

· 论 著 ·

被动训练对兔网上肌腱急性断裂术后腱-骨修复中 BMP-2 表达的影响

李 森¹, 靳安民^{2△}, 付国建², 王鹏程², 张 辉², 闵少雄²

(1. 泸州医学院附属医院脊柱骨科, 四川 646000; 2. 南方医科大学珠江医院骨科中心, 广州 510282)

摘要:目的 探讨应力刺激在肩袖损伤术后腱-骨修复中的作用。方法 选取 18 只成年雄性新西兰白兔, 术前随机选取 2 只白兔处死, 以熟悉解剖结构及对照用。将其余 16 只白兔随机分为两组, 即应力刺激组(A 组)与非应力刺激组(B 组), 每组各 8 只。A 组术后第 2 周开始被动训练(CPM); B 组正常笼养。分别于术后 2、4、6、8 周训练结束后处死, 取材, 每次每组各处死 2 只, 检测 BMP-2 表达。结果 术后 2 周, 两组 BMP-2 染色均呈阳性, 组间比较无明显差别。术后 4 周, 两组 BMP-2 染色阳性, A 组稍显均匀。术后 6 周, 两组 BMP-2 染色阳性分布均较前广泛, A 组较 B 组明显, 且相对均匀有序。术后 8 周, A 组比 B 组 BMP-2 染色更为有序, 靠近骨面 BMP-2 表达程度与靠近腱性部分比较, 差别较前减小。结论 CPM 训练能提高兔网上肌腱急性断裂术后腱-骨界面 BMP-2 表达, 从而增进胶原的合成, 促进肩袖损伤术后腱-骨修复。

关键词:兔网上肌腱; 腱-骨修复; CPM 训练; BMP-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.020

中图分类号: R365.686

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)15-1985-03

Impact of stress to BMP-2 expression in repairing tendon-bone after operation to rabbit supraspinatus tendon of acute rupture

LI Sen¹, JIN An-min^{2△}, FU Guo-jian², et al.

(1. Department of Vertebral Column Orthopaedics, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Center of Orthopaedics, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: Objective To study the impact of CPM to BMP-2 expression in repairing tendon-bone after operation to rabbit supraspinatus tendon of acute rupture, and to explore the role of stress in the postoperative repairation after acute rotator cuff injury.

Methods 18 adult male New Zealand white rabbits, two rabbits were randomly selected and had been put to death before operation (to become familiar with the normal anatomical structure and be reserved for the control samples available). Another 16 rabbits were randomly divided into two groups: CPM group and non-CPM group ($n_1=n_2=8$). 2 weeks after operation, CPM group start to be trained; non-CPM group were normally feeded. After 2, 4, 6, 8 weeks, respectively, 2 rabbits each time in each group were put to death, drawn the materials and observed the changes of BMP-2 expression. **Results** After 2 weeks, BMP-2 expression of two groups also stained color, but no significant difference; after 4 weeks, BMP-2 expression of two groups also stained color, color in A group was slightly even; after 6 weeks, BMP-2 stained wider than before, For A group, it was even and order relatively; after 8 weeks, For A group, BMP-2 staining was more orderer than before, between closing to the bone and to the tendon, the difference of expression of BMP-2 decreased than before. **Conclusion** CPM can promote BMP-2 expression in repairing of tendon-bone after operation to rabbit supraspinatus tendon of acute rupture, thereby further collagen synthesis, contribute to the recovery of tendon-bone after rotator cuff injury.

Key words: rabbit supraspinatus tendon; tendon-bone repair; CPM; BMP-2

BMP(bone morphogenetic protein)是骨发生蛋白家族的一个属名,属于 TGF- β 超家族,能导致异位骨、软骨形成,同时对细胞增殖、分化、凋亡起重要作用。其能够在体内诱导骨和腱样组织形成,在肢体生长、软骨内骨化、骨折早期及肌腱修复时表达,从而发挥其骨发生、骨诱导、骨修复及肌腱修复作用^[1-3]。本实验通过研究被动训练(CPM)条件下 BMP-2 在兔网上肌腱急性断裂术后腱-骨修复过程中的表达情况,从而了解应力刺激对腱-骨修复的促进作用。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 包埋石蜡(上海华申器材公司)、甲醛(广州洛辛宝化学试剂公司)、硝酸(广州化学试剂厂)、二甲苯(广

州化学试剂厂)、无水乙醇(广州化学试剂厂)、庆大霉素(华北制药厂)、青霉素(80 万单位/支,华北制药厂)、注射用生理盐水(广州珠江医院)、戊巴比妥钠(北京北实纵横科技发展有限公司)、BMP-2 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、DAB 显色试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司)等。

