

不同时长的静态进展性牵伸对大鼠创伤性膝关节挛缩的治疗效果及其机制研究*

王璐^{1,2}, 张立宁¹, 何家乐^{1,2}, 左秀芹¹, 谢惠敏¹, 贾子善^{1△}

1. 解放军总医院第一医学中心 康复医学中心(北京 100853); 2. 解放军医学院(北京 100853)

【摘要】目的 探讨不同时长的静态进展性牵伸治疗大鼠创伤性膝关节挛缩的效果及机制。**方法** 选取雄性Wistar大鼠70只,随机分为手术造模组50只,空白对照组(不造模,不治疗)10只和单纯创伤未制动组(造成创伤不加克氏针固定,不治疗)10只。手术造模组50只建立膝关节挛缩模型,再随机分为静态进展性牵伸治疗20 min组(S20 min),治疗30 min组(S30 min),治疗40 min组(S40 min),非牵伸组(造模后只麻醉,不牵伸)以及模型对照组(造模后立即处死,只用于病理染色和蛋白检测)共5组,每组各10只。牵伸治疗周期为隔天一次,牵伸治疗8次,共16 d。于治疗0 d、8 d、16 d测量各组关节活动度(ROM)、步态分析,于治疗16 d后处死大鼠,取膝关节后囊组织进行HE及Masson染色,比较组织病理变化,Western blot检测转化生长因子(TGF)- β 1与白介素(IL)-6的表达。**结果** ① ROM: S30 min组治疗8 d时,ROM恢复与S20 min、S40 min组相当($P>0.05$),治疗16 d时则恢复最佳($P<0.05$);治疗8 d、16 d时,S20 min、S30 min、S40 min组ROM均较0 d改善($P<0.01$)。② 步态分析: S30 min组治疗8 d和16 d时支撑相改善最佳($P<0.05$),且均较0 d改善($P<0.05$)。S30 min组治疗8 d时和S40 min组步幅改善相似($P>0.05$),治疗16 d时和S20 min、S40 min步幅改善相似($P>0.05$); S30 min组治疗8 d时步幅较0 d有明显改善($P<0.05$),16 d时改善不明显。治疗8 d和16 d时,S30 min组摆动相恢复最佳($P<0.05$),治疗8 d较0 d改善不明显,治疗16 d时摆动相较0 d有改善($P<0.05$)。S30 min组治疗8 d时摆动速度与S20 min组、S40 min组、非牵伸组差异无统计学意义($P>0.05$),治疗16 d摆动速度改善优于其他3个治疗组($P<0.05$);治疗8 d、16 d时S30 min组摆动速度较0 d有改善($P<0.05$)。③ HE染色及Masson染色: 治疗16 d后,S30 min组关节囊纤维组织增生及炎症改善最明显。④ Western blot检测: 治疗16 d后,S30 min组TGF- β 1和IL-6的蛋白表达低于S20 min组、S40 min组、非牵伸组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 静态进展性牵伸治疗30 min对大鼠创伤性膝关节挛缩改善最明显,其机制为降低TGF- β 1与IL-6的表达,减轻关节粘连和炎症反应,重塑关节囊结构,抑制关节囊纤维化,缓解疼痛,提高关节活动功能。

【关键词】 关节挛缩 静态进展性牵伸 纤维化 炎症

The Therapeutic Effect and Mechanism of Static Progressive Stretching in Different Durations on Traumatic Knee Contracture in Rats WANG Lu^{1,2}, ZHANG Li-ning¹, HE Jia-le^{1,2}, ZUO Xiu-qin¹, XIE Hui-min¹, JIA Zi-shan^{1△}. 1. Center of Rehabilitation Medicine, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China

△ Corresponding author, E-mail: jiazishan1963@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of static progressive stretching (SPS) in different durations on traumatic knee contracture in rats. **Methods** Seventy male Wistar rats were randomly divided into three groups, including surgical modeling group ($n=50$), control group (CON, no surgery, no treatment, $n=10$) and trauma without immobilization group (TRA, no treatment, $n=10$). The knee contracture model was established, and 50 surgical modeling rats were randomly divided into five groups including static progressive stretching treatment for 20 minutes group (S20 min, $n=10$), treatment for 30 minutes group (S30 min, $n=10$), treatment for 40 minutes group (S40 min, $n=10$), untreatment group (UNT, no SPS, $n=10$) and modeling group (MOD, $n=10$, euthanized after immobilization for histological staining and Western blot). Individuals in the S20 min, S30 min, and S40 min groups were anesthetized and submitted to SPS. One treatment session took place every other day. A total of 8 sessions were given till the final treatment session on the day 16. On the day 0, 8, and 16 of intervention, the range of joint motion (ROM) and gait analysis were measured and compared. After the ROM measurements and gait analysis, the rats were euthanized on the day 16 and the samples were stained with HE and Masson methods. The changes of pathological organization were observed. Western blot was used to detect the expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and interleukin-6 (IL-6). **Results** ① ROM: the ROM of S30 min group recovered similar to that of the S20 min and S40 min groups after 8 days of treatment ($P>0.05$), and was the best among all the surgical modeling groups after 16 d of treatment ($P<0.05$). The ROM of S20 min, S30 min and S40 min groups significantly improved on the day 8 and day 16 comparing with that on

