

# 超声治疗应力屏蔽大鼠跟腱白细胞介素1 $\beta$ 的表达\*

张晶, 马燕红, 王伟, 晏小燕, 赵华坤

## Interleukin 1 beta expression in Achilles tendon of stress-shielded rats following ultrasound treatment

Zhang Jing, Ma Yan-hong, Wang Wei, Yan Xiao-yan, Zhao Hua-kun

Department of Rehabilitation Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Zhang Jing★, Studying for master's degree, Department of Rehabilitation Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China  
d-zj@yeah.net

Correspondence to: Ma Yan-hong, Associate chief physician, Department of Rehabilitation Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China  
d-zj@yeah.net

Received: 2010-03-30  
Accepted: 2010-05-10

上海交通大学附属第六人民医院康复医学科, 上海市 200232

张晶★, 男, 1983年生, 陕西省榆林市绥德县人, 上海交通大学医学院在读硕士, 主要从事骨关节康复方面的研究。  
d-zj@yeah.net

通讯作者: 马燕红, 副主任医师, 上海交通大学附属第六人民医院康复医学科, 上海市 200232

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)30-05622-04

收稿日期: 2010-03-30  
修回日期: 2010-05-10  
(20100330025/M·L)

### Abstract

**BACKGROUND:** Ultrasound has been clinically used to treat acute and chronic soft tissue injury, but the ultrasonic treatment for tendon contracture has been rarely reported.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of ultrasonic treatment on level of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in Achilles of stress-shielded rats.

**METHODS:** Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups: normal group, model group, and ultrasound treatment group. The left hind limbs of all rats of the later two groups were modeled using Achilles tendon cerclage combined with sciatic nerve cut method. At 3 weeks after surgical operation, the treatment group was subjected to ultrasound treatment, strength 1W/cm<sup>2</sup>, frequency 1MHz, inflation ratio 20%, 5 days per week, once per day, 10 minutes once, for a total of 3 weeks. At 6 weeks post-surgery, the left hind limb Achilles tendon tissue was detected by transmission electron microscopy and the level of IL-1 $\beta$  was detected by enzyme-labeled immunosorbent assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After 3 weeks of ultrasound treatment, collagen fibers arranged neater than in the model, small fibers decreased, closed to the control group. The level of IL-1 $\beta$  in the model group was significantly higher than the normal group. After ultrasound treatment, the level of IL-1 $\beta$  was dramatically decreased. The results suggested that ultrasound treatment played an effective role in the treatment of Achilles tendon contracture, which might reduce the level of IL-1 $\beta$  in the Achilles tendon.

Zhang J, Ma YH, Wang W, Yan XY, Zhao HK. Interleukin 1 beta expression in Achilles tendon of stress-shielded rats following ultrasound treatment. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(30): 5622-5625.  
[http://www.crter.cn http://en.zgclckf.com]

### 摘要

**背景:** 临床上超声被用于软组织急性慢性损伤的治疗, 但是关于超声波治疗肌腱挛缩的实验研究较少。

**目的:** 观察超声对应力屏蔽后大鼠跟腱的作用和白细胞介素 1 $\beta$  水平的影响。

**方法:** 将 24 只 SD 大鼠随机分为正常组, 造模组和超声治疗组, 后 2 组大鼠左后肢用跟腱环扎联合坐骨神经切断的方法造模, 治疗组术后 3 周开始进行超声治疗, 强度为 1 W/cm<sup>2</sup>, 频率为 1 MHz, 通胀比为 20%, 每周治疗 5 d, 1 次/d, 10 min/次, 治疗共 3 周。术后 6 周取其左后肢部分跟腱组织, 进行透射电镜检测, 并采用 ELISA 法检测白细胞介素 1 $\beta$  水平。

