

发育性髋关节脱位患儿关节囊 I、Ⅲ型胶原表达量与术后关节功能康复的相关性研究

方继红^{1,2}, 孙 军², 宁 波², 李惠萍¹

摘要 目的 探讨发育性髋关节脱位(DDH)患儿关节囊中 I、Ⅲ型胶原表达与术后关节功能康复的相关性,为术后关节功能锻炼提供理论依据。方法 对 160 例 2.5~3 岁 DDH 患儿采用相似的术式,术后留取关节囊,对其中 I、Ⅲ型胶原采用免疫组织化学和 RT-PCR 法进行检测,术后采用相同的功能锻炼方法,术后 6 个月采用 McKay 进行评分分组。结果 Ⅲ型胶原免疫组化和 RT-PCR 结果差异无统计学意义,而 I 型胶原在功能较差的患儿关节囊中表达明显增高。结论 DDH 患儿关节囊中 I 型胶原表达与术后关节功能恢复有相关性,Ⅲ型胶原表达量高的患儿术后应该加强功能锻炼。

关键词 发育性髋关节脱位; 胶原蛋白; 功能锻炼

中图分类号 R 726.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)03-0345-04

发育性髋关节发育不良(developmental dysplasia of the hip, DDH)是小儿骨科的常见病。很多患儿进行早期治疗后,大部分得到相对稳定正常的髋关节^[1]。但对于 18 月以后诊断的及前期保守治疗失败的患儿,目前国内外多数医师推荐手术治疗^[2]。对于 >18 个月采取手术治疗的患儿,术后关节功能是主要考虑的问题,Ⅰ、Ⅲ型胶原是关节囊的主要胶原成分,与关节功能密切相关^[3]。同时术后功能锻炼也是关节功能恢复的重要因素之一。该研究旨在通过检测手术治疗的 DDH 患儿关节囊内 I、Ⅲ型胶原表达量,分析 DDH 患儿关节囊内 I、Ⅲ型胶原表达量与术后关节功能康复的相关性,为患者实施有效的个体化康复训练提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 纳入标准: 从 2010~2014 年间,选取安徽省儿童医院骨科行切开复位+关节囊成形+骨盆截骨+股骨短缩旋转截骨+石膏术的女性患儿

160 例,年龄 2.5~3(2.7±0.3)岁,术前髋关节脱位程度在 3°~4°,所有手术由 2 位副主任医师及以上职称医师主刀。排除标准: 病理性髋关节脱位、合并其他基础疾病患儿及术后 Severin 放射线评分出现股骨头坏死及再脱位的患儿。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组化 取所有患儿术中行关节囊紧缩切除的关节囊组织,将标本在多聚甲醛液中室温固定 24 h,脱水、透明、石蜡包埋。每个标本取有代表性的关节囊全层切面(厚度 4 μm)切片。常规将切片脱蜡, PBS 冲洗,柠檬酸盐及微波进行联合抗原修复 0.3% 过氧化氢封闭, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,羊血清封闭非特异性抗原, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入 I 抗(兔抗人 I 或Ⅲ型胶原蛋白抗体 1:200,北京博奥森公司), 37℃ 孵育 1 h,然后 4℃ 过夜, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入 II 抗(北京中杉金桥生物技术有限公司通用型二抗), 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,最后用苏木精复染,晾干后用中性树胶封片,并在镜下拍片存档,每张切片在纤维层选择 5 个不同的 400 倍视野,计数其中阳性表现的成纤维细胞,并应用软件计算不同视野阳性表达光密度,取 5 个不同视野的平均值。

1.2.2 RNA 提取与 qRT-PCR 深低温保存的关节组织经过研磨处理后,总组织和细胞的 RNA 通过使用 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提示步骤进行提取。提取的 RNA 纯度和浓度用分光光度计测量光密度值,计算 OD_{260/280} 来确定纯度。琼脂糖凝胶电泳,评价 RNA 的完整性。取 1 μg 总 RNA,利用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒(日本 TOYOBO 公司)逆转录生成 cDNA,用分光光度计测量 OD_{260/280} 来确定 cDNA 纯度。利用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒(日本 TOYOBO 公司)对 cDNA 进行扩增。I 型胶原上游引物 5'-GGGAACATC-CTCCTTCAACAG-3',下游引物 5'-GGAGCTGGC-TACTTCTCGC-3'; Ⅲ型胶原上游引物 5'-CAGAT-CACGTCATCGCACAAC-3',下游引物 5'-GAGGGC-CAAGACGAAGACATC-3'。结果用相对定量法(2^{-ΔΔCT})表示。

