

兔伸直型膝关节挛缩模型中肌源性挛缩的病理特征及其机制研究

杨帆, 黄鹏鹏*, 周云, 张全兵, 王锋, 刘阿英, 陈爽, 徐齐宇

摘要 目的 探讨在兔伸直型膝关节挛缩模型中肌源性挛缩的病理特征及其可能机制。方法 选取新西兰白兔 30 只, 根据固定时间, 随机分为以下 5 组 ($n=6$): 对照组 (I-0, 不进行任何处理)、固定 1 周组 (I-1, 左膝关节伸直位固定 1 周)、固定 2 周组 (I-2, 左膝关节伸直位固定 2 周)、固定 4 周组 (I-4, 左膝关节伸直位固定 4 周) 和固定 8 周组 (I-8, 左膝关节伸直位固定 8 周)。然后通过检测固定后膝关节挛缩角度、股直肌 Masson 染色、低氧诱导因子 (HIF)-1 α 和转化生长因子 (TGF)- β 1 的蛋白表达水平, 分析各组结果差异。结果 在固定 8 周内, 固定组的肌源性挛缩角度在 4 周内随着固定时间的延长而增加, 但 4 周后 I-4 组和 I-8 组相比差异无统计学意义。Masson 染色结果提示, 股直肌横截面积在固定 4 周内不断降低, 而胶原纤维沉积占比在固定 4 周内不断升高, 但固定 4 周后 I-8 组与 I-4 组相比, 股直肌横截面积的降低和胶原纤维沉积占比的增加差异均无统计学意义。股直肌 HIF-1 α 蛋白表达水平在固定 4 周内不断升高, 但 4 周后 I-4 组和 I-8 组相比差异无统计学意义; 2 周内 TGF- β 1 蛋白表达增加差异有统计学意义, 2 周后每个固定组相比差异无统计学意义。结论 在兔伸直型膝关节挛缩模型中肌源性挛缩的病理特征主要为肌纤维化和萎缩的时间依赖性改变, 并且其机制可能与 HIF-1 α 和 TGF- β 1 高表达有关。

关键词 肌纤维化; 肌源性挛缩; 关节挛缩; 低氧; 制动

中图分类号 R 195.1; R 323.72

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)07-1042-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.008

临床上膝关节损伤治疗中, 常常需要辅以膝关节功能位或伸直位固定^[1], 而不恰当或长时间固定制动是关节挛缩的一个重要因素, 如不早期进行干预, 一旦膝关节挛缩发展至后期, 即使手术也难以恢

复正常关节活动度 (range of motion, ROM)。因此, 制动引起的膝关节挛缩已成为临床工作中常见难题^[2-3]。

研究^[4-5]表明, 在制动早期, 限制关节活动的主要原因为肌源性因素 (肌肉、肌膜、肌腱等), 之后随着固定时间延长关节源性因素 (关节囊、关节软骨、韧带等) 逐渐占据主导, 且 ROM 恢复愈加困难。所以, 阐明早期肌源性挛缩和其病理变化规律, 并探讨其中分子机制, 对于早期预防和治疗关节挛缩具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 该实验方案经安徽医科大学动物伦理委员会批准 (批准号: LLSC20190761)。该研究使用的 30 只雄性骨骼发育成熟的新西兰白兔 (安徽医科大学实验动物中心, 合肥, 中国; 3~4 月龄, 体质量 2~2.5 kg), 单笼饲养在室温、自然光照的环境中, 并且被允许在笼内自由地活动和获取水、食物。所有兔按照每组 6 只随机分为以下 5 组: 对照组 (I-0 组) 不进行石膏固定、石膏固定 1 周组 (I-1 组)、固定 2 周组 (I-2 组)、固定 4 周组 (I-4 组)、固定 8 周组 (I-8 组)。在各个固定时间点结束后兔被安乐死, 并进行取材以及相关指标的检测。

