

膝部韧带损伤愈合机制及其组织工程学治疗进展*

姜大朋¹ 李昭铸¹

随着我国人民生活水平的不断提高,全民健身及体育运动的职业化得到空前的发展,但随着人们体育运动的增加,韧带损伤在肌肉骨骼系统病变中所占的比例亦逐年增高,其中大部分为膝部韧带损伤。90%膝部韧带损伤发生在前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)和内侧副韧带(medial collateral ligament, MCL)。其导致的劳动能力及运动能力的丧失给社会带来了巨大损失。尽管膝部韧带损伤的发生率较高,但其临床处理措施仍存在争议^[1]。为了研究出更新更好的促进韧带愈合的方法,深入了解韧带损伤、愈合、重建的内部机制尤为重要^[2]。本文将膝部韧带损伤愈合机制及治疗韧带损伤的新兴生物学技术做一综述。

1 膝部韧带损伤愈合机制

1.1 正常韧带的生物学特点

韧带由细胞外基质和散在分布于基质间的成纤维细胞构成,成纤维细胞参与损伤韧带的愈合、塑形及韧带对机械因素的生物学适应。细胞外基质形态学表现为网状结构,使得胶原纤维沿韧带长轴排列。胶原纤维的规则排列对于韧带的刚度及韧力极为重要。I型胶原是韧带的重要基质成分,占韧带干重的70%—80%,是参与韧带抗拉伸强度的主要因素,亦是韧带愈合过程中增殖与塑形阶段有效的标志物,所以,在研究韧带与肌腱愈合时,学者们多利用测定I型胶原mRNA的表达来反映愈合情况。III型胶原及V型胶原各占韧带干重的8%及12%,III型及V型胶原参与调节胶原纤维直径。韧带中也含有II、IX、X、XI、XII型胶原。

膝部韧带因其功能的不同,各种基本构成成分也各不相同。兔内侧副韧带的切线模量及抗拉强度较前交叉韧带高,这与内侧副韧带胶原纤维平均直径相对较大、成纤维细胞呈梭形、I型胶原含量较III型胶原含量高有关。Hsieh^[3]研究发现:机械负荷也参与韧带内胶原的基因表达,每种韧带的构成都与其承受的负荷直接相关。

1.2 膝部韧带损伤愈合机制

韧带损伤愈合由以下4个相互联系的阶段组成:出血、炎症反应、细胞增殖及塑形。出血是局部血管受损后的快速反应,Wright^[4]研究发现:韧带受损区的血凝块可以为细胞游走提供暂时的基质,而韧带作为致密结缔组织,血管供应较少,所以受损区域形成的血凝块不明显。在炎症阶段的早期,受损区域出现多形核细胞,巨噬细胞对于调整促进愈合的细胞因子及生长因子所需的微环境极为重要,是调整愈合级联反应的关键。炎症阶段的后期即出现细胞增殖,表现为成纤维细胞增殖、黏蛋白基质及胶原产生,III型胶原增多尤为明显,随后,I型胶原及基质明显增多。该阶段表现为合成代谢与分解代谢之间的动态平衡,同样受多种细胞因子的调控,持续数周。塑形是一个缓慢而复杂的过程,是由瘢痕组织向

正常韧带组织转变的过程,表现为胶原纤维的重新排列、成熟、胶原基质增加,该阶段可持续数年。愈合后韧带的构成成分改变包括:蛋白聚糖增多、V型胶原所占比例增高、成熟胶原交联减少。通常,韧带愈合处胶原纤维数目增多,但胶原纤维直径较正常韧带小^[5]。韧带愈合阶段可以持续数月甚至数年,是胶原纤维逐渐成熟的过程,而胶原纤维的成熟对于恢复韧带的刚度及韧力至关重要。

