

· 实验研究 ·
Experimental Research

骨髓间充质干细胞及其复合物对肌腱 早期愈合影响的实验研究

韩桂全¹, 唐述森¹, 刘晓伟¹, 韩振学², 李志仙²

(1. 山东省潍坊医学院附属医院, 潍坊 261031; 2. 潍坊市中医院, 潍坊 261041)

摘要 [目的] 探讨骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 与纤维蛋白胶复合体对兔肌腱早期愈合的影响, 为临床应用提供依据。[方法] 家兔骨髓间充质干细胞离体培养、纯化、扩增后与纤维蛋白胶混合。36 只家兔分为实验组和对照组, 兔跟腱横断制作肌腱断裂模型。实验组应用自体 BMSCs 复合纤维蛋白胶移植于肌腱损伤区, 对照组仅以纤维蛋白胶置于肌腱损伤区。分别于术后 1 周、3 周、6 周及 12 周对移植部位进行大体标本观察, 细胞示踪、组织学检查、免疫组织化学检查、形态测定分析及生物力学测定。[结果] 实验组相比对照组肌腱大体观察粘连差, 肌腱活动性好。3 周后纤维蛋白载体即降解, 细胞示踪结果显示标记的骨髓间充质干细胞至少 6 周内仍可保持活性并存在于肌腱组织中, 但之后逐渐扩散。3 周时, 实验组与对照组相比胶原纤维排列更为有序, 且胞核形态结构更规则, 但在 6 周及 12 周时, 实验组与对照组细胞核参数测定无统计学意义。3 周时实验组比对照组具有更强的生物力学特性, 但之后则差别不明显。[结论] 肌腱损伤后即给以腱内 BMSCs 复合纤维蛋白胶治疗可促进肌腱愈合早期组织形态学及生物力学修复。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肌腱; 愈合

中图分类号: R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005 - 8478 (2009) 09 - 0703 - 03

Experimental study of rabbit tendon early healing affected by mesenchymal stem cells composite grafts HAN Gui-quan, TANG Shu-sen, LIU Xiao-wei, et al. The Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of rabbit BMSCs with fibrin sealant on accelerating early tendon healing. [Methods] The BMSCs were isolated and amplified. The rabbits were divided into experimental (E) and control (C) groups. The injury model was a sharp complete transection through the midsubstance of the achilles tendon. The experimental group was implanted with composite of BMSCs and fibrin sealant, The control group was operated with only fibrin sealant. Specimens were harvested at 1, 3, 6, and 12 weeks for analysis, which included evaluation of gross morphology, cell tracing, histological assessment, immunohistochemistry studies, morphometric analysis, and mechanical testing. [Results] The gross morphology of the tendons showed the experimental group had lesser adhesion and better reactivity than that in the control group. The fibrin had degraded at 3 weeks. Cell tracing showed that the labeled bone marrow derived mesenchymal stem cells remained viable and presented in the intratendinous region for at least 6 weeks, becoming more diffuse at later timepoints. At 3 weeks, collagen fibers appeared more organized and there were better morphometric nuclear parameters in the treatment group. At 6 and 12 weeks, there were no differences between the groups with regard to morphometric nuclear parameters. Biomechanical testing showed improved modulus in the treatment group as compared with the control group at 3 weeks, but not at subsequent timepoint. [Conclusion] Intratendinous cell therapy with bone marrow derived mesenchymal stem cells following primary tendon repair can improve histological and biomechanical parameters in the early stage of tendon - healing.

Key words: bone mesenchymal stem cells; tendons; healing

肌腱损伤是外科的常见问题之一, 其修复是一个复杂的

作者简介: 韩桂全 (1964 -), 男, 山东潍坊人, 学士, 副主任医师, 研究方向: 骨关节外科、手足外科, (电话) 0536 - 8068907, (电子邮箱) sstangvyfy@126.com

过程, 关键在于损伤后的修复不仅要达到肌腱纤维连续性及强度的修复, 而且要使肌腱与其周围组织的活动性达到良好, 关节功能得以恢复。肌腱损伤术后大多需要外固定, 由于不能早期恢复功能锻炼, 使肌腱愈合面临很大风险, 例如肌腱

