·基础研究·

自体肌腱细胞介导修复肌腱缺损的实验研究

陈兵　丁小邦　祝联　商庆新　崔磊　刘伟　曹谊林

【摘要】 目的　探讨以自体肌腱细胞为种子细胞的组织工程化肌腱体内形成。方法　取自体肌腱细胞经体外培养、扩增，与可吸收生物材料聚羟基乙酸（polyglycolic acid，PGA）混合培养形成细胞-生物材料复合物，将细胞-生物材料复合物移植于手术缺损的家猪趾浅屈肌腱处，并设单纯 PGA 组作为对照组。术后 6 周取材，对标本进行大体观察、组织学和生物力学检测和评价再生组织。结果　实验组新生组织在大体、组织学和胶原排列等方面与正常肌腱相似，对照组新生组织细胞、胶原排列较为紊乱。生物力学显示其最大拉力、最大应力和弹性模量，实验组比对照组分别提高 36.1%（$t = 3.56$、$P < 0.05$）、27.4%（$t = 2.94$、$P < 0.05$）和 15.0%（$t = 2.62$、$P < 0.05$）。结论　应用组织工程技术以自体肌腱细胞可以修复肌腱缺损。

【关键词】 腱；动物实验替代试验；组织工程；种子细胞

An experimental study of repair of tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon　*CHEN Bing, DING Xiao-bang, ZHU Lian, et al. Department of Plastic Surgery, The Reserarch Center of Tissue Engineering, The Ninth People's Hospital affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai* 200011, China

【Abstract】 Objective　To investigate the formation of engineered tendon in vivo with autologous tenocytes as seed cells. **Methods**　The autologous tenocytes were cultured and amplified in vitro and mixed with bio-absorbable polyglycolic acid (PGA) to form a cell-scaffold complex. This cell-scaffold complex was implanted and bridged the defect of the superficial digital flexor tendon at the pig foot. A cell-free PGA was implanted at another pig's foot as a control. The regenerated tendon was harvested after 6 weeks for gross, histology examinations and biomechanical analysis. **Results**　The regenerated tissue at the experimental group was comparable to the normal tendon in gross and histology properties of tenocytes and collagen distribution. A misarranged collagen distribution and regenerated tissue cells were observed at the control group. The biomechanical results at the experimental group demonstrated 36.1%, 27.4%, 15.0% greater than those at the control group in maximum force, maximum stress and spring modulus, respectively. **Conclusion**　Using tissue engineering technique autologous tenocytes can repair tendon defects.

【Key words】 Tendons; Animal testing alternatives; Tissue engineering; Seed cells

肌腱损伤或缺失是临床上的常见病。手术修复损伤肌腱后易发生粘连，导致肢体产生不同程度的功能障碍。若肌腱缺失过多必须使用替代物，目前的肌腱来源有自体肌腱、人工合成材料和同种异体肌腱等。自体肌腱移植使供区受损且来源有限，人工合成材料易导致异物反应、感染等，异体肌腱植入后易诱发免疫排斥反应，故均不是理想的替代物。笔者应用组织工程技术，在动物体内构建肌腱组织并修复自体肌腱缺损获得满意效果，为临床应用提供了实验室依据。

材料与方法

1. 材料：幼年家猪 10 头，体重 10 kg 左右（上海市川沙区养殖厂提供）。Ⅱ型胶原酶（美国 Worthington 公司）；含体积分数为 10% 胎牛血清的 F-12 培养液（美国 Gibco 公司）；质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶；聚羟基乙酸（polyglycolic acid，PGA）。标准生物力学测定仪（陕西天水试验机厂）。磷酸缓冲液和二氧化碳培养箱。

2. 实验方法：在无菌条件下，切取猪左侧趾浅屈肌腱 3 cm，切成 1 × 2 × 2 mm 大小的组织块，用磷酸缓冲液（PBS，含青霉素，链霉素各 100 U/ml）冲洗 2 遍，加入 2 倍体积的Ⅱ型胶原酶（1 mg/ml），置于 37℃恒温摇床消化 4 h 后用 150 目尼龙网筛过滤、离心，搜集细胞以 1 × 10^6/盘密度（培养皿直径 100 mm）接种，加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 Ham F-12 培养液，置饱和湿度，37℃，体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养。肌腱细胞传至第 2 代，经质量分数为 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞，制成浓度为 5.0 × 10^7/ml 的细胞悬液。将聚羟基乙酸 45 mg 平行排列成束状，长 3 cm，直

基金项目：国家“973”组织工程基金资助项目（G1999054309）

作者单位：200011 上海第二医科大学附属第九人民医院整形外科、上海市组织工程研究与开发中心

万方数据

径 0.5 cm。用上述浓度细胞悬液与聚羟基乙酸混合形成细胞-生物材料复合物，将该复合物放入培养皿置于二氧化碳培养箱，体外培养 1 周，每隔 1 ~ 2 d 更换培养液 1 次，以保证细胞的营养。无菌条件下切断猪右侧后肢趾浅屈肌腱，造成 3 cm 长的缺损。实验组（5 头）：将细胞-生物材料复合物移植于缺损处。对照组（5 头）：将单纯生物材料移植于缺损处。于修复后 6 周取材，分别行大体观察，组织学和生物力学检查评价再生组织。

