

文章编号:1004-7220(2016)02-0167-04

# TGF- $\beta_1$ 对大鼠肩袖损伤修复术后腱-骨愈合的影响

张冲<sup>1</sup>, 李莉<sup>2</sup>

(1. 河北省中医院 骨科, 石家庄 050000; 2. 河北医科大学 基础医学院, 组织学与胚胎学教研室, 石家庄 050017)

**摘要:** 目的 评价转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 对 Wistar 大鼠肩袖损伤重修复术后早期腱-骨界面愈合的影响。方法 54 只 Wistar 大鼠, 取双侧大结节止点处横断撕裂肩袖冈上肌腱全层造模, 6 周后重建肩袖止点, 腱骨界面注射以纤维蛋白胶为载体的 TGF- $\beta_1$  缓释体诱导成骨。随机分为高、低剂量组和单纯手术对照组。术后 1、2、3 周随机分组处死动物, 取肩袖标本作生物力学检测。结果 肉眼观察各组断裂点均在肌腱缝合处以内。高剂量组最大抗拉强度、最大载荷百分比、刚度及最大横断面积与低剂量组和对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ )。低剂量组最大载荷百分比、最大抗拉强度、刚度、刚度百分比、最大横断面积与对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ )。高剂量 TGF- $\beta_1$  在肩袖损伤修复早期效果更佳, 腱-骨界面的抗拉强度及刚度随着康复时间的延长而不断增强。结论 TGF- $\beta_1$  加强腱-骨界面的最大抗拉强度、最大载荷百分比、刚度及最大横断面积, 诱导断面再生成直止点的复杂结构, 促进肩袖损伤的愈合。

**关键词:** 转化生长因子  $\beta_1$ ; 肩袖损伤; 腱-骨愈合; 生物力学

中图分类号: R684.7; R318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.02.167

## Effects of TGF- $\beta_1$ on early tendon-bone healing after reconstruction of rotator cuff tears in rats

ZHANG Chong<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup> (1. Department of Orthopaedics Surgery, TCM Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) on early tendon-bone healing after reconstruction of rotator cuff tears in Wistar rats. **Methods** The models of rotator cuff supraspinatus tendon by full-thickness transverse tears at the greater tuberosity point in bilateral upper limbs of 54 Wistar rats were established and reconstructed. After 6 weeks, TGF- $\beta_1$  induced by fibrin glue was injected at the tendon-bone interface to release osteogenesis. The rats were randomly divided into low-dose TGF- $\beta_1$  group, high-dose TGF- $\beta_1$  group and control group, and then executed randomly at 1st, 2nd and 3rd week to make the supraspinatus specimens for biomechanical testing. **Results** The rupture point was formed within the suture of rotator cuff in each group by visual observation. The maximum tensile strength, maximum loading percentage, stiffness and maximum cross-section area of tendon-bone interface in high-dose group were higher than those in low-dose group and control group ( $P < 0.05$ ). The maximum loading percentage, maximum tensile strength, stiffness, stiffness percentage and the maximum cross-section area of tendon-bone interface in low-dose group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). High-dose TGF- $\beta_1$  could promote the healing during early reconstruction of rotator cuff tears, the tensile strength and stiffness at the tendon-bone interface would increase with

收稿日期:2015-05-26; 修回日期:2015-09-09

基金项目:河北省医学科学研究重点课题(ZL20140293)。

通信作者:张冲, 副主任医师, 副教授, Tel: (0311) 69095088; E-mail: haiyan633@sohu.com。

the rehabilitation period prolonging. **Conclusions** Using TGF- $\beta_1$  can increase the maximum tensile strength, maximum loading percentage, stiffness and maximum cross-section area of tendon-bone interface, so as to induce the fractured section to generate complex structure directly, thus promote the healing of rotator cuff tears.

