

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.010

BFGF、PDGF 对兔膝前交叉韧带重建术后早期腱骨愈合影响的实验研究

杜庆钧¹, 苏培强^{2△}, 何家强¹, 黄明光¹

(1. 南方医科大学附属顺德区第一人民医院骨科, 广东佛山 528300;

2. 中山大学第一附属医院骨科, 广州 510000)

摘要:目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子(BFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)对兔膝前交叉韧带(ACL)重建术后早期腱骨愈合的影响。方法 选择 72 例健康成年新西兰兔作为研究对象, 实验兔根据研究方法不同分为 3 组, BFGF 组、PDGF 组及对照组并进行造模, 术后 2、5 周分别进行组织学及生物力学检测。结果 PDGF 组、BFGF 组术后 2、5 周的最大载荷显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), PDGF 组、BFGF 组术后 2、5 周的刚度显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 BFGF 及 PDGF 均能够在腱骨愈合早期通过增加兔腱骨间的间充质细胞及新生血管数量, 促进炎症消散, 进而促进腱骨组织的愈合。生物力学方面, BFGF 及 PDGF 能提高腱骨界面的最大刚度及负荷, 增强腱骨界面的强度。

关键词:成纤维细胞生长因子 2; 血小板衍生生长因子; 腱骨愈合; 前交叉韧带

中图分类号: R816

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)06-0746-03

A experimental study on the effect of tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction through BFGF and PDGF

Du Qingjun¹, Su Peiqiang^{2△}, He Jiaqiang¹, Huang Mingguang¹

(1. Department of Orthopedics, the First People's Hospital Affiliated to Southern Medical University in Shunde District, Foshan, Guangdong 528300, China; 2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction through BFGF and PDGF. **Methods** Based of seventy two healthy matured New Zealand white rabbits underwent ACL reconstruction. Devide three groups through different methods, group BFGF, group PDGF, group normal. **Results** The maximum loads of group BFGF and PDGF after 2 and 5 weeks are higher than group normal, there was significant difference in maximum loads ($P < 0.05$). The max stiffness of group BFGF and PDGF after 2 and 5 weeks are higher than group normal, there was significant difference in maximum loads ($P < 0.05$). **Conclusion** The group BFGF and PDGF can promote tendon-bone healing by increasing the vascularization and blood vessels of the tendon-bone interface and vascular endothelial growth factor. In biomechanics, group BFGF and PDGF can promote maximum loads, max stiffness and hardness of tendon-bone healing.

Key words: fibroblast growth factor 2; platelet derived growth factor; tendonbone healing; ACL

膝前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)损伤一般多发生于膝关节强力外展及过伸运动^[1-2]。患病率呈现逐年上升趋势, ACL 损伤后可能会发生膝关节不稳定而严重影响关节运动, ACL 损伤后多出现膝关节稳定性差, 引起膝关节反复的受伤, 从而导致关节软骨逐渐退变并被破坏而发生骨关节炎^[3-4]。ACL 损伤的修复由于相对较为困难, 一直是骨科领域研究的重点, ACL 损伤修复的实质是腱骨愈合^[5]。本研究为了解碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, BFGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)对膝前交叉韧带重建术后早期腱骨愈合的影响, 通过建立动物实验模型分析 BFGF、PDGF 在兔膝 ACL 重建后对腱骨愈合的影响, 从而为腱骨的早期愈合提供参考。

1 材料与方

1.1 材料 选择 72 例健康成年新西兰兔作为研究对象, 体质量 2.8~3.5 kg, 10~14 周龄。实验兔根据研究方法不同分为 3 组: BFGF 组、PDGF 组及对照组, 每组 24 例。

1.2 方法

1.2.1 纤维蛋白凝胶复合物制备 分别将 BFGF、PDGF 15

ng 和 0.5 mL 的纤维蛋白凝胶混合, 采用漩涡混匀器以 2 600 r/min 的速度(转 2 min)进行振荡并充分搅拌后制成混悬凝胶注射剂。

1.2.2 造模 术前固定实验兔后, 采用 3% 的戊巴比妥钠注射入耳缘静脉进行麻醉, 麻醉后将兔子固定在手术台上, 常规脱毛, 消毒铺巾, 于髌骨上缘 1 cm 处作一个 5 cm 左右长的切口, 切开皮肤及皮下组织后沿着髌骨内侧切开直至关节腔, 显露髌间窝。手术充分暴露切口下缘, 并于股内侧肌后方找出半腱肌肌腱, 保留半腱肌的胫骨端止点, 于腱膜的交界处切断胫骨端止点。获取最长的肌腱后采用刀片清除肌腱周围的肌肉组织, 将半腱肌肌腱对折成两段。采用 3-0 的编织线进行编织, 将其编织成直径 2.5~3.0 mm 的自体肌腱, 根据 ACL 走向以直径 3 mm 的克氏针做胫骨-股骨隧道, 半腱肌的预留缝线固定在细钢丝上面, 通过钢丝从胫骨的隧道外面将肌腱导入关节腔中, 适当调整肌腱的角度。采用同样方法将半腱肌肌腱导入股骨的隧道当中, 屈膝 45°角将移植后的肌腱慢慢牵拉绷紧, 肌腱植物末端缝合于股骨隧道的外口坚韧的软组织上, 根据术前设计, 分别在 24 例实验兔股骨隧道的入口处放置含

