

· 基础研究 ·

## 骨髓单个核细胞促进腱骨愈合的生物力学测试

李 宁, 张义龙<sup>△</sup>, 李淑英, 李志怀

(承德医学院附属医院骨外一科, 河北承德 067000)

**摘要:**目的 采用自体骨髓单个核细胞植于前交叉韧带重建术中的腱-骨界面, 观察其增强腱-骨愈合强度的能力。方法 24 只新西兰大白兔行双侧膝关节半腱肌肌腱前交叉韧带重建术, 随机选取一侧膝关节作为实验侧, 胫骨侧腱-骨界面植入自体骨髓单个核细胞, 对侧不植入骨髓单个核细胞作为对照侧。于术后 2、4、8、12 周取材, 测试移植肌腱的腱-骨界面抗拉伸强度, 记录拉脱或断裂负荷及重建韧带的断裂部位。结果 在术后 2、4、8 周, 重建韧带断裂部位均发生在胫骨骨道内。术后 12 周, 对照侧有 1 例自肌腱部分断裂, 5 例从胫骨骨道拔出; 实验侧有 3 例自肌腱部分断裂, 3 例从胫骨骨道拔出。术后 2 周, 实验侧与对照侧相比, 两侧断裂负荷数值比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 在术后 4、8、12 周, 两侧断裂负荷数值比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 自体骨髓单个核细胞可以增强腱骨界面的抗拉伸强度, 有利于腱-骨界的组织愈合。

**关键词:**骨髓移植; 交叉韧带; 膝关节; 腱骨愈合

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)05-0463-03

## Biomechanical testing on tendon bone healing promoted by bone marrow mononuclearcell

Li Ning, Zhang Yilong<sup>△</sup>, Li Shuying, Li Zhihui

(First Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of autologous bone marrow mononuclearcells, which were transplanted in the tendon bone interface in reconstruction of anterior cruciate ligament, on enhancing the healing potential. **Methods** Bilateral anterior cruciate ligaments of 24 New Zealand rabbits were removed and reconstructed with autogeneic tendons of semitendinosus muscles. The autologous bone marrow mononuclearcells were injected into the bone tunnel of one side of each animal randomly as the experimental group. The other side was not injected as control. Specimens were collected at 2, 4, 8, 12 weeks after surgery respectively for biomechanical test. The maximal pull-out loads and sites of break were recorded. **Results** The sites of break were all in the bone tunnels of bilateral tibia in postoperative 2, 4, 8 weeks. There were 3 cases of break in tendons and 3 cases of break in bone tunnels in the experimental group, and there were 1 case of break in tendon and 5 cases of break in bone tunnels in the control group. The difference of the pull-out loads between the two groups had statistical significance ( $P < 0.05$ ) in postoperative 4, 8, 12 weeks, while there was no statistical significance of pull-out loads between the two groups in postoperative 2 weeks. **Conclusion** Autologous bone marrow mononuclearcells can enhance the tensile strength of interface of tendon and bone and benefit tendon-bone healing.

**Key words:** bone marrow transplantation; cruciate ligament; knee joint; tendon-bone healing

前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 损伤后常导致严重的膝关节不稳, 从而引起继发的半月板和关节软骨的损伤, 为恢复膝关节的正常结构和功能, 常需要手术行 ACL 重建术。在移植物的选择方面, 腓绳肌腱近年来应用较多, 主要是因为四股腓绳肌腱强度较高, 取材部位创伤小, 术后恢复快<sup>[1]</sup>。但是, 移植肌腱在骨道中的愈合属于腱-骨愈合, 相对于骨-骨界面愈合, 其愈合时间较长<sup>[2]</sup>, 限制了患者早期的康复练习。如何促进腱-骨愈合成为近年来学者们关注的一个焦点。本实验的目的是通过在骨道中注入自体骨髓单个核细胞, 以促进腱-骨界面愈合。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物及分组** 24 只新西兰大白兔 (由承德医学院实验动物中心提供), 体质量 2.0~2.5 kg, 平均 2.26 kg。实验前检测双侧膝关节未见畸形, 前后抽屉试验及侧方应力试验均阴性。双侧膝关节均接受手术, 随机选取一侧膝关节作为实验侧, 对侧作为对照侧。

**1.1.2 医用耳脑胶** 医用耳脑胶为广州白云医用胶有限公司生产, 固化时间小于 15 s, 聚合热低, 局部刺激小, 体表应用固

化膜脱落为 7~10 d, 体内约 4 周可降解为水溶性物随代谢排出体外。

## 1.2 方 法

**1.2.1 自体骨髓单个核细胞的获得** 经耳缘静脉注射 3% 的戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg) 将动物麻醉, 双侧髌骨部消毒, 用含有 0.5 mL 肝素的 10 mL 注射器, 从双侧髌骨快速抽取骨髓各 5 mL, 放入无菌离心管, 1 500 r/min 离心 15 min, 取中间细胞层移入另一管内, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 后再次 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 保留沉淀部分, 再加入 0.5 mL PBS 液吹打成单核细胞悬液, 备用。