1.2 仪器与试剂 光学显微镜购自厦门麦克奥迪公司; 电泳仪和转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司; 病理组织包埋机购自常州中微电子有限公司; Masson 染色试剂购自福州迈新生物技术开发公司; TRIzol 购自上海生物工程有限公司; 蛋白上样 buffer、标准 BSA 购自美国 Thermo 公司; 二甲苯 I 溶液、二甲苯 II 溶液、PVDF 膜以及兔抗 TGF- β 1、HIF-1 α 和过氧化物酶缀合的亲合性山羊抗兔 IgG-HRP 抗体购自沈阳万类生物公司。

1.3 方法

1.3.1 动物造模 采用该课题组之前使用的石膏固定模型^[6-7]。简单地说, 实验人员用耳静脉注射 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉兔后, 用管型石膏从兔左侧腹股沟到近端脚趾进行单侧膝关节伸直固定。

2021-03-19 接收

基金项目: 安徽省重点研究和开发计划项目 (编号: 201904a07020067); 安徽医科大学校科研基金 (编号: 2018xkj050); 安徽医科大学 2021 年临床医学学科建设项目 (编号: 2021lck031)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院康复医学科, 合肥 230601

作者简介: 杨帆, 女, 硕士研究生;

周云, 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhoukeg@163.com

* 对本文具有同等贡献

1.3.2 ROM 测量 在每个固定的时间点,通过耳静脉注射过量戊巴比妥钠对兔进行安乐死后,实验员从兔左后肢的髌关节脱臼并完全切除,使用团队研制的关节动度测量仪进行兔固定侧后肢的 ROM 测量^[7-8]。简单地说,实验员通过固定夹与金属圆盘的平台固定兔左后肢的股骨、胫骨和其肌肉附着点的近端和远端。在测量膝 ROM 时,实验员使用标准扭矩为 $0.077 \text{ N} \cdot \text{m}$ 转动驱动转盘并间接地转动胫骨,可通过数字测力计控制所施加的力,并且可根据转盘的刻度确定股骨和胫骨之间的 ROM 变化(图 1)。2 名实验员进行 ROM 测量,并对每个膝关节重复测量 3 次。在该研究中,屈曲角越大代表挛缩程度或运动损失越小。膝关节屈曲的 ROM 丢失值被称为总挛缩,肌切开术后的屈曲 ROM 的丢失值称为关节源性挛缩。根据之前的研究,肌源性挛缩为总挛缩和关节源性挛缩的差值^[9-10]。

1.3.3 组织准备和 Masson 染色 测量 ROM 后立刻切取兔左侧股直肌。肌肉标本使用梯度乙醇脱水,然后石蜡包埋。在切片机上取 $5.0 \mu\text{m}$ 进行切片,脱蜡,进行 Masson 染色,观察肌纤维萎缩和胶原沉积情况。使用倒置显微镜在 400 倍放大的条件下观察染色的切片,对 5 个随机选择的区域进行分析对比,并使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算肌横截面积(cross sectional area, CSA)和胶原沉积面积百分比。其他样品在液氮中快速冷冻,然后在 -70°C 下储存,用作后续的分子检测。

1.3.4 蛋白提取和 Western blot 检测 Western blot 分析 TGF- $\beta 1$ 和 HIF-1 α 蛋白水平。采用 RIPA 裂解缓冲液在冰上提取股直肌标本中的总蛋白。采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。随后,在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶上用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离每对样品的等量蛋白质,并将其电沉积电到聚偏二氟乙烯膜(微孔)中。用 5% 脱脂牛奶溶解于 TBST 中室温孵育 90 min 后,将膜与兔抗 TGF- $\beta 1$ (1:2 000),兔抗 HIF-1 α (1:1 000) 和兔抗 GAPDH 多克隆抗体 (1:5 000) 在 4°C 孵育过夜。第 2 天,在 TBST 溶液洗 10 min,洗涤 3 次后,在室温下用辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG (1:10 000) 作为二次抗体,将膜孵育 40 min。每 10 min 用 TBST 清洗 3 次后,根据制造商说明书,用化学发光剂系统检测膜。用 Image J 软件定量分析各谱带密度,用 GAPDH 对 TGF- $\beta 1$ 和 HIF-1 α 谱带密度进行归一化。

