

• 实验研究 •

兔运动对骨软骨骨折转归的影响: MRI 表现与 MMP-13 表达

冯少仁, 孙西河, 王滨, 张颖颖, 阮玖根

【摘要】 目的:观察实验兔运动对骨软骨骨折转归影响及骨片覆盖软骨 MMP-13 表达,探讨骨软骨骨折与剥脱性骨软骨炎的关系。**方法:**随机选用 30 只月龄及体重相近的健康新西兰大白兔,雌雄不限;试验组 20 只建立兔膝股骨髁骨软骨骨折模型,假手术对照组 10 只,所有模型均不进行内固定及外固定。术后即进行术侧膝关节间歇主动活动(IAM)与间歇被动活动(IPM);术后 1、2 周分别从试验组中随机抽取 10 只实验兔行 MRI 检查、大体观察、组织学检查,假手术对照组 10 只于术后 2 周行上述检查。MRI 扫描序列包括 TSE-T₁WI、TSE-T₂WI、T₂WI/SPAIR、3D/WATSc/FFE/T₁WI。**结果:**术后 1、2 周,骨折线均清晰,骨软骨骨折片移位 14 (14/20);骨片覆盖软骨术后 2 周较术后 1 周损伤重($P<0.05$);骨折区成纤维细胞数术后 2 周较术后 1 周多($P<0.05$)。术后第 2 周,股骨髁骨折处骨质增生,MRI 示薄层低信号,骨片内部分骨小梁坏死;骨片覆盖软骨 MMP-13 表达,术后 2 周较术后 1 周表达程度明显增高($P<0.05$),对照组仅 2 (2/10)只轻度表达。**结论:**运动可使兔股骨髁骨软骨骨折愈合不佳,术后 2 周变化类似剥脱性骨软骨炎的特点;骨软骨骨折后骨片覆盖软骨 MMP-13 表达升高,对临床治疗骨软骨骨折及评价预后具有重要意义。

【关键词】 骨软骨骨折;磁共振成像;剥脱性骨软骨炎

【中图分类号】 R445.2; R683 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2010)04-0358-04

Influence of movement on outcome of osteochondral fracture in rabbits; MRI features and MMP-13 expressions FENG Shao-ren, SUN Xi-he, WANG Bin, et al. Department of MRI, the People's Hospital of Jiangxi Xinyu, Jiangxi 338025, P. R. China

【Abstract】 Objective: To observe the influence of movement on outcome of osteochondral fracture and the expression of MMP-13 in the covering cartilage of bone flap and to explore the relationship between the osteochondral fracture and the osteochondritis dissecans. **Methods:** Thirty Newzealand rabbits were chosen randomly, whose weight was close to each other, and whose gender was not restricted. We made osteochondral fracture models of 20 rabbits, another 10 rabbits received unilateral knee arthrotomy as pseudoperation controls. All models were not treated by internal or external fixation. Then, the knee on the model side was enforced to do intermittent passive and active movement. Ten experimental rabbits were chosen after one week and two weeks respectively and randomly and received MRI examination, pathological observation and histological examination respectively. MRI sequences included TSE-T₁WI, TSE-T₂WI, T₂WI/SPAIR, 3D/WATSc/FFE/T₁WI. **Results:** In one and two weeks points after damaging, the fracture lines were clear and osteochondral fragment displaced in 14 cases (14/20). In two weeks point, the obducent cartilage of bone fragment was worse than that in one week ($P<0.05$). In two weeks point, the number of fibroblasts in fracture zone was greater than that in one week point ($P<0.05$). In two weeks point, the fracture of the femoral condyles presented obvious hyperosteogeny, MR images showed lamellar low signals, and part of bone trabeculae in bone fragment showed necrosis. The control group had no changes. The covering cartilage of bone flap expression of MMP-13 was higher two week later than one week later, while in the control group there was only slight expression in 2 rabbits (2/10). **Conclusion:** The influence of movement on osteochondral fracture is obvious which brings the fracture healing below normal standard. MRI features and pathological changes of osteochondral fracture were similar to osteochondritis dissecans in two weeks point. The increase of MMP-13 expression of the covering cartilage of bone flap is of significance for clinical therapy.

