

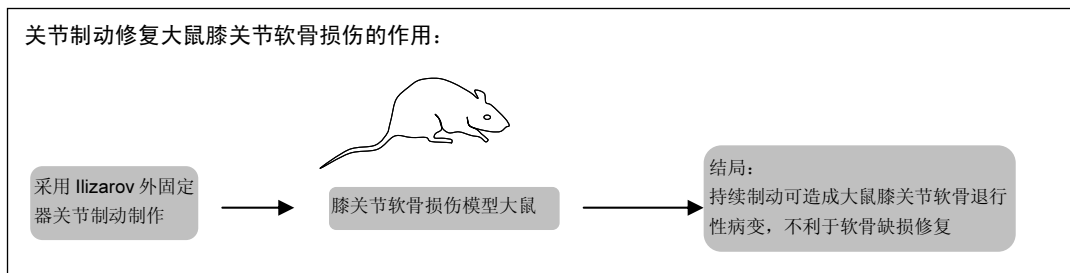
关节制动对大鼠膝关节软骨缺损修复的影响

徐立岩¹, 马剑雄², 王颖², 孙磊², 张春秋³, 马信龙^{1, 2}(¹天津医科大学, 天津市 300070; ²天津市天津医院骨科研究所, 天津市 300050; ³天津理工大学, 天津市 300384)

引用本文: 徐立岩, 马剑雄, 王颖, 孙磊, 张春秋, 马信龙. 关节制动对大鼠膝关节软骨缺损修复的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(37):5496-5503.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.37.004 ORCID: 0000-0001-9212-8092(马信龙)

文章快速阅读:



徐立岩, 男, 1989 年生, 汉族, 2016 年天津医科大学毕业, 硕士。

通讯作者: 马信龙, 博士生导师, 教授。天津医科大学, 天津市 300070; 天津市天津医院骨科研究所, 天津市 300050

文题释义:

Ilizarov 外固定器: Ilizarov 装置是一种复杂的环形支架系统, 通过多平面的水平穿透骨骼和肢体的克氏针与支架相连, 它包含许多组件, 在延长的同时可以矫正成角和旋转畸形; 同时还有加压、延长和横向移位的功能。

关节制动: 是经常用于骨骼肌肉损伤中来治疗关节疼痛以及关节损伤的一种方法, 研究发现制动和其他治疗方法相比能减少受损滑膜关节的疼痛, 减小关节应力, 阻止受损关节的骨性关节炎进程。

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)37-05496-08

稿件接受: 2016-07-13

摘要

背景: 关节制动是骨科中常用来治疗关节疼痛以及关节损伤的一种方法, 制动和其他治疗方法相比能减少受损滑膜关节的疼痛, 避免受损关节面间的接触应力以及摩擦力。但是制动常常会引起一些不良并发症如关节挛缩、关节周围骨质疏松以及软骨退变。

目的: 观察关节制动对大鼠膝关节软骨损伤修复的影响。

方法: 36 只 SD 大鼠麻醉后, 在一侧股骨髁间窝使用角膜环钻钻出直径 2.5 mm 及深 2.0 mm 的全层软骨缺损, 而后随机分为制动组和对照组, 每组 18 只, 对照组单纯造模后不作任何处理, 而制动组造模后立即采用经设计和改良的小动物外固定架伸直位进行跨关节制动。

结果与结论: ①软骨缺损修复速度: 制动组与对照组的软骨缺损修复速度差异无显著性意义; ②组织学染色: 两组再生组织主要为纤维细胞, 术后 8 周, 制动组的 Wakitani 评分和 Mankin 评分高于对照组 ($P < 0.05$); ③软骨代谢标志物检测: 与对照组相比, 制动组大鼠干预 8 周后尿样中 II 型胶原交联 C 末端肽水平显著提高 ($P < 0.05$); ④结果说明: 持续制动可造成大鼠膝关节软骨退行性病变, 不利于软骨缺损修复。

关键词:

组织构建; 软骨组织工程; 制动; 关节软骨; 软骨修复; 软骨退变; 甲状旁腺素; 基质金属蛋白酶; II 型胶原; 大鼠; II 型胶原交联 C 末端肽; 外固定架; 国家自然科学基金

主题词:

组织工程; 骨关节炎; 膝关节

基金资助:

国家自然科学基金(11172208)

Xu Li-yan, Master, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author:
Ma Xin-long, Doctoral supervisor, Professor, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Effects of joint immobilization on the repair of articular cartilage of the rat knee

Xu Li-yan¹, Ma Jian-xiong², Wang Ying², Sun Lei², Zhang Chun-qiu³, Ma Xin-long^{1,2} (¹Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ²Orthopedics Research Institute, Tianjin Hospital, Tianjin 300050, China; ³Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

Abstract

BACKGROUND: Joint immobilization is one of the methods used to treat joint pain and joint injury in the department of orthopedics. Compared with other treatment methods, immobilization can reduce the pain of the damaged synovial joints and avoid the contact stress and friction between the joints. However, immobilization can cause some serious complications such as joint contracture, osteoporosis and cartilage degeneration.

OBJECTIVE: To observe the effects of joint immobilization on the repair of cartilage injury of knee joint in rats.

