

关节内出血对大鼠伸直型膝关节挛缩的影响

张全兵^{1,2}, 朱得婷^{1,2*}, 周云^{1,2}, 阚秀丽^{1,2}, 霍雷¹, 张若希², 肖晗^{1,2}, 毛晶^{1,2}, 李雪明^{1,2}, 张润^{1,2}

(¹ 安徽医科大学第二附属医院康复医学科, 合肥 230601; ² 安徽医科大学第二临床医学院, 合肥 230000)

摘要 **目的** 探讨关节内出血对大鼠伸直型膝关节挛缩的影响。**方法** 将 18 只雄性成熟的 SD 大鼠随机均分为 3 组。其中对照组(C 组)不固定,饲养 4 周后处死。单纯固定组(M1 组)左下肢膝关节伸直位固定 4 周后处死。出血固定组(M2 组)取自体血注射膝关节腔后伸直位固定 4 周后处死。运用关节活动度测量仪测量在一个标准力矩作用时各组膝关节活动度,挛缩程度由分离膝关节肌肉前后的活动度计算所得。应用 HE 染色和 Masson 染色检测前方关节囊细胞数目和胶原沉积情况。通过 Western blot 检测前方关节囊转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、无翅型蛋白家族成员 (Wnt1)、 β -连环蛋白 (β -catenin) 蛋白表达的变化。**结果** 相较于 C 组, M1、M2 组大鼠膝关节总挛缩和关节源性挛缩程度有所增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时 M2 组总挛缩和关节源性挛缩程度重于 M1 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相较于 C 组, M1、M2 组大鼠膝关节前方关节囊细胞数目增多, 胶原沉积增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时 M2 组大鼠膝关节前方关节囊细胞数目升高及胶原沉积增加程度重于 M1 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相较于 C 组, M1、M2 组大鼠前关节囊 TGF- $\beta 1$ 、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达有所升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时 M2 组较 M1 组大鼠膝关节前方关节囊 TGF- $\beta 1$ 、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 关节固定可导致关节挛缩, 关节内出血加重了固定诱导的关节囊纤维化和关节挛缩。

关键词 膝关节挛缩; 纤维化; 膝关节活动度; 关节内出血; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号 R 686.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1381-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.003

关节固定作为一种常用的骨关节疾病治疗措施,一般用于缓解疼痛和抑制炎症,但也会导致关节挛缩等并发症^[1-3]。关节囊纤维化改变是引起关节挛缩的主要病理改变^[4]。在关节囊纤维化进程中,许多细胞因子发挥重要作用,其中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor 1, TGF- $\beta 1$) 与纤维化关系最为密切^[5]。同时,已有研究^[6-7]表明,无翅型蛋白家族成员 (wingless-type MMTV integration site family, member 1, Wnt1)、 β -连环蛋白 (β -catenin, β -catenin) 等可与 TGF- $\beta 1$ 信号产生协同作用,促进组织纤维化的发展。

关节及其周围创伤过程中伴随的关节出血也是

影响关节挛缩进程的一个重要因素^[8]。膝关节出血往往需要数周时间才能被吸收,而关节腔内血液累积可引起滑膜炎和纤维化,进而促进关节挛缩发生^[9]。阐明关节内出血对关节囊纤维化的影响,有助于临床上更好地防治关节挛缩。该研究拟应用关节腔内血液注射模拟关节腔出血,阐明大鼠膝关节腔血液注射后关节固定对关节囊纤维化以及继而引起的关节挛缩的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂 移液器购自赛默飞有限公司(美国),光学显微镜购自麦克奥迪集团公司(厦门),低速离心机购自中科中佳公司(合肥),Masson 染色试剂购自安徽欣乐生物技术有限公司(合肥),HE 染色试剂购自安徽欣乐生物技术有限公司(合肥),4℃、-20℃冰箱购自中科美菱公司(合肥),电子分析天平购自上海精密有限公司(上海),转膜仪和电泳仪购自伯乐有限公司(美国),戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司(美国),三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自上海生物工程有限公司(上海),75% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇及无水乙醇购自安徽

2025-05-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:2408085QH270);安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2022b063);安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2023A30077);安徽省高等学校省级质量工程项目(编号:2023jyxm1129);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金项目(编号:2022GMFY05)

作者简介:张全兵,男,博士研究生,主治医师;

