

· 基础研究 ·

鸡趾屈肌腱鞘内损伤修复后的愈合和 bFGF 的表达*

盛加根¹ 曾炳芳¹ 姜佩珠¹ 范存义¹

摘要 目的:了解鸡趾屈肌腱鞘内损伤修复后碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达及其与肌腱愈合的关系。**方法:**将 36 只来亨鸡的右足第 3 趾趾屈长肌腱切断后缝合并重新覆以腱鞘,于术后不同时间点切取标本(每个时间点 6 只),另取 6 只未行手术处理鸡的肌腱标本作为对照。将标本行组织学检查,并用 RT-PCR 和免疫组化方法测定肌腱 bFGF 的表达。**结果:**肌腱修复后断端先出现炎细胞浸润,接着成纤维细胞聚集并分泌胶原,最后胶原纤维重新塑形。这些细胞活动在腱实质比腱鞘、腱外膜出现迟且弱。bFGF 在对照组肌腱仅出现低水平表达,而在实验组肌腱各个时间点均明显上调;腱鞘、腱外膜的表达明显高于腱实质。**结论:**bFGF 参与了鸡趾屈肌腱损伤修复的愈合过程。

关键词 肌腱; 损伤; 碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号: R687.2 R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-04-0310-03

The tendon healing process and bFGF expression after insheathed injury of chicken flexor digitorum tendon/SHENG Jiagen,ZENG Bingfang,JIANG Peizhu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007,22(4):310—312

Abstract Objective: To investigate bFGF expression and the relationship with the tendon healing process after insheathed chicken flexor digitorum tendon injury. **Method:** The right 3rd flexor digitorum longus tendons of thirty six Leghorn chickens were transected, resutured, and covered with the sheath. Specimens were obtained postoperatively at various time points(n=6, at each time point). The control tendons were harvested without operation (n=6). Histological observation was carried out. bFGF expressions in tendon were detected by RT-PCR and immunohistochemical methods. **Result:** After tendon injury, inflammatory cells infiltrated at the suture line at the beginning, then fibroblasts congregated and secreted collagen, the collagen fibers were reshaped at last. These cell activities in parenchyma appeared later and were weaker than those in sheath and epitenon. bFGF expression was very low in tendons of control group, but high in those of experimental groups at different time points. The bFGF expressions in sheath and epitenon were higher than in parenchyma. **Conclusion:** bFGF plays a critical role in the healing process of chicken flexor digitorum tendon following injury.

Author's address Department of Orthopaedics, Shanghai Sixth People's Hospital, Jiaotong University, Shanghai, 200233

Key words tendon; injury; basic fibroblast growth factor

屈肌腱在腱鞘内损伤后,腱鞘、腱外膜和腱实质内成纤维细胞分裂增殖并向断端迁移,分泌胶原连接断端,同时毛细血管向断端再生,在完成肌腱修复的同时也造成了粘连。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)由于能显著促进成纤维细胞的分裂增殖以及血管生成这两个在组织创伤修复中非常重要的过程而受到关注。因此,研究 bFGF 在屈肌腱鞘内损伤愈合过程中的表达及变化规律,将有助于了解鞘内肌腱的愈合和粘连形成的分子生物学机制,为提高肌腱损伤的治疗效果提供借鉴。

只,体重 3—3.5kg,按术后第 1、3、7、14、28、56d 6 个时间点随机分配,每个时间点 6 只,另 6 只不做手术作为正常对照。

1.2 建立屈肌腱鞘内损伤修复的动物模型

氯胺酮(ketamine 30mg/kg)肌肉注射麻醉,在无菌条件下,于右足第三趾作跖侧纵切口,打开 A2—A4 滑车之间的鞘管。横行切断趾深屈肌腱,采用 5—0 单丝尼龙线做改良 Kessler 缝合,将切开的腱鞘重新覆盖于肌腱表面,用 5—0 编织缝线缝合皮下组织和皮肤。术后用石膏管型固定鸡爪成拳击手套状。分别于术后第 1、3、7、14、28、56d 取吻合口两侧

1 材料和方法

1.1 动物及分组

成年雄性来亨鸡(由上海家禽育种中心提供)42

* 基金项目:上海市创伤骨科临床医学中心基金项目(ZX01A07)

1 上海交通大学附属第六人民医院骨科,上海,200233

作者简介:盛加根,男,副主任医师,博士

收稿日期:2006-07-24

0.5cm 范围内的腱鞘和肌腱组织, 正常对照组则切取相应部位的正常腱鞘和肌腱组织。所有用于逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测的标本均立即冻存于 -70°C 液氮中备用, 其它标本以 10%中性福尔马林固定用于免疫组化及组织学检测。