METHODS: Osteochondral full-thickness defects (2.5 mm in diameter; 2 mm in depth) were created in the left femoral condyle fossa with a corneal trephine. 36 animals were randomly assigned into immobilization group and control group ($n=18$ per group). In the control group, animal models were established, without any treatment. In the immobilization group, after model establishment, rats were immobilized by a designed and modified simplified miniature Ilizarov fixator.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Repair rate of cartilage defect: No significant difference in repair rate was detected between immobilization group and control group. (2) Histological staining: Regeneration tissue was mainly fiber cells in both groups. At 8 weeks after surgery, Wakitani score and Mankin score were higher in the immobilization group than in the control group ($P < 0.05$). (3) Cartilage metabolic marker detection: Compared with the control group, at 8 weeks, C-telopeptide of type II collagen levels in the urine were significantly higher in the immobilization group than in the control group ($P < 0.05$). (4) Results indicated that persistent immobilization could result in cartilage degeneration, and it was detrimental for cartilage repair.

Subject headings: Tissue Engineering; Osteoarthritis; Knee Joint

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 11172208

Cite this article: Xu LY, Ma JX, Wang Y, Sun L, Zhang CQ, Ma XL. Effects of joint immobilization on the repair of articular cartilage of the rat knee. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(37):5496-5503.

0 引言 Introduction

制动是经常用于骨骼肌肉损伤中来治疗关节疼痛以及关节损伤的一种方法^[1], 研究发现制动和其他治疗方法相比能减少受损滑膜关节的疼痛^[2], 减小关节应力, 阻止受损关节的骨性关节炎进程^[3], 早期制动干预对治疗和阻止骨性关节炎进程有重要意义^[4]。但是它常会引起一些引发肌肉骨骼系统的不良并发症, 特别是关节软骨, 导致短暂性或永久性身体残疾或功能障碍, 如关节挛缩、关节周围骨质疏松以及软骨退变^[5]。Arakaki等发现对膝关节进行制动时会严重影响骨和肌肉组成、制动部分的血供甚至是关节结构^[6]。Bedi等^[7]认为这些损伤以及退行性关节炎如果处理不当会引发退行性关节炎和功能异常。

关节软骨的退变也会因制动方法的不同而表现的不同, Vanwanseele等^[8]在临床上也发现脊髓损伤的患者膝关节软骨会有进行性退变表现, 关节软骨变薄; 悬吊制动会导致关节软骨细胞活性减低继而引起关节萎缩^[9]; 使用内固定或外固定等刚性制动会引起更严重的软骨退变^[10]; 顾延等^[11]通过切除大鼠一侧跟腱, 发现低应力侧软骨发生退变, 退变首先出现于软骨细胞, 并以细胞功能活动衰退

和细胞退变、崩解为主要特点, 继而软骨基质出现断裂和破坏, 软骨细胞和软骨基质的退变呈进行性发展。

软骨具有复杂的层结构, 其结构与功能是适应力学环境的结果, 关节软骨对力学环境较为敏感, 偏离正常生理载荷组织都要发生退变, 软骨生长、发育和维持正常生理功能都需要合适载荷的作用。Mollon等^[12]观察到滑膜关节损伤的理想治疗方法应该包括适度的活动以此恢复支撑性能和减小摩擦力以及身体负重引起的软骨磨损, 不但能提高关节机械性能而且还能延缓甚至抑制关节炎的进程。Gu等^[13]研究发现运动能减轻疼痛, 维持关节活动度, 缩短住院或康复的时间。所以, 适当的力学刺激能抑制或减轻关节僵硬, 提高滑液流动和营养物质, 刺激愈合和软骨再生, 是软骨缺损修复的重要条件, 也是软骨维持自身功能结构正常的重要条件。

机械刺激对软骨修复起着重要的作用, 那么经制动后机械刺激减弱或消失, 软骨损伤是否还能修复, 所以实验目的是从不同时间点观察软骨在制动与机械刺激条件下的自我修复情况。实验主要研究相对较小的骨软骨缺损的自我修复情况, 根据文献报道是不施加任何干

预条件下是可以自我修复的,但实验还要观察加上制动干预后的失应力条件下对软骨修复是否有影响,并从组织学上评估制动产生的失应力条件对大鼠膝关节软骨缺损修复过程的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2015年3至7月在天津市中西医结合骨科研究所实验室完成。

1.3 材料 于天津医科大学动物实验中心购买36只3月龄SD大鼠,雌雄不限,体质量300-350 g,饲养温度(22±2) °C,相对湿度50%-80%,昼夜均为12 h的动物房里,所有动物自由进食水和食物。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及干预 腹腔注射水合氯醛3 mL/kg将大鼠麻醉后,将其仰卧固定于消毒过的鼠板上,取其左侧后腿关节,予剃毛、常规消毒、铺巾。取膝关节髌韧带内侧缘切口,从髌韧带内侧进入,屈曲膝关节,将髌骨导向外侧脱位,暴露出股骨滑车部。在股骨髌间窝使用角膜环钻钻出直径2.5 mm深2.0 mm的全层软骨缺损,建立膝关节软骨缺损大鼠模型。建模后将36只大鼠随机分为2组,每组18只,对照组造模后不作处理,制动组采用实验团队自己改良设计的小型Ilizarov外固定器^[15](包括两个外径35 mm、内径25 mm、厚1 mm的铝合金圆环,12个六角螺母,以及3根长42 mm直径3 mm的螺纹杆),伸直位跨关节制动,先将外固定架套入膝关节附近,然后分别在股骨远端以及胫骨近端垂直骨面打进2根0.8 mm的克式针,然后将克式针经带帽的凸纹螺母固定在外固定架上,向远端调节螺母使股骨胫骨稍稍分离,促使关节面处于低应力环境,术后进行消毒抗感染,连续3 d肌肉注射青霉素钠,每日40万单位/只。