周云,男,教授,主任医师,博士,博士生导师,通信作者,

E-mail:zhoukeg@163.com

* 对本文具有同等贡献

欣乐生物技术有限公司(合肥),RIPA 裂解缓冲液购自上海雅酶生物医药科技有限公司(上海),SDS-PAGE 试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司(中国上海),兔抗 TGF- β 1 抗体、兔抗 Wnt1 抗体、兔抗 β -catenin 抗体、兔抗 β -actin 抗体、亲和性山羊抗兔 IgG-HRP 购自 Affinity Biosciences 公司(美国)。

1.1.2 实验动物造模分组 18 只 3 月龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,取自安徽医科大学实验动物中心。大鼠被关在笼子里,温度控制在 24 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,光照/黑暗周期为 12 h,提供标准食物和水。将大鼠按照随机分组法等分为 3 组:对照组(C 组)、单纯固定组(M1 组)、出血固定组(M2 组),每组 6 只大鼠。通过腹膜内注射戊巴比妥钠(40 mg/kg,货号 P3761)对 M1 组大鼠进行麻醉,然后使用塑形铝制夹板固定其左膝关节 4 周(专利号:202120470158.0)。对 M2 组大鼠进行麻醉,使用微量注射器在动物超声引导下注射 20 μl 尾静脉血液,然后使用塑形铝制夹板固定固定其左膝关节 4 周(见图 1)。本实验已获安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:LLSC20221126)。

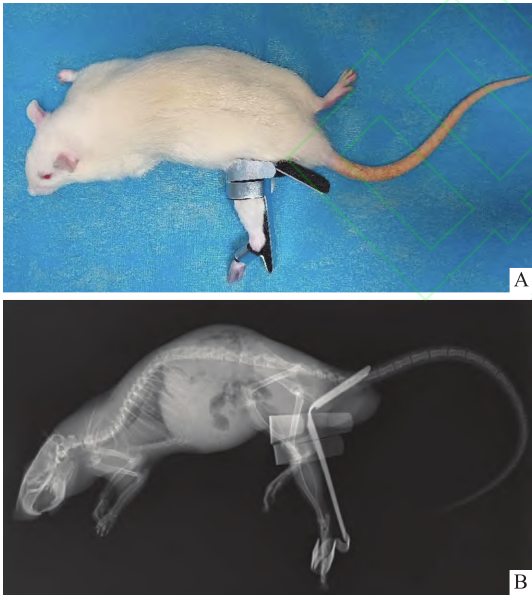


图 1 大鼠膝关节挛缩模型制作

Fig. 1 Establishment of rat knee contracture model

A: Knee joint of the rat was fixed in straight position; B: Radio-graphy of the extending knee joint in the rat.

1.2 关节挛缩程度检测及组织取材 大鼠应用过量麻醉处死后,取下左侧下肢,使用大鼠膝关节活动度测量装置(专利号 No:ZL202120996643.1)测量膝关节活动度(range of motion, ROM)。与课题组之

前的研究^[10]保持一致,使用 0.053 N · m 的标准扭矩在肌切开术前后分别测量每只大鼠左膝关节的 ROM(见图 2A、B)。使用以下公式计算总挛缩和关节源性挛缩的程度^[11]: ① 总挛缩程度 = 肌切开术前的 ROM(对照组膝关节) - 肌切开术前的 ROM(固定组膝关节);② 关节源性挛缩程度 = 肌切开术后的 ROM(对照组膝关节) - 肌切开术后的 ROM(固定组膝关节)。测量左 ROM 后,先分离髌上韧带以隔离前关节囊,随后小心地沿着膝关节和髌骨的边缘取出所选的前关节囊,手术过程中尽可能多地去除周围脂肪组织。最后,将选定的膝关节内侧关节囊的三分之一保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 4% 多聚甲醛中过夜,用于后续组织病理学检查,其余三分之二的选定侧部组织在液氮中快速冷冻并储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下,用于后续蛋白质印迹分析。

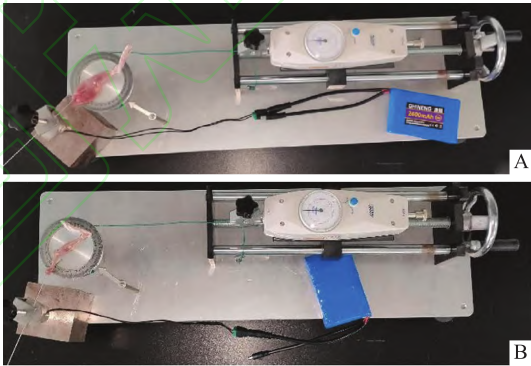


图 2 大鼠膝关节活动度测量

Fig. 2 Measurement of knee joint range of motion in rats

A: Schematic diagram of knee joint range of motion measurement before myotomy; B: Schematic diagram of knee joint range of motion measurement after myotomy.

