

局部注射血小板源性生长因子 对大鼠跟腱末端病组织结构的影响

姜苗苗, 谭勇海, 李佳林, 于海勇

(山东省文登整骨医院, 山东 文登 264400)

摘要 目的:观察血小板源性生长因子对末端病末端组织结构的影响,为血小板源性生长因子治疗末端病提供实验基础和理论依据。**方法**:对筛选后的大鼠随机分成3组(I、II、III)组,其中I组为血小板源性生长因子注射组,II组为生理盐水注射组,III组为对照组。将I、II组大鼠放入电刺激跳跃造模装置里,通交流电4次·min⁻¹,通电电压由小逐步加大,直到大鼠出现有效跳跃为止,共持续20min,休息10min,再持续20min。每天训练1次,每周6次,周日休息,持续4周。实验过程中常规纯鼠料喂养。每周分别对血小板源性生长因子组和生理盐水组大鼠跟腱部位注射0.2mL血小板源性生长因子和生理盐水,其注射时间均为大鼠休息日,对照组不做任何处理,造模4周后处死大鼠,进行取材,组织切片制作,HE染色。显微镜下观察每个样本跟腱末端、纤维软骨区、跟骨区、腱骨界面、腱围共5个区域病理变化。**结果**:血小板源性生长因子注射组大鼠跟腱末端区发生了轻微的病理性变化。生理盐水注射组大鼠跟腱末端区发生了明显的病理性变化。对照组大鼠跟腱末端区未发生明显的病理性变化。**结论**:注射血小板源性生长因子可以不同程度的有效地预防大鼠跟腱末端病的发生。

关键词 生长因子 血小板源性 末端病 局部注射

Research on the influence of local injection with platelet-derived growth factor on tissue structure of rat Achilles tendon's enthesiopathy JIANG Miao-miao*, TAN Yong-hai, LI Jia-lin, YU Hai-yong. *Wendeng Orthopedic Hospital, Wendeng 264400, Shandong, China

ABSTRACT Objective:To observe the effects of platelet-derived growth factor on structure of tissue of terminal end disease to provide experimental and theoretical basis for its application in this disease. **Methods:**Screened rats were randomly divided into three groups, platelet derived growth factor injection group(Group I), saline injection group(Group II), control group(group III). Put Group I and Group II into electrical stimulation jumping molding device, alternating current is 4 min⁻¹, power voltage was gradually increased until the rats appeared effective jump with duration of 20 min followed with 10 min rest and 20 min alternating current again. Training was proceed once every day and 6 times per week with Sunday rest for 4 weeks. The experimental processed in conventional pure rat feed. Platelet derived growth factor group and saline group were applied with 0.2 ml each weekend on rat Achilles tendon while the control group without any treatment, modeling rats were sacrificed after 4 weeks, material, tissue section, HE staining were carried out. Microscopic observe each sample of Achilles tendon terminal, fibrocartilage zone, calcaneal tendon area, articular surface of bone, tendon in a total of 5 regional pathological changes. **Results:**Platelet derived growth factor injection group rat Achilles tendon terminal region has undergone minor pathological changes. Saline injection group rat Achilles tendon terminal region had obvious pathological changes. Control rats Achilles tendon terminal area without obvious pathological changes. **Conclusion:**Injection of platelet derived growth factor may vary in the degree of effective prevention of rat Achilles tendon terminal disease.