**结果与结论:** 超声治疗 3 周后胶原纤维排列较造模组整齐, 细小纤维减少, 接近于正常对照组。造模组白细胞介素 1 $\beta$  水平显著高于正常组, 超声治疗后白细胞介素 1 $\beta$  水平显著降低。结果提示超声治疗可以对挛缩跟腱有治疗作用, 可能与降低挛缩跟腱中白细胞介素 1 $\beta$  水平有关。

**关键词:** 跟腱; 超声治疗; 应力屏蔽; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 医学影像

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.30.027

张晶, 马燕红, 王伟, 晏小燕, 赵华坤. 超声治疗应力屏蔽大鼠跟腱白细胞介素 1 $\beta$  的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(30):5622-5625. [http://www.crter.org http://cn.zgclckf.com]

## 0 引言

因应力屏蔽引起肌腱的挛缩是制动所致关节僵硬的重要原因。近来研究发现, 肌腱挛缩过程中白细胞介素1水平增高, 在挛缩过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。超声在临床上被用于软组织急性慢性损伤的治疗, 但是关于超声波治疗肌腱挛缩的实验研究较少<sup>[2]</sup>。本实验观察超声对完全应力屏蔽后的跟腱形态学和白细胞介素1 $\beta$ 水平的影响。

## 1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009-10/2010-03在上海交通大学附属第六人民医院动物实验楼和中心实验室完成。

**材料:** 6-8周龄雄性SD鼠24只, 体质量(180 $\pm$ 10) g, 由上海市第六人民医院动物实验室提供并代饲养。随机分为3组, 分别为正常组, 造模组和超声治疗组, 每组8只。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[3]</sup>。

### 方法:

**大鼠跟腱应力屏蔽动物模型制作:** 造模组和超声治疗组大鼠的左肢行跟腱完全应力屏蔽造模, 参照Palmer等<sup>[4]</sup>以及王伟等<sup>[5]</sup>方法制作模型, 用2-0肌腱缝线, 穿过SD大鼠左后肢的胫

腓关节和足底筋膜于跟骨之间的间隙, 然后拉紧至足跖屈最大角度, 保持马蹄足位, 并且将坐骨神经在分出胫神经和腓总神经的近端切断, 然后缝合伤口。术后给予青霉素预防感染, 如3 d内持续保持马蹄足位, 则造模成功。

**术后处理及超声治疗:** 大鼠分笼喂养, 正常饮食。超声治疗组术后3周开始超声治疗, 强度为  $1 \text{ W/cm}^2$ , 频率为  $1 \text{ MHz}$ , 通胀比为20%, 每周治疗5 d, 1次/d, 10 min/次, 治疗共3周。治疗时给予恩氟烷吸入麻醉, 大鼠俯卧位, 于左后肢跟腱后放置直径为1 cm的超声波传感器, 超声头与皮肤间均匀涂布耦合剂。造模组不予治疗, 但术后护理, 饮食, 活动与治疗组相同。正常组不予手术, 不予治疗, 余均相同。

**取材并电镜观察:** 术后6周动物用过量氯胺酮麻醉致死, 取其左后肢部分跟腱组织, 进行透射电镜检测。

**白细胞介素  $1\beta$  水平的测定:** 取每只大鼠剩余跟腱组织20 mg, 迅速用眼科剪剪碎后放入预冷的研钵内, 边倒入液氮边研磨, 以保持跟腱组织的脆性, 直至研成粉末状为止, 迅速用药匙将其转移至1.5 mL EP管中, 取预加PMSF的RIPA裂解液至EP管, 并冲洗研钵和研棒, 将冲洗液一并转移至EP管中, 密封EP管后用力振荡, 使跟腱组织更好地接触到裂解液, 裂解30 min后,  $14\,000 \text{ r/min}$   $4^\circ\text{C}$ , 离心10 min后小心吸取上清液, 移入新的离心管中, 进行ELISA检测白细胞介素  $1\beta$  水平。

**主要观察指标:** 电镜下胶原纤维的形态; 白细胞介素  $1\beta$  水平。

**设计、实施、评估者:** 均为本文作者。

**统计学分析:** 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采取SPSS 11.0 统计软件进行独立样本组间  $t$  检验分析。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 参加实验数量为24只, 进入结果分析数量为24只, 中途无脱落。