1.1.2 主要仪器(器械) 自制兔肩关节被动活动控制装置、CPM(杭州正大医疗器械公司)、外科手术基本器械(江苏张家港医疗器械公司)、电动钻(江苏张家港医疗器械公司)、外科 2-0 可吸收缝线(上海金环医疗器械公司)、OLYMPUS BH-2 型显微镜(日本 OLYMPUS 公司)、超低温冰箱(日本 SANYOX 公司)、LEICA ASP300 全自动脱水机(瑞典 LEICA 公司)、TECEC4715 全自动包埋机(日本樱花公司)、LEICA RM2135

△ 通讯作者: E-mail: jinanmin2008@163.com。

石蜡切片机(瑞典 LEICA 公司)、LEICA CV5030 全自动染色工作台(瑞典 LEICA 公司)等。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 实验动物分组与手术方法

随机选取 18 只成年雄性新西兰白兔(南方医科大学实验动物所 SCXK 粤 2006-0015), 体质量 2.0~2.5 kg, 适应性饲养 2 周, 未见异常, 活动良好, 术前随机取 2 只白兔处死, 以熟悉解剖结构及留作正常标本做对照用, 将其余 18 只白兔双侧肩关节行冈上肌腱断裂术后腱-骨界面重建手术。手术方式参照参考文献[4]及临床骨科常用手术方法。具体方法如下: 用戊巴比妥钠进行耳缘静脉麻醉, 麻醉满意后, 术区备皮, 医用碘伏消毒, 铺无菌洞巾。沿兔冈上肌腱肱骨大结节附着点长轴纵向切开皮肤, 约 1 cm, 逐层钝性分离, 并严格止血, 找到冈上肌腱附着点, 将兔冈上肌腱从肱骨大结节附着点处完全离断, 用直径为 1 mm 的克氏针从外侧肱骨解剖颈向肱骨大结节方向打孔, 然后进行腱-骨缝合, 重建冈上肌腱附着点。检查组织无活动性出血及确定肌腱断离及缝合无误后, 用庆大霉素盐水冲洗关节腔和皮下, 放置引流片, 逐层间断缝合切口。

1.2.2 术后处理及应力刺激训练

术后给予石膏固定, 常规予以青霉素 20 万 u 肌肉注射, 每日 2 次, 共用 3 d, 1 周后拆除石膏。将其余 16 只白兔按照动物实验科研设计常用分组方法随机分为两组, 即应力刺激组(A 组)与非应力刺激组(B 组)。B 组正常笼养, 自由活动; A 组术后 1 周拆除石膏, 然后开始训练, 训练器械由自制兔肩关节被动活动控制装置、CPM 组成。具体训练计划如下: 术后第 2 周, 隔日训练 1 次, 每次 5 min; 术后 3~4 周, 每天训练 1 次, 每次 15 min; 术后第 5~6 周, 每天训练 2 次, 每次 10 min; 术后第 7~8 周, 每天训练 2 次, 每次 20 min。分别于术后第 2、4、6、8 周最后 1 天训练结束后, 在各组中随机选取 2 只白兔处死, 取材、固定。

1.3 标本处理

分别于术后 2、4、6、8 周随机选取各组中 2 只动物处死, 以冈上肌腱重建止点为中心, 取肱骨近端包括肌腱-骨交界面的大结节组织, 大小约 1 cm×0.7 cm×0.5 cm。10% 甲醛固定 48 h 后, 予 10% 稀硝酸脱钙, 以针刺法确定脱钙完全后, 流水冲洗, 梯度乙醇脱水、透明、石蜡包埋, 5 μm 厚度连续切片、贴片, 二甲苯脱蜡, 常规入水。染色前用 PBS 液浸泡组织切片 10 min, 然后按照试剂盒说明书操作, 分别加入一抗后, 孵育过夜, 然后加入二抗, DAB 显色。

2 结 果

2.1 腱-骨界面形态学大体观察

取材前两组试验动物运动、饮食无明显差别, 可以奔跑, 外观未见明显关节肿胀、跛行及其他异常。实验过程中无 1 只动物死亡, 无关节内感染现象。术后 2 周, A 组与 B 组比较, 炎症反应较重, 肩关节术区明显肿胀, 可见少量炎性物质渗出, 可见缝线及冈上肌腱断裂处。术后 4 周, 两组炎症较前明显减轻, A 组术区肿胀基本消退, 无明显炎性物质渗出, 仍可见缝线及冈上肌腱断裂处。术后 6 周, 两组肌腱缝合处缝线被部分吸收, 可见肌腱断裂处裂隙变小, 外层出现 1 层膜状物, 质坚韧, A 组相对明显。术后 8 周, 两组肌腱缝合处缝线吸收更加明显, 只余少许缝线。肌腱断裂处裂隙较前模糊, 膜状物外观更加光滑, 颜色呈灰白色, 质较前坚韧, A 组相对较明显。