* 全军后勤科研计划重大项目子项(No. AWS17J004)资助

△ 通信作者, E-mail: jiazishan1963@163.com

day 0 ($P<0.01$). ② Gait analysis: the stands in the S30min group improved best on the day 8 and day 16 ($P<0.05$), and better than that on day 0 ($P<0.05$). The stride length of the S30 min group progressed similar to that of the S40 min group on the day 8 ($P>0.05$), and there was no difference among three groups on the day 16 ($P>0.05$). The stride length of the S30 min group appeared to recover more quickly on the day 8 ($P<0.05$), and those of S20 min and UNT groups recovered significantly on the day 16 ($P<0.05$). In addition, the swings in the S30 min group improved best ($P<0.05$), and it appeared to recover better on the day 16 ($P<0.05$). There was no statistical difference in terms of the swing speed among the four surgical modeling groups on the day 8 ($P>0.05$). The swing speed of the S30min group increased most than those of the other three groups ($P<0.05$), and it was much better on the day 8 and day 16 comparing with that on the day 0 ($P<0.05$). ③ HE and Masson staining: the fibrosis and inflammation of the S30min group were significantly suppressed comparing to the other groups on the day 16. ④ Western blot: The protein expression levels of TGF- β 1 and IL-6 were significantly lower than those in the other intervention groups including the S20 min, S40 min and UNT groups on the day 16 ($P<0.05$). **Conclusion** Static progressive stretching treatment for 30 min could significantly improve the traumatic knee contracture in rats. The mechanism may be that the SPS decreased the expressions of TGF- β 1 and IL-6, reduced the adhesion and inflammation of joint capsule. Therefore it relieved the pain and increased the joint mobility by reconstructing the structure of the capsule and suppressing the fibrotic changes.

【Key words】 Joint contracture Static progressive stretch Fibrosis Inflammation

关节挛缩是指全范围关节活动度的缺失,并伴有变形、废用、疼痛等,关节囊或/和关节周围软组织纤维化和短缩,延展性受限或者刚度增加^[1],主动及被动关节活动度(range of joint motion, ROM)受限,降低个体活动能力及生活质量。创伤后肘关节挛缩发生率为50%^[2],膝关节挛缩发生率高达11%^[3]。对于轻中度关节挛缩治疗效果较好,但是对于较为严重的关节挛缩则治疗时间长、恢复效果差。牵伸治疗是目前预防和治疗关节挛缩的主要手段,而静态进展性牵伸(static progress stretch, SPS)是近年来被推崇的新方法,目前临床上治疗时间通常设置为20~40 min,但缺乏明确的研究依据。本研究拟采用大鼠创伤性膝关节挛缩模型,观察各组关节囊形态结构、细胞因子表达的变化情况,探讨不同时长的静态进展性牵伸对关节挛缩的治疗效果及其机制,为进一步科学指导临床治疗关节挛缩提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂与仪器

SPF级健康雄性Wistar大鼠70只,体质量180~200 g,购自北京斯贝福公司。自由进食进水,适应性喂养1周后进行实验。

静态进展性牵伸器械(自制,委托中国航天大学工厂生产);弹簧测力计(上海铸衡公司);辣根酶标记山羊抗兔IgG、辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(ZSGB-BIO公司)。白介素(IL)-6(D5W4V)XP兔源抗体(CST公司);转化生长因子(TGF)- β 1兔源抗体(AFFINITY公司);PCR仪(Agilent公司)、CFX Connect™荧光定量聚合酶链式反应检测系统(美国BIORAD公司)、ThermoND2000超微量核酸蛋白测定仪(上海GENE公司);低温高速离心机(美国

SIGMA公司);倒置显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 实验动物分组

70只大鼠,采用随机数字表法随机分为手术造模组50只,空白对照组(CON)10只和单纯创伤未制动组(TRA)10只。手术造模组造模成功后,再使用随机数字表法随机分为静态进展性牵伸治疗20 min组(S20 min)、治疗30 min组(S30 min)、治疗40 min组(S40 min),非牵伸组(UNT)以及模型对照组(MOD)共5组,每组各10只。

1.3 大鼠创伤后膝关节挛缩模型的建立

手术造模组50只,参照HILDEBRAND等造模方法,改良后建立创伤后膝关节挛缩模型^[4],使用戊巴比妥钠溶液给予腹腔注射麻醉,去除毛发,碘伏消毒皮肤,使大鼠左膝关节处于过伸45°位维持5 s以损伤膝关节后囊,于大鼠膝关节前外侧行2 cm纵向切口,切开皮肤、肌肉及关节前囊,避免损伤外侧副韧带,充分暴露关节腔、股骨和胫骨近膝关节端,在关节腔内使用1.5 mm克氏针于股骨外侧髁非关节软骨部分打孔,深度为3 mm,模拟关节内骨折,血流入关节腔,术中注意避免损伤周围的神经血管,处理完毕后,生理盐水冲洗伤口,使用实验动物缝合线将肌肉缝合。在接近膝关节的股骨和胫骨平台下0.5 cm处,使用0.8 mm克氏针分别垂直于股骨及胫骨长轴打孔,穿透股骨和胫骨,两端穿透两侧皮肤,各留2 cm折弯成环,使用直径为2 mm的钢丝拧紧固定,使膝关节固定于最大屈曲位(150°),再次用生理盐水冲洗伤口,缝合皮肤。1 d后经X线照射检测克氏针是否贯穿股骨与胫骨(图1),固定期间观察肢体是否有肿胀、感染,克氏针有无脱落松动。克氏针固定5周后常规麻醉取下,左后肢呈屈曲挛缩状态,跛行,则为造模成功。TRA组只造成创伤不加克氏针固定。CON组不做任何处理。

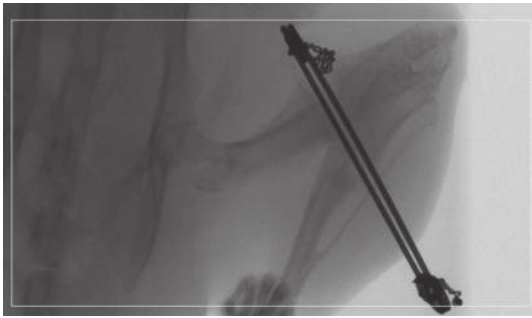


图 1 X线照射检测克氏针是否穿透股骨与胫骨
Fig 1 Confirmation of the Kirschner wire penetrating the femur and tibia by X-ray

