

## 兔 MSCs 对韧带移植骨道内愈合影响的光镜观察

刘靖 徐斌 徐洪港 王瑞 涂俊

**摘要** 目的 探讨兔自体外周血间充质干细胞(MSCs)对韧带移植在骨道内愈合的影响。方法 8只新西兰白兔随机均分为实验组和对照组。粒细胞刺激因子动员各组兔后,抽取外周血分离、纯化培养干细胞。实验组移植入MSCs和生物蛋白胶混合物;对照组移植入生物蛋白胶。分别于2、4、8、12周4个时间点每组各处死1只兔行形态学观察。术后4个时间点对两组标本进行高倍镜下成纤维细胞计数,采用单向方差分析及SNK法检验,比较韧带重建术后移植肌腱与骨道愈合情况。结果 术后8周实验组移植肌腱与骨道界面连接紧密,出现Sharpey纤维及软骨移行带,术后12周对照组出现Sharpey纤维,但连接组织中胶原排列紊乱。实验组与对照组在4个时间点高倍镜下成纤维细胞计数比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 MSCs能促进韧带重建术后移植肌腱在骨道内愈合。

**关键词** 间充质干细胞;膝关节;韧带;移植;愈合

**中图分类号** R 686

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1076-04

随着国民健身意识不断加强,交叉韧带损伤越来越多见。交叉韧带是膝关节重要的静力稳定结构,损伤后难以自愈且治疗难度较大,如不及时治疗或治疗不当,随之出现膝关节不稳,关节其他韧带松

弛,半月板损伤,关节软骨退变等并发症,导致膝关节退变及骨性关节炎的早期发生<sup>[1-3]</sup>。目前主要手术方式为膝关节镜下自体软组织移植术(腓绳肌、半腱肌、股薄肌等)前交叉韧带重建术。随着微创技术的不断发展,该手术方式日益成熟,但文献<sup>[4]</sup>报道,其失败率仍为0.7%~10.0%,骨道内愈合不良是导致失败的重要原因之一。目前,关于移植肌腱在骨道内愈合的研究愈来愈多,包括物理干扰、生理机械刺激、骨替代材料填充、骨膜移植、生长因子和基因治疗、组织工程技术及干细胞移植等<sup>[5]</sup>。随着组织工程技术的日益成熟,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)促进骨道内愈合的研究尤为突出。

## 1 材料与方法

**1.1 MSCs的分离、培养及鉴定** 粒细胞刺激因子动员后,抽取兔外周血5 ml,采用密度梯度离心法分离细胞接种到5 ml完全培养基中,37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温箱中培养,48~72 h后,首次换液,以后每72 h换液1次,观察细胞形态及生长情况,待细胞呈涡旋状生长并达90%时进行传代培养。取第3代生长旺盛细胞行MSCs表面抗原CD11b、CD34、CD29、CD90检测。

**1.2 动物模型的建立及分组** 8只兔随机均分为实验组和对照组。麻醉消毒铺巾后取出趾长屈肌腱,将肌腱对折,对折后其直径为 $(2.5 \pm 0.3)$  mm,

2014-04-18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH157)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科四病区,合肥 230022

作者简介:刘靖,男,硕士研究生;

徐斌,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: youchen100@126.com

the basic electrophysiological properties of hippocampal CA1 and CA3 neurons. **Methods** The structure properties and basic electrophysiological properties of mouse hippocampal slices were observed and recorded by infrared differential interference contrast technique and patch clamp, respectively. **Results** The hippocampal slice structure was observed clearly with healthy gloss and few dead neurons, and the hippocampal neurons were sealed easily with patch clamp technique. The spontaneous discharge current and action potential between CA1 and CA3 neurons did not show significant differences in amplitude, frequency, inter spike-intervals and resting membrane potentials. The current density of sodium and potassium ion when injecting pulse stimulations and the action potential numbers when injecting step currents showed significant differences in CA1 and CA3 neurons ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Some basic electrophysiological properties of hippocampal CA1 and CA3 neurons provide certain theoretical basis for memory and nerve diseases research.