【Key words】 Osteochondral fracture; Magnetic resonance imaging; Osteochondritis dissecans; Experimental research

骨软骨骨折是指外伤后关节软骨合并软骨下骨发生的小骨折,临床上较常见,好发于青少年;剥脱性骨软骨炎是指由各种原因导致的局部关节软骨及其软骨下骨与母骨分离为特征的一类关节疾病,好发年龄 10~20 岁,至今病因未明,多数学者认为与外伤有关,

如不及时治疗可使骨关节炎的发生提前 10 年。骨软骨骨折后骨片覆盖软骨基质金属蛋白酶变化情况,至今未见报道,因此,正确认识骨软骨骨折转归及骨片覆盖软骨金属蛋白酶变化情况,对探讨剥脱性骨软骨炎病因及骨软骨骨折治疗将起重要作用。

材料与方法

1. 实验动物

30 只健康新西兰大白兔(山东省农科院提供),雌

作者单位: 338025 江西,新余市人民医院 MR 室(冯少仁、阮玖根); 261031 山东,潍坊医学院附属医院影像中心(孙西河、王滨、张颖颖)

作者简介: 冯少仁(1967-),男,江西崇仁人,硕士研究生,副主任医师,主要从事骨关节影像诊断与研究。

通讯作者: 孙西河, E-mail: sunxihe8130@163.com

雄不限,兔龄 5~6 个月,体重 2.5~3.0 kg。

2. 实验方法

模型建立及活动方式:用 10% 的水合氯醛 (3 mg/kg) 行兔腹腔注射麻醉。将其仰卧于手术台上,经膝关节内侧切口显露股骨髁,20 只以骨凿凿取 4 mm×4 mm 大小并深达软骨下 3 mm 的骨软骨片,创面撒青霉素粉预防感染后将骨软骨片放回原处,对照组 10 只仅切开关节囊而不进行骨软骨骨折,彻底止血后缝合;术后即进行术侧膝关节间歇被动活动 (intermittent passive motion, IPM) 与间歇主动活动 (intermittent active motion, IAM)。IAM 组:兔在笼内间断自由活动;IPM 组:术后第 1 周,每天活动 2 次,持续 5 min,活动范围 40°~45°,术后第 2 周,持续时间延长至 10 min,活动范围 90°~100°,活动方向同前。每次被动活动前均用 75% 酒精消毒手术伤口。术后每天每只大白兔肌注 40 万青霉素预防感染 4 天,分笼饲养,每笼 1 只。

MRI 检查:分别于术后第 1 周和第 2 周随机各抽取实验兔 10 只行术侧膝关节 MRI 检查;对照组于术后第 2 周行 MRI 检查。采用荷兰 Philips 公司 Achieva Noval Dual 1.5T 超导型双梯度磁共振检查系统,选用 Micro-47 mm 高分辨表面线圈。兔麻醉后俯卧将线圈置于膝关节前部,行膝关节矢状面、轴面扫描。

大体病理观察及检验材料收取:MRI 检查完毕后即刻行兔耳缘静脉注入空气猝死。切开膝关节,肉眼观察并取照;然后用摆锯锯取骨软骨片所在之股骨内侧髁(范围:以骨软骨片为中心外 1.0 cm),对照组取同样部位,放入 10% 的甲醛液内固定。1 周后,将组织脱钙,石蜡包埋,5 μ m 连续切片,HE 常规染色和 ABC 法免疫组织化学染色。