2015-01-17 接收

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研课题(编号: 13FR016),安徽省自然科学基金(编号: 1408085QH153)

作者单位: ¹安徽医科大学护理学院,合肥 230601

²安徽省儿童医院骨科,合肥 230022

作者简介: 方继红,女,副主任护师,硕士研究生;

李惠萍,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: hulihuizi@163.com

1.2.3 关节功能评分 围手术期予以制定统一的功能康复方案,后期每两周复诊,并于术后半年根据 McKay(表1)临床关节评价标准^[4]及 Severin(表2)放射线评价标准^[5]分为不同的等级。

表1 McKay 临床评价标准

等级	标准
优	稳定无痛的髋关节、无跛行、Trendelenburg 征阴性,髋关节功能正常
良	稳定无痛的髋关节、轻微跛行,髋关节功能轻微受限
一般	稳定无痛的髋关节、跛行、Trendelenburg 征阳性,髋关节功能受限或这些症状均存在
差	不稳定和(或)疼痛的髋关节、Trendelenburg 征阳性

表2 Severin 放射线评价标准

等级	标准
优	I A CE 角 >19°、6~13 岁和 14 岁以上 >25°
良	I B CE 角 15~19°、6~13 岁和 14 岁以上 20~25°
	II 同 I A 或 I B、股骨头、股骨干、髋臼中度畸形
一般	III 髋关节发育不良、无半脱位、CE 角 <15°、6~13 岁和 14 岁以上 <20°
差	IV 半脱位
	V 股骨头位于假臼
	VI 再脱位

1.2.4 功能锻炼 在围手术期为患儿制定详细的功能锻炼计划:手术当天麻醉清醒后即开始让患儿进行足趾及踝关节活动,术后 2~3 d 起当患儿能耐受切口疼痛时鼓励患儿主动活动足趾关节,主要为足趾背伸、跖屈活动及股四头肌收缩锻炼;2~3 次/d,每次 30~60 min,锻炼强度及时间逐渐增加。6 周后拆除石膏,第 7 周,保持骨盆在水平位置,双腿外展呈 60°,指导患儿自仰卧坐起,上身挺直,屈髋 90°,逐渐弯腰,用双手触碰足尖,达到锻炼髋关节屈曲的目的,同时指导患儿屈膝、外展、内收 4 次/d,20~30 min/次。第 8 周,双腿外展呈 30°角方法同上。与此同时,可鼓励患儿双手交叉,手指越过足尖触摸脚心。第 9 周,双腿内收至正常中立位,方法同上。由于患儿石膏固定已达 6 周,拆除石膏后很不适应,康复锻炼时非常疼痛,所以在康复锻炼前给予热毛巾湿敷关节 30 min 后再进行锻炼,也可与主管医师一起给予髋关节手动松解,即被动活动髋关节,将髋关节活动范围增大,大大减轻了因康复锻炼给患儿带来的痛苦。具体方法可在床尾正中系上长条绷带,绷带上挽数个大结以利患儿抓握,也可做为目标,逐渐握到更远的大结,达到锻炼效果。同时为鼓励患儿,在每个大结上放上孩子们感兴趣的东西,比如糖果、小玩具等以作奖励,这样可以提高患儿锻炼

的兴趣,增强其信心。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件分析,结果资料采用方差分析检验。

2 结果

2.1 不同关节功能的 I 型胶原 mRNA、免疫组化光密度比较 根据 McKay 评分结果进行分析(表 3),总 160 髋中 102 髋术后关节功能评分为优或良(优良率为 63.7%)。在关节功能评分差的 24 髋中,I 型胶原 mRNA 表达高的 17 髋,表达较低的和中间的分别为 3 髋和 4 髋。同时 I 型胶原免疫组化光密度测定也得到相似的结果,在关节功能评分差的 24 髋中,平均光密度高的 13 髋,平均光密度值低和中间组分别为 3 髋和 8 髋。

2.2 不同关节功能 I 型胶原免疫组化结果 光学显微镜下观察关节囊纤维层成纤维细胞胞核或基质 I 型胶原阳性信号表达呈棕褐色或棕蓝色,胞核深染,胞质内见波浪状深染;III 型胶原阳性信号表达较 I 型胶原胞核染色浅主要分布在胞核周围,在胞质中呈细线状。本研究中关节囊纤维层内 I 型胶原免疫组化表达(图 1):纤维细胞排列分布不均、大小形态差异,基质染色也存在明显差异。本次研究 DDH 患儿髋关节囊免疫组化未见有 III 型胶原阳性染色。

