

## ◇技术与方法◇

## 残端牵张并增强缝合修复兔急性前交叉韧带完全损伤的实验研究

邓小文, 赵其纯, 尚希福, 李久源, 吴星, 李丹, 王毅

**摘要** 取27只健康成年雌性新西兰大白兔于近前交叉韧带股骨止点处完全离断建立双侧急性前交叉韧带完全损伤模型。随机选择一侧膝关节采用自体半腱肌腱增强缝合残端并牵张技术修复前交叉韧带(L组), 对侧行常规前交叉韧带重建(R组)。结果显示: 术后第3、6、10周L组移植体在组织学表现如腱骨界面愈合、细胞增殖、血管再生等方面均优于R组; R组骨-移植体-骨复合体(骨-移植体-残端复合体)的最大载负荷要稍强于L组( $P < 0.05$ )。

**关键词** 前交叉韧带; 完全损伤; 残端牵张并增强缝合; 移植体-残端愈合

中图分类号 R 686.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1683-04

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)损伤是膝关节常见损伤之一, 近年来, 关节镜下ACL重建恢复其稳定性已成为治疗其损伤的常规治疗手

段且取得了良好的治疗效果<sup>[1-3]</sup>, 但有文献<sup>[4]</sup>报道该手术失败率达到8%~25%。所以如何改进手术提高其成功率仍是目前的研究热点。通过对多例陈旧性ACL股骨止点断裂患者关节镜下观察发现, 断裂后的ACL残端可粘连于股骨髁窝顶点、后交叉韧带、股骨外髁等处后形成愈合, 并产生一定张力<sup>[5]</sup>, 这在临床实践工作过程中得到证实, 因此该研究通过建立兔急性ACL完全损伤模型, 应用自体半腱肌腱增强缝合残端并牵张技术修复, 并与常规ACL重建的治疗效果作对比, 探讨膝关节急性ACL完全损伤的治疗方法。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 30只健康成年雌性新西兰大白兔, 体重1.9~2.5 kg, 平均2.3 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。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立及术后处理** 3.0%戊巴比妥钠耳缘静脉置管麻醉(1 ml/kg), 仰卧位固定, 双侧膝关节术区备皮、消毒、铺巾。取膝前内侧切口,

2015-07-25 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: 邓小文, 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

## The characteristics of T lymphocyte cytokine in the cord blood transplantation patients

Yang Huizhi, Zhu Xiaoyu, Wang Jian, et al

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

**Abstract Objective** To evaluate characteristics of T-lymphocyte immunologic function and reconstitution after allo-gene cord blood transplantation. **Methods** To peripheral blood from 11 human cord blood at 30, 60 and 90 days after cord blood transplantation, the T-lymphocytes with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin in the presence of monensin. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed for  $\gamma$ -IFN and IL-4 intracellular production by flow cytometry. **Results** The rate of  $\gamma$ -IFN and IL-4 from T lymphocytes began to increase at 60 days after the transplantation, and the rate of  $\gamma$ -IFN and IL-4 increased significantly at 90 days after the transplantation ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The immune function begins to recover at 60 days after the Cord blood transplantation, the immune function peaks after 90 days. Cord blood transplantation is effective for the acute leukemia therapy.

**Key words** allo-gene cord blood transplantation; T-lymphocytes; cytokines

长 3~4 cm, 逐层切开皮肤及皮下组织, 暴露并切取半腱肌腱, 小心刮除肌肉部分, 两端用 3.0 肌腱缝合线编织, 湿纱布包裹备用。然后切开内侧支持带及关节囊, 将髌骨向外侧脱位, 屈膝 90°~100°, 切除髌下脂肪垫, 完整暴露 ACL, 随机选择一侧膝关节 (L 组) 于近股骨止点处完全切断并以正常股骨附着点建立直径 2.0 mm 股骨骨隧道, 处理好隧道外口软组织, 将编织好的肌腱一端与韧带残端重叠缝合, 另一端以自制小牵引钩拉出股骨隧道, 反复屈伸膝关节数次, 张力满意后, 于屈膝 30° 位在股骨隧道口适当部位钻入门形钉, 固定股骨端。对侧 (R 组) 于上下止点处完整切除 ACL, 同样以 2.0 mm 克氏针分别建立股骨及胫骨骨隧道, 处理好隧道外口软组织, 以自制小牵引钩将编织好的肌腱移植自胫骨及股骨隧道依次拉出, 先将胫骨端肌腱反复打结, 固定于胫骨隧道外口, 并与周围软组织缝合加固, 反复屈伸膝关节数次, 张力满意后, 于屈膝 30° 位在股骨隧道口适当部位钻入门形钉, 固定股骨端。生理盐水冲洗关节腔, 复位髌骨, 逐层关闭切口。患肢不固定, 切口不包扎, 术前 30 min 及术后前 3 d 予肌注青霉素 20 万 U 预防感染。