**Key words:** Transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ); Rotator cuff tears; Tendon-bone healing; Biomechanics

肩袖损伤是导致肩关节疼痛和功能障碍的主要原因之一,占肩关节疾患的17%~41%,其中冈上肌腱撕裂占肩袖损伤的35%~38%。断裂点多在距离肱骨大结节止点的1 cm以内<sup>[1]</sup>,肌腱-骨界面是一个力学薄弱点。腱-骨特殊结构具有较好的抗压应力强度,应力可以从肌腱逐渐传递到骨或从骨逐渐传递到肌腱,避免造成应力集中断裂<sup>[2]</sup>。有学者提出肩袖损伤血运学说,即冈上肌腱远端1~1.5 cm的缺血区是肩袖撕裂最常发生部位,骨与肌腱的血供在此缺乏交汇吻合,肩袖肌腱细胞变性坏死、纤维样变。研究发现,转化生长因子 $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )能够增加原胶原质和弹性硬蛋白的表达以及肌腱、韧带的最大抗拉力;它还可以通过加强肌腱、韧带与骨之间的连接促进愈合,缩短重建时间及修复过程,降低周围组织的排异反应<sup>[3-4]</sup>。

本课题组通过在Wistar大鼠模型肩袖腱-骨修复界面注射以纤维蛋白为载体的TGF- $\beta_1$ 缓释复合物,考察术后界面的愈合情况,测量冈上肌腱的生物力学指标,以评价修复效果,为临床治疗提供实验支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

TGF- $\beta_1$  (No. 566406, Millpore 公司, 美国); 关节镜系统 (Stryker 公司, 美国); 射频、刨刀等动力系统, 水泵, 缝合钩、摆渡线、交换棒、穿刺针等; 直径5 mm的G II带线锚钉 (DePuy-Mitek 公司, 美国)等; 手术基本器械 (上海微创骨科医疗科技有限公司); 自制大鼠被动活动器和肩外展矫形器; 生物力学测试机 (858-MiniBionix II型, MTS 公司, 美国)等。

### 1.2 制备 TGF- $\beta_1$ 缓释复合物

TGF- $\beta_1$  剂型为1.0 mg/L的高、低剂量各10、20 mL。TGF- $\beta_1$  局部应用时,代谢快、用量大,早期呈爆发式释放,随后浓度很快下降至治疗水平以下;同时,TGF- $\beta_1$  半衰期短,难以持续发挥作用,故以纤维蛋白胶 (fibrin glue, FG) 作为 TGF- $\beta_1$  的载体,通过

FG 封闭 TGF- $\beta_1$  形成缓释体逐步释放,发挥稳定、持久的成骨诱导作用,并且可以在一定时间内维持局部高作用浓度。

### 1.3 造模

54只健康雄性Wistar大鼠(河北医科大学实验动物中心提供,动物质量合格证号:SCXL冀-2014-00105),清洁级,9月龄,体重600~650 g。

配制3%戊巴比妥钠按20 mg/kg腹腔注射麻醉,先注射总量的3/4,根据情况追加10%,直至麻醉成功。术前30 min,每只大鼠肌注头孢曲松钠注射液0.3 g以预防感染。双侧肩关节造模。沿肩关节的头侧小切口全层横断冈上肌肌腱。6周后,肩关节镜下行双排固定法缝合。腱骨界面及其间隙内注射填充TGF- $\beta_1$ 缓释复合物,10~12 s凝固。对照组除手术缝合外,不给予任何干预措施。

术后1、2、3周随机分组处死动物后,取双侧肱骨大结节,以近冈上肌腱止点为中心、各远端约3.0 cm范围为标本,修整肱骨大结节附着点与冈上肌腱,剔除多余软组织。-80℃保存备用。

