

· 基础研究 ·

Ilizarov 技术对关节软骨病理改变的实验观察

韩大为, 李良华, 王清玉, 卢圣友

(福建中医学院附属人民医院骨科, 福建 福州 350004)

【摘要】 目的: 了解在 Ilizarov 技术下, 受牵拉的实验踝关节软骨之间的压力改变对关节软骨的影响, 为临床提供理论依据。方法: 在 18 只实验狗左右足踝关节处分别装上 Ilizarov 外固定支架, 采用 1 mm/d 的牵拉速度, 先制造内翻畸形, 时间 3 周, 致踝关节内翻 15°, 摄 X 线片证实后, 停止牵拉 3 周, 再以相同的速度 (1 mm/d) 矫正畸形, 时间 3 周。并于第 3、7、9 周 (分组为: A 组、B 组、C 组) 取实验足内侧关节软骨和健足内侧关节软骨 (D 组), 通过 HE 染色, 观察内侧关节软骨形态学改变。通过免疫组织化学染色, 应用软件 Image-Pro Plus 6.0 取得图像灰度值, 用 SPSS 13.0 进行统计学处理。使用透射电镜观察软骨的显微结构。结果: ① Mankin 得分: 手术后 A 组和 B 组 Mankin 得分差异有统计学意义 ($P=0.043<0.05$); 手术后 B 组和 C 组 Mankin 得分差异有统计学意义 ($P=0.038<0.05$)。② 灰度值: A 组和 B 组比较, $P=0.047<0.05$, 差异有统计学意义; B 组和 C 组比较, $P=0.045<0.05$, 差异有统计学意义; A 组和 D 组比较, $P=0.039<0.05$, 差异有统计学意义; C 组和 D 组比较, $P=1.23>0.05$, 差异无统计学意义。结论: 在 Ilizarov 牵张技术牵拉下, 当踝关节软骨面之间压力增大时, 关节软骨会发生压力性坏死; 当关节软骨面之间压力逐渐减小后, 关节软骨可逐渐恢复再生。

【关键词】 踝关节; 软骨; 骨再生; 病理学

Effects of Ilizarov technique on the histopathological changes of articular cartilage HAN Da-wei, LI Liang-hua, WANG Qing-yu, LU Sheng-you. Department of Orthopaedics, the People's Hospital Affiliated to Fujian College of TCM, Fuzhou 350004, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of pressure changes on the experimental articular cartilage by utilizing Ilizarov distraction technique. **Methods:** The Ilizarov external fixators were fixed at the left ankle joints of 18 experimental dogs, and the fixators were stretched with a speed of 1 mm/d to create a varus deformity. After three weeks, the ankle varus was 15 degree; when the degree was confirmed by X-ray film, the same traction was retained for 3 weeks. Then the traction decreased at the same speed of 1 mm/d to correct the deformity for 3 weeks. At the 3rd, 7th and 9th weeks, articular cartilages were separated from medial foot of the experimental and normal side to do morphology observation after HE stain, which were group A, group B, group C and group D respectively separately. The gray scale values were obtained using Image-Pro Plus 6.0 software and compared among the 4 groups using SPSS 13.0. The microstructure of cartilage was observed through transmission electron microscopy. **Results:** ① The Mankin scores; there was significant difference between group A and group B ($P=0.043<0.05$); and significant difference between group B and group C ($P=0.038<0.05$). ② The values of gray scale; there was significant difference between group A and group B ($P=0.047<0.05$); significant difference between group B and group C ($P=0.045<0.05$); significant difference between group A and group D ($P=0.039<0.05$); no significant difference between group C and group D ($P=1.23>0.05$). **Conclusion:** Using Ilizarov technique, when the pressure between the cartilage surface of the ankle joint increases, the necrosis of articular cartilage occurred; and when the stress between the articular cartilage surface decreases, the damaged articular cartilage can be restored.

