

· 基础研究 ·

脉冲超声波治疗对大鼠膝关节内侧副韧带损伤愈合的影响

樊永梅 张长杰 伍源 吕兰

【摘要】目的 通过检测转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在大鼠膝关节内侧副韧带 (MCL) 损伤模型中的表达以及观察局部瘢痕愈合的情况, 探讨脉冲超声波治疗对韧带损伤愈合的作用。**方法** 选择 18 只 Sprague-Dawley 大鼠, 行内侧副韧带切断术, 造模成功后随机分为对照组、0.5 W/cm² 超声组和 1.0 W/cm² 超声组。对照组不予以治疗, 0.5 W/cm² 超声组和 1.0 W/cm² 超声组依次予以每天 10 min 相应强度的脉冲超声波治疗, 治疗 8 d 后处死各组大鼠。大体观察各组大鼠局部韧带愈合的情况后, 取内侧副韧带进行苏木素-伊红 (HE) 染色、Van Gieson (VG) 染色及免疫组织化学染色, 观察并比较各组大鼠炎症细胞浸润、胶原纤维排列情况及 TGF- $\beta 1$ 表达强度。**结果** ①肉眼观察: 断裂的内侧副韧带均以瘢痕组织形式愈合, 与对照组比较, 2 个超声组的瘢痕组织明显增大。②HE 染色以及 VG 染色后光镜下观察: 对照组中炎症细胞以及新生血管数较 2 个超声组少, 并且对照组胶原纤维排列较 0.5 W/cm² 超声组、1.0 W/cm² 超声组紊乱。③0.5 W/cm² 超声组、1.0 W/cm² 超声组的 TGF- $\beta 1$ 表达较对照组强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 1.0 W/cm² 超声组的 TGF- $\beta 1$ 表达较 0.5 W/cm² 超声组强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** ①脉冲超声波治疗韧带损伤, 可使局部瘢痕组织增生, 炎症反应增强, 胶原纤维排列规则, 从而改善近期软组织愈合, 远期效果尚待进一步研究。②软组织损伤后, 脉冲超声波治疗可以促进 TGF- $\beta 1$ 表达增加; 并且治疗强度增大, TGF- $\beta 1$ 表达增强。③脉冲超声波治疗可能通过促进 TGF- $\beta 1$ 表达而促进软组织愈合。

【关键词】 超声波治疗; 内侧副韧带; 转化生长因子- $\beta 1$; 修复

The effect of pulsed ultrasound on medial collateral ligament repair FAN Yong-mei, ZHANG Chang-jie, WU Yuan, LV Lan. Department of Rehabilitation, Xiangya 2nd Hospital, Changsha 410011, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of pulsed ultrasound therapy (US) on medial collateral ligament healing in rats and its mechanism. **Methods** Eighteen 3-month-old male Sprague-Dawley rats with transected medial collateral ligaments (MCLs) were studied. They were randomly divided into a control group, a 0.5 W/cm² group and a 1.0 W/cm² group. The control group was not given any treatment. The 0.5 W/cm² group and 1.0 W/cm² group were given 10 minutes of pulsed US (duty cycle: on/off = 3 ms/1 ms) daily for 8 days at either 0.5 or 1.0 W/cm² intensity. All the rats were sacrificed on the 9th day. After macroscopic examination, their MCLs were harvested and studied using haematoxylin-eosin staining, Van Gieson's staining and immunohistochemical techniques in order to detect transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta 1$) and any histological or histochemical changes. **Results** Macroscopically, the lacerated MCLs had healed with scar tissue formation. Scarring appeared to be greater in the 0.5 W/cm² and 1.0 W/cm² groups than in the control group. Inflamed cells appeared to be more numerous in the treated groups than in the controls. There were significant differences in collagen fiber extent among all three groups. In the 1.0 W/cm² group, the average level of TGF- $\beta 1$ was significantly up-regulated, and TGF- $\beta 1$ expression was higher than in the other two groups. **Conclusions** Pulsed US can improve ligament healing in the short term, however whether long-term treatment with US can yield further improvement is unknown. Pulsed US can increase the level of TGF- $\beta 1$, which will be higher with higher US dosage. Pulsed US may enhance injured ligament repair by up-regulating TGF- $\beta 1$.