1.4 治疗方法

手术造模组造模成功后,大鼠在克氏针拔除2 d后进行麻醉后牵伸治疗,分别给予3组大鼠每次静态进展性牵伸治疗20、30、40 min,根据 $T=W \cdot L \cdot \sin \theta$,其中 T 为扭矩,单位Nm, W 为牵伸的力的大小, L 为大鼠胫骨长度, θ 为牵伸方向与胫骨的角度,我们将 θ 定为 90° ,牵伸力即为 F (如图2中所示),其中 $T=0.04 \text{ Nm}$, $L=0.05 \text{ m}$, $\sin \theta=1$, $W=0.8 \text{ N}$ 。即牵伸方向与大鼠胫骨垂直,牵伸位置在大鼠胫骨最末端,牵伸力值 $F=0.8 \text{ N}$ 。牵伸周期隔1 d牵伸1次,共牵伸8次,共16 d。UNT组造模后只进行麻醉,不进行牵伸治疗;MOD组只造模,不治疗,于造模成功后即刻(0 d)处死取材,仅用于病理染色及Western blot检测。CON组和TRA组此环节不进行任何干预。

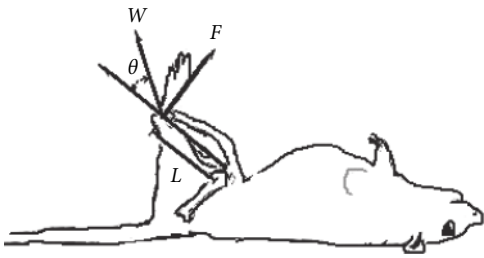


图 2 牵伸治疗示意图
Fig 2 The schematic diagram of stretching
W: Tensile force to be exerted by the force gage; F: Component of W normal to the long axis of tibia; L: The length of tibia; θ : Angle between the traction line and the extended line from the tibia

1.5 取材与检测

1.5.1 ROM的测量 分别于第1次牵伸前(0 d),牵伸4次后次日(8 d),牵伸8次后次日(16 d)测量每组(MOD组除外)大鼠ROM。全部采用力矩 $T=0.035 \text{ Nm}$ 时测量ROM,根据胫骨长度计算测量时施加的力的大小,由与本课题组不相关的一位科研人员用ROM测量尺测量左膝ROM,测量3次,取平均值。

1.5.2 步态分析 选取每组(MOD组除外)训练合格的

大鼠,于第1次牵伸前(0 d)和第4次及第8次牵伸结束后次日(分别为8 d和16 d)各采集1次Catwalk步态数据。测量支撑相(stands)、步幅(stride length)、摆动相(swings)、摆动速度(swing speed),取其平均值。

1.5.3 膝关节后囊组织HE、Masson染色 在最后一次测量ROM以及步态分析后(治疗16 d后),将6组共60只大鼠全部处死。7组(含0 d处死的MOD组)中取一半数量大鼠(35只,即每组5只)膝关节后囊组织进行病理学分析。在距左后膝关节上下各1 cm处剪断皮肤、肌肉与骨,将完整膝关节放入质量分数4%多聚甲醛中固定48 h后,石蜡包埋,切片,分别进行常规HE和Masson染色,于镜下观察各组关节囊组织的形态及病理结构变化。

1.5.4 Western blot检测治疗16 d后大鼠关节囊组织的TGF- β 1和IL-6表达 治疗16 d后,7组剩余的35只大鼠(即每组5只)处死后于冰上完整取下膝后关节囊组织,加入裂解液,裂解关节囊组织提取蛋白质,离心取上清,使用BCA法测蛋白浓度,SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜,封闭,一抗溶液(IL-6 1 : 1 000、TGF- β 1 1 : 1 000、GAPDH 1 : 5 000),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBST洗膜3次,加二抗稀释液中(1 : 5 000),室温孵育1 h, TBST洗膜3次, ECL发光。使用Image J软件分析条带灰度值,以目的条带与GAPDH内参条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

计量指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较使用LSD法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

50只大鼠均建模成功,治疗过程中无骨折、感染及死亡等情况。共70只大鼠纳入实验。

2.2 各组大鼠不同时间ROM测量结果

见表1。同时点各组大鼠组间比较,在3个时点,各手

表 1 各组大鼠ROM测量结果
Table 1 ROM of rats in each group

Group	n	ROM/ $^\circ$		
		0 d	8 d	16 d
S20 min	10	63.40 $\pm$ 5.34	83.30 $\pm$ 9.78 [*]	91.90 $\pm$ 7.32 [*]
S30 min	10	66.60 $\pm$ 5.42	89.20 $\pm$ 8.19 [*]	102.10 $\pm$ 6.38 [*]
S40 min	10	64.50 $\pm$ 4.40	83.80 $\pm$ 5.27 [*]	94.70 $\pm$ 5.12 [*]
UNT	10	67.00 $\pm$ 6.15	74.80 $\pm$ 3.36 [*]	83.00 $\pm$ 3.09 [*]
TRA	10	119.40 $\pm$ 4.65 [*]	121.40 $\pm$ 5.48 [*]	120.10 $\pm$ 2.51 [*]
CON	10	128.20 $\pm$ 4.47 [*]	129.80 $\pm$ 2.74 [*]	127.00 $\pm$ 6.83 [*]
F		352.426	129.767	95.713
P		0.000	0.000	0.000

* $P < 0.05$, vs. other groups at the same time point; # $P < 0.01$, vs. 0 d in the same group