BFGF 的纤维蛋白凝胶 0.5 mL(BFGF 组),在 24 例实验兔股骨隧道的入口处放置含 PDGF 的纤维蛋白凝胶 0.5 mL(PDGF 组),在其余 24 例实验兔则不放置凝胶(对照组),逐层缝合手术创口,生理盐水冲洗,术后兔子回笼自由饲养。

1.2.3 术后处理 术后 3 d 用 15 万单位的青霉素预防感染,术后观察动物进食、活动、精神状态以及切口渗血等基本情况,术后兔子均笼内自由活动并于术后 7 d 拆线,每天观察膝关节伤口情况。

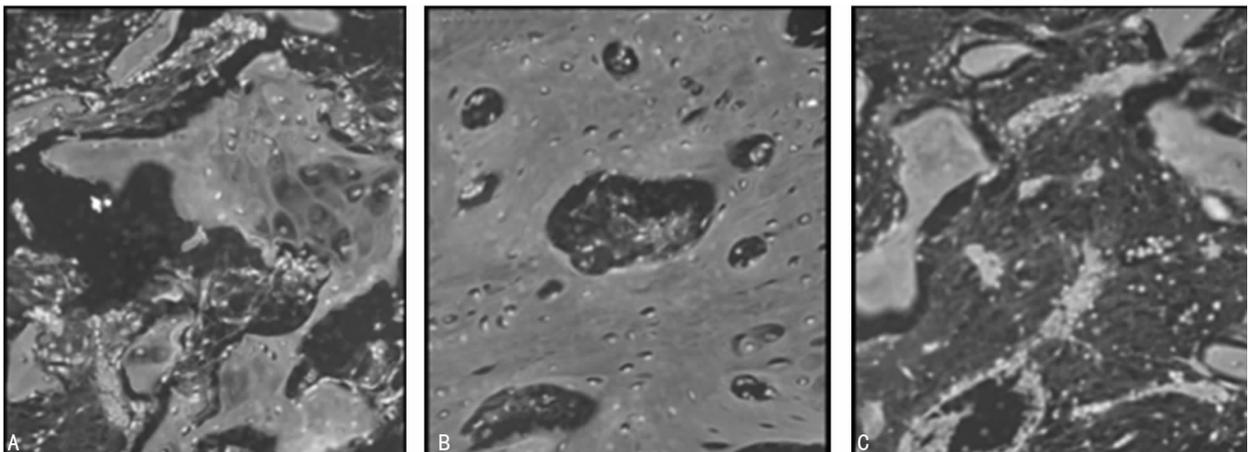
1.2.4 术后取材 术后 2 周选取 BFGF 组 12 例、PDGF 组 12 例,对照组 12 例处死。其中各取 6 例标本用于生物力学测试,6 例用于组织学检测,术后 5 周再处死各组兔子 12 例,同样方法进行组织学及生物力学检测。

1.2.5 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 所有实验动物在术前,术后 2、5 周分别采血,分离血清,放置于 -70℃ 的地方冷藏,对 IL-1、IL-6、IL-10 等因子采用双抗体夹心 ELISA 法检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织学观察结果 (1)术后 2 周观察:PDGF 组显示腱骨结合相对较为致密,结合处可发现有大量增生的成纤维细胞存在,细胞质突长而不明显,细胞相对较小且核染色颜色较深、细胞呈梭形或呈圆形的间充质细胞,细胞沿毛细血管周围进行分布,并可见一定数量新生毛细血管;BFGF 组显示腱骨界面较为紧密,结合处可见一定数量增生的成纤维细胞及间充质细胞,细胞沿着毛细血管周围分布,可见一定数量的新生毛细血管;对照组腱骨的界面间隙相对较大,腱骨结合处并无显著的愈合倾向,腱骨的界面存有疏松纤维血管组织,局部可见少量的间充质细胞及成纤维细胞,未及新生毛细血管及软骨组织。(2)术后 5 周观察:PDGF 组显示腱骨间组织狭窄较为模糊,可见软骨组织,软骨细胞从肌腱周围向骨隧道周围延伸,骨隧道周围可见清楚的软骨陷窝和一定数量成骨细胞,腱骨间可见较多新生血;BFGF 组显示腱骨间组织狭窄模糊,软骨细胞从肌腱周围向骨隧道周围方向逐渐成熟,骨隧道周围可见软骨陷窝及成骨细胞,腱骨间可见新生血管;对照组腱骨界面存在间接愈合,腱骨结合相对松弛,存在一定的骨化,骨隧道的附近能够看到少量成骨细胞,骨隧道界面处存在着骨的重塑,腱骨界面处存在有少量新生毛细血管。术后 5 周组织学观察结果见图 1。