2.2 腱-骨界面组织学结构镜下观察

术后 2 周, 两组 BMP-2 染色均呈阳性, 染色深浅及面积大小均无明显差别, 两组均呈细点状分布。表达染色深浅不一, 无明显表面和内部差别(见图 1a、b、bb)。术后 4 周, 两组 BMP-2 染色阳性, 两组均呈现靠近骨面染色较靠近腱性部分颜色稍深, 且稍显均匀。A 组染色较 B 组深, 且稍显均匀(见图 1c、cc)。术后 6 周, 两组 BMP-2 染色阳性分布均较前广泛, A 组较 B 组明显, 且均匀有序。靠近骨面 BMP-2 表达程度仍较靠近腱性部分强, 且差别较前稍显增大(见图 1d、dd)。术后 8 周, A 组 BMP-2 染色更为有序, B 组 BMP-2 染色较浅。A 组 BMP-2 染色均匀散在分布, 靠近骨面 BMP-2 表达程度与靠近腱性部分比较, 差别较前减小(见图 1e、ee)。

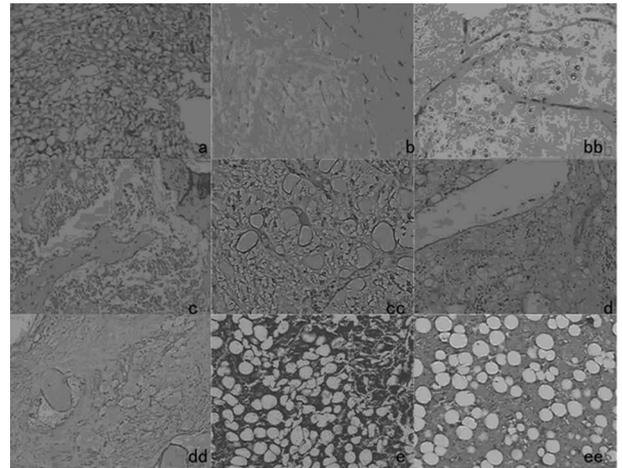


图 1 腱-骨修复过程中 BMP-2 表达情况
a: 正常腱-骨结构 BMP-2 表达情况; b: 术后 2 周 A 组 BMP-2 表达情况; bb: 术后 2 周 B 组 BMP-2 表达情况; c: 术后 4 周 A 组 BMP-2 表达情况; cc: 术后 4 周 B 组 BMP-2 表达情况; d: 术后 6 周 A 组 BMP-2 表达情况; dd: 术后 6 周 B 组 BMP-2 表达情况; e: 术后 8 周 A 组 BMP-2 表达情况; ee: 术后 8 周 B 组 BMP-2 表达情况。

图 1 腱-骨修复过程中 BMP-2 表达情况

3 讨 论

在组织结构学上, 正常肩袖肌腱可以视为 3 层结构, 即滑囊层、中间层和关节面层, 肩袖及其表面结构分为大束腱纤维、小束腱纤维和疏松结缔组织。肩袖损伤的修复分为 I 型(外在修复方式)与 II 型(内在修复方式)^[5-6]。I 型修复是指肌腱损伤依靠滑膜组织及血管来修复。病变区大量血管增生, 滑膜长入, 纤维母细胞形成大量胶原, 通过纤维的编织来完成肌腱的连续性, 此多发生在滑囊层。II 型修复是指肌腱损伤依靠腱细胞本身来修复。腱细胞一部分演化为纤维母细胞, 另一部分细胞形成软骨细胞, 从而修复肌腱的损伤, 此变化多发生在深层。这些组织学分析被用于描述附着点愈合中组织和细胞的形态学改变^[7-8]。

肌腱是连接骨骼肌肌腹与骨骼之间的单轴致密胶原纤维结缔组织束, 是弹性小、寡血管的组织。肌腱本身不具有收缩能力, 但具有很强的耐压抗张力和抗摩擦的能力。因此, 力学刺激必然对肌腱细胞的生物学特性产生很大的影响。力学信号可刺激细胞表面的牵张受体和黏附位点, 导致一系列瀑布效应, 从而改变细胞周围的营养成分、氧气等。国内有学者证实, 早期训练可以提高腱-骨修复组织的血氧饱和度, 从而改善修

复组织及关节软组织的营养,促进腱-骨愈合^[9-10]。应力刺激还可改变细胞内的第二信使 NO 或 Ca²⁺ 浓度,直接或间接影响细胞因子 mRNA 的表达,从而影响基质蛋白的合成。