术造模组的ROM小于TRA组和CON组, TRA组ROM小于CON组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。0 d各手术造模组之间ROM差异无统计学意义($P > 0.05$)。牵伸治疗8 d和16 d时, S20 min、S30 min、S40 min组ROM高于UNT组($P < 0.05$)。牵伸治疗8 d时, S20 min、S30 min、S40 min组效果相当($P > 0.05$), 牵伸治疗16 d时, 3组中S30 min组ROM恢复最佳($P < 0.05$)。

同组内不同时间点比较, 8 d时S20 min、S30 min、

S40 min组ROM均较0 d有改善($P < 0.01$), 16 d时各手术造模组较0 d时ROM均有改善($P < 0.01$); CON组和TRA组基本未见变化($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠步态分析结果

2.3.1 大鼠左后爪支撑相和步幅 见表2。3个时段, TRA组的支撑相、步幅与CON组差异无统计学意义($P > 0.05$)。在牵伸治疗前, 各手术造模组支撑相、步幅基本相同($P > 0.05$), 数值均较CON组和TRA组小($P < 0.05$)。

表 2 左后爪支撑相和步幅的测量结果
Table 2 Stands and stride length of rats in each group

Group	n	Stands/s			Stride length/cm		
		0 d	8 d	16 d	0 d	8 d	16 d
S20 min	10	0.198±0.104 [*]	0.227±0.104 [*]	0.279±0.078 [*]	7.859±1.892 [*]	8.103±2.532 [*]	10.834±3.307 [△]
S30 min	10	0.217±0.119 [*]	0.364±0.160 ^{*,△}	0.404±0.134 ^{*,△}	7.994±2.078 [*]	11.370±2.293 ^{*,△}	10.247±1.584
S40 min	10	0.182±0.102 [*]	0.250±0.074 [*]	0.313±0.117 [△]	7.937±1.653 [*]	10.050±2.339 ^{*,#}	10.237±2.225
UNT	10	0.205±0.153 [*]	0.201±0.122 [*]	0.266±0.125 [*]	6.976±2.066 [*]	8.175±2.341 [*]	10.117±2.823 [△]
TRA	10	0.425±0.118 [#]	0.438±0.102 [#]	0.426±0.081 [#]	10.111±1.165 [#]	11.844±2.297 [#]	11.038±2.024
CON	10	0.474±0.181 [#]	0.456±0.100 [#]	0.482±0.050 [#]	11.132±1.514 [#]	12.230±1.691 [#]	11.519±3.007
F		6.972	5.906	3.158	4.525	6.276	0.351
P		0.000	0.001	0.021	0.002	0.000	0.879

* $P < 0.05$, vs. CON group and TRA group at the same time point; # $P < 0.05$, vs. UNT group at the same time point; $\Delta P < 0.05$, vs. 0 d in the same group

支撑相在同时点各组间比较, 牵伸治疗8 d和16 d时S30 min组改善最佳, 优于UNT组($P < 0.05$); S20 min组及S40 min组恢复大致相同($P > 0.05$), 与UNT组恢复类似, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。同组内不同时间点比较, 8 d时S30 min组支撑相较0 d改善($P < 0.05$) 16 d时S30 min组和S40 min组较0 d时支撑相有改善($P < 0.05$); CON组和TRA组基本未见变化($P > 0.05$)。

步幅在同时点各组间进行比较, 当牵伸治疗8 d时, S30 min组和S40 min组改善最为明显, 优于其他两个手

术造模组($P < 0.05$), 且与TRA组差异无统计学意义($P > 0.05$), 但S40 min组仍与CON组差异有统计学意义($P < 0.05$); S20 min组改善情况与UNT组基本相同($P > 0.05$); 牵伸治疗16 d时, 各手术造模组步幅数值继续变大, 趋于正常($P > 0.05$)。同组内不同时间点比较, 8 d时S30 min组步幅较治疗前改善($P < 0.05$); 16 d时S20 min组和UNT组较0 d时步幅均有改善($P < 0.05$), 其余各组未见明显变化($P > 0.05$)。

2.3.2 左后爪摆动相和摆动速度 见表3。3个时段,

表 3 左后爪摆动相和摆动速度的测量结果
Table 3 Swings and swing speed of rats

Group	n	Swings/s			Swing speed/(cm/s)		
		0 d	8 d	16 d	0 d	8 d	16 d
S20 min	10	0.228±0.082 [*]	0.187±0.051 [*]	0.168±0.046 [*]	45.851±19.515 [*]	57.838±20.198 [*]	67.754±19.733 ^{*,△}
S30 min	10	0.222±0.061 [*]	0.160±0.056 ^{*,#}	0.119±0.036 ^{*,△}	50.899±21.151 [*]	71.090±19.831 ^{*,△}	94.375±12.574 ^{*,△}
S40 min	10	0.225±0.118 [*]	0.159±0.035 ^{*,#}	0.166±0.072 [*]	45.141±19.157 [*]	61.855±20.977 [*]	74.728±10.021 ^{*,△}
UNT	10	0.226±0.121 [*]	0.215±0.071 [*]	0.170±0.046 [*]	49.793±16.985 [*]	56.470±19.794 [*]	66.543±17.422 [*]
TRA	10	0.115±0.017 [#]	0.114±0.017 [#]	0.112±0.016 [#]	98.208±23.367 [#]	97.357±10.439 [#]	105.487±15.399 [#]
CON	10	0.100±0.022 [#]	0.094±0.020 [#]	0.105±0.015 [#]	102.376±18.263 [#]	104.079±19.815 [#]	110.466±25.362 [#]
F		3.027	4.293	4.010	14.276	9.278	7.498
P		0.020	0.003	0.004	0.000	0.000	0.000

* $P < 0.05$, vs. CON group and TRA group at the same time point; # $P < 0.05$, vs. UNT group at the same time point; $\Delta P < 0.05$, vs. 0 d in the same group