【Key words】 Ultrasound therapy; Medial collateral ligament; TGF- $\beta 1$; Tissue repair

韧带损伤是膝部常见的运动创伤, 尤以内侧副韧带 (medial collateral ligament, MCL) 损伤多见, 严重者常合并半月板损伤。韧带愈合不良易造成关节不稳和

继发性骨关节炎^[1], 严重影响治疗效果。

脉冲超声波治疗软组织损伤, 如肌腱和韧带损伤, 已有广泛研究, 但结果仍有争议^[2]。Warden 等^[3]发现, 低强度脉冲超声波能加速韧带愈合但远期并不能改善韧带愈合, 认为低强度脉冲超声波有利于韧带受损患者早期恢复活动。Sparrow 等^[4]对

膝内侧副韧带损伤兔模型给予低强度超声治疗后发现,治疗组韧带抗张力强度明显优于对照组,I型胶原成分明显增多,膝关节活动的恢复更好,再损伤的危险性更小。随着越来越多的研究证实超声波治疗在软组织修复中的作用,其机制也有待于进一步探讨。有研究表明,超声波治疗可以促进血管形成、成纤维细胞产生、白细胞黏附,增强纤维细胞活性以及增强胶原双折射^[5-8]。近几年来甚至有研究表明,对兔 MCL 损伤模型行脉冲超声波治疗,可以上调炎症因子如前列腺素-2 (prostaglandin-2, PGE-2) 和白介素-4 (interleukin-4, IL-4),刺激炎症反应^[9]。因此推测,超声波治疗很可能是通过上调某种或某几种细胞因子来促进软组织愈合。

本实验建立了大鼠膝关节 MCL 损伤模型,给予脉冲超声波治疗,通过观察韧带愈合情况以及检测韧带组织中转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor, TGF- $\beta 1$) 的表达来探讨超声波治疗对 TGF- $\beta 1$ 表达的影响以及超声波治疗对韧带愈合的作用,从而探讨超声波治疗是否通过提高 TGF- $\beta 1$ 表达水平来促进软组织损伤愈合。

材料与方法

一、实验动物与试剂

选择 18 只健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 230 ~ 280 g,由中南大学动物部提供。TGF- $\beta 1$ 兔多克隆抗体由北京中山公司生产,工作浓度为 1:100。应用日本欧技公司生产的 ES-2 型超声波治疗仪,由中南大学湘雅二医院康复科提供。

二、动物模型与分组

大鼠适应性生活 3 d 后,在无菌条件下于左后膝内侧行长约 1 cm 的纵切口,显露 MCL;胫骨结节水平锐性切断 MCL,切断后韧带断端有所回缩,横断处形成约 2 mm 宽的缝隙;止血后,用 5-0 尼龙线连续缝合深筋膜层,用 5-0 尼龙线间断缝合皮肤关闭切口。术后大鼠笼内自由放养。

造模成功后,将动物随机分为对照组、0.5 W/cm² 超声组和 1.0 W/cm² 超声组,每组 6 只。对照组不予任何治疗,0.5 W/cm² 超声组和 1.0 W/cm² 超声组每日给予相应强度的脉冲超声波治疗。

三、脉冲超声波治疗

自术后第 2 天始,0.5 W/cm² 超声组、1.0 W/cm² 超声组大鼠每日给予 1 次相应强度的脉冲超声波治疗,超声频率为 1 MHz,通断比 1:3,采用接触法,使用直径为 1.5 cm 的小声头,治疗前按照 0.03 ml/kg 体重剂量腹腔注射水合氯醛麻醉,每次麻醉后大鼠都能及时清醒。治疗时间每次 10 min,每天 1 次,连续 8 d,

第 9 天取标本。

四、观察指标

1. 大体观察:肉眼观察造模侧局部韧带愈合的情况,如断端是否愈合连接、瘢痕组织大小及表面结构。

2. 组织学检查:韧带固定后,冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,行 HE 染色和 Van Gieson (VG) 染色。

3. 免疫组织化学染色:取韧带组织作 TGF- $\beta 1$ 含量分析,应用北京中山公司提供的 TGF- $\beta 1$ 兔多克隆抗体试剂盒,按照试剂盒提供的说明书进行操作。将各组切片置于相同强度光线下用低倍镜和高倍镜观察 TGF- $\beta 1$ 的表达情况。每个标本选择 2 张切片,每张切片观察 5 个有代表性的高倍视野 ($\times 400$),以胞浆和胞膜中出现浅黄至棕褐色颗粒为阳性表达的判定标准。使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析,计算各标本的累积光密度。

五、统计学分析

应用 SPSS 13.0 版软件包进行统计学处理,所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、大体观察