3. 结果分析原则与步骤

30 只实验兔术后饮食良好,麻醉醒后在笼内自由间断活动,术后病程观察均无脓毒症,且均进入实验程序。

MRI 资料分析:由 2 位资深影像学专家进行双盲阅片,观察内容为骨软骨骨折愈合情况、骨片覆盖软骨变化。

骨片覆盖软骨病变,按 Yulish 的 MRI 分级法进行分类。I 级:关节软骨内异常低信号,关节表面尚光滑;II 级:关节表面不规则伴有软骨丢失,但小于软骨厚度的 50%;III 级:关节软骨表面严重不规则,软骨丢失达软骨厚度 50% 以上,但小于 100%;IV 级:关节软骨完全丢失。

组织学资料分析:观察兔骨软骨骨折修复组织的组织学特性及覆盖软骨变化,由 2 位资深病理学专家以双盲法分析。

骨片覆盖软骨的病理改变按 Brittberg 分级标准:0 级,关节面光滑完整,软骨细胞结构、形态、排列正常;I 级,关节面粗糙,软骨软化,软骨细胞坏死伴增生;II 级,关节软骨破坏,软骨缺损不超过软骨层的 1/2 层;III 级,软骨缺损深达软骨深层但不超过钙化层;IV 级,软骨破坏深达软骨钙化层,甚至软骨下骨也遭破坏。

骨片覆盖软骨免疫组织化学染色资料分析:软骨细胞胞浆内呈棕黄色为 MMP-13 阳性表达。参考 Pelletier 的分度方法,在软骨结构完整的区域随机选取 6 个高倍镜视野($\times 400$ 倍),其中 3 个位于软骨浅表层和移行层,3 个位于深层和钙化层;计算每个视野内阳性细胞数和细胞总数。MMP-13 表达用阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示,得分 $\leq 25\%$ 者,为轻度表达;得分 25%~50% 者,为中度表达;得分 $> 50\%$ 者,为高度表达。在同一骨软骨骨折切片内,骨片覆盖软骨的 MRI 表现、病理变化以级数高为准。

大体病理观察:骨软骨片移位、骨片覆盖软骨颜色、骨折线。

4. 统计学分析方法

骨折区成纤维细胞数值比较采用两样本均数 t 检验;等级有序资料的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,骨片覆盖软骨 MMP-13 表达用四格表资料的确切概率法。以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准,均使用简明统计软件 10.34 完成。

结 果

1. 大体病理观察

术后第 1 周:骨软骨片移位 6 只(6/10),骨片覆盖软骨表面粗糙,色泽淡黄,骨折线清晰可见。术后第 2 周:骨软骨片移位 8 只(8/10);骨片覆盖软骨表面粗糙,部分骨质裸露,色泽晦暗并有少量污秽,骨折线仍清晰可见(图 1)。

2 MRI 表现

术后第 1、2 周,骨折线均清晰,于 T₁WI 上呈线状低信号、T₂WI 上线状高信号;骨片周围骨髓水肿,于 T₂WI/SPAIR 上呈片状高信号影。3D/WATSc 示:骨片覆盖软骨粗糙、变薄,部分缺损。术后第 2 周, MRI 示股骨髁骨折面薄层低信号(图 2)。

3. 组织学观察

观察术后第 1、2 周骨折区成纤维细胞:随机挑选 6 个高倍镜视野($\times 400$ 倍),计算骨折区每个视野内成纤维细胞数量,以均数 $\pm$ 标准差表示,结果发现术后第 2 周骨折区成纤维细胞数较术后第 1 周多(图 3),二组比较有统计学意义($P < 0.05$)。

骨片覆盖软骨病理变化(表 1):术后第 1 周 I 级 3 只(3/10)、II 级 6 只(6/10),均位于骨折线附近;术后

2 周Ⅱ级 1 只(1/10)、Ⅲ级 5 只(5/10)、Ⅳ级 4 只(4/10),位于骨折线附近及骨片中心区域,二组比较有统计学意义($P<0.05$);从表 1 中可知,术后第 2 周较术后第 1 周骨片覆盖软骨损伤重(图 4)。

表 1 试验组兔膝骨片覆盖软骨的病理变化 (只)

