

文章编号:1004-7220(2014)03-0248-06

# 利用罗曼鸡肌腱滑液鞘体内构建趾深屈肌腱的生物力学及组织学研究

涂峻, 黄如林, 魏皎, 张海峰, 邹亚光, 袁宇雯, 韩冬, 李青峰

(上海交通大学附属第九人民医院 整复外科, 上海 200011)

**摘要:** **目的** 探索肌腱滑液鞘对肌腱体内再生的作用。**方法** 将36只罗曼鸡随机平均分为A、B两组。A组把左趾深屈肌腱滑液鞘的上、下、右侧分离,不切断趾深屈肌腱。同种异体脱细胞肌腱用部分分离的腱滑液鞘包裹,并固定在趾深屈肌腱左侧。B组直接把同种异体脱细胞肌腱固定在去除肌腱滑液鞘的趾深屈肌腱左侧。另取右趾深屈肌腱作为正常对照组。分别在第4、8、12周取材进行趾深屈肌腱最大载荷、弹性模量的生物力学检测及HE染色的组织学检测。**结果** 术后第4、8、12周时,除第4周A、B组在弹性模量方面差异无统计学意义,其余时间点A组最大载荷和弹性模量都大于B组( $P < 0.05$ )。随时间延长,A组胶原纤维增多,排列紧密,方向一致,炎性细胞浸润及纤维组织增生程度较轻。而B组胶原纤维数量逐渐减少、排列逐渐散乱,炎性细胞浸润、纤维组织增生程度明显高于A组。**结论** 腱滑液鞘有助于肌腱再生,说明合适的体内环境对肌腱构建具有重要作用,本研究结果对临床上肌腱缺损病人找到合适肌腱替代物有积极作用。

**关键词:** 肌腱; 腱鞘; 滑液鞘; 组织工程; 再生; 生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Biomechanical and histological research on *in vivo* engineered tendon with tendon synovial sheaths in Roman chicken

TU Jun, HUANG Ru-lin, WEI Jiao, ZHANG Hai-feng, ZOU Ya-guang, YUAN Yu-wen, HAN Dong, LI Qing-feng (Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract: Objective** To explore the role of tendon synovial sheaths in tendon regeneration *in vivo*. **Methods** Thirty-six Roman chicken were randomly divided into Group A and B, with 18 chicken in each group. In Group A, the synovial sheaths of the deep flexor tendons in the left middle toes were separated from the up, right and down side without cutting off the tendons themselves. The allograft decellularized tendons were coated with synovial sheaths which were detached partly and fixed on the left side of the normal deep flexor tendons in the middle toes of the left foot. In Group B, the allograft decellularized tendons were directly implanted on the left side of the deep flexor tendons without coating of synovial sheaths. The normal deep flexor tendons from the right foot were used as the control group. The maximum loads and elastic modulus of the tendons at 4th, 8th and 12th week were obtained by mechanical testing, and HE staining was conducted to observe histological changes of the tendons. **Results** The maximum load at 8th and 12th week and elastic modulus at 4th, 8th and 12th week in Groups A were greater than those in Group B, with significant differences ( $P < 0.05$ ). Group A showed more densely deposited matrices and longitudinally aligned collagen fibers than Group B, and inflammatory cells and fibrous tissues could hardly be found in Group A. In Group B, the collagen fibers were decreased gradually, with disordered alignment. Furthermore, more inflammatory cells infiltration and hyperplasia of fibrous tissues were found in Group B. **Conclusions** The synovial sheaths can contribute to tendon regeneration, indicating that a proper environment *in*

*vivo* plays an important role in the engineered tendons. This study has a positive effect on finding proper tendon replacements for patients with tendon deficiency.