1.4.2 一般观察 分别于术后第2, 4, 8周取材,观察膝关节有无挛缩、粘连和血肿形成;关节液的颜色和量;缺损处修复组织的填充情况、表面规则性、光泽度以及周围软组织的结合情况;缺损周围软组织的色泽和表面平整性。

1.4.3 组织学染色 分别于术后第2, 4, 8周时分批给大鼠麻醉后脱椎处死,行膝关节内侧切口,钝性分离关节周围的肌肉,用咬骨钳剪下远端股骨,将其浸入40 g/L多聚甲醛溶液中固定24 h,体积分数10%EDTA溶液中脱钙6周,石蜡常规包埋,矢状位切片,放入二甲苯,逐级乙醇脱蜡脱水,行苏木精-伊红染色后对缺损处修

复组织的细胞形态、基质异染性、表面规则性、软骨厚度以及与周围软组织的结合情况进行光学显微镜下观察并结合Wakitani评分^[16](0-14分,得分越高软骨缺损修复越差)标准做组织学评分;行番红O染色后对缺损周围软组织的结构、细胞排列、基质失染以及潮线完整性做光学显微镜下观察并结合改良的Mankin评分^[17](0-14分,分数越高退变越严重)标准进行评分,然后将实验组和对照组得分进行比较。所有评分均在光学显微镜下(10×10倍)下由2位独立观察者按相应的评分标准进行评分,取两者均值作为最终得分。

1.4.4 免疫组织化学染色 分别于术后第2, 4, 8周取材后进行免疫组织化学染色观察,切片脱蜡,乙醇梯度脱水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,加一抗:用油性笔在组织周围画圈,然后滴加稀释好的一抗,于4 °C湿盒中孵育过夜。第2天PBS冲洗3×5 min。除去PBS,加试剂2(聚合物辅助剂),室温下孵育20 min。PBS冲洗3×3 min。加试剂3(辣根过氧化物酶标记二抗IgG多聚体),室温下孵育30 min, PBS冲洗3×5 min。加显色剂:除去PBS,每张切片滴加一滴新鲜配制的DAB显色液,显微镜下观察5 min,阳性信号为棕黄色或棕褐色,当觉得可以时自来水冲洗切片终止显色。复染:水洗后用体积分数1%的盐酸乙醇分化,再用自来水水洗返蓝,脱水,中性树脂封固,光学显微镜下分析结果。结果判定:用PBS代替一抗做阴性对照,以细胞核或细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。通过II型胶原免疫组织化学对修复组织进行鉴别,判别再生组织是纤维软骨还是透明软骨,同时采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件,测定周围软骨组织切片单位面积II型胶原纤维免疫组织化学染色平均吸光度值。在光学显微镜下(10×20)下选取5个高倍镜视野,计算每个视野的基质金属蛋白酶3阳性细胞数和细胞总数,基质金属蛋白酶3表达量用阳性细胞数占细胞总数百分比表示^[11]。

1.4.5 尿中软骨代谢标志物测定 分别于术后第2, 4, 8周取材前收集大鼠尿液,为保持大鼠尿中软骨代谢标志物的蛋白活性,所有样本取材完成后尽快完成检测。正式检测前尿样一直置于-80 °C深低温冰箱中。采用高灵敏度的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测大鼠尿液中的软骨吸收指标II型胶原交联羧基端肽的浓度。尿样准备:将冻存的大鼠尿液样本从冰箱中取出缓慢的恢复到室温,然后慢慢地混匀。洗液的配制:按1:100的比例配制洗液备用。从冰箱中取出试剂盒放置20-30 min以恢复到室温(23 °C)。取出酶标板,按照II型胶原交联羧

基端肽标准品的次序分别向空白微孔中加入100 μL 的标准品溶液。其他微孔中分别加入100 μL 待测样品, 空白对照孔加入100 μL 蒸馏水。除空白对照孔外, 各孔中均加入50 μL 酶标记溶液。封闭酶标板, 置于孵育箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育反应1 h。使用蒸馏水以1:100的比例稀释浓缩洗涤液, 使用洗涤液清洗酶标板4-6次。使用吸水纸彻底拍干酶标板, 将50 μL 显色剂A和50 μL 显色剂B先后加入各孔中, 避光在室温下反应10 min。将50 μL 终止液加入各孔以使反应终止, 之后立即将酶标板置于酶标仪上测量并记录各孔的吸光度值(测量波长450 nm)。使用换算软件, 根据各孔的吸光度值换算出各血清样品中II型胶原交联羧基端肽的浓度。

1.5 主要观察指标 制动对关节软骨影响的大体观察结果, 各组Wakitani评分, Mankin评分, II型胶原以及基质金属蛋白酶3免疫组织化学阳性表达率, 尿中CTX-II的浓度。

