外周血间充质干细胞凝胶对兔肌腱移植物重建 前交叉韧带腱骨愈合的影响 _{対家能 徐 斌 徐洪港 朱雪坤 陈}鹏

摘要 目的 探讨在兔自体肌腱移植物重建前交叉韧带 (ACL) 模型股骨道内注入自体外周血间充质干细胞(PBM-SCs) 凝胶对早期腱骨愈合的影响。方法 健康 3~4 月龄新 西兰大白兔 32 只,随机均分为 PBMSCs 组与对照组, PBM-SCs 组予以皮下注射粒细胞集落刺激因子(G-CSF) 动员 6 d 后采集外周血 采用密度梯度离心法及贴壁培养法分离纯化 PBMSCs ,光镜下观察细胞形态并行流式细胞术检测鉴定表 面抗原表达。建立自体肌腱移植物重建前交叉韧带模型, PBMSCs 组于动物模型股骨道内注入 PBMSCs 凝胶, 对照组 仅注入凝胶。分别于术后第2、4、8、12周每组随机取4只处 死取材 1 只做 Masson 三色染色观察组织愈合的病理表现 3 只做股骨道移植物抗牵拉试验观察其愈合强度。结果 流 式细胞术检测结果提示 PBMSCs 表面表达 CD29、CD90 不表 达 CD11b、CD34。Masson 三色染色显示 PBMSCs 组术后第4 周胶原纤维开始增生 排列紊乱 ,第8周胶原纤维显著增生, 排列不规则,第12周胶原纤维大量增生,排列有序。PBM-SCs 组腱骨愈合速度较对照组迅速。PBMSCs 组和对照组的 股骨道移植物抗牵拉强度随时间延长呈现上升趋势,其中 PBMSCs 组移植物的抗牵拉强度自第8 周起明显高于对照组 (P < 0.01)。结论 PBMSCs 凝胶对兔自体肌腱移植物重建 ACL 的早期腱骨愈合有促进作用。

关键词 前交叉韧带; 腱骨愈合; 外周血间充质干细胞 中图分类号 R 686.5

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2015) 08 - 1081 - 05

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL) 是 维系膝关节稳定的重要弹性结构,但是在损伤或断 裂后无法引起血小板聚集,不能激活凝血系统,难以 自愈^[1],会导致膝关节稳定性降低,加大膝关节内 软骨和半月板等其他结构损伤的风险,目前公认有 效的治疗方法是进行关节镜下肌腱移植物重建 ACL 手术^[2]。肌腱移植物在骨道内的愈合,即腱骨 愈合的强度决定了术后移植物的稳定性,对指导术

2015-04-23 接收

- 基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1208085 MH157)
- 作者单位: 安徽医科大学第一附属医院运动创伤与关节镜外科 ,合肥 230032
- 作者简介:刘家能,男,硕士研究生;

徐 斌,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,Email: youchen100@126.com 后功能锻炼、患肢负重以及参加体育活动起到关键 性作用,是保证ACL重建术临床效果的重要因素。 间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是来 源于中胚层的一类多潜能干细胞,其主要存在于结 缔组织与器官间质中,如骨髓、脂肪、羊膜组织、脐 带、外周血等。MSCs具有强大的增殖能力、多向分 化潜能和免疫调节功能,在适宜的体内或体外环境 下可以向成骨细胞、成软骨细胞、肌腱、脂肪细胞、骨 髓基质细胞、血管内皮细胞及神经细胞样细胞分化, 并且多次传代扩增后仍具有干细胞特性,是重要的 组织工程种子细胞^[3]。该实验建立兔自体肌腱移 植物重建ACL模型,加入外周血间充质干细胞(peripheral blood mesenchymal stem cells,PBMSCs)作为 影响因素,探讨 PBMSCs 对早期腱骨愈合有无促进 作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 3~4 月龄健康新西兰大白 兔 32 只 不限雌雄,体重 2.3~2.7 kg 清洁级 购自 安徽医科大学实验动物中心。根据实验要求随机均 分为 PBMSCs 组和对照组。术前白兔运动饮食正 常,体检未发现膝关节周围肿胀,四足均无溃烂,双 膝前抽屉实验、Lachman 实验均为阴性。抛硬币法 随机选取一侧膝关节,建立自体肌腱移植物重建 ACL 模型,PBMSCs 组于模型股骨隧道内注入 PBM--SCs 凝胶,对照组仅注入凝胶。