Key words Growth factor;Platelet-derived;Tendinosis local;Injection

末端病是指肌腱、韧带、关节囊纤维层在骨上附着部分发生劳损性变性而引起的疾患。末端病的主要病理表现为:潮线涨潮;细胞明显增生;跟骨骨髓腔内脂肪减少,跟骨内的软骨岛明显骨化;腱围组织水肿增厚,炎性细胞浸润,异化骨形成等^[1]。随着分子生物学的发展,细胞因子在实验和临床的研究越来越多,有研究证实了细胞因子^[2-4],对组织损伤有愈合

作用,有可能逆转末端病的病理变化,从而恢复正常结构缓解症状和减少复发。本研究参照姚小卫等^[5]对大鼠跟腱末端病造模方法进行大鼠跟腱末端病造模,应用血小板源性生长因子进行干预,观察跟腱末端区组织结构的病理变化,分析血小板源性生长因子对末端病的修复影响情况,探讨末端病的发病机理,对其治疗方案的制定提供有力的实验依据,为末端病

的防治提供科学有效的方案。

1 材 料

1.1 实验动物 选用 Wistar 雄性大鼠 40 只, 体重 (250 ± 20) g, 由山东省文登整骨医院动物实验中心提供, 实验动物合格证号: 20100011。

1.2 实验药物 大鼠自体血小板源性生长因子、生理盐水注射液、10% 甲醛固定液、脱钙剂(由甲酸 35 mL、乙酸 15 mL、HCl 50 mL、甲醛 50 mL、NaCl 5 g、蒸馏水 350 mL 配制而成)、70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精、95% 酒精、无水酒精、二甲苯 I、二甲苯 II、蒸馏水、伊红染液、中性树胶。

1.3 实验仪器 Thermo 冷冻离心机、Thermo 移液器、0.22 μm 无菌滤器、细胞计数器、流式细胞仪、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻柜、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻柜、水浴锅、LABCONCO 生物安全柜、自动双重纯水蒸馏水器、LEICA 全自动脱水机、LEICA 手动切片仪、病理组织漂烘仪、LEICA 自动染色仪、病理组织漂烘仪、倒置显微镜。

2 方 法

2.1 动物分组及喂养 选用 36 只形接近平均体重为 (250 ± 20) g Wistar 雄性大鼠, 按国家标准啮齿类动物固体混合饲料分笼饲养。进行随机编号, 对应随机数字表随机分成 3 组(I、II、III 组), 其中 I 组为血小板源性生长因子注射组, II 组为生理盐水注射组, III 组为对照组。动物分组后每笼 4~6 只给予充足的啮齿类动物饲料和自来水饲养, 让大鼠自行饮食, 动物实验室内温度控制在 $22\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度保持在 45%~50% 之间。大鼠饲养的笼具、饲料槽及水瓶定期清洗消毒。

2.2 大鼠血液的采集 参照叶少梅等^[4]大鼠心脏取血法, 将大鼠麻醉后仰卧位固定于木板上, 给予消毒皮肤, 首先将 7 号针头注射器抽取少量的低分子量肝素钠行肝素化处理, 然后将针头由大鼠剑突下缘正中处斜穿入胸腔, 针尖于皮肤成 $20^{\circ}\sim 35^{\circ}$, 当针头插入心脏, 由于心脏搏动血液自然涌入注射器, 然后缓慢抽拉注射器的针芯, 可取血 2~3 mL, 大鼠可继续存活。将抽好的血液注入到无菌的真空采血管, 注射器盖上针帽, 放入无菌标本袋。

2.3 大鼠自体血小板源性生长因子的制备 在生物安全柜将血液转移到 10 mL 的无菌离心管中, 离心 20 min。将离心后上层富含血小板的血清小心移出并不带任何红细胞, 放入无菌的 10 mL 离心管中。在 -20

$^{\circ}\text{C}$ 冰箱中短期保存, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中长期保存。将冷冻的富含血小板的血清在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中融化, 时间不超过 5 min。富含血小板的血清完全溶化后离心 6 min, 然后用移液管将上清液轻轻取出转移到无菌离心管中。加入强力霉素后用滤网过滤出杂质, 抽到 3 mL 的针管中备用。

