

论 著

(基础研究)

挛缩肢体深筋膜中 I 型胶原的表达

薛书生, 笪 虎, 吴 琪, 赵凤朝

【摘要】 目的 研究四肢发生制动性挛缩后, 深筋膜组织内 I 型胶原表达的变化以及肢体不易被拉伸的原因。**方法** 将兔的右侧股骨干造成重叠短缩型骨折作为实验组, 未作处理的左后肢作为对照组。1 个月和 2 个月后分别切取双后肢股部外侧中段深筋膜, 利用天狼猩红染色、免疫组化染色来观察含有 I 型胶原的纤维束的显微形态, 采用 Western blot 法检测 I 型胶原的表达、实时荧光定量 PCR 法测定 I 型胶原相关基因的表达的情况。**结果** 实验组骨折后 1 个月和 2 个月的 I 型胶原纤维长度均明显小于对照组 [(58.3±18.5) μm vs (81.7±13.4) μm, (51.1±16.2) μm vs (83.5±14.6) μm, $P<0.01$]。与对照组比较, 实验组骨折后 1 个月和 2 个月的 I 型胶原表达量明显减少 ($P<0.05$), I 型胶原蛋白 mRNA 的相对表达量明显下降 ($P<0.05$)。**结论** 肢体挛缩后深筋膜内 I 型胶原含量降低并导致肢体软组织延展性下降。

【关键词】 制动性挛缩; 深筋膜; I 型胶原; 延展性; 牵引

【中图分类号】 R34 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2018)06-0566-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.06.002

Research on type-I collagen expression in deep fascia of contracture limbs

XUE Shu-sheng¹, DA Hu², WU Qi², ZHAO Feng-chao¹

(1. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 2. Department of Orthopedics, the 82th Hospital of PLA, Huai'an 223001, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective Research the reason for change of type-I collagen expression change and difficulty of limbs to be stretched in the deep fascia after immobilizing contracture. **Methods** The right femoral shaft of rabbits was introduced to overlapping and shortened fracture as the experimental group. The left thigh without treatment was introduced as the control group. After 1 month and 2 months, the deep lateral fascia of the lateral thigh was cut. Morphology of fibrous bundles containing type I collagen was observed by Sirius red staining and immunohistochemical staining. The expression of type I collagen was detected by Western blot, and the expression of type I collagen-related gene was detected by real-time quantitative PCR. **Results** Whether it was one or two months after the fracture, the fiber bundles containing type I collagen of the deep fascia tissue were significantly shorter [(58.3±18.5) μm vs (81.7±13.4) μm, (51.1±16.2) μm vs (83.5±14.6) μm, $P<0.01$], the expression of type I collagen was significantly reduced ($P<0.05$) and the mRNA transcription level of type I collagen-related genes was significantly decreased ($P<0.05$) in the experimental group with limb contracture compared to that in the control group without intervention. **Conclusion** The content of type I collagen in deep fascia was decreased after limb contracture, leading to the decreased malleability of limb soft tissues.

【Key words】 immobilized contracture; deep fascia; type-I collagen; malleability; traction

0 引 言

基金项目: 淮安市市级科技计划项目 (HAB201731)

作者单位: 221004 徐州, 徐州医科大学 (薛书生、赵凤朝); 223001

淮安, 解放军第八二医院骨科 (笪 虎、吴 琪)

通信作者: 赵凤朝, E-mail: Zhjianzh@sina.com

肢体骨折后, 骨折断端常发生重叠, 肢体短缩。如不能早期恢复肢体的长度, 患肢活动受限, 肌肉组织受到张力变小, 易出现制动性挛缩。经过一段时间后, 行二期手术时, 术中肢体将不易牵拉、

