

· 基础研究 ·

物理疗法促进髌骨-髌腱结合部损伤早期恢复的实验研究

陈鸿辉 杨小红 王文 梁佩红 徐钢 秦岭

【摘要】目的 探讨低强度脉冲超声刺激(LIPUS)和功能性电刺激(FES)对兔髌骨-髌腱结合部(BTJ)损伤愈合的影响。**方法** 18周龄成年雌性新西兰兔63只,建立髌骨部分切除模型,随机分为超声组、复合组和对照组。超声组在术后3d开始为期6周的LIPUS治疗,复合组在术后1~4周给予LIPUS治疗,在5~12周给予FES治疗。通过组织学染色观察BTJ纤维软骨移行带的修复,并进行生物力学测试,以评价其疗效。**结果** (1)组织学结果显示,超声组和复合组术后6周在截骨界面均有大量新骨生成,BTJ可见大量新生软骨细胞;术后12周纤维软骨带初步形成;术后18周可见具有过渡结构的纤维软骨带。对照组术后6周纤维母细胞增生,无新骨形成;术后18周出现大量新生软骨细胞,但缺乏纤维软骨带的过渡结构。(2)术后6、12和18周的力学测量结果显示,各组BTJ随时间的推移而逐渐改建,3个时间点超声组、复合组的极限拉应力均明显高于对照组($P < 0.05$)。**结论** LIPUS和FES可使骨、软骨等多种细胞增生,通过促进新骨形成及重建纤维软骨带的过渡结构,从而加快骨-肌腱结合部位的早期恢复。

【关键词】 骨-肌腱结合部; 低强度脉冲超声; 功能性电刺激

An experimental study of physical therapy in the early healing of a patellar bone and tendon junction CHEN Hong-hui*, YANG Xiao-hong, WANG Wen, LIANG Pei-hong, XU Gang, QIN Ling. * Guangzhou Institute of Traumatology, The 4th Affiliated Hospital of the Medical College of Ji Nan University, Guangzhou 510220, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of low-intensity pulsed ultrasound and functional electrical stimulation on the healing of a patellar bone-tendon junction (BTJ). **Methods** An animal model of partial patellectomy was formed in 63 mature female New Zealand White rabbits (18 weeks old), and the rabbits were then randomly classified into ultrasound, compound and control groups. The ultrasound group was given low-intensity ultrasound therapy for 6 weeks beginning 3 days after the operation, while the compound group received the same treatment from week 1 to week 4 after the operation, and the compound group was given functional electrical stimulation from week 5 to week 12. The plerosis of BTJ in the fibrous cartilage zone was observed, along with biomechanical examination at the end of the test period. **Results** (1) In the ultrasound and compound groups, the histological examination revealed abundant new bone formation at the cut bone interface at 6 weeks after the operation. Many new chondrocytes were observed at the BTJ. A fiber cartilage zone formed beginning 12 weeks after the operation. The fibrous cartilage zones had a transition structure at 18 weeks. In the control group, there was fibroblast proliferation but no new bone formation at 6 weeks after the operation, and abundant new cartilage cells at 18 weeks, but no transition structure was observed in the fibrous cartilage zones. (2) Mechanical testing at three time points after the operation demonstrated that the BTJ was gradually rebuilt in every group with time. The limit tensile stresses in the ultrasound and compound groups were significantly larger than in the control group at all three time points. **Conclusion** Low-intensity ultrasound and functional electrical stimulation can promote the proliferation of bone and cartilage cells. This can accelerate new bone formation and rebuild a transition structure of fibrous cartilage, and so speed up early healing of bone-tendon junctions.