2.4 造模 本实验的动物模型是参照姚小卫等^[3]的大鼠跟腱末端病造模方法进行。将经过适应性电击筛选后的大鼠随机分组成 3 组, 即 I 组血小板源性生长因子注射组, II 组为生理盐水注射组, III 组为对照组。打开控制开关, 调整电压, 由小逐步加大, 直到大鼠向上跳离铜棒出现有效跳跃为止, 每 15 s 通电 1 次, 持续 20 min, 休息 10 min, 再持续 20 min。每天造模 1 次, 造模时间均为周一到周六的下午进行, 周日停止电击, 让大鼠休息, 持续造模 4 周。其中一般通电电压为 45 V, 个别情况下达到 60~80 V。

2.5 给药方法

2.5.1 血小板源性生长因子注射组 将大鼠固定在操作台上, 暴露其后肢, 消毒, 在其跟腱止点部位用 1 mL 的注射器针头插入, 缓慢注射血小板源性生长因子 0.2 mL, 轻轻指揉跟腱部让血小板源性生长因子充分吸收, 每周注射 1 次, 总共 4 周, 注射时间均为大鼠休息日。注射后第 2 天继续将大鼠放入自制电刺激造模装置进行造模。

2.5.2 生理盐水注射组 将大鼠固定在操作台上, 暴露其后肢, 消毒, 在其跟腱止点部位用 1 mL 的注射器针头插入, 缓慢注射生理盐水 0.2 mL, 轻轻指揉跟腱部让生理盐水充分吸收, 每周注射 1 次, 总共 4 周, 注射时间均为大鼠休息日。注射后第 2 天继续将大鼠放入自制电刺激造模装置进行造模。

2.5.3 对照组 不进行任何注射。

2.6 取材方法

2.6.1 标本取材 当造模 4 周后, 将大鼠固定在操作台上, 用 1% 氯胺酮按 $0.1\text{ mL}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ 比例给大鼠行腹腔注射麻醉, 而后在助手的帮助下迅速将大鼠的双侧后足取下, 包括整条跟腱和跟腱的止点部位, 取材过程中动作轻柔, 不要破坏跟腱的止点结构, 取材范围勿过大, 避免其他组织的干扰, 也勿偏小, 造成重要部位缺失, 影响观察。取材完后按脊髓脱臼法处死大鼠。

2.6.2 切片的制作 将取下来的实验标本放入 10% 甲醛固定液中, 并置于常温保存中保存 24 h。将固定

好的标本用清水冲洗 3 h 后,置于脱钙溶液中进行脱钙,脱钙液至少要没过标本 2 cm 高,每 2 d 更换一次脱钙液,共脱钙 4 d。用细针探查标本是否脱钙完全,当细针可轻松刺入跟骨,即脱钙完成,将标本用自来水冲洗 24 h,然后按 70% 酒精,80% 酒精,90% 酒精,95% 酒精,无水酒精,无水酒精顺序进行标本脱水,脱水完毕后予二甲苯 I、二甲苯 II 透明,石蜡包埋。用手动石蜡切片机切片,每个标本连续切片 2~4 张,切片厚度约为 0.5 mm,不宜过厚过薄,而后用涂有多聚赖氨酸的载玻片进行附片,最后将附好片的载玻片放入病理组织漂烘仪内给予 40 ℃ 烘烤 1 h,使得切片更牢地附于载玻片上。

2.6.3 HE 染色 将切好的载玻片置病理组织漂烘仪内,调节漂烘仪温度至 60 ℃,烘烤 30 min,以使标本切片更紧密粘附于载玻片上,不易脱落;按二甲苯 I、二甲苯 II、无水酒精、无水酒精、95% 酒精、90% 酒精、80% 酒精、70% 酒精顺序进行切片脱蜡,脱蜡完全后放入蒸馏水水洗 60 min;将载玻片放入苏木素染色 6 min;用蒸馏水漂洗 2 min;将载玻片放入盐酸酒精分化 2~5 s;用蒸馏水水洗 15 min;将载玻片放入伊红染色 5 min;用蒸馏水水洗 2 min;按 70% 酒精,80% 酒精,90% 酒精,95% 酒精,无水酒精,无水酒精顺序进行标本脱水,予二甲苯 I、二甲苯 II 进行透明,用中性树胶封固。