Key words Ankle joint; Cartilage, articular; Bone regeneration; Pathology

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(12): 923-926 www.zggszz.com

应用 Ilizarov 技术治疗难治性足踝部畸形, 可收到令人惊喜的效果, 在牵张技术下对神经血管的实验性基础研究已比

较深入广泛, 但对肌腱、软骨组织的结构和组织的变化研究较少, 本实验在牵张技术下通过观察实验侧关节软骨的病理改变和微观改变, 旨在为临床应用 Ilizarov 外固定架矫正马蹄足畸形提供理论依据。

基金项目: 自然科学基金高校专项 (编号: 2006J0426)

通讯作者: 韩大为 Tel: 0591-83947301 E-mail: handawei@medmail.

com.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

1.1.1 实验动物 成年实验狗 18 只 (农科院研究所实验动物中心提供), 体重 15~20 kg, 年龄 12 个月左右, 雌雄不拘, 无明显外伤、畸形、骨质疏松、退行性病变等。

1.1.2 分组 将成年实验狗 18 只按随机抽签法随机分成 A、B、C 组, 各 6 只狗, 并于第 3 周杀死 A 组、第 7 周杀死 B 组、第 9 周杀死 C 组, 以各组左侧后足关节软骨为实验组, 以 A、B、C 3 组右侧后足关节软骨为对照组(D 组)。3 组动物年龄和体重比较见表 1。

表 1 3 组狗的体重与年龄比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of body weight and age of dogs among 3 groups($\bar{x} \pm s$)

分组	狗数(只)	体重(kg)	年龄(月)
A 组	6	13.56±6.79 ^{ab}	12.83±1.16 ^{ab}
B 组	6	13.83±6.97 ^c	12.33±0.81 ^f
C 组	6	13.58±6.78	12.16±1.47

注: 与 B 组比较, ^a $P=1.45>0.05$, ^b $P=1.62>0.05$; 与 C 组比较, ^b $P=1.91>0.05$, ^c $P=1.79>0.05$, ^d $P=1.41>0.05$, ^f $P=1.58>0.05$

Note: Compared to group B, ^a $P=1.45>0.05$, ^b $P=1.62>0.05$; Compared to group C, ^b $P=1.91>0.05$, ^c $P=1.79>0.05$, ^d $P=1.41>0.05$, ^f $P=1.58>0.05$

1.2 造模方法

1.2.1 手术方法 以 846-动物复合麻醉剂 (长春兽医研究所生产), 按 0.1 ml/kg 臀部肌注麻醉, 常规消毒铺巾, 将术前组装好并消毒的无菌矫形器套于右侧后足, 2 个伊氏环置于胫骨近段, 2 个伊氏环置于跗骨远段, 每环各有 1 对相交叉的直径为 2 mm 的克氏针贯穿胫骨、跗骨, 2 枚克氏针在小腿内、外两侧的交角约为 50°, 使下肢置于环的中央。拉紧克氏针并将克氏针用螺母、锁钉器固定在环上。2 环之间由 4 根螺杆经环上的孔相连, 4 根连杆之间的距离相等。把足环和小腿远段上的环经各自环上的前和内、外中央孔分别各用 1 个带活动铰链的调节螺杆相连, 共 3 根, 可通过调节螺杆和活动铰链改变长度和方向。18 只动物中无一例死亡, 术后拍 X 线片, 均显示克氏针位置良好, 无劈裂骨折。肌注抗生素, 术后自由放养。

1.2.2 造畸形及矫正方法 手术 6 d 后开始延长外侧调节螺杆, 内侧调节螺杆则相应缩短。外固定架有滑动螺母, 可借螺母在螺杆上的移动而延长或缩短螺杆。经标定螺母, 拧 2 圈延长 1 mm。每日调整 2 次, 按 1 mm/d, 分 2 次调整。前 3 周加大踝关节内侧压力, 致内翻 15°, 并经 X 线证实; 第 4~6 周不调节, 保持原有压力; 第 7~9 周减小踝关节内侧压, 矫正畸形, 摄 X 线片。