【Key words】 Bone-tendon junctions; Low-intensity pulsed ultrasound; Functional electrical stimulation

骨-肌腱结合部(bone-tendon junction, BTJ)损伤在汽车工业和体育事业日益发达的今天十分常见,髌骨

损伤后手术切除部分髌骨并重置髌腱或股四头肌于剩余的髌骨上,是通常的外科选择。由于BTJ复杂的特征性结构——纤维软骨移行带的恢复缓慢和困难,术后通常需要较长时间的固定,但长时间的外固定对骨骼肌和关节的功能均有明显的影响。因此,如何能缩短固定时间,早期开始功能训练,是重要的研究课题。大量的动物或临床试验证实:低强度脉冲超声刺激

基金项目:国际骨折内固定研究会 AO 基金资助项目(No. AO/ASIF03-Q26)

作者单位:510220 广州,暨南大学医学院第四附属医院、广州市创伤外科研究所(陈鸿辉、杨小红、王文、梁佩红、徐钢);香港中文大学威尔斯亲王医院矫形外科及创伤学系(秦岭)

(low intensity pulsed ultrasound stimulation, LIPUS) 在骨折愈合、骨不连、韧带损伤和软骨缺损修复等方面有明显的疗效^[1-3]; 功能性电刺激 (functional electrical stimulation, FES) 在骨折愈合延迟和不愈合、肢体麻痹以及职业病患者肌肉劳损的治疗方面也有很好的效果^[4,5]。本研究建立兔髌骨部分切除模型, 术后采用 LIPUS 和 FES 进行治疗, 以了解物理疗法对 BTJ 愈合的影响, 为临床上 BTJ 的修复重建、术后康复的方法与时机选择提供可靠的理论与实验依据。

材料与方法

一、兔髌骨部分切除模型的建立^[6,7]与分组

成年雌性新西兰兔 63 只 (18 周龄), 体重为 2.2 ~ 2.5 kg, 随机分为超声组、复合组和对照组, 每组 21 只。肌肉注射 10% 氯胺酮 (0.5 ml/kg 体重), 静脉注射 2.5% 苯巴比妥钠, 每次 0.2 ~ 0.5 ml, 维持麻醉下, 膝外侧入路, 于髌骨远端 1/3 横行截骨, 去除远端 1/3 髌骨后, 于近侧剩余髌骨垂直钻 2 个直径为 0.8 mm 的孔, 将髌腱用不可吸收缝线直接缝合于近端髌骨上, 并用“8”字钢丝保护, 膝关节屈曲 90° 位石膏固定 6 周。术后 3 d 在手术部位开窗, 用于 LIPUS 的治疗。术后分笼喂养, 拆除石膏固定后笼内自由活动。

二、术后处理

治疗时 3 组动物均给予氯胺酮 (0.25 ml/kg 体重, 肌肉注射) 镇静。超声组在术后 3 d 开始 LIPUS 治疗, 强度为 $(30.0 \pm 5.0) \text{ mW/cm}^2$, 脉冲宽度为 200 μs , 频率为 1.5 MHz, 每天 1 次, 每次 20 min, 共 6 周, 治疗时在开窗部位放置直径为 2.5 cm 的超声波传感器, 超声头与皮肤间均匀涂布耦合剂。复合组在术后 1 ~ 4 周给予 LIPUS 治疗, 方法与超声组相同; 在 5 ~ 12 周给予 FES 治疗, 脉冲宽度为 20 μs , 肌肉收缩刺激循环为 1 s 开、2 s 关, 每天 1 次, 每次 30 min; 治疗时拆除石膏, 于手术侧下肢股四头肌表面皮肤均匀涂布耦合剂后, 放置 2 个 2.5 cm × 3.5 cm 的软塑料电极板 (正极在近端, 负极在远端); FES 的振幅从健侧最大收缩强度的 10% 开始, 每周增加 5%。对照组不给予治疗, 而在手术方法、术后护理、喂养及活动等方面与另外 2 组相同。

三、组织学观察

于术后 6, 12, 18 周分别处死实验动物取材, 每个时间点用 2 例完整的标本进行组织学观察, 5 例在完成生物力学试验后也回收用于组织学观察, 各个愈合时间点的样本实际总数分别为 7。标本用 10% 中性甲醛固定 24 h, 10% 甲酸脱钙, 系列酒精脱水, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μm , HE 染色, 镜下观察组织学变化以及新生组织中纤维软骨带的重建。