很多实验研究表明,BMP 细胞因子在细胞聚集、迁移、分化、增殖和血管形成中起重要作用,BMP 缺陷导致肌腱愈合延迟。现已发现 7 种 BMP,其中 BMP-2 主要在骨及软骨组织中表达,对体内软骨组织的生长和软骨内骨化过程中起重要诱导作用^[11-12]。BMP-2 可以在组织修复过程中增加胶原纤维的直径和促进 I 型胶原前体表达^[13-14],明显增加肌腱张力和强度,修复损伤的肌腱,并且可以促进损伤骨组织的愈合,这也是本实验选择 BMP-2 的原因。本实验即是结合两种有利于肌腱愈合的因素^[15-17],研究 CPM 条件下 BMP-2 在兔网上肌腱急性断裂术后腱-骨修复过程中的表达情况,从而了解应力刺激对腱-骨损伤的修复促进作用。本实验结果显示,应力刺激可以促进兔网上肌腱断裂术后腱-骨界面 BMP-2 的表达,增进损伤腱-骨的修复。术后 2、4、6、8 周,两组 BMP-2 染色均呈阳性,染色深浅及面积大小随着时间的变化有所变化。术后 2 周,两组 BMP-2 染色均呈阳性,两组均呈细点状分布,组间无明显差别。术后 4、6、8 周,两组 BMP-2 染色均为阳性,两组均呈现靠近骨面染色较靠近腱性部分颜色稍深。A 组染色较 B 组深,且显均匀、有序。随着时间推移,靠近骨面 BMP-2 表达程度与靠近腱性部分比较,差别逐渐减小。

综上所述,应力刺激能够促进兔网上肌腱急性断裂术后腱-骨界面 BMP-2 的表达,从而促进其腱-骨修复。但本实验仅仅是从定性的角度,以后的实验还可以从控制机械训练环境、量化应力刺激强度方面更加深入研究应力刺激下腱-骨修复的机制。

参考文献:

- [1] Yeh LC, Tsai AD, Lee JC. Bone morphogenetic protein-7 regulates differentially the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in rat achilles and patellar tendon cell cultures[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(6):2107.
- [2] Salamon A, Toldy ES. Use of mesenchymal stem cells from adult bone marrow for injured tissue repair[J]. *Orv Hetil*, 2009, 150(27):1259.
- [3] Lui PP, Chan LS, Cheuk YC, et al. Expression of bone morphogenetic protein-2 in the chondrogenic and ossifying sites of calcific tendinopathy and traumatic tendon injury rat models. [J]. *J Orthop Surg Res*, 2009, 21(4): 27.
- [4] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005:1606.
- [5] Derwin KA, Codsí MJ, Milks RA, et al. Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device. [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2009, 91(5):1159.
- [6] Baums MH, Spahn G, Steckel H, et al. Comparative evaluation of the tendon-bone interface contact pressure in different single- versus double-row suture anchor repair techniques. [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2009, 17(12):1466.
- [7] Dimmen S, Nordsletten L, Engebretsen L, et al. The effect of parecoxib and indometacin on tendon-to-bone healing in a bone tunnel: an experimental study in rats. [J]. *Bone Joint Surg Br*, 2009, 91(2):259.
- [8] Huang HS, Ao YF, Wang YJ, et al. The effects of continuous passive motion on tendon-bone healing of the tendon autograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model[J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2008, 46(14):1088.
- [9] 黄红拾, 敖英芳, 王子羲, 等. 兔膝关节持续被动活动对前交叉韧带重建术后切口局部组织血氧饱和度的影响[J]. *中国微创外科杂志*, 2007, 7(8):808.
- [10] 王蕾, 罗涛, 邓廉夫. 应力刺激在肩袖损伤修复中作用机制的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2009, 11(2):152.
- [11] 赵伟峰, 任先军. 骨诱导分子的研究进展[J]. *重庆医学*, 2003, 32(11):1586.
- [12] 张慧宇, 杨鑫, 向学熔, 等. rhBMP2 对牙髓成纤维细胞增殖及碱性磷酸酶活性的影响[J]. *重庆医学*, 2008, 37(5): 459.
- [13] Richert M, Wang H, Wieloch P. Adenovirus-mediate gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocyte and the healing rat Achilles Achilles[J]. *Connect Tissue Res*, 2005, 46(4):175.
- [14] Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y, et al. Effect of GDF-5 on ligament healing[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(1):71.
- [15] Favre P, Loeb MD, Helmy N, et al. Latissimus dorsi transfer to restore external rotation with reverse shoulder arthroplasty: a biomechanical study[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2008, 17(4):650.
- [16] Veeger HE, Van DHF. Shoulder function: the perfect compromise between mobility and stability [J]. *J Biomech*, 2007, 40(10):2119.
- [17] Gimbel JA, Van KJ, Lake SP, et al. The role of repair tension on tendon to bone healing in an animal model of chronic rotator cuff tears[J]. *J Biomech*, 2007, 40(3): 561.

(收稿日期:2009-10-31 修回日期:2010-01-12)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!