A:PDGF 组术后 5 周,可见明显软骨组织;B:BFGF 组术后 5 周,可见软骨细胞从肌腱周围向骨隧道周围方向逐渐成熟;C:对照组术后 5 周,腱骨结合相对松弛,存在一定程度的骨化,可见少量的成骨细胞。

图 1 术后 5 周组织学观察结果(×200)

2.2 各组术后 2、5 周最大载荷结果对比分析 对比分析中显示,PDGF 组、BFGF 组术后 2、5 周的最大载荷显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组 2、5 周刚度结果比较显示,PDGF 组、BFGF 组术后 2、5 周的最大载荷显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组术后 2、5 周最大载荷和刚度结果对比分析($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	最大载荷值(N/m)		刚度(N/m)	
	术后 2 周	术后 5 周	术后 2 周	术后 5 周
PDGF 组	10.32±0.05 ^a	18.87±0.35 ^a	6.23±0.18 ^a	12.67±0.34 ^a
BFGF 组	9.56±0.05 ^a	18.11±0.31 ^a	5.89±0.16 ^a	11.92±0.30 ^a
对照组	6.47±0.03	12.25±0.26	3.21±0.23	6.74±0.25

^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

表 2 不同时期炎症因子 IL-1、IL-6、IL-10 表达($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n = 6$)

组别	时期	IL-1	IL-6	IL-10
PDGF 组	术前	19.4±3.4	15.8±2.5	15.4±2.0
	术后 2 周	38.4±5.1 ^a	25.4±4.7 ^a	27.2±5.2 ^a
	术后 5 周	24.1±4.3 ^a	16.1±2.8 ^a	16.2±2.3 ^a
BFGF 组	术前	20.4±3.6	15.7±2.8	15.6±2.1
	术后 2 周	38.1±4.9 ^a	25.5±4.8 ^a	27.5±5.6 ^a
	术后 5 周	25.6±6.1 ^a	17.3±3.3 ^a	19.2±3.1 ^a
对照组	术前	20.1±3.8	15.6±2.7	15.2±2.2
	术后 2 周	53.8±7.9	36.1±5.9	40.3±6.7
	术后 5 周	41.2±6.4	29.1±4.2	29.5±3.9

^a: $P < 0.05$,与对照组同时点比较。

2.3 不同时期炎症因子 IL-1、IL-6、IL-10 表达 3 组术后 2、5 周 IL-1、IL-6、IL-10 的表达均呈上升趋势。PDGF 组及 BFGF 组术后 2、5 周 IL-1、IL-6、IL-10 表达显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

3 讨 论

在腱骨愈合的起始阶段, 各种炎性因子释放大量的生长因子以调节腱骨愈合的进程。在各种细胞因子的作用下, 多潜能干细胞朝着受伤部位迁移, 血凝块变成多血管的组织, 血凝块能促使肌腱移植再血管化, 进而促进腱骨结点的愈合^[6-9]。本研究术后 2 周观察 PDGF 组显示腱骨结合处相对较为致密, 结合处能够发现大量增生的成纤维细胞, 细胞质突长而不明显, 细胞较小且核染色较深、呈梭形或者圆形的间充质细胞, 细胞沿着毛细血管周围分布, 其中可见一定数量的新生毛细血管。BFGF 组可见腱骨界面相对较为致密, 结合处能够发现一定数量增生的成纤维细胞以及间充质细胞, 各类细胞沿着毛细血管的周围分布, 能够发现一定数量的新生毛细血管。在术后 5 周的组织学观察中, 本研究进一步发现 BFGF 组及 PDGF 组的腱骨结点愈合显著优于对照组。

PDGF 能通过间接途径对内皮细胞临近的组织细胞进行激活, 促进平滑肌细胞释放 FGF、VEGF 等生长因子, 从而最终达到促进血管生成的目的, 大量实验表明 PDGF 能够促进骨及韧带组织的愈合^[10-12]。BFGF 是一种广泛存在于人体各种组织当中的生物活性物质^[13]。BFGF 为体内重要的创伤愈合因子之一, 近年研究发现, BFGF 能够促进骨、软骨及肌腱组织的损伤修复^[14-15]。本组研究中组织学观察结果表明 BFGF 及 PDGF 均能够在腱骨愈合早期通过增加兔腱骨间的间充质细胞及新生血管数量进而促进腱骨组织的愈合。