1.2 主要试剂与仪器 粒细胞集落刺激因子(北 京双鹭药业股份有限公司); Percoll 分离液(美国 Pharmaeia 公司); 10% 胎牛血清(浙江天杭生物科技 有限公司); 细胞培养时用的青霉素 - 链霉素、胰酶 细胞消化液(上海碧云天生物技术有限公司); L-DMEM 液、牛血清白蛋白(美国 Hyclone 公司); 抗兔 CD11b、CD29、CD34、CD90 抗体(美国 Santa Cruz 公 司); 凝血酶冻干粉(长春国奥药业有限公司); 人纤 维蛋白原(上海莱士血液制品股份有限公司); Masson 三色染色试剂盒(福州迈新生物科技有限公 司)。CO₂ 培养箱(上海姚氏仪器设备厂); BHC-1300 II A 生物安全柜(苏州净化设备有限公司); 倒 置相差显微镜(日本 Olympus 公司); EpicsXL 型流 式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); FA1204B 电 子分析天平(上海精科天美贸易有限公司); NK100 指针式拉力计(上海艾固检测仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取、培养 PBMSCs PBMSCs 组动物按照 30 μg/(kg • d) 剂量予以粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) 动员 6 d 第7天经耳缘静脉采集外周血15 ml 在无菌工作 台内按照1:1比例与磷酸盐缓冲液(PBS)稀释混 合 吹打均匀 缓慢加入密度为 1.073 g/L 的 Percoll 分离液,以此为离心介质分离细胞(2 500 r/min 20 min) 吸取灰白色云雾状的白膜层(单个核细胞 层) 适量 PBS 洗涤后加入含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 L-DMEM 培养基 中,置于37 ℃、5% CO,、80% 湿度的培养箱中培养。 3 d 后半量换液 5 d 后全量换液,以后每3~4 d 换 液1次 倒置相差显微镜下观察传代细胞以集落方 式贴壁生长,呈长梭型或多角形。当贴壁生长的原 代细胞呈 80%~90% 融合时,用 0.25% 的胰蛋白酶 消化3 min 按照1:2比例进行传代。

1.3.2 流式细胞仪检测 PBMSCs 细胞表面抗原表 达 胰蛋白酶消化第 3 代贴壁细胞 收集细胞悬液, 常温下 800 r/min 离心 5 min ,弃去上清液,PBS(含 1% 牛血清白蛋白) 清洗细胞 3 次,计数细胞以达到 流式细胞仪检测的细胞数量要求,每管含细胞数 1.0×10⁵ 个,向各管内依次加入 CD11b、CD29、 CD34、CD90 抗体,避光、孵育 35 min,之后以 PBS (含1% 牛血清白蛋白) 清洗细胞,去除未结合抗体, 以 500 μl PBS 重悬细胞并转入流式管中,流式细胞 仪测定相应 CD 分子标记率。

1.3.3 制备 PBMSCs 凝胶混合物 消化收集第 3 代 PBMSCs 1.0×10⁵ 个,以 0.3 ml PBS 冲洗形成细 胞悬液,同时取凝血酶冻干粉 0.1 g、人纤维蛋白原 0.1 g 与 2 ml 氯化钙注射液混合,1 ml 注射器抽取 0.3 ml 混合液与 0.3 ml 细胞悬液,摇匀混合 25 ~ 30 s(室温 24 ℃) 即可形成凝胶。