病理分级	术后第 1 周	术后第 2 周
0 级	1	0
I 级	3	0
Ⅱ级	6	1
Ⅲ级	0	5
Ⅳ级	0	4
合计	10	10

注: $t=113.00, P<0.001$ 。
对照组大体病理观察、MRI 与组织学检查关节软骨及软骨下骨均未见异常变化。
对照组和试验组两组兔膝骨折片覆盖软骨 MMP-13 表达见表 2。

表 2 两组兔膝骨折片覆盖软骨 MMP-13 表达 (只)

组别	只数	软骨 MMP-13 表达			
		无表达	轻度	中度	高度
对照组	10	8	2	0	0
试验组					
术后第 1 周	10	0	5	2	3
术后第 2 周	10	0	1	3	6

注:试验组术后第 1 周与对照组比较, $P<0.05$;术后第 2 周与对照组比较, $P<0.05$;术后第 1 周与术后第 2 周比较, $P<0.05$ 。

从表 2 中可知,术后第 2 周较术后第 1 周 MMP-13 表达的程度明显增高(图 5、6)。

讨 论

1. 骨软骨骨折转归过程中骨片覆盖软骨细胞内 MMP-13 的表达

MMP-13 在骨性关节炎、类风湿性关节炎软骨细胞内表达及其与关节软骨病损程度相关性文献报道较多^[1,2]。然而,目前尚未见骨软骨骨折转归过程中,骨片覆盖软骨 MMP-13 表达及与骨折转归相关性文献报道。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)属于锌肽酶超家族,是一类结构高度同源的内肽酶,广泛分布于植物、动物中,在正常稳态组织中 MMP 表达较低,而在炎性细胞因子、生长因子、创伤等刺激下以及细胞转化过程中其表达量上升,活性加强。因此,其参与了多种病理过程,如炎症、创伤、细胞坏死、血管形成和肿瘤侵袭转移等^[3]。依据它们各自的特异底物、初级结构和细胞定位,MMP 分子可分为 5 个大家族,依次为胶原酶、明胶酶、基质降解酶、基质溶解酶和膜型 MMP 分子。胶原酶主要包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13,它们可以特异地识别天然纤维性胶原(I 型、Ⅱ型、Ⅲ型);其中 MMP-13 可以直接降解关节软骨基质中最具特征、含量最多的Ⅱ型胶原。据文献报道,MMP-13 对Ⅱ型胶原的裂解活性是 MMP-1