1.6 统计学分析 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间数据差异比较采用独立样本的 t 检验或单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入大鼠36只, 无死亡, 2只出现关节融合现象, 2只出现针道感染, 最终共32只进入结果分析, 每组16只。

2.2 各组关节软骨一般形态 术后2周, 制动组和对照组一般形态无显著差异, 关节内无粘连、挛缩, 周围未见水肿, 关节液清亮, 软骨缺损区部分填充, 有凹陷, 缺损处有暗红色纤维肉芽组织填充, 未见软骨样组织的存在。缺损平面明显低于周围正常软骨, 周围软骨表面光滑, 色泽光亮。术后4周, 制动组软骨缺损区被修复组织基本填平, 散在比较浅的小凹陷, 有部分高出周围关节面, 表面不平整, 能观察到与周围组织分界, 周围软骨表面粗糙, 色泽黯淡; 对照组动物膝关节内关节液清亮, 未见粘连或挛缩, 软骨缺损区基本被再生组织充填完全, 再生组织表面与周围软骨基本持平, 边缘分界较模糊。周围软骨无异常改变。术后8周, 制动组部分出现膝关节粘连, 关节融合表现, 关节液浑浊, 可见明显凹陷, 未出现粘连的软骨缺损区修复组织基本填平, 周围软骨表面较粗糙, 色泽较黯; 对照组动物关节内关节液清亮, 未见粘连或挛缩, 软骨缺损区被再生组织完全充填, 再生组织呈米白色半透明状, 表面平坦, 与周围组织无明显分界, 周围软骨无异常改变。

2.3 各组关节软骨组织学变化 见图1, 2。术后2周, 制动组的缺损可见纤维组织填充, 有明显凹陷, 可见梭形纤维细胞增殖, 但细胞密度较低, 未见软骨细胞, 软骨基质含量很低或无基质着色(图1A), 缺损周围软骨表面平整, 无裂隙, 软骨基质轻度失染或无失染, 软骨细胞排列有序, 潮线正常(图2A)。同样的对照组在术后2周后缺损区被新生组织部分填充, 修复面不平整, 有明显的凹陷, 大量梭形的成纤维细胞增殖, 未见软骨细胞(图1D)。周围软骨细胞呈圆形或椭圆形, 轻度肥大, 形态饱满, 基质蕃红-O染色呈粉红色, 表层轻度失染(图2D)。术后4周, 制动组缺损基本修复, 部分修复表面要高于相邻关节软骨面, 修复组织仍以纤维组织为主。再生组织外周可见散在类软骨细胞, 中心部分主要是成纤维细胞, 细胞排列紊乱、密集, 基质染色较淡或失染(图1B)。周围软骨表层裂隙形成, 软骨细胞肥大, 形状不规则, 基质着色不均, 失染退变明显(图2B)。对照组缺损基本完全填充, 再生组织表面变平滑并且和周围软骨整合较好, 几乎一致或非常接近。修复组织为纤维组织, 可见散在小而圆的类软骨细胞排列整齐, 基质均匀着色, 但着色淡(图1E)。周围软骨细胞散在肥大, 基质深染或失染, 失染下移到软骨中下层, 可见潮线不完整(图2E)。术后8周缺损处填充完整, 主要为纤维组织, 有裂隙以及小血管存在, 可见下层有圆形类软骨细胞生成(图1C)。周围软骨层变薄, 细胞簇集明显, 排列紊乱, 层次不清, 重度失染, 潮线不完整或上移(图2C)。同时期在对照组观察到缺损区充填完整, 再生组织表面平滑且与周围组织整合较好, 与周围软骨高度相同, 修复组织有片状软骨样组织出现, 细胞外基质着色不均一(图1F)。周围软骨表层纤维化, 细胞肥大, 细胞排列规则, 分层明显, 基质异染明显、均匀, 有小血管侵入(图2F)。

2.4 各组组织学染色评分变化 见表1。术后2周, 制动组与对照组缺损修复较差, 两组Wakitani评分都很高, 但两组相比差异无显著性意义。周围软骨轻微退变, 两组Mankin评分较低, 两组比较差异无显著性意义。术后4周, 软骨缺损有所修复, 但主要是纤维组织, 两组Wakitani评分相比差异无显著性意义。对照组组内比较术后4周Wakitani评分显著低于术后2周, 制动组组内比较术后4周评分也显著低于2周。周围软骨退变程度加重, 两组Mankin评分增大, 但两组比较差异无显著性意义, 而组内比较发现无论对照组还是制动组术后4周Mankin评分都高于2周($P < 0.05$)。术后8周, 软骨缺损进一步修复, 对照组和制动组术后8周Wakitani评分显著低于4周, 但差

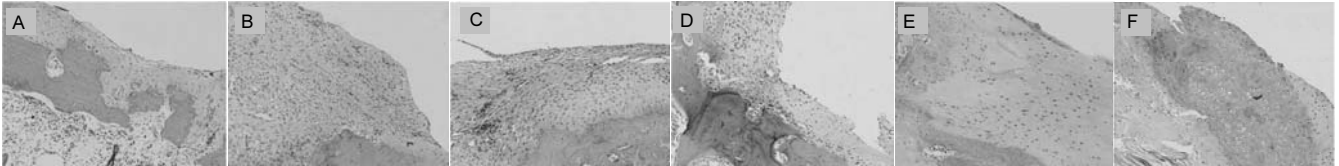


图1 各组关节软骨组织形态变化(苏木精-伊红染色, ×100)