生物力学方面, 本实验研究显示, PDGF 组、BFGF 组术后 2 周及术后 5 周的最大载荷显著高于对照组 ($P < 0.05$)。由此可以证实 PDGF 及 BFGF 对肌腱移植重建 ACL 术后早期的腱骨愈合具有显著的促进作用。炎症因子表达方面, 3 组术后 2、5 周 IL-1、IL-6、IL-10 均呈上升趋势。PDGF 组及 BFGF 组术后 2、5 周 IL-1、IL-6、IL-10 表达显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 PDGF 及 BFGF 组能够显著促进炎症消散。本研究认为 BFGF 及 PDGF 均能够在腱骨愈合早期通过增加兔腱骨间的间充质细胞及新生血管数量、促进炎症消散, 进而促进腱骨组织的愈合。生物力学方面, BFGF 及 PDGF 能提高腱骨界面的最大刚度及负荷, 增强腱骨界面的强度。

参考文献:

- [1] Nguyen DT, Ramwadhoebe TH, van der Hart CP, et al. Intrinsic healing response of the human anterior cruciate ligament; an histological study of reattached ACL remnants[J]. J Orthop Res, 2014, 32(2): 296-301.
- [2] Kernozek T, Torry M, Shelburne K, et al. From the gait laboratory to the rehabilitation clinic: translation of motion analysis and modeling data to interventions that impact anterior cruciate ligament loads in gait and drop landing[J]. Crit Rev Biomed Eng, 2013, 41(3): 243-258.
- [3] Wang W, Chen HH, Yang XH, et al. Postoperative programmed muscle tension augmented osteotendinous junction repair[J]. Int J Sports Med, 2007, 28(8): 691-696.
- [4] Hofbauer M, Murawski CD, Muller B, et al. Revision sur-

- gery after primary double-bundle ACL reconstruction; AAOS exhibit selection[J]. J Bone Joint Surg Am, 2014, 96(4): 30.
- [5] Schwartzberg RS. Prediction of Semitendinosus and gracilis tendon lengths and diameters for double bundle ACL reconstruction[J]. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2014, 43(1): 1-6.
- [6] Lovric V, Chen D, Yu Y, et al. Effects of demineralized bone matrix on tendon-bone healing in an intra-articular rodent model[J]. Am J Sports Med, 2012, 40(10): 2365-2374.
- [7] Dong Y, Zhang Q, Li Y, et al. Enhancement of tendon-bone healing for anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction using bone marrow-derived mesenchymal stem cells infected with BMP-2[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(10): 13605-13620.
- [8] Mutsuzaki H, Sakane M. Calcium phosphate-hybridized tendon graft to enhance tendon-bone healing two years after ACL reconstruction in goats[J]. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol, 2011, 3(1): 31.
- [9] Kiliçoğlu Öi, Dikmen G, Koyuncu Ö, et al. Effects of demineralized bone matrix on tendon-bone healing: an in vivo, experimental study on rabbits[J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2012, 46(6): 443-448.
- [10] Rui Z, Li X, Fan J, et al. GIT1Y321 phosphorylation is required for ERK1/2- and PDGF-dependent VEGF secretion from osteoblasts to promote angiogenesis and bone healing[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(4): 819-825.
- [11] Al-Hazmi BA, Al-Hamdan KS, Al-Rasheed A, et al. Efficacy of using PDGF and xenograft with or without collagen membrane for bone regeneration around immediate implants with induced dehiscence-type defects: a micro-computed tomographic study in dogs[J]. J Periodontol, 2013, 84(3): 371-378.
- [12] Kaipel M, Schützenberger S, Schultz A, et al. BMP-2 but not VEGF or PDGF in fibrin matrix supports bone healing in a delayed-union rat model[J]. J Orthop Res, 2012, 30(10): 1563-1569.
- [13] Wang L, Gao W, Xiong K, et al. VEGF and BFGF expression and histological characteristics of the bone-tendon junction during acute injury healing[J]. J Sports Sci Med, 2014, 13(1): 15-21.
- [14] Yuan S, Pan Q, Fu CJ, et al. Effect of growth factors (BMP-4/7 & BFGF) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. Indian J Med Res, 2013, 138(2): 104-110.
- [15] Xiong N, Yang H, Liu L, et al. BFGF promotes the differentiation and effectiveness of human bone marrow mesenchymal stem cells in a rotenone model for Parkinson's disease[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 36(2): 411-422.