

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:52 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.032.html>

兔自体与同种异体肌腱联合应用重建前交叉韧带的实验研究

吴 星 赵其纯 尚希福 邓小文 李久源 李 丹

摘要 健康成年雌性新西兰大白兔 24 只, 随机选择一侧膝关节以自体半腱肌腱和自体半腱肌腱混编后重建前交叉韧带作为实验组, 另一侧膝关节以自体半腱肌腱折叠双股重建前交叉韧带作为对照组。术后 3、6、10 周观察两组兔重建的前交叉韧带组织学改变 ($n=3$) 并行生物力学检测 ($n=5$)。结果显示, 与兔同种异体肌腱重建前交叉韧带比较, 自体同种异体肌腱联合应用可加快移植物成熟速度, 增加移植物强度, 缩短腱骨成骨时间, 提高愈合强度。

关键词 兔; 前交叉韧带; 重建; 自体肌腱; 异体肌腱; 联合应用

中图分类号 R 686.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1853-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.032

前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 损伤是膝关节常见损伤之一, 前交叉韧带断裂后会继发起半月板、膝关节软骨损伤, 加快膝关节退变速度。

2016-07-19 接收

基金项目: 安徽省科技厅重点科研项目 (编号: 11070403044)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院骨科, 合肥 230001

作者简介: 吴 星, 男, 硕士研究生;

赵其纯, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

qichzhao@163.com

度, 引起膝关节不稳等并发症, 影响患者的日常生活。膝关节 ACL 断裂后利用手术重建是目前公认的治疗方法^[1-3]。重建移植物材料的选择对手术效果至关重要, 但对于移植物材料的选择仍存在争议, 有人提出联合应用自体与异体肌腱重建 ACL 应用于临床, 但尚缺乏相关的基础研究^[4]。该研究拟开展自体肌腱和同种异体肌腱联合应用重建韧带, 观察移植物组织变化及生物力学改变, 探讨自体肌腱和同种异体肌腱联合应用重建 ACL 损伤的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24 只健康成年雌性新西兰大白兔, 2.2~3.0 kg, 由安徽医科大学附属省立医院实验动物中心提供。饲养期间实验动物关节功能良好, 无关节红肿、跛行等异常。术前单独笼养。

1.2 主要实验器材及试剂 重建手术主要手术器械、光学显微镜由安徽医科大学附属省立医院提供; 石蜡切片机、HE 染色试剂等由安徽医科大学附属省立医院病理科提供; 力学试验机 (Instron E3000, 英国) 由中国科学技术大学力学实验室提供。

Influence of emotional regulation strategies on patients with depression empathy

Zhao Shuai¹ Zhou Xiaoqin^{1,2} Zhang Lei¹

(¹Dept of Medical Psychology Anhui Medical University Hefei 230032;

²Dept of Outpatient Anhui Mental Health Center Hefei 230022)

Abstract To explore the influence of emotional regulation strategies on patients with depression empathy. A total of 52 patients with depression and 53 healthy control subjects were assessed with interpersonal relations index-C (IRI-C) and were compared in empathy traits; meanwhile, they were also assessed with emotion regulation questionnaire (ERQ) and hamilton depression scale (HAMD). The personal distress in IRI-C for study group was significantly higher than those for controls ($P < 0.001$), and it was positively associated with the degree of depression ($P < 0.001$). The scores of expressive suppression for study group were positively associated with the scores of personal distress for controls ($P < 0.05$); the scores of cognitive reappraisal for study group were positively associated with the scores of perspective taking for controls ($P < 0.001$).

Key words depression; emotional regulation strategies; empathy

1.3 实验方法

1.3.1 同种异体移植物制备 同种异体肌腱不在本组研究的实验动物中取材。另取 24 只健康成年雌性新西兰大白兔 2.1 ~ 3.2 kg。兔用 3.0% 戊巴比妥钠耳缘静脉置管麻醉(1 ml/kg) 固定于手术台上,剪毛、消毒、铺巾,一侧膝关节前内侧纵行切口,暴露并切取半腱肌腱,小心剔除肌性部分置入庆大霉素溶液中,生理盐水中漂洗干净后装入双层无菌塑料袋,-80℃深低温冰箱保存 2 周后备用。另一侧膝关节同样方法切取半腱肌腱,深低温保存 2 周备用。记录每只兔的体重。