**Key words** patch clamp; mouse; brain slices; hippocampal neurons; electrophysiology

长度为 $(6.2 \pm 0.3)$  mm,对折肌腱两游离端用无菌1-0缝线缝合,折叠处用0.25 mm钢丝穿过后备用。再从髌旁内侧入路,以髌骨为中心,作长约2.5 cm的切口,依次切开皮肤、筋膜、关节囊及内侧支持带,将髌骨外翻脱位,切除脂肪垫,显露前交叉韧带。切除前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)股骨及胫骨上下止点并作标记,用与肌腱直径相匹配的手摇钻(2.5 mm克氏针)于标记处分别钻取胫骨及股骨隧道,将移植物通过两端的牵引钢丝及缝线引入骨隧道,在股骨隧道终点外侧以1.0 mm克氏针从外向内钻两个间隔0.3 cm单皮质骨道,将钢丝两端穿过骨道后固定于股骨内侧,再用1.0 mm克氏针在胫骨结节稍偏下的皮质骨上钻孔,将缝线穿孔而过后屈膝 $30^\circ$ 拉紧韧带固定。反复冲洗股骨道内残留的血迹,在股骨隧道外口附近,按照分组设计注入胶体(实验组移植入MSCs和生物蛋白胶混合物,对照组移植入生物蛋白胶),逐层缝合切口。屈膝 $30^\circ$ 位石膏固定术肢,术后预防感染。

**1.3 标本处理及组织学观察** 分别于术后2、4、8、12周各组处死1只兔,解剖膝关节并于膝关节上、下各2.0 cm离断完整保留膝关节。标本固定、脱钙后制成石蜡切片,HE染色后行形态学观察。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较ACL重建术后4个时间点高倍镜下腱-骨界面成纤维细胞计数。

## 2 结果

**2.1 MSCs的生物学特性** 原代细胞在开始培养时没有贴壁,散在分布于培养瓶瓶底,细胞呈圆形,没有突起,胞体透亮,折光性好,核呈卵圆形。随着培养时间的延长,细胞慢慢开始贴壁,少部分呈集落生长,细胞有少量突起,胞质内颗粒增多,折光性差,核较大且不清晰,呈扁圆形。培养48~72 h后,贴壁细胞两端伸出伪足,绝大部分呈形态均一的短梭形。首次换液后细胞贴壁及增生速度加快,后可见明显集落形成,细胞克隆样生长,细胞形态均一,呈长梭形,融合排列成漩涡状。待培养11~14 d细胞已基本贴满瓶底就可以传代了,胰酶消化的细胞呈圆形且胞体透亮,折光性好,传代接种后细胞贴壁及克隆样增生更加迅速,形态更加均一,均呈成纤维长梭形外观。

### 2.2 组织标本观察

**2.2.1 膝关节标本大体观察** 每组分别于术后2、4、8、12周处死1只兔,兔膝关节切口愈合良好,无

感染,有明显关节腔积液,滑膜大量增生,软骨无明显损伤。移植肌腱结构完整,色泽较正常肌腱暗淡,呈淡红色,张力可,无松弛,无坏死及断裂。移植肌腱两端与骨隧道愈合良好。2周时股骨隧道外口间隙仍可见少量胶体,4周时股骨隧道外口间隙无胶体,股骨隧道内口可见少量瘢痕组织及骨组织,8周时股骨隧道外口出现少量骨样组织,内口出现大量瘢痕组织,12周时骨道外口可见较多骨样组织,移植肌腱与隧道壁粘连。

