

· 实验研究 ·



骨髓间充质干细胞促进骨 - 肌腱结合部愈合的初步观察

董 飞, 陈鸿辉, 杨小红, 王 文, 沈 雁, 梁佩红, 谭见容, 梁伟国

(暨南大学医学院第四附属医院 广州市创伤外科研究所, 广州 510220)

摘 要: [目的] 观察骨髓间充质干细胞对骨 - 肌腱结合部愈合的影响。[方法] 采用骨髓穿刺、全骨髓培养法获取兔骨髓间充质干细胞。36 只 18 周龄新西兰大白兔随机分为 2 组, 实验组将骨髓间充质干细胞与 Pluronic F - 127 载体材料结合后, 植入兔髌骨部分切除模型, 对照组只进行手术, 不植入细胞。在术后 6、12、18 周进行 X 线片、大体和组织学观察评估。[结果] X 线片显示术后 6、12、18 周实验组骨 - 肌腱结合部新生骨面积显著大于对照组 ($P < 0.01$)。大体观察可见实验组骨 - 肌腱结合部愈合较早。HE 染色显示实验组术后 6 周有大量的纤维母细胞和类软骨细胞增生, 并可见新骨形成; 12 周, 髌腱与松质骨接触面软骨细胞移行带形成; 18 周, 纤维软骨移行带排列更有序。Safranin O 染色显示实验组术后 6 周, 基质染色较深, 部分骨 - 肌腱结合处可见相对浓染区; 12 周, 基质染色范围明显减少, 沿类软骨细胞走行分布; 18 周, 类软骨细胞集中的区域染色较 12 周有所减退。组织学检查显示实验组术后 6、12、18 周骨 - 肌腱结合部组织愈合明显, 较对照组迅速。[结论] 骨髓间充质干细胞可以促进骨 - 肌腱结合部细胞增生, 促进其早期愈合。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 骨 - 肌腱结合部; 愈合

中图分类号: R687

文献标志码: A

文章编号: 1005 - 8478 (2007) 16 - 1249 - 04

Primary observation on bone mesenchymal stem cells accelerating bone-tendon junction healing DONG Fei, CHEN Hong-hui, YANG Xiao-hong, et al Guangzhou Research Institute of Traumatic Surgery, The 4th Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510220, China

Abstract: [Objective] To evaluate the effects of Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) on healing of bone-tendon junction in a patellar tendon complex. [Method] The BMSCs of rabbits were harvested by bone marrow aspiration. Adherent cells were selected as BMSCs after the whole marrow was cultured. Standard partial patellectomy was conducted in 36 18-week-old rabbits divided into 2 groups. The experimental group was planted into by the composite of BMSCs and Pluronic F-127 while the control group was only operated without BMSCs planting into. The patellar-patellar tendon complexes were harvested at weeks 6, 12, 18 postoperatively for radiographic, gross and histological evaluations. [Result] Radiographic measurements showed significantly more newly formed bone at the patellar tendon-patellar healing junction in the experimental group compared with that of the controls at weeks 6, 12, 18 ($P < 0.01$). The gross observations showed the tissue healing in the experimental group was quicker than that of the controls. Histologically, HE-stained specimen showed in the experimental group considerable fibroblast and chondrocyte-like cellular proliferation, new bones formed at week 6; chondrocytes transitional zone was formed at trabecular bone-patellar tendon junction at week 12; array of fibrocartilage transitional zone was ordered at week 18. Safranin O-stained specimen showed in the experimental group matrix was stained red at newly formed bone to patellar tendon junction, partially thick at week 6; matrix stains reduced and distributed along chondrocyte-like cells at week 12, stains in the realm of chondrocyte-like cells concentration was reduced than before at week 18. Histological observations showed more improved tissue integration in the experimental group at weeks 6, 12, 18. [Conclusion] BMSCs could accelerate early healing of bone-tendon junction.

基金项目: 国际骨折内固定研究会 AO 基金资助项目 (NO. AO / ASIF03 - Q26)

广州市医药卫生科技重点项目 (NO. 2005 - YB053) (NO. 2006 - ZDi - 03)

作者简介: 董 飞 (1980 -), 男, 山西永济人, 在读医学硕士, 医师, 研究方向: 骨与关节损伤, (电话) 020 - 34403731, (电子信箱) dongfei020@yahoo.com.cn

tion was reduced than before at week 18. Histological observations showed more improved tissue integration in the experimental group at weeks 6, 12, 18. [Conclusion] BMSCs could accelerate early healing of bone-tendon junction.

