon versus control Ⅱ, control Ⅰ, experimental group, $P<0.05$, $t=3.749$

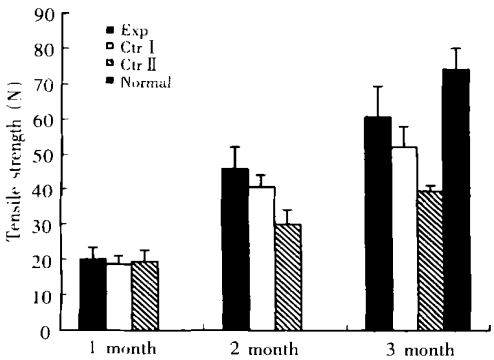


图 8 术后 1、2、3 月各组动物肌腱的抗张强度

Fig 8 Tensile strengths of the grafts in 3 groups 1, 2 and 3 months postoperatively

3 讨论

在腹壁疝的修补中 HAM 被证明能够防止术后粘连形成[9],在顽固性角膜上皮缺损中 HAM 有效促进角膜愈合并可作为烧伤治疗的生物敷料暂时覆盖伤口[10~12]。已有实验显示肌腱能够通过来源于腱外膜的成纤维细胞实现自我修复,但到目前为止,据我们所知利用成纤维细胞与羊膜复合后修复肌腱缺损则尚未见报道。

我们利用组织工程的原则,把成纤维细胞种植在 HA·ECM 膜上,并用这种细胞-生物膜复合体修复兔肌腱缺损获得初步成功。成纤维细胞-HA-ECM 复合物修复肌腱缺损的腱化过程随时间的延长而逐渐成熟。术后 1 月由于肌腱血供受到干扰并且种植的成纤维细胞也要适应新的环境,故镜下只见大量梭形细胞位于 HA-ECM 膜内。随着毛细血管的大量增殖,肌腱血供得到恢复,成纤维细胞分裂增殖并分泌胶原,镜下见梭形的成纤维细胞顺着细胶原的长轴排列。术后 3 个月腱化基本完成,胶原变粗变成熟并顺着肌腱的长轴排列,大量梭形细胞整齐均匀的分布于胶原之间,与正常肌腱的结构类似。与此形成对比,对照组 的胶原和细胞分布相当紊乱而对照组 则以瘢痕组织连接肌腱断端,二者腱化的质量明显劣于实验组。因此,种植的成纤维细胞在腱化过程中起着重要作用。

有种子细胞(成纤维细胞)的 HA·ECM(实验组)的腱化速度和质量明显优于只有 HA·ECM(对照组Ⅰ)和无 HA·ECM(对照组Ⅱ),BrdU 标记的成纤维细胞(用抗 BrdU 作一抗)免疫组化显示有大量细胞棕黄色阳性染色,说明参与腱化的主要为标记的种子细胞。Awad[13] 报道,把间充质干细胞(Mesenchymal stem cells)种植于Ⅰ型胶原后移植于髌骨肌腱的缺损中(实验组)与仅用Ⅰ型胶原移植(对照组)相比,所形成的胶原直径较大也较成熟,腱细胞数量更多,并且其生物力学性能显著优于对照组,这与本研究实验组的抗张强度和腱化质量优于对照组的结论是一致的。说明种植细胞不但可促进肌腱的腱化过程,并且在生物力学性能的改善上也扮演着重要的角色。

参考文献:

[1] Potenza A D. Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1962, 44(1): 49—64.

[2] Seiler J G Ⅲ, Gelberman R H, Williams C S, *et al*. Autogenous flexor tendon graft: a biomechanical and morphological study in dogs[J]. J Bone Joint Surg, 1993, 75A(7): 1 004—1 014.

[3] Naam N H, Effingham I L. Staged flexor tendon reconstruction using pedicaled tendon graft from the flexor digitorum superficialis[J]. J Hand Surg, 1997, 22A(2): 323—327.

[4] Verdan C E. Half a century of flexor tendon surgery: correct status and changing philosophies[J]. J Bone Joint Surg, 1972, 54A(3): 472—491.

[5] Strickland J W. Flexor tendon surgery, part 2: Free tendon grafts and tenolysis[J]. J Hand Surg, 1989, 14B(4): 368—382.

[6] Johnson L L, Feagin JA Jr. Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study[J]. Arthroscopy, 2000, 16(2): 191—196.

[7] Minami A, Usui M, Ishii S, *et al*. The *in vivo* effects of various immunoreactive treatments on allogeneic tendon grafts[J]. J Hand Surg, 1983, 8(6): 888—893.

[8] Powers D L, Davenport M E, Wisnewski P J. Glutaraldehyde-cross-linked meniscal allograft: clinical and histological result[J]. J Invest Surg, 1988, 1(4): 249—257.

[9] Szabo A, Haj M, Waxsman I, *et al*. Evaluation of seprafilm and amniotic membrane as adhesion prophylaxis in mesh repair of abdominal wall hernia in rats[J]. Eur Surg Res, 2000, 32(2): 125—128.

[10] Azuara-Blanco A, Pillai C T, Dua H S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction[J]. Br J Ophthalmol, 1999, 83(4): 399—402.

[11] Pires R T, Tseng S C, Prabhasawat P, *et al*. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy[J]. Arch Opthalmol, 1999, 117(10): 1 291—1 297.

[12] Maral T, Borman H, Arslan H, *et al*. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing[J]. Burns, 1999, 25(7): 625—635.

[13] Awad H A, Butler D L, Boivin G P, *et al*. Autologous meshenchymal stem cell-mediated repair of tendon[J]. Tissue Eng, 1999, 5(3): 267—277.

(编辑 王 红)

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