

石膏外固定修复兔髌骨-腱连接点断裂的组织形态学变化*

王靖¹, 张朝跃², 谭财福³

Effect of plaster external fixation on the histomorphological changes for bone-tendon junction healing

Wang Jing¹, Zhang Chao-yue², Tan Cai-Fu³

¹Department of Orthopedics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China; ²Department of Orthopedics, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China; ³Department of Orthopedics, Zhuzhou TCM Traumatic Hospital, Zhuzhou 412007, Hunan Province, China

Wang Jing★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China
wjz930@yahoo.com.cn

Corresponding author: Zhang Chao-yue, Professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China
zcy1958@medmail.com

Received: 2011-12-09
Accepted: 2012-02-01

Abstract

BACKGROUND: Plaster external fixation has a positive effect on bone-tendon junction healing, but there is no in-depth study on the repair mechanism.

OBJECTIVE: To investigate the effect of plaster external fixation on the histomorphological changes for bone-tendon junction healing.

METHODS: The bone-tendon junction healing models were established by cutting off the junction between the patellar tip and the patellar tendon as well as the distal part of the patella. The models were divided into experimental group and model group. The models in the experimental group were performed with plaster external fixation and those in the model group were without fixation. Each group got the sample at 2, 4 and 8 weeks after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: Hematoxylin-eosin staining, Safranin'O staining, macrophages immunohistochemistry staining and integral absorbance showed that the tissue edema and adhesion at the bone-tendon junction in the experimental group were better than those in the model group, cartilage cells and bone tissue formation and differentiation in the experimental group were significantly better than those in the model group, and degree of the inflammation in the experimental group was light and disappeared quickly. External fixation can accelerate the process of bone-tendon repair and promote the healing.

Wang J, Zhang CY, Tan CF. Effect of plaster external fixation on the histomorphological changes for bone-tendon junction healing. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(13): 2362-2365. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 石膏外固定对髌骨-腱连接点断裂的治疗作用肯定, 但相关修复机制一直未有深入研究。

目的: 观察石膏外固定对髌骨-腱连接点断裂修复的组织形态学改变。

方法: 切断髌尖与髌腱连接处并切除远端部分髌骨建立兔髌骨-腱连接点损伤模型, 实验组在造模的基础上给予石膏外固定, 模型组不予固定, 分别在造模后 2, 4, 8 周取材。

结果与结论: 苏木精-伊红染色、Safranin'O 染色和巨噬细胞免疫组化染色及其积分吸光度检测均显示实验组造模后骨-腱结合部组织修复快, 软骨细胞及骨组织的形成、分化明显优于模型组, 且炎症反应程度轻、消失快。说明外固定可加快骨-腱组织修复进程, 促进其愈合。

关键词: 骨-腱连接点; 外固定; 组织形态学; 积分吸光度值

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.13.019

王靖, 张朝跃, 谭财福. 石膏外固定修复兔髌骨-腱连接点断裂的组织形态学变化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(13):2362-2365. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨-腱连接点是骨通过软骨与肌腱、韧带接触的部位, 典型的纤维软骨性骨-腱连接点的结构有4层组织: 纯纤维连接组织、非钙化的纤维软骨、钙化的纤维软骨和骨^[1]。骨-腱连接点在微小的距离内肌腱、韧带等软组织转换为骨组织。由于骨-腱连接点损伤发生在骨和腱这两种不同组织结构之间, 其修复过程缓慢而困难, 临床上也缺乏有效康复方法。单纯外科修复疗效欠佳, 远期可能遗留疼痛、关节活动受限等后遗症。固定制动韧带对韧带及骨创伤的保护作用肯定。但即使同样制动固定对骨-腱连接点愈合的疗效会逊于单纯骨创伤或韧带创伤, 制动在骨-腱连接点损伤修复过程

中有什么治疗作用, 对其修复过程的促进作用有何不同?