Key words: bone mesenchymal stem cells; bone-tendon junction; healing

多种原因导致的肌腱止点的损伤,如肩袖损伤、网球肘、部分撕脱型跟腱断裂等发病率逐年增高。骨-肌腱结合部愈合过程比较复杂,该部位的特征性结构纤维软骨带的再生十分缓慢和困难^[1]。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是多种间充质细胞的前体细胞,有多向分化潜能,传代繁殖能力强,生物相容性好等优点。本研究将骨髓间充质干细胞移植入兔髌骨部分切除模型中^[2],通过 X 线片、大体和组织学研究,观察其在骨-肌腱结合部修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 兔 BMSCs 体外分离,培养与扩增

8 周龄新西兰大白兔,无菌条件下抽取股骨干骺端骨髓 3 ml, 100 目钢网过滤, 1 200 r/min 离心 10 min, 采用全骨髓培养法以 (6~8) × 10⁴/cm² 置于 75 ml 培养瓶培养, 每瓶含 10 ml 培养液 (含青、链霉素各 100 U/ml, 体积分数为 20% 胎牛血清, MEM), 37℃、5% CO₂ 孵箱中原代培养。4 d 后半量换液, 以后每 48~72 h 全量换液。当细胞融合达 80% 时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 5 × 10⁴/cm² 接种到培养瓶传代, 收集第 3 代细胞供移植用。

1.2 BMSCs 移植修复骨-肌腱结合部 (bone-tendon junction, BTJ) 损伤

1.2.1 实验动物及分组 36 只 18 周龄新西兰大白兔, 体重 2.2~2.5 kg, 随机分为实验组 (BMSCs + 载体 Pluronic F-127) 和对照组 (只手术, 不植入 BMSCs 和载体), 分 6、12、18 周 3 个时间点, 每个时间点 6 只。

1.2.2 兔髌骨部分切除手术^[2] 麻醉下左下肢膝外侧入路, 于髌骨远端 1/3 横行截骨, 去除远端 1/3 髌骨, 垂直近侧剩余髌骨钻 2 个 0.8 mm 的孔。髌韧带用不可吸收缝线缝合于近端髌骨上, 实验组将 BMSCs + 载体复合物植入髌骨与髌腱之间, 8 字钢丝保护, 膝关节石膏固定于屈膝 90 位。6 周后拆除石膏, 笼内自由活动。在术后 6、12、18 周取材, 分别作大体解剖检查, X 线片分析及组织学观察。

1.3 X 线片观察

在标本 X 线正位片中找出手术截骨线, 观察从近端残余髌骨长出的新骨, 由同一个检测者用 Image J 图像分析软件分析测量, 得出新骨面积定量数值。

1.4 资料的处理和分析方法

X 线片用 SPSS11.5 统计软件处理, 双因素方差分析, 对实验组、对照组的差异性进行统计学分析, P < 0.05 (双尾) 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 培养情况

原代培养第 6 d 首次全量换液后, 倒置显微镜下观察可见培养瓶中有许多增殖中的细胞克隆形成, 克隆大小不一, 最大可占据整个 100 倍视野, 克隆中心向周围有放射状生长的贴壁细胞, 形态多呈多角性、短梭形。随着换液, 非贴壁细胞逐渐被弃掉。8~10 d 后, 各个集落之间基本融合达

80%, 予以传代, 传代细胞呈长梭形, 细胞生长密集时, 其形态通常呈均匀一致的成纤维细胞样。

2.2 X 线片

X 线片经 Image J 软件处理, 结果显示实验组 6、12、18 周的新生骨面积均明显增大 (图 1), 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 不同时间点各组内相比, 差异也有统计学意义 (表 1)。

表 1 X 线片髌骨新生骨面积 (mm²)

分组	术后时间		
	6 周 (mm ²)	12 周 (mm ²)	18 周 (mm ²)
实验组	3.50 ± 0.09*#	6.10 ± 0.45*#	8.71 ± 0.54*#
对照组	1.96 ± 0.19#	3.73 ± 0.38#	5.64 ± 0.33#