1.3 bFGF 的 RT-PCR 检测

RT-PCR 操作步骤按文献进行。bFGF 引物序列如下: 上游引物 5'-AGTATCAATCAAAGGCGTAAG-3'下游 5'-AGTGCCACATACCAATCAGAG-3', 扩增片段长度为 168bp, 扩增条件为: 94°C , 3min; 94°C 1min, 54°C 1min, 72°C 1min 30 个循环; 72°C 延伸 5min。GAPDH 的引物序列为: 上游 5'-AAGGCTGTGGCAAGG-3' 下游 5'-GGAGATTCAGTGTGGTGGG-3'; 扩增片段的长度为 469 bp, PCR 扩增条件为: 95°C , 5min; 95°C 30s, 53°C 15s, 72°C 30s 30 个循环; 72°C 延伸 5min。PCR 产物电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统扫描并获取灰度值, 以 bFGF/GAPDH 比值作为衡量 bFGF 表达水平的指标。

1.4 bFGF 的免疫组化检测

常规石蜡包埋, 做肌腱纵面切片, 采用兔抗 bFGF 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司) 行 S-P 免疫组化染色, 设空白对照。阳性染色颗粒为棕黄色。利用计算机图像系统(ImagePro-Plus 4.5)在高倍视野($400\times$)下分别测量吻合口附近 1mm 范围内腱鞘、腱外膜、腱实质内阳性细胞及总细胞数目, 每个部分随机取 5 个视野, 计算出阳性百分比。

常规 HE 染色观察肌腱各部分的细胞活动及肌腱的愈合和粘连情况。

1.5 统计学分析

采用 SAS 6.12 统计软件包进行单因素方差分析, 组间以 SNK 法进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 光学显微镜下组织学观察

术后第 1、3d 肌腱断端局部组织水肿、充血和炎细胞浸润, 肌腱胶原纤维间可见大量红细胞。第 7d 肌腱局部充血、水肿减轻, 胶原纤维散裂, 炎细胞向胶原纤维间浸润, 并见多核吞噬细胞活跃, 腱鞘、腱外膜毛细血管增生, 成纤维细胞增殖活跃, 但腱实质细胞未见增殖; 肌腱断端间未见明显的新生胶原形成。第 14d 肌腱的炎症反应基本消退, 腱鞘、腱外膜细胞增生仍然活跃, 腱实质也可见十分活跃的细胞增殖, 这三个部位的细胞在增殖的同时向肌腱断端迁移, 连接断端, 细胞间可见排列紊乱的胶原成分和

大量毛细血管。第 28d 肌腱的腱鞘、腱外膜细胞数有所减少, 但腱实质细胞数量变化不明显。肌腱断端完全由大量新生的、排列不规则的胶原纤维所连接, 毛细血管减少, 肌腱与周围组织粘连明显(图 1, 见前置彩色插页 9)。第 56d 肌腱的腱鞘、腱外膜细胞数较前明显减少, 腱实质细胞数量也有下降, 细胞变成细长形, 核变小, 排列也较规律。肌腱断端胶原纤维的排列方向趋于一致, 与肌腱纵轴平行, 肌腱与周围组织的粘连较前减轻。

2.2 bFGF mRNA 的表达

见图 2。对照组肌腱 bFGF mRNA 呈低水平表达, 而实验组肌腱在术后第 1d 即明显升高, 而且随着时间的推移, 表达的量逐渐增加, 至术后第 7d 达到高峰, 随后开始逐渐降低, 但在术后第 56d 仍维持在一个较高的水平。实验组的所有时间点与对照组之间 bFGF mRNA 表达量的差异有非常显著性意义 ($P<0.01$)。

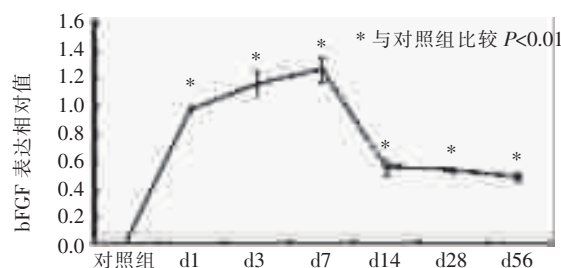


图 2 对照组及实验组屈肌腱 bFGF mRNA 表达

2.3 bFGF 蛋白的表达

免疫组化结果显示, 对照组肌腱的腱鞘、腱外膜及腱实质均有少量 bFGF 蛋白表达, 而实验组肌腱的相应部位在术后第 1d 即出现散在的免疫染色, 随着时间的推移染色逐渐变多加深; 腱鞘、腱外膜在术后第 7d 时最明显, 腱实质则在第 14d 达高峰, 以后逐步减弱, 但在第 56d 染色仍较明显。实验组的所有时间点与对照组肌腱相应部位之间表达量的差异有非常显著性意义 ($P<0.01$)。在所有实验组的标本中, 腱鞘与腱外膜间的阳性细胞百分比差异无显著性意义 ($P>0.05$), 但二者均明显高于腱实质 ($P<0.01$)。

3 讨论

bFGF 由于在组织修复中发挥多种生物学活性而受到广泛关注。目前, 在肌腱方面对 bFGF 的研究大多集中在体外^[1-4], 对屈肌腱正常愈合过程中 bFGF 表达的研究很少。Tsubone 等^[5]运用免疫组化方法检测屈肌腱损伤 10d 内两个时间点的 bFGF 表达, 发现仅在修复部位周围的炎性细胞中出现阳性表达, 而腱细胞则为阴性。但 Chang 等^[6]采用原位

