

· 论 著 ·

持续被动运动对兔膝关节损伤后侧副韧带内弹性蛋白表达的影响

孙青青¹, 周爱萍²

[摘要] **目的** 观察持续被动运动(continuous passive motion, CPM)对兔膝关节损伤后侧副韧带内弹性蛋白的影响。**方法** 选取 15 只新西兰雄性大白兔造膝关节软骨全层缺损模型,术后按运动方式不同,随机分成 3 组即制动组、自由活动组、CPM 组。6 周后提取韧带采用蛋白免疫印迹法(western blotting)进行弹性蛋白的检测。**结果** 制动组的膝关节出现不同程度的僵硬,功能出现障碍;三组弹性蛋白的表达量分别是制动组(0.84 ± 0.25)、自由活动组(2.91 ± 0.34)、CPM 组(2.04 ± 0.69)。自由活动组侧副韧带内弹性蛋白的表达高于制动组和 CPM 组,CPM 组侧副韧带内弹性蛋白的表达高于制动组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** CPM 和自由活动均可有效防止关节损伤后导致的韧带挛缩及关节僵硬,而自由活动效果更好。

[关键词] 兔;持续被动运动;膝关节损伤;弹性蛋白;蛋白印迹

[中图分类号] R3;R686.5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.05.012

Continuous passive motion had an influence on elastic protein expression in deputy ligament after rabbits' knee injury

SUN Qing-qing¹, ZHOU Ai-ping². 1. Bengbu Medical University, Beng'bu, Anhui 233030, China; 2. Department of Medical Quality Control, 82 Hospital of PLA, Huai'an, Jiangsu 223001, China

[Abstract] **Objective** Observe the influence of elastin in the deputy ligament of rabbit whose knee joint were injury after continuous passive motion. **Methods** 15 male New Zealand rabbits were used to establish the model of knee joint cartilage full-thickness defect. Then according to different way of movement, all animals were randomly divided into 3 groups: brake group, free activity group, CPM group. Ligaments were extracted and the elastin was test by western blot. **Results** All rabbits' knee joint appeared stiffness in different degrees and functional bottleneck. The elastin expression of three groups are as follows: brake group (0.84 ± 0.25), free activity group (2.91 ± 0.34), CPM group (2.04 ± 0.69). Elastin expression of the deputy ligament in free activity group was higher than the brake group and CPM group ($P < 0.01$). Elastin expression of the deputy ligament in CPM group was higher than the brake group ($P < 0.01$). **Conclusion** CPM and free activities could effectively prevent ligament contracture and stiffness of joint which is caused by joint damage, while free activities is better.

[Key words] rabbit; continuous passive motion; knee injury; elastin; western blotting

骨关节损伤或关节软骨损伤后,主要表现为关节疼痛、肿胀、僵硬和功能障碍并可逐渐发生退行性变。部分患者因害怕疼痛未能进行早期的康复训练,致局部肌腱、韧带、关节囊等软组织与关节广泛粘连,使得关节屈伸、旋转功能受阻,限制了正常的关节运动,影响关节功能的恢复^[1-2]。本研究以新西兰大白兔为研究对象建立膝关节全层缺损模型,观察 6 周持续被动运动(continuous passive motion,

CPM)对膝关节损伤后周围组织(侧副韧带)内弹性蛋白的影响,为临床常规使用 CPM 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组 实验的新西兰雄性大白兔 15 只由青岛康大公司提供,兔龄为 70 d,体重为 $1.165 \sim 2.335$ kg,麻醉采用 3% 戊巴比妥钠(1 mL/kg),在兔两后退膝关节髌骨内侧作 2 cm 的弧形切口,逐层切开,暴露股骨髌骨面,在其中心处用电钻致其关节软骨全层缺损,深度以缺损区有渗血为准。见图 1。用生理盐水冲净软骨碎片及凝血块,逐层关闭切口,灭菌纱布覆盖包扎。术后随机分成 3 组即制动组、自由活动组、CPM 组,每组 5 只含 10 个膝关节。制动组采用自制袜套屈膝固定,见图 2。

基金项目: 蚌埠医学院研究生科技创新立项课题 (Byyex1420)

作者单位: 1. 233030 安徽蚌埠,蚌埠医学院研究生部 2013 级研究生(解放军 82 医院); 2. 223001 江苏淮安,解放军 82 医院医疗质量控制科

通讯作者: 周爱萍, E-mail: aiping.82@163.com

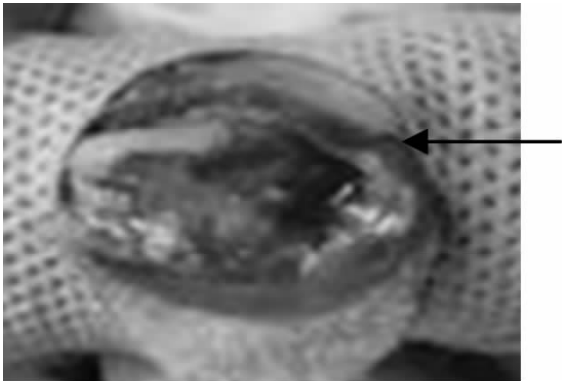


图 1 兔膝关节软骨全层缺损造模



图 2 袜套制动兔后腿造模

1.2 术后处理 术后所有兔子连续注射 3 d 青霉素(40 万 U/次,2 次/d)。制动组采用袜套,屈膝位制动 6 周;自由活动组笼内活动 6 周;CPM 组笼内自由活动并每天上下午各 1 h CPM 仪运动 6 周,运动的起始角度为 20°,速度为 8°/s^[3],在其耐受范围内逐渐增加角度,最大角度为 100°。