由于MCL对保持膝关节稳定性具有重要作用,并且具有自愈能力,所以常被用来研究韧带损伤愈合。尽管MCL损伤后可以自愈,但愈合后韧带的超微结构及生化构成发生了很大改变,即使在韧带愈合后若干年内,其生物力学特性仍较正常韧带差。目前,胶原含量、胶原交联、胶原排列的改变被认为是影响愈合后韧带生物力学特性的三大因素。在韧带愈合的早期,III型胶原及V型胶原含量升高,愈合6周后,总胶原含量及羟基吡啶交联密度较正常韧带低。Boorman^[6]曾利用MCL进行韧带损伤愈合的实验研究,通过实验发现:MCL愈合的速度、质量及愈合过程中韧带生物学改变与治疗措施相关,单纯MCL损伤保守治疗较手术治疗的效果好。ACL断裂后常引起膝关节不稳定,重建ACL是解决问题的根本方法,而术后康复是确保手术效果、实现术后良好膝关节功能的保证^[7]。

2 促进韧带愈合的生物学技术

为了提高韧带愈合质量、恢复愈合后韧带的正常功能,基于生物学、生物工程学的组织工程学方法等新兴的生物学技术已被应用到韧带损伤的治疗中,如各种生长因子的应用、转基因技术、细胞治疗技术及生物支架材料的应用。

2.1 生长因子

生长因子通过与细胞表面的特异性受体结合,从而激活定向生物反应。Dahlgren^[8]对韧带愈合时转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)的表达情况进行了研究。结果发现:在MCL损伤后1周,TGF- $\beta 1$ 的表达水平达高峰,而IGF-I的表达高峰出现较晚,约在损伤后4周。目前已发现转化生长因子、胰岛素样生长因子等在韧带或肌腱愈合中起重要作用^[9-10]。Marui等^[11]对体外培养MCL的成纤维细胞应用TGF- $\beta 1$,结果发现可以使胶原合成增加1.5倍。Spindler等^[12]研究发现,韧带损伤后6周内,应用TGF- $\beta 2$ 可以使I型胶原合成增加,从而促进了愈合,但股骨-内侧副韧带-胫骨复合体(femur-MCL-tibia complex, FMTC)的生物力学

* 基金项目:黑龙江省教育厅海外学人科研(合作)项目(1054HQ019);教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2004]527号)

1 哈尔滨医科大学附属第二医院小儿外科,150086

作者简介:姜大朋,男,博士,住院医师

收稿日期:2006-04-17

特性恢复程度有限,愈合后的 MCL 刚度增加,但极载负荷无改善。TGF- β 由伤口愈合处脱粒血小板释放,对愈合处瘢痕的成熟及愈合后生物力学恢复有至关重要的作用,它是单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞及成纤维细胞的趋化因子,并且对肉芽组织形成具有显著的刺激作用。

血小板衍生因子(PDGF)在韧带损伤愈合早期起重要的作用,韧带损伤后第 2-6 周给予 PDGF 可以促进 FMTc 生物力学特性的恢复。有学者在韧带损伤局部给予 PDGF,结果证明其可以促进韧带生物力学特性的恢复^[13]。

两种或多种生长因子对促进韧带愈合具有协同作用。局部联合应用 TGF- β 1 与 EGF 可以明显促进自体腓腱移植的修复^[14]。而 PDGF 联合应用 TGF- β 2 对 FMTc 的愈合作用与单独应用 TGF- β 2 相比无差异^[12]。韧带的愈合过程极为复杂,生长因子促进韧带愈合的机制仍有待于进一步研究。

2.2 基因治疗

转基因技术利用逆转录病毒、腺病毒及脂质体作为载体将 DNA 片段引入韧带愈合处,通过促进或抑制某种基因的表达来提高韧带愈合的质量。Hildebrand^[15]研究发现:在韧带内腺病毒载体较逆转录病毒载体更能有效的表达。利用 LacZ 基因作为标记基因,腺病毒载体在韧带内可以持续表达 6 周。以腺病毒作为载体的 TGF- β 1 基因转移可以促进韧带细胞增生和基质形成,并促进韧带断裂处 I 型胶原及 III 型胶原的沉积^[16]。