**1.2.2 解剖学大体及组织学观察** 术后第 3、6、10 周, 分别随机应用过量戊巴比妥处死 9 只实验动物, 取标本时先行对新鲜标本行大体观察, 其中 6 只行生物力学检测, 3 只用于组织学观察, 标本取下后予 10% 中性福尔马林固定, 分别切取移植 - 残端复合体 (R 组为关节腔内移植) 与骨隧道内移植, 前者予石蜡包被、平行韧带纤维方向中央及外周分别切片, HE 染色后光学显微镜下观察; 后者固定后脱钙 48~72 h, 再予包被、切片, HE 染色后显微镜下观察。

**1.2.3 生物力学检测** 取下标本后保留关节两端各约 4 cm 骨性结构, 剔除移植 (移植 - 残端复合体) 外所有软组织, 包括固定所用缝线以及门形钉, 生理盐水纱布包裹后用塑封袋封存于 -80 °C 冰箱内, 集中行生物力学测试。测试前 4 °C 冰箱隔夜解冻。测试时保持室温 (22 ± 2) °C, 湿度 70%, 加载速度为 2 mm/s, 记录最大载负荷, 软件绘制载荷 - 位移曲线。

**1.3 统计学处理** 所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。各时间点最大载负荷采用两独立样本 *t* 检验进行比较。

## 2 结果

**2.1 大体观察** 实验期间 1 只动物因麻醉意外死

亡。术后切口愈合良好, 未出现切口及关节感染; 术后 3 周时能自由走动。取标本时各时间点家兔膝关节内半月板及关节软骨未见明显退变, 部分关节有少量积液, L 组移植 - 残端复合体形态完整, 关节内出现反应性滑膜增生包绕于移植与韧带残端缝合处, 关节液清亮, R 组移植关节内部分未见明显变性坏死, 连续完整。

## 2.2 组织学观察

**2.2.1 关节腔内移植组织学观察** 术后第 3 周, R 组移植内部细胞呈坏死状态, 外有较薄的滑膜组织包绕, 外周有极少量成纤维细胞增生 (图 1a), L 组移植外有滑膜组织包绕, 外周成纤维细胞增生多于 R 组 (图 1d); 术后第 6 周, R 组移植外有滑膜组织包绕, 外周出现较多成纤维细胞增生, 但中央部仍处于少细胞状态 (图 1b), L 组移植外有较厚实的滑膜组织包绕, 中央部亦出现较为密集的成纤维细胞增生 (图 1e); 术后第 10 周, R 组移植外周有大量成纤维细胞增生, 中央部亦出现较为密集的细胞增生 (图 1c), L 组移植内部及外周部均呈现大量密集的成纤维细胞增生 (图 1f)。术后各时间点内均可见移植 - 残端间大量滑膜组织填充, 大量新生血管形成 (图 2)。

**2.2.2 腱 - 骨组织愈合的组织学观察** 术后第 3 周, R 组腱骨界面连接疏松, 可见明显分界, 其内主要由炎性细胞填充 (图 3a), L 组腱骨界面大部分连接紧密, 其间以肉芽组织为主, 可见少量血管组织 (图 3d); 术后第 6 周, R 组腱骨界面连接较紧密, 其间可见以肉芽组织填充为主, 可见少量且无序排列的胶原纤维 (图 3b), L 组腱骨界面连接紧密, 有 Sharpey's 纤维生成, 血管丰富 (图 3e); 术后第 10 周, R 组腱骨界面结合紧密, 可见 Sharpey's 纤维生成, 但排列仍比较紊乱 (图 3c), L 组腱骨界面连接紧密, 界面以 Sharpey's 纤维连接为主, 可见软骨细胞生成 (图 3f)。

**2.3 生物力学检测** 术后第 3 周, 行拉力测定时 R 组 1 例在移植实质部断裂, 5 例由隧道内拉出, L 组 6 例均于移植与残端缝合部断裂; 术后第 6 周, R 组 4 例在移植实质部断裂, 2 例由隧道内拉出, L 组 4 例于移植与残端缝合部断裂, 2 例由隧道内拉出; 术后第 10 周, R 组 6 例均在移植实质部断裂, L 组 3 例于移植与残端缝合部断裂, 3 例于移植近股骨隧道内口处断裂。两组最大载负荷各时间点差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