四、生物力学检测

于术后 6, 12, 18 周分别处死实验动物, 各个愈合时间点的样本数为 5; 受试肢体连同完整的股四头肌-髌骨-髌腱-胫骨复合体一起取材, 标本用 0.9% 生理盐水纱布包裹, 封存在保鲜袋中, -20℃ 冰箱中冻存待测。检测时将标本解冻, 剔除膝关节周围组织和张力钢丝, 测量并计算出愈合界面横截面积。标本用自制的夹具固定于力学试验仪上 (Tinius Olsen H25KS), 胫骨与负重轴呈 10° 前倾生理角, 先以 1 N 拉力、20 mm/min 拉速和 1 mm/min 移位施加 10 个周期的预负荷, 以消除潜在的膝复合体内张力不均的影响, 然后再以 20 mm/min 拉速拉断复合体, 记录断裂载荷, 计算极限拉应力 (极限拉应力 = 愈合界面横截面积/极限拉伸强度)。

五、统计学分析

所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件处理。生物力学检测结果采用单因素方差分析进行组间比较。

结 果

一、正常髌骨-髌腱结合部结构

正常髌骨-髌腱结合部 4 层特征性结构明显 (图 1), 可见纤维细胞、纤维软骨细胞、钙化的纤维软骨细胞和骨细胞。

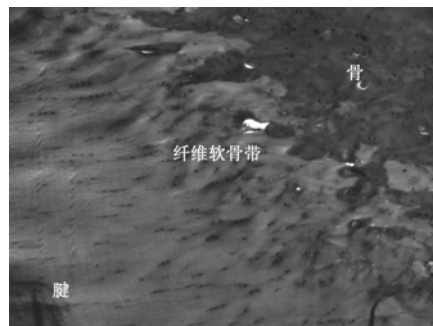


图 1 正常髌骨-髌腱结合部结构, 包括纤维细胞、纤维软骨细胞、钙化的纤维软骨细胞和骨细胞 (HE 染色, ×100)

二、髌骨-髌腱结合部组织学观察

术后 6 周, 超声组有大量的纤维母细胞、成骨细胞增生, 可见新骨形成, 并有少量的软骨化生 (图 2A); 复合组细胞增生活跃, 出现大量的成骨细胞和破骨细胞, 有明显的新骨形成, 骨-腱连接处出现灶状排列的新生软骨细胞 (图 2B); 对照组可见大量的纤维母细胞增生, 细胞排列紊乱, 截骨界面仍清晰可辨, 未见新骨形成 (图 2C)。

术后 12 周, 超声组软骨化生明显, 可见软骨细胞嵌入胶原纤维中生长, 纤维软骨带初步形成 (图 3A); 复合组软骨化生明显, 沿力的方向出现弧型的新生纤维软骨带, 仍可见成骨细胞和破骨细胞, 各种细胞均排

列整齐,极性明显(图 3B);对照组可见新骨形成,骨-腱连接处的组织结构杂乱,主要是纤维结缔组织(图 3C)。

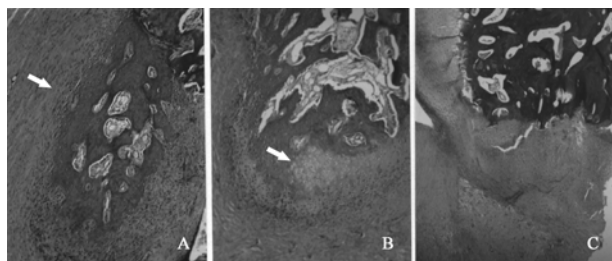


图 2 术后 6 周, A. 超声组细胞增生活跃, 可见新骨形成(箭头所示)(HE 染色, $\times 100$); B. 复合组出现大量的成骨细胞和破骨细胞, 新骨形成明显, 骨-腱连接处出现灶状排列的新生软骨细胞(箭头所示)(HE 染色, $\times 100$); C. 对照组大量的纤维母细胞增生, 无新骨形成(HE 染色, $\times 100$)