延展,影响骨折断端的复位及术后肢体功能恢复^[1]。为了恢复骨折处正常对位关系,术者常需要做广泛软组织的松解,如骨膜剥离等。骨骼的血供受到破坏,常引起骨折愈合延迟甚至骨不连等后果^[2]。在皮肤、肌肉、肌腱、筋膜等组织中, I 型胶原蛋白是最主要的胶原蛋白,其直径粗大、具有较强的抗张能力^[3-4]。故我们推测软组织不易被拉伸,应与 I 型胶原蛋白表达的改变有密切关系。本研究选取兔后肢股部的深筋膜组织为研究对象,通过研究挛缩肌肉组织的深筋膜表达 I 型胶原的变化,来分析挛缩的肌肉延展性变差的原因,为肢体骨折二期手术前行牵引、维持肢体长度的处理,提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 24 月龄以上健康新西兰大白兔 40 只,雌雄不限,体重 2.0~2.5 kg,均由南京青龙山动物繁育场提供[实验动物许可证号: SCXK(苏) 2017-0011];戊巴比妥钠(上海恒瑞医药有限公司);四甲基联苯胺(DAB)试剂盒(上海基因生物工程有限公司);兔抗鼠单抗、辣根过氧化物标记羊抗兔 IgG(上海远慕生物科技有限公司);总 RNA 提取(Trizol)试剂(omga 公司,美国);DNA 酶消化试剂盒、反转录酶试剂盒(TaKaRa 公司,日本);荧光定量 PCR 分析仪(Applied-Biosystems,美国);苦味酸饱和水溶液(1.22%)(上海远慕生物科技有限公司);天狼猩红(Sirius Red,中国国药集团化学试剂有限公司);偏振光显微镜(Nikon Eclipse 80i)、OLYMPUS CX41 显微镜、CANON DS16275 数码相机。

1.2 方法

1.2.1 兔股骨重叠骨折模型的制作 将每只兔的右后肢分配至实验组,左后肢分配至对照组。肌注麻醉兔后,人为折断右侧股骨干中段,使之完全性骨折。由于肌肉的收缩,骨折断端自动处于重叠短缩状态。兔麻醉清醒后,置于笼内自由活动。实验对动物的处理方法符合国家科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

1.2.2 深筋膜组织的取材 于兔股骨骨折后 1 个月和 2 个月,各自随机选取 20 只兔子。耳缘静脉注射空气处死后,迅速切取双后肢股部外侧中段深筋膜。

1.2.3 深筋膜组织的苦味酸天狼猩红染色 将切

取的标本立即置于 10% 甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋、切片,切片厚约 4 μm ,继而脱蜡至水,浸染于苦味酸天狼猩红溶液 1 h。水洗后苏木精复染核,脱水、透明、封片,于偏振光显微镜下观察。

1.2.4 SP 法免疫组化检测筋膜组织中 I 型胶原表达 将切片脱蜡至水, PBS 冲洗 3 min \times 3 次。用稀释后的高 pH 脱蜡抗原修复液修复后, PBS 冲洗。3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min, PBS 冲洗。滴加山羊血清工作液,室温下孵育 15 min,吸去多余液体。滴加 1:100 兔源抗兔 I 型胶原抗体,孵育 60 min。PBS 冲洗 5 min \times 3 次,滴加生物素标记山羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。PBS 冲洗后,滴加辣根过氧化物标记链霉素卵白素工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。PBS 冲洗后,以 DAB 显色剂显色。水洗后,复染、脱水、透明、封片。切片在显微镜下观察,见 I 型胶原免疫阳性产物为棕黄色颗粒,位于深筋膜细胞膜外。每张切片内任选 5 个视野(800 \times),采用 EMAL200 真彩图像分析系统对免疫组化阳性染色强度进行半定量分析,测量每张切片阳性染色的平均灰度值。

1.2.5 Western blot 方法检测 I 型胶原表达 2 组各取 20 份骨折后 1 个月和 2 个月的新鲜后肢股部中段外侧深筋膜,共 80 份,每份质量约 10 mg 左右。经蛋白裂解液裂解后,提取组织总蛋白。然后加入上缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 30 min。采用十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶分离电泳(PAGE),再将蛋白质转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,使用封闭液封闭过夜。室温下,使用兔抗兔一抗孵育 2 h, TBST 清洗 3 次;羊抗兔二抗孵育 2 h, TBST 清洗 3 次。最后,利用 ECL 显色,曝光。采用 ImageQuant TL 图像分析系统测定 Western blot 条带 A 值,并与内参照 β -actin 的测定值进行比较,计算 A 比值,进行半定量分析。