**Key words:** Tendon; Tendon sheaths; Synovial sheaths; Tissue engineering; Regeneration; Biomechanics

肌腱的主要功能是把肌肉收缩产生的力传导至骨骼,从而带动关节形成肢体运动;同时在关节载荷周期中被动地贮存和释放能量,使运动效率提高<sup>[1]</sup>。肌腱损伤和缺损是临床常见病,当肌腱移植无法满足需求的时候,大段肌腱缺损的病人往往由于无法得到有效治疗而遗留下严重的手足功能障碍。传统的肌腱移植方法包括自体肌腱移植、同种异体肌腱移植及人工肌腱移植等。自体肌腱移植供区有限,异体肌腱移植存在着排异反应,人工肌腱所用材料往往存在生物相容性较低、降解困难等问题,这些都限制了它们的应用<sup>[2]</sup>,而快速发展的组织工程肌腱则给这一领域指明了一个新的方向。许多学者在体外运用组织工程的方法构建肌腱,但到目前为止,体外培养的组织工程肌腱由于缺乏合适的内环境,在生物力学和组织学方面,与正常肌腱相比,还存在较大差距<sup>[3-4]</sup>。近年来,体内组织工程的发展日渐受到重视<sup>[5]</sup>。指(趾)屈肌腱外层包裹着由腱纤维鞘和腱滑液鞘共同组成的腱鞘,在其周围形成了一个相对封闭的微环境,内有少量液体,不仅有润滑作用,而且能给肌腱提供营养物质<sup>[6]</sup>。

本实验采用部分分离的罗曼鸡趾深屈肌腱滑液鞘包裹同种异体脱细胞肌腱,形成相对独立的微环境,并固定在附近的正常肌腱上,接受其运动时所产生的力学刺激,充分模拟体内肌腱的微环境。对照组则直接固定在去除滑液鞘的肌腱上,放置于皮下位置。两组在多个时间点取材,进行生物力学及组织学检测,通过统计分析及对比,探讨利用肌腱滑液鞘构建肌腱的可行性及优越性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

罗曼鸡 36 只,体重( $2 \pm 0.5$ ) kg,雌性;购自上海交通大学医学院附属第九人民医院动物房。另取 10 只罗曼鸡用于同种异体脱细胞肌腱的制作。36 只罗曼鸡随机平均分为 A、B 两组,每组 18 只。A 组为实验组,制备好的脱细胞肌腱用腱滑液鞘包裹。B 组为对照组,脱细胞肌腱不用腱滑液鞘包裹。A、

B 两组手术均实施于罗曼鸡左脚中趾第 2 趾节。右脚中趾相应部位肌腱作为正常对照组。

### 1.2 同种异体脱细胞肌腱的制作

罗曼鸡 10 只,麻醉处死。取其趾深屈肌腱 60 根,统一用刀片修剪成 15 mm × 1 mm 大小。放入液氮中 2 min,然后立即放入 37 °C 生理盐水中 10 min,重复 5 次。4 °C 生理盐水冲洗 5 遍,每遍 5 min。随后放入溶解有 DNase (D5025, Sigma 公司, 150 IU/mL) 和 RNase (R6513, Sigma 公司, 100 μg/mL) 的生理盐水中,摇床 4 °C、100 r/min 过夜。最后 4 °C 生理盐水冲洗 5 遍,每次 30 min,环氧乙烷灭菌, -80 °C 保存备用<sup>[7]</sup>。

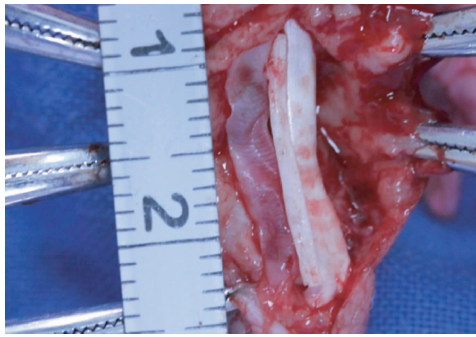
### 1.3 手术方式

罗曼鸡用氯胺酮麻醉后常规消毒铺巾,在左脚中趾第 2 趾节屈侧做一 3 cm 纵行切口。依次分离皮肤、皮下软组织至腱鞘,把第 2 趾节的腱滑液鞘的上、下、右端切开,掀起至左侧(见图 1(a))。把制作好的同种异体脱细胞肌腱用腱滑液鞘的脏层面包裹并将其缝合。随后把脱细胞肌腱滑液鞘复合物整体固定在第 2 趾节的深屈肌腱左侧缘(见图 1(b))。缝线要穿过脱细胞肌腱、滑液鞘、趾深屈肌腱,把三者固定在一起。缝合切口,纱布包扎。B 组(对照组)直接把同种异体脱细胞肌腱固定在去除滑液鞘的中趾第 2 趾节肌腱左侧。