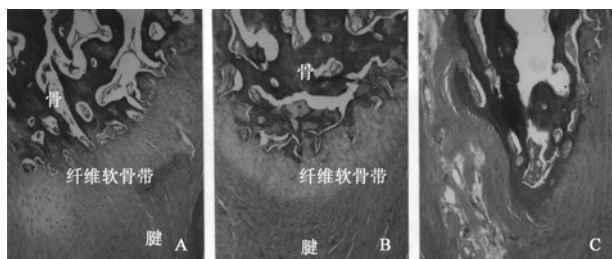


图 3 术后 12 周, A. 超声组软骨化生明显, 纤维软骨带初步形成(箭头所示)(HE 染色, $\times 100$); B. 复合组骨-腱连接处出现大量软骨细胞包绕髌骨向腱内长入, 弧型的纤维软骨带初步形成, 其形态更类似正常髌骨结构(HE 染色, $\times 100$); C. 对照组骨-腱连接处的组织结构杂乱(HE 染色, $\times 100$)

术后 18 周, 超声组细胞增生减慢, 胶原纤维及细胞排列整齐, 纤维软骨带基本形成, 接近骨-肌腱结合部的正常结构(图 4A); 复合组骨-腱连接处各种细胞沿纵轴方向有规律地排列, 出现由多种细胞构成的、与正常 BTJ 过渡结构类似的纤维软骨移行带(图 4B); 对照组的纤维组织与骨组织直接相连, 部分区域出现软骨细胞, 但缺乏骨-肌腱结合部的纤维软骨带的过渡结构(图 4C)。

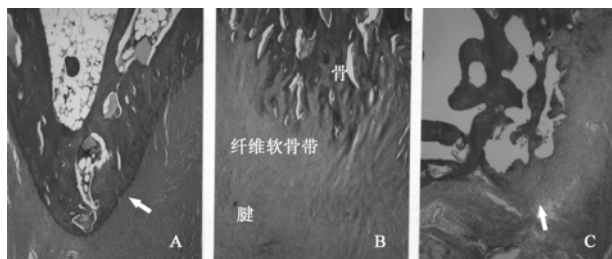
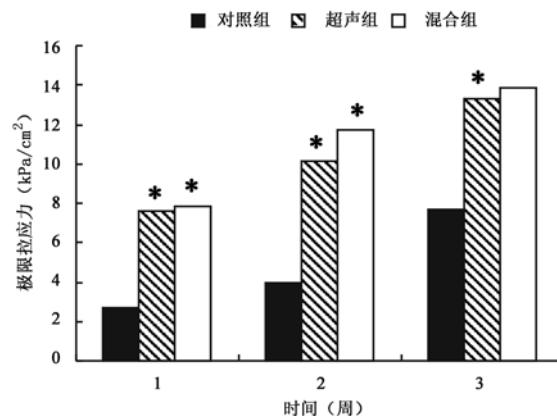


图 4 术后 18 周, A. 超声组胶原纤维及细胞排列整齐, 纤维软骨带基本形成, 并出现连续的潮线(箭头所示)(HE 染色, $\times 100$); B. 复合组骨-腱连接处组织排列整齐, 出现与正常 BTJ 类似的细胞过渡结构(HE 染色, $\times 100$); C. 对照组软骨细胞形成较多(箭头所示), 细胞排列紊乱, 缺乏正常 BTJ 结构(HE 染色, $\times 100$)

三、生物力学检测

生物力学检测结果显示各组极限拉应力随着时间的推移逐步增加, 超声组及复合组各时间点的应力均显著高于对照组(图 5)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