实验采用苏木精-伊红染色、Safranin'O染色、巨噬细胞免疫组化染色及其积分吸光度值检测等方法观察制动对骨-腱连接点损伤的修复过程。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2010-05在湖南省人民医院完成。

材料: 成年健康新西兰大白兔36只, 18周龄, 雌雄不限, 体质量2.20~3.10 kg, 购自长沙市开福区东创试验动物科技服务部, 许可证号: SCXK(湘)2009-0012。

方法:

实验分组、造模与干预: 将36只兔随机分为2组: 实验组和模型组, 每组18只。静脉注射体积分数2.5%戊巴比妥钠(0.8 mL/kg)麻醉白兔, 膝关节前外侧入路在髌骨中远端1/3处横行截骨, 切断髌尖与髌腱连接处并切除远端部分髌骨, 清除纤维软骨带。近端髌骨纵向钻孔, 3-0丝线编织缝合髌腱与髌骨, 间断缝合加固, 并在胫骨结节下钻孔张力钢丝“8”字固定, 缝合皮肤^[2]。实验组屈膝90°位管型石膏制动, 3周后去除。模型组同法造模, 术膝不固定。

组织标本制备: 分别于造模后2, 4, 8周取每组兔各6只, 空气栓塞处死, 取带胫骨结节及部分股四头肌的髌骨-髌腱复合体-20℃保存, 用于组织学观察。

组织学观察: 标本从中间纵行剖开, 用体积分数10%中性甲醛固定24 h, 体积分数10%甲酸脱钙4周, 系列乙醇脱水、透明、石蜡包埋, 在中央矢状位将标本切成5 μm厚的切片。参照文献方法进行苏木精-伊红染色、Safranin'O染色和巨噬细胞免疫组化染色^[3-4]。

Safranin'O染色的积分吸光度值测定: 在每个时间点采用系统抽样法抽取切片, 每间隔其50 μm抽取1张切片, 共取5张, 采用Image图像分析软件, 每张切片取3个点并对其结果进行评估。计算实验组和模型组Safranin'O阳性染色的积分吸光度值。

巨噬细胞免疫组化染色积分吸光度值检测: 采用激光共聚焦显微镜照相, 观察计数巨噬细胞。通过与电脑相连的显微镜将采集到的图像存入电脑, 用Image图像分析软件计算巨噬细胞免疫组化染色的积分吸光度值反映被测个体截面或投影轮廓内总的吸光度, 由各像素点吸光度值直接相加, 计算每个视野阳性表达的积分吸光度值。

主要观察指标: 两组兔髌骨-髌腱复合体的组织学改变。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同时间点结果的比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入36只兔均进入结果分析。

2.2 苏木精-伊红染色结果 实验组造模后2

周时可见纤维母细胞增生及少量散在的类软骨细胞, 沿纵轴方向紊乱排列。模型组有少量纤维母细胞增生, 未见类软骨细胞; 4周时实验组见大量类软骨细胞和纤维母细胞增生, 部分细胞沿骨-腱的纵轴方向排列, 趋向有序, 见新生松质骨自截骨面向远端肌腱部分长入, 可见少量类软骨细胞灶状分布及散在的小钙化灶。模型组可见类软骨细胞和纤维母细胞增生, 细胞和胶原沿骨-腱的纵轴方向无序排列, 少量松质骨长入肌腱, 散在类软骨细胞灶状分布, 未见钙化灶。造模后8周实验组髌腱与松质骨接触处可见纤维软骨带新生, 未见潮线形成, 大量类软骨细胞增生且排列相对有序, 近端新生松质骨向髌腱内长入且与髌腱呈现融合趋势, 小钙化灶较前增多。模型组仍可见大量增生的纤维母细胞, 髌腱与松质骨接触处未见明显纤维软骨带新生, 无潮线形成; 大量类软骨细胞增生, 排列相对无序; 骨-腱连接点近端新生松质骨向髌腱内长入, 未见融合趋势, 有散在钙化灶出现, 较实验组的钙化灶要小且少, 见图1。