1.3 HE 和 Masson 染色 为了进行组织学分析,使用分级酒精对组织标本进行脱水,石蜡包埋中。使用切片机获得 6 μm 的矢状切面。随后,根据制造商的说明,对关节进行脱蜡处理,并进行苏木精(HE)和 Masson 染色,以检查病理变化,包括关节囊中的总细胞计数和胶原沉积。染色后,在显微镜(BX43F, OLYMPUS, Tokyo 163-0914, Japan)下以 400 倍的放大倍数检查切片,并在切片中随机选择 3 个视野。计算每个视野中的细胞数,然后计算平均值。最后,将单位转换为每 mm^2 的细胞总数。为了评估胶原沉积,使用 Image Proplus 软件测量关节囊组织中蓝色染色区域的百分比。

1.4 蛋白质印迹 通过蛋白质印迹分析 TGF- β 1、Wnt1、 β -catenin 的蛋白水平。使用液氮将组织样品

研磨成细粉,并用 RIPA 裂解缓冲液(上海雅酶生物医药科技有限公司)匀浆。离心后,收集含有蛋白质的上清液。通过 SDS-PAGE 试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司)分离等量的蛋白质,并通过电转移将其转移到 PVDF 膜上。然后在室温下用无蛋白快速封闭缓冲液($1\times$)封闭 20 min。

随后,将膜清洗 3 次,用一抗在 4°C 冰箱孵育过夜[兔抗 TGF- β 1 (1:5 000),兔抗 Wnt1 (1:2 000),兔抗 β -catenin (1:5 000),兔抗 β -actin (1:5 000)];过夜后,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,然后用过氧化物酶偶联的亲合纯化的山羊抗兔 IgG-HRP (1:10 000)在室温下持续孵育 90 min,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。

最后,使用添加的增强型化学发光 (ECL) 底物使膜显影。并且在数字成像设备 (UVP ChemStudio 515, Analytik Jena AG, Germany) 上捕获目标信号。使用 Image J 软件量化每个条带的密度。用 β -actin 对 TGF- β 1、Wnt1 和 β -catenin 谱带密度进行统一归一化得出各个蛋白相对含量。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并使用 SPSS 23.0 进行分析。使用单因素方差分析比较各组之间的差异。比较各组之间的不同因素,包括总挛缩程度、关节源性挛缩、细胞数目、胶原沉积程度以及 TGF- β 1、Wnt1、 β -catenin 的表达水平。当方差分析显示差异时,采用 Bonferroni 检验或 Tamhane T2 检验评估组间多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总挛缩和关节源性挛缩 M1 组和 M2 组总挛缩和关节源性挛缩程度都重于 C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时 M2 组总挛缩和关节源性挛缩程度重于 M1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.2 HE 染色和 Masson 染色切片和组织学评价

M1 组与 M2 组大鼠细胞数目较 C 组均有所增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。M2 组较 M1 组大鼠细胞数目增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4A、B。M1 组与 M2 组大鼠胶原沉积较 C 组均有所增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。M2 组较 M1 组大鼠胶原沉积更显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4A、C。

2.3 关节囊组织蛋白表达分析 M1 组与 M2 组较

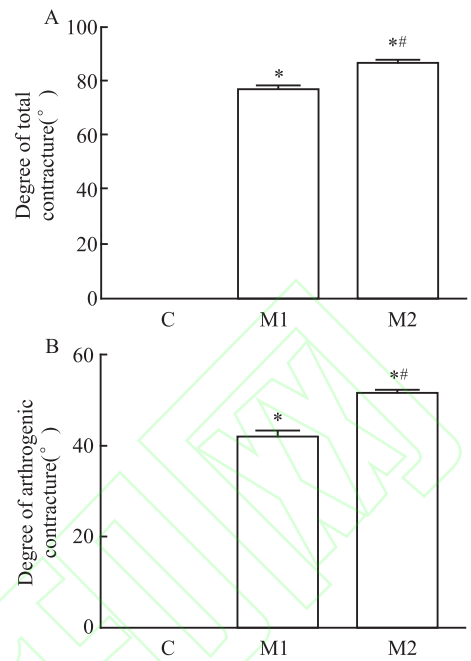


图3 各组大鼠总挛缩和关节源性挛缩程度

Fig. 3 Total contracture and arthrogenic contracture of rats in each group

A: Quantitative molecular analysis of total contracture; B: Quantitative analysis of arthrogenic contracture; * $P < 0.05$ vs C group; # $P < 0.05$ vs M1 group.