1.3.4 建立兔 ACL 重建实验模型 3% 戊巴比妥 纳溶液按照 1 ml/kg 剂量经耳缘静脉缓慢静推,完 全麻醉后单侧膝关节备皮,碘酒、酒精消毒,无菌手 术巾铺巾覆盖。做小腿后方纵行切口,分离并离断 合适长度的趾长屈肌腱,对折肌腱,游离端使用4-0 无菌缝合线编织缝合,对折端用1.0 mm 钢丝穿过, 无菌生理盐水纱布覆盖待移植肌腱备用。做髌旁内

侧入路 以髌骨为中心 切开内侧支持带 将髌骨推 向外侧,充分暴露兔膝关节腔,辨别并剪断 ACL,检 查前抽屉试验及 Lachman 实验(+) 建立 ACL 断裂 模型,屈曲兔膝关节于90°位置,沿原ACL 走形方向 及上下止点附丽处,使用 2.5 mm 克氏针建立胫骨 道与股骨道,1.0 mm 克氏针于股骨髁上方约 2 mm 处建立两处骨道,自胫骨端向股骨端引入移植肌腱, 股骨端两段钢丝均由外向内穿过骨道,于内侧相交 并拧紧 PBMSCs 组与对照组分别将 PBMSCs 凝胶或 凝胶均匀注入股骨隧道,将胫骨端肌腱拉紧并与周 围骨膜、筋膜等组织缝合固定。复位髌骨 检查前抽 屉试验及 Lachman 试验(-),无菌生理盐水冲洗关 节腔 逐层缝合手术切口 无菌敷料包扎伤口。待麻 醉苏醒后送回安徽医科大学实验动物中心笼内饲 养,自由活动,每日检查实验动物的手术伤口及一般 情况。其中 PBMSCs 组1 只实验动物于术后当日死 亡 对照组 2 只实验动物分别于术后第 3 天和第 4 天死亡 均立即补齐; PBMSCs 组与对照组分别有 3 只和2只实验动物于术后1~3d内出现手术切口 红肿、脓性渗出等症状,予以每日20万U青霉素钠 肌注3d后均症状好转,其余实验动物均未发生感 染且存活至标本取材阶段。

1.3.5 标本制备 术后第2、4、8、12 周使用空气栓 塞法每组各处死4 只实验动物,立即手术取出实验 膝关节,剔除多余软组织,1 只用于 Masson 三色染 色3只用于股骨端移植物抗牵拉力试验。Masson 染色观察标本仅留取股骨端(股骨干下1/3 与股骨 髁),固定于10%中性福尔马林溶液中72 h,取出标 本,10% EDTA 磷酸缓冲液脱钙4~6 周。移植物抗 牵拉试验标本留取股骨端(股骨下1/2)、移植 ACL、 胫骨端(胫骨上1/2),即刻进行试验。

1.3.6 Masson 三色染色 针刺法判断组织脱钙满 意后,沿移植物纵轴切开标本,按照脱水、透明、包埋 程序制成蜡块,切成 5 μm 厚薄片,置于载玻片上脱 蜡至水,滴加 100 μl Masson 复合染色液染色 5 min, 蒸馏水冲洗;滴加 100 μl 磷钼酸染色 5 min,甩干; 滴加 100 μl 苯胺蓝染色 5 min,蒸馏水稍冲;滴加 100 μl 分化液分化 30~60 s(重复 1 次),脱水、透 明、封片后置于光学显微镜下观察。

1.3.7 股骨道移植物抗牵拉强度试验 调整室温 至 24 ℃,湿度 70%,抽出用于固定股骨端肌腱的钢 丝,生理盐水滴浴标本标本股骨端以三段钢丝捆扎 固定于测试架上方水平支架上,胫骨末端打孔予以 穿过钢丝并固定在测试架下方卡口处,裁剪合适大 小铝板肤贴固定于胫骨结节后方,并钢丝捆扎,另一端连接拉力计,于水平位置均匀用力牵拉胫骨端钢丝(图1),直至移植物自股骨道内脱出,记录拉力计峰值数据。