Figure 1 Changes in histomorphology of the articular cartilage in each group (hematoxylin-eosin staining, ×100)

图注: 图中A-C分别为制动组术后2, 4, 8周; D-F分别为对照组2, 4, 8周。只有对照组(E, F)有类软骨细胞出现, 制动组均为纤维细胞。

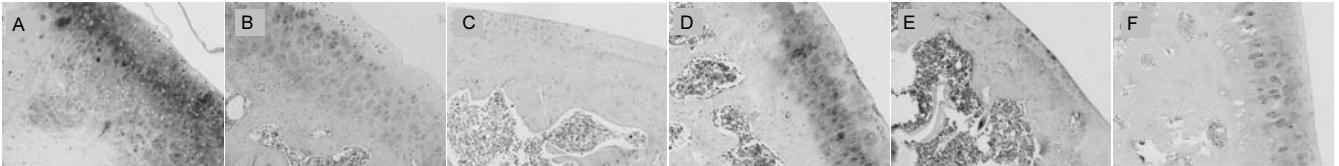


图2 各组关节软骨组织形态变化(番红O-固绿染色, ×100)

Figure 2 Changes in histomorphology of the articular cartilage in each group (safranin O-fast green staining, ×100)

图注: 图中A-C分别为制动组术后2, 4, 8周; D-F分别为对照2, 4, 8周。图C红色失染严重。

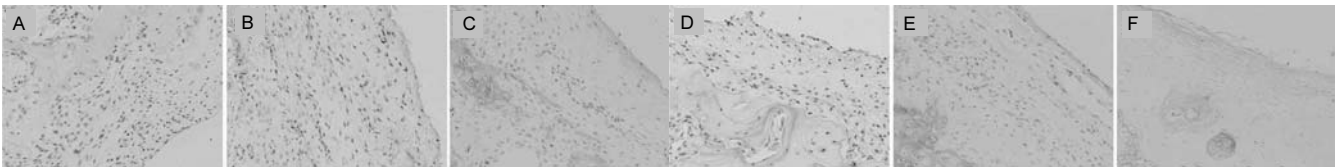


图3 各组关节软骨II型胶原的表达(免疫组织化学染色, ×200)

Figure 3 Immunoreactivity of type II collagen in the articular cartilage in each group (immunohistochemical staining, ×200)

图注: 图中A-C分别为制动组术后2, 4, 8周; D-F分别为对照2, 4, 8周。图F II型胶原阳性表达明显, 其他均不明显。

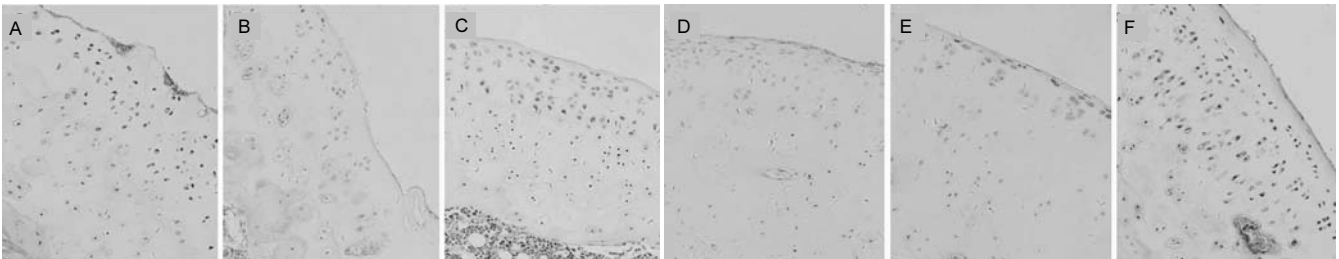


图4 各组关节软骨基质金属蛋白酶3表达(免疫组织化学染色, ×200)

Figure 4 Immunoreactivity of matrix metalloproteinase 3 in the articular cartilage of each group (immunohistochemical staining, ×200)

图注: 图中A-C分别为制动组术后2, 4, 8周; D-F分别为对照2, 4, 8周。图C阳性细胞数明显增多。

异无显著性意义。组间比较发现制动组的Wakitani评分高于对照组($P < 0.05$); 制动组周围软骨进一步退变, 术后8周Mankin评分显著高于术后4周, 而对照组有所恢复, 所以对照组8周评分低于术后4周($P < 0.05$)。组间比较制动组的Mankin评分高于对照组($P < 0.05$)。

2.5 各组关节软骨免疫组织化学染色结果 制动组术后2周II型胶原呈阴性表达(图3A), 4周时少量表达或几乎无阳性表达(图3B), 8周阳性表达增多, 散在分布, 不集中(图3C)。对照组2周几乎是阴性表达, 偶可见黄染的小颗粒(图3D), 4周可见部分阳性表达区, 大部分还是阴性表达为主(图3E), 8周阳性表达明显增多, 颜色分布均匀, 但颜色较淡(图3F)。两组II型胶原染色的吸光度值见表1。