结　果

1. 细胞学观察：肌腱细胞在体外培养 4 h 开始贴壁生长。经过 3 代培养达到 3.5×10^7 个细胞。肌腱细胞与 PGA 复合 4 h 后，肌腱细胞可贴附于 PGA。经体外培养 5 ~ 7 d，肌腱细胞牢固粘附于 PGA 上，并分泌大量细胞外基质（图 1）。

2. 大体观察：（1）实验组：在原肌腱缺损处形成条索状组织，新生组织与周围组织稍有粘连，可分离，色白，质地软，有韧性。新生组织与正常肌腱组织交界处连接良好。（2）对照组：新生组织可见未被吸收的生物材料（图 2，3）。

3. 组织学观察（HE 染色）：（1）实验组：新生组织细胞分布均匀，平行排列，但细胞量较正常肌腱多，胶原束基本呈平行排列，与正常肌腱组织的细胞和胶原排列方向相同。（2）对照组新生组织细胞与胶原束排

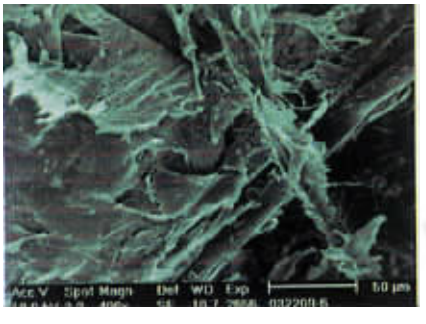


图 1　扫描电镜：体外培养肌腱细胞 PGA 纤维表面生长并分泌大量细胞外基质　×400



图 2　实验组肌腱细胞-PGA 复合物移植修复后 6 周，新生组织形成，肌腱缺损得以修复



图 3　对照组单纯 PGA 移植修复后 6 周，新生组织形成，肌腱缺损得以修复，可见生物材料残留

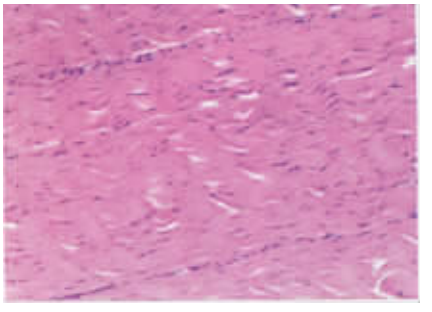


图 4　正常肌腱细胞与胶原排列整齐，方向与其纵轴平行　HE 染色　×100

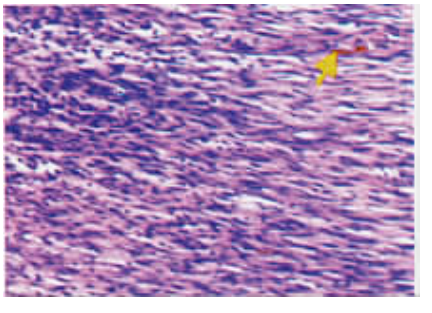


图 5　实验组新生组织细胞分布均匀，平行排列，细胞量较多，细胞与胶原束基本排列规则，方向与其纵轴基本平行　箭头　少量 PGA 残留　HE 染色　×100

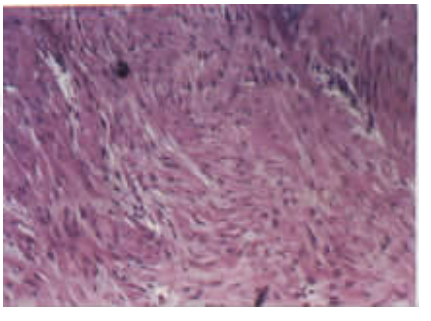


图 6　对照组新生组织细胞与胶原排列紊乱　HE 染色　×100

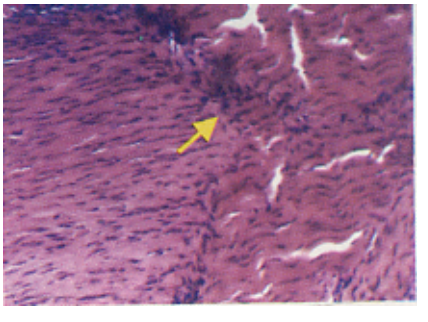


图 7　实验组新生组织显示界面愈合良好　箭头　右侧为正常肌腱　HE 染色　×100

万方数据

表 1　实验组与对照组新生组织力学特性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	猪数	最大张力(N)	最大伸长(mm)	最大应力(Mpa)	弹性模量(Mpa)	僵硬度(N/mm)	最大应变(%)	应变能(J)
实验组	5	181.0±24.6	10.5±1.1	19.5±2.7	92.7±8.8	17.3±2.1	21.1±2.6	0.96±0.20
对照组	5	133.0±11.0	9.0±1.1	15.3±1.7	80.6±2.8	14.9±1.1	19.0±2.4	0.60±0.12
t 值	–	3.56	1.96	2.94	2.62	2.02	1.20	3.11
P 值	–	< 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05