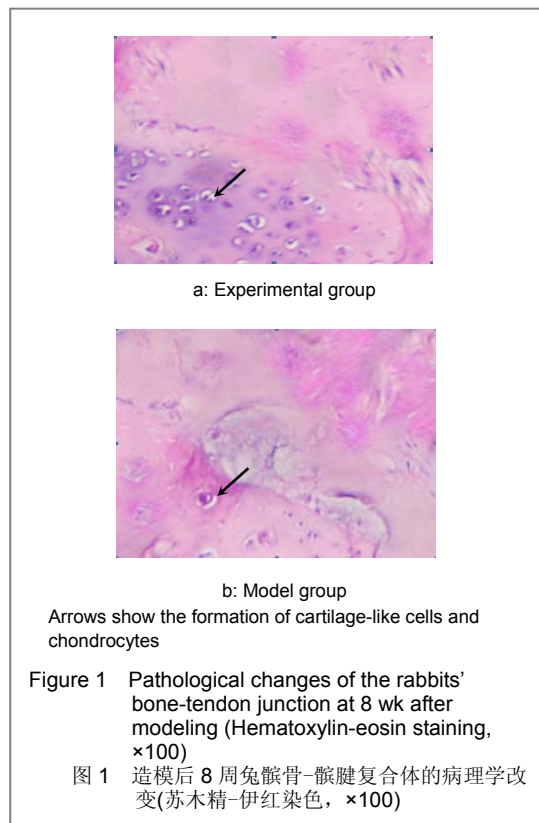
¹ 湖南省人民医院骨科, 湖南省长沙市 410005; ² 中南大学湘雅三医院骨科, 湖南省长沙市 410013; ³ 株洲市中医伤科医院骨科, 湖南省株洲市 412007

王靖★, 男, 1976年生, 湖南省邵阳市人, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事关节外科、运动医学的研究。
wjzj930@yahoo.com.cn

通讯作者: 张朝跃, 教授, 博士生导师, 中南大学湘雅三医院骨科, 湖南省长沙市 410013
zcy1958@medmail.com

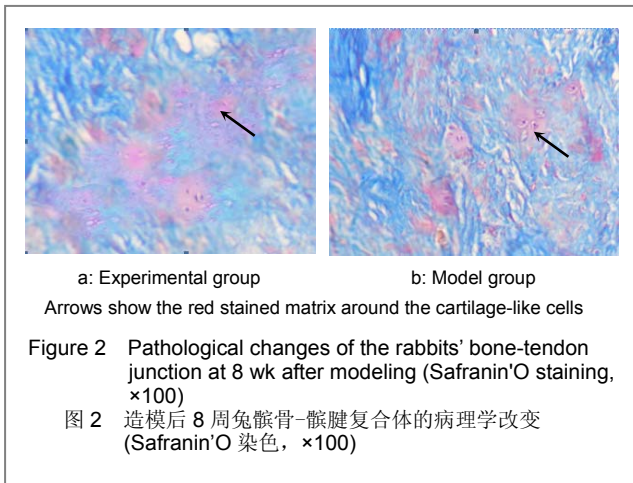
中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2012)13-02362-04

收稿日期: 2011-12-09
修回日期: 2012-02-01
(20111025024/
WLM · C)



2.3 Safranin'O染色结果 造模后2周, 实验组新生的骨-腱连接点处基质部分红染, 主要分布于骨-腱连接点的骨侧。模型组基质染色较浅, 在骨-腱连接点的骨侧染色面积较小。造模后4周, 实验组新生骨与肌腱交界处基质红染部分较之前加深, 染色范围增大, 红染主要分布于

骨-腱连接点的两侧。模型组基质染色较浅, 染色深度以及面积较造模后2周时增加, 红染区域主要分布于骨-腱结合部偏骨侧。造模后8周, 实验组新生骨与肌腱交界处基质可见红染深度未有加深, 染色范围较4周时无明显区别, 红染主要分布于骨-腱连接点的两侧且沿类软骨细胞走行分布。模型组新生骨与肌腱交界处基质面积较4周时增大, 染色加深, 主要集中于骨-腱结合处的类软骨细胞聚集处, 见图2。