**2.2 透射电镜观察形态学改变** 纵切面: 正常组胶原原纤维排列整齐(图1); 造模组的胶原原纤维排列紊乱, 出现纵横交叉排列(图2); 超声治疗组的胶原原纤维排列较造模组整齐, 但较正常组紊乱(图3)。

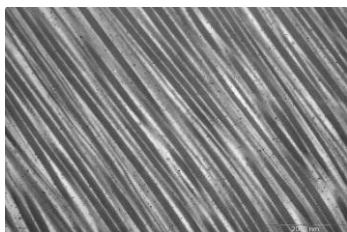


Figure 1 Normal group tendon longitudinal section ( $\times 17\,500$ , scale bar: 2 000 nm)  
图1 正常组肌腱纵切面( $\times 17\,500$ , 标尺 2 000 nm)

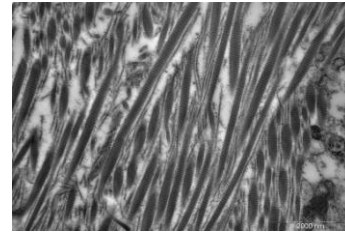


Figure 2 Model group tendon longitudinal section ( $\times 17\,500$ , scale bar: 2 000 nm)  
图2 造模组肌腱纵切面( $\times 17\,500$ , 标尺 2 000 nm)

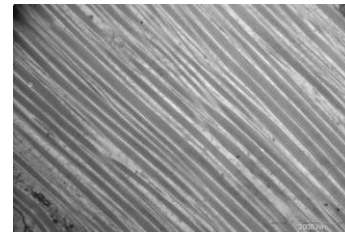


Figure 3 Treatment group tendon longitudinal section ( $\times 17\,500$ , scale bar: 2 000 nm)  
图3 治疗组肌腱纵切面( $\times 17\,500$ , 标尺 2 000 nm)

横切面: 正常组胶原原纤维大小均匀(图4), 造模组胶原原纤维与正常组比较明显细小(图5), 超声治疗组胶原原纤维与正常组比较直径大小不匀, 与造模组比较细小纤维明显减少(图6)。

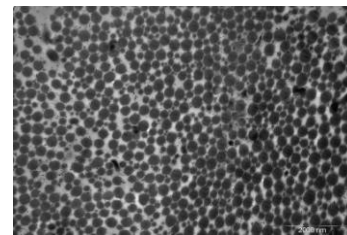


Figure 4 Normal group tendon transversal section ( $\times 17\,500$ , scale bar: 2 000 nm)  
图4 正常组肌腱横切面( $\times 17\,500$ , 标尺 2 000 nm)

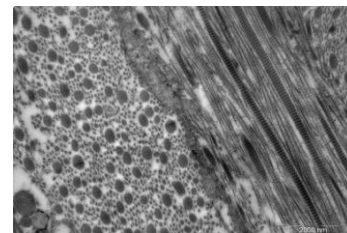


Figure 5 Model group tendon transversal section ( $\times 17\,500$ , scale bar: 2 000 nm)  
图5 造模组肌腱横切面 ( $\times 17\,500$ , 标尺 2 000 nm)

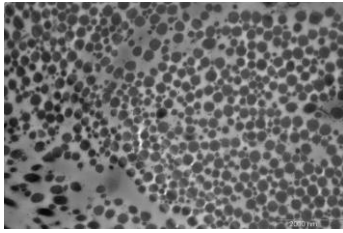


Figure 6 Treatment group tendon transversal section ( $\times 17\ 500$ , scale bar: 2 000 nm)  
图 6 治疗组肌腱横切面( $\times 17\ 500$ , 标尺 2 000 nm)