TRA组的摆动相和摆动速度与CON组差异无统计学意义($P > 0.05$)。在牵伸治疗前,4个手术造模组摆动相、摆动速度基本相同($P > 0.05$),数值均较CON组和TRA组小($P < 0.05$)。

摆动相同时点各组间比较,牵伸治疗8 d时S30 min组及S40 min组改善基本相同,均优于UNT组($P < 0.05$);S20 min组恢复缓慢与UNT组差异无统计学意义($P > 0.05$)。牵伸治疗16 d时,S30 min组恢复最佳,仍明显优于UNT组($P < 0.05$);S20 min组及S40 min组摆动相均与UNT组差异无统计学意义($P > 0.05$)。同组内不同时间比较,8 d时S40 min组摆动相均较治疗前有改善($P < 0.05$),余手术造模组与8 d时比较无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$);16 d时S30 min组较0 d时摆动相有明显改善($P < 0.05$);CON组和TRA组基本未见变化($P > 0.05$)。

摆动速度同时点各组间比较,牵伸治疗8 d时,各组摆动速度数值均有增加,但4个治疗组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);在牵伸治疗16 d后,S30 min组改善明显优于其他3个治疗组($P < 0.05$),与CON组和TRA组差异无统计学意义($P > 0.05$);同组内不同时间比较,8 d时S30 min组摆动速度较治疗前有明显改善($P < 0.05$),余手术造模组与治疗前比较无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$);16 d时3个治疗组较0 d时摆动速度均有改善($P < 0.05$)。

2.4 治疗16 d后大鼠关节囊组织病理染色结果

见图3。HE染色及Masson染色结果示,与自然恢复的CON组相比,制动5周(造模后即刻,治疗前)的MOD组、经过16 d治疗的4个手术造模组有明显病理改变,可见关节囊增厚,纤维组织增生,滑膜组织增生粘连,关节腔空间变窄。纤维组织及滑膜组织局部退变,部分纤维组织增生伴玻璃样变性,成纤维细胞增多,间质可见大量慢性炎症细胞浸润,滑膜下纤维组织中血管增生。静态进展性牵伸治疗16 d后,可见各治疗组关节囊纤维组织增生及炎症与MOD组相比均有改善,其中S30 min组改善最为明显,UNT组其增生及炎症最为严重。同属自然恢复,TRA组与CON相比有轻度炎症与纤维化反应。

2.5 治疗16 d后大鼠膝后关节囊组织TGF- β 1蛋白的表达

见图4、表4。造模后即刻(0 d)的MOD组大鼠膝后关节囊组织TGF- β 1蛋白表达最高。治疗16 d后,S30 min组TGF- β 1表达降低,低于除CON组的其他组($P < 0.05$);TRA组表达仍高于CON组($P < 0.05$);S20 min组与S40 min组表达高于CON组和S30 min组($P < 0.05$),低于MOD组($P < 0.05$)。

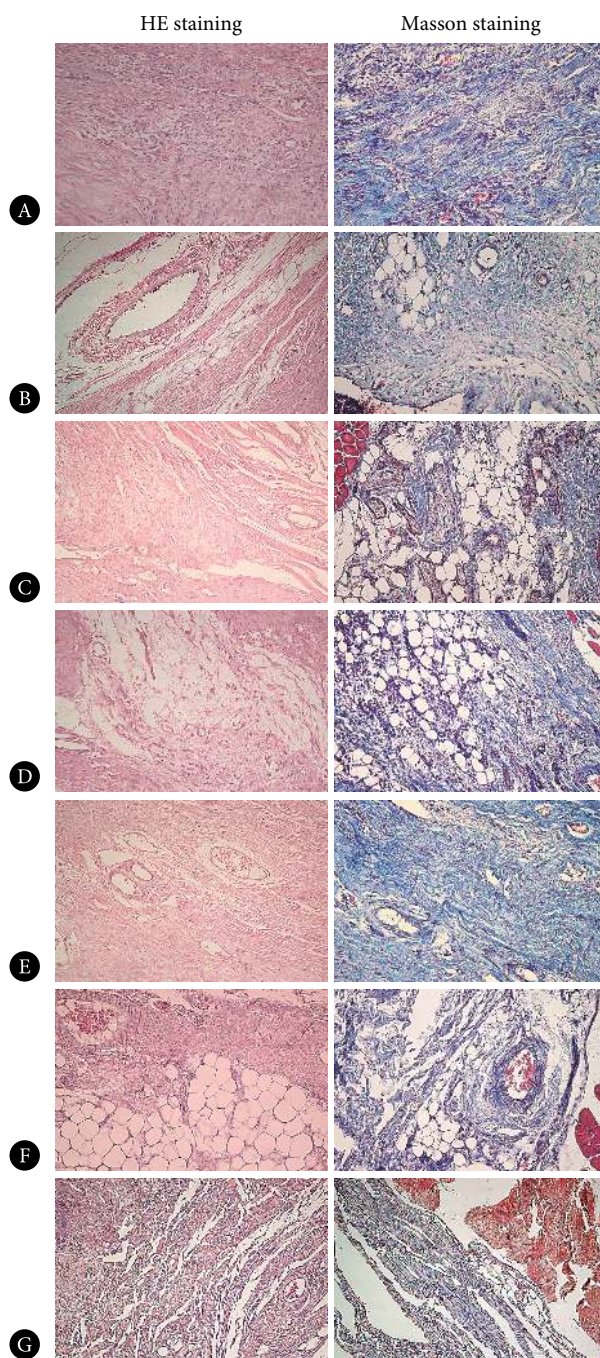


图3 各组关节囊组织治疗16 d后的病理改变。 $\times 400$

Fig 3 Pathological changes of joint capsule. $\times 400$

A: MOD group; B: S20 min group; C: S30 min group; D: S40 min group; E: UNT group; F: TRA group; G: CON group. A: 0 d (before treatment); B-E: 16 d after the treatment