基质金属蛋白酶3免疫组织化学阳性细胞为黄褐

色, 在对照组呈轻度表达(图4A-C), 术后第2, 4, 8周阳性细胞率呈递增趋势, 术后第2周阳性细胞数显著低于术后第4, 8周与术后第4周相比差异无显著性意义; 制动组阳性细胞表达明显(图4D-F), 术后第2, 4, 8周阳性细胞率呈递增趋势, 术后4周组高于2周组, 术后8周组高于4周组, 且均有显著性意义($P < 0.05$)。同时间段相比, 术后第2, 4周制动组均值大于对照组, 但差异无显著性意义($P > 0.05$), 第8周制动组阳性表达率高于制动组($P < 0.05$; 表1)。

2.6 各组关节软骨代谢标志物II型胶原交联C末端肽浓度变化 软骨代谢标志物检测结果显示, 与对照组相比, 大鼠制动8周后尿样中II型胶原交联羧基端肽水平显著提高($P < 0.05$), 其他时间段II型胶原交联羧基端肽的表达量差异无显著性意义。组内比较发现对照组2

周升高, 4周到8周逐渐降低趋势。而制动组内比较发现2周时 II 型胶原交联羧基端肽表达升高, 4周比2周时降低, 但8周时比4周表达量要高。见表1。

表 1 各组 Wakitani 评分、Mankin 评分、II 型胶原吸光度值、基质金属蛋白酶 3 阳性细胞率及 II 型胶原交联 C 末端肽表达量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=16$)

Table 1 Changes in Wakitani score, Mankin score, type II collagen absorbance value, matrix metalloproteinase 3-positive cell rate and C-telopeptide of type II collagen levels in each group

指标		术后时间(周)		
		2	4	8
Wakitani 评分	制动组	12.67±1.50	6.50±1.38 ^b	5.17±1.72 ^a
	对照组	13.17±1.17	5.50±1.52 ^b	3.17±0.98
Mankin 评分	制动组	0.86±0.33	5.63±1.77 ^{bc}	8.75±1.28 ^a
	对照组	1.13±0.57	5.13±1.46 ^{bc}	3.38±0.92
II 型胶原吸光度值	制动组	0.40±0.09	0.24±0.05	0.12±0.02 ^a
	对照组	0.40±0.06	0.28±0.03	0.26±0.62
基质金属蛋白酶 3 阳性细胞率(%)	制动组	4.22±1.77	12.37±5.37	29.64±10.26 ^a
	对照组	2.59±1.25	8.66±3.38	9.84±4.11
II 型胶原交联 C 末端肽浓度(μg/L)	制动组	3.80±0.29	3.20±0.44	3.60±0.51
	对照组	4.10±0.75	2.80±0.45	2.50±0.38 ^a

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与术后 2 周相比, ^b $P < 0.05$; 与术后 8 周相比, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

3.1 制动对软骨修复速度以及组织形态的影响 实验采取了跨关节制动的方法来模拟关节表面的低应力环境, 以往实验采取的制动办法, 切神经, 克式针跨关节制动关节面都会有接触, 只是限制了关节活动度, 静态压力并未消除, 实验采用的外固定架, 通过螺母旋转延长股骨和胫骨间的距离, 使关节面真正的分离, 起到制动并减小关节间应力的效果。首先从修复速度是看, 通过大体观察及苏木精-伊红染色可以看出, 正常应力组和制动组的修复速率无明显差异, 各时间段缺损填充程度接近, 说明制动对软骨缺损修复速度影响不大。其可能的原因实验分析为, 软骨自身有一定再生修复能力, 制动的的影响作用比较弱, 体现不出来。另外可能观察的时间点选择的间隔大, 会错过两组修复速度不同的时间点, 有条件适当补充相应观察时间点。其次观察发现两组再生组织的细胞类型与组织形态结构有相当的不同, 对照组 4 周时出现散在软骨细胞, 8 周可见片状软骨组织, 而制动组几乎各时段均主要为纤维组织, 修复表面不平整, 或高于周围关节面或有凹陷存在, 并且几乎未见软骨细胞, 可见制动影响了再生细胞的类型与组织形态及结构排列。因

此实验初步认为再生组织平滑的结构和软骨细胞的生成与关节运动的机械刺激有关。有报道说机械刺激可以促进软骨再生, 促进间充质干细胞向软骨细胞分化^[18], 有研究发现可控的机械刺激能使骨缺损表面有关节软骨样结构出现, 在持续被动活动下关节软骨显著改善^[19]。上述几个研究都证实了适当的机械刺激可以促进软骨修复。而另一方面, 过度的机械刺激或制动会对软骨修复产生负面影响如软骨退变, 软骨细胞凋亡, 骨关节炎改变等^[20]。所以若想成功修复软骨缺损, 机械环境的准备是不可缺少的。至于什么程度的机械刺激是有效的, 目前还没有统一结论, 不同个体选择不同。而且随着软骨修复的进程而变化, 机械应力也要随着变化才会产生更好的效果。