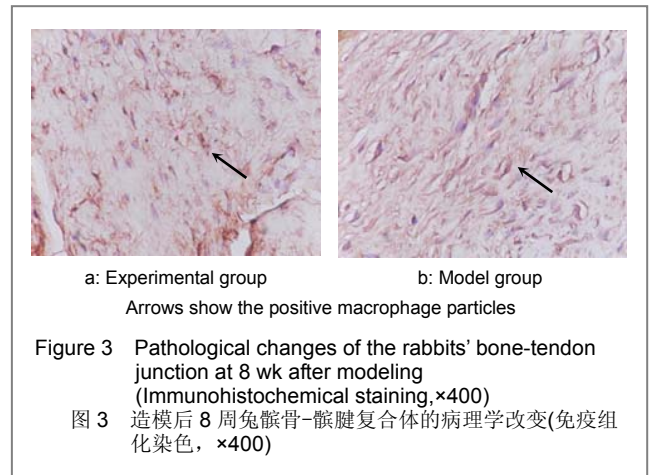
对Safranin'O阳性染色的积分吸光度值进行统计学分析发现, 随着造模后时间的延长, 两组Safranin'O阳性染色的积分吸光度值均明显增加, 其中实验组的积分吸光度值的峰值在造模后4周出现, 8周后下降。模型组的积分吸光度值在造模后8周还未达到峰值, 其峰值延后出现。其中造模后2, 4周, 实验组积分吸光度值高于模型组($P < 0.01$), 而造模后8周实验组积分吸光度值低于模型组($P < 0.01$), 见表1。

表1 两组 Safranin'O 阳性染色的积分吸光度值的比较
Table 1 Comparison of the integral absorbance values by safranin'O staining in two groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Time	Experimental group	Model group
2 wk	232.47±18.56 ^a	185.95±13.24
4 wk	1 654.22±163.43 ^a	897.50±102.38
8 wk	432.54±87.05 ^a	1 023.52±122.92

^a $P < 0.01$, vs. model group

2.4 巨噬细胞免疫组化结果 造模后2周, 实验组可见少量散在阳性染色颗粒, 主要集中在骨-腱连接点的肌腱部; 模型组散在阳性染色颗粒较实验组明显, 散在分布。造模后4周, 实验组阳性染色颗粒较2周时减少, 染色强度减小; 模型组阳性染色颗粒较2周时有所减少, 染色强度及面积实验组均不及模型组。造模后8周, 实验组染色强度进一步减小, 染色区域进一步较少, 染色主要分布于骨-腱连接点的骨侧, 模型组染色面积及强度较4周有所减小, 主要分布于骨-腱连接点的两侧, 见图3。



巨噬细胞免疫组化阳性染色的积分吸光度值检测发现, 随着造模时间的延长, 两组的积分吸光度值逐渐下降, 与模型组比较, 实验组对应时间点积分吸光度值明显降低($P < 0.01$), 见表2。

表2 两组巨噬细胞免疫组化阳性染色的积分吸光度值比较
Table 2 Comparison of integral absorbance of the macrophage in two groups by immunohistochemical staining ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Time	Experimental group	Model group
2 wk	78.23±15.15 ^a	112.62±22.03
4 wk	53.57±11.20 ^a	97.19±24.56
8 wk	38.28±6.30 ^a	56.58±8.41

^a $P < 0.01$, vs. model group

3 讨论

骨-腱连接点形态学上分为直接止点和间接止点, 直接止点通过sharpey纤维成锐角与骨膜相连^[5]。间接止点通过肌腱、纤维软骨、钙化的纤维软骨、骨4层结构使肌腱与骨相连。实验所研究的是骨-腱连接处间接止点, 正常兔髌骨-腱标本在髌骨可见通过髌骨表面骨、钙化的软骨、非钙化的软骨以及肌腱组成一个4层结构的骨-腱结合部, 其中钙化的软骨、非钙化的软骨其间又有纤维软骨带, 标志性的结构为纤维软骨带中间的潮线^[6-7]。影响骨-腱连接点修复过程的因素相对较多, 如手术技巧、方式、局部生物力学环境、外固定时间等^[8-9], 目前认为特殊的组织结构是骨-腱连接点损伤难以修复的主要因素。实验以兔膝髌骨-腱连接点损伤为模型, 探讨制动对骨-腱连接点损伤修复的影响。