图 5 不同时间点的极限拉应力均数比较

讨 论

骨-肌腱结合部处于软硬两种不同组织的交界处, 位置特殊, 组织构成复杂, 损伤后其特征结构纤维软骨带的重建比较困难。在组织愈合的相关研究领域中, 物理刺激方法是常用的康复手段, 由于具有无创性的优势而越来越受到重视, 其中 LIPUS 是近年来公认的能促进骨折愈合的一种新的物理治疗手段, 大量的研究证实, LIPUS 可刺激肥大软骨细胞增殖、促进软骨内化骨、增强细胞外基质的合成及刺激血管再生, 从而促进骨折愈合和软骨再生^[1-3,8]。本研究将其应用于 BTJ 修复的研究, 通过建立兔髌骨部分切除模型观察超声刺激对组织愈合的影响, 术后 6 周可见纤维母细胞、成骨细胞、软骨细胞等增生和分化, 新骨形成远早于对照组。

在骨-腱连接的修复过程中, 纤维软骨带的重建至关重要。正常的 BTJ 纤维软骨带结构是从一种组织到另一种组织的过渡部分, 较为复杂, 包括纤维组织、纤维软骨、钙化的纤维软骨细胞和骨 4 个部分, 其特殊结构使刚度自韧带到骨逐渐增加, 张力得到梯度分布, 这种弹性调节可降低韧带的牵张负荷, 以承受更大的载荷^[9,10]。Leung 等^[11]采用与本研究相同的模型, 在术后 24 周时仅观察到一层约 0.1 mm 的纤维软骨层; Wong 等^[12]以羊为实验动物, 采用相似模型, 在术后 24 周可以观察到 BTJ 界面形成与正常类似的潮线结构; 近期有研究报道在犬动物模型前十字韧带重建术后一年才能观察到组织学上与正常骨-腱接点相似的结构^[13]。本研究证实, 在术后 12 周, 超声组已经出现

幼稚的纤维软骨带,纤维软骨细胞和胶原纤维沿着髌骨-髌腱纵轴的方向生长排列;在术后 18 周,可见与正常 BTJ 类似的纤维软骨带及连续的潮线结构;而对照组的修复速度较慢,术后 18 周在 BTJ 位置主要是大量的软骨细胞及纤维组织形成,缺乏正常的过渡结构。实验结果显示,LIPUS 刺激有利于纤维软骨带的早期形成,从而促进 BTJ 的修复。

骨关节损伤的治疗,一般需要一段时间不同形式的固定和制动以保证损伤的愈合。由于制动可带来肌肉萎缩、关节强直,组织的形态结构、生物化学和生物力学的改变,这一系列病理变化使功能恢复更加困难。因此,制定术后早期康复训练计划对关节功能的恢复有至关重要的作用。FES 是常用的康复手段。研究表明,FES 有利于退变组织的早期恢复^[14,15],防止肌肉萎缩及恢复瘫痪肌的功能等。本研究设计在术后早期(1~4 周)应用 LIPUS 促进细胞增生和纤维结缔组织的形成,以增强 BTJ 对负荷的承受能力,使早期功能训练成为可能,然后采用 FES 诱导股四头肌收缩进行功能训练,促进 BTJ 的重建。组织学结果显示,超声组和复合组 BTJ 恢复均早于对照组,其中复合组应用 FES 进行功能训练,使损伤局部早期受到应力刺激,在术后 6 周细胞及胶原纤维的排列更为整齐和有序,而术后 12 周出现的类纤维软骨带呈弧形,较单纯超声组出现的呈“一”字形排列的纤维软骨带更接近正常的 BTJ 结构。

随着时间的延长、组织的修复改建以及新生胶原的增多,生物力学检测结果显示各组的力学性能在逐渐提高,各组 18 周的极限拉应力在 3 个时间点内呈现逐级上升趋势,其中,超声组及复合组极限拉应力在各阶段均显著高于对照组($P < 0.05$)。在实验早期(1~4 周),超声组及复合组的处理方法相同,在 5~6 周,复合组改用 FES 治疗,诱导股四头肌收缩,增加 BTJ 界面的应力,以加快损伤组织的重塑改建,由于时间尚短,术后 6 周极限拉应力虽有增高的趋势,但组间差异无统计学意义,而在组织学结果中则可见到愈合界面的软骨细胞出现最早、细胞排列更为有序等有利于纤维软骨带重建的现象,在术后 12 周,复合组的极限拉应力较超声组大,此时沿力线方向出现的弧形结构的纤维软骨带,更符合力学的要求。在实验的后期,随着时间的推移,组织的修复改建速度逐渐减慢,超声组与复合组的应力也相应接近。