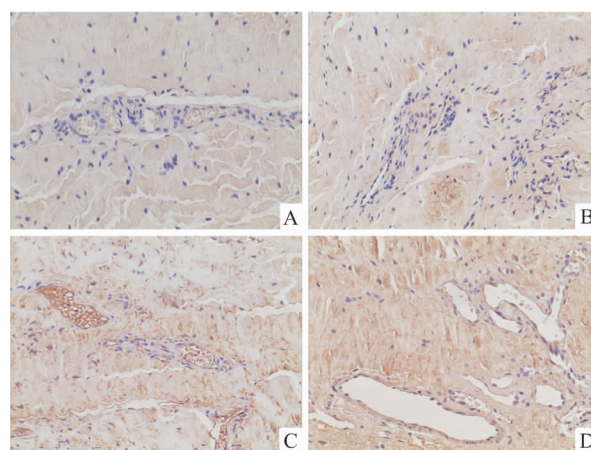


图1 免疫组化法检测不同关节功能 I 型胶原表达

A: 术后 6 个月 McKay 评分为差; B: 术后 6 个月 McKay 评分为一般; C: 术后 6 个月 McKay 评分为良; D: 术后 6 个月 McKay 评分为优

表3 不同关节功能的 I 型胶原 mRNA、免疫组化光密度的表达

关节功能	I 型胶原/actin			光密度		
	0.6~0.8	0.8~1.0	1.0~1.2	0.16~0.34	0.34~0.52	0.52~0.70
优	20	25	4	30	16	3
良	12	37	4	34	17	2
一般	7	13	14	19	7	8
差	3	4	17	3	8	13

2.3 各组间胶原表达量的结果比较 I型胶原免疫组化光密度检测结果: 术后关节功能 McKay 评分差的分组中 I 型胶原的表达较其他组明显增高, 差异有统计学意义 ($F = 42.273$, $P < 0.01$); I 型胶原 mRNA 表达量结果: 功能功能评分差的患儿 I 型胶原 mRNA 表达量较其他组高, 差异有统计学意义 ($F = 52.282$, $P < 0.01$)。通过 RT-PCR 检测 III 型胶原 mRNA 表达差异无统计学意义 ($F = 3.313$, $P > 0.05$)。见图 2。