文献报道愈合进程随着时间延长出现纤维母细胞、类软骨细胞及其细胞群、微小钙化灶、骨细胞及松质骨形成、纤维软骨带及骨-软骨融合及组织细胞无序趋向有序性排列等组织变化^[10-11]。实验发现随着时间的推移, 两组骨-腱连接点部位均出现愈合倾向, 模型组的类软骨细胞微小钙化灶、骨细胞及松质骨形成、纤维软

骨带及骨-软骨融合变化均迟缓于实验组, 且转化程度及速度不如实验组, 在造模后8周时, 模型组仍未出现明显骨-软骨融合现象。整个实验过程中, 两组均未见明显潮线形成, 可能与观察时间不够长有关。实验通过Safranin'O染色方法对糖氨多糖分布进行研究, 发现实验组染色面积与强度均高于模型组, 提示实验组类软骨细胞及细胞外基质分化形成更快。巨噬细胞是单核吞噬细胞系统中高度分化、成熟的细胞类型, 主要功能是以固定细胞或游离细胞的形式对细胞残片及病原体进行噬菌作用。在炎症早期, 大量的嗜中性细胞会占据炎症处, 当这些细胞灭亡时, 就会被巨噬细胞所吞噬。Dagher等^[4]在兔前交叉韧带修复模型中使用外固定支架固定造模后兔膝关节, 发现造模后早期的固定作用可以减少兔的巨噬细胞聚集, 认为巨噬细胞早期表达减少能够促进骨-腱连接点的愈合。实验采用免疫组化方法检测发现实验组巨噬细胞阳性染色的积分吸光度值显著低于模型组。表明适当外固定可以减少损伤后的骨-腱连接点的炎症反应, 减少巨噬细胞聚集。

一般来说, 骨-腱连接点损伤愈合过程经历了炎症机化、新骨形成、编织骨重建和纤维软骨结合部成熟、骨再塑形等4个阶段^[12]。关于骨-腱修复的具体机制尚未完全明确, 正常状态下骨-腱损伤的修复过程中, 早期是纤维瘢痕组织修复^[13], 瘢痕组织不同于正常组织, 不能达到正常生理功能。Wong等^[14]采用异体组织工程软骨细胞移植治疗兔髌骨-腱损伤, 实验仅证实无免疫排斥, 有促进愈合潜能。有学者采用低能脉冲超声及组合磁场刺激兔髌骨-腱连接点损伤, 证实其能促进骨-腱连接点新骨形成及纤维软骨再生^[15]。Kim等^[16]研究证实转化因子 β 及骨形态发生蛋白2也能促进其修复。但离临床上应用有很大距离。关于其修复机制的研究, Zhu等^[17]认为SOX9对腱-骨连接处修复时II型胶原的生成起到关键作用。Zhao等^[18]认为局部缺氧是腱-骨连接处修复的必要先决条件。制动对局部环境缺氧是否有影响, 实验中未涉及, 也是实验的局限所在。有报道称过长时间制动导致韧带极限载荷下降, 反而影响愈合^[19]。实验中兔膝固定3周后即行解除, 避免过长时间制动阻碍其修复及力学功能重建。

总之, 实验结果显示, 造模后外固定制动可减少机械刺激对骨-腱连接点的影响及巨噬细胞聚集, 推测其可能减轻骨-腱连接点处的炎症反应, 进而促进其愈合。同时石膏外固定可增加骨-腱连接点间质细胞增殖、分化及细胞外基质的合成, 促进其愈合。

致谢: 感谢湖南省人民医院病理科喻宏副主任医师、钟仁华主管技师在组织切片及阅片过程的无私帮助, 感谢中南大学粉末冶金国家重点实验室及老师提供的力学测试设备及技术指导, 感谢师兄苗惊雷和刘波, 在论文修改上给予的建议。