1.2.6 RT-PCR 法检测 I 型胶原的 mRNA 表达 将 2 组各 40 份质量约 10 mg 左右的新鲜兔后肢股部深筋膜在冰上的低温条件下进行研磨,然后分别加入 0.5 mL Trizol 试剂,按 Trizol 试剂说明书进行 RNA 的提取。cDNA 合成参照反转录试剂盒说明书进行。产物存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。检索 NCBI GenBank 数据库中 I 型胶原全长 mRNA 序列,应用 Primer 5.0 软件,委托 TaKaRa 宝生物工程(大连)股份有限公司合成 I 型胶原基因以及内参 GAPDH 基因的上下游引物,引物序列为 GAPDH (正向: 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3',

下游:5'-CACAATGCCGAAGTGGTCGT-3');I型胶原蛋白引物正向:上游:5'-GGTTACGACTTTGGTTATGA-3',下游:5'-GGAGGGTCTCAATCTGGTTG-3')^[6]。并用 NCBI 中的 Blast 程序进行核酸序列相似性比较和引物特异性分析取反转录产物 cDNA 1 μL 为模板,采用(大连宝生物公司) 2×SYBR Premix DimerEvaser 建立反应体系,将各反应管放入荧光定量 PCR 仪,按下列条件扩增:95℃ 30 s,然后 40 个循环按 95℃ 5 s,60℃ 30 s,读板,以 GAPDH 作为内参照,用 Light Cycler Software Ver. 4.0 分析目的基因的相对表达水平。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件包对所有数据进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 深筋膜组织的天狼猩红染色 深筋膜组织经天狼猩红染色后,在偏振光显微镜下观察,见深筋膜组织内的细胞外基质中 I 型胶原呈鲜艳的猩红色,有较强的双折射光。对照组的 I 型胶原纤维束有明显的定向性,密度稍大、形态偏长,而实验组的定向性较差,密度稍小、形态较短。见图 1。实验组骨折后 1 个月和 2 个月的 I 型胶原纤维长度均明显小于对照组($P < 0.01$),见表 1。

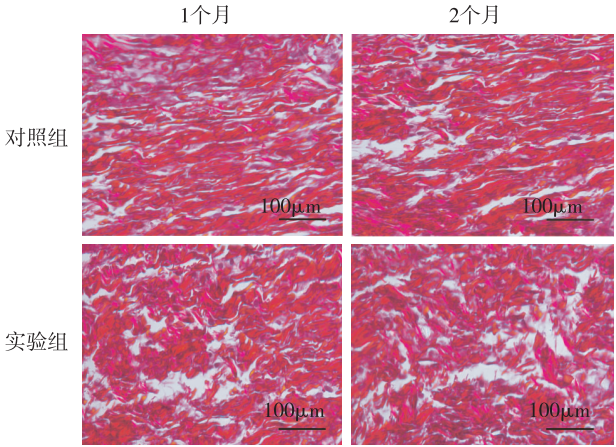


图 1 镜下观察骨折后兔深筋膜内 I 型胶原纤维表达(天狼猩红染色 ×400)

2.2 深筋膜组织的 I 型胶原蛋白免疫组化染色 深筋膜组织的切片经 I 型胶原免疫组化染色后,在显微镜下观察,见细胞内和细胞外的中 I 型胶原蛋白呈棕黄色,实验组的棕黄色染色明显浅于

对照组,见图 2。实验组骨折后 1 个月和 2 个月深筋膜 I 型胶原蛋白免疫组化染色所产生的棕黄色的平均灰度值均明显高于对照组($P < 0.05$),见图 3。

表 1 兔深筋膜组织中 I 型胶原纤维长度对比($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	<i>n</i>	不同时间 I 型胶原纤维长度	
		1 个月	2 个月
对照组	20	81.7±13.4	83.5±14.6
实验组	20	58.3±18.5	51.1±16.2
<i>t</i> 值		2.5	2.9
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