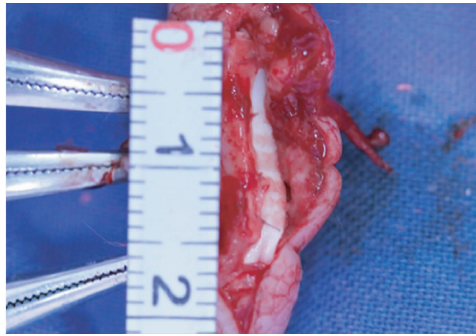
### 1.4 取材及检测

**1.4.1 术后观察及样本大体观察情况** 术后观察罗曼鸡的活动情况及伤口情况。在第 4、8、12 周分别随机取材 12 只罗曼鸡,观察植入材料的大小、粗细、颜色、透明程度、质地、光泽及与周围组织的黏连情况。

**1.4.2 生物力学测试** 在第 4、8、12 周分别随机取材 8 只罗曼鸡。另取这 8 只鸡右脚中趾第 2 趾节趾深屈肌腱,修剪成 15 mm × 1 mm 大小,作为正常对照组。取下的标本立即放入 4 °C 的生理盐水中防止干燥。所有标本在 1 h 内在生物力学测试仪(Instron 4411, 美国)上进行拉伸测试,测量最大载荷及弹性模量。



(a)



(b)

**图1 A组手术方式** (a)分离腱滑液鞘(保留左侧)并放入同种异体脱细胞肌腱,(b)用腱滑液鞘包裹同种异体脱细胞肌腱并固定在正常趾深屈肌腱的左侧

**Fig.1 Surgical procedures of Group A** (a) The tendon synovial sheaths (keep the left side) were separated and put in the allograft decellularized tendon, (b) The allograft decellularized tendons were coated with the synovial sheaths and fixed on the left side of the normal deep flexor tendons

**1.4.3 HE染色** 在第4、8、12周分别随机取材4只罗曼鸡。另取这4只鸡右脚中趾第2趾节趾深屈肌腱作为正常对照组。标本取下后立即用4%多聚甲醛溶液固定48 h。固定完成后放入自动脱水机中进行梯度脱水。脱水后的标本用石蜡包埋。对固定、脱水、包埋后的标本进行苏木素-伊红(D006, 中国南京建成生物工程研究所)染色,并在双筒显微照相系统(Leica DM4000B, 德国)下观察拍照。

**1.4.4 数据统计** 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示。数据比较采用单因素方差分析,若结果有统计学意义( $P < 0.05$ ),再进行多组之间的多重比较(LSD法),以确定两两组间的差异。

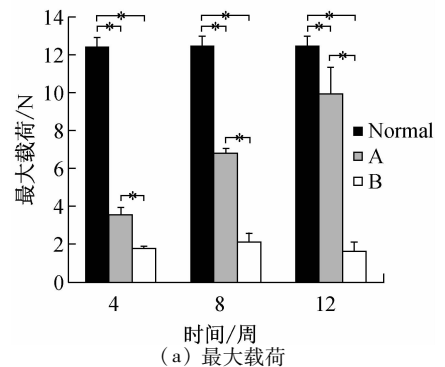
## 2 结果

### 2.1 术后活动及伤口情况

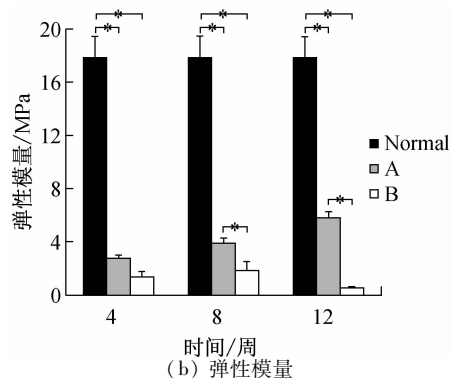
罗曼鸡术后8 h内处于俯卧状态,8 h后开始能够站立,24 h已全部能行走,但常出现健侧腿独立,患侧腿收缩动作,术后72 h行走自如。术后3 d切口略微肿胀。5只罗曼鸡切口出现溃疡。为了保证实验结果不受感染因素干扰,此5只罗曼鸡不列入数据统计。术后2周切口均已消肿,3周缝线大部分自行脱落。

### 2.2 生物力学测试

本次力学测试在共31只(已剔除5只出现感染的样本)罗曼鸡中随机选取的24个样本中进行。数据采用单因素方差分析,多重比较应用LSD法。由测试结果可知,在第4、8、12周3个时间点,除第4周A、B组在弹性模量方面差异无统计学意义,其余时间点A组最大载荷和弹性模量均大于B组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。但是A、B组在3个时间点的力学性能均不及正常组(见图2)。