2.7 观察指标

2.7.1 一般形态体征观察 观察所有 Wistar 大鼠的毛发光泽度、饮食、大小便、活动变化,跳跃次数,跳跃高度、活动能力,并每周记录动物体重,取材时观察跟腱及跟骨的外观、大小、硬度。

2.7.2 大鼠跟腱末端组织光学显微镜下组织形态的观察 在显微镜下,观察每个标本跟腱的末端区,包括末端跟腱、纤维软骨区、跟骨区、腱骨关节面、腱围组织的形态,并在 10×4 倍、10×10 倍和 10×40 倍镜下拍照记录,所有切片阅片均在同一放大倍数、同一光强度下分析。

3 结果

3.1 造模过程中的损耗 在造模过程中,血小板源性生长因子注射组有 3 只出现抽搐猝死的,生理盐水注射组有 2 只不能适应电击强度的大鼠均给予淘汰,对照组大鼠数量不变。造模结束后大鼠在各组内的分布见表 1。

表 1 造模结束后各组内大鼠分布情况 只

时间	组别		
	I	II	III
1 周	11	12	12
2 周	10	10	12
3 周	9	10	12
4 周	9	10	12

3.2 一般体征观察 实验过程中对照组大鼠神态安静、活泼好动,皮毛发亮,饮食良好。血小板源性生长因子注射组和生理盐水注射组大鼠在第 1、2 周电击后明显出现气喘,饮水、进食量增加,有少量大鼠出现皮毛脱落,第 3、4 周气喘明显减轻,饮食良好,皮毛无明显脱落,以上情况显示大鼠逐渐适应电击量。大鼠在注射血小板源性生长因子后未见明显异常,注射部位未见红肿,大鼠活动如常。

3.3 叫声次数 在造模过程中,大鼠的尖叫声次数随着时间的推移出现了不同的变化,每周叫声次数、声音大小都一样。第 1 周,大鼠因电击时疼痛四处乱窜,声音分贝比较高,次数比较多;第 2 周后大鼠渐渐适应了电刺激,叫声次数相对第一周明显减少;第 3 周有些大鼠出现避电行为,大鼠之间可通过前肢相互支撑,利用可出现单只脚站立现象,或者四肢朝天以致四肢没有接触铜棒无以形成回路;第 4 周后,大鼠尖叫次数有所减少。

3.4 跳跃高度 第 1 周由于尚未适应电击,最大跳跃高度可达 15 cm;第 2 周明显适应造模仪内部环境以及电刺激,最大跳跃高度为 35 cm,第 4 周跳跃高度较前 3 周都明显增高,最大可达到 45 cm。

3.5 跳跃次数 第 1 周由于大鼠尚未适应电刺激,有效跳跃次数仅为 30 次;第 2 周后明显适应造模仪内部环境及电击,跳跃次数增多;第 3、4 周跳跃次数较前 2 周增加 70% 以上。

3.6 活动能力 造模第 1 周生理盐水组和血小板源性生长因子注射组大鼠的四肢由于刺激出现明显的不适,主要表现在四肢伸不开;生理盐水和血小板源性生长因子注射后无明显变化。第 3 周注射生理盐水组症状仍进一步加剧,注射血小板源性生长因子组症状有所缓解。

3.7 标本取材观察 取材全部由同一个人进行,其中血小板源性生长因子注射组和生理盐水注射组的大鼠跟腱部明显较对照组大鼠的跟腱增粗,后腿肌群明显发达,趾底筋膜增厚。