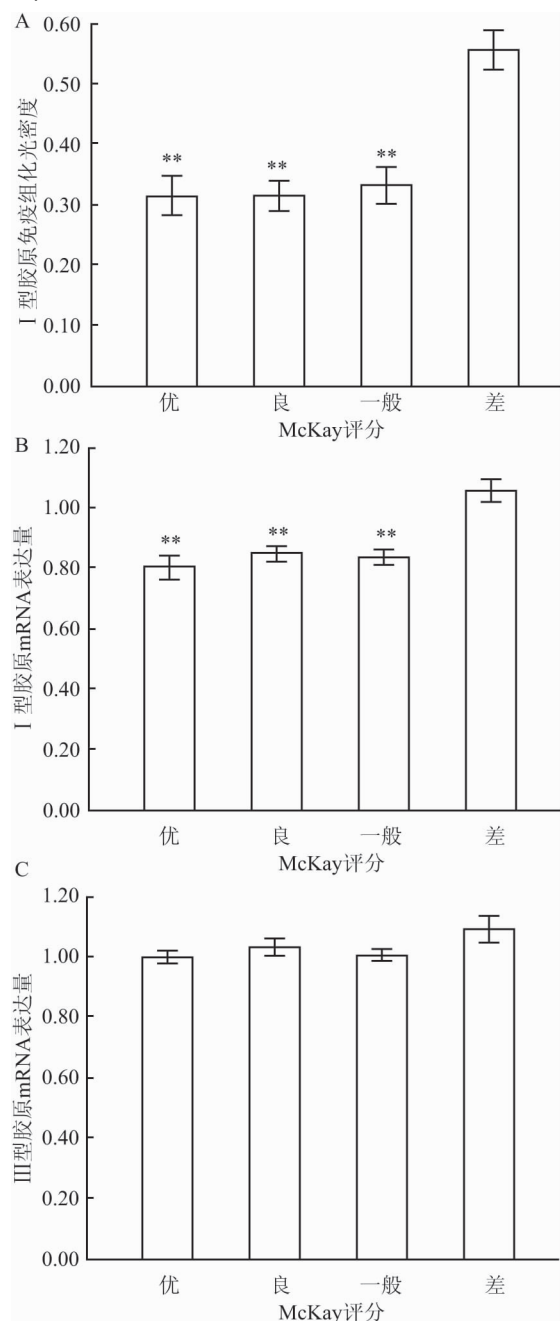


图2 不同关节功能关节囊免疫组化及 mRNA 结果

A: 不同关节功能 I 型胶原免疫组化光密度结果; B: 不同关节功能 I 型胶原 mRNA 表达量; C: 不同关节功能 III 型胶原 mRNA 表达量; 与关节功能差组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

DDH 在婴幼儿呈现一种动态的发育过程, 可随着年龄的增加而逐渐好转或逐渐加重。随着早期 B 超筛查的普及^[6], 早期治疗获得很好疗效, 但大龄 DDH 的治疗仍然是一个挑战, 术后会出现多种并发症^[7-8], 主要包括: 再脱位, 术后再脱位发生率不高; 股骨头缺血性坏死; 关节僵硬, 发生率较高。Tukentmez et al^[9] 认为产生髋关节僵直的原因是术中损伤、出血多、破坏髋臼及股骨头软骨, 导致术后关节广泛粘连, 长期固定髋关节及术后缺乏锻炼等。患髋固定不动导致的关节囊及结缔组织收缩变厚变硬, 失去弹性在早期是可逆的, 可通过关节活动恢复功能^[10]。但患儿因年幼不易掌握功能锻炼方法, 加上手术创伤引起的疼痛往往不愿锻炼。为此制定详细的术前术后康复训练计划对术后髋关节功能康复有很大的帮助^[11]。人类出生时髋臼较浅, 股骨头表面呈平滑的弧线, 在随后的生长发育的过程中不断的加深, 股骨头弧度加大, 髋关节逐渐稳定, 而这需要头臼同心的相互作用才能达到。而关节囊及周围软组织则具有保持这种头臼同心的重要作用^[3]。DDH 关节囊的病理改变是 DDH 术后关节功能恢复的重要因素, 既往研究^[12-13] 也表明髋关节囊主要由 I 型和 III 型胶原构成, I 型胶原是 $\phi 2 \sim 10 \mu\text{m}$ 粗纤维, 主要功能是抵抗外界的拉力; 而 III 型胶原是 $\phi 0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 的细纤维, 主要功能是保持延展性器官结构, 并提出了胶原分子含量及比例对结缔组织生物学特征有很大的影响。1984 年, Skirving et al^[14] 采用生化方法发现 1~4 岁 DDH 患儿关节囊中 I、III 型胶原比例异常, 近年来国内有研究从基因^[3] (DNA 及 RNA) 及分子水平^[15] (胶原蛋白免疫组化分析) 指出 DDH 患者关节囊内的 I、III 型胶原表达量与正常儿童存在明显差异。本研究采用相同年龄段进行 DDH 手术患儿以去除年龄因素, 手术主要由同级别两位高年资医师主刀, 关节囊采用相同的标准的方法进行处理, 术后采用前述相同的标准的锻炼方法, 观察关节功能恢复情况, 本研究首次将关节囊 I 型和 III 型胶原表达情况与术后关节功能相联系起来。

本研究显示在 DDH 关节囊中 I 型胶原表达有所不同, 对术后 6 个月关节功能锻炼后发现部分患儿功能欠佳 (McKay 标准), 分析了其中 I 型胶原的表达量, 关节囊中 I 型胶原表达高的患儿术后关节功能较差。III 型胶原差异无统计学意义, 同时进一

步对关节囊中 I 型和 III 型胶原基因表达进行定量检测,发现相似的结果,由此根据前人研究表明,DDH 患儿关节囊 I 型和 III 型胶原比例失常,可能主要是 I 型胶原的异常表达有关。结合胶原的功能,推测 I 型胶原的异常表达,有可能是术后关节功能锻炼后仍然欠佳的原因之一。