3.2 制动对再生软骨以及周围软骨的影响的定量分析 Wakitani 评分量表从细胞形态、基质染色性、表面规则性、软骨厚度以及与周围软骨的结合情况对修复组织进行综合评价, 而 Mankin 评分量表分别从软骨大致结构、软骨细胞、蕃红-O 染色程度及潮线完整性等方面来评价周围软骨退变程度。制动 8 周组的 Wakitani 评分均值与 Mankin 评分均值要高于相应时段的对照组, 与对照组比较差异有显著性意义。说明制动不利于软骨修复并会引起周围软骨退变。但有学者认为关节制动对软骨缺损是一种保护, 关节制动产生的机械应力缺失是影响软骨修复重要因素之一^[21]。早期制动是对软骨损伤急性期的一个应激保护作用, 减轻组织炎症反应, 然而软骨细胞压力感受器是软骨细胞功能的重要调节器, 维持细胞外基质稳态^[22], 长时间应力缺失会导致稳态失衡, 减弱细胞生物活性和基质生成, 腐蚀软骨胶原网, 并且骨髓干细胞新分化而来的软骨细胞会发生退变。正如 Hung 等^[23]发现, 9 周持续分离制动兔膝关节引起了软骨细胞形态学改变并且早于软骨退变前出现。

3.3 制动对关节软骨内相关因子表达量的影响 关节软骨包括大量细胞外基质以及嵌在里面的软骨细胞, 细胞外基质主要有 II 型胶原和蛋白多糖组成^[24]。由关节制动引起的蛋白多糖丢失在关节恢复运动后是可以逆转的, 然而 II 型胶原和蛋白多糖构成的纤维网结构的损伤是不可逆的, 因为它在软骨中的代谢更新很慢, 所以 II 型胶原是病理上客观评价软骨退变的常用指标^[25]。实验对软骨中 II 型胶原的免疫组织化学染色显示制动组修复组织 II 型胶原染色阴性, 可初步判定再生组织非透明软骨。而周围软骨基质内 II 型胶原染色呈浅褐色, 通过吸光度值对比显示含量明显少于对照组, 尤其是 8 周时间点, 说明制动组周围软骨 II 型胶原破坏, 软骨发生退

变。基质金属蛋白酶是降解软骨中胶原的主要酶类与糖氨多糖及 II 型胶原等软骨损伤指标变化密切相关, 且其浓度与软骨的损伤程度也有一定的关系^[26]。其中基质金属蛋白酶 3 主要是由软骨细胞分泌, 可暴露胶原, 破坏其网状结构, 同时可激活其他酶, 切断 II 型胶原内 α 链构成的三聚体, 可加速胶原的破坏^[27]。曾经有报道说关节制动能减少 II 型胶原与蛋白多糖的含量, 并且上调基质金属蛋白酶的表达^[28]。免疫组织化学结果显示制动组软骨中基质金属蛋白酶 3 阳性细胞率较对照组明显升高, 证明制动可造成机体基质金属蛋白酶 3 表达增加。基质金属蛋白酶不仅充分暴露并降解胶原, 而且可使黏附在胶原纤维上的糖氨多糖遭到破坏, 进一步加速基质退行性变。II 型胶原交联 C 末端肽是基质金属蛋白酶降解 II 型胶原的产物, 为 II 型胶原片段的羧基端肽。Sowers 等^[29]研究发现 II 型胶原交联羧基端肽与膝关节活动度与严重度相关, 尿液中 II 型胶原交联羧基端肽含量变化能灵敏检测膝关节骨性关节炎的进展。Lohmander 等^[30]发现在关节损伤或发生骨关节炎后 1 周, 关节液中 II 型胶原交联 C 末端肽的含量就有明显的升高, 最后逐渐下降到一个稳定的水平。Catterall 等^[31]也报道在急性损伤后, 关节液中 II 型胶原交联 C 末端肽的含量有显著的升高。实验结果显示, 在急性损伤期(术后 2 周), 其关节液中 II 型胶原交联 C 末端肽的浓度显著高于其他时间点, 并且随着时间增长逐渐下降, 但制动组在术后 8 周时又有所升高, 可能的解释是制动在软骨损伤稳定期由于制动得不到相应的机械刺激而发生退变, II 型胶原被降解, 有形成骨性关节炎的趋势。

3.4 研究局限性与不足 实验有一定局限性和不足, 首先造模过程复杂, 技术要求高, 大鼠下肢外固定架的安装比较困难, 所以造模数量有些不足。另外在结果分析部分有大体观察以及组织学观察, 虽然有量表作为依据, 但仍有一定主观性, 误差比较大。另外, 实验早期动物造模手术会影响肢体活动, 活动量减小。此外, 通过外固定架调节使膝关节面分离, 但是由于大鼠个体差异性以及外固定架安装差异, 可能造成关节面分离程度不一致, 随着时间增长, 以及大鼠啃咬, 外固定架螺丝也会有松动, 虽然定期进行加固, 但仍不能完全避免松动发生。

3.5 结论 实验通过外固定架造成关节制动的大鼠模型, 比较了制动组和对对照组的组织形态学改变。力学环境对关节软骨的形态和生理功能有着至关重要的作用, 不同强度、作用时间、和不同类型的力学刺激对软骨缺损修复的影响也不同, 目前究竟多大强度、多长作用时

间、和施加什么类型的力才是最合适软骨修复的并没有达成一致, 一直存在争议。实验通过关节制动的动物模型实验证实关节制动引起关节面的低应力环境对软骨缺损修复以及软骨的形态结构及组成成分都是不利的。同时, 缺损周围软骨也会因制动而发生退变改变。