2.6 治疗16 d后大鼠膝后关节囊组织IL-6蛋白的表达

见图5、表4。造模后即刻(0 d)的MOD组大鼠膝后关节囊组织IL-6蛋白的表达最高。治疗16 d后,CON组、UNT组和TRA组IL-6蛋白的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);而S30 min组在所有组中IL-6的蛋白表达最低($P < 0.05$)。

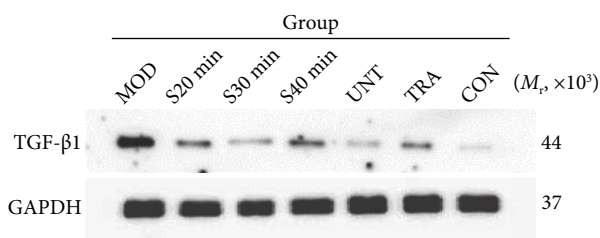


图 4 治疗 16 d 后各组膝后关节囊组织 TGF- β 1 蛋白表达

Fig 4 The expression of TGF- β 1 in the posterior capsule after 16 d treatment

表 4 各组膝后关节囊组织 TGF- β 1 及 IL-6 蛋白的表达相对量

Table 4 The protein expressions of TGF- β 1 and IL-6 in the posterior capsule

Group	n	TGF- β 1/GAPDH	IL-6/GAPDH
MOD	5	0.586 $\pm$ 0.007*	0.559 $\pm$ 0.008*
S20 min	5	0.215 $\pm$ 0.003*	0.418 $\pm$ 0.013*
S30 min	5	0.118 $\pm$ 0.003*	0.226 $\pm$ 0.003*
S40 min	5	0.283 $\pm$ 0.005*	0.469 $\pm$ 0.031*
UNT	5	0.127 $\pm$ 0.003*	0.296 $\pm$ 0.029
TRA	5	0.189 $\pm$ 0.006*	0.307 $\pm$ 0.021
CON	5	0.049 $\pm$ 0.002*	0.267 $\pm$ 0.032
F		4 424.597	87.362
P		<0.001	<0.001

* P <0.05, vs. other groups at the same time point

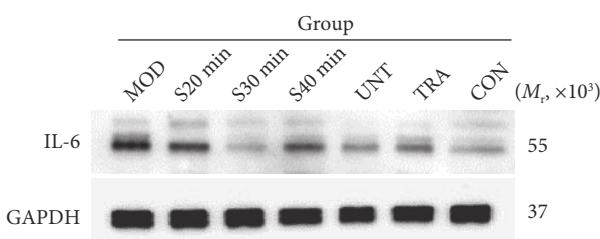


图 5 治疗 16 d 后各组膝后关节囊中 IL-6 蛋白表达

Fig 5 The expression of IL-6 in the posterior capsule after 16 d treatment

3 讨论

静态进展性牵伸是应用应力松弛原理重塑关节周围软组织,使其发生永久塑性形变,改善关节活动度。目前关于静态进展性牵伸的临床研究较多,基础研究很少,治疗时间依据治疗师个人经验通常设定在 20 ~ 40 min,缺乏理论依据^[5-6]。国内外关于不同时间的牵伸对关节挛缩的影响,缺乏临床随机对照研究,但国外有少量动物实验对牵伸治疗方案进行了初步研究。MORIYAMA 等^[7]采用不同力矩及时间的静态牵伸治疗脊髓损伤大鼠,显示大力矩(0.045 Nm)、长时间(30 min)比小力矩(0.015 Nm)、

短时间(15 min)改善关节活动度更为有效。USUBA 等^[8]对创伤性膝关节挛缩的大鼠进行不同力矩不同时间的静态牵伸,结果显示小力矩(0.02 Nm)、长时间(40 min)改善关节挛缩效果更好。但前人的研究采用的是静态牵伸治疗,而本研究使用静态进展性牵伸治疗,故关于静态进展性牵伸治疗的更优治疗方案仍需进一步研究。

已有许多研究采用步态分析用以评估动物疼痛以及功能状态,FEHMAN 等^[9]通过步态分析评估大鼠炎性疼痛程度,当炎症和疼痛减轻时步态中的支撑相延长、摆动相缩短、摆动速度加快。ANGEBY-MOLLER 等^[10]对踝关节急性炎症的大鼠进行了详细的步态分析,步态能很好的反映踝关节的功能状态,随着炎症及疼痛缓解,关节功能逐步恢复,步态相关指标也都随之改善。本研究结果显示不同时间的静态进展性牵伸治疗创伤性膝关节挛缩的效果不同,S30 min 组膝关节活动度、步态中的支撑相、摆动相和摆动速度改善均优于其他治疗组和 MOD 组,步幅在治疗 8 d 时可以看出 S30 min 组与 S40 min 组大于其他治疗组,治疗 16 d 时各组步幅差异无统计学意义。这可以说明 SPS 治疗 30 min 更好地提高了关节功能,进而改善步态。但步幅这个指标结果存在争议,各文献报道结果并不完全一致,步幅为反映身体协调性指标,与支撑相、摆动相等单足相关指标不同,文献中也报道单足相关指标有差异而协调性指标并无差异的结果,例如,王鑫蕊等^[11]使用 Catwalk 检测氧化苦参碱治疗神经病理性疼痛小鼠步态结果显示小鼠步幅治疗前后与对照组并未产生明显变化。本研究中,经治疗 8 d 时 S30 min 组和 S40 min 组步幅改善效果较为明显,但在 16 d 时各组步幅恢复相似,这可能是由于大鼠四足行走模式,经过长时间步态的调整代偿适应,单纯左后肢损伤对身体协调性产生影响较小,故在 16 d 时各组步幅差异无统计学意义。