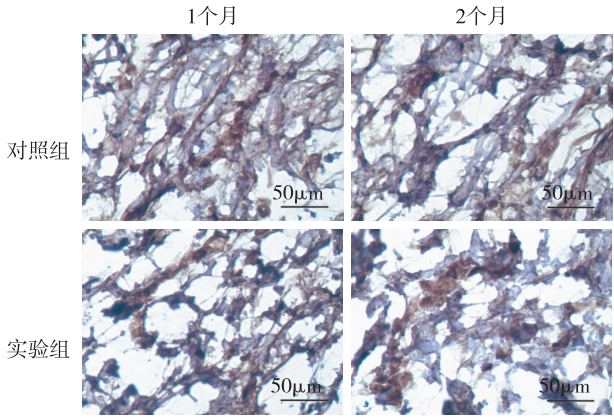
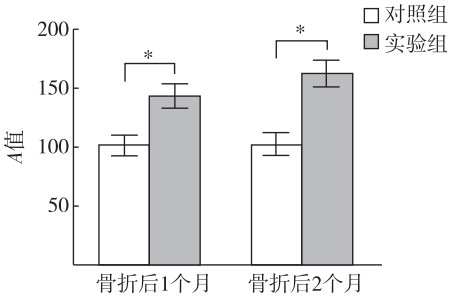


图 2 骨折后兔深筋膜内 I 型胶原蛋白表达(免疫组化染色 ×800)

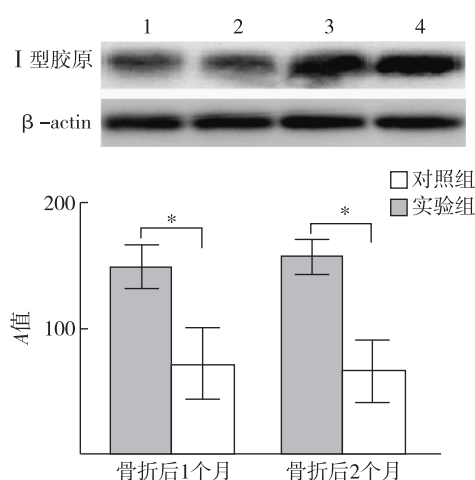


与对照组比较, * $P < 0.05$

图 3 骨折后不同时间兔深筋膜 I 型胶原免疫组化染色灰度值比较

2.3 Western blot 检测 I 型胶原的表达 实验组骨折后 1 个月和 2 个月深筋膜组织中 I 型胶原的表达均显著低于对照组($P < 0.05$),见图 4。

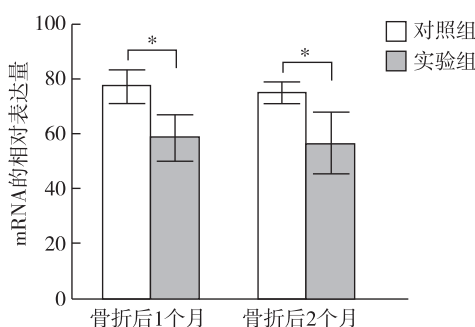
2.4 RT-PCR 法检测深筋膜 I 型胶原蛋白的 mRNA 表达 RT-PCR 结果显示,实验组骨折后 1 个月和 2 个月的 I 型胶原蛋白 mRNA 的相对表达量均显著低于对照组($P < 0.05$),见图 5。



1,2:实验组术后1个月、2个月;3,4:对照组术后1个月、2个月

与对照组比较, * $P < 0.05$

图4 Western blot 法检测骨折后深筋膜内 I 型胶原蛋白表达比较



与对照组比较, * $P < 0.05$

图5 PCR 法检测骨折后深筋膜内 I 型胶原蛋白的 mRNA 的相对表达量比较

3 讨论

胶原蛋白是由三条肽链拧成的螺旋形纤维状大分子蛋白质,作为一种细胞外基质广泛存在皮肤、肌腱、筋膜等组织中,由于这一长且坚韧的特殊构型,使这些组织富有弹性,在保持组织整体功能方面发挥着重要生物力学作用^[7]。胶原蛋白是一个有多达十余种成员的蛋白质家族,其中 I 型胶原蛋白含量最多,约占生物体胶原总量的 90%。I 型胶原蛋白直径较为粗大,主要作用是吸收和传递应力,具有较强的抗张能力^[8-9]。

