DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.015

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1368-03

兔肢体缓慢牵伸延长对相邻关节软骨代谢的影响

王序全,李起鸿,许建中,周 强 (第三军医大学西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨肢体缓慢牵伸刺激作用下相邻关节软骨的功能代谢变化及其生物适应能力。方法 30只健康成年新西兰兔分为延长组(A)及延迟观察组(B),再按延长幅度不同分为10%(A_{10},B_{10})、20%(A_{20},B_{20})及40%(A_{40},B_{40})3亚组,每组5只,另外5只作正常对照。采用胫骨上干骺端截骨缓慢牵伸肢体延长,延长速度1 mm/d,分上、下午2次完成。定期摄X线片监测延长幅度及膝关节影像学变化。生物化学方法测定预定延长幅度时的胫骨平台关节软骨基质糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)含量及羟赖氨酸与羟脯氨酸构成比变化。结果 ①各组不同时相点膝关节软骨未见明显影像学异常。②A_{10}、B_{10}及B_{20}组软骨GAG含量正常;A_{20}组仅氨基半乳糖显著性下降($P<0.05$);A_{40}组中氨基己糖、氨基半乳糖和葡萄糖醛酸均出现明显下降($P<0.01$)而氨基葡萄糖并无明显变化($P>0.05$);B_{40}组GAG含量较A_{40}组均有显著性恢复($P<0.01$),其中氨基己糖及氨基半乳糖已恢复至正常水平。③A_{40}及B_{40}组软骨基质胶原中HYL/HYP比分别为0.18及0.17,其余各组之比值接近于正常比0.24左右。结论 低幅度延长时关节软骨代谢功能能有效适应缓慢牵伸刺激,但大幅度延长时关节软骨会出现暂时性代谢功能紊乱。

关键词:肢体延长;关节软骨;代谢
中图法分类号:R322.72;R329.25;R687.35 文献标识码:A

Effects of limb lengthening on metabolism of articular cartilage in experimental rabbits

WANG Xu-quan, LI Qi-hong, XU Jian-zong, ZHOU Qiang (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the adaptation of metabolism of the arthrodial cartilage for limb lengthening. **Methods** Thirty New Zealand rabbits were divided into two groups: limb lengthening group (A) and delayed observation group (B). Each group was further divided into three sub-groups ($n=10$) according to the distraction ranges: 10%, 20%, and 40%. Upper-tibia metaphysis lengthening was adopted at 1 mm/d rate of distraction and iconography changes of the knee joint were observed with X-ray. The contents of glycosaminoglycan (GAG), hydroxylysine (HYL), and hydroxyproline (HYP) were determined by biochemical techniques. **Results** ① There was no obvious imaging change of knee articular cartilage at every time point in each group. ② The content of GAG was normal in group A_{10}, and B_{10}, and B_{20}, but the content of galactosamine decreased obviously in group A_{20} ($P<0.05$). In group A_{40}, the contents of hexosamine, galactosamine, and glycuronic acid were obviously decreased ($P<0.01$), but hexosamine and galactosamine recovered to the normal level ($P>0.05$). The content of GAG recovered obviously in group B_{40} as compared with that in group A_{40}. ③ The ratio of HYL to HYP was 0.18 and 0.17, respectively in group A_{40} and group B_{40}, but it was normal in other groups, nearly 0.24. **Conclusion** Metabolism of the arthrodial cartilage during low distraction range can adapt the stimulation of distraction, but great distraction range may result in transitory disorder in metabolic function of the arthrodial cartilage.

Key words: limb lengthening; joint; cartilage; metabolism

近年来,肢体延长对关节的影响已逐渐受到重视。目前的实验研究表明,延长有引起关节功能障碍和关节软骨损伤的可能,表现为股骨或胫骨延长幅度超过20%后出现膝关节屈伸功能受限[1],膝关节软骨进行性退行性改变等[2~4]。但这种结论尚缺乏足够的临床支持,李起鸿等[5]报道的肢体延长病例中,延长率达

作者简介:王序全(1965-),男,湖北省荆州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事创伤骨科、肢体延长方面的研究。电话:(023)65340297,E-mail:wangxuquan@hotmail.com