粘连及肌腱断裂。本研究应用自体骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 与纤维蛋白胶复合体修复家兔肌腱损伤, 观察其对肌腱早期愈合的影响, 为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象 健康家兔 (潍坊医学院动物中心提供) 36 只, 体重 1.5~2.5 kg, 无感染、瘢痕和皮肤撕裂等情况。

1.2 BMSCs 的培养: 将家兔以 3% 戊巴比妥钠经耳缘静脉常规麻醉, 取 20 ml 注射器经胫骨近端内侧进针, 缓慢抽取骨髓 1~3 ml, 以贴壁法分离、培养 BMSCs, 常规消化传代。

1.3 BMSCs 胞浆标记: 按照厂家说明用 CFDA-SE (荧光胺反应琥珀酰亚胺酯) 示踪细胞。第三代 BMSCs 细胞在 PBS 中清洗, 在 10- μ mol/L CFDA-PBS 溶液中再次悬浮, 然后 37 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min, 于 37 $^{\circ}$ C 下在完全培养基中悬浮 30 min, 确保探针完全修饰。

1.4 实验分组: 将 36 只家兔分为实验组和对照组, 每组 18 只。切开家兔跟腱中部横行切断跟腱, 用改良的 Kessler 法以 5-0 的无损伤尼龙线缝合肌腱。按照厂家说明制备纤维蛋白胶, 与骨髓间充质干细胞混合。实验组应用自体 BMSCs 复合纤维蛋白胶移植于肌腱损伤区, 对照组仅以纤维蛋白胶置于肌腱损伤区。分别于术后 1 周、3 周、6 周及 12 周对移植部位进行大体标本观察、细胞示踪、组织学检查、免疫组织化学检查、形态测定分析及生物力学测定。

1.5 统计处理 对所得的数据采用 SPSS 8.0 统计软件处理, $P < 0.05$ 时为有统计学差异。

2 结果

2.1 MSCs 原代培养 11 d 后细胞大致融合成片, 细胞突起互相连接。

2.2 大体结果

实验组和对照组肌腱没有损伤撕裂。3 周时, 损伤部位的

纤维蛋白胶几乎完全降解, 损伤部位是增生、微透明的; 6 周时, 损伤部位几乎没有纤维蛋白, 损伤部位是增厚的。实验组腱周无明显肉芽组织和膜状粘连, 肌腱滑动好; 对照组腱周有较大面积肉芽组织, 并与腱鞘形成致密的粘连, 肌腱滑动性较差, 与正常肌腱相比, 3 周时治疗组和对照组损伤部位的横断面积都是增加的 ($P < 0.05$), 两组间无明显差别。两组的横断面积在 6 周时减少到正常值, 在 12 周时保持相似的结果。

2.3 BMSCs 的示踪:

荧光标示说明 BMSCs 在损伤部位保持活性长达 6 周。1 周时染色很强, 并且在植入部位浓集。在 3 周和 6 周时, 细胞开始迁移到损伤周围的地方, 但是没有迁移到正常肌腱的近端或远端。

2.4 组织学和免疫组织化学

实验组和对照组的早期阶段 HE 染色显示在损伤部位的中部有纤维化和纤维蛋白的出现。两组的炎症反应是相似的, 以淋巴细胞和巨细胞的聚集为特点, 但没有明显的免疫反应。炎症反应在 6 周时明显减轻, 在 12 周时几乎消失。损伤部位的细胞计数是增加的。3 周时, 损伤部位细胞计数在治疗组有 205% 的增加, 在对照组有 233% 的增加。12 周时, 在治疗组细胞计数下降至 128%, 在对照组其下降至 137% (图 1)。两组中, 在 3 周时损伤部位周围的 I 型胶原纤维染色程度相对于肌腱远端或近端部分要差。然而, 实验组表现出高密度的 I 型胶原结构, 其相对于对照组的胶原结构有更多的结构 (图 2), 并且胶原纤维排列更为整齐。在 6 周和 12 周时, 治疗组和对照组的标本组织上是相似的, 在随后的时间点, 标本有更强的染色和更多结构的胶原纤维。正常出现在腱旁组织中的 III 型胶原在损伤部位出现, 两组中 III 型胶原在损伤部位近端和远端消失。3 周时 III 型胶原染色是明显的, 在 12 周时染色消失。