注: * P < 0.01, 同一时间点实验组与对照组比较 # P < 0.01, 不同时间点之间各组内比较

2.3 大体观察

实验组: 术后 6 周, 髌腱及髌骨背面见大量纤维组织增生, 关节面光滑, 截骨面可辨认, 骨与腱接触面开始融合。12 周, 骨与腱部分区域已融合, 截骨面不甚清晰。18 周, 骨与腱已融合, 截骨面分辨不清。对照组: 术后 6 周, 髌腱及髌骨背面纤维组织增生明显, 截骨面清晰。12 周, 截骨面清晰, 骨与腱有融合趋势。18 周, 骨与腱大部分融合, 截骨面隐约可见。

2.4 组织学检查

2.4.1 HE 染色 实验组: 6 周, 大量纤维母细胞和类软骨细胞增生, 部分类软骨细胞排列成条带状, 大部分细胞排列紊乱, 可见新骨形成, 并向髌腱内长入, 隐约可见截骨界面 (图 2a)。12 周, 髌腱与松质骨接触面软骨细胞移行带形成, 可见新生骨形成, 截骨界面不明显, 细胞排列较前有规律 (图 2b)。18 周, 截骨面已消失, 可见大量活跃新生松质骨, 软骨移行带排列更加有序, 胶原纤维及细胞排列较前有规律 (图 2c)。

对照组: 6 周, 纤维母细胞增生, 截骨面清晰, 无新骨形成 (图 2d)。12 周, 仍有纤维母细胞增生, 截骨界面模糊, 可见多量类软骨细胞和新生松质骨增生, 排列较有规律 (图 2e)。18 周, 可见软骨带和新生骨形成, 类软骨细胞含量较多, 胶原纤维排列较前有规律, 截骨面不明显 (图 2f)。

2.4.2 Safranin O 染色 实验组: 6 周, 基质染色较深, 新生骨与肌腱交界处的基质着红色, 部分骨-腱结合处可见相对浓染区 (图 3a)。12 周, 基质染色范围明显减少, 集中在部分骨-腱结合区的类软骨细胞聚集处, 沿类软骨细胞走行分布, 染色较浅。18 周, 骨-肌腱结合部类软骨细胞集中的区域被染成粉红色, 较 12 周有所减退 (图 3b)。

对照组: 6 周, 基质染色较深, 在骨-肌腱结合部有少量灶性分布染成红色的区域。12 周, 基质染色减少, 可见骨-肌腱界面处有相对集中的基质红染区域, 分布排列紊乱。18 周, 仍可见明显的基质红染, 范围和程度有所增强 (图 3c)。