收稿日期:2003-07-07;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

9%～84.5%, 并未出现明显的永久性关节功能障碍和骨关节炎表现。为何动物实验结果与临床疗效之间会产生如此大的差异尚需待进一步研究。本实验采用生物化学及分子生物学等方法观察了不同幅度胫骨上干骺端缓慢牵伸延长对膝关节软骨形态及功能的影响, 以期阐明关节软骨是否适应缓慢牵伸刺激及其功能代谢基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

30 只健康成年新西兰兔, 体质量 2～4 kg, 雌雄不拘, 由我校实验动物中心提供。动物分组: 实验组分为延长组(A 组)及延迟观察组(B 组), 其中 B 组为延长停止后继续观察 3 个月。各组又按延长幅度不同分为 3 个亚组, 即延长 10% 组(A_{10}、B_{10})、20%组(A_{20}、B_{20})、40%组(A_{40}、B_{40})。每组 5 只, 共 30 只, 均以右后肢为实验侧。另 5 只为正常对照。

1.2　延长方法

3%戊巴比妥纳(1 ml/kg)耳缘静脉麻醉, 右后肢常规消毒。胫骨近端前内侧弧形切口, 骨膜下环形剥离胫骨上干骺端并截骨, 中段截断腓骨。分别于胫骨平台关节面下 1、3、6 cm 处横行交叉穿放直径 1.2 mm 3 组克氏针, 每组 2 枚, 交叉角 25°～45°, 自制微型半环槽式外固定器连接固定(本实验室研制)。术后青霉素 80 万 U 肌注。术中不作延长, 术后第 4 天开始以 1 mm/d 速度延长, 分上、下午 2 次完成, 即 0.5 mm/次, 2 次/d。每次延长后任动物自由活动。

1.3　X 线检查

延长过程中定期摄 X 线片, 了解延长幅度、延长区骨再生情况。并于术前、延长前、延长终止及取材时分别摄膝关节正侧位 X 线片, 对比观察关节面平滑度、关节间隙大小、骨赘的形成及关节轴向偏移情况。

1.4　关节软骨 GAG 含量测定

切取胫骨平台软骨, PBS 液冲洗 2 次, 1∶1 丙酮/乙醚漂洗 2 次, 100 ℃干燥箱内烘干脱水, 精确称重, 密封管内分装保存待测。氨基葡萄糖及氨基半乳糖及氨基己糖采用改进的 Rondle-Morgan 法[6] 测定, 葡萄糖醛酸参照 Bitter 法[7] 测定。其中, 氨基己糖代表软骨氨基聚糖总量, 氨基半乳糖和葡萄糖醛酸代表软骨硫酸软骨素含量, 而氨基葡萄糖代表软骨硫酸角质素含量。

1.5　氨基酸分析

切取胫骨平台软骨, 按上述方法处理并脱水至恒重; 置水解管中, 加入适量的 6 mol/L 盐酸液, 吹氮 2 min; 真空封管, 110 ℃ 水解 24 h; 取出开管, 100 ℃ 水浴中蒸发盐酸, 去离子水洗涤 3 次, 蒸干; 加 Na-S 稀释液(美国 Beckman 公司)定容至 2 ml, 超滤过弃杂质; 取过滤液, 用高效氨基酸分析仪 6300 黄金系统(美国 Beckman 公司)测定羟赖氨酸(hydroxylysine, HYL)及羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量, 并计算出 HYL/HYP 比值。

1.6　统计学方法

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用统计软件包 SPSS10.0 行方差分析。

2　结果

2.1　一般结果

所有动物均顺利完成预期延长幅度及观察时间。关节无感染, 部分针道有浅表感染, 经换药及抗感染等处理均治愈。

2.2　X 线检查

各组术前、延长前、延长终止时及取材时等不同时相点膝关节正侧位 X 线片相比较, 关节面平滑度、关节间隙大小无异常, 均未见骨赘形成及关节轴向偏移等现象。

2.3　软骨 GAG 含量

与正常对照组比, A_{10}组软骨 GAG 含量正常; A_{20}组仅氨基半乳糖下降($P<0.05$); A_{40}组中, 氨基己糖、氨基半乳糖和葡萄糖醛酸均出现明显下降($P<0.01$), 而氨基葡萄糖并无明显变化($P>0.05$); B_{10}组及 B_{20}组 GAG 含量均正常; B_{40}组中 GAG 均较 A_{40}组有非常显著的恢复($P<0.01$), 其中氨基己糖及氨基半乳糖已恢复至正常水平, 仅葡萄糖醛酸仍较正常对照组水平低下(表 1)。