**1.2.2 实验动物模型的建立** 在麻醉状态下, 双膝术区备皮、消毒, 取髌腱内侧纵行切口, 于胫骨结节内后、大腿内侧, 分离出半腱肌腱, 保留远端止点完整, 自腱和肌腹交界处近端切断, 肌腱断端用 4-0 的肌腱编织线编织作为牵引线; 于半腱肌腱远端止点处凿取 5.0 mm×3.5 mm×3.5 mm 大小骨块连同半腱肌腱共同切下做成肌腱-骨块复合体备用。沿髌腱内侧切开至关节腔, 外推髌骨致脱位, 切断翼状皱襞, 于上、下止点处完整切除 ACL, 查前抽屉试验及 Lachman 试验为阳性, 然后用 2 mm 钻头自胫骨结节内上骨面向原前交叉韧带下止点钻取骨

道,通过该骨道再向上、外、后至髁间窝外侧壁后部,近 ACL 止点处钻取骨道,钻通至股骨外髁外侧骨面,然后改用 3.5 mm 钻头于股骨骨道外侧由外向内扩大股骨骨道深达 5 mm,使股骨骨道呈瓶颈样,适应半腱肌腱一端骨块嵌入。用直针引导牵引线,将一端带骨块的半腱肌腱肌腱侧自股骨骨道外口导入关节腔,从胫骨骨道拉出,拉紧时骨块嵌入股骨骨道外侧端,于屈膝 30°位拉紧,经胫骨骨桥,悬吊固定。查前抽屉试验及 Lachman 试验阴性后,庆大霉素盐水冲洗创口。实验侧先将胫骨侧骨道内口涂薄层耳脑胶封闭内口,将准备好的骨髓单个核细胞悬液用注射器针头通过胫骨骨道外口注入胫骨骨道,边注边退,完毕后用耳脑胶封闭外口。对照侧不予注射细胞,而仅于胫骨骨道内外口封闭薄层耳脑胶。创口逐层间断缝合,患肢不予以固定,伤口常规换药,肌注青霉素 3 d 预防感染。术后笼养,自由活动。

**1.2.3 生物力学检测** 于术后 2、4、8、12 周分别将 6 只实验动物处死取材,将膝关节 ACL 外周围软组织去除,股骨和胫骨各保留 3 cm 长,股骨与胫骨端分别固定于生物力学试验机(MTS 858 Mini Bionix)上,使拉力经过韧带的轴线。测试前将胫骨端移植肌腱骨道外的软组织及缝线结均去除,以期使胫骨端腱-骨界面成为拉力测试对象,行最大拉脱负荷实验,测试移植肌腱的腱-骨界面抗拉伸强度,按 5 mm/min 速度加载负荷,记录拉脱或断裂负荷及重建韧带的断裂部位。因各测试对象的移植肌腱的长度、骨道直径和长度接近,各组样本的最大载荷未用隧道长度来标准化,直接取其绝对值作比较。

**1.3 统计学处理** 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,断裂载荷比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大体观察结果** 24 只实验动物均未出现术后感染,处理标本时见膝关节重建的 ACL 连续性完整,其中 4 只实验侧膝关节内见轻微的滑膜炎和关节腔少量积液,关节腔内未见异位骨化,未见纤维组织过度形成及关节僵直。

表 1 重建韧带断裂部位(n)

时间(周)	实验侧			对照侧		
	胫骨骨道	肌腱	股骨骨道	胫骨骨道	肌腱	股骨骨道
2	6	0	0	6	0	0
4	6	0	0	6	0	0
8	6	0	0	6	0	0
12	3	3	0	5	1	0

表 2 最大抗拉脱(断)强度( $\bar{x} \pm s, N$ )

时间(周)	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
2	11.78 ± 2.32	11.44 ± 2.08	0.272	> 0.05
4	21.97 ± 3.08	16.29 ± 2.03	3.769	< 0.05
8	29.97 ± 2.69	21.62 ± 2.02	6.076	< 0.05
12	34.82 ± 2.55	31.39 ± 2.51	2.347	< 0.05