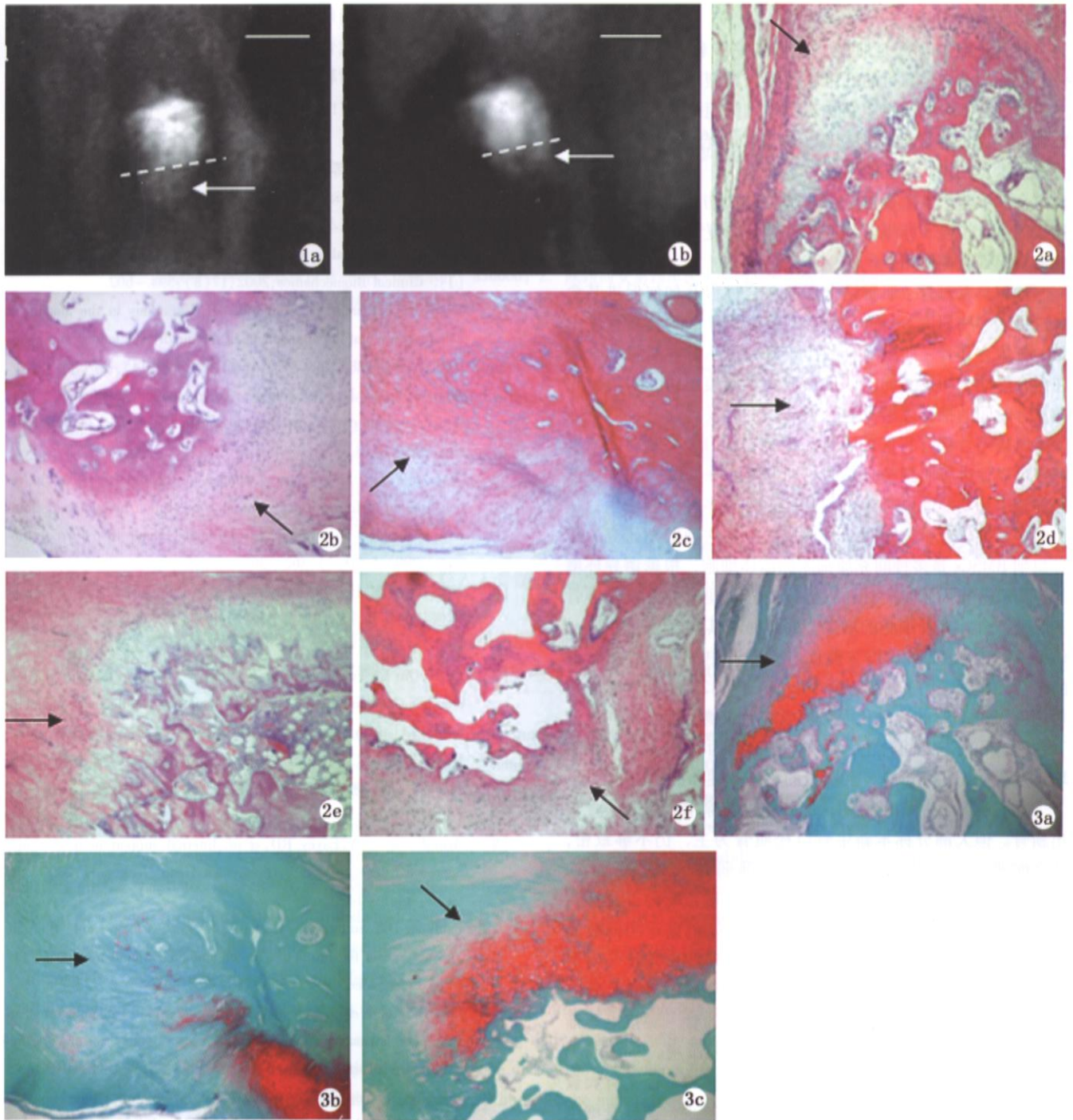


图 1 术后 18 周髌骨前后位 X 线片, 显示术后骨 - 肌腱接点愈合界面新生骨生成 (箭头所指处为密度较低的新生骨, 虚线为最初截骨处, 右上角直线为标尺 = 7 mm) 1a. 实验组 1b. 对照组 图 2 髌骨 - 髌腱复合体 HE 染色 100 × 2a. 实验组 6 周, 大量的纤维母细胞和类软骨细胞增生 (箭头所示) 2b. 实验组 12 周, 髌腱与松质骨接触面软骨细胞移行带形成 (箭头所示) 2c. 实验组 18 周, 软骨移行带排列更加有序 (箭头所示) 2d. 对照组 6 周, 截骨面清晰, 无新骨形成 (箭头所示) 2e. 对照组 12 周, 多量类软骨细胞和新生松质骨增生 (箭头所示) 2f. 对照组 18 周, 软骨带和新生骨形成, 类软骨细胞含量较多 (箭头所示) 图 3 髌骨 - 髌腱复合体 Safranin O 染色 (100 ×) 3a. 实验组 6 周, 基质染色较深, 新生骨与肌腱交界处的基质着红色 (箭头所示) 3b. 实验组 18 周, 基质染色较前减少 (箭头所示) 3c. 对照组 18 周, 仍可见明显基质红染 (箭头所示)。

3 讨论

骨-肌腱结合部是肌腱、韧带或关节囊与骨接触的部位。特征性结构是移行的纤维软骨带。典型的纤维软骨性骨-肌腱结合部有四层组织结构：纤维结缔组织、非钙化的纤维软骨、钙化的纤维软骨和骨。该部位愈合过程比较复杂，手术技术、方式，局部的生物力学环境^[3]，外固定时间等都对愈合和重塑产生重要影响。该部位的损伤，如跟腱或肩袖撕裂等愈合较慢。纤维软骨带的重建与修复对骨-肌腱结合部的愈合起到关键作用。