1.3.2 动物模型的建立及术后处理 健康成年雌性新西兰大白兔 24 只 2.2 ~ 3.0 kg,切断并完全清除兔正常前交叉韧带作为兔 ACL 重建模型。随机选择一侧膝关节以异体半腱肌腱和自体半腱肌腱混编后重建前交叉韧带作为实验组,另一侧膝关节以同种异体半腱肌腱重建前交叉韧带作为对照组。按照肌腱取材动物和实验动物体重质量基本一致的原则。术前 2 h 取出同种异体肌腱置于等渗盐水中自然复温。3.0% 戊巴比妥钠耳缘静脉置管麻醉大白兔,仰卧位固定,剪毛、消毒、铺巾。取一侧膝前内侧切口,长约 3 ~ 4 cm,暴露并切取半腱肌腱,小心剔除肌性部分后置入庆大霉素溶液中备用。自体半腱肌腱和异体半腱肌腱两端对齐重叠,用组织剪修整至合适的粗细后两端用 3.0 肌腱缝合线编织,湿纱布包裹备用。然后切开并将髌骨向外侧脱位,屈膝 90 ~ 100°,暴露、切断并完全清除前交叉韧带。沿正常的前交叉韧带走行用 2.0 mm 克氏针分别钻取胫骨及股骨隧道,将联合肌腱两端牵引线用自制小勾穿过胫骨及股骨隧道,先将股骨端肌腱反复打结,固定于股骨隧道外口,并与周围软组织、骨膜缝合加固,拉紧股骨端牵引线,张力满意后,于屈膝 30°位在胫骨隧道外口,肌腱与周围软组织、骨膜缝合加固。生理盐水冲洗关节腔,复位髌骨,逐层缝合手术切口。另一侧膝关节以异体半腱肌腱折叠成双股后组织剪修整,依照上述同样的方法重建 ACL。术后双下肢不固定,不限制活动,切口不包扎,术前 30 min 及术后前 3 d 肌注青霉素 80 U 预防感染。

1.3.3 观察指标 大体观察:实验动物术后取标本先行肉眼观察,注意关节内移植物形态、连续性、移植肌腱在骨隧道界面腱骨愈合情况。组织学观察:术后 3、6、10 周随机抽出 8 只实验动物,应用过量戊巴比妥处死,其中 3 只用于组织学观察,标本取下后予 10% 中性福尔马林固定,肌腱部分予石蜡包被、

垂直韧带纤维方向切片,腱骨部分固定后脱钙 48 ~ 72 h,再予包被、切片,HE 染色后显微镜下观察。其余 5 只于生物力学仪器下行生物力学测试,测量最大拉脱或拉断强度。生物力学检测:取出标本时保留关节两端各约 4 cm,剔除标本周围所有软组织及固定所用缝线。生理盐水湿纱布包裹后双层无菌塑封袋封存于 -80℃冰箱内,检测前 4℃冰箱中隔夜解冻。测试时保持室温(24 ± 2)℃,湿度 65%,用生理盐水保持标本湿润,固定标本,加载速度为 2 mm/s,记录最大载负荷(单位 N),软件绘制载荷-位移曲线,并记录股骨-移植物-胫骨复合体断裂或者拉脱的部位。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各时间点最大载负荷比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察 术后 2 周动物能自由活动。切口甲级愈合。不同时间段兔膝关节内半月板及软骨未见明显退变,少许清亮积液,移植后肌腱位置良好、形态正常、色泽灰白、质地软,早期双股肌腱未完全融合,后期间隙消失。腱骨周围新生骨形成,对照组骨量较少。

2.2 组织学观察

2.2.1 关节腔内移植物组织学观察 术后 3 周,实验组联合肌腱间炎症细胞少量浸润,肌腱内部细胞消失,呈坏死状,外周成纤维细胞少量增生并向内部生长,可观察到新生薄壁小血管;对照组移植肌腱少许松弛,肌腱外少量滑膜包绕,外周成纤维细胞数量极少。术后 6 周,实验组肌腱间炎症细胞基本消失,外周及中心部大量且密集的成纤维细胞增生,胶原纤维排列无序;对照组移植肌外周成纤维细胞增生明显,但肌腱中心部细胞增生较密集。术后 10 周,实验组联合肌腱中心及外周成纤维细胞数量减少,胶原纤维纵向排列较规则;对照组移植肌腱间外周成纤维细胞数量减少,中心区细胞增生仍较密集,胶原纤维排列相对无序。见图 1。

2.2.2 腱-骨组织愈合的组织学观察 术后 3 周,实验组联合肌腱腱骨界面纤维结缔组织填充,与骨组织和腱组织相融合,可见少量新生薄壁血管、软骨细胞、外周成纤维细胞增生、Sharpey's 纤维形成,胶原纤维排列无序;对照组移植肌腱腱骨界面疏松结缔组织填充,未观察到 Sharpey's 纤维形成。术后 6 周,实验组联合肌腱腱骨界面可见较多的 Sharpey's