本研究仅仅通过 DDH 关节囊手术标本来证实胶原表达情况。缺乏正常患儿关节囊 I、III 型胶原表达情况,这需要进一步收集标本研究。另外需要进一步的体外研究证实髋关节应力下的关节囊胶原表达量的表达改变。尽管如此,本研究 also 具有很大的临床意义,认为术中留取标本进行 I 型和 III 型胶原的检测,有助于判定术后关节功能的恢复情况,同时为术后提供合理的康复训练计划提供理论依据。

参考文献

- [1] Wedge J H, Kelley S P. Strategies to improve outcomes from operative childhood management of DDH[J]. *Orthop Clin North Am*, 2012, 43(3): 291-9.
- [2] Wang T M, Wu K W, Shih S F et al. Outcomes of open reduction for developmental dysplasia of the hip: does bilateral dysplasia have a poorer outcome[J]. *J Bone Joint Surg Am* 2013, 95(12): 1081-6.
- [3] 王恩波, 赵群, 李连永. COL1a1 COL3a1 在发育性髋脱位患儿关节囊的表达[J]. *中国当代儿科杂志* 2008, 10(4): 493-6.
- [4] McKay D W. A comparison of the innominate and the pericapsular osteotomy in the treatment of congenital dislocation of the hip[J]. *Clin Orthop Relat Res* 1974, 98: 124-32.
- [5] Severin E. Congenital dislocation of the hip; development of the joint after closed reduction[J]. *J Bone Joint Surg Am* 1950, 32-A(3): 507-18.
- [6] Sewell M D, Eastwood D M. Screening and treatment in developmental dysplasia of the hip-where do we go from here[J]. *Int Orthop* 2011, 35(9): 1359-67.
- [7] Böhm P, Brzuske A. Salter innominate osteotomy for the treatment of developmental dysplasia of the hip in children: results of seventy-three consecutive osteotomies after twenty-six to thirty-five years of follow-up[J]. *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(2): 178-86.
- [8] Chang C H, Kao H K, Yang W E et al. Surgical results and complications of developmental dysplasia of the hip-one stage open reduction and Salter's osteotomy for patients between 1 and 3 years old[J]. *Chang Gung Med J* 2011, 34(1): 84-92.
- [9] Tukenmez M, Tezeren G. Salter innominate osteotomy for treatment of developmental dysplasia of the hip[J]. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2007, 15(3): 286-90.
- [10] 李香梅. 儿童发育性髋关节脱位手术的康复指导[J]. *实用护理杂志* 2003, 19(8): 226.
- [11] 杨雪, 李燕华. 截骨术治疗儿童发育性髋关节脱位的围手术期护理[J]. *护理实践与研究* 2012, 9(22): 54-5.
- [12] Wess T J. Collagen fibril form and function[J]. *Adv Protein Chem* 2005, 70: 341-74.
- [13] Montes G S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems[J]. *Cell Biol Int* 1996, 20(1): 15-27.
- [14] Skirving A P, Sims T J, Bailey A J. Congenital dislocation of the hip: a possible inborn error of collagen metabolism[J]. *J Inherit Metab Dis* 1984, 7(1): 27-31.
- [15] 李洪秋, 王恩波, 吉士俊. 发育性髋关节脱位关节囊(胶原)组织偏光显微镜观察及临床病理意义[J]. *中华小儿外科杂志*, 2009, 8(30): 529-32.

Relevant study of expression of collagen I and III in capsule of developmental dislocation of the hip and post-operative joint functional impairment

Fang Jihong^{1,2}, Sun Jun², Ning Bo², et al

(¹School of Nursing, Anhui Medical University, Hefei 230601; ²Dept of Orthopaedics, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore correlation of the expression of collagen I and III in capsule of developmental dislocation of the hip (DDH) and joint functional impairment after operation. The purpose of the study is to offer a theoretical basis for post-operative rehabilitation exercise. **Methods** The patients with DDH at the age of 2.5~3 years old who received similar operation were included in our hospital from 2010 to 2013. The redundant capsules were preserved for detecting expression of collagen I and III by immunohistochemistry and RT-PCR. The same way of rehabilitation exercise was used. The patients were divided into different groups by McKay score. **Results** There was no statistical significance in expression of collagen III both immunohistochemistry and RT-PCR. However, higher expression of collagen I was observed in patients with worse joint function. **Conclusion** The expression of collagen I in capsule of DDH patients is of correlation with post-operative joint functional rehabilitation. The patients with higher expression of collagen I should strengthen the function exercise after operation.

Key words developmental dislocation of the hip; collagen; function exercise