1.2.3 取材与标本制作

(1)取材: 于第 3、7、9 周采用空气栓塞法分别杀死 6 只实验狗, 显露实验侧左侧后足踝关节, 取内侧关节软骨和右侧后足踝关节, 取内侧关节软骨。

(2)石蜡切片标本制作: 取实验侧和健侧踝关节内侧关节软骨, 10%福尔马林溶液固定 7 d, 流水冲洗 24 h, 10%EDTA 二钠盐溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 以氢氧化钠调至 pH 7.0, 脱钙 14 d。流水冲洗 24 h, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 矢状面切成 4 μm 厚的切片, 用 HE 染色, 中性树胶封片。

1.3 观察指标

1.3.1 组织学观察 切片于光镜下观察, 参照 Mankin 病理表现及分级标准, 并采用盲法对各标本进行组织学评分。

1.3.2 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡至水; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 10 min, 3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; PBS 冲洗, 2 min×3 次; 滴加 10%山羊血清, 37 °C 孵育 1~2 h 或 4 °C 过夜; PBS 冲洗, 5 min×3 次。滴加试剂 1 (polymer helper), 室温孵育 20 min, PBS 冲洗, 5 min×3 次。滴加试剂 2 (poly peroxidase-anti-mouse/rabbit IgG), 室温孵育 20~30 min, PBS 冲洗, 5 min×3 次。滴加显色剂 (DAB) 显色。自来水充分冲洗, 复染, 脱水透明, 封片。阴性对照片用 PBS 代替第 1 抗体, 其他步骤与实验片相同。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件计算图像灰度值, 并用 SPSS 13.0 进行统计。

1.3.3 透射电镜观察 于实验侧和健侧踝关节内侧切取软骨标本; 用 3%戊二醛-1.5%多聚甲醛-0.1 MPBS (pH 7.2) 4 °C 固定 2 h; 0.1 MPBS (pH 7.2) 漂洗 3 次; 用 1%锇酸固定液 (pH 7.2) 固定 1 h; 0.1 MPBS (pH 7.2) 漂洗 3 次; 丙酮梯度脱水; 用无水丙酮+环氧树脂 618 包埋剂 (1:1) 1.5 h, 纯 618 包埋剂 35 °C 3 h; 包埋, 聚合; 超薄切片机切 70~80 nm 的超薄切片; 经醋酸铀、柠檬酸铅分别染色 5 min, 并蒸馏水洗。观察软骨细胞、细胞核形态, 高尔基体、内质网数量, 胶原纤维形态、排列。

1.4 统计处理方法 运用 SPSS 13.0 统计软件包采用单因素方差分析, 组间 LSD 法两两比较。

2 结果

2.1 免疫组织学观察及评分 切片于光镜下观察, 参照 Mankin 病理表现及分级标准^[1], 采用盲法对各标本进行组织学评分, 见表 2。Mankin 得分及免疫组化化学观察见表 3。

从表 3 可以看出, 随时间延长, Mankin 得分减少, 说明在 Ilizarov 技术牵张应力下, 原本受损的关节软骨可逐渐恢复正常。免疫组化图片灰度值随时间延长数值降低。整个观察期内软骨细胞胞浆内均有 II 型胶原表达, 在 Ilizarov 技术牵张应力下, 术后 3 周内表达逐渐变弱; 从第 7 周时开始逐渐变强, 原本减少的胶原纤维含量逐渐增加; 至第 9 周时接近正常。当软骨之间压力增大时, 软骨有不同程度缺损, 细胞排列紊乱, 部分区域出现软骨细胞大片坏死, 于缺损区可见从潮线向上凸起, 簇集细胞出现频率增加, 染色丢失严重, 分布不均; 当软骨之间压力逐渐恢复正常时, 缺损的软骨逐渐修复, 坏死的细胞逐渐清除, 同时表层和移行层内软骨细胞逐渐增多。这说明在关节软骨压力逐渐恢复后, 在光镜下可见到软骨细胞在组织学上呈现修复的状态。

2.2 电镜观察结果

2.2.1 对照组 健侧可见软骨细胞和细胞核为椭圆形或近圆形, 表面有突起和皱褶, 细胞核较大。胞质内粗面内质网丰富, 可见高尔基复合体。细胞周基质为半透明的环形带。基质中胶原纤维细而密, 交织状 (见图 1)。