(a) 最大载荷



(b) 弹性模量

**图2** 正常组、实验组(A组)和对照组(B组)生物力学测试结果比较(\* $P < 0.05$ )

**Fig.2 Comparison of biomechanical testing results in Group A, B and control group** (a) Maximum load, (b) Elastic modulus

## 2.3 组织学检测

**2.3.1 大体观察** 术后4周,A组材料较植入时变细,少量透明组织包裹,与周围稍黏连,色白、质韧、光泽好。B组材料较植入时增粗,可见软组织包裹,与周围稍黏连,色白、质软、光泽稍差。术后8周,A组材料较4周时粗,但不及B组;依然可见少量透明软组织包裹,与周围黏连程度比4周时稍稍加重;色泽白,质地比4周更韧,光泽与4周时相仿。B组材料较4周时更粗,软组织包裹更厚,与周围黏连明显加重,色泽稍黄,质软,光泽欠佳。术后12周,A组材料粗于4、8周,透明软组织包裹,与周围组织黏连,但远不及B组严重,色泽白,质地比8周更韧,光泽度更好。B组材料与8周时粗细几乎无改变,软组织包裹更致密,与周围黏连严重,色泽稍黄,质地、光泽几乎与周围软组织无差别。

**2.3.2 苏木素-伊红染色** 术后4周,A组材料相比于B组,胶原排列整齐、致密,少量炎性细胞浸润。B组材料的胶原纤维大多保存,胶原的排列保持一定的方向性,但胶原之间的交联开始减少,炎性细胞浸润,周围结缔组织开始侵入,程度比A组严重。术后8周,A组胶原纤维却比4周时更粗大,排列依然整齐,方向性良好;炎性浸润基本消失,周围软组织与肌腱本体分界清楚。B组胶原散乱排列,相互之间的交联较4周时明显减少,胶原纤维也变得更细;可明显看到炎性细胞浸润,纤维结缔组织长入破坏肌腱原有结构。术后12周,A组胶原比4、8周更粗大,交联更紧密,排列整齐,方向一致,已经接近正常肌腱水平。B组材料完全被长入的纤维结缔组织破坏,只有少量胶原纤维的痕迹(见图3)。

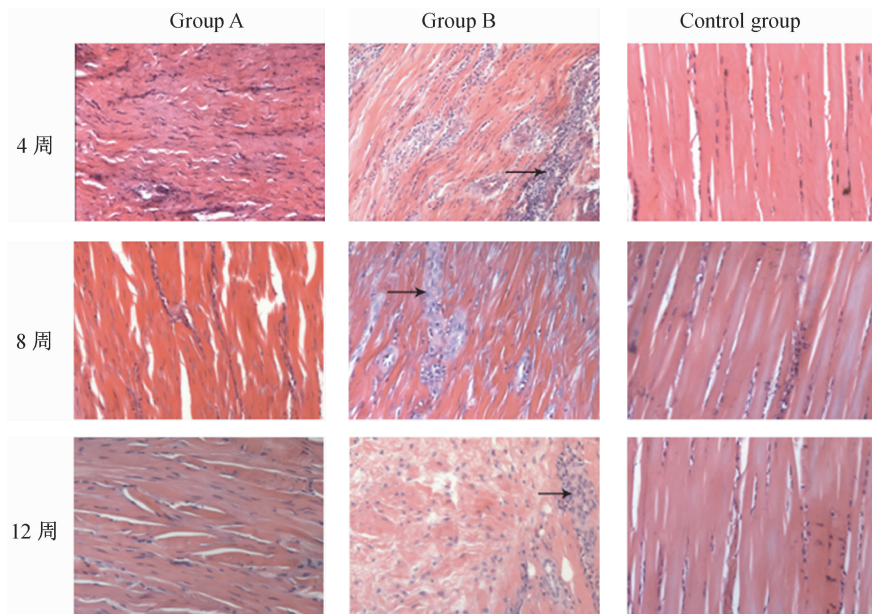


图3 正常组、实验组(A组)和对照组(B组)苏木素-伊红染色结果比较( $\times 200$ ,箭头示炎性细胞浸润)

Fig.3 Comparison of HE staining microscopic images in groups A, B and control group at different period