2.3 白细胞介素 1 $\beta$  的检测结果 正常组白细胞介素 1 $\beta$  水平(38.514 $\pm$ 3.743) ng/L; 造模组(55.652 $\pm$ 2.590) ng/L, 超声治疗组(29.562 $\pm$ 4.125) ng/L。正常组和造模组比较,  $t=7.530$ , 双侧 $P=0.000$ ,  $P < 0.05$ , 两样本均数之间差异有显著性意义。造模组和治疗组比较,  $t=11.389$ , 双侧 $P=0.000$ ,  $P < 0.05$ , 两样本均数之间差异有显著性意义。正常组和治疗组比较,  $t=3.368$ , 双侧 $P=0.015$ ,  $P < 0.05$ , 两样本均数之间差异有显著性意义。见图 7。

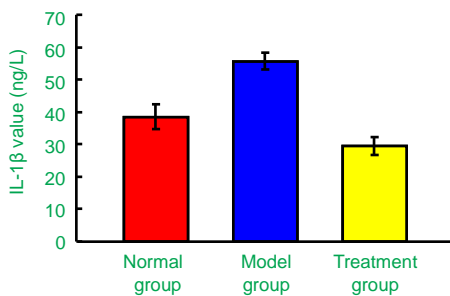


Figure 7 The level of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in each group  
图 7 各组白细胞介素 1 $\beta$  水平分布直方图

### 3 讨论

本实验透射电镜结果显示, 大鼠跟腱完全屏蔽 6 周后, 胶原原纤维与正常跟腱相比, 排列明显紊乱, 以细小纤维为主。此结果与以往制动对肌腱和韧带组织的影响研究结果一致<sup>[5,7]</sup>。超声治疗组的胶原原纤维排列较造模组整齐, 未见细小纤维增多, 整体特点接近于正常跟腱组织。因此从形态学上可以发现超声治疗对应力屏蔽后的大鼠挛缩跟腱有显著改善作用。

以往研究发现超声对韧带肌腱的损伤有良好的治疗作用。Takakura 等<sup>[8]</sup>研究发现超声可加速膝关节内侧副韧带损伤的早期愈合。Enwemeka 等<sup>[9]</sup>证实超声治疗可促进患者术后跟腱的修复, Yeung 等<sup>[10]</sup>也运用跟腱断裂后的鼠模型进行研究, 证实每天 5 min、每周 3 次的脉冲超声治疗 2 周或 4 周后, 肌腱的愈合加快。Lü 等<sup>[11]</sup>利用兔行髌骨部分切除术后髌骨髌腱重建模型, 术后 3 d 开始每天对髌骨-髌腱连接点处进行超声治疗, 结果

证实超声有助于加速骨-肌腱的修复, 主要以促进其早期复原最为明显。本实验对完全应力屏蔽 3 周的跟腱, 进行 3 周的局部超声治疗后, 发现组织形态虽然与正常跟腱仍有差别, 但较造模组接近正常。这些研究提示, 超声可以影响损伤或挛缩肌腱的组织代谢。

低中强度的超声波作用于组织主要产生热作用和机械波作用。温热作用可能使得含有胶原较多的组织伸展性暂时得到增加, 局部微循环增强, 减轻炎症反应<sup>[5]</sup>。弹性机械波产生的微液流可以使得细胞膜的结构和功能发生变化。微液流可影响细胞信使钙离子内流, 及其他离子的跨膜扩散和转运<sup>[12-13]</sup>。Reher 等<sup>[14]</sup>的研究发现超声干预后白细胞介素 8, 碱性成纤维细胞生长因子在下颌骨成骨细胞中表达增加, 血管内皮生长因子则在所有细胞中表达增加。Li 等<sup>[15]</sup>发现了特定强度的超声治疗可以升高转化生长因子 $\beta$  的表达水平和降低白细胞介素 6, 肿瘤坏死因子 $\alpha$  的表达水平, 均表明超声的确可以影响到细胞因子的表达。本实验结果提示, 超声能降低挛缩肌腱增高了的白细胞介素 1 $\beta$  的水平, 而且超声治疗 3 周后的白细胞介素 1 $\beta$  水平显著降低正常, 说明超声能干预白细胞介素 1 $\beta$  水平, 其机制尚待进一步研究。