图1 测量股骨道移植物抗牵拉强度

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行 分析,详细记录两组移植物肌腱自骨道内脱出时所 需拉力的大小,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用两样 本t检验。

2 结果

2.1 PBMSCs 表面标志物的表达 流式细胞仪检 测结果提示:本实验中所培养的第3代 PBMSCs 均 一表达 CD29、CD90, 阳性表达率为 97.3%、98.4%, 而 CD11b、CD34 呈阴性,阳性表达率为 1.3%、 1.3%, 见图 2。



A:: CD29; B: CD90; C: CD11b; D: CD34

2.2 Masson 三色染色观察 术后 2 周:两组在腱 骨交界处均有大量坏死组织形成 纤维排列紊乱 成

纤维细胞与胶原纤维均无明显增生,见图3A。

术后4周:对照组仍有大量坏死组织,纤维排列 不齐,有少量成纤维细胞增生,但未见明显胶原纤 维。PBMSCs组坏死组织较对照组减少,组织排列 欠规则,有少量成纤维细胞及胶原纤维长入,见图 3B。

术后 8 周: 对照组有大量成纤维细胞长入 纤维 排列欠规则,腱骨愈合界面有少量胶原纤维长入。 PBMSCs 组有大量成纤维细胞长入,部分纤维排列 整齐,部分欠规则,腱骨愈合界面有大量胶原纤维长入,见图 3C。

术后 12 周: 对照组成纤维细胞数量减少,胶原 纤维生成增多 腱骨愈合交界处成纤维细胞与胶原 纤维数量比约为1:1。PBMSCs 组仅残余少量成纤 维细胞,大量胶原纤维规则排列在腱骨愈合交界处, 见图 3D。



图 3 术后 4 个时间点腱骨愈合界面 Masson 三色染色 × 100 A: 术后 2 周; B: 术后 4 周; C: 术后 8 周; D: 术后 12 周; 1: 对照 组; 2: PBMSCs 组

2.3 股骨道移植物抗牵拉强度 股骨道移植物抗 牵拉力强度随时间延长呈上升趋势,第2周、第4周 时,两组之间抗牵拉力强度差异无统计学意义。术 后第8周及第12周,PBMSCs组抗牵拉力强度明显 大于对照组(P<0.01),见表1。

表1 术后各时间段两组股骨道移植物抗牵拉强度对比(N x ± s)

项目	对照组(n=3)	PBMSCs 组($n = 3$)	t 值	P 值
术后2周	22.87 ± 3.91	24.93 ± 1.94	-0.820	0.456
术后4周	38.60 ± 3.41	39.67 ± 4.82	-0.313	0.770
术后8周	50.73 ± 2.32	61.07 ± 3.00	-4.725	0.009
术后12周	65.87 ± 4.31	89.80 ± 5.70	-5.817	0.004

3 讨论

ACL 重建手术在骨道内建立了一个全新的腱 - 骨交界面,而移植肌腱与骨道在这个界面上的修 复重建却是一个缓慢而复杂的生物过程,目前已经 有大量的动物试验及临床试验对腱骨愈合过程进行 了深入的研究。在关节镜下 ACL 重建手术及术后 康复过程中影响腱骨愈合的因素有很多 如:移植物 材料、骨道定位、骨道内移植物长度和直径、移植物 的固定方式、移植物在骨道内的张力、移植物在骨道 内的移动以及早期康复锻炼等^[4]。在组织学方面, 腱骨愈合经历3个阶段:①组织炎症期;②血管长 入与细胞增生期;③韧带重建期,各阶段间无明显 组织学与时间界限 約在第8 周起 纤维瘢痕开始形 成^[5]。在 ACL 重建过程中 腱骨愈合是最薄弱的环 节 也是决定手术成败的关键所在 如何促进肌腱移 植物在骨道内的愈合或加强愈合强度成为当前运动 医学领域的研究热点。