C 组大鼠膝关节前方关节囊 TGF- β 1、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达均有所升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。M2 组较 M1 组大鼠膝关节前方关节囊 TGF- β 1、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$) (见图 5)。

3 讨论

关节挛缩可分为先天性多发性关节挛缩和后天性挛缩。先天性多发性关节挛缩症是因肌肉、关节囊及韧带纤维化,引起以全身多个关节僵直为特征的综合征,其病因较为复杂,治疗也十分困难^[11]。引起后天性关节挛缩的病因主要包括骨关节系统直接损伤后关节制动(如创伤、手术、运动后关节炎等)和神经系统疾患(如脑卒中、脑瘫、周围神经损伤等),其中非常常见的一个原因是创伤后长时间或者不恰当的关节固定^[12]。膝关节作为人体最重要的负重运动关节之一,在各种运动与事故中极易受到损伤,而为促进膝关节损伤修复需行的膝关节制动,常导致膝关节挛缩的发生。在创伤或关节手术后,容易引起关节内出血,促进关节内的炎症反应和纤维组织增生,这可能导致关节结构的改变和功

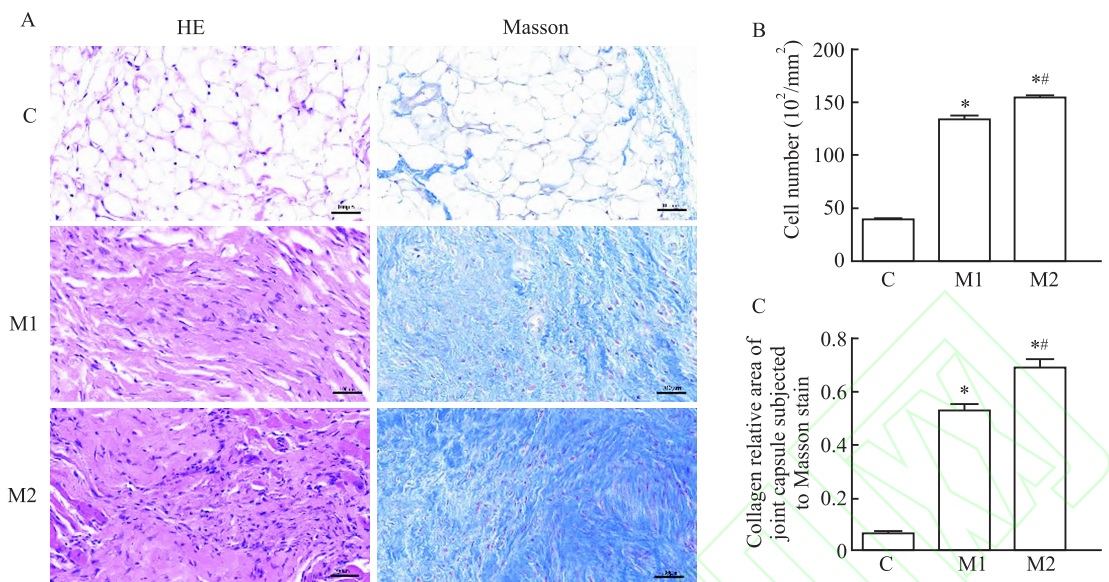


图4 大鼠前方关节囊 HE 和 Masson 染色结果

Fig.4 Results of HE and Masson staining of the anterior articular capsule in rats

A: The representative images of the anterior joint capsule in each group with HE staining and Masson staining $\times 400$; B: Anterior joint capsule cell count statistics in each group; C: Masson staining statistics of collagen deposition ratio of anterior articular capsule of rats in each group; * $P < 0.05$ vs C group; # $P < 0.05$ vs M1 group.