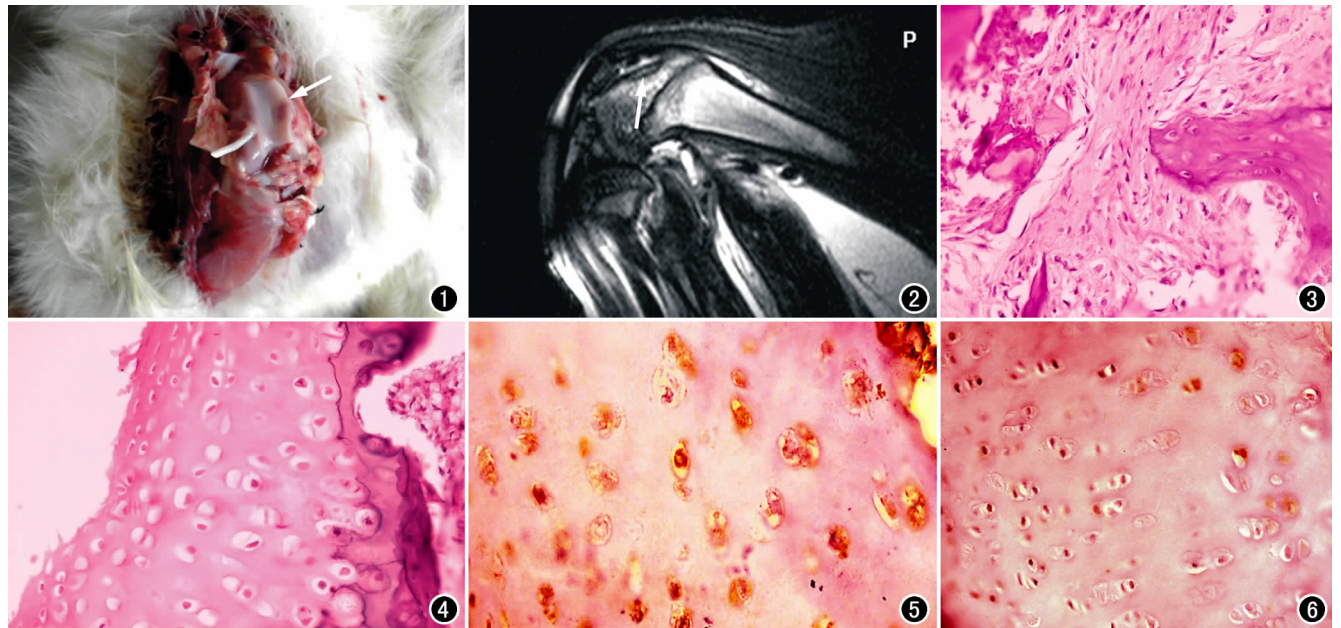


图 1 术后第 2 周试验兔大体观察:骨软骨片移位(箭),骨片覆盖软骨表面粗糙,色泽淡黄晦暗,骨折线清晰。图 2 术后第 2 周,矢状面 T₂WI SPAIR,示骨折线清晰(箭),骨软骨片周围骨髓水肿,呈片状高信号,股骨髁骨折线处有薄层低信号。图 3 术后第 2 周,病理片示骨折区成纤维细胞多(×400,HE)。图 4 病理片示骨片覆盖软骨破坏,软骨缺损不超过软骨层的 1/2 层(为Ⅱ级损伤),骨片覆盖软骨 MMP-13 表达(×400,HE)。图 5 软骨细胞胞浆呈棕黄色为 MMP-13 阳性表达,表达得分大于 50%为高度表达(×400)。图 6 软骨细胞胞浆呈棕黄色为 MMP-13 阳性表达,表达得分小于 25%为轻度表达(×200)。

的 5~10 倍^[4,5],而且其他许多 MMP 亚型对 II 型胶原降解需要通过 MMP-13 起作用。MMP-13 可将完整的 II 型胶原降解成胶原片断,然后再由其他金属蛋白酶对片断进一步降解。可以认为 MMP-13 的变化最能反映出软骨基质的代谢变化,是关节软骨破坏中的限速酶。本实验研究发现,术后 1 周 MMP-13 表达以轻度为主,术后第 2 周以中、重度为主。经 MRI 及病理检查骨片覆盖软骨术后第 2 周较术后第 1 周损伤重($P<0.05$),因此,MMP-13 在骨片覆盖软骨的表达与骨折转归存在一定的相关性,即软骨损伤越重,MMP-13 表达越高,反之亦然。本组试验手术虽可引起关节创伤,但因术中止血彻底,且动物伤口愈合较快,对照组仅 2 只(2/10) MMP-13 轻度表达,可以认为试验结果与手术没有关系。

2. 骨软骨骨折与剥脱性骨软骨炎的关系

部分学者认为二者有区别:我国学者赵涛等^[6]、国外学者 Jessica 和 Bradley 等^[7,8]认为,骨软骨骨折不同于剥脱性骨软骨炎。骨软骨骨折有急性损伤病史,突然发生,骨块边缘不整齐,且 MRI 检查显示骨折区因髓内损伤有大范围水肿,关节腔内有积血,易与剥脱性骨软骨炎鉴别。