1.4 统计学处理 数据使用 Shapiro-Wilk 进行正态性检验,满足正态性检验的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各

组间挛缩 ROM、肌 CSA、肌胶原纤维、TGF- $\beta 1$ 和 HIF-1 α 的蛋白表达结果均进行方差分析和 SNK 检验进行分析,以进行各组间的比较。选择小于 0.05 的 α 值作为这些统计分析的显著性水平。

2 结果

2.1 挛缩 ROM 在总挛缩中,各组间比较 F 值 = 822.552,固定 8 周内每个固定组与前 1 个固定组比较,其挛缩角度随着固定时间延长逐渐增加 ($P < 0.001$);在肌源性挛缩中,各组间比较 F 值 = 367.736,每个固定组在前 4 周内的挛缩角度随着固定时间延长逐渐增加 (I-1 组与 I-0 组相比: $P < 0.001$; I-2 组与 I-1 组相比: $P < 0.001$; I-4 组与 I-2 组相比: $P = 0.031$),但固定 4 周后 I-4 组和 I-8 组相比,挛缩角度增加差异无统计学意义 ($P = 0.192$) (图 1 和表 1)。

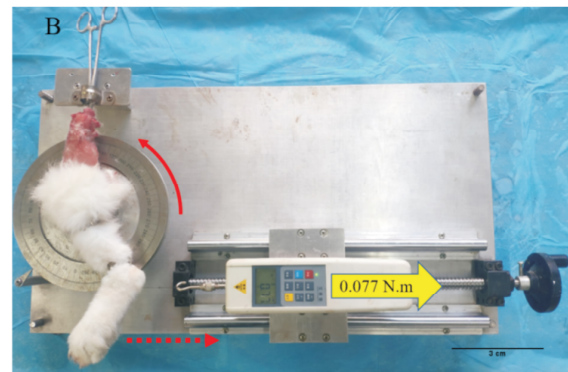
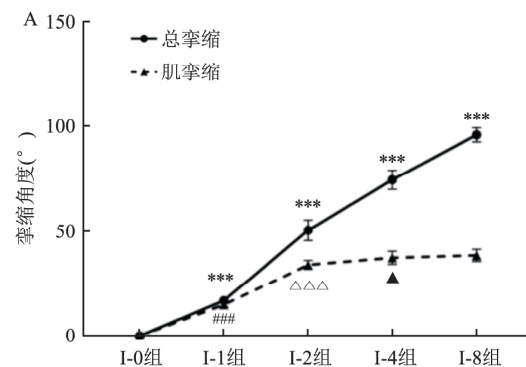


图 1 总挛缩、肌挛缩和关节动度测量仪

A: 总挛缩和肌挛缩角度,与 I-0 组比较: *** $P < 0.001$; 肌挛缩,与 I-0 组比较: ### $P < 0.001$; 与 I-1 组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与 I-2 组比较: $\Delta P < 0.05$; B: 关节动度测量仪

表 1 5 组新西兰兔各测量指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	总挛缩($^\circ$)	肌源性挛缩($^\circ$)	CSA(μm^2)
I-0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	$5\,179.87 \pm 160.50$
I-1	17.17 ± 1.47	15.17 ± 0.98	$4\,692.14 \pm 172.58$
I-2	50.83 ± 4.83	34.33 ± 2.16	$4\,463.42 \pm 155.69$
I-4	74.83 ± 4.54	37.67 ± 3.14	$4\,194.89 \pm 241.59$
I-8	96.17 ± 3.37	38.83 ± 2.86	$4\,278.23 \pm 153.79$