挛缩关节中病理改变主要为关节囊增厚纤维化,成纤维细胞及肌成纤维细胞过度增殖,细胞外基质的沉积,胶原纤维增殖且排列紊乱,同时伴有淋巴细胞浸润^[12-13]。挛缩形成过程中涉及多种细胞因子和酶的作用,TGF- β 1、结缔组织生长因子(CTGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)等^[14-16]。研究显示挛缩关节囊包括 TGF- β 1 和 CTGF 升高^[17-18]。TGF- β 1 是创伤修复过程中参与炎症与纤维化的关键因子,其主要作用表现为促进成纤维细胞和肌成纤维细胞的增殖,刺激胶原合成与 TIMPs 的表达,抑制胶原分解与 MMPs 的合成,使细胞外基质沉积,纤维组织增生粘连。文献报道向关节腔内注射 TGF- β 1 和 CTGF 拮抗剂治疗兔创伤后膝关节挛缩,关节囊中肌成纤维细

胞和血管数量减少,胶原降解,滑膜增生减轻^[19-20]。采用牵伸以及超短波治疗兔膝关节挛缩,治疗后关节囊中TGF- β 1表达明显减少,减轻关节囊纤维化,关节活动明显改善^[21];本研究中静态进展性治疗30 min组治疗16 d后关节囊变薄,滑膜增殖减轻,粘连减少,胶原含量减少,肌成纤维细胞和淋巴细胞数量明显减少,TGF- β 1的蛋白表达较模型组和其他治疗组明显减少。

炎症反应也被认为是导致关节挛缩形成的因素之一,已有许多研究报道了关节制动挛缩后关节囊中巨噬细胞、肥大细胞和淋巴细胞增殖,IL-1、IL-6和TNF- α 等炎症因子表达升高,刺激成纤维细胞,促进关节囊纤维化^[22-24]。本研究结果显示治疗16 d后静态进展性S30 min组IL-6表达较其他治疗组(S20 min和S40 min)最低,甚至低于CON组,关节囊炎症反应减轻,疼痛以及关节功能恢复最佳;此外还观察到UNT组的TGF- β 1和IL-6表达均处于较低水平,这可能是由于关节挛缩已进入慢性炎症稳定阶段,细胞因子处于表达较低的水平,几乎与CON组表达水平相近,而牵伸属于一种类似于先破坏再治疗的方式,打破细胞因子的动态平衡过程,破坏关节囊中增生的结缔组织,使关节囊组织结构重塑,已有研究提出抑制巨噬细胞的迁徙可有效减轻关节囊炎症及纤维化,因此我们推测牵伸治疗30 min可能抑制了巨噬细胞的迁徙,进而炎症因子表达减低,其机制有待进一步研究证实^[25];另大鼠与人不同,恢复能力较强,因此UNT组细胞因子表达不活跃,这与KANEGUCHI等^[23]的研究一致,其报道制动后关节挛缩自然恢复1周后其TGF- β 1和IL-1的表达较造模组减低,与空白对照组差异很小。除此之外,本研究中单纯损伤未制动组(TRA)的TGF- β 1和IL-6表达一直高于对照组,虽然从关节活动度、步态和HE染色结果来看与对照组差异较小,我们可以认为制动是造成关节纤维化挛缩的主要原因,但不能认为关节创伤后不应进行制动。本研究未对损伤部位骨及软骨进行检测,且大鼠与人的生理病理结构存在差异,未制动而过早进行主动活动,可能不利于骨与软骨的愈合,不利于后期功能活动的恢复,故仍应制动,在制动后尽早进行康复治疗,以免形成不可逆的关节挛缩。这与已有的大量研究结果一致,TRUDEL等^[26]证实大鼠膝关节挛缩模型当制动1-2周时发生可逆的肌源性挛缩,当制动4周以上,关节将发生关节源因素不可逆性的挛缩。ANDO等^[27]制动大鼠膝关节,制动4周及以上,关节滑膜增殖粘连,大量纤维组织在关节腔中增殖,再复动16周后,关节病理改变也未完全恢复正常。且有研究显示大鼠膝关节挛缩形成后立刻进行主动活动不进行辅助治疗,虽然关节活动度较会增大,改善肌源性挛

缩,但会加重关节源性的挛缩,与自然恢复组相比,胶原含量和成纤维细胞数量增多,TGF- β 1和IL-1表达升高^[28]。

综上,静态进展性牵伸治疗30 min对大鼠创伤性膝关节挛缩改善最明显,降低IL-6与TGF- β 1的表达,抑制成纤维细胞增殖,促进胶原降解,减轻关节粘连和炎症反应,逆转关节囊纤维化,重塑关节囊结构,增加关节活动度,提高个体活动能力。为临床治疗关节挛缩提供科学依据与理论指导。虽然本动物实验得出静态进展性牵伸30 min效果最好,但未来的临床应用仍需进行大量临床实验来进一步证明。