**2.2 生物力学检测结果** 为了更有效地观察腱-骨界面的效果,本实验股骨侧采用骨块镶嵌式固定,旨在使股骨侧达到更大的固定强度,在拉伸试验中,主要观测胫骨侧腱-骨界面的抗拉伸强度。在术后 2、4、8 周,重建韧带断裂均发生在胫骨骨道

内,即韧带由骨道内拔出。术后 12 周,对照侧有 1 例自肌腱部分断裂,5 例从胫骨骨道拔出;实验侧有 3 例自肌腱部分断裂,3 例从胫骨骨道拔出。所有实验动物均未见骨块完全从股骨骨道拔出(表 1)。随着时间的推移,实验侧和对照侧的抗拉断强度均有增加;术后 2 周,两组数值差异无统计学意义;在术后 4、8、12 周抗拉断强度的测试结果中,实验侧抗拉断强度与对照侧相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),即实验侧抗拉断强度大于对照侧,见表 2。

## 3 讨论

目前,ACL 重建的方法很多,由于腓绳肌肌腱取材方便、创伤小、强度可靠、取材后对供区功能影响小,故临床应用较多。然而,这需要移植物的肌腱组织与骨道的骨组织形成腱-骨愈合,这是一个纤维组织形成连接,新骨形成,骨向肌腱内长入,局部纤维不断重建的复杂过程<sup>[3-5]</sup>。在术后早期,腱-骨界面成为愈合过程中最薄弱的环节,尤其是腱骨组织处于关节腔内的内环境中。因此,许多学者认为针对此种术式的术后康复治疗时间需要“延长至术后 8 周”。移植骨与骨道形成牢固的固定连接可以有利于早期积极地进行功能康复练习<sup>[6]</sup>,促进膝关节功能的康复,所以肌腱移植骨在骨道中形成有效的愈合对于 ACL 的成功重建是非常必要的。

骨髓中富含基质干细胞、骨祖细胞和骨内膜细胞等,骨髓成骨特性近年来的研究主要集中在骨髓基质干细胞的作用上。Lim 等<sup>[7]</sup>在兔身上用含骨髓基质干细胞的纤维蛋白胶涂抹在自身腓绳肌腱上重建 ACL,对照侧与实验侧的生物力学测试在术后 2 周与 4 周比较差异无统计学意义;第 8 周时实验侧的最大拔出负荷和刚度明显高于对照侧,提示骨髓基质干细胞能促进腱-骨结合部位的愈合。骨髓中的有核细胞为每毫升  $32 \times 10^6$  个,每 18 000 个有核细胞中仅有 1 个骨髓基质干细胞,即每毫升骨髓中有约 2 000 个骨髓基质干细胞<sup>[8]</sup>。虽浓度很低,但 Karaoglu 等<sup>[9]</sup>的研究显示,新鲜骨髓组织同样有促进腱骨愈合的作用,提示骨髓的成骨特性可能基于骨髓内诸多成分的相互作用。为加强重建术后骨道内骨髓基质干细胞浓度,本实验应用密度梯度离心提取技术,将骨髓单个核细胞提取后直接注于腱骨界面,操作简洁,避免了细胞培养过程有可能带来的污染、细胞活性差等问题。采用耳脑胶对骨道口进行封闭,耳脑胶的固化时间小于 15 s,聚合热低,局部刺激小,在体内约 4 周可降解为水溶性物而进入体内代谢排出,以往常用于脑脊液漏的修补。应用耳脑胶封闭骨髓道口后,隔断了关节腔与骨道内的联系,理论上一定时间段内避免了关节液对骨髓道内基质干细胞的稀释及基质干细胞向关节腔流失。

有效的腱骨愈合还需要避免受关节腔内滑液中抑制因素作用的影响。Berg 等<sup>[10]</sup>在兔子的膝关节做平行于 ACL 的股骨和胫骨髓道,观察髓道在关节内环境下愈合的情况,显示骨髓道在远离关节腔的部分明显比靠近关节腔的部分愈合要好,越靠近关节腔,愈合的时间越长。运用肌腱移植骨进行 ACL 重建时,腱-骨愈合同样处于关节腔内的条件之下。Demirag 等<sup>[11]</sup>用  $\alpha_2$ -巨球蛋白阻断关节滑液内基质金属蛋白酶的效应,促进腱-骨界面的愈合,证实关节液中基质金属蛋白酶对腱骨愈合存在不利影响。鉴于此,实验中采用了耳脑胶对骨道口进行封闭,利用其固化时间短、局部刺激小、在体内可降解时间长等特点,除阻断关节腔内积液的稀释作用外,还避免受关节腔内抑制因子的影响,更好地促进骨髓道内新骨的形成和腱-骨界面胶原纤维的重建,增加腱骨界面的结合力<sup>[12]</sup>。