2.2.2 实验组 第 3 周时, 软骨细胞数目减少、变扁, 细胞核变小, 胞质内粗面内质网明显减少, 偶见高尔基体。基质中胶原纤维粗大, 排列紊乱, 乃至断裂 (见图 2)。第 7 周时, 软骨细胞数目增多, 形态椭圆, 胞质内粗面内质网增多, 可见高尔基体。基质中胶原纤维见裂隙, 排列紊乱 (见图 3)。第 9 周时, 软骨细胞近圆形, 细胞核较大, 胞质内粗面内质网丰富, 可见高

表 2 Mankin 病理学分级评分(分)

Tab.2 The Mankin pathological score(score)

分类	计分
结构	
正常	0
表层破坏	1
血管翳及表层破坏	2
浅层裂隙形成达移行层	3
局限性深达骨质辐射层裂隙	4
深达骨质钙化层软骨缺损负重区	5
全层软骨缺损	6
细胞	
正常	0
细胞过多、紊乱	1
细胞呈簇	2
细胞少	3
染色	
正常	0
轻染	1
中等染色	2
深染	3
失染	4
潮线的完整性	
完整	0
不完整有血管通过	1
总分	0~14

尔基体, 基质中胶原纤维排列细密, 见斜形弯曲(见图 4)。

在透射电镜下观察到当关节软骨压力增大时软骨细胞数目减少、变扁, 细胞核变小, 胞质内粗面内质网明显减少, 偶见高尔基体。基质中胶原纤维粗大, 排列紊乱, 乃至断裂。当关节软骨压力逐渐恢复正常时, 变扁的软骨细胞逐渐恢复正常形态, 内质网、高尔基体数目增加, 胶原纤维排列逐渐呈有序。说明显微观察下软骨细胞是处于逐渐向正常软骨发展的。

3 讨论

3.1 Ilizarov 技术下关节软骨细胞的压力性坏死 当关节软骨承受超过生理阈值的高负荷时, 软骨形成裂隙, 甚至软骨骨折、软骨损伤等, 侵袭到软骨下骨的软骨损伤是全层损伤, 反之则为部分损伤。目前有研究认为, 软骨细胞是通过自身形

表 3 实验 3、7、9 周时 Mankin 得分及免疫组化图片灰度值比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 The Mankin score and the value of gray scale of immunohistochemistry image at the 3 rd, 7 th and 9 th weeks($\bar{x}\pm s$)

组别	狗数(只)	Mankin 得分(分)	灰度值
A 组(3 周时)	6	10.17±1.17 ^{a1}	210.8±4.08 ^{a2c}
B 组(7 周时)	6	7.33±1.21 ^{b1}	195.2±3.16 ^{b2}
C 组(9 周时)	6	3.50±1.05	186.8±1.13 ^d
D 组(对照组)	18	-	183.5±0.51

注: 与 B 组比较, ^{a1} $P=0.043<0.05$, ^{a2} $P=0.047<0.05$; 与 C 组比较, ^{b1} $P=0.038<0.05$, ^{b2} $P=0.045<0.05$; 与 D 组比较, ^c $P=0.039<0.05$, ^d $P=1.23>0.05$
 Note: Compared to group B, ^{a1} $P=0.043<0.05$, ^{a2} $P=0.047<0.05$; Compared to group C, ^{b1} $P=0.038<0.05$, ^{b2} $P=0.045<0.05$; Compared to group D, ^c $P=0.039<0.05$, ^d $P=1.23>0.05$