2.2 Masson 染色及定量结果 各组 CSA 如图 2 和表 1 所示。定量结果中, 各组间比较 F 值 = 28.911, 在 4 周内每个固定组的股直肌横截面积相较于前一个固定组不断降低(I-1 组与 I-0 组相比: $P < 0.001$; I-2 组与 I-1 组相比: $P = 0.037$; I-4 组与 I-2 组相比: $P = 0.016$), 但在固定 4 周后, I-8 组相比 I-4 组的降低差异均无统计学意义($P = 0.430$); 类似地, 胶原纤维沉积占比在固定 4 周内, 每个固定组相较于前一个固定组不断升高(I-1 组与 I-0 组相比: $P < 0.001$; I-2 组与 I-1 组相比: $P = 0.020$; I-4 组与 I-2 组相比: $P < 0.001$), 但固定 4 周后 I-8 组相比 I-4 组增加差异无统计学意义($P = 0.076$), 各组间比较 F 值 = 164.266。

2.3 HIF-1 α 和 TGF- β 1 的蛋白表达 在固定 4 周内, 每个固定组的股直肌 HIF-1 α 蛋白表达水平相较于前一个固定组不断升高(I-1 组与 I-0 组相比: $P < 0.001$; I-2 组与 I-1 组相比: $P = 0.002$; I-4 组与 I-2 组相比: $P < 0.001$), 但 4 周后 I-4 组和 I-8 组相比差异无统计学意义($P = 0.201$), 各组间比较 F 值 = 132.491; 在 2 周内, 股直肌 TGF- β 1 蛋白表达增加有统计学意义(I-1 组与 I-0 组相比: $P < 0.001$; I-2 组与 I-1 组相比: $P < 0.001$), 2 周后每个固定组相比差异均无统计学意义(I-4 组与 I-2 组相比: $P = 0.221$; I-8 组与 I-4 组相比: $P = 0.112$), 各组间相比 F 值 = 53.302(图 3)。