表 1　胫骨平台软骨 GAG 含量(μg/mg, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Content of glycosaminoglycan (GAG) in cartilage of tibial plateau (μg/mg, $\bar{x}\pm s$)

Group	Glycosamine	Galactosamine	Glycuronic acid	Hexosamine
Control	12.4±0.9	32.4±6.3	15.8±2.1	45.7±7.5
A_{10}	12.1±1.5	31.6±6.4	14.7±2.4	42.4±6.7
A_{20}	11.3±1.2	26.7±5.9 *	14.9±1.4	40.5±5.8
A_{40}	10.3±0.5	16.2±6.7 **	7.3±2.6 **	26.8±6.3 **
B_{10}	12.1±0.6	31.2±5.2	14.6±1.9	43.5±5.7
B_{20}	11.8±1.3	30.9±3.4	14.3±1.3	41.1±3.8
B_{40}	11.2±1.1	29.3±4.4 △△	12.1±1.5 *△△	39.5±4.5△△

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$, *vs* control;　△△: $P<0.01$, *vs* group A_{40}

2.4　氨基酸分析

正常关节软骨基质胶原中 HYL/HYP 比为 0.24 左右, A_{40}及 B_{40}组分别为 0.18 及 0.17, 其余各组之比值接近于 0.24 左右(表 2)。

表 2　胫骨平台软骨氨基酸含量($\bar{x}\pm s$, μg/mg)

Tab 2　Content of amino acid in cartilage of tibial plateau ($\bar{x}\pm s$, μg/mg)

Group	Control	Experimental group				
		A_{10}	A_{20}	A_{40}	B_{10}	B_{20}	B_{40}
HYL	13.17±2.08	15.16±2.16	17.16±3.14	19.14±1.76	12.21±1.92	17.27±2.07	16.53±1.10
HYP	53.85±4.06	65.73±8.76	68.99±1.32	103.18±10.54	48.34±1.69	78.39±1.47	97.21±9.24
HYL/HYP	0.24±0.03	0.23±0.01	0.25±0.04	0.18±0.02	0.25±0.01	0.22±0.03	0.17±0.02

3　讨论

正常关节软骨中只有软骨细胞, 主要功能为合成

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和分泌蛋白聚糖及胶原，维持软骨结构稳定。软骨胶原纤维主要为Ⅱ型胶原，约占软骨干重的60%，以“网状拱形结构”构成软骨的空间骨架。蛋白多糖由核心蛋白与糖胺聚糖(glycosaminoglycan，GAG)组成的可聚蛋白多糖聚合而成，充填于胶原纤维网中，提供软骨的韧性和弹性。关节软骨虽缺乏血管但细胞功能活跃，当软骨出现损害或退变时，软骨细胞蛋白多糖的合成及含量下降，细胞表现型改变，合成和分泌Ⅱ型胶原能力下降而Ⅰ型胶原合成增加，软骨钙化趋势增强，抗应力能力下降，并可使软骨损伤出现恶性循环。

本实验对胫骨平台关节软骨的基质含量变化进行了观察。结果显示：①延长幅度小于20%时，软骨基质GAG含量并无明显改变，延长幅度达40%时，GAG含量下降明显，并主要表现为硫酸软骨素含量显著降低，而硫酸角质素含量非常稳定。②停止延长3个月后GAG总量及硫酸软骨素含量逐渐恢复并已接近于正常水平。该结果表明，延长幅度较小时软骨细胞形态及其代谢功能处于正常水平，软骨基质蛋白聚糖的总含量能维持在动态平衡状态；而当延长幅度逐渐增大，软骨逐渐出现病理性损害，此时部分细胞退变其代谢功能也随之降低，蛋白聚糖合成减少，软骨表层出现糜蚀，大量蛋白聚糖通过表层裂隙而丢失，使软骨的韧性和弹性性能下降，缓冲压力和负荷能力减低。如不及时补充基质含量，软骨将出现进行性结构破坏。为此，正常细胞合成和分泌基质功能出现代偿性增强，同时细胞开始增殖，使受损软骨在细胞数量和功能上获得双重补偿，以利于基质含量稳定。如损害性刺激因素持续作用，软骨功能代谢及再生修复能力不足于补充蛋白聚糖的丢失量时，则表现出GAG含量持续性下降。