近年学者对骨-肌腱结合部的愈合过程及如何促进其愈合进行了一些研究。Leung等^[2]关于兔髌骨-髌腱复合体中骨-骨愈合和骨-肌腱愈合的比较研究显示骨-肌腱结合部在愈合界面之间及其周围区域形成大量瘢痕组织，瘢痕组织随愈合时间的推移逐渐重建。Wong等^[4,5]发现软骨可能增强骨-肌腱结合部移行区的再生。徐钢、Lu等^[6,7]发现低强度超声可以促进骨肌腱结合部的早期修复。陈鸿辉等^[8]证实低强度超声和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和新骨形成。根据这项前期研究，作者想到 BMSCs 是多种间充质细胞的前体细胞，根据诱导环境的不同可分化为软骨、骨、肌腱等细胞，理论上可以促进骨-肌腱结合部多种细胞的增生，从而促进其愈合。近年 Lim、Hong等^[11,12]也发现 BMSCs 能促进骨隧道中骨-肌腱结合部的愈合。作者选用的细胞载体 Pluronic F-127 是由 70% 的聚氧化乙烯和 30% 的聚氧化丙烯构成的共聚物，能在不同温度下在固态和液态之间转化，平均降解时间为 4~8 周，对细胞增殖及活力无明显影响，无明显的免疫原性和抗原性^[9,10]。

本实验 X 线片结果说明，部分髌骨切除术后残余髌骨长出新骨。但大部分标本新生骨以松质骨为主，仍不够致密，残余髌骨和新生骨之间会成为比较薄弱的区域，正如 Lu 等^[7]发现在髌骨髌腱复合体拉力实验中，被拉断的部位往往是截骨处，而不是新骨和髌腱界面。HE 染色显示相同时间点比较，实验组的新生骨质量及软骨带成熟程度均优于对照组。这提示随着愈合时间的延长，在新骨和肌腱接点处重新生成了相对致密的过渡性纤维软骨带，新的骨-肌腱接点逐渐形成，BMSCs 对骨-肌腱愈合有明显的促进作用。Safranin O 染色显示 6 周实验组骨腱接点有较多糖氨多糖，证实有大量类软骨细胞形成；12 周基质分泌糖氨多糖减少，类软骨细胞开始向成熟软骨细胞移行带转化；18 周类软骨细胞更多地转变为成熟软骨细胞，软骨带形成较对照组快。作者的研究结果表明 BMSCs 能够促进骨-肌腱结合部细胞增生，增加细胞基质合成，促进新生骨和纤维软骨移行带形成。

综上所述，通过对兔部分髌骨切除模型的研究表明，骨

-肌腱结合部随时间延长而逐渐恢复，骨髓间充质干细胞可以促进该部位早期愈合。

致谢：本院放射科李国耀、陈松主管技师协助本研究的 X 光拍摄，特此致谢！

参考文献：

- [1] 薛海滨, 敖英芳, 等. 应用半腱肌腱重建前交叉韧带末端形成的特点 [J]. 中国运动医学, 2002, 21 (2): 127 - 130.
- [2] Kwok SL, Ling Q. A comparative study of bone to bone repair and bone to tendon healing in patella-patellar tendon complex in rabbits [J]. Clinical Biomechanics, 2002, 17 (8): 594 - 602.
- [3] Evans EJ, Benjamin M, Pemberton DJ. Variations in the amount of calcified tissue at the attachments of the quadriceps tendon and patellar ligament in the man [J]. J Anat, 1991, 174: 145 - 151.
- [4] Wong MW, Qin L, et al. Healing of bone-tendon junction in a bone trough: a goat partial patellectomy model [J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, (413): 291 - 302.
- [5] Wong MW, 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, 5; 70 (2): 362 - 367.
- [6] 徐钢, 陈鸿辉, 杨小红, 等. 低强度超声促进兔骨-肌腱结合部早期恢复的初步观察 [J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13 (10): 767 - 769.
- [7] Lu H, Qin L, Fok P, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone-tendon junction healing: a partial patellectomy model in rabbits [J]. Am J Sports Med, 2006, 34 (8): 1287 - 1296.
- [8] 陈鸿辉, 杨小红, 王文, 等. 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 - 294.
- [9] Arevalo-Silva CA, Eavey RD, et al. Internal support of tissue engineered cartilage [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 126 (12): 1448 - 1452.
- [10] Faulkner DM, Sutton ST, Hesford JD, et al. A new stable Pluronic F68 gel carrier for antibiotics in contaminated wound treatment [J]. Am J Emerg Med, 1997, 15 (3): 20 - 25.
- [11] Lim JK, Hui J, et al. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Arthroscopy, 2004, 20 (9): 899 - 910.
- [12] Hong WO, James CHG, Eng HL. Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model [J]. Am J Sports Med, 2004, 32 (2): 321 - 327.

(收稿：2007-01-17 修回：2007-03-16)