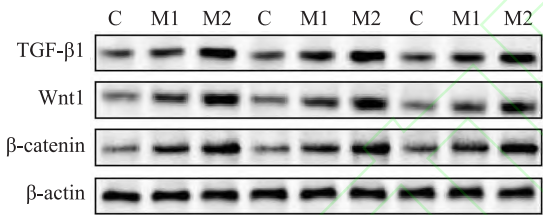
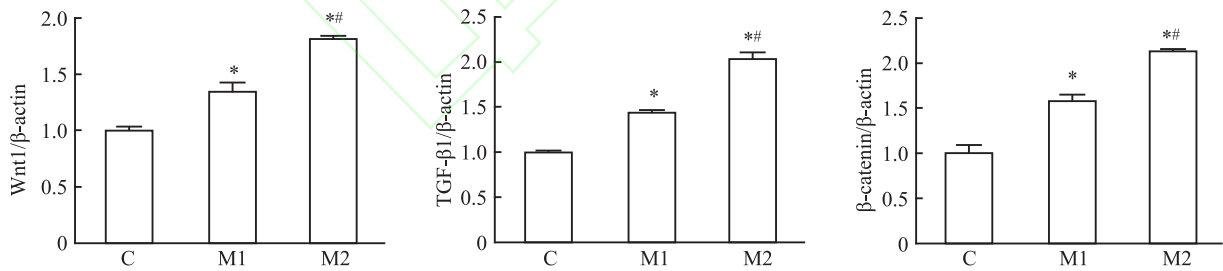


图5 各组大鼠膝关节前方关节囊中 TGF- β 1、Wnt1 和 β -catenin 表达变化
Fig. 5 Expression changes of TGF- β 1, Wnt1 and β -catenin in anterior joint capsule of knee joint in each group

* $P < 0.05$ vs group C; # $P < 0.05$ vs M1 group.



能障碍,甚至引起关节挛缩发生^[9,13]。因此,了解关节固定伴出血所致关节挛缩的发病机制显得尤为必要。深入了解关节出血后纤维组织形成的过程和影响因素,可以为关节挛缩治疗提供更有效的手段。

既往有研究^[14]表明,膝关节固定 1 周即可出现关节挛缩,膝关节固定 2 周内以肌源性因素(肌肉、肌腱、筋膜等)限制为主,2 周后以关节源性因素(关节囊、韧带、骨、软骨)限制为主,膝关节固定 4 周后关节挛缩程度变得稳定。故而本研究对大鼠一侧膝关节制作了为期 4 周的固定膝关节挛缩动物模型。本研究显示,与 C 组相比,M1 组与 M2 组大鼠膝关节总挛缩程度和关节源性挛缩程度明显增加,M2 组

较 M1 组总挛缩及关节源性挛缩更加显著,提示伴有关节内出血的关节固定所引起的关节挛缩程度更加严重。组织纤维化进程往往伴随着早期炎症,出现炎症细胞和纤维化细胞为主的细胞数目增多,并伴有胶原沉积增多^[10]。本研究中,这两种造模方式均引起前方关节囊细胞数目、胶原沉积增高,而 M2 组更为明显,提示两种造模方式均可引起关节囊纤维化,而关节内出血会加重关节囊纤维化。

Wnt 是一类重要的分泌型糖蛋白,在细胞信号传导和调控中发挥着关键作用。Wnt 蛋白分泌后与细胞表面特异性受体结合,引起 β -catenin 的积累, β -catenin 在细胞内过度积累并进入细胞核,可能促

使纤维化的发生^[15-16]。与此同时,Wnt/ β -catenin 信号通路激活可以促进纤维化关键因子 TGF- β 信号活化,促进纤维化进展^[17]。本研究检测了大鼠膝关节前方关节囊 TGF- β 1、Wnt1、 β -catenin 蛋白的表达改变。与 C 组相比,M1 组与 M2 组大鼠膝关节前方关节囊 TGF- β 1、Wnt1、 β -catenin 蛋白的表达显著增加,而 M2 组较 M1 组表达增加,这说明关节固定导致 Wnt1/ β -catenin 信号通路以及 TGF- β 1 活化可能对出血固定所致大鼠膝关节囊纤维化起到促进作用。这一发现将有助于提高临床医师对关节内出血以及关节固定引起的关节挛缩发病机制的理解,有利于进一步优化治疗方案。本研究仅应用蛋白质印迹对 Wnt1、 β -catenin 以及 TGF- β 1 表达进行了检测,未进一步验证其上下游分子(如 Smad、GSK-3 β)表达或信号通路交互作用。课题组将在今后研究中采用多种实验技术验证,进一步阐明关节内出血以及关节固定引起关节挛缩形成的具体机制。