肌腱由细胞外基质和少量肌腱细胞组成, 细胞外基质主要是平行排列的, 较粗大的 I 型胶原纤维组成, 较细小的 III 型胶原含量很少<sup>[16]</sup>。肌腱挛缩的病理基础主要表现胶原组织的异常。白细胞介素 1 是肌腱细胞分泌的一种具有多种生物活性的细胞因子<sup>[17]</sup>。白细胞介素 1 会建立有效的正反馈环来触动肌腱细胞介导的细胞素-金属基质蛋白酶基质破坏<sup>[18]</sup>。白细胞介素 1 会诱导金属基质蛋白酶 1 及金属基质蛋白酶 3 的基因表达, 激发分解代谢, 从而降低 I 型胶原蛋白的表达<sup>[19-20]</sup>。Uchida 等<sup>[1]</sup>在兔髌腱应力屏蔽模型中发现, 髌腱中肌腱细胞的白细胞介素 1 $\beta$  表达增加。这与本研究结果相似。本次研究还发现, 应力屏蔽 3 周后, 给以超声治疗 3 周, 伴随着形态学的改善, 白细胞介素 1 $\beta$  水平显著下降。故推测超声对挛缩肌腱的改善作用很可能与其降低白细胞介素 1 $\beta$  水平有关。

本实验发现, 超声治疗对完全应力屏蔽后发生的肌腱挛缩有改善作用, 并且可能与其干预白细胞介素 1 $\beta$  水平有关。更多的关于肌腱挛缩过程中的细胞因子调控及超声治疗的作用机制尚需进一步探索。

### 4 参考文献

- Uchida H, Tohyama H, Nagashima K, et al. Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon. *J Biomech.* 2005;38(4):791-798.
- Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med.* 2003;33(2):95-107.



- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [4] Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, et al. Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. J Orthop Res. 2002;20(5):939-946.
- [5] Wang W, Ma YH. Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian. 2009;15(6):521-523. 王伟, 马燕红. 大鼠跟腱应力屏蔽挛缩模型的建立[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(6):521-523.
- [6] Nan DK. Beijing: People's Medical Publishing House. 2005. 南登昆. 康复医学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [7] Majima T, Yasuda K, Tsuchida T, et al. Stress shielding of patellar tendon: effect on small-diameter collagen fibrils in a rabbit model. J Orthop Sci. 2003;8(6):836-841.
- [8] Takakura Y, Matsui N, Yoshiya S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. J Ultrasound Med. 2002;21(3):283-288.
- [9] Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S. The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. Ultrasound Med Biol. 1990;16(8):801-807.
- [10] Yeung CK, Guo X, Ng YF. Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. J Orthop Res. 2006;24(2):193-201.
- [11] Lü 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.
- [12] Coakley WT. Biophysical effects of ultrasound at therapeutic intensities. Physiotherapy. 1978;64(6):166-169.
- [13] Dyson M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. Br J Cancer Suppl. 1982;5:165-171.
- [14] Reher P, Doan N, Bradnock B, et al. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. Cytokine. 1999;11(6):416-423.
- [15] Li JK, Chang WH, Lin JC, et al. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. Biomaterials. 2003;24(13):2379-2385.
- [16] Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports. 2000;10(6):312-320.
- [17] Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J. 1994;8(15):1314-1325.
- [18] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996;87(6):2095-2147.
- [19] Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, et al. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. J Orthop Res. 2003;21(2):256-264.
- [20] Archambault J, Tsuzaki M, Herzog W, et al. Stretch and interleukin-1beta induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. J Orthop Res. 2002;20(1):36-39.