3.8 HE 染色观察情况 图片字母所指区域:跟腱(T)、纤维软骨区(UE)、潮线(TM)、钙化软骨区(ME)、跟骨(C)、骨髓腔(CCM)、脂肪垫(CEP)、腱骨关节面软骨(CA)、血管(BV)。

3.8.1 跟腱区 HE 染色观察情况 对照组在显微镜可观察到跟腱由多束腱纤维平行排列组成,在各个纤维束之间,有一排排成行排列的腱细胞,两者紧凑衔接。腱细胞呈梭形,体积较小,中央有椭圆形的细胞核,细胞核大,占整个细胞的3/5~4/5,胞浆红染较浅[图1(1)、图2(1)]。生理盐水组跟腱纤维排列紊乱,部分腱纤维断裂不规则,细胞呈梭形,体积较大,数目较多,在腱的中间靠近端部位可发现多处玻璃样变性区域,腱纤维结构模糊不明显,还有一些血管向腱内生长,可见血管内的红细胞,还有部分炎性细胞浸润[图2(2)]。血小板源性生长因子组跟腱的腱纤维平行排列整齐规则,腱细胞排列整齐,结构清楚,细胞核较完整,腱纤维呈波浪状,腱纤维较完整,部分切片可见少许腱纤维微断裂的痕迹,大约占整条跟腱宽带的5%左右,无炎性细胞浸润,未见明显匀质红染的玻璃样变性区域[图2(3)]。

3.8.2 纤维软骨区 HE 染色观察情况 对照组在低倍镜下,可见纤维软骨区的两个面厚度有所不同,靠近腹侧的面较背侧的面略厚,腱纤维进入该区后,就成为相互交织成束的 Sharpey 纤维。在高倍下可见 Sharpey 纤维之间有大量的软骨陷窝,每个陷窝内各有1~2个软骨细胞紧凑在一起。软骨细胞呈椭圆状,体积较腱细胞大,数目较多。潮线位于纤维软骨区与钙化软骨区之间,其弯曲线平整光滑,曲线的弧度趋势与跟骨的轮廓大致相当,形状像海潮(图3)。生理盐水组纤维软骨区明显增厚,特别是腹侧面,其远侧端部分出现了明显的钙化,而近侧端部分,向腱

区扩张,使原来的腱纤维软骨化,腱细胞转化成了软骨细胞。发现有肉芽组织增生和血管侵入。血小板源性生长因子组纤维软骨区的背侧面和腹侧面无明显增厚,有些切片靠近远侧端出现了较小的钙化,约占纤维软骨区面积2%~5%,近侧端向腿区略微推进,未见玻璃样变性和炎性细胞浸润,未见血管侵入[图2(3)]。

3.8.3 钙化软骨区 HE 染色观察情况 对照组钙化软骨区与跟骨的致密骨无明显的分界,其染色较均匀,细胞数目较少[图2(1)]。生理盐水组钙化软骨区和跟骨的染色不均匀,基质中出现了大量的类似潮线的蓝染线条,有的与潮线的走行方向一致,有的在骨髓腔周围环绕,形成沉积岩样的层状排列[图1(2)、图2(2)]。血小板源性生长因子组染色均匀,与跟骨分界不明显,染色均匀,细胞数量不多,其形态和造模组细胞相似,在纤维软骨区与钙化软骨区可见潮线向腱区推进[图2(3)]。