术后适当的康复训练不仅有利于 BTJ 的愈合和成熟,同时可以加快骨-腱过渡结构的演变过程。物理治疗具有无创性的优势,其中 LIPUS 和 FES 在骨科康复治疗中应用很广泛。本研究证实,在兔髌骨部分切除

模型中,LIPUS 可以促进 BTJ 的愈合,FES 治疗可使局部承受应力刺激以加速损伤部位的塑型重建,二者相结合更有利于 BTJ 的恢复,尤其是在损伤的早期。组织学及力学检测结果提示,使用 LIPUS 和 FES 治疗 BTJ 损伤,术后的肢体制动时间可适当缩短,会有利于更早地进行康复训练,降低术后愈合界面再次损伤或断裂的风险。

参 考 文 献

- Okada K, Miyakoshi N, Takahashi S, et al. Congenital pseudoarthrosis of the tibia treated with low-intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS). *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29:1061-1064.
- Mayr E, Frankel V, Ruter A. Ultrasound—an alternative healing method for nonunions? *Arch Orthop Trauma Surg*, 2000, 120: 1-8.
- Takakura Y, Matsui N, Yoshiya S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. *J Ultrasound Med*, 2002, 21: 283-288.
- Qin L, Appell HJ, Chan KM, et al. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*, 1997, 78: 512-517.
- Belanger M, Stein RB, Wheeler GD, et al. Electrical stimulation: can it increase muscle strength and reverse osteopenia in spinal cord injured individuals? *Arch Phys Med Rehabil*, 2000, 81:1090-1098.
- Wong MWN, Qin L, Tai JKO, et al. Engineered allogeneic chondrocyte pellet for reconstruction of fibrocartilage zone at bone-tendon junction—a preliminary histological observation. *J Biomed Mater Res*, 2004, 70:362-367.
- 徐钢, 陈鸿辉, 杨小红, 等. 低强度超声促进兔骨-肌腱结合部早期恢复的初步观察. *中国矫形外科杂志*, 2005, 13:767-769.
- 贾小林, 陈文直, 司海鹏, 等. 超声对兔关节软骨损伤的修复作用. *中华创伤杂志*, 2004, 20:97-99.
- 陈启明, 梁国穗, 秦岭, 等, 译. 骨关节肌肉系统生物学和生物力学. 北京:人民卫生出版社, 2001.498-530.
- 张春礼, 范宏斌, 吕荣, 等. 自体 and 异体肌腱重建前十字韧带后止点转归的组织学研究. *中华骨科杂志*, 2004, 24:146-149.
- Leung SK, Qin L, Fu LK, et al. A comparative study of bone to bone repair and bone to tendon healing in patella-patellar tendon complex in rabbits. *J Clin Biomech*, 2002, 17: 594-602.
- Wong MWN, Qin L, Lee KM, et al. Healing of bone-tendon junction in a bone trough. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 413:291-320.
- 滕星, 王满宜, 黄啸原, 等. 骨-髌腱骨自体移植重建前十字韧带的研究. *中华骨科杂志*, 2005, 25: 491-496.
- Qin L, Appell HJ, Chan KM, et al. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil*, 1997, 78: 512-517.
- Belanger M, Stein RB, Wheeler GD, et al. Electrical stimulation: can it increase muscle strength and reverse osteopenia in spinal cord injured individuals? *Arch Phys Med Rehabil*, 2000, 81: 1090-1098.

(修回日期:2006-02-15)

(本文编辑:松 明)