杂交技术定性观察鞘内肌腱愈合过程不同时间点腱鞘、腱实质 bFGF mRNA 的表达,发现炎性细胞及成纤维细胞均可见阳性表达;与正常肌腱相比,术后第 1—56d 间所有时间点腱鞘、腱实质的阳性细胞数均明显增加,其中以术后第 7d 最多;实验组肌腱腱鞘的阳性细胞数要明显多于腱实质。本研究采用 RT-PCR 定量检测 bFGF mRNA 在细胞内的表达强度,并结合免疫组化、组织学手段研究肌腱愈合过程中的 bFGF 表达规律、组织学变化和两者之间的关系;另外,由于腱外膜在鞘内肌腱的愈合过程中起着十分重要的作用,因此我们将其与腱实质分开进行研究。研究结果与 Chang 等的相似:肌腱修复术后自始至终 bFGF 的表达均明显增强,腱鞘的表达高峰在术后第 7d,所有时间点腱鞘的表达强度也明显高于腱实质。但本研究中腱实质的表达高峰在术后第 14d,似乎与 Chang 等的研究结果不同,推测可能与他们的“腱实质”包含了本研究的“腱外膜”和“腱实质”两部分有关:由于腱外膜的表达强度明显高于腱实质,表达高峰出现也较早(在本研究中为术后第 7d),因此,两个部分混合检测使 Chang 等研究中腱实质的表达高峰出现在术后第 7d。

本研究的组织学结果显示肌腱的愈合过程大致可分炎症反应期(早期)、胶原和纤维形成期(中期)、塑形期(中后期),而 bFGF 的表达则为:术后第 1d 立即升高,到达高峰后逐步下降,但直到第 56d 仍维持在较高的水平。由于组织正常愈合过程中局部生长因子的表达水平早期主要受创面浸润的细胞、中后期主要受发挥修复作用的细胞的影响^[7],因此,我们推测肌腱修复后早期 bFGF 表达的增高主要与修复部位的炎性细胞的聚集密切相关;到中期,炎性细胞分泌的 bFGF 和在 bFGF 刺激下成纤维细胞的自分泌形成了表达的高峰;到中后期,随着炎症的消退,表达程度有所下降,由于成纤维细胞生成胶原的活动伴随着肌腱修复的整个过程,只不过在程度上有所减弱,因此直到第 56d 仍可见到较明显的表达。

在本研究中,实验组所有肌腱的腱外膜细胞 bFGF 表达均与腱鞘细胞无差异,提示腱外膜细胞在肌腱愈合过程中扮演着与腱鞘细胞同样重要的角色。虽然腱实质的 bFGF 表达程度明显低于腱鞘和

腱外膜,表达高峰出现也较迟,但是其表达的下降过程要慢于腱鞘和腱外膜,以致在肌腱愈合的中后期,它们之间表达上的这种差距较早期要小;组织学观察则发现腱实质内的成纤维细胞增殖要迟于腱鞘和腱外膜,但当增殖达到高峰后,其数量随时间推移的下降也比它们缓慢,这些都意味着在肌腱愈合的早期腱鞘、腱外膜细胞起着主要的作用,而在肌腱愈合的中后期,腱实质细胞的作用得到了加强。结合术后第 56d 肌腱的粘连程度较第 28d 有所减轻,间接证明了腱鞘、腱外膜细胞的活动更容易造成肌腱粘连这一观点。我们认为腱鞘、腱外膜和腱实质细胞 bFGF 表达上这种差别的形成可能与前二者比后者具有更丰富的血液循环,含有更多的成纤维细胞有关。良好的血运有利于炎性细胞在腱鞘和腱外膜的迅速聚集并分泌 bFGF,而大量的成纤维细胞则是 bFGF 高表达的物质基础,两者的共同作用使局部组织内 bFGF 维持在较高浓度状态,而在后者的反作用下,这两个部位的炎性细胞和成纤维细胞表现出高表达状态。而腱实质的情况则正好相反,因此它的 bFGF 表达强度弱于前二者,表达高峰也相应推迟。由于肌腱内部的胶原分泌和塑形要持续相当长一段时间,因此腱实质内 bFGF 表达的下降比较缓慢。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Tang JB, Xu Y, Wang XT. Tendon healing in vitro: activation of NIK, IKKalpha, IKKbeta, and NF- kappaB genes in signal pathway and proliferation of tenocytes [J]. Plast Reconstr Surg, 2004,113(6):1703—1711.
- [3] Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing [J]. J Hand Surg [Am], 2004,29(4):551—563.
- [4] Costa MA, Wu C, Pham BV, et al. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation [J]. Tissue Eng, 2006,12(7):1937—1943.
- [5] Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, et al. Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo [J]. Ann Plast Surg, 2004,53(4):393—397.
- [6] Chang J, Most D, Thunder R, et al. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression [J]. J Hand Surg [Am], 1998,23(6):1052—1058.
- [7] Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound [J]. J Surg Res, 1992,52(4):389—394.