术后第 9 天,各组大鼠均可见横行切断的 MCL 已经愈合并连接,新愈合的 MCL 无光泽。2 个超声组愈合处瘢痕组织增生较对照组明显,尤以 1.0 W/cm² 超声组愈合处瘢痕组织增生更明显,瘢痕组织最饱满,韧带结构的排列明显优于对照组和 0.5 W/cm² 超声组。

二、HE 染色和 VG 染色

大鼠正常组织 MCL 的 HE 染色切片可见胶原纤维呈波浪状,成纤维细胞散布于胶原纤维间,沿胶原纤维长轴排列。VG 染色见粗大的胶原纤维排列整齐,断端分界明显 (图 1)。

对照组 HE 染色示炎症细胞较少,新生血管不明显;VG 染色见胶原纤维变细,方向不一,排列紊乱 (图 2,3)。0.5 W/cm² 组 HE 染色示炎症细胞较对照组稍多,可见极少量的新生毛细血管;VG 染色见胶原纤维较对照组稍多,较 1.0 W/cm² 超声组少,排列稍紊乱 (图 4,5)。1.0 W/cm² 超声组 HE 染色示组织中炎症细胞密集,较对照组、0.5 W/cm² 超声组多,新生毛细血管较对照组、0.5 W/cm² 超声组稍明显;VG 染色见胶原纤维在最多,排列较规则,但仍然与正常韧带组织分界明显 (图 6,7)。

三、TGF- $\beta 1$ 免疫组化染色

术后第 9 天,1.0 W/cm² 超声组的 TGF- $\beta 1$ 累积

光密度最高, 达 $(20\ 447.39 \pm 2202.394)$, 其次为 $0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组, 为 $(13\ 747.60 \pm 1603.857)$, 对照组最低, 为 (9137.612 ± 1020.057) 。组间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1, 图 8 ~ 10。

表 1 TGF- β 1 表达累积光密度值(像素, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	累积光密度
对照组	6	$9\ 137.612 \pm 1\ 020.057$
$0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组	6	$13\ 747.60 \pm 1\ 603.857^a$
$1.0\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组	6	$20\ 447.39 \pm 2\ 202.394^{ab}$

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 $0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组比较, ^b $P < 0.05$

讨 论

膝关节 MCL 是重要的膝关节内侧稳定装置, 包括深、浅两部分。膝关节屈曲 $15^\circ \sim 90^\circ$ 时, 浅层可以控制胫骨的旋转和外展, 深层稳定半月板于胫骨和股骨, 在某些情况下, 还可以限制股骨内侧髁前脱位^[10]。MCL 一旦损伤, 可导致膝关节一定程度的不稳定, 且影响内侧半月板的功能, 导致骨性关节炎的发生。

张喜善等^[11]的研究显示, TGF- β 1 的表达在术后第 9 天达到高峰, 选择该时间点利于观察。曾有研究显示, $1.25\ \text{W}/\text{cm}^2$ 、持续时间 10 min 的脉冲和连续超声波治疗对兔头部皮肤无明显损伤, 是安全的^[12]。所以本实验选择术后第 9 天来观察各组韧带愈合的差异情况, 选择 $0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 和 $1.0\ \text{W}/\text{cm}^2$ 这两种治疗强度进行干预。

本实验发现, 脉冲超声波治疗可以促使局部瘢痕组织增生; 使组织中炎症细胞及新生血管增加, 促进炎症反应; 可以提高组织中 TGF- β 1 的水平, 且超声波治疗强度越大, 组织中 TGF- β 1 表达越多。这与 Leung

等^[2]研究的结果一致, 脉冲超声波治疗可能通过上调组织中 TGF- β 1 的表达, 来诱导成纤维细胞生成并与巨噬细胞迁移到损伤处, 促进胶原合成以及新生血管形成, 从而有助于韧带等软组织愈合。这可能是超声波治疗促进韧带愈合的主要分子机制。