Bi et al^[6]报道术后规律皮下注射甲状旁腺激素 [1-34]对大鼠 ACL 重建模型早期腱骨愈合有促进 作用。Kuang et al^[7]使用涂有掺锶磷灰石骨水泥的 同种异体腱重建兔 ACL,术后组织学提示实验组较 对照组提早完成了腱骨愈合。Gulotta et al^[8]认为肿 瘤坏死因子α拮抗剂可以加强大鼠肩袖修补术后 早期腱骨愈合的生物力学强度。Kovacevic et al^[9] 在大鼠冈上肌肌腱断裂模型中使用 rhPDGF-BB 涂 层补片修补冈上肌,较普通补片能增加腱骨愈合早 期的细胞增生和血管再生。上述实验均取得了一定 的成果,也为后期的临床试验打下了坚实的基础。

由于 MSCs 具有多向分化与无限增殖的特性, 使其在运动医学修复重建领域具有广阔的临床应用 前景,目前国内外学者更多的把研究方向指向了骨 髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells,bMSCs)^[10]。Li et al^[11]使用超顺磁纳米 铁颗粒和细胞膜红色荧光探针标记 bMSCs,与生物 蛋白胶混合后注入兔 ACL 重建模型的膝关节中,认 为 bMSCs 可以促进早期腱骨愈合。但是骨髓移植 治疗在临床上的使用存在来源有限、取材属于有创 操作且存在感染风险等问题,MSCs 的同源性让研究 者把目光转向其他来源。Toghraie et al^[12]从髌下脂 肪垫中提取脂肪来源 MSCs 治疗膝关节软骨缺损和 骨性关节炎,取得了理想的效果。Sekiya et al^[13]发 现膝骨关节炎患者关节液中 MSCs 细胞数量较正常 人增加,并证明这些 MSCs 来自滑膜而非骨髓。 Zhao et al^[14]首先在动员后的外周血中提取,培养出 具有多能干细胞潜能的一类细胞,即 PBMSCs,随着 研究的深入,PBMSCs 的提取与培养鉴定已经日趋 成熟。

本研究对提取培养出的细胞行流式细胞仪检测 细胞表面抗原表达,结果提示 CD29、CD90 呈阳性, CD11b、CD34 呈阴性,符合 MSCs 鉴定标准^[15]。成 功移植入兔 ACL 重建模型股骨端后在不同时间段 对腱骨愈合的组织学特征和抗牵拉强度进行观察, 评估 PBMSCs 对腱骨愈合的影响。术后第2周和第 4 周,PBMSCs 组与对照组在组织学特征和抗牵拉强 度上均无明显区别,自第8周开始,PBMSCs 组腱骨 愈合界面胶原纤维数量较对照组明显增多,抗牵拉 强度亦显著大于对照组。可见 PBMSCs 在这个时间 段可以促进腱骨界面胶原纤维形成,从而加强生物 力学强度。

ACL 重建后的腱骨愈合重建过程极其复杂,其 愈合类型和方式,以及可以对其愈合造成影响的因 素都有待于进一步研究,PBMSCs 因取材微创、感染 率低,有利于实现临床自体细胞移植的目标,有着广 阔的临床应用前景。本研究结果表明:PBMSCs 可 以促进 ACL 重建术后的早期腱骨愈合,加强腱骨愈 合生物力学强度,为临床促进腱骨愈合提出了一种 新的思路。

参考文献

- [1] Murray M M , Spindler K P , Ballard P , et al. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold [J]. J Orthop Res , 2007 , 25(8):1007 - 17.
- [2] Reinhardt K R, Hetsroni I, Marx R G. Graft selection for anterior cruciate ligament reconstruction: a level I systematic review comparing failure rates and functional outcomes [J]. Orthop Clin North Am, 2010, 41(2): 249 – 62.
- [3] Satija N K , Singh V K , Verma Y K , et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine [J]. J Cell Mol Med 2009 ,13(11-12):4385-402.