### 1.4 生物力学测试

标本(冈上肌腱)解冻,测试前用湿纱布包裹-20℃保存。先行预处理,拉伸速度为0.6 mm/s,预牵拉2.5 N,MTS生物力学试验机检测标本断裂点位置。测试内容为:最大抗拉强度、最大载荷百分比、最大横断面面积、刚度、刚度百分比。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件包进行分析,数据以均数±标准差表示。进行方差齐性检验,正态分布及方差齐采用析因方差分析检验,方差不齐行Welch检验。各样本均数间两两比较采用t检验,组间样本差异不同时间点比较采用ANOVA检验,显著差异设定为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 肉眼观察

大鼠麻醉复苏后自由活动,肩外展固定器固定

7 d。术后 3 d, 每只大鼠注射头孢曲松钠注射液 0.3 g/d, 抗炎处理。3 组大鼠术后精神、饮食、运动尚可, 未见切口肿胀及感染, 无明显红肿和血性渗出物。标本均在断裂点以内。术后 2、3 周时, 高剂量组肩关节正常主动活动, 伤口渗液、愈合肿胀、挛缩情况明显好转。

## 2.2 结果分析

术后 1、2、3 周, 高剂量组腱-骨界面最大抗拉强度、最大载荷百分比、最大横断面面积、刚度与低剂量组、对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ )。术后 2 周, 高剂量组腱-骨界面最大抗拉强度、术侧/健侧最大载荷百分比、刚度及刚度百分比与低剂量组、对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ )。术后 3 周, 高剂量组最大抗拉强度、术侧/健侧最大载荷百分比、最大横断面面积与低剂量组、对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ )。术后 1、3 周, 高剂量组最大横截面积较低剂量组、对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ )。术后 3 周, 高剂量组术侧/健侧最大载荷百分比与低剂量组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ , 见表 1~3)。

术后 2 周, 高剂量组刚度、刚度百分比与低剂量组和对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ , 见表 4、5)。

表 3 术后不同时相点腱-骨界面最大横断面面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Tab. 3 Maximum cross-section area of tendon-bone interface at different periods after surgery

| 时间     | 最大横断面面积/mm <sup>2</sup> |              |                    | t/F                | P                  |
|--------|-------------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|        | 高剂量组                    | 低剂量组         | 对照组                |                    |                    |
| 术后 1 周 | 16.73 ± 2.57            | 13.56 ± 1.02 | 15.21 ± 1.23       | 2.22               | 0.001              |
| 术后 2 周 | 15.76 ± 1.14            | 12.82 ± 0.31 | 15.23 ± 0.52       | 2.53               | 0.001              |
| 术后 3 周 | 14.85 ± 3.52            | 11.44 ± 1.02 | 9.14 ± 1.06        | 1.62               | 0.001              |
| 平均     | 15.61 ± 1.47            | 13.31 ± 0.05 | 14.22 ± 1.41       | 3.17 <sup>b</sup>  | 0.025 <sup>b</sup> |
| F      | 0.531                   | 0.376        | 0.121 <sup>a</sup> | 0.133 <sup>c</sup> |                    |
| P      | 0.104                   | 0.097        | 0.301 <sup>a</sup> | 0.249 <sup>c</sup> |                    |

注: <sup>a</sup> 为时间效应 F 值与 P 值, <sup>b</sup> 为组效应 F 值与 P 值, <sup>c</sup> 为交互效应 F 值与 P 值

表 4 术后不同时相点刚度 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Tab. 4 Stiffness at different periods after surgery N · mm<sup>-1</sup>

| 分组   | 术后 1 周       | 术后 2 周                     | 术后 3 周       |
|------|--------------|----------------------------|--------------|
| 高剂量组 | 23.25 ± 3.56 | 27.83 ± 4.72 <sup>**</sup> | 24.71 ± 3.92 |
| 低剂量组 | 23.21 ± 0.68 | 24.87 ± 1.11 <sup>*</sup>  | 24.05 ± 1.41 |
| 对照组  | 23.12 ± 0.71 | 22.31 ± 0.83               | 24.01 ± 1.31 |
| F    | 12.95        | 20.71                      | 22.43        |