本研究结果表明,关节固定可引起关节挛缩,关节内出血可加重关节囊纤维化以及继而发生的关节挛缩。对于部分特殊人群,如血友病患者,可因单纯关节内出血诱发关节挛缩^[18]。本研究重点探讨了膝关节内出血对关节挛缩进程的影响,为临床上关节创伤后出血较多患者的治疗提供理论参考,同时对血友病等单纯膝关节内出血患者关节挛缩风险评估有指导意义。对于关节创伤后出血患者或血友病等单纯膝关节内出血患者,都应及时采取有效措施,避免持续出血或血液在关节腔长时间堆积。关节腔内血液注射联合关节固定,可以作为大鼠膝关节挛缩模型制作的有效方法之一,为今后关节挛缩相关研究提供良好的载体。

(感谢安徽医科大学公共卫生学院王华教授、苏州大学李斌教授对于本研究的指导)

参考文献

- [1] Zhang B B, Xu L, Zhang Q B, et al. Anti-fibrosis effect and its mechanism of atractylenolide III on post-traumatic extending knee joint contracture in rats[J]. *Exp Gerontol*, 2025, 201: 112708. doi:10.1016/j.exger.2025.112708.
- [2] Kaneguchi A, Ozawa J, Yamaoka K. The effects of immobilization duration on joint contracture formation after anterior cruciate ligament reconstruction in rats[J]. *Clin Biomech (Bristol)*, 2023, 103: 105926. doi:10.1016/j.clinbiomech.2023.105926.
- [3] Zhang Q B, Huo L, Li M, et al. Role of hypoxia-mediated pyroptosis in the development of extending knee joint contracture in rats[J]. *Eur J Med Res*, 2024, 29(1): 298. doi:10.1186/s40001-024-01890-9.
- [4] Mao J, Zhang J N, Zhang Q B, et al. Extracorporeal shock wave and melatonin alleviate joint capsule fibrosis after knee trauma in rats by regulating autophagy[J]. *Curr Mol Med*, 2025, 25(2): 222-36. doi:10.2174/0115665240339436240909100847.
- [5] 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. doi:10.1055/s-0038-1676502.
- [6] Zhou S, Wu Q, Lin X, et al. Cannabinoid receptor type 2 promotes kidney fibrosis through orchestrating β -catenin signaling[J]. *Kidney Int*, 2021, 99(2): 364-81. doi:10.1016/j.kint.2020.09.025.
- [7] Somanader D V N, Zhao P, Widdop R E, et al. The involvement of the Wnt/ β -catenin signaling cascade in fibrosis progression and its therapeutic targeting by relaxin[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 223: 116130. doi:10.1016/j.bcp.2024.116130.
- [8] Yuan S, Song L, Jiang H, et al. Perioperative blood loss during joint replacement: comparison between patients with and without hemophilia[J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1): 324. doi:10.1186/s13018-022-03217-y.
- [9] Carlos Rodriguez-Merchan E. Synovitis in hemophilia: preventing, detecting, and treating joint bleeds[J]. *Expert Rev Hematol*, 2023, 16(7): 525-34. doi:10.1080/17474086.2023.2209717.
- [10] Hu C, Zhang Q B, Wang F, et al. The effect of extracorporeal shock wave on joint capsule fibrosis in rats with knee extension contracture: a preliminary study[J]. *Connect Tissue Res*, 2023, 64(5): 469-78. doi:10.1080/03008207.2023.2217254.
- [11] 俞沁圆, 王 斌, 沈卫民, 等. 先天性多发性关节挛缩症康复专家共识[J]. *组织工程与重建外科*, 2024, 20(2): 160-75.
- [11] Yu Q Y, Wang B, Shen W M, et al. Expert consensus on rehabilitation of arthrogryposis multiplex congenita[J]. *J Tissue Eng Reconstr Surg*, 2024, 20(2): 160-75.
- [12] 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. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.009.
- [12] Chen S, Zhang Q B, Zhou Y, et al. Effect of ultrashort wave intervention on joint capsule fibrosis in rabbit extending knee joint contracture[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(3): 380-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.009.
- [13] Li X M, Wang K, Liu M, et al. Nicorandil mitigates arthrogenic contracture induced by knee joint extension immobilization in rats: interference with RhoA/ROCK signaling and TGF- β 1/Smad pathway[J]. *Eur Cell Mater*, 2024, 47: 59-72. doi:10.22203/ecm.v047a05.
- [14] Zhou C X, Wang F, Zhou Y, et al. Formation process of extension knee joint contracture following external immobilization in rats[J]. *World J Orthop*, 2023, 14(9): 669-81. doi:10.5312/wjo.v14.i9.669.
- [15] Lei Q, Yu Z, Li H, et al. Fatty acid-binding protein 5 aggravates pulmonary artery fibrosis in pulmonary hypertension secondary to left heart disease via activating Wnt/ β -catenin pathway[J]. *J Adv*