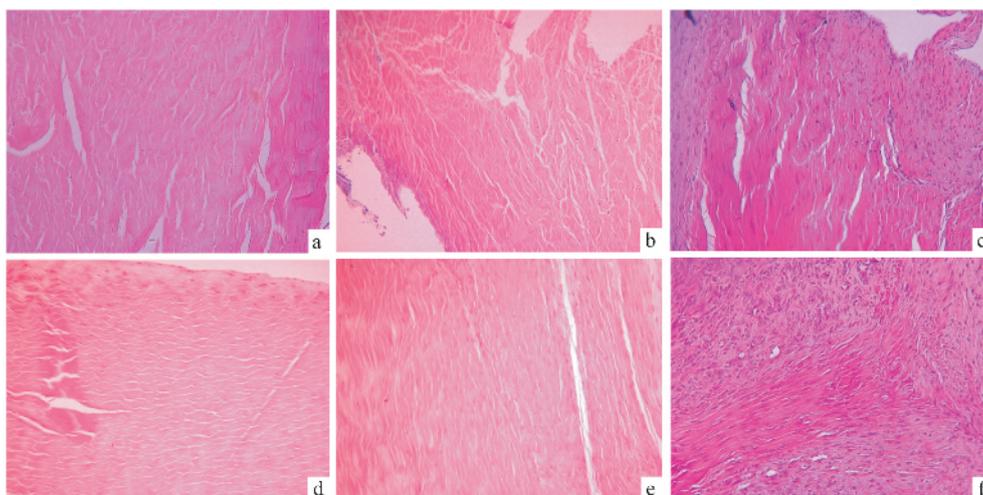


图1 术后两组各时间点移植组织学观察 HE × 200

a: R 组术后第3周; b: R 组术后第6周; c: R 组术后第10周; d: L 组术后第3周; e: L 组术后第6周; f: L 组术后第10周

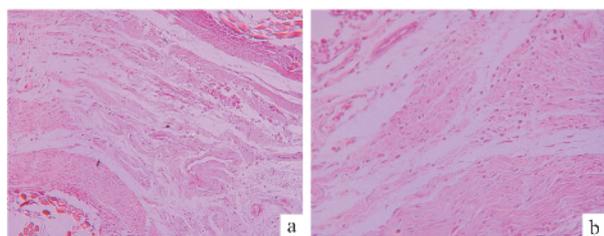


图2 术后L组移植-残端连接处组织学观察 HE × 200

a: L 组术后第6周; b: L 组术后第10周

表1 各组术后最大载负荷比较(N n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	L 组	R 组	t 值
3 周	19.09 ± 1.75	42.35 ± 6.45	-8.53
6 周	37.64 ± 1.95	53.90 ± 2.87	-11.47
10 周	65.12 ± 2.78	70.46 ± 1.37	-4.22

### 3 讨论

**3.1 移植物的再血管化及增生重塑** 无论是自体、异体以及人工材料类韧带移植在体内均无血液供应,一般均需经历缺血坏死、再血管化、细胞及胶原纤维的增生及重塑、再韧带化等过程。本研究显示L组移植在细胞增殖、血管再生等重塑过程快于R组,表明自体半腱肌腱增强缝合残端并牵张技术修复兔急性ACL完全损伤较常规ACL重建更利于移植组织结构成熟、滑膜覆盖,与实验预期结果一致。

**3.2 对腱-骨愈合的影响** ACL重建术后移植

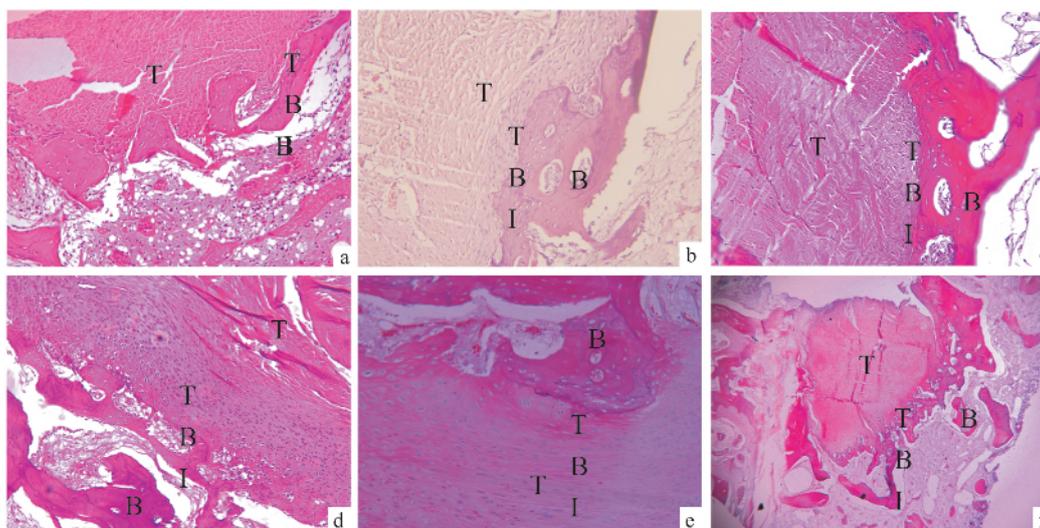


图3 术后两组各时间点腱骨愈合界面的组织学观察 HE × 100

T: 肌腱移植; TBI: 腱骨界面; B: 骨; a: R 组术后第3周; b: R 组术后第6周; c: R 组术后第10周; d: L 组术后第3周; e: L 组术后第6周; f: L 组术后第10周