- [4] Ekdahl M, Wang J H, Ronga M, et al. Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008, 16(10): 935 – 47.
- [5] Sharma P , Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing [J]. Surgeon , 2005 , 3(5): 309 – 16.
- [6] Bi F , Shi Z , Jiang S , et al. Intermittently administered parathyroid hormone [1 – 34] promotes tendon-bone healing in a rat model [J]. Int J Mol Sci , 2014 , 15(10) : 17366 – 79.
- [7] Kuang G M, Yau W P, Lu W W, et al. Local application of strontium in a calcium phosphate cement system accelerates healing of soft tissue tendon grafts in anterior cruciate ligament reconstruction: experiment using a rabbit model[J]. Am J Sports Med , 2014, 42(12): 2996 – 3002.
- [8] Gulotta L V , Kovacevic D , Cordasco F , et al. Evaluation of tumor necrosis factor α blockade on early tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model [J]. Arthroscopy ,2011 ,27(10): 1351 -7.
- [9] Kovacevic D , Gulotta L V , Ying L , et al. rhPDGF-BB promotes early healing in a rat rotator cuff repair model [J]. Clin Orthop

Relat Res 2015 473(5):1644-54.

- [10] Hirzinger C , Tauber M , Korntner S , et al. ACL injuries and stem cell therapy [J]. Arch Orthop Trauma Surg , 2014 , 134(11): 1573 - 8.
- [11] Li Y G , Wei J N , Lu J , et al. Labeling and tracing of bone marrow mesenchymal stem cells for tendon-to-bone tunnel healing [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc , 2011 , 19(12): 2153 -8.
- [12] Toghraie F S , Chenari N , Gholipour M A , et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in rabbit [J]. Knee , 2011, 18(2):71-5.
- [13] Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, et al. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis [J]. J Orthop Res ,2011 ,30(6):943-9.
- [14] Zhao Y , Glesne Y , Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A , 2003 , 100(5): 2426 - 31.
- [15] 韩忠朝. 间充质干细胞基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2012:6-14.

The tendon-to-bone healing of ACL reconstruction in a rabbit model using autograft seeded with PBMSCs gel

Liu Jianeng , Xu Bin , Xu Honggang , et al

(Dept of Sports Injury and Arthroscopic Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract *Objective* This study was conducted to analyze the effect of peripheral blood mesenchymal stem cells (PBMSCs) gel on the early period of tendon-to-bone healing after reconstruction of the anterior cruciate ligament (ACL) using autograft. Methods Thirty-two New Zealand rabbits aged 3 ~ 4 months were randomly divided into two groups (n = 16 per group): experimental and control. After rabbits from the experimental group were mobilized by subcutaneous injection of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) for 6d, the PBMSCs were isolated from rabbit peripheral blood samples by combination of density gradient centrifugation and adhesive culture, morphology of cell proliferation was observed by microscopy and phenotypes of PBMSCs were detected by flow cytometry. A model of ACL reconstruction using autograft was performed in all of the rabbits, the experimental group received injection of PBMSCs gel into the femur tunnel and the control group received gel only. At 2, 4, 8 and 12 weeks, 4 animals in each group were euthanized , 1 for histologic assessment by Masson trichrome staining and 3 for biomechanical testing. **Results** Flow cytometry showed that the PBMSCs expressed CD29, CD90 positive, CD11b, CD34 negative. According to the Masson trichrome staining , in the experimental group , collagen fibers were presented but had a disordered arrangement at 4 weeks after surgery. At 8 weeks after surgery , collagen fibers were obviously increased but irregularly arranged. At 12 weeks after surgery , collagen fibers were formed in abundance and regularly arranged. The healing at tendon-bone interface of the experimental group was quicker than those of the control group. The maximum biomechanical pull-out strength of the autograft in the femur tunnel presented a rising trend with the prolong of repair time in both experimental and control groups, and it was significantly higher in the experimental group at 8 and 12 weeks after surgery (P < 0.01). Conclusion PBMSCs gel could enhance the early period of tendon-to-bone healing after reconstruction of the ACL using autograft.

Key words anterior cruciate ligament; tendon-to-bone healing; peripheral blood mesenchymal stem cells