在对发生四肢制动性挛缩的骨伤患者行 II 期手术时,发现术中软组织抗拉伸能力增加,特别是

深筋膜、肌膜、肌腱等纤维结缔组织发生挛缩、粘连,不易伸展,进而影响到骨折短缩畸形的矫正及术后肢体功能的恢复。由于 I 型胶原蛋白是纤维结缔组织的最主要的抗张力蛋白,故本研究推测,发生制动性挛缩的肢体软组织抗拉伸能力增加,可能与肢体筋膜、肌膜、肌腱等组织的 I 型胶原蛋白表达有着密切相关性。

在本研究中,我们选取兔后肢股部的深筋膜为研究对象,右侧股骨发生重叠、短缩性骨折。骨折 1 个月和 2 个月后,右后肢股部肌肉组织发生制动性挛缩。切取右后肢股部中段外侧深筋膜,并置于实验组,左后肢股部相应部位的深筋膜置于对照组。天狼猩红染色可见实验组的 I 型胶原蛋白组成的纤维束定向性较差,并且长度变短。进行型胶原蛋白免疫组化染色,并用 EMAL200 真彩图像分析系统分析棕黄色的灰度值;采用 Western blot 法检测 I 型胶原蛋白的表达;还采用 RT-PCR 法检测型胶原蛋白 mRNA 的表达。以上结果提示:无论在骨折后 1 个月还是 2 个月,实验组深筋膜的型胶原蛋白的量及其 mRNA 的表达均显著低于对照组 ($P < 0.05$),即挛缩的深筋膜表达型胶原蛋白明显减少。

本研究开始之前,我们认为由于 I 型胶原蛋白具有较强的抗张能力,发生制动性挛缩的肌肉不易被拉伸时, I 型胶原蛋白表达应该增加,而结果却与我们之前的设想截然相反。出现这一个结果应该这是由于制动导致肢体中 I 型胶原蛋白分解代谢和合成失衡所造成的^[10]。但这并未能对筋膜等软组织延展性能下降给出一个合理解释。经过仔细观察与分析,认为在实验前我们混淆了组织的延展性与刚性这两个概念。延展性,即韧性,是指组织受力时发生变形的能力;而刚性,即强度,是指组织在受力时抵抗变形的能力。

有研究表明,对于包括筋膜组织在内的任何弹性材料而言,“胡克定律”和“弹性模量(E)”均能够反映出其最基本的弹性行为方式^[11]。在材料弹性限度内,其应力与应变成正比例关系,即胡克定律,其比值被称为材料的弹性模量(E)^[12-13]。 $E = \sigma / \epsilon$, σ 为应力, ϵ 为应变。目前弹性模量作为软组织力学性能重要参数之一,已经得到较为广泛的研究和测量,例如足部肌肉及肌腱等组织^[16-17]。有研究显示当皮肤等组织中胶原蛋白含量增加时组织的韧性也相应提高,反之,当组织中胶原蛋白含量减小

时组织的韧性也下降^[11,16]。有学者研究表明弹性体韧性与弹性模量(E)成负相关关系,韧性越大的组织拉伸弹性模量越小^[17-18]。由于挛缩肢体筋膜等结缔组织中 I 型胶原蛋白含量下降导致韧性下降,在韧性下降同时组织的拉伸弹性模量(E)增大。根据 $E = \sigma / \varepsilon$ 公式,当收到相同应力 σ (纵向牵引力)作用时,随着组织弹性模量(E)增大,发生应变量 ε (拉伸长度)将变小。因此与新鲜骨折相比,当骨折肢体发生制动性挛缩时,由于胶原蛋白含量减少导致拉伸弹性模量变大,使得软组织难以牵拉、伸展。故而实验中得出的“ I 型胶原蛋白表达下降”的结论,与临床上所见肌肉组织挛缩后延展性能下降的现象,是完全契合的。