列紊乱。两组均可见未降解的 PGA,周围可见炎性细胞浸润(图 4～7)。

4. 生物力学检测:结果见表 1。

讨　论

肌腱损伤或缺失是造成手功能障碍的主要因素之一,临床治疗肌腱缺损的传统方法有自体肌腱移植、异体肌腱移植和人工合成材料。但这些方法都存在着缺点。20 世纪 80 年代末期,组织工程的兴起和发展[1],为临床修复组织缺损提供了一种新的方法,使组织缺损达到完全修复成为有一定的可能性。

Cao 等[2]首先在裸鼠皮下构建组织工程化肌腱,张兆锋等[3]在鸡皮下构建组织工程化肌腱,获得了在大体和组织学结构上与正常肌腱相似的组织。但是,曹谊林的工作是在没有完善免疫功能的裸鼠体内完成的,所以不能观察机体对细胞和生物材料的反应;而且皮下构建肌腱没有受到应力的作用,也不符合人体的生理特点。组织工程化肌腱应用于临床,首先应在具有免疫功能的动物体内证实其能否形成,并观察机体对它的反应。本研究结果发现,肌腱细胞-PGA 复合物植入自体肌腱缺损部位后第 6 周即可形成新生肌腱组织。组织学显示新生肌腱组织的细胞和胶原排列与其纵轴平行,和正常肌腱组织相一致。而单纯 PGA 植入所形成的新生组织的细胞和胶原排列紊乱,新生组织内可见未降解的 PGA,周围有大量炎性细胞浸润,说明机体对生物材料 PGA 存在着免疫排斥反应。

PGA 是组织工程研究中被广泛应用多年的一种可吸收合成材料。由于它的亲水特性,因此在体内很容易降解。它在体内通过一系列的分解过程,产生羟基乙酸,最终成为二氧化碳和水;对细胞无毒,对多种细胞具有吸附作用[4]。自 Vacanti 首先利用组织工程技术在 PGA 上形成组织工程化透明软骨以来,该材料已被应用并证实其对多种细胞具有支持吸附作用[5]。

本研究中,生物力学测定结果显示,在最大拉力、最大应力和弹性模量方面,肌腱细胞-PGA 修复组较单纯-PGA 修复组分别提高了 36.1%($t = 3.56$、$P < 0.05$),27.4%($t = 2.94$、$P < 0.05$)和 15.0%($t = 2.62$、$P < 0.05$);达到了正常肌腱的 60.0%,52.2% 和 50.4%。有研究表明,最大张力在实际情况下并无意义,肌腱组织在机体所受的应力一般不超过最大应力的 1/3[6]。

本研究结果表明,应用组织工程技术,可以构建组织工程化肌腱并修复肌腱缺损。但是肌腱细胞经多次传代后丧失分泌基质的能力,因此,我们认为,进一步的工作首先应尽可能地在短时间内大量扩增肌腱细胞并保持其功能。已有众多学者应用生长因子或转基因技术在这方面进行了初步研究,提出增加肌腱细胞数量和延缓肌腱细胞衰老的方法[7-9],但仍未彻底解决肌腱种子细胞来源缺乏的难题。其次,虽然 PGA 具有无毒、与细胞吸附好的特性,但其机械强度不足,且机体对其有一定的免疫反应。所以,应开发与机体和肌腱细胞相容性更好,具有一定的机械强度、易塑形、价廉的生物材料,为达到临床应用奠定物质基础。

参 考 文 献

1 Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science, 1993, 260: 920-926.

2 Cao YL, Vacanti JP, Ma X, et al. Generation of neo-tendon using synthetic polymer seeded with tenocytes. Transplation proceeding, 1994, 26: 3390-3391.

3 张兆锋, 高庆新, 曹谊林. 自体组织工程化肌腱预制的初步研究. 中华手外科杂志, 2002, 18: 125-127.

4 Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, et al. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatric Surg, 1988, 23: 3-9.

5 Robert CT. Polymer scaffoid processing. In: Robert CT, ed. Principles of tissue engineering. 1st ed. Austim. USA: RG Landes company, 1997. 263-293.

6 过邦辅, 主译. 临床骨科生物力学基础. 第 1 版. 上海: 上海远东出版社, 1993. 102.

7 Natsu-ume T, Nakamura N, Shino K, et al. Tempol and spatial expression of transforming growth factor-beta in the healing patellar ligament of the rat. J Orthop Res, 1997, 15: 837-843.

8 Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protain-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. Am J Sports Med, 1999, 27: 476-488.

9 Rohrich RJ, Trott SA, Love M, et al. Mersilene suture as a vehicle for delivery of growth factors in tendon repair. Plast Reconstr Surg, 1999, 104: 1713-1717.

(收稿日期:2002-12-09)
(本文编辑:郑忆柳)

万方数据