致谢: 感谢天津医院骨科研究所的所有老师和同学提供的帮助。

作者贡献: 实验设计为张春秋和徐立岩。实验实施为徐立岩和马剑雄。实验评估为孙磊和张春秋。资料收集为王颖。马信龙审校。徐立岩对文章负责。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例, 实验方案中有关动物伦理问题已经由天津医科大学实验动物伦理委员会讨论批准。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Kunz RI, Coradini JG, Silva L, et al. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(10):842-849.
- [2] Lamb SE, Marsh JL, Hutton JL, Nakash R, Cooke MW. Mechanical supports for acute, severe ankle sprain: a pragmatic, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2009;373:575-581.
- [3] Jones RK, Chapman GJ, Findlow AH, et al. A new approach to prevention of knee osteoarthritis: reducing medial load in the contralateral knee. *J Rheumatol.* 2013;40(3):309-315.
- [4] Stumpfe ST, Pester JK, Steinert S, et al. Is there a correlation between biophotonical, biochemical, histological, and visual changes in the cartilage of osteoarthritic knee-joints? *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013;3(3):157-165.

- [5] Brandt KD. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arthritis Rheum.* 2003;49(2):267-271.
- [6] Arakaki K, Kitamura N, Kurokawa T, et al. Joint immobilization inhibits spontaneous hyaline cartilage regeneration induced by a novel double network gel implantation. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22:417-425.
- [7] Bedi A, Feeley BT, Williams RJ III. Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92:994-1009.
- [8] Vanwanseele B, Eckstein F, Knecht H, et al. Knee cartilage of spinal cord-injured patients displays progressive thinning in the absence of normal joint loading and movement. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(8): 2073-2078.
- [9] Haapala J, Arokoski J P, Ronkko S, et al. Decline after immobilisation and recovery after remobilisation of synovial fluid IL1, TIMP, and chondroitin sulphate levels in young beagle dogs. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(1):55-60.
- [10] Trudel G, Himori K, Uthoff HK. Contrasting alterations of apposed and unapposed articular cartilage during joint contracture formation. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005;86(1):90-97.
- [11] 顾延,戴克戎,裘世静,等.应力降低导致关节软骨退变机理的形态学研究[J].中华骨科杂志,1995,15(9):631-633.
- [12] Mollon B, Kandel R, Chahal J, et al. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:1824-1833.
- [13] Gu XI, Leong DJ, Guzman F, et al. Development and validation of a motion and loading system for a rat knee joint in vivo. *Ann Biomed Eng.* 2010;38:621-631.
- [14] Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop Relat Res.* 1972;82:253-262.
- [15] 马信龙,马剑雄.可调节动物实验用全环外固定架:中国, CN203468785U[P].2014-03-12.
- [16] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(4): 579-592.
- [17] van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1992;10(1):58-61.
- [18] Angele P, Yoo JU, Smith C, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res.* 2003;21(3):451-457.
- [19] Harada Y, Tomita N, Wakitani S, et al. Use of controlled mechanical stimulation in vivo to induce cartilage layer formation on the surface of osteotomized bone. *Tissue Eng.* 2002;8(6):969-978.
- [20] Loening AM, James I E, Levenston M E, et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381(2):205-212.
- [21] van Valburg AA, van Roy HL, Lafeber FP, et al. Beneficial effects of intermittent fluid pressure of low physiological magnitude on cartilage and inflammation in osteoarthritis. An in vitro study. *J Rheumatol.* 1998; 25(3):515-520.
- [22] Mobasheri A, Mobasheri R, Francis MJ, et al. Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular ion homeostasis and the regulation of cell volume, free [Ca²⁺] and pH. *Histol Histopathol.* 1998;13(3):893-910.
- [23] Hung SC, Nakamura K, Shiro R, et al. Effects of continuous distraction on cartilage in a moving joint: an investigation on adult rabbits. *J Orthop Res.* 1997; 15(3): 381-390.
- [24] Leong DJ, Gu XI, Li Y, et al. Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biol.* 2010;29:420-426.
- [25] Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 1997; 99(7):1534-1545.
- [26] Qi C, Changlin H, Zefeng H. Matrix metalloproteinases and inhibitor in knee synovial fluid as cartilage biomarkers in rabbits: the effect of high-intensity jumping exercise. *J Surg Res.* 2007;140(1):149-157.
- [27] 刘志翔,张柳,张楠.降钙素对兔骨关节炎软骨基质金属蛋白酶1的影响[J].中国矫形外科杂志,2006,14(22):1741-1743.
- [28] Ando A, Suda H, Hagiwara Y, et al. Reversibility of immobilization-induced articular cartilage degeneration after remobilization in rat knee joints. *Tohoku J Exp Med.* 2011;224:77-85.
- [29] Sowers MF, Karvonen-Gutierrez CA, Yosef M, et al. Longitudinal changes of serum COMP and urinary CTX-II predict X-ray defined knee osteoarthritis severity and stiffness in women. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(12):1609-1614.
- [30] Lohmander LS, Atley LM, Pietka TA, Eyre DR. The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(11):3130-3139.
- [31] Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(6):R229.