发生制动性肌肉挛缩的骨伤患者,软组织延展性差,是多种因素共同作用的,包括皮肤、肌肉纤维、肌膜、肌内膜、肌腱组织的因素,还有其他组织成分表达改变的因素^[19]。本研究只单纯检测了深筋膜组织中 I 型胶原蛋白表达的改变,没有对作用力大小、组织拉伸度等具体量化,具有显著的局限性,是本研究不足之处,有待于我们进一步研究。

综上所述,肌肉组织在发生制动性萎缩时,由于 I 型胶原蛋白的表达变小导致组织弹性模量增加,延展性下降,导致术中肌肉组织不易于被牵拉、伸展。这为临床工作中对于不能早期手术的肢体骨折患者,进行适当牵引,尽量维持肢体长度,减轻肢体挛缩程度,降低 II 期手术难度和减小手术创伤提供了理论依据。

(致谢:感谢解放军第八二医院王连丽老师以及南京总医院马恒辉、张明超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] 漆佳丽, 冯海燕, 梁 朋. I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的真核表达及其与成纤维细胞的作用[J]. *生物技术*, 2016, 26(3): 239-244, 299.
- [4] Tresoldi I, Oliva F, Benvenuto M, et al. Tendon's ultrastructure[J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2013, 3(1): 2-6.
- [5] 程津津, 任萍萍. 学习《关于善待实验动物的指导性意见》后的体会[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(3): 78-79.
- [6] 孙 伟, 艾红军, 张广道, 等. 钙磷涂层处理对镁合金植入体周围软组织 I 型胶原 mRNA 表达影响动物实验研究[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2012, 5(5): 291-294.
- [7] 金长鑫, 吴 琼, 刘 烨, 等. 富血小板血浆凝胶联合脂肪干细胞促进大鼠创面修复的实验研究[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(4): 349-353.
- [8] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(2): 275-286.
- [9] 赵良军, 彭芬芬, 庄 薇, 等. 骨质疏松大鼠膝关节组织总胶原、I 型及 II 型胶原蛋白的含量变化[J]. *中国组织工程研究*, 2011, 15(2): 205-207.
- [10] 赵华昆, 马燕红. 肌腱挛缩机制在分子水平的研究进展[J]. *中国康复*, 2012, 27(2): 127-129.
- [11] 卢天健, 徐 峰. 皮肤的力学性能概述[J]. *力学进展*, 2008, 38(4): 393-426.
- [12] 罗 微, 代 伟, 马 兰, 等. 胡克定律探究实验装置的改进[J]. *物理实验*, 2015(3): 18-20.
- [13] Mortazavian S, Fatemi A. Effects of fiber orientation and anisotropy on tensile strength and elastic modulus of short fiber reinforced polymer composites[J]. *Compos Part B Eng*, 2015, 7(2): 116-129.
- [14] 曹雪倩, 张 章, 王林农. 角膜生物力学测量及其临床应用新进展[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(3): 319-322.
- [15] 边 蕾, 胡海威, 温建民, 等. 足部相关肌肉、肌腱组织材料弹性模量的测定[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(12): 1919-1923.
- [16] 张剑锋, 陈允震, 刘海春, 等. 骨胶原在骨质疏松大鼠中的变化及其与骨生物力学相关性实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(23): 1807-1809.
- [17] 郝建秀, 王海刚, 王伟宏, 等. 利用弹性体增韧木粉/HDPE 复合材料[J]. *复合材料学报*, 2016, 33(5): 976-983.
- [18] Ma L, Wang MZ, Ge XW. Surface treatment of poly(ethylene terephthalate) by gamma-ray induced graft copolymerization of methyl acrylate and its toughening effect on poly(ethylene terephthalate)/elastomer blend[J]. *Radiat Phys Chem*, 2013, 9(10): 92-97.
- [19] 马淑梅, 陈 瑶, 刘 莉. 肌肉萎缩症治疗的研究进展[J]. *世界临床药物*, 2017, 38(11): 790-792, S73-S74.

(收稿日期: 2018-02-01; 修回日期: 2018-05-20)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 吕锋烽)