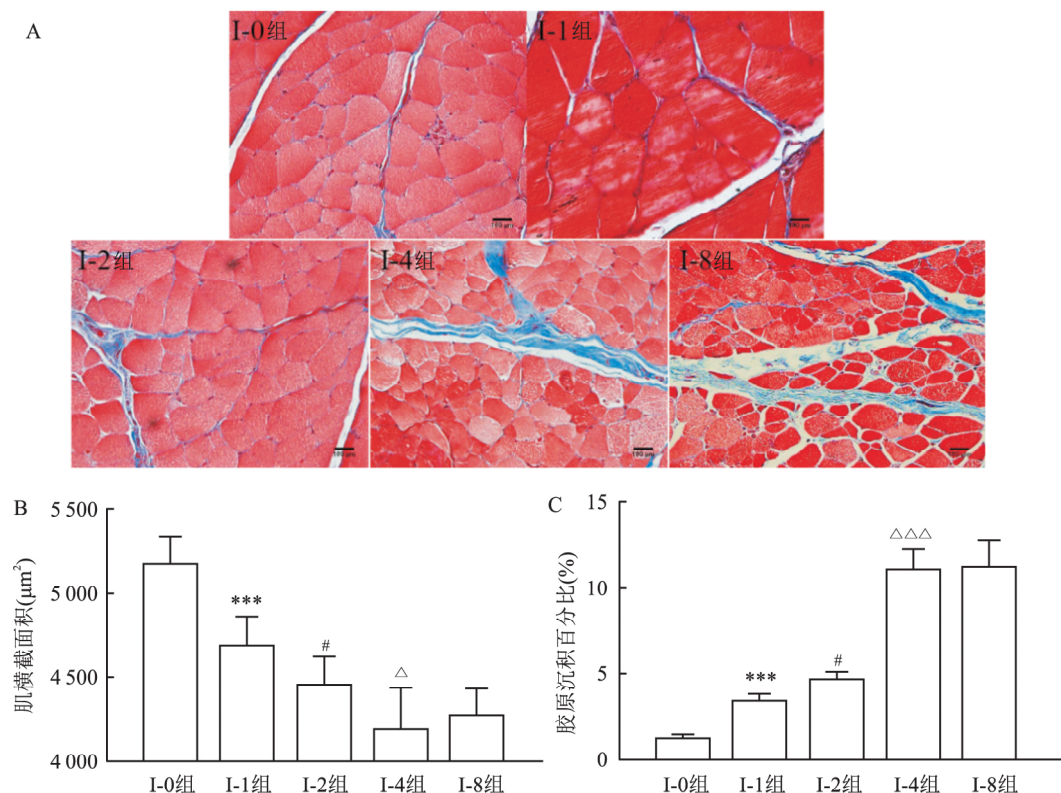


图2 Masson 染色和定量结果

A: 马松染色切片结果 $\times 400$; B: 肌横截面积定量; 与 I-0 组比较: *** $P < 0.001$; 与 I-1 组比较: # $P < 0.05$; 与 I-2 组比较: △ $P < 0.05$; C: 胶原纤维占比定量; 与 I-0 组比较: *** $P < 0.001$; 与 I-1 组比较: # $P < 0.05$; 与 I-2 组比较: △△△ $P < 0.001$

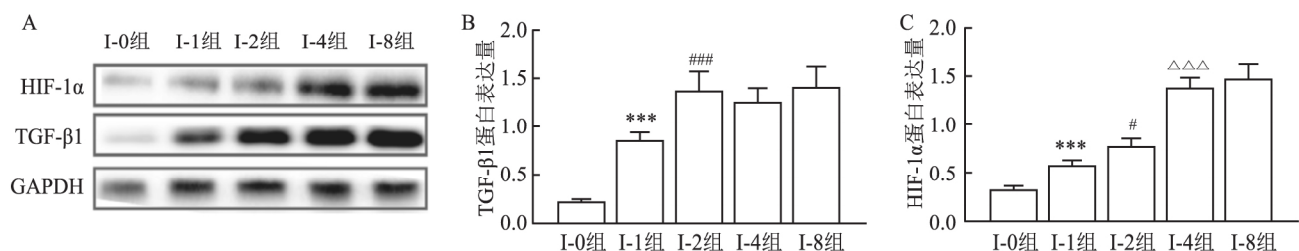


图3 HIF-1 α 和 TGF- β 1 相对于 GAPDH 蛋白表达结果

A: HIF-1 α 、TGF- β 1 和 GAPDH 的灰度值; B: TGF- β 1 / GAPDH 蛋白表达定量结果; 与 I-0 组比较: *** $P < 0.001$; 与 I-1 组比较: ### $P < 0.001$; C: HIF-1 α / GAPDH 蛋白表达定量结果; 与 I-0 组比较: *** $P < 0.001$; 与 I-1 组比较: # $P < 0.05$; 与 I-2 组比较: △△△ $P < 0.001$

3 讨论

关节挛缩一旦发展至后期,目前临床措施都难以实现关节功能的较大恢复,严重限制患者的日常活动。因此,预防和治疗早期肌挛缩的发生和发展对延缓甚至逆转关节挛缩的进程极为重要^[4, 9]。该研究通过兔膝关节伸直型挛缩模型,探讨在关节固定早期所致的肌挛缩过程中的病理特征变化及可能机制。

该研究的 Masson 染色显示,在固定 4 周之前,骨骼肌的胶原沉积随着固定时间延长不断增加,而骨骼肌的 CSA 随着固定时间延长不断降低,且改变差异均有统计学意义,但 4 周至 8 周的改变,差异均无统计学意义。这表明在早期肌源性挛缩的病理特征为骨骼肌纤维化和萎缩,并且这个病理特征在 4 周时达到稳定。有研究^[9, 11]表明,骨骼肌的纤维化表现为肌内和肌肉结缔组织过度堆积,导致肌肉伸展性下降。在该实验中,固定所致的骨骼肌收缩减少,使得肌膜弹性降低变硬。同时,持续的关节固定导致骨骼肌细胞外基质胶原组织异常堆积,造成骨骼肌纤维化加剧,使得肌肉伸展性进一步降低。此外,骨骼肌在固定后也会造成废用性肌萎缩,也会限制关节活动^[9, 12]。因此,固定后引起的骨骼肌纤维化和废用性肌萎缩是肌源性挛缩的最主要病理特征,并且这种病理特征在早期进展迅速,后期进展缓慢。这个病理特征的变化规律对于以后选择早期干预肌挛缩的时间点提供了重要参考。