韧带损伤后的愈合过程大致经过以下三个基本阶段: ①修复炎症期。该期生长因子释放是从血小板失颗粒开始, 其中包括表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、TGF- β 等, 是炎症细胞有力的趋向剂。有研究发现, TGF- β 1 可以趋化巨噬细胞^[13]。本实验观察到, 脉冲超声波治疗可以上调 TGF- β 1 水平, 刺激急性炎症反应, 这可能是超声波治疗使组织中炎症因子 PGE2 和 IL-4 水平上升所致^[9]。之后, 巨噬细胞在损伤处分泌其它生长因子, 包括 EGF、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、TGF- β 等, 从而刺激成纤维细胞、血管内皮细胞向创伤部位移动。梁国伟^[14]认为, 超声波治疗可以调节机体血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因的表达, 促进血管与毛细血管生成, 增加血流量, 改善供血。②增殖期, 即炎症细胞被趋化至损伤处后, 内皮细胞分化移行, 逐渐出现肉芽组织。肉芽组织富含巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、纤维连接蛋白和 III 型胶原等。成纤维细胞是最主要的合成、释放细胞间质 (胶原蛋白、粘连蛋白等) 的细胞。而 Robbins 等^[15]发现, TGF- β 1 可刺激肌腱基质成分中蛋白多糖, 如二聚糖和聚集蛋白聚糖、胶原和纤维粘连蛋白的合成, 并能自我诱导 TGF- β mRNA 对照组表达提高 40%。同时有研究发现, 组织中 TGF- β 1 水平升高可以趋化成纤维细胞, 刺激成纤维细胞合成, 释放细胞产物, 促进

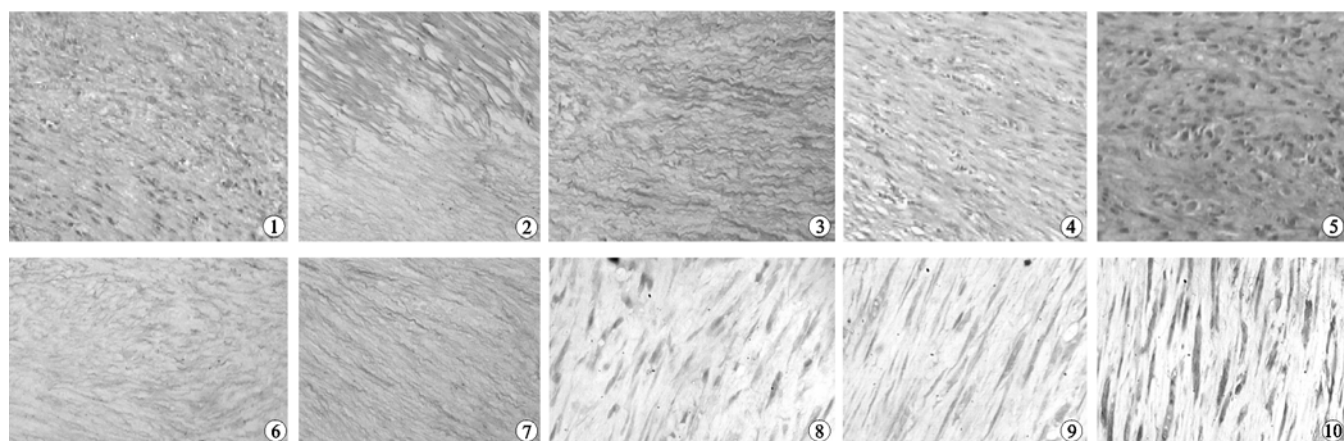


图 1 $1.0\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL 断端 (HE 染色, $\times 100$); 图 2 对照组 MCL (HE 染色, $\times 100$); 图 3 对照组 MCL (VG 染色, $\times 100$); 图 4 $0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL (HE 染色, $\times 100$); 图 5 $0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL (VG 染色, $\times 100$); 图 6 $1.0\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL (HE 染色, $\times 100$); 图 7 $1.0\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL (VG 染色, $\times 100$); 图 8 对照组 MCL 的 TGF- β 1 表达 (免疫组化染色, $\times 400$); 图 9 $0.5\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL 的 TGF- β 1 表达 (免疫组化染色, $\times 400$); 图 10 $1.0\ \text{W}/\text{cm}^2$ 超声组 MCL 的 TGF- β 1 表达 (免疫组化染色, $\times 400$)

肉芽组织增生^[2,16]。③重塑期,即Ⅲ型胶原逐渐被Ⅰ型胶原取代,这一过程一直持续到韧带组织的胶原成分及机械性能逐渐趋于正常。然而对于瘢痕组织而言,这个理想的过程也许永远不能实现。Conti 等^[19]研究发现,TGF- β 1 可增强韧带的刚度和断裂能量,而bFGF和IGF-1 则无此作用。超声波治疗不仅可以增强兔跟腱胶原双折射性,更好地组织胶原束的显微结构,还可以促进 TGF- β 1 的表达,就像本实验和 Leung 等^[2]的实验中所见,胶原纤维排列更为规则,限制了瘢痕组织过度增生。