反义基因疗法利用寡核苷酸降低影响韧带愈合蛋白的表达,被认为是一种很有应用前景的方法。这种疗法经 Nakamura^[17]实验证实可以有效地降低 MCL 愈合处核心蛋白多糖的产生,从而使胶原纤维直径增加,同时使愈合后 MCL 抗张力增加 85%。利用反义基因疗法可以降低 MCL 愈合处 III 型胶原及 V 型胶原的高水平表达。Shimomura 等^[18]将反义基因疗法用于体外实验,结果证实上述 2 种胶原的表达可降低约 40%。成纤维细胞是通过吸收寡脱氧核苷酸来降低 V 型胶原蛋白的表达。反义基因疗法作为一种新的、有前景的促进韧带愈合的方法,相信会得到更广泛的研究和利用。

2.3 细胞治疗

利用间充质祖细胞 (mesenchymal progenitor cells, MPCs) 或间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的细胞治疗在组织工程领域具有广阔的应用前景, MPCs 或 MSCs 可以分化成不同类型的细胞,包括成纤维细胞。MSCs 来源于骨髓,无论是否经过基因转移,被移植到受体组织内仍保留它的分化潜能。Awad^[19] 研究发现:移植到大鼠 MCL 损伤处的 MSCs 可以分化为成纤维细胞,3d 后这些细胞可移行到韧带的非受损区域。MSCs 可以明显改善韧带愈合质量,包括负载结构的特性及新生胶原纤维的排列属性均优于对照组。MSCs 不但可以直接促进韧带愈合,还可以被看做是一种向损伤韧带传递治疗性作用分子的载体,从而提高愈合的速度和质量^[20]。

2.4 生物支架

利用藻酸盐、壳聚糖、胶原、透明质酸酶可以制成多种膜或凝胶作为生物支架^[21]。Musahl 等^[22]研究发现:猪小肠黏膜下层 (small intestinal submucosa, SIS) 可以促进韧带的愈合。SIS 主要由胶原构成,并含有少量的细胞因子及生长因子,如

FGF、TGF- β 。它是一种可吸收的生物支架,能够为韧带愈合提供必需的细胞和营养成分,并能够为塑形提供胶原结构。

Musahl 等^[21]研究亦发现:SIS 可以增强愈合后韧带的生物力学特性,优化韧带愈合的生物化学构成。以单层 SIS 用于治疗兔 MCL 6mm 宽损伤的缝隙,于术后第 12、26 周进行检测,FMTc 的刚度较对照组增高 56%,术后 12 周极载负荷增加 2 倍,愈合 MCL 的切线模量增加 50%,并且该效应持续增加至 26 周。SIS 治疗组 MCL 组织学表现为:胶原纤维密度增加、胶原纤维排列规则、细胞数增加,胶原纤维直径增加的同时 V 型胶原比例减低。实验结果提示,应用 SIS 治疗韧带损伤的组织工程技术有广泛的前景。

2.5 机械因素

机械因素可以影响细胞的生物学行为及胶原纤维的构造,Wang 等^[23]在微型凹槽内培养成纤维细胞,并对其进行机械性拉伸来模仿完整肌腱承受拉力的环境,结果发现成纤维细胞具有沿拉力方向排列的趋势,同时胶原基质产生良好。因此,恰当利用机械因素的组织工程学方法对韧带生物力学特性恢复具有较好效果。

3 未来的研究方向

膝部韧带作为机体的一部分,其生物力学、生物化学特性的研究已取得了很大进步,韧带的拉力、黏滞弹性特征、生物学因素及基础实验研究有望推动韧带损伤愈合研究领域。有关韧带断裂后愈合过程及韧带替代治疗方面的理论将成为评价韧带修复重建效果的基础。生长因子、基因治疗、生物支架组织工程等新兴的生物学方法使得研究韧带优质愈合的内在分子及细胞学反应机制成为可能。Woo 等^[2]推测,将机械刺激与反义基因疗法相结合,并应用到生物支架组织工程,必将给韧带愈合的研究带来新前景。实际上,将体外实验的结论应用到在体实验,进而应用到临床是一个漫长的过程。生物力学与其他生物学科相结合的方法可能对韧带愈合有更好的疗效。当然,达到这些目标需要多学科、跨学科的协作。只有这样,韧带损伤的患者才能快速恢复,重新投入到日常生活和体育运动中。