**2.2.2 石蜡切片 HE 染色** ① 术后2周:对照组:骨道内界面区连接疏松,间隙清晰可辨,界面区可见由少量血管、成纤维细胞和炎性细胞组成的新生肉芽组织(图1A2);实验组:界面区结合亦不紧密,填充组织仍为血管,成纤维细胞和炎性细胞组成,但出现排列不规整且不成熟的类软骨细胞(图1A1)。② 术后4周:对照组:界面区连接相对较紧密,填充组织血管含量少,成纤维细胞和炎性细胞增多,并出现稀疏不成熟类软骨细胞(图1B2);实验组:界面区连接紧密,已无明显界限,可见炎性细胞和成纤维细胞及排列不规整类软骨细胞,新生骨质向肌腱长入,已出现软骨化骨过程(图1B1)。③ 术后8周:对照组:界面区连接紧密,炎性细胞减少,成纤维细胞增生,胶原纤维合成增多,排列方向不规整(图1C2);实验组:界面区连接紧密,类软骨细胞逐渐成熟,排列较规整,胶原纤维大量合成,出现与骨隧道轴向垂直的Sharpey纤维及软骨移行带(图1C1)。④ 术后12周:对照组:界面区出现Sharpey纤维,但连接组织中胶原排列紊乱(图1D2);实验组:界面区可见大量排列有序的Sharpey纤维及规整排列的类软骨细胞(图1D1)。

**2.3 腱骨界面成纤维细胞计数** 术后4个时间点对两组标本进行腱-骨界面高倍镜下(HE染色)成纤维细胞计数,见表1,每个标本取3个高倍镜视野,每组4个时间点各12个高倍镜视野。方差分析结果显示两组在4个时间点比较差异有统计学意义( $F=30.91, P<0.05$ )。

## 3 讨论

**3.1 界面愈合的止点结构特点及组织学转归** 移植物在关节腔里经历了缺血、坏死、再血管化、细胞增殖和塑形、韧带化等过程。移植物在骨道内愈合分为两种方式,即直接止点和间接止点<sup>[6]</sup>。直接止点类似于正常交叉韧带的过渡形式,其特征性结构是移行的纤维软骨带,从韧带向止点分别是韧带、纤

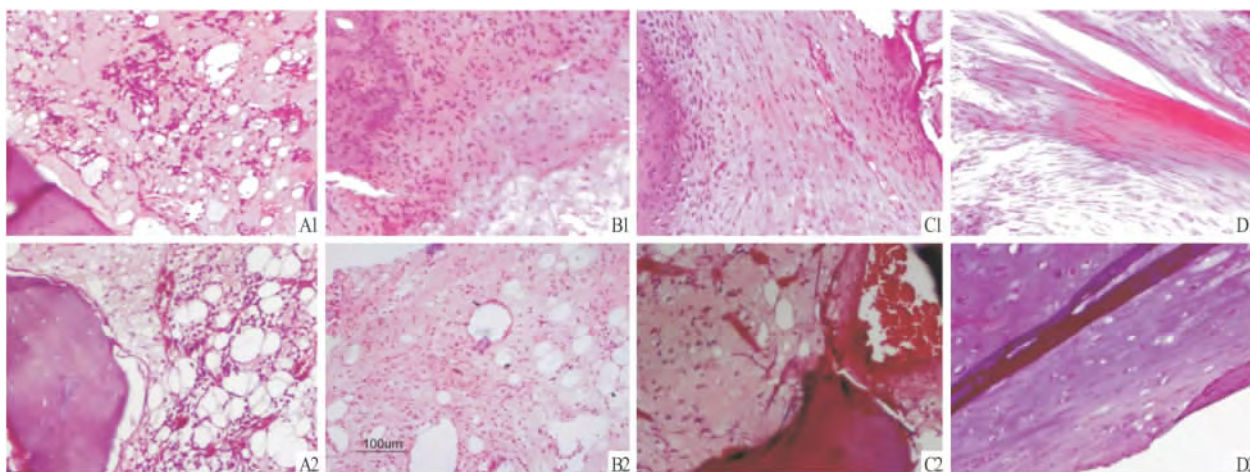


图1 术后4个时间点腱-骨界面区 HE×100  
1:实验组;2:对照组;A:2周;B:4周;C:8周;D:12周

表1 术后两组标本 HE 染色界面区成纤维细胞计数的比较 ( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间			
	2周	4周	8周	12周
实验	$12.58 \pm 1.65^*$	$15.35 \pm 2.12^*$	$18.62 \pm 3.46^*$	$14.68 \pm 2.52^*$
对照	$3.49 \pm 1.56$	$5.65 \pm 1.58$	$7.32 \pm 1.28$	$4.95 \pm 1.68$