注: 与对照组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.05$

表 1 术后不同时相点最大抗拉强度 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Tab. 1 Results of maximum tensile strength at different periods after surgery

| 分组   | 最大抗拉强度/MPa                  |                            |                             |
|------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|      | 术后 1 周                      | 术后 2 周                     | 术后 3 周                      |
| 高剂量组 | 136.65 ± 6.85 <sup>**</sup> | 143.53 ± 8.15 <sup>*</sup> | 152.14 ± 9.35 <sup>**</sup> |
| 低剂量组 | 129.14 ± 5.01               | 135.51 ± 6.72 <sup>*</sup> | 142.04 ± 8.16 <sup>*</sup>  |
| 对照组  | 126.63 ± 5.07               | 129.22 ± 7.21              | 131.17 ± 7.06               |
| F    | 21.22                       | 22.16                      | 23.85 <sup>*</sup>          |

注: 与对照组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.05$

表 2 术后不同时相点冈上肌腱术侧/健侧最大载荷百分比 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

Tab. 2 Maximum loading percentage of operated/healthy supraspinatus at different periods after surgery

| 时间     | 最大载荷百分比/%                   |                            |              |
|--------|-----------------------------|----------------------------|--------------|
|        | 高剂量组                        | 低剂量组                       | 对照组          |
| 术后 1 周 | 35.53 ± 10.22 <sup>*△</sup> | 30.38 ± 12.31 <sup>*</sup> | 12.54 ± 6.23 |
| 术后 2 周 | 38.73 ± 7.25 <sup>*△</sup>  | 31.58 ± 6.32 <sup>*</sup>  | 22.32 ± 5.56 |
| 术后 3 周 | 43.21 ± 8.51 <sup>*△</sup>  | 35.71 ± 9.63 <sup>*</sup>  | 29.35 ± 7.73 |

注: 与对照组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$

表 5 术后不同时相点刚度百分比

Tab. 5 Stiffness percentage at different periods after surgery

| 分组        | 刚度百分比/% |        |        |
|-----------|---------|--------|--------|
|           | 术后 1 周  | 术后 2 周 | 术后 3 周 |
| 高剂量组/对照组  | 34.82   | 41.31  | 35.11  |
| 低剂量组/对照组  | 34.03   | 27.13  | 34.71  |
| 高剂量组/低剂量组 | 33.95   | 25.34  | 32.57  |

### 3 讨论

肩袖撕裂存在修复的原因在于组织挛缩和粘连、脂肪浸润,这些因素导致修复失败几率较高。近年来,许多学者提出采用组织移植及生长因子治疗肩袖损伤,目的是恢复腱-骨解剖结构和重建韧带-肌腱-骨与软骨的连接,形成具有生理性的胶原纤维组织,连接承载负荷及减缓压应力<sup>[5-6]</sup>。

本实验应用纤维蛋白胶承载的缓释复合物 TGF- $\beta_1$ ,其具有良好的组织相容性、可降解性及粘合性,胶原纤维极纤细的网架状结构有助于 TGF- $\beta_1$  缓慢释放,良好的微环境可保护重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)不发生蛋白水解,延长 TGF- $\beta_1$  局部作用时间<sup>[7]</sup>。Uhthoff 等<sup>[8]</sup> 研究发现,TGF- $\beta_1$  高浓度可增强肌腱细胞和胶原纤维的有序排列合成,重塑腱-骨交界面复合体的力学作用。Baums 等<sup>[9]</sup> 认为,一定浓度的生长因子可以增强肌腱细胞的合成能力,促进肌腱细胞和原胶原纤维组织有序排列。另一方面,作为肌腱-骨界面连接处另一端的骨组织,在修复和重塑过程中也受到拉力和压应力作用的影响<sup>[10]</sup>,而肌腱与骨的愈合通过骨长入和钙化的程度直接影响修复组织的力学强度<sup>[11-12]</sup>。