参考文献

- [1] 伍刚,张长杰,汤长发.膝关节前交叉韧带损伤与康复[J].中国康复医学杂志,2004,19(2):154—155.
- [2] Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, et al. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair[J]. J Biomech, 2006, 39(1):1—20.
- [3] Hsieh AH, Sah RL, Paul Sung KL. Biomechanical regulation of type I collagen gene expression in ACLs in organ culture [J]. J Orthop Res, 2002, 20(2):325—331.
- [4] Wright RW, Parikh M, Allen T, et al. Effect of hemorrhage on medial collateral ligament healing in a mouse model [J]. Am J Sports Med, 2003, 31(5):660—666.
- [5] Plaas AH, Wong-Palms, Koob T, et al. Proteoglycan metabolism during repair of the ruptured medial collateral ligament in skeletally mature rabbits [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 374(1):35—41.
- [6] Boorman RS, Shrive NG, Frank CB. Immobilization increases the vulnerability of rabbit medial collateral ligament autografts to creep[J]. J Orthop Res, 1998, 16(6):682—689.
- [7] 葛杰,周谋望,敖英芳,等.关节镜下膝前交叉韧带重建术后的康复[J].中国康复医学杂志,2003,18(12):743—746.

- [8] Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions [J]. J Orthop Res, 2005, 23(1):84—92.
- [9] Fu SC, Wong YP, Cheuk YC, et al. TGF- β 1 reverses the effects of matrix anchorage on the gene expression of decorin and procollagen type I in tendon fibroblasts [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 431(2):226—232.
- [10] Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, et al. Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro [J]. J Hand Surg [Am], 2005, 30(3):441—447.
- [11] Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, et al. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts [J]. J Orthop Res, 1997, 15(2):18—23.
- [12] Spindler KP, Murray MM, Detwiler KB, et al. The biomechanical response to doses of TGF- β 2 in the healing rabbit medial collateral ligament [J]. J Orthop Res, 2003, 21(2):245—249.
- [13] Weiler A, Forster C, Hunt P, et al. The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Am J Sports Med, 2004, 32(4):881—891.
- [14] Yasuda K, Tomita F, Yamazaki S, et al. The effect of growth factors on biomechanical properties of the bone-patellar tendon-bone graft after anterior cruciate ligament reconstruction: a canine model study [J]. Am J Sports Med, 2004, 32(4):870—880.
- [15] Hildebrand KA, Deie M, Allen CR, et al. Early expression of marker genes in the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments: the use of different viral vectors and the effects of injury [J]. J Orthop Res, 1999, 17(1):37—42.
- [16] Pascher A, Steinert AF, Palmer GD, et al. Enhanced repair of the anterior cruciate ligament by in situ gene transfer: evaluation in an in vitro model [J]. Mol Ther, 2004, 10(2):327—336.
- [17] Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, et al. Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo [J]. J Orthop Res, 2000, 18(4):517—523.
- [18] Shimomura T, Jia F, Niyibizi C, et al. Antisense oligonucleotides reduce synthesis of procollagen alpha1 (V) chain in human patellar tendon fibroblasts: potential application in healing ligaments and tendons [J]. Connect Tissue Res, 2003, 44(3):167—172.
- [19] Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, et al. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite [J]. J Orthop Res, 2003, 21(3):420—431.
- [20] Watanabe N, Woo SL, Papageorgiou C, et al. Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation [J]. Microsc Res Tech, 2002, 58(1):39—44.
- [21] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications [J]. Biomaterials, 2003, 24(24):4337—4351.
- [22] Musahl V, Abramowitch SD, Gilbert TW, et al. The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament—a functional tissue engineering study in rabbits [J]. J Orthop Res, 2004, 22(1):214—220.
- [23] Wang JH, Jia F, Gilbert TW, et al. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix [J]. J Biomech, 2003, 36(1):97—102.