Chang 等^[17]发现,正常肌腱细胞和腱鞘细胞可表达 TGF- β 1,在创伤愈合过程中,肌腱细胞、腱鞘细胞及炎性细胞中 TGF- β 1 的 mRNA 表达显著上调。张喜善等^[11]研究发现,大鼠 MCL 损伤后,TGF- β 1 及其受体的表达呈现一定的规律性:主要分布于成纤维细胞和血管内皮细胞中,呈带状分布,越靠近韧带断端,表达越丰富,表达高峰期在伤后第 9 天。本实验发现,伤后第 9 天 TGF- β 1 表达阳性率高,主要分布于成纤维细胞和血管内皮细胞中,但是 TGF- β 1 分布较为均匀,没有发现越靠近韧带断端,表达越丰富的规律。Matsui 等^[18]的研究显示,低频脉冲超声波治疗第 12 天时,治疗组 MCL 的机械性能明显增强,但这种作用在治疗第 21 天时消失,组织切片显示治疗组的胶原纤维直径较对照组大。本实验和以往这些研究的差别在于超声波的治疗强度,提示强度越大可能效果越好,但是强度过大则会对机体造成损伤。

综上所述,韧带损伤后经过脉冲超声波治疗,损伤局部瘢痕组织增加,胶原纤维排列规则,近期可改善软组织愈合,远期效果尚待进一步研究。软组织损伤后,局部 TGF- β 1 表达增多,脉冲超声波治疗可在短期内促进 TGF- β 1 的表达,并且治疗强度增大,TGF- β 1 表达增强。脉冲超声波治疗可能通过促进 TGF- β 1 表达而促进软组织愈合。

参 考 文 献

- [1] 陈连旭,傅欣,张继英,等. 内侧副韧带切断合并半月板部分切除对大鼠膝关节软骨、滑膜和细胞因子的影响. 中国运动医学杂志, 2006,25:655-657.
- [2] Leung MP, Ng GY, Yip KK. Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. *Ultrasound Med Biol*, 2006,33:449-452.
- [3] Warden SJ, Avin KG, Beck EM, et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates and a nonsteroidal anti-inflammatory drug delays knee ligament healing. *Am J Sports Med*, 2006,34:1094-1102.
- [4] Sparrow KJ, Finucane SD, Owen JR, et al. The effects of low intensity ultrasound on medial collateral ligament healing in the rabbit model. *Am J Sports Med*, 2005,33:1048-1056.
- [5] Maxwell L, Colletcut T, Gledhill M, et al. The augmentation of leucocyte adhesion to endothelium by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 1994,20:383-390.
- [6] Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the Achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol*, 2001,27:1691-1696.
- [7] DesRosiers EA, Yahia L, Rivard CH. Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors. *J Orthop Res*, 1996,14:200-208.
- [8] Mailhot JM, Schuster GS, Garnick JJ, et al. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF- β 1 stimulation. *J Clin Periodontol*, 1995,22:679-685.
- [9] Leung MCP, Ng GY, Yip KK. Effect of ultrasound on acute inflammation of transected medial collateral ligaments. *Arch Phys Med Rehabil*, 2004,85:963-966.
- [10] Haimes JL, Wroble M, Grood ES, et al. Role of medial structures in the intact and anterior cruciate ligament deficient knee. *Am J Sports Med*, 1994,22:402-409.
- [11] 张喜善,罗怀灿,鲁玉来,等. 韧带愈合过程中转化生长因子 β 1 及其 I 型受体表达的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2001,8:472-474.
- [12] 高敬龙. 超声波作用于兔头部皮肤后损伤效应和温度变化的实验研究. 中华物理医学与康复杂志, 1998,20:58-60.
- [13] Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987,84:5788-5792.
- [14] 梁国伟. 综合康复治疗膝关节骨关节炎的疗效观察. 中华物理医学与康复杂志, 2006,28:553-554.
- [15] Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG. Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys*, 1997,15,342:203-211.
- [16] Beck LS, Deguzman L, Lee WP. TGF-beta 1 accelerates wound healing; reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. *Growth Factor*, 1991,5:294-304.
- [17] Chang J, Most D, Stelnicki E, et al. Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing evidence for dual mechanisms of repair. *Plast Reconstr Surg*, 1997,100:937-944.
- [18] Matsui N, Yoshiya S, Takakura Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. *Ultrasound Med*, 2002,21:283-288.
- [19] Conti NA, Dahners LE. The effect of exogenous growth factors on the healing of ligament injuries. *Trans Orthop Res Soc*, 1993,18:60.

(修回日期:2009-12-29)

(本文编辑:吴倩)