与骨隧道界面的愈合情况是手术成功与否的重要因素,手术因素、局部的生物学环境等均对腱骨愈合有着重要影响<sup>[6]</sup>。Rodeo et al<sup>[7]</sup>研究发现重建术后会出现胫骨骨隧道扩大溶解现象,分析认为可能的原因主要包括:移植物未能解剖位固定、移植物的排异反应、毒性代谢产物致细胞坏死、电钻钻取骨隧道时发生灼热坏死等。由于人体结构特点,其对胫骨隧道的影响更为严重,本实验中 L 组单纯建立股骨骨隧道,避免了建立胫骨骨隧道的一切弊端,股骨骨隧道在术后第 6 周时 L 组腱骨界面既已连接紧密,并有 Sharpey's 纤维生成,腱骨面血管丰富,而术后第 10 周时 R 组才出现排列紊乱的 Sharpey's 纤维,结果亦显示在促进腱骨界面愈合方面,自体半腱肌腱增强缝合残端并牵张技术修复兔急性 ACL 完全损伤较常规 ACL 重建更有优势。

**3.3 移植物-残端愈合** 本实验中术后设定各时间点内均可见移植物-残端间大量滑膜组织填充以及大量新生血管形成,但设定时间内并未观察到两者间发生明显胶原纤维的束间融合,考虑可能为实验观察时间不足、两者缝合方式等有关。另外,行生物力学检测时发现 R 组骨-移植物-骨复合体(骨-移植物-残端复合体)的最大载负荷各设定时间点均要稍强于 L 组,但随着观察时间的不断增加,两者之间的差距亦逐渐缩小;此外,通过对比两组移植物的拉脱或断裂部位,可以发现术后早期 L 组主要薄弱部位即位于移植物与残端缝合处,随着观察时间的不断增加,该部位抗拉强度亦逐渐加强。

因此,本研究表明自体半腱肌腱增强缝合残端

并牵张技术修复兔急性 ACL 完全损伤较常规 ACL 重建更利于移植物组织结构成熟、滑膜覆盖,但早期抗拉强度稍弱。

### 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] Tiamklang T, Sumanont S, Foocharoen T, et al. Double-bundle versus single-bundle reconstruction for anterior cruciate ligament rupture in adults [J]. *Cochrane Database Syst Rev* 2012, 11: CD008413.
- [4] Kazusa H, Nakamae A, Ochi M. Augmentation technique for anterior cruciate ligament injury [J]. *Clin Sports Med* 2013, 32(1): 127-40.
- [5] Nakamae A, Ochi M, Deie M, et al. Biomechanical function of anterior cruciate ligament remnants: how long do they contribute to knee stability after injury in patients with complete tears [J]. *Arthroscopy* 2010, 26(12): 1577-85.
- [6] 周平, 赵其纯, 尚希福, 等. rhBMP-2 联合 rhVEGF165 对兔前交叉韧带重建后腱-骨愈合的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5): 458-62.
- [7] Rodeo S A, Kawamura S, Kim H J, et al. Tendon healing in a bone tunnel differs at the tunnel entrance versus the tunnel exit: an effect of graft-tunnel motion [J]. *Am J Sports Med* 2006, 34(11): 1790-800.

## The research about remnant tension and augmented suture in acute complete rupture of anterior cruciate ligament in rabbits

Deng Xiaowen, Zhao Qichun, Shang Xifu, et al

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

**Abstract** Acute complete ACL femoral rupture model of both two knee joints were created in all 27 rabbits. The ACL of one knee were repaired by remnant tension and augmented suture with semitendinosus tendon autografts (L group) and the contralateral one were subjected to anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR) with semitendinosus tendon autografts (R group). The group L presented enhanced tendon-bone healing, cellular proliferation and revascularization at 3th, 6th, 10th postoperative week compared to the group R; the average maximum load of the group R was better than that of the group L ( $P < 0.05$ ).

**Key words** anterior cruciate ligament; complete tear; remnant tension and augmented suture; remnant-to-graft healing