状和体积的改变而感受外在机械环境的变化^[2]。本实验当压力增大时各层软骨细胞变扁, 当超过承受压力阈值后, 可发生细胞的坏死。

3.2 Ilizarov 技术下关节软骨修复 关节软骨修复能力很差, 首先是由于它缺乏神经、血管、淋巴管的分布, 仅依靠关节液的浸渗营养, 其次因为关节软骨细胞为高分化型软骨细胞, 有丝分裂少。然而有报道深达软骨下松质骨的全层关节软骨缺损, 可以得到修复。为修复软骨损伤, 可考虑提供具成软骨能力的间充质细胞, 如骨髓中、骨膜生发层中的间充质细胞或直接提供培养的软骨细胞, 或给予能促进软骨细胞形成的生长因子。查国庆等^[3]通过新型双向三维可降解生物活性材料胶原复合梯度 TCP 对兔关节软骨的缺损进行修复, 观察到双向三维可降解生物活性材料 Col/TCP 在动物体内可诱导关节软骨缺损后的软骨修复。另外, 降低关节压力可促进新的软骨的形成^[4]。Shapiro 等^[5]详细观察了全层关节软骨缺损的修复过程, 2 周时关节软骨缺损充满了间充质细胞和成软骨细胞, 虽有软骨细胞形成, 但极少; 6 周时, 软骨细胞大量出现, 软骨下骨部分形成; 8~10 周时, 软骨下骨大部分或全部形成, 类似正常关节软骨的组织结构已经出现。本实验通过运用“牵张-应力”技术, 通过恢复关节软骨局部应力环境, 使软骨细胞恢复再生能力。在电镜下我们观察到在第 7、9 周时软骨细胞形态较第 3 周时有所恢复。

本实验以狗为研究对象, 运用 Ilizarov“牵张-应力”技术, 纠正内翻足畸形, 通过在光镜、电镜、免疫组织化学染色下观察关节软骨的组织学形态和超微结构, 得出关节软骨不仅外

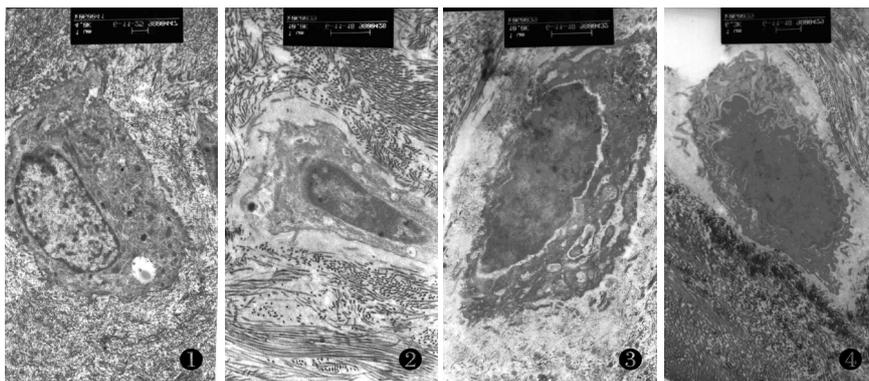


图 1 对照组(健侧)电镜结果×2 400 图 2 3 周时电镜结果×2 400 图 3 7 周时电镜结果×2 400 图 4 9 周时电镜结果×2 400
Fig.1 Transmission electron microscope graph of control group (normal side)×2 400 **Fig. 2** Transmission electron microscope graph of group A (three weeks after experiment)×2 400 **Fig. 3** Transmission electron microscope graph of group A (seven weeks after experiment)×2 400 **Fig. 4** Transmission electron microscope graph of group A (nine weeks after experiment) ×2 400

“旋后牵伸法治疗肱骨外上髁炎观察”一文读后感

张炳然, 陈育林

(济南军区第 152 中心医院康复理疗中心, 河南 平顶山 467000)

关键词 网球肘; 牵引术; 肘关节

Impressions of reading "Observation on external humeral epicondylitis treated with back-rotation traction" ZHANG Bing-ran, CHEN Yu-lin. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, the 152th Central Hospital of Jinan Military Region, Pingdingshan 467000, Henan, China

Key words Tennis elbow; Traction; Elbow joint

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(12):926 www.zggszz.com

“旋后牵伸法治疗肱骨外上髁炎观察”^[1]提出以牵引为主的方法治疗肱骨外上髁炎,有创见。读后有 3 点异议,与作者商榷。

1 关于肱骨外上髁炎的病位

引起肱骨外上髁部位疼痛的原因很多,很少为网球运动员,绝大多数是工作或生活中经常提重物、频繁或持续性地旋转前臂等运动的手工作业劳动者。常常累及肘关节、桡骨环状韧带、桡尺近侧关节、桡侧腕伸肌、旋后肌等处,甚至是颈椎病神经根型的病象。无论是保守治疗还是手术治疗,如果只针对肱骨外上髁,疗效是不佳的^[2]。