1.3 蛋白免疫印迹(western blotting)弹性蛋白的检测 6 周后采用静脉注射空气处死所有兔子取其膝关节侧副韧带,所有标本保存在 -80 ℃。蛋白提取:取出标本先将其剪碎,迅速充分研磨后加入细胞裂解液,1300 r 离心 4 min,离心机半径为 95 mm。取上清液,保存在 -20 ℃,采用 NanoDrop 分光光度计测量各组标本蛋白的浓度,光波长度设定为 280 nm。采用 western blotting 检测弹性蛋白的表达:聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 5% 浓缩胶、10% 分离胶,上样量 20 μg,电压 80 V,电泳结束后取出凝胶。半干法转印:恒流 2 mA/cm² 下转膜 70 min,确保转膜成功;转移至 5% 的封闭液中,室温下平缓摇动 2 h,加入弹性蛋白一抗,放入冰箱 4 ℃ 过夜;TBST 缓冲液漂洗硝酸纤维素薄膜 3 次,每次 10 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育 2 h,TBST 漂洗硝酸纤维素薄膜 3 次,每次 10 min。DAB 显色:将硝酸纤维素薄膜置于暗盒中均匀的滴上 DAB 显色剂,反

应 10 min;将硝酸纤维素薄膜放入扫描仪中成像,β-actin 为内参,进行灰度值的分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件包进行数据处理,定量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,各组弹性蛋白比较采用方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

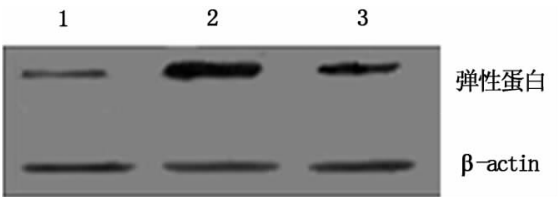
2 结 果

2.1 体重比较 三组兔子术前体重为(2.014 ± 0.194) kg,组间比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。术后 CPM 组兔子能安静耐受 2 h 的训练,训练期间饮食正常;自由活动组一切如常;制动组兔子膝关节均出现僵硬、伸屈活动受限,食欲明显下降,6 周后平均体重较术前减少,但与术前比较差异仍没有统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 各组兔术前、术后 6 周体重的比较(kg, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	术前	术后 6 周
制动组	5	2.17 ± 0.25	2.06 ± 0.32
自由活动组	5	2.00 ± 0.18	2.97 ± 0.18
CPM 组	5	2.01 ± 0.25	2.54 ± 0.16

2.2 弹性蛋白表达的比较 western blotting 所得电泳条带的颜色越深表明其蛋白的表达越高,三组中弹性蛋白电泳条带的灰度值分别与其相对应的 β-actin 电泳条带的灰度值相比,三组的弹性蛋白平均表达量分别是制动组(0.84 ± 0.25),自由活动组(2.91 ± 0.34),CPM 组(2.04 ± 0.69)。制动组弹性蛋白的表达均低于自由活动组和 CPM 组(*P* < 0.01),而 CPM 组弹性蛋白的表达低于自由活动组(*P* < 0.01)。见图 3。



1:制动组;2:自由活动组;3:CPM 组

图 3 弹性蛋白的表达

3 讨 论

3.1 弹性蛋白的功能 弹性蛋白通常分布在结缔组织、血管、肺泡壁等组织中,是一种无定形弹性体,赋予组织弹性、伸缩性等功能^[4]。膝关节软骨损伤往往不能自发修复,并且软骨破坏不会局限、停止,

其逐渐发展、扩大,严重者发展成为骨性关节炎,引起关节长期疼痛、关节韧带的挛缩和关节功能障碍,如果较长时间不运动,会导致血运不畅,渗出的浆液纤维蛋白留在关节囊产生沉积易形成纤维组织致粘连,最终形成瘢痕导致韧带挛缩、关节僵硬等^[5-7]。当膝关节的功能发生改变时,作为内部结构功能基础之一的弹性蛋白是如何随之改变,正是本研究想要探讨的。

3.2 CPM 的特点与运用 Salter 等^[8]于 20 世纪 70 年代提出滑膜关节持续被动运动理论,并将其应用于关节软骨缺损后的修复过程,发现可起到加速关节周围的韧带和肌腱的愈合与再生的满意疗效。CPM 作为软骨损伤的一种辅助治疗方法,具有药物和手术不能替代的独有优势,逐渐受到国内外相关专业与机构的重视和应用,其所给予的大范围被动周期性正弦曲线性缓慢运动,使肌肉凝胶成分如水和蛋白多聚糖黏稠度减低,肌肉的被动僵硬程度减少,致使弹性增加、挛缩及痉挛得到有效缓解,故被广泛应用于预防和治疗关节粘连、僵硬、肌肉挛缩、骨质疏松等方面^[9-12],但从分子水平来证实 CPM 疗效的报道目前较少见。