参 考 文 献

- [1] SUNG E J, CHUN M H, HONG J Y, *et al.* Effects of a resting foot splint in early brain injury patients. *Ann Rehabil Med*, 2016, 40(1): 135-141.
- [2] DUNHAM C L, CASTILE R M, CHAMBERLAIN A M, *et al.* The role of periarticular soft tissues in persistent motion loss in a rat model of posttraumatic elbow contracture. *J Bone Joint Surg Am*, 2019, 101(5): e17[2019-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6738539>. doi:10.2106/JBJS.18.00246.
- [3] WONG K, TRUDEL G, LANEUVILLE O. Noninflammatory joint contractures arising from immobility: animal models to future treatments. *Biomed Res Int*, 2015, 2015(3): 848290.
- [4] HILDEBRAND K A, ZHANG M, HART D A. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in posttraumatic contractures. *Clin Orthopand Relat Res*, 2007, 456(456): 85-91.
- [5] SODHI N, YAO B, KHLOPAS A, *et al.* A case for the brace: a critical, comprehensive, and up-to-date review of static progressive stretch, dynamic, and turnbuckle braces for the management of elbow, knee, and shoulder pathology. *Surg Technol Int*, 2017, 31: 303-318.
- [6] LINDENHOVIUS A L, DOORNBERG J N, BROUWER K M, *et al.* A prospective randomized controlled trial of dynamic versus static progressive elbow splinting for posttraumatic elbow stiffness. *J Bone Joint Surg Am*, 2012, 94(8): 694-700.
- [7] MORIYAMA H, TOBIMATSU Y, OZAWA J, *et al.* Amount of torque and duration of stretching affects correction of knee contracture in a rat model of spinal cord injury. *Clin Orthop Relat Res*, 2013, 471(11): 3626-3636.
- [8] USUBA M, AKAI M, SHIRASAKI Y, *et al.* Experimental joint contracture correction with low torque—long duration repeated stretching. *Clin Orthop Relat Res*, 2007, 22(1): 70-78.
- [9] FEEHAN A K, ZADINA J E. Morphine immunomodulation prolongs inflammatory and postoperative pain while the novel analgesic ZH853 accelerates recovery and protects against latent sensitization. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 100-120.
- [10] ANGEY-MOLLER K, BERGE O G, HAMERS F P. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and rofecoxib. *J Neurosci Methods*, 2008, 174(1): 1-9.

- [11] 王鑫蕊, 杨丽, 徐榕雪. Catwalk步态分析法检测氧化苦参碱对神经病理性疼痛小鼠步态行为改善. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1): 36-39.
- [12] 余宝富, 陆骅. 创伤后肘关节外源性挛缩机制研究进展. 山东医药, 2016, 56(11): 93-95.
- [13] CHEN A F, LEE Y S, SEIDL A J, *et al.* Arthrofibrosis and large joint scarring. *Connect Tissue Res*, 2019, 60(1): 21-28.
- [14] KIM D H, LEE K H, LHO Y M, *et al.* Characterization of a frozen shoulder model using immobilization in rats. *J Orthop Surg Res*, 2016, 11(1): 160-166.
- [15] EVERDING N G, MASCHKE S D, HOYEN H A, *et al.* Prevention and treatment of elbow stiffness: a 5-year update. *J Hand Surg Am*, 2013, 38(12): 2496-2507.
- [16] HILDEBRAND K A. Posttraumatic elbow joint contractures: defining pathologic capsular mechanisms and potential future treatment paradigms. *J Hand Surg Am*, 2013, 38(11): 2227-2233.
- [17] HILDEBRAND K A, ZHANG M, GERMSCHIED N M, *et al.* Cellular, matrix, and growth factor components of the joint capsule are modified early in the process of posttraumatic contracture formation in a rabbit model. *Acta Orthop*, 2008, 79(1): 116-125.
- [18] KANEGUCHI A, OZAWA J, KAWAMATA S, *et al.* Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees. *J Orthop Res*, 2017, 35(7): 1414-1423.
- [19] EMAMI M J, JABERI F M, AZARPIRA N, *et al.* Prevention of arthrofibrosis by monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor: a novel use of bevacizumab in rabbits. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2012, 98(7): 759-764.
- [20] FUKUI N, TASHIRO T, HIRAOKA H, *et al.* Adhesion formation can be reduced by the suppression of transforming growth factor-beta1 activity. *J Orthop Res*, 2000, 18(2): 212-219.
- [21] 张全兵. 牵伸联合超短波治疗对兔膝关节挛缩模型中关节功能恢复以及关节囊纤维化影响的初步研究. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [22] MORREY M E, ABDEL M P, RIESTER S M, *et al.* Molecular landscape of arthrofibrosis: microarray and bioinformatic analysis of the temporal expression of 380 genes during contracture genesis. *Gene*, 2017, 610: 15-23.
- [23] KANEGUCHI A, OZAWA J, MINAMIMOTO K, *et al.* Low-level laser therapy prevents treadmill exercise-induced progression of arthrogenic joint contracture via attenuation of inflammation and fibrosis in remobilized rat knees. *Inflammation*, 2019, 42(3): 857-873.
- [24] YABE Y, HAGIWARA Y, SUDA H, *et al.* Joint immobilization induced hypoxic and inflammatory conditions in rat knee joints. *Connect Tissue Res*, 2013, 54(3): 210-217.
- [25] ITAYA N, YABE Y, HAGIWARA Y, *et al.* Effects of low-intensity pulsed ultrasound for preventing joint stiffness in immobilized knee model in rats. *Ultrasound Med Biol*, 2018, 44(6): 1244-1256.
- [26] TRUDEL G, LANEUVILLE O, COLETTA E, *et al.* Quantitative and temporal differential recovery of articular and muscular limitations of knee joint contractures : results in a rat model. *J Appl Physiol*, 2014, 117(7): 730-737.
- [27] ANDO A, SUDA H, HAGIWARA Y, *et al.* Remobilization does not restore immobilization-induced adhesion of capsule and restricted joint motion in rat knee joints. *Tohoku J Exp Med*, 2011, 227(1): 13-22.
- [28] KANEGUCHI A, OZAWA J, MINAMIMOTO K, *et al.* Active exercise on immobilization-induced contractured rat knees develops arthrogenic joint contracture with pathological changes. *J Appl Physiol*, 2018, 124(2): 291-301.

(2019-08-29收稿, 2020-01-15修回)

编辑 吕 熙