## 3 讨论

肌腱组织工程发展之初,最先采用种子细胞复合支架材料在体外培养的模式,时至今日取得了许多令人瞩目的成果,但是单纯体外培养的组织工程肌腱,在组织学及生物力学等方面与正常肌腱相比还存在较大差距<sup>[3]</sup>。传统组织工程的3大要素:种

子细胞、支架材料和细胞因子的概念现在已逐渐被拓展。如今的学者已经意识到,单纯细胞因子的刺激很难促使肌腱仿生再生。近年来,许多学者尝试加入力学刺激因素构建肌腱或者通过体内培养的方式构建肌腱组织,结果显示在力学及组织学特性方面都好于单纯体外培养获得的肌腱<sup>[8-10]</sup>。体外力学刺激一般采用周期拉伸应力刺激的方法<sup>[8]</sup>。肌腱

的体内构建一般是利用体内皮下环境,这些都和肌腱生长的生理微环境有所区别<sup>[9]</sup>。无论是力学刺激还是应用体内环境,目的都在于模拟肌腱生理状态所处的微环境,从而构建出具有正常组织学和生物力学特性的肌腱组织。

肌腱外附属结构通常包括5种,手足部位的腱鞘是其中之一,它的结构相对封闭,更接近生理条件下肌腱所处的微环境<sup>[6]</sup>。本实验正是利用腱鞘这个结构,用腱鞘中的滑液鞘包裹材料,并且固定在正常趾深屈肌腱上,利用肌腱运动时的伸缩张力给材料以接近生理状态下的力学刺激,充分模拟了肌腱生长的体内微环境,达到促进肌腱再生的理想状态。从生物力学及组织学的结果推测,腱滑液鞘可能起到以下作用:(1)从HE染色结果观察,A组有序的胶原纤维显著增加,并且变得更加粗大。生物力学测试中最大载荷和弹性模量都随时间显著增加,这两方面力学性能的增加同样依赖于胶原纤维的形成,说明胶原纤维处于不断合成状态。B组有序的胶原纤维随着时间的推移而减少,最大载荷及弹性模量不变甚至降低,说明胶原纤维来源缺乏。有序的胶原合成依赖于正常的肌腱细胞群体,表明A组内的肌腱细胞数量在稳定增长。目前,对于这些肌腱细胞的来源尚不得而知,推测与肌腱祖/干细胞的迁入和增殖分化有关。肌腱祖/干细胞在2007年被Bi等<sup>[11]</sup>第1次描述,作为存在于肌腱里的多种潜能干细胞,它的参与可能是肌腱再生的最重要因素之一,这种细胞不仅存在于肌腱本体里面,而且还存在于肌腱的腱旁组织<sup>[12]</sup>。腱滑液鞘里是否存在多种潜能干细胞,目前尚无相关报道,但是可以推测,腱滑液鞘对于肌腱祖/干细胞进入材料增殖、向肌腱细胞定向分化起到了重要作用,可能是肌腱祖/干细胞的来源。(2)肌腱的修复分为外源性和内源性,外源性修复依靠周围肉芽组织增生侵入,形成纤维疤痕组织,对于肌腱的再生十分不利<sup>[13]</sup>。内源性修复依靠腱内膜和腱外膜的细胞增殖来实现<sup>[14]</sup>,是理想的修复方式。HE染色结果显示,4周时B组材料有大量炎性细胞浸润,纤维组织开始增生并破坏胶原排列,随着时间的延长,这种情况逐渐加重。同时生物力学测试结果也表明,B组材料随时间推移,力学性能并没有增加甚至出现了下降。用腱滑液鞘包裹的A组在3个时间点未受“外部”干扰,与其他软组

织分界清楚。大体观察发现,在其周围始终包裹着一层与周围软组织分界清楚的透明组织,随着时间推移,力学性能逐渐增加。由此可见,肌腱滑液鞘发挥了屏障作用,阻隔炎性细胞、肉芽组织浸润。(3)肌腱的营养提供分内源性和外源性两种。内源性营养主要包括发源于肌肉、骨起止点的小血管。外源性营养包括腱鞘滑液等<sup>[14]</sup>。指/趾屈肌腱这种不靠近肌肉、骨起止点的肌腱营养主要来自于滑液,保留了完整一侧的腱滑液鞘同时可能还保留分泌滑液的功能,给肌腱再生提供了营养保障。