众所周知,低氧及 HIF-1 α 的过表达是成纤维细胞向肌成纤维细胞分化和促纤维化因子 TGF- β 1 激活的重要启动子,在众多临床纤维化疾病中都可以找到其作用机制^[13-14]。该实验中,兔肢体被石膏长时间固定后,血流逐渐减少,造成局部缺血,导致肌肉毛细血管数量减少,使固定侧肢体处于低氧状态。蛋白检测中固定组的 HIF-1 α 蛋白相对于对照组都是高表达说明了制动后的骨骼肌处于低氧状态,也表明其可能是造成肌挛缩不断增加的潜在分子机制。此外,TGF- β 是多功能的细胞因子,有 3 种亚型,其中 TGF- β 1 与纤维化的关系最为密切。有研究^[4, 11]表明,TGF- β 1 可激活成纤维细胞,使其分泌大量胶原,促进纤维化结缔组织异常堆积。并且持续的 TGF- β 1 刺激可导致成纤维细胞合成及细胞外基质沉积的时间延长和增加,加剧挛缩的发展。该课题组在之前关节挛缩模型中表明,关节囊中的 TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达随着固定时间延长表达

增高,也表明了促纤维化因子 TGF- β 1 在关节挛缩的发生发展中的重要作用^[6]。该研究中骨骼肌 TGF- β 1 蛋白高表达在第 2 周以后进入稳定期,这和 Kubo et al^[15] 的研究在大鼠被固定后,骨骼肌中因子 TGF- β 1 mRNA 表达在第 1 周即高表达且进入稳定期的结果不完全一致,其可能是由于模型固定方法不同以及其检测的 TGF- β 1 mRNA 的表达和最终的蛋白表达并非一定相同原因所致。进一步结合 HIF-1 α 的蛋白表达随着固定时间不断增高,并在固定 4 周后进入稳定期,可以推测低氧和促纤维化因子 TGF- β 1 过表达是早期造成肌挛缩病理特征改变的潜在分子机制。

该研究通过挛缩角度变化表明,固定 1 周后关节活动即发生明显的受限,且总挛缩随着固定时间的发展逐渐增加;肌挛缩随着固定时间的延长也在增加,但其在 4 周后趋于平衡,这与一些固定诱导的关节挛缩研究结果类似^[2, 5]。结合上述病理和蛋白分子结果显示,肌源性挛缩的发展与骨骼肌纤维化和萎缩的病理特征改变密切相关,均在固定 4 周后进入稳定期,而且其主要分子机制也有着类似的变化。相信这为未来干预肌源性挛缩的措施提供重要时间参考和靶点选择。

参考文献

- [1] Clavet H, Doucette S, Trudel G. Joint contractures in the intensive care unit: quality of life and function 3.3 years after hospital discharge [J]. Disabil Rehabil, 2015, 37(3): 207-13.
- [2] Trudel G, Uhthoff H K, Goudreau L, et al. Quantitative analysis of the reversibility of knee flexion contractures with time: an experimental study using the rat model [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15: 338.
- [3] 王 锋, 张全兵, 周 云, 等. 分散式冲击波联合常规康复治疗创伤后膝关节伸直挛缩的疗效观察 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2020, 35(2): 187-9.
- [4] 张全兵, 周 云, 钟华璋, 等. 关节挛缩的发病机制和治疗进展 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(6): 548-52.
- [5] Huang P P, Zhang Q B, Zhou Y, et al. Effect of radial extracorporeal shock wave combined with ultrashort wave diathermy on fibrosis and contracture of muscle [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2021, 100(7): 643-50.
- [6] 陈 爽, 张全兵, 周 云, 等. 超短波干预对兔伸直型膝关节挛缩模型关节囊纤维化的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 380-5.
- [7] Zhou Y, Zhang Q B, Zhong H Z, et al. Rabbit model of extending knee joint contracture: progression of joint motion restriction and subsequent joint capsule changes after immobilization [J]. J Knee Surg, 2020, 33(1): 15-21.
- [8] Zhang Q B, Zhou Y, Zhong H Z, et al. Effect of stretching com-