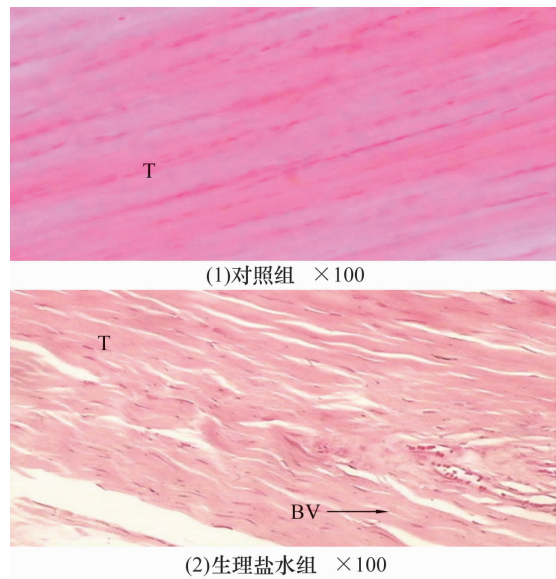


图1 倒置显微镜下跟腱区 HE 染色图片

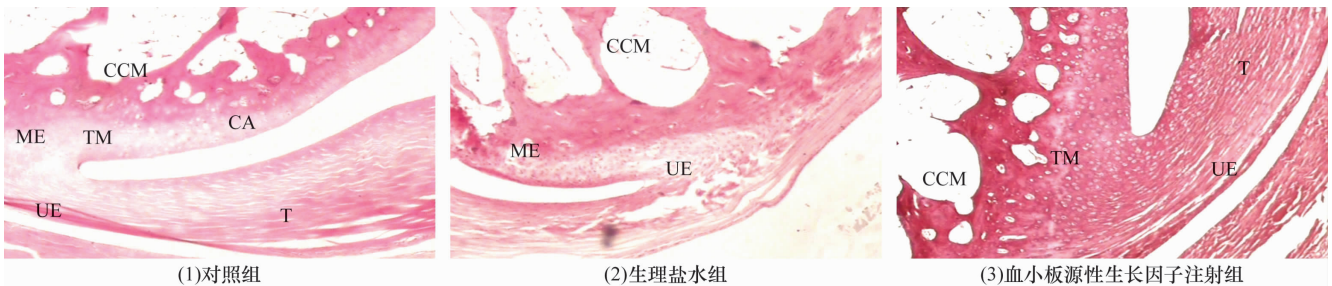


图2 倒置显微镜下跟腱区 HE 染色图片 ×400

3.8.4 跟骨和骨髓腔 HE 染色观察情况 对照组跟骨的致密骨质染色均匀,颜色深,其跟骨的骨小梁呈片状,骨髓腔较大,内有较多脂肪空泡,无出现明显的

增生象[图4、图2(2)]。生理盐水组跟骨的致密骨质染色均匀,其跟骨的骨小梁呈片状,骨髓腔及脂肪空泡变小,骨小梁呈片状密集分布。骨髓呈现明显增

生象:可见大量增殖的间充质细胞、幼稚母细胞、分叶中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等[图 1(2)、图 2(2)]。血小板源性生长因子组跟骨的致密骨质红染均匀,其骨小梁呈片状,骨髓腔较大,跟骨致密骨,骨小梁呈片状,骨髓腔内无出现明显增生象,内可见大量脂肪组织空泡[图 2(3)]。