本实验中，关节软骨GAG含量虽在延长幅度达40%时有明显下降，但当延长终止后，随着软组织的蠕变效应和再生，张力逐渐降低，对软骨的异常高应力刺激减缓，软骨再生修复及功能代偿作用逐渐增强，因而停止延长3个月时软骨GAG含量能逐渐恢复。

成熟软骨细胞并不是一种分化终末细胞，有进一步分化能力，当受到异常刺激而引起内环境紊乱时软骨细胞可向成骨细胞及骨细胞转化，软骨细胞表现型发生改变，由分泌Ⅱ型胶原转为以分泌Ⅰ型胶原为主。文献[8]报道胶原中羟赖氨酸和羟脯氨酸含量比值较为恒定，Ⅰ型胶原为0.13左右，Ⅱ型为0.26左右。本实验通过氨基酸分析表明，正常软骨HYL/HYP比值为0.24左右，与文献基本相符；当延长幅度为10%和20%时，软骨HYL/HYP比仍与正常值相近，延长幅度为40%时为0.18左右，介于Ⅰ型与Ⅱ型之间，说明此时细胞的软骨表现型已有所改变，部分细胞可能因退变导致其合成和分泌Ⅱ型胶原的能力下降，而产生Ⅰ型胶原的能力增加。即使是停止延长3个月时HYL/HYP构成比仍未明显恢复，反映出软骨细胞表现型一旦改变则较难恢复。由于Ⅰ型胶原含量增加且易聚集成束，使得软骨的“拱桥形纤维网”构型紊乱，蛋白聚糖分布不匀，另外蛋白聚糖与Ⅰ型胶原间的结合能力不强，软骨负荷时易出现应力分布不均及负荷传导紊乱而致损伤[9]。因此，恢复和维持软骨细胞的正常表型，增强软骨细胞的代谢功能，对保护关节软骨具有十分重要的生理意义。

总之，肢体延长幅度达10%~20%时关节软骨细胞表现型及代谢功能无明显改变，延长幅度达40%时则有较明显的代谢功能紊乱表现，但在停止延长后3个月时紊乱的功能代谢已逐步恢复并近于正常水平。说明大幅度延长时关节软骨能自我调节代谢功能紊乱，不过这种自我调节过程较长。

参考文献：

[1] Herzenberg J E, Scheufele L L, Paley D, *et al*. Knee range of motion in isolated femoral lengthening[J]. Clin Orthop, 1994, 301: 49-54.

[2] Stanitski D F. The effect of limb lengthening on articular cartilage. An experimental study[J]. Clin Orthop, 1994, 301(9): 68-72.

[3] Nakamura E, Mizuta H, Otsuka Y, *et al*. Leg lengthening and glycosaminoglycans in the rabbit knee[J]. Acta Orthop Scand, 1995, 66(1): 33-37.

[4] Nakamura E, Mizuta H, Takagi K. Knee cartilage injury after tibial lengthening. Radiographic and histological studies in rabbits after 3-6 months[J]. Acta Orthop Scand, 1995, 66(4): 313-316.

[5] 李起鸿，柳凤轩，马树枝，等. 骨骺牵伸和干骺端截骨大幅度延长下肢的实验研究与临床疗效观察[J]. 中华骨科杂志，1991，11(3)：187-190.

[6] Rondle C J M, Morgan W T J. The determination of glucosamine and galactosamine[J]. Biochem J, 1955, 61: 586-589.

[7] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Anal Biochem, 1962, 4: 330-334.

[8] 刘智广，马海燕. 胶原特异性氨基酸快速测定方法的研究及应用[J]. 氨基酸杂志，1994，16(3)：8-12.

[9] Bora F W Jr, Miller G. Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis[J]. Hand Clin, 1987, 3(3): 325-336.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net