另一部分学者认为二者无区别:Nagura (1937 年)和 Langenskiold (1955 年)用兔做实验和 Rehbein (1950 年)使用机械装置重复撞击成年狗膝关节前部,损伤股骨髁,放射学和组织学检查显示损伤区骨和软骨坏死与剥脱性骨软骨炎表现一致。Aichroth 等^[9]于 1971 年用新西兰大白兔在股骨内侧髁制成各式各样的骨软骨骨折,结果显示一部分骨软骨骨折愈合,一部分未愈合,未愈合的骨软骨骨折与人体剥脱性骨软骨炎非常相似。最近,Krappel 等^[10]报道肱骨小头骨挫伤导致剥脱性骨软骨炎,受伤时 MRI 显示肱骨小头骨挫伤,12 周后,由于患者主诉肘关节桡侧疼痛,活动受限,经再次 MRI 检查,发现 II 期剥脱性骨软骨炎,说明急性外伤可导致剥脱性骨软骨炎。至于骨软骨骨折发生的位置,Aichroth 和 Kennedy 等^[9,11]通过尸体实验证实骨软骨骨折可发生在膝关节任何部位,包括剥脱性骨软骨炎好发的部位,即股骨内侧髁外侧面后部。

本研究采用青年新西兰大白兔做实验,骨软骨骨折后立即进行主动和被动活动,与国外学者所做实验的运动方式不同,他们均未采取间歇被动运动,因而与

临床上患者关节受伤后进行的活动方式存在较大差距;再之,他们都未检测软骨内基质金属蛋白酶的的变化,因此,本实验结果更能较全面反映骨软骨骨折后变化,实验结果支持上述结论。

总之,骨软骨骨折后,MMP-13 表达升高,且其表达与骨折转归存在一定的相关性,即软骨损伤越重,MMP-13 表达越高,为骨软骨骨折治疗及评价预后具有重要意义,并为将要进行下一步实验软骨移植探讨打下坚实基础。通过本实验再一次证实骨软骨骨折与剥脱性骨软骨炎存在较为密切的关系。

参考文献:

- [1] 张超,王旭,姜建元,等. MMP-1、13mRNA 和 DDR2 表达与关节软骨退变的关系[J]. 复旦学报(医学版),2007,34(1):126-127.
- [2] 夏睿,董启榕,戴检英,等. 兔创伤性骨性关节炎软骨细胞中基质金属蛋白酶-13 表达增加[J]. 基础医学与临床,2007,27(2):202-203.
- [3] Kleiner DE, Stetler-stevenson WC. Matrix metalloproteinases and metastasis[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 43 (Suppl): 42-51.
- [4] Kleiner DE, Steler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinase [J]. Curr Opin Cell Biol, 1993, 5(2):891-896.
- [5] Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagenases in osteoarthritic cartilage[J]. J Clin Invest, 1997, 99(4):1534-1539.
- [6] 赵涛,翁磊,尤玉华,等. 膝关节外伤性骨软骨骨折的 X 线和 MRI 表现[J]. 中华放射学杂志,2003,37(11):985-988.
- [7] Jessica S, Baum. Atraumatic osteochondral fracture and osteoarthritis in a colle-geiate volleyball player: a case report[J]. J Athc Training, 2000, 35(1):80-85.
- [8] Bradley J, Dandy D. Osteochondritis dissecans and other lesions of the femoral condyles[J]. J Bone Joint Surg, 1989, 71(4):518-522.
- [9] Aichroth P. Osteochondral fractures and their relationship to osteochondritis dissecans of the knee: an experimental study in animals[J]. J Bone Joint Surg, 1971, 53(3):448-454.
- [10] Krappel FA, Bauer E, Harland U. Are bone bruises a possible cause of Osteochondrtis dissecans of the capitellum? a case report and review of the literature[J]. J Arch Orthop Trauma Surg, 2005, 125(80):545-549.
- [11] Kennedy JC, Wayne RG, Robert W. Osteochondral fractures of the femoral condyles[J]. J Bone Joint Surg, 1966, 48(3):436-440.

(收稿日期:2009-06-22 修回日期:2010-01-15)