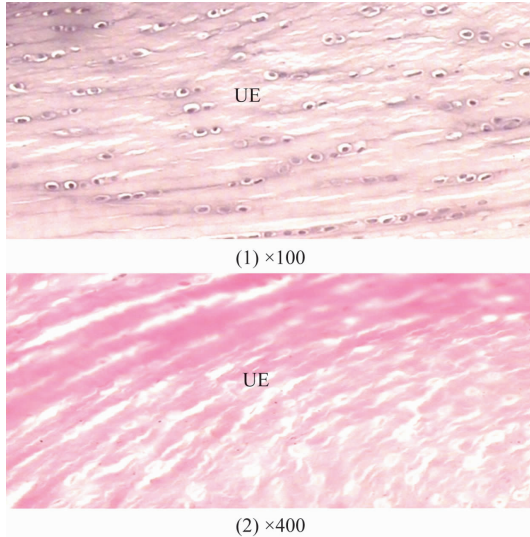


图 3 倒置显微镜下对照组纤维软骨区 HE 染色图片

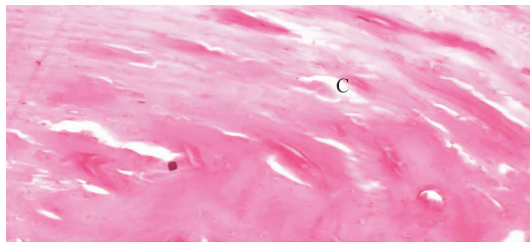


图 4 倒置显微镜下跟骨骨髓腔 HE 染色图片 × 400

3.8.5 腱骨界面 HE 染色观察情况 对照组位于跟骨的背侧后上方,与跟腱接触的区域,有一层厚约 0.10 mm 的透明软骨,有较多的软骨细胞,是跟腱与跟骨的界面软骨。生理盐水组位于跟骨的背侧后上方,与跟腱接触的区域,有一层厚约 0.10 mm 的透明软骨,有较多的软骨细胞,是跟腱与跟骨的界面软骨。血小板源性生长因子组关节软骨面光滑,厚度没有明显增厚,与对照组大抵相同[图 2(3)]。

4 讨论

目前对末端病的发病机理尚没有统一的认识,我国学者扈盛等^[6-7]发现在造模过程中在末端区纤维软骨区和钙化软骨区的潮线可向纤维软骨区方向上涨。并发现大鼠跟腱末端区 eNOS 表达活跃。我们研究早期发现在末端病末端区常见腱围组织水肿,毛细血管扩张和炎性细胞浸润等,说明腱围组织血液供应

障碍,组织细胞坏死,其原因可能与外界牵拉力或者超过了局部毛细血管的承受能力造成血管损伤。但同时腱围毛细血管扩张,使局部血流增加,可促进末端病的修复。

末端病的治疗方法很多,但如何探求一种能诱导患者自身的修复,达到治本作用的方法是当前研究的一个方向。随着细胞因子生物技术的发展,运用血小板源性生长因子局部导入治疗骨折、韧带、肌腱损伤的研究已深入,部分已经应用到临床,并取得一定效果。我们研究表明,通过增加肌腱细胞增殖,胶原蛋白的合成,血管的形成达到组织再生,体外和动物实验证实,富含血小板血浆对腱组织胶原蛋白的沉淀和肌腱血管化起到了积极的作用。对于自我修复能力有限的末端组织,特定的血小板源性生长因子有可能启动或加快这些组织的愈合过程。

综上所述,临床应用血小板源性生长因子促进末端病的组织结构的修复是有潜力的。

5 参考文献

- [1] Mcgonagle D, WaKefield RJ, Tan AL, et al. Distinct topography of erosion and new bone formation in achilles tendon enthesitis: Implications for understanding the link between inflammation and bone formation in spondylarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(9): 2694 - 2699.
- [2] 刘颖. 浅议当归的化学成分与临床药理作用[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(27): 51 - 53.
- [3] Olaussen M, Holmedal, Lindbaek M, et al. Physiotherapy alone or in combination with corticosteroid injection for acute lateral epicondylitis in general practice: A protocol for a randomized placebo - controlled study[J]. *BMC Musculoskeletal Disord*, 2009, 10: 152.
- [4] Hay EM, Paterson SM, Lewis M, et al. Pragmatic randomised controlled trial of local corticosteroid injection and naproxen for treatment of lateral epicondylitis of elbow in primary care [J]. *BMJ*, 1999, 319: 964 - 968.
- [5] 姚小卫, 扈盛, 欧高志, 等. 末端病大鼠模型的建立[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2006, 14(5): 17 - 18.
- [6] 扈盛, 胡亚哲. 末端病潮线涨潮的力学分析[J]. *中国运动医学杂志*, 2002, 21(4): 346 - 348.
- [7] 扈盛, 滕宇, 胡亚哲, 等. 内皮型一氧化氮合酶在大鼠末端病中的表达[J]. *中国运动医学杂志*, 2005, 24(6): 690 - 691.

(2012-07-18 收稿 2012-12-20 修回)