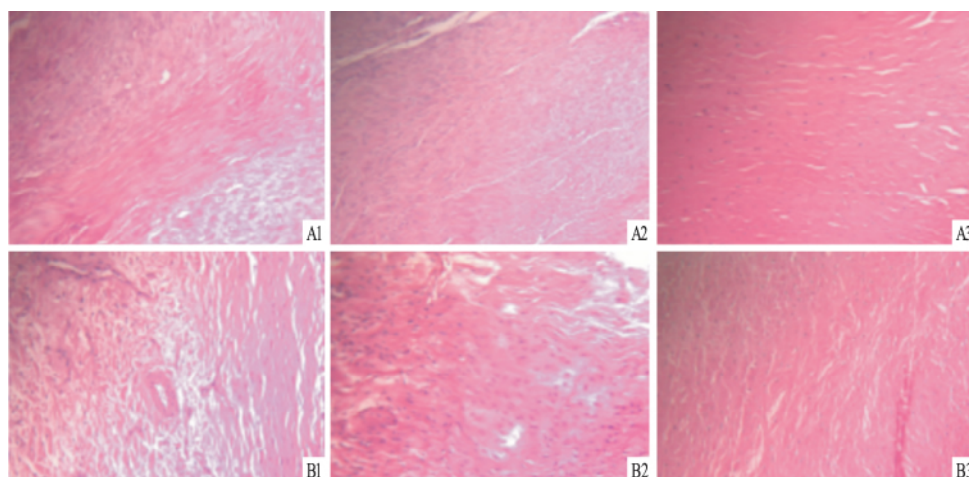


图1 术后两组各时间点移植组织学观察 HE × 200

A: 实验组; B: 对照组; 1: 3 周; 2: 6 周; 3: 10 周

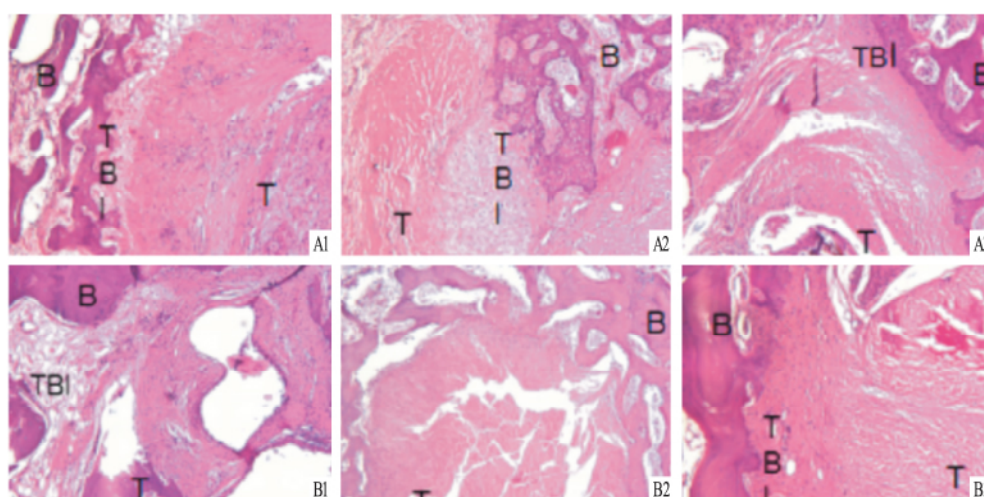


图2 术后两组各时间点腱骨界面的组织学观察 (T: 肌腱; TBI 腱骨界面; B: 骨) HE × 100

A: 实验组; B: 对照组; 1: 3 周; 2: 6 周; 3: 10 周

纤维排列仍比较无序,开始沿移植体应力方向生长,并可见密集软骨细胞;对照组移植肌腱腱骨界面局部 Sharpey's 纤维形成,排列较紊乱。术后 10 周,实验组联合肌腱腱骨界面以 Sharpey's 纤维连接为主,胶原纤维生长趋于有序,基本沿移植体应力方向生长;对照组移植肌腱腱骨界面 Sharpey's 纤维粗大密集,但排列仍比较紊乱无序。见图 2。

2.3 生物力学检测及统计学结果 术后 3 周,骨-移植体-骨复合体均从骨隧道内拉脱;术后 6 周,实验组 4 例韧带实质部拉断,1 例从骨隧道内拉脱,对照组 3 例韧带实质部拉断,2 例从骨隧道内拉脱;10 周时,复合体均为韧带实质部断裂,且随着时间的延长,拉脱或拉断的力量也在增长。两组最大载负荷各时间点差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表1 各组术后最大载负荷比较 ($N = 5, \bar{x} \pm s$)

时间	实验组	对照组	t 值	P 值
3 周	36.41 ± 0.66	25.62 ± 0.67	-25.67	<0.01
6 周	42.80 ± 1.16	31.04 ± 0.81	-18.57	<0.01
10 周	71.51 ± 1.76	61.61 ± 1.27	-10.21	<0.01