与对照组比较: \*  $P < 0.05$

维软骨、钙化软骨及骨,在钙化软骨和纤维软骨之间有“潮线”相隔<sup>[7-8]</sup>。其止点的特有的四层移行结构决定了其传递、缓冲应力、降低负荷,还在移植物的生长塑形中的重要作用<sup>[9-11]</sup>。间接止点其特点为肌腱与骨组织间形成的穿透性的胶原纤维,走向通常与骨隧道轴向垂直,这种胶原纤维为 Sharpey 样纤维,是肌腱与骨形成连接的一个重要标志。理想的韧带重建愈合止点应为直接止点,而交叉韧带重建术后愈合多为间接愈合,但众多学者观点不一。Rodeo et al<sup>[12]</sup>在狗趾长伸肌的上止点移植到胫骨近端的骨隧道研究中,发现愈合界面为间接止点。而 Panni et al<sup>[13]</sup>在兔自体骨-髌腱-骨重建兔 ACL 中发现愈合界面为直接接止点。

**3.2 MSCs 对骨道内移植肌腱愈合的影响** 近年来,国内外学者<sup>[14-15]</sup>发现多种因素可促进界面区愈合。陈鸿辉等<sup>[14]</sup>发现低强度超声及功能性电刺激可使骨、软骨等多种细胞增生,从而促进纤维软骨带重建及新骨形成。Pan et al<sup>[15]</sup>发现带有 BMP 的注射用磷酸钙对兔 ACL 重建后骨道内肌腱移植愈合有促进作用。国外研究者<sup>[16-17]</sup>发现软骨可能增强骨-肌腱结合部移行区的再生。MSCs 因具有强大的增殖能力、多向分化潜能、取材方便、损伤小、便

于外源基因的转染及表达调控等特点使其成为理想的组织工程种子细胞而用于骨道内肌腱移植愈合研究中。Lim et al<sup>[18]</sup>使用腓绳肌自体移植行兔双侧 ACL 重建,实验组 bMCSs 被植入生物蛋白胶,对照组中则为空白纤维蛋白胶,结果显示 bMCSs 改善了愈合过程并促进了生物性能的提高。本实验考虑到 MSCs 是多种间充质细胞的前体细胞,在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞,理论上可以促进骨-肌腱结合部多种细胞的增生,从而促进界面愈合。

## 参考文献

- [1] Prochop D J. Marrow stromal cell as stem cells for nonhematopoietic tissue [J]. Science, 1997, 276 (5309): 71-4.
- [2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284 (5411): 143-7.
- [3] Davis P Y, Frazier C R, Shapiro J R, et al. Age related changes in effects of insulin like growth factor on human osteoblast like cells [J]. Biochem J, 1997, 324 (3): 753-60.
- [4] 王俊良. BMP-2 和 HGF 基因修饰的自体 MSCs 促进腱骨愈合的研究 [D]. 中国人民解放军军医进修学院, 2012.
- [5] 蒋略韬, 李永刚. 关于促进前交叉韧带重建术后腱骨愈合的研究进展 [J]. 现代医学, 2013, 41 (8): 584-9.
- [6] Freedman K B, D'Amato M J, Nedeff D D, et al. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a meta analysis comparing patellar tendon and hamstring tendon autografts [J]. Am J Sports Med, 2003, 31 (1): 2-11.
- [7] Dobson K R, Reading L, Haberey M, et al. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteogenic cells from rat tibiae and