3.3 弹性蛋白的检测与 CPM 临床意义 本研究中制动组所有膝关节在术后 6 周均有瘢痕组织形成,而出现了僵硬等功能障碍,是较长时间缺乏锻炼,血液循环差造成,与学者郭祁等^[13]的研究一致。6 周后所有实验兔的体重与术前相比较差异没有统计学意义,但制动组的平均体重明显降低,这与术后制动舒适度降低,伤口的疼痛等影响了食欲进而导致体重的下降有关;消瘦也会消耗体内蛋白影响术后的恢复,由此出现局部影响带动全身的平均体重下降,由此我们在实验中关注了体重的变化。Salter 等^[8]的实验证明,对于制动所引起的并发症作 CPM 能够起到很好的预防作用。实验 6 周后各组间弹性蛋白表达的差异说明:CPM 和自由活动可以防止因制动产生的关节僵硬、韧带挛缩等,自由活动组的数据提示效果更好,这可能与兔子本身运动的强度比 CPM 大有关。也有研究显示患者术后恢复过程中进行 CPM,能够有效提高锻炼的效果,保证患者锻炼天数的持续性和有效性,有利于促进患者膝关节功能的恢复和提高,且恢复的效果明显比自主锻炼好^[14]。Chang 等^[15]在 CPM 治疗和非细胞聚丙交酯-乙交酯共聚物植入兔软骨再生的联合效应中发现,CPM 能有效防止关节周围组织痉挛的形成。本研究中除制动组外其他组无一例有痉挛现象发生,提示术后早期的康复训练可以增加韧带强度功能锻炼,对减少

关节粘连,防止关节僵硬,肌肉萎缩等并发症有加速康复作用。

(致谢:感谢我院笪虎博士、吴德平主任、赵文玺老师对本实验提供的帮助。)

【参考文献】

- [1] Derrick M, Knapik BA, Joshua D, et al. The basic science of continuous passive motion in promoting knee health: a systematic review of studies in a rabbit model [J]. *Arthroscopy*, 2013, 29(10): 1722-1731.
- [2] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学 [M]. 3 版, 北京: 人民军医出版社, 2005: 2191-2194.
- [3] 黄红拾, 敖英芳, 陈里宁, 等. 兔膝关节持续被动活动器的研制与初步应用 [J]. *中国运动医学杂志*, 2007, 26(3): 313-317.
- [4] 邹仲之, 李继承. 组织学与胚胎学 [M]. 8 版, 北京: 人民卫生出版社, 2013: 42-45.
- [5] Jamil K, Chua KH, Joudi S, et al. Development of a cartilage composite utilizing porous tantalum, fibrin, and rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defect [J]. *J Orthop Surg Res*, 2015, 10: 27. doi:10.1186/s13018-015-0166-z.
- [6] 高健, 潘莹. CPM 结合康复训练治疗膝关节周围骨折的临床探讨 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2014, 2(7): 59-60.
- [7] 孙国静, 赵建宁. 骨挫伤在膝关节损伤中的研究进展 [J]. *东南国防医药*, 2013, 15(5): 508-510.
- [8] Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, et al. The biological effect of continuous passive motion on the healing of fullthickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1980, 62(8): 1232-1251.
- [9] 温连英. 人工全膝关节置换术后早期康复锻炼的临床探讨 [J]. *医学信息*, 2013, 26(3): 407-407.
- [10] Rogan S, Taeymans J, Hirschmüller A, et al. Effect of continuous passive motion for cartilage regenerative surgery - a systematic literature review [J]. *Z Orthop Unfall*, 2013, 151(5): 468-474.
- [11] Du Plessis M, Eksteen E, Jenneker A, et al. The effectiveness of continuous passive motion on range of motion, pain and muscle strength following rotator cuff repair: a systematic review [J]. *Clin Rehabil*, 2011, 25(4): 291-302.
- [12] Hosalkar H, Bomar JD. Clinical effectiveness of continuous passive motion (CPM) following femoroacetabular impingement surgery in adolescents [J]. *J Child Orthop*, 2012, 6(4): 269-275.
- [13] 郭祁, 何大炜, 孙宁, 等. 创伤后肘关节僵硬 553 例回顾性分析 [J]. *中华外科杂志*, 2015, 53(2): 85-89.
- [14] 姜义琴. 全膝关节置换术后手术自行锻炼与 CPM 锻炼对膝关节功能的影响 [J]. *中国卫生标准管理*, 2015, (8): 153-153.
- [15] Chang NJ, Lin CC, Li CF, et al. The combined effects of continuous passive motion treatment and acellular PLGA implants on osteochondral regeneration in the rabbit [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3153-3163.

(收稿日期: 2015-05-27; 修回日期: 2015-07-22)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)