3 讨论

目前大多数同种异体肌腱通过深低温冷冻或冻干法保存,清洗和冷冻去除了血液中的免疫排斥因素并使细胞膜表面的组织相容性抗原变性从而减少异体肌腱的抗原性。经过冷冻处理的异体肌腱基本上被看作轻度免疫原性的植入物,受体对异体肌腱不会产生明显的免疫排斥反应^[5]。本研究经深低温冷冻处理的异体肌腱,大大降低了宿主对移植

物免疫排斥的可能性,实验组和对照组实验动物均未出现明显的排斥现象,术后短时间和10周膝关节未见明显的红肿与渗出,组织学染色也没有在移植肌腱内部发现大量炎症细胞。

重建 ACL 移植术都经历一个移植术坏死、细胞再生、血管再生和胶原重塑的过程。实验组中深低温处理的异体肌腱在降低免疫原性的同时无腱细胞存活,在移植中只起到为细胞再生提供生长支架的作用,但是自体肌腱中仍然有大量的活性腱细胞,腱细胞本质上就是特殊的成纤维细胞,移植后借助周围组织液营养及两端血管的迅速长入,细胞复苏、增生、分裂,受体自身的活性腱细胞浸润长入混合编织的异体肌腱内,分化成熟并分泌正常胶原纤维后重塑成新的 ACL,骨道内部分塑性成骨。同时冷冻处理的异体肌腱虽然灭杀了肌腱细胞的免疫抗原,其细胞结构仍会引起轻度或迟发性免疫反应,移植术局部的炎性反应刺激关节滑液增多,滑液沿着肌腱与骨隧道之间的缝隙流入,对腱骨愈合产生不利影响,还可通过稀释最初形成的血肿,抑制纤维血块形成延缓愈合速度,同样条件下异体量越少所引起的免疫反应越轻微,对腱骨愈合影响越小^[6-7]。

本实验表明自体肌腱和同种异体肌腱联合重建 ACL 较单纯同种异体肌腱重建有利于移植术组织结构成熟、滑膜覆盖、腱骨愈合,且术后实验动物未见明显免疫排斥反应,证实深低温处理降低肌腱免疫原性行之有效。另外,本研究在行生物力学检测

时显示实验组标本的最大拉脱或拉断强度在各时间点均要稍强于对照组($P < 0.05$),但随着观察时间的不断增加,两者之间的差距逐渐缩小。

参考文献

- [1] Kruse L M, Gray B, Wright R W. Rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review [J]. *J Bone Joint Surg Am* 2012 94(19): 1737-48.
- [2] Li S, Chen Y, Lin Z, et al. A systematic review of randomized controlled clinical trials comparing hamstring autografts versus bone-patellar tendon-bone autografts for the reconstruction of the anterior cruciate ligament [J]. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012, 132(9): 1287-97.
- [3] Lee Y S, Ra H J, Ahn J H, et al. Posterior cruciate ligament tibial insertion anatomy and implications for tibial tunnel placement [J]. *Arthroscopy* 2011 27(2): 182-7.
- [4] 许沛荣, 陈伟南, 金根洋, 等. 关节镜下自体-同种异体混编肌腱重建前交叉韧带的临床疗效分析 [J]. *实用临床医药杂志*, 2013 17(9): 37-9.
- [5] Mahalingam V D, Behbahani-Nilofar N, Horine S V, et al. Allogeneic versus autologous derived cell sources for use in engineered bone-ligament-bone grafts in sheep anterior cruciate ligament repair [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014 21(5-6): 1047-54.
- [6] 董向辉, 凌 鸣, 冯伟楼, 等. 关节滑液对兔前交叉韧带重建后腱骨愈合生物力学和组织学的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2012 16(11): 1937-40.
- [7] Wen C Y, Ling Q, Lee K M, et al. Grafted tendon healing in tibial tunnel is inferior to healing in femoral tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction: a histomorphometric study in rabbits [J]. *Arthroscopy* 2010 26(1): 58-66.

Anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits using autogenous tendon combined with allogeneic tendon

Wu Xing, Zhao Qichun, Shang Xifu, et al

(Dept of Orthopedics, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Twenty-four healthy female adult New Zealand white rabbits, One-side knee joint reconstructed with autogenous-allogeneic tendon were selected randomly as the test, and the other joint reconstructed with autogenous tendon folded double were served as the control at the same time. 3, 6 and 10 weeks after operation, the histologic examination of ACL ($n=3$) and the biomechanical test ($n=5$) were conducted. Compared with anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits using autogenous tendon, the use of autogenous tendon combined with allogeneic tendon may promote graft maturation rate and the strength of graft, shorten the time of osteogenesis between the tendon graft and the bone tunnel, improve healing strength.

Key words rabbits; anterior cruciate ligament; reconstruction; autogenous tendon; allogeneic tendon; combined use