本实验中,术后 4、8、12 周实验侧的腱-骨界面愈合强度均

强于对照侧。术后 12 周,对照侧有 1 例自肌腱部分断裂,5 例从胫骨髓道拔出;实验侧有 3 例自肌腱部分断裂,3 例从胫骨髓道拔出。说明在干预措施影响下,术后腱-骨界面的愈合强度得到了增加,提示自体骨髓移植的有效性。实验中未见有从股骨侧拔出者,说明了骨块镶嵌式固定技术具有较高的固定强度,可以进一步在临床中应用<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 刘宁,刘建民,梁振雷,等.前入路关节镜下可吸收空心界面螺钉固定四股腓绳肌腱重建后交叉韧带[J].中国矫形外科杂志,2005,13(12):887-889.
- [2] Leung KS, Qin L, Fu LK, et al. A prospective study of bone to bone repair and bone to tendon healing in patella-patella tendon complex in rabbits[J]. Clin Biomech, 2002, 17(8):594-602.
- [3] Eriksson E. Vascular ingrowth into ACL-grafts[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2008, 16(4):341-341.
- [4] Nebelung W, Becker R, Urbach D, et al. Histological findings of tendon-bone healing following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring grafts[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2003, 123(4):158-163.
- [5] Hays PL, Kawamura S, Deng XH, et al. The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel[J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(3):565-579.
- [6] 曾春,蔡道章,王昆,等.关节镜下前交叉韧带重建术后的康复干预[J].中国临床康复,2005,9(14):1-3.
- [7] Lim JK, Hui J, Li L, 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.

- [8] Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, et al. Age and gender related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1):117-125.
- [9] Karaoglu S, Celik C, Korkusuz P. The effects of bone marrow or periosteum on tendon-to-bone tunnel healing in a rabbit model[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009, 17(2):170-178.
- [10] Berg EE, Pollard ME, Kang Q. Interarticular bone tunnel healing[J]. Arthroscopy, 2001, 17(2):189-195.
- [11] Demirag B, Sarisozen B, Ozer O, et al. Enhancement of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament grafts by blockage of matrix metalloproteinases[J]. Bone Joint Surg Am, 2005, 87(11):2401-2410.
- [12] Tomita F, Yasuda K, Mikami S, et al. Comparisons of intraosseous graft healing between the doubled flexor tendon graft and the bone-patellar tendon-bone graft in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Arthroscopy, 2001, 17(5):461-476.
- [13] 张义龙,李 宁,李志怀.一端带骨块同种异体深冻下肢肌腱重建前交叉韧带的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(7):1295-1299.

(收稿日期:2011-08-09 修回日期:2011-09-22)

(上接第 462 页)

#### 参考文献:

- [1] 林秀云,郭琦.兔体内甘草酸锌和葡萄糖酸锌药动学比较[J].微量元素与健康研究,1994,11(1):4-5.
- [2] 齐志敏,王倩,张莹.大鼠心肌缺血/再灌注损伤实验模型开胸方法的研究[J].中国临床康复,2004,8(30):6620-6621.
- [3] Nagel E, Meyer Z, Vilsendorf A, et al. Antioxidative vitamins in revention of ischemia/reperfusion injury[J]. Int J Vit Nutr Rev, 1997, 67(5):298-306.
- [4] 王鹏,张燕,田玉科,等.等容血液稀释和川芎嗪在兔心肌缺血/再灌注损伤中的抗氧化作用[J].临床麻醉学杂志,2003,19(1):27-29.
- [5] 李峥,董志.金属硫蛋白及其对脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J].重庆医学,2009,38(8):989-991.
- [6] 刘胜中.心肌缺血/再灌注损伤机制研究进展[J].实用医院临床杂志,2007,4(1):88-90.
- [7] Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zhao X, et al. Expression of SERCA isoform with faster Ca<sup>2+</sup> transport properties improves postischemic cardiac function and Ca<sup>2+</sup> handling and decreases myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(4):H2418-2428.
- [8] Gao H, Chen L, Yang HT. Activation of alpha1B-adrenoceptors alleviates ischemia/reperfusion injury by limita-

tion of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload in cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(3):584-595.

- [9] 司良毅,张远慧.钙超载、氧自由基和中性粒细胞与心肌缺血/再灌注损伤[J].重庆医学,1995,24(3):177-178.
- [10] Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL, et al. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-kB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine[J]. Circulation, 2001, 103(18):2296-2302.
- [11] Saitoh M, Osanai T, Kamada T, et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbate congestive heart failure; role in induction of plasma nitric oxide level[J]. Heart Vessels, 2003, 18(4):177-182.
- [12] 李烽,郭振荣,赵霖.锌在机体代谢中的作用[J].国外医学医学地理分册,1999,20(3):103-106.
- [13] 蒋与刚,王先远,郭长江,等.锌对肝缺血/再灌注损伤的对抗作用及其机制研究[J].中国病理生理杂志,2002,18(2):192-195.
- [14] 沈炳玲,秦毅,颜利求.锌对家兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2004,16(9):560-561.

(收稿日期:2011-03-02 修回日期:2011-07-20)