生物力学测试发现,高、低剂量组和对照组肌腱最大抗拉强度和最大载荷百分比随时间延长呈上升趋势,3组不同时间点之间具有显著差异( $P < 0.05$ ),提示腱-骨愈合随时间进展加强;3组同期肌腱最大载荷百分比比较有显著差异( $P < 0.05$ )。术后2周,3组最大载荷百分比和刚度比较,虽然对照组形成了类似正常组织的腱骨愈合,但是生物强度较低,推测与未形成明显的富含夏贝氏纤维(Sharpey's fibers)软骨性骨痂有关。

本实验证实,TGF- $\beta_1$  是骨基质中的信号蛋白,诱导单核细胞向成骨细胞分化,成膜内化骨促进新生骨的形成;促进骨组织长入移植肌腱,促进腱-骨界面愈合,诱导间充质细胞分化为成软骨细胞、骨细胞,加快肩袖损伤的内在修复,促进冈上肌腱直接止点的形成。组织学观察表明,腱-骨界面修复处有明显的新鲜血管增生和夏贝氏纤维排列,软骨性骨痂和骨性骨痂、大量新生骨小梁长入,肌腱末端纤维粗细不均紊乱向整齐有序排列转变,促进冈上肌腱直接止点的形成,提高冈上肌腱和腱-骨界面的力学强

度。TGF- $\beta_1$  明显提高腱-骨界面的抗拉载荷、抗张力强度及其刚度,促进腱骨-界面形成,加速再生组织的愈合。

### 参考文献:

- [1] Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, *et al.* Experimental rotator cuff repair. A preliminary study [J]. J Bone Joint Surg Am, 1999, 81(9): 1281-1290.
- [2] Schneeberger AG, Nyffeler RW, Gerber C. Structural changes of the rotator cuff caused by experimental subacromial impingement in the rat [J]. J Shoulder Elbow Surg, 1998, 7(4): 375-380.
- [3] Burkhart SS, Adams CR, Burkhart SS, *et al.* A biomechanical comparison of 2 techniques of footprint reconstruction for rotator cuff repair: The SwiveLock-FiberChain construct versus standard double-row repair [J]. Arthroscopy, 2009, 25(3): 274-281.
- [4] Taniguchi N, Suenaga N, Oizumi N. Bone marrow stimulation at the footprint of arthroscopic surface-holding repair advances cuff repair integrity [J]. J Shoulder Elbow Surg, 2015, 24(6): 860-866.
- [5] Gwak HC, Kim CW, Kim JH, *et al.* Delaminated rotator cuff tear: Extension of delamination and cuff integrity after arthroscopic rotator cuff repair [J]. J Shoulder Elbow Surg, 2015, 24(5): 719-726.
- [6] Bardana DD, Burks RT, West JR. The effect of suture anchor design and orientation on suture abrasion: An *in vitro* study [J]. Arthroscopy, 2003, 19(3): 274-281.
- [7] Collin P, Abdullah A, Kherad O, *et al.* Prospective evaluation of clinical and radiologic factors predicting return to activity within 6 months after arthroscopic rotator cuff repair [J]. J Shoulder Elbow Surg, 2015, 24(3): 439-445.
- [8] Uhthoff HK, Sarkar K. Surgical repair of rotator cuff ruptures the importance of the subacromial bursa [J]. J Bone Joint Surg Br, 1991, 73(3): 399-401.
- [9] Baums MH, Schminke B, Posmyk A, *et al.* Effect of single- and double-row rotator cuff repair at the tendon-to-bone interface: Preliminary results using an *in vivo* sheep model [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2015, 135(1): 111-118.
- [10] Sousa Cde O, Michener LA, Ribeiro IL, *et al.* Motion of the shoulder complex in individuals with isolated acromioclavicular osteoarthritis and associated with rotator cuff dysfunction: Part 2-muscle activity [J]. J Sports Med, 2015, 25(1): 77-83.