- bined with ultrashort wave diathermy on joint function and its possible mechanism in a rabbit knee contracture model [1]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2018, 97(5): 357 – 63.
- [2] Wang F, Zhang Q B, Zhou Y, et al. Effect of ultrashort wave treatment on joint dysfunction and muscle atrophy in a rabbit model of extending knee joint contracture: enhanced expression of myogenic differentiation [J]. *Knee*, 2020, 27(3): 795 – 802.
- [3] Trudel G, Uthoff H K. Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular? An experimental longitudinal study in the rat knee [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2000, 81(1): 6 – 13.
- [4] Wong K, Trudel G, Laneuville O. Noninflammatory joint contractures arising from immobility: animal models to future treatments [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 848290 – 6.
- [5] Steplewski A, Fertala J, Beredjickian P K, et al. Blocking collagen fibril formation in injured knees reduces flexion contracture in a rabbit model [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(5): 1038 – 46.
- [6] Blaauw M E, Smit T H, Hanemaaijer R, et al. Cyclic mechanical stretch reduces myofibroblast differentiation of primary lung fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(1): 23 – 7.
- [7] Abdel M P, Morrey M E, Barlow J D, et al. Intra-articular decorin influences the fibrosis genetic expression profile in a rabbit model of joint contracture [J]. *Bone Joint Res*, 2014, 3(3): 82 – 8.
- [8] Kubo K, Sakamoto J, Honda A, et al. Effects of twitch contraction induced by magnetic stimulation on expression of skeletal muscle fibrosis related genes and limited range of motion in rats [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2019, 98(2): 147 – 53.

Pathological characteristics and mechanism of myogenic contracture in rabbit model of knee extension contracture

Yang Fan, Huang Pengpeng, Zhou Yun, et al

(*Dept of Rehabilitation Medicine, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*)

Abstract Objective To explore the pathological characteristics of myogenic contracture and its possible mechanism in rabbit model of knee extension contracture. **Methods** According to the immobilization time, thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into 5 groups ($n=6$): control group (I-0, without any treatment), 1-week immobilization group (I-1, with left knee joint complete extending immobilization for 1 week), 2-week immobilization group (I-2, with left knee joint complete extending immobilization for 2 weeks), 4-week immobilization group (I-4, with left knee joint complete extending immobilization for 4 weeks) and 8-week immobilization group (I-8, with left knee joint complete extending immobilization for 8 weeks). At the end of each immobilization time point, the rabbits were killed, and then the myogenic contracture and arthrogenic contracture were analyzed by detecting the angle of knee joint contracture after immobilization. The cross-sectional area of rectus femoris muscle fiber was analyzed by Masson staining. The protein expression levels of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) were analyzed by Western blot. **Results** During the 8 weeks, the angle of myogenic contracture in the immobilization group increased with the immobilization time within 4 weeks, but there was no significant difference between I-4 group and I-8 group after 4 weeks. Masson staining results showed that the cross-sectional area of rectus femoris decreased continuously within 4 weeks of immobilization, while the proportion of collagen fiber deposition increased continuously within 4 weeks after immobilization. However, there was no significant difference in the reduction of cross-sectional area of rectus femoris and the increase of collagen fiber deposition between I-8 group and I-4 group after 4 weeks of immobilization. The expression level of HIF-1 α protein increased continuously within 4 weeks after immobilization, but there was no significant difference in the expression level of HIF-1 α protein between I-4 group and I-8 group after 4 weeks immobilization; the expression of TGF- β 1 protein increased significantly within 2 weeks, but there was no significant difference between the each group after 2 weeks immobilization. **Conclusion** The muscle fibrosis and atrophy are mainly pathological features of myogenic contracture in rabbit model of knee extension contracture, which is time-dependent change, and the mechanism may be related to the high expression of HIF-1 α and TGF- β 1.

Key words skeletal muscle fibrosis; myogenic contracture; joint contracture; hypoxia; immobilization