4 参考文献

- [1] Li AG, Chen HH, Jiang B, et al. Zhongguo Jiaoxing Waikexue Zazhi. 2006;19(1):50-53. 李爱国, 陈鸿辉, 江斌, 等. 骨膜促进骨-腱连接点愈合的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 19(1):50-53.
- [2] Wang L, Lv HB, Huo BJ, et al. Yiyong Shengwu Lixue. 2006;21(4):291-297. 王琳, 吕红斌, 霍碧君, 等. 兔髌骨-腱结合部新骨形成与大小预测其愈合程度[J]. 医用生物力学, 2006, 21(4):291-297.
- [3] Li AG, Chen HH, Jiang B, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(15):2677-2680. 李爱国, 陈鸿辉, 江斌, 等. 腱周组织及骨膜对骨-腱结合部位早期愈合质量的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(15): 2677-2680.
- [4] Dagher E, Hays PL, Kawamura S, et al. Immobilization Modulates Macrophage Accumulation in Tendon-Bone Healing. Clin Orthop Relat Res. 2009;467(1):281-287.
- [5] Li MW, Zhou XS. Jieyou yu Linchuang. 2010;15(4):290-292. 李明伟, 周新社. 异体骨修复骨关节缺损后腱-骨固定和愈合的研究进展[J]. 解剖与临床, 2010, 15(4): 290-292.
- [6] Fealy S, Rodeo SA, MacGillivray JD, et al. Biomechanical evaluation of the relation between number of suture anchors and strength of the bone-tendon interface in a goat rotator cuff model. Arthroscopy. 2006;22(6):595-602.
- [7] Fu GJ, Jin AM, Li S, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(7):1187-1190. 付国建, 靳安民, 李森, 等. 肩袖损伤模型兔持续被动活动对骨-肌腱界面早期修复的影响: MRI不同时点影像证实[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1187-1190.
- [8] Lu H, Hu J, Qin L, et al. Area, length and mineralization content of new bone at bone-tendon junction predict its repair quality. J Orthop Res. 2011;29(5):672-677.
- [9] Wong MW, Qin L, Lee KM, et al. Articular cartilage increases transition zone regeneration in bone-tendon junction healing. Clin Orthop Relat Res. 2009;467(4):1092-1100.
- [10] Nebelung W, Becker R, Urbach D, et al. Histological findings of tendon-bone healing following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring grafts. Arch Orthop Trauma Surg. 2003;123(4):158-163.
- [11] Qin L, Leung KS, Chan CW, et al. Enlargement of remaining patella after partial patellectomy in rabbits. Med Sci Sports Exerc. 1999;31(4):502-506.
- [12] Jiang B, Chen HH. Guoji Gukexue Zazhi. 2009;30(5):296-298. 江斌, 陈鸿辉. 骨-肌腱结合部损伤愈合研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2009, 30(5):296-298.
- [13] Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. J Orthop Res. 2006;24(3):541-550.
- [14] Wong MW, Qin L, Tai JK, et al. Engineered allogeneic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction--a preliminary histological observation. Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004;70(2):362-367.
- [15] Lu H, Qin L, Fok P, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone-tendon junction healing: a partial patellectomy model in rabbits. Am J Sports Med. 2006;34(8):1287-1296.
- [16] Kim HJ, Kang SW, Lim HC, et al. The role of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein with fibrin glue in healing of bone-tendon junction injury. Connect Tissue Res. 2007;48(6):309-315.
- [17] Zhu ZQ, Jiang JM, Leng YK, et al. Biomechanical research of SOX9, CTGF in bone tendon junction healing. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2011;27(7):797-798.
- [18] Zhao J, Zhang P, Qin L, et al. Hypoxia is essential for bone-tendon junction healing: the molecular biological evidence. Int Orthop. 2011;35(6):925-928.
- [19] Ni GX, Cheng HP, Wu ZY. Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi. 1999;16(3):300-302. 倪国新, 成海平, 吴宗耀. 膝关节制动对髌韧带力学特性影响的实验研究[J]. 生物医学工程学杂志, 1999, 16(3):300-302.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验由王靖和张朝跃设计, 实验实施为王靖、谭财福, 实验评估为张朝跃, 资料收集为王靖, 谭财福, 王靖成文, 张朝跃审核, 王靖对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验中对动物的处置方法符合科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。