- Res, 2022, 40: 197–206. doi:10.1016/j.jare.2021.11.011.
- [16] Wan X, Chen S, Li P, et al. Sinensetin protects against pulmonary fibrosis *via* inhibiting Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. *Tissue Cell*, 2022, 78: 101866. doi: 10.1016/j.tice.2022.101866.
- [17] Działo E, Czepiel M, Tkacz K, et al. WNT/ β -catenin signaling promotes TGF- β -mediated activation of human cardiac fibroblasts by enhancing IL-11 production [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (18): 10072. doi:10.3390/ijms221810072.
- [18] Cruz-Montecinos C, Maas H, Cerda M, et al. Altered neural control of gait and its association with pain and joint impairment in adults with haemophilic arthropathy: clinical and methodological implications [J]. *Haemophilia*, 2022, 28(3): 497–504. doi: 10.1111/hae.14517.

Effect of intra-articular hemorrhage on extending knee joint contracture in rats

Zhang Quanbing^{1,2}, Zhu Deting^{1,2}, Zhou Yun^{1,2}, Kan Xiuli^{1,2}, Huo Lei¹, Zhang Ruoxi²,
Xiao Han^{1,2}, Mao Jing^{1,2}, Li Xueming^{1,2}, Zhang Run^{1,2}

(¹*Dept of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

²*The Second Clinical School of Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230000*)

Abstract Objective To investigate the effect of intraarticular hemorrhage on extending knee joint contracture model in rats. **Methods** 18 mature male SD rats were divided into 3 groups by random number table method. The control group (group C) was not immobilized and was killed after 4 weeks of feeding. In the simple fixation group (M1 group), the left lower limb knee joint was immobilized in straight position for 4 weeks. The blood fixation group (M2 group) was injected into the knee cavity with body blood and immobilized in a straight position for 4 weeks. The knee joint motion of each group was measured by the joint motion measuring instrument under a standard torque. The contracture degree was calculated by the joint range of motion of the knee joint before and after muscles separation. HE staining and Masson staining were used to detect the number of cells and collagen deposition in the anterior joint capsule. The protein expressions of transforming growth factor 1 (TGF- β 1), wingless-type MMTV integration site family, member 1 (Wnt1) and beta-catenin (β -catenin) in the anterior articular capsule were detected by Western blotting. **Results** Compared with group C, total knee contracture and arthrogenic contracture of rats in M1 and M2 groups increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). At the same time, the degree of total contracture and arthrogenic contracture in M2 group was higher than that in M1 group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group C, the number of anterior joint capsule cells and collagen deposition in M1 and M2 groups increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). At the same time, the number of anterior joint capsule cells and collagen deposition in M2 group were higher than those in M1 group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group C, the protein expressions of TGF- β 1, Wnt1 and β -catenin in the anterior articular capsule of rats in M1 and M2 groups increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). At the same time, the protein expressions of TGF- β 1, Wnt1 and β -catenin in the anterior articular capsule of the knee joint in M2 group were significantly higher than those in M1 group, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Joint immobilization can lead to joint contracture, and joint bleeding aggravates the degree of joint capsule fibrosis induced by immobilization.

Key words knee joint contracture; fibrosis; knee joint range of motion; joint hemorrhage; Wnt/ β -catenin signaling pathway

Fund Programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2408085QH270); Health Research Project of Anhui Province (Nos. AHWJ2022b063, AHWJ2023A30077); Provincial Quality Project of Colleges and Universities in Anhui Province (No. 2023jyxm1129); National Natural Science Foundation Incubation Plan of the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. 2022GMFY05)

Corresponding author Zhou Yun, E-mail: zhoukeg@163.com