(上接 898 页)

的一个主要原因。尽管关于肌力训练的效果仍存在很多问题,大量研究表明肌力训练是可行的,不会增加痉挛。Damiano 等^[1]建议根据特别训练原则抗阻训练应在更多的功能位上进行,这保证步行中特别肌群功能性肌力训练的益处。Darrah 等^[15]报道肌力训练计划对于参与的残疾个体有心理作用,可以改善他们对残疾的态度和自信心。这是一个易于理解、合适的计划,参与者将其作为社交工具而非医疗活动。结果显示他们对于外表的主观自我感觉有很大不同。鼓励性的训练应成为自我照顾而非医疗照顾的一部分,从而激发内在的训练动力。

4 结论

功能性下肢肌力训练计划能改善脑瘫患儿的运动功能,提高患儿的转移能力,增加关节活动范围,改善步行能力,没有增加痉挛和异常的运动模式的不良影响。

参考文献

- [1] Mayston MJ. The Bobath concept—evolution and application [C]. Movement disorders in children. Basel: Karger, 1992.
- [2] Kabat H, Knott M. Proprioceptive facilitation therapy for paralysis [J]. Physiotherapy, 1954, 40(6):171—176.
- [3] Fowler EG, Ho TW, Nwigwe AI, et al. The effects of quadriceps femoris muscle strengthening exercises on spasticity in children with cerebral palsy [J]. Phys Ther, 2001, 81(6): 1215—1223.
- [4] 陈立典, 郭晓琳, 陶静, 等. 针刺治疗结合肌力训练对脑卒中后偏瘫患者步行能力的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(2): 136—139.
- [5] 林庆. 全国小儿脑瘫座谈会纪要 [J]. 中华儿科杂志, 1987, 27(3):162—163.
- [6] 陈哨军, 李继海, 刘敦厚. 痉挛性脑瘫患者感觉和运动障碍的特点及其原因 [J]. 中国康复医学杂志, 2000, 15(6): 353—356.
- [7] Carr JH, Shepherd RB. Neurological rehabilitation: optimising motor performance [M]. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. 补页码.
- [8] Olney SJ, MacPhail HE, Hedden DM, et al. Work and power in hemiplegic cerebral palsy gait [J]. Phys Ther, 1990, 70(7): 431—437.
- [9] Unnithan VB, Dowling JJ, Frost G, et al. Cocontraction and phasic activity during GAIT in adolescents with cerebral palsy [J]. Electromyogr Clin Neurophysiol, 1996, 36(8): 487—494.
- [10] Campbell SK. Physical therapy for children [M]. Philadelphia: WB Saunders, 1995. 489—524.
- [11] Damiano DL, Vaughan CL, Abel MF. Muscle response to heavy resistance exercise in adolescents with cerebral palsy [J]. Dev Med Child Neurol, 1995, 37(8): 731—739.
- [12] Blundell SW, Shepherd RB, Dean CM, et al. Functional strength training in cerebral palsy: a pilot study of a group circuit training class for children aged 4—8 years [J]. Clinical Rehabilitation, 2003, 17(1): 48—57.
- [13] Gage JR. The role of gait analysis in the treatment of cerebral palsy [J]. Pediatr Orthop, 1994, 14(6):701—702.
- [14] Kramer JF, MacPhail HE. Relationships among measures of walking efficiency, gross motor ability, and isokinetic strength in adolescents with cerebral palsy [J]. Pediatr Phys Ther, 1994, 6(2):3—8.
- [15] Darrah J, Wessel J, Nearingburg P, et al. Evaluation of a community fitness program for adolescents with cerebral palsy [J]. Pediatr Phys Ther, 1999, 11(5): 18—23.