- femur[J]. *Calcif Tissue Int* ,1999 ,65(5) :411 -3.
- [8] Colter D C , Class R , Dicirolaro C M , et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ,97(7) : 3213 -8.
- [9] Bolno P B , Morgan D , Wechsler A. Chemokine induced migration of human mesenchymal stem cells: A strategy for directing cardiac repair[J]. *Cardiothoracic Surgery* ,2004 ,19(3S) :S33.
- [10] Jager M ,Wild A ,Fuss M ,et al. Advantages of biomatrices in chondrogenesis of pluripotent mesenchymal stem cells [J]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2002 ,140(6) :681 -9.
- [11] 李景红 ,杜江 ,黄金中. 软骨组织工程种子细胞来源的最新研究进展[J]. *中国临床康复* 2003 ,7(23) :3240 -1.
- [12] Rodeo S A , Arnoczky S P , Torzilli P A. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog [J]. *J Bone Joint Surg Am* ,1993 ,75(12) :1795 -803.
- [13] Panni A S ,Milano G ,Lucania L ,et al. Graft healing after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits [J]. *Clin Orthop* ,1997 , 343(10) :203 -12.
- [14] 陈鸿辉 ,杨小红 ,王文. 物理疗法促进髌骨 - 髌腱结合部损伤早期恢复的实验研究[J]. *中华物理医学与康复杂志* , 2006 ,28(5) :291 -4.
- [15] Pan W ,Wei Y ,Zhou L ,et al. Comparative *in vivo* study of injectable biomaterials combined with BMP for enhancing tendon graft osteointegration for anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *J Orthop Res* 2011 ,29(7) :1015 -21.
- [16] Wong M W ,Qin L ,Lee K M ,et al. Healing of bone tendon junction in a bone trough: a goat partial patellectomy model [J]. *Clin Orthop Relat Res* 2003 ,8(413) :291 -302.
- [17] Wong M W ,Qin L. Engineered allogeneic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone tendon junction a preliminary histological observation [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004 ,70(2) :362 -7.
- [18] Lim J K ,Hui J ,Li L ,et al. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a babbit model of anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Arthroscopy* ,2004 ,20(9) : 899 -910.

## The morphology of effects of MSCs for healing of the graft of ligament in the bone tunnel

Liu Jing , Xu Bin , Xu Honggang , et al

(Dept of Orthopaedics Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate whether autogenous peripheral blood mesenchymal stem cells gel could promote the healing of the graft of ligament in the bone tunnel. **Methods** 8 New Zealand white rabbits were randomly divided into experimental and control group. After mobilizing with Granulocyte colony-stimulating , autogenous peripheral blood mesenchymal stem cells were isolated and cultured *in vitro*. For the experimental group , autogenous peripheral blood mesenchymal stem cells gel was injected into the femur Road tip clearance of the ACL reconstruction model; for the control group , only fibrin glue was injected into. Respectively , in 2nd week , 4th week , 8th week , 12th week , one rabbit of each group was sacrificed for morphology and the number of fibroblasts was counted at tendon-bone interface with HE staining under high magnification microscope to investigate whether autogenous peripheral blood mesenchymal stem cells gel could promote the healing of tendon-bone interface after ligament reconstruction. **Results** For the experimental group , in 8th week , tendon-bone interface connection was tight , the interfacial region showed a large orderly arrangement of Sharpey fibers and chondrocyte-like cells , for the control group , in 12th week , Sharpey fibers could be found , but the collagen fiber was disorder. The number of fibroblasts was counted at tendon-bone interface , we adopted one-way ANOVA and SNK test to analyze the number of fibroblasts , the difference between experimental and control group was considered significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Autogenous peripheral blood mesenchymal stem cells gel can promote the healing of tendon-bone interface after ligament reconstruction.

**Key words** mesenchymal stem cells ; knee ; ligament ; graft ; healing