#### 来自本文课题的更多信息一

**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。

**课题的意义:** 进一步完善了完全应力屏蔽致大鼠跟腱挛缩动物模型的建立方法, 不仅利用透射电镜观察跟腱中胶原纤维的形态和排列, 并且用 ELISA 法检测了白细胞介素 1 $\beta$  的表达水平, 对超声治疗的研究深入到细胞因子的水平。

**课题评估的“金标准”:** 目前尚未有评价的金标准。

**设计或课题的偏倚与不足:** ① 观察生化指标较为单一, 细胞因子的作用相当复杂, 跟腱挛缩以及超声的治疗作用是由多种细胞因子共同调控的结果, 关于其他细胞因子表达水平是否参与还需进行大量研究工作。② 超声治疗强度可增加分组, 进行组内比较, 可进一步研究超声不同治疗强度治疗作用的差异。

**提供临床借鉴的价值:** 给临床上超声治疗肌腱挛缩提供了良好的实验支持和理论依据, 也给应用相关细胞因子药物治疗肌腱挛缩提供了新思路。

## CRTER 杂志对关键词标引的要求: 本刊中文部

每篇文章需标引 5~8 个关键词。请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版 Index Medicus 中医学主题词表 (MeSH) 内所列的词及《中医药学主题词表》中的词, 必要时, 可采用习用的自由词并排列于最后。关键词中的缩写词应按 MeSH 还原为全称, 如“HbsAg”应标引为“乙型肝炎表面抗原”。对非医学科关键词, 根据相应学科标准进行规范。

本刊推荐的关键词:

### ○ 干细胞研究

胚胎干细胞; 脐带干细胞; 脐血干细胞; 羊膜干细胞; 羊水干细胞; 骨髓间充质干细胞; 造血干细胞; 肿瘤干细胞; 精原干细胞; 生殖干细胞; 成骨干细胞; 软骨干细胞; 肌肉干细胞; 神经干细胞; 脂肪干细胞; 心脏干细胞; 气管干细胞; 肝脏干细胞; 胰腺干细胞; 胃肠干细胞; 内皮干细胞; 角膜干细胞; 皮肤干细胞; 毛囊干细胞; 乳腺干细胞; 前列腺干细胞; 涎腺干细胞

### ○ 生物材料研究

生物活性骨水泥材料; 骨科内植物材料; 骨替代材料; 组织诱导性生物材料; 牙周与口腔组织再生修复材料; 牙科与颅颌面生物材料; 矫形外科材料; 血管内支架材料; 药物控释系统及其载体材料; 纳米生物材料; 生物医用水凝胶材料; 软组织工程材料; 组织工程皮肤材料; 组织工程支架材料; 神经再生修复材料; 血液净化材料; 医疗器械材料; 医用高分子材料; 生物活性涂层材料; 表面生物矿化材料; 生物医用可降解高分子材料; 医用智能高分子材料; 新型非病毒基因载体材料; 纤维状及含纤维结构生物材料; 丝蛋白基生物材料; 生物衍生材料; 医用金属材料; 生物陶瓷材料; 生物制造快速成型材料; 生物传感器与生物芯片材料; 微电子植入器件材料

### ○ 组织工程研究

骨组织工程; 软骨组织工程; 肌肉肌腱组

织工程; 血管组织工程; 心肺组织工程; 皮肤组织工程; 神经组织工程; 肝脏组织工程; 口腔组织工程; 泌尿系统组织工程; 眼科组织工程

### ○ 医学植入物研究

人工假体: 髋关节假体; 膝关节假体; 肩关节假体

医学植入物: 硬组织植入物; 软组织植入物

心血管植入物: 管腔植入物; 植入物与影像技术

数字化医学: 数字化骨科技术; 数字化外科技术; 数字化口腔科技技术; 数字化眼科技术; 数字化心血管技术; 数字化神经科技技术; 数字化洗血管科技技术; 数字化影像技术

### ○ 器官移植研究

肾移植; 肝移植; 心肺移植; 肠移植; 脾移植; 腺体移植; 组织移植; 细胞移植。