2 旋肘方向宜用旋前

前臂旋转运动由桡尺近侧关节、桡尺远侧关节和前臂骨间膜构成,属车轴关节。运动轴贯穿桡骨头中心与关节盘尖部之间,桡骨头在尺骨的桡骨切迹和桡骨环状韧带上旋转。旋前运动的肌肉有旋前圆肌和旋前方肌,旋后运动的肌肉主要有肱二头肌、旋后肌。与病位疼痛有直接联系的是旋后肌,它借腱束(浅层)和肌束(深层)共同起于肱骨外上髁(起点与指总伸肌腱愈着)、肘关节的桡侧副韧带、桡尺近侧关节的环状韧带、尺骨旋后肌嵴和其三角形压迹的后份,以及肌表面的腱膜等处,远端止于桡骨近端 1/3 的外侧面^[3]。频繁或持续旋转前臂或者是长时间提起重物,旋后肌受到过多拉伸,其附着点如肱骨外上髁、桡侧副韧带、环状韧带和桡骨上 1/3 段更是应力集中区,容易引起损伤,局部纤维组织增生、粘连,压迫神经末

梢,引起疼痛。做前臂旋前牵伸,桡骨沿着运动轴向前旋伸,旋后肌受到牵伸,可缓解痉挛、挛缩,松解软组织粘连、瘢痕。而旋后运动受牵伸的是旋前方肌、旋前圆肌,与肱骨外上髁疼痛无直接关系,疗效可能欠佳。

3 旋前时间宜长一些

该文提出松解牵伸的时间全程为 20 min,其中旋后和外展的时间为 60~90 s,每日 1 次,读后感觉时间短了一些。牵伸效应必须达到蠕变的程度才能起到治疗作用,牵伸时间、力度要够长、够大,才能使之蠕变。Victor 等^[4]认为,关节长时间承受恒定的低载荷时,软组织发生缓慢变形,即蠕变。受载初期 6~8 h,这种蠕变最大,但可在低速率下继续数月。读者建议,让患者手提 1 kg 的沙袋,做屈腕屈指前臂旋前摆动,每次 20 min,每日 2 次,去代替手法牵伸,较为省时省力。

参考文献

- [1] 傅瑞阳,王娅玲,顾钟忠,等.旋后牵伸法治疗肱骨外上髁炎临床观察.中国骨伤,2009,22(2):102-103.
- [2] 华江,王全美.旋后肌在肘外侧软组织损害中的重要作用(附 197 例诊治分析).颈腰痛杂志,2003,24(1):18-20.
- [3] 邵福元,邵华磊,薛爱荣.颈肩腰腿疼应用解剖学.郑州:河南科技出版社,2000.539-587.
- [4] Victor H, Frankel MN.骨骼系统基本生物力学.天津:科学技术出版社,1986.106-107.

(收稿日期:2009-09-08 本文编辑:连智华)

观形态上得到了恢复,在病理组织学上也得到了恢复,说明在 Ilizarov 牵张技术牵拉下,当踝关节软骨面之间压力增大,关节软骨会发生压力性坏死,当关节软骨面之间压力逐渐减小后,关节软骨逐渐恢复再生。

参考文献

- [1] Jansen EJ, Emans PJ, Van Rhijn LW, et al. Development of partial thickness articular cartilage injury in a rabbit model. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(2):487-494.
- [2] Sarkadi B, Parker JC. Activation of ion transport pathways by

changes in cell volume. Biochim Biophys, 1991, 10(4):407-427.

- [3] 查国庆,廖威明,王迎军,等.胶原复合梯度 TCP 修复关节软骨的形态学观察.中国修复重建外科杂志,2008,22(8):989-992.
- [4] 赵建宁,王瑞.关节软骨损伤的修复和重建.中国骨伤,2007,20(11):729-731.
- [5] Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ, et al. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg(Am), 1993, 75(4):532-553.

(收稿日期:2009-10-13 本文编辑:连智华)