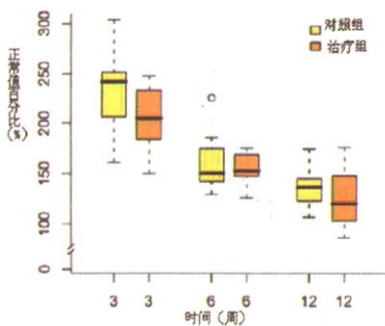


图 1 肌腱损伤部位的细胞数与正常值的百分比

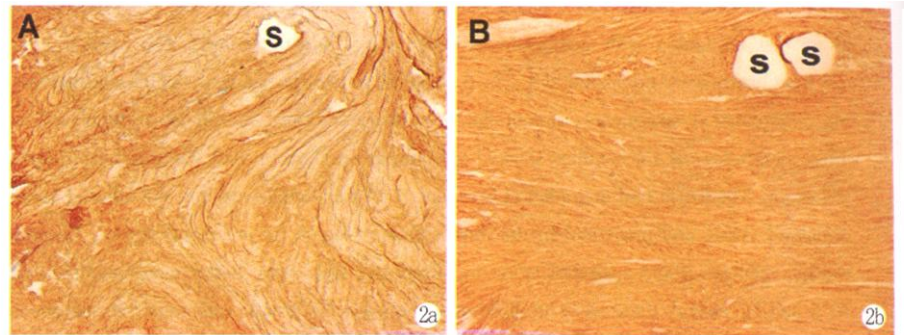


图 2 3 周时免疫组化染色 (S 为缝合线) 图 2a 对照组 图 2b 实验组

2.5 形态学分析

实验组和对照组在 1 周、3 周、6 周和 12 周时细胞核纵横比和细胞定位角有明显的改进, 其改善与肌腱愈合和成熟有关。3 周时, 治疗组细胞核纵横比率小于 0.3 的细胞百分数和细胞核定位角值小于 30 $^{\circ}$ 的细胞百分数比对照组明显升高 (细胞核纵横比率分别为 36.3% 29.1%, 细胞核定位角值分别为 85.2% 3.9%, $P < 0.05$)。6 周时, 两组没有明显的差别。12 周时, 细胞核纵横比率和细胞核定位角值接近正常。

2.6 生物力学测定

实验组和对照组肌腱的结构特性在 1 周、3 周、6 周和 12 周都有改进。3 周时, 治疗组相比对照组高 32% 的模量 (88.9MPa 67.2MPa, $P < 0.05$)。在 6 周和 12 周时, 治疗组和对照组结构特性没有明显的不同。

3 讨论

肌腱损伤的修复是一个复杂的过程, 以往肌腱愈合的理论停留在内源性和外源性两种机制混合存在。Khan 等发现在

损伤后肌腱内膜细胞显示出延迟的细胞反应^[1],提示内源性机制常常延迟,而外源性机制在愈合中占主导。外源性愈合机制的主导地位使滑膜鞘炎症增生反应强烈,细胞外基质,胶原物质在受损伤部位增加过多^[2]。所以现在人们把眼光放在如何加强内源性愈合,而抑制外源性愈合从而达到提高肌腱愈合的效果。既往学者在肌腱组织工程研究中多采用肌腱细胞作为种子细胞^[3],但是自体取材将造成供区功能缺失,异体取材又面临免疫排斥或传播疾病的风险。此外,在体外培养腱细胞(肌腱的主要组织成分)因增殖速度较慢比较耗时,多次传代后细胞基本丧失分泌基质的能力。利用组织工程技术构建肌腱的研究主要是以生物可降解材料为支架,以有分泌功能的细胞为种子,构建出有一定功能的肌腱样组织。

在本研究中笔者采用骨髓间充质干细胞(BMSCs)为种子细胞。BMSCs是多种间充质细胞的前体细胞,有传代繁殖能力强,生物相容性好等优点^[4]。它存在于成熟机体的骨髓基质中,有向特定间质细胞分化的潜能,如:骨、软骨、脂肪、肌腱、肌肉及骨髓基质^[5]。BMSCs的标志性表面抗原CD44经鉴定为阳性。BMSCs取材方便,在体外培养过程中可以短时间内大量增殖,避免了组织配型不合及免疫排斥等问题,使得其在组织工程的应用中独具优势。另有文献报道, BMSCs在体外培养未经诱导即具备分泌I型胶原的能力,与腱细胞的主要功能相同,无论在数量上还是质量上都更符合构建肌腱组织时对种子细胞的要求。李明等发现骨髓间充质干细胞及其复合物可以增强兔桡骨缺损的愈合^[6],国外已有将MSCs应用于构建肌腱组织的研究^[7],但国内目前鲜见报道。