在种子细胞及支架材料的选择上,本实验与传统组织工程方法也有不同。已有研究证明,在体外培养的情况下,即使提高种子细胞种植的密度,构建肌腱的组织学和生物力学无明显改善<sup>[15]</sup>。更多学者认为,种子细胞的作用主要在于能分泌某些细胞因子,刺激宿主自身细胞迁移聚集参与再生过程,而非种子细胞本身的增殖分化<sup>[16-18]</sup>。另外,考虑到种子细胞存在的安全隐患,取舍就变成一个值得讨论的问题。在软骨方面,已经有学者成功利用自体细胞归巢再生出关节软骨<sup>[19]</sup>。因此,本实验并没有运用种子细胞,而是利用同种异体脱细胞肌腱作为材料,配合肌腱滑液鞘形成的微环境来构建肌腱组织,在此过程中,同种异体脱细胞肌腱上面保留的大量肌腱基质蛋白在肌腱的发育中发挥了重要作用,可能通过吸引自体肌腱祖/干细胞归巢帮助再生肌腱<sup>[7,10]</sup>。本实验所用材料的脱细胞方法遵循两个原则:第一,最大程度去除材料上引起免疫排斥反应的组分;第二,尽可能保留肌腱基质蛋白。快速冻融循环及低温制作方法,在裂解细胞的同时把对基质蛋白的损伤降到最小<sup>[20]</sup>。细胞裂解后,用核酸酶去除细胞中免疫原性很强的核酸,减小排斥反应。快速冻融过程中形成的冰晶能使原来致密的胶原断裂,变得疏松,恰为肌腱祖/干细胞的进入提供方便。

#### 4 结语

本实验采用肌腱滑液鞘包裹同种异体脱细胞肌腱,并将其固定在原位正常肌腱上,充分模拟了肌腱细胞所处的生理环境。结果表明,再生的肌腱组织在生物力学及组织学上均取得了令人满意的结果,提示体内微环境对于肌腱再生具有重要作用。但本实验只限于力学和组织学的观察,对于腱滑液鞘是



否含有再生能力细胞、具体是何种细胞等问题还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Voleti PB, Buckley MR, Soslowky LJ. Tendon healing: Repair and regeneration [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2012, 14: 47-71.
- [2] 李宗虎, 曲彦隆, 周继辉, 等. 肌腱组织工程研究新进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(18): 1406-1407.
- [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(5): 1280-1289.
- [4] Calve S, Dennis RG, Kosnik PE 2nd, *et al.* Engineering of functional tendon [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(5-6): 755-761.
- [5] Shastri VP. In vivo engineering of tissues: Biological considerations, challenges, strategies, and future directions [J]. *Adv Mater*, 2009, 21(32-33): 3246-3254.
- [6] Kannus P. Structure of the tendon connective tissue [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2000, 10(6): 312-320.
- [7] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(12): 3233-3243.
- [8] Badylak SF, Nerem RM. Progress in tissue engineering and regenerative medicine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(8): 3285-3286.
- [9] McCullen SD, Chow AGY, Stevens MM. In vivo tissue engineering of musculoskeletal tissues [J]. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22(5): 715-720.
- [10] Cao D, Liu W, Wei X, *et al.* In vitro tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids: A preliminary report [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(5): 1369-1377.
- [11] Bi Y, Ehrichiou D, Kilts TM, *et al.* Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche [J]. *Nat Med*, 2007, 13(10): 1219-1227.
- [12] Mienaltowski MJ, Adams SM, Birk DE. Regional differences in stem cell/progenitor cell populations from the mouse achilles tendon [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(1-2): 199-210.
- [13] 石继祥. 促进肌腱愈合及预防肌腱粘连的研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(5): 400-403.
- [14] Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: Healing, modeling and remodeling [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006, 6(2): 181-90.
- [15] Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, *et al.* Effects of cell-to-collagen ratio in mesenchymal stem cell-seeded implants on tendon repair biomechanics and histology [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(3-4): 448-457.
- [16] Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, *et al.* Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man [J]. *Lancet*, 2004, 364(9436): 766-770.
- [17] da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9): 2287-2299.
- [18] Chen L, Tredget EE, Wu PY, *et al.* Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing [J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1886.
- [19] Lee CH, Cook JL, Mendelson A, *et al.* Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: A proof of concept study [J]. *Lancet*, 2010, 376(9739): 440-448.
- [20] Patel N, Solanki E, Picciani R, *et al.* Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics [J]. *Proteomics*, 2008, 8(5): 1055-1070.