本实验的结果说明移植于肌腱损伤部位的BMSCs对损伤肌腱的早期愈合有重要作用,可以增强肌腱早期愈合,减少粘连。荧光燃料染色显示细胞有活力至少持续6周。在1周、3周和6周的对比研究说明细胞弥漫性扩散。染色剂随细胞分化而传替给子细胞,荧光显示随时间而减少。原位标记的细胞在8周时能够检测到。由于这种原因作者选择这些研究的时间点,在研究中应用相同技术分离的细胞,有活力的同源性BMSCs在兔腓韧带损伤模型中可以存活8周。本研究中治疗组在3周时较好的形态学参数和模量说明BMSCs促进肌腱的愈合率和成熟度。上述结果与另外一些研究的数据一致。这些数据同样显示在肌腱缺损模型中,BMSCs种植的组织基因工程替代物可以改进生物机械特性。

本研究中移植的BMSCs在肌腱治疗方面的确切作用还不清楚。其中的作用是在肌腱治疗的环境下他们可能分化成肌腱细胞,并且通过制造胶原和塑型参与肌腱愈合过程。BMSCs可能在愈合过程中起生长因子起动机作用,而不是仅仅通

过分化起作用。在肌腱内细胞活力的发现(CDFA标记所显示)支持这种可能性。在组织学分析中,作者没有观察到来自BMSCs的明显淋巴细胞免疫反应。有一些明显的证据说明同源的骨髓源性间充质干细胞可以调整宿主免疫反应,最近的间充质干细胞免疫移植的文献说明了这一点。作者研究结果也与上述研究发现是一致的。在3周时免疫组织化学和形态学结果说明肌腱结构特性的改进是由于愈合的加速而不是感染或瘢痕形成的缘故。在3周时肌腱的生物机械特性改进,其临床意义值得重视。这项改进可以通过增加骨髓源性间充质干细胞的数量或添加生长因子来优化,另外与基因治疗一起增加效果。

本实验中作者选择纤维蛋白胶作为细胞载体是因为在临床上它用于神经愈合和血液凝固。骨髓源性间充质干细胞在纤维蛋白胶中可以保持活性,并且有良好的生物相容性,来源广泛,在肌腱愈合过程中可以被吸收,因此作者用纤维蛋白胶作为骨髓源性间充质干细胞的传递工具。实验结果显示纤维蛋白胶的添加并不影响损伤肌腱愈合后强度和组织学特性。通过实验作者希望应用同源性骨髓源性间充质干细胞将会对肌腱手术提供一种“不用保护”的细胞治疗方法。

参考文献:

- [1] Khan U, Occleston NL, Khaw PT, et al. Differences proliferative rate and collagen lattice concentration between endotendons and synovial fibroblasts[J]. *Hand Surg Am*, 1998, 5: 266 - 273.
- [2] Matthews P, Richards H. Factors in the adherence of flexor tendon after repair: an experimental study in the rabbit[J]. *Bone Joint Surg Br*, 1976, 2: 230 - 236.
- [3] Cao Y, Liu Y, Liu W, et al. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2002, 110: 1280 - 1289.
- [4] 徐钢,陈鸿辉,杨小红,等.骨髓间充质干细胞促进骨-肌腱结合部愈合的初步观察[J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16: 1249 - 1250.
- [5] Ringe J, Kaps C, Bumester GR, et al. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs[J]. *Naturwissenschaften*, 2002, 89: 338 - 351.
- [6] 李明,曹豫江,张德文,等.骨髓间充质干细胞及其复合物修复兔桡骨缺损的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 24: 1896 - 1899.
- [7] Young RG, Butler DL, Weber W, et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repairs[J]. *Orthop Res*, 1998, 16: 406 - 413.

(收稿:2008-12-30 修回:2009-02-16)