

续筋接骨液与自体富血小板血浆促进兔肩袖腱骨界面愈合的实验研究

谢求恩¹ 何江² 谢心军¹ 徐永贵¹ 郭彦涛¹ 刘鑫¹ 张博²

[摘要] **目的:**探讨续筋接骨液与自体富血小板血浆(APRP)对兔肩袖重建术后腱骨愈合的促进作用及其作用机制。**方法:**选用 45 只健康的新西兰大白兔随机分为 A,B,C,D,E 共 5 组,每组各 9 只。A 组为正常组,B 组为模型组,C 组为续筋接骨液组,D 组为 APRP 组,E 组为续筋接骨液+APRP 组。A 组不做任何处理;B 组、C 组双侧肩关节成功制作出肩袖损伤模型后,B 组予以生理盐水灌胃 8 周,C 组予以续筋接骨液灌胃 8 周;D 组、E 组在双侧建立肩袖损伤模型并进行肩袖重建手术后予以 APRP 凝胶局部应用再逐层缝合伤口,术后 D 组予以生理盐水灌胃 8 周,E 组予以续筋接骨液灌胃 8 周。分别于 2,4,8 周处死每组中各 3 只兔,观察其组织学染色、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达并进行生物力学测定。**结果:**苏木精-伊红染色结果:正常网上肌腱纤维呈排列规整,可见肌腱纤维、纤维软骨、钙化纤维软骨、骨的典型四层结构。肩袖重建术后第 2 周,C,D,E 组炎症反应明显轻于 B 组,且有一定量的新生血管生成。肩袖重建术后第 4 周,B 组腱骨面开始疏松结合,C,D,E 组结合较 B 组紧密,且类圆形软骨细胞较模型组明显增多,胶原纤维排列较规整,而 E 组可见排列较规则的胶原纤维与类圆形软骨细胞相互渗透生长。肩袖重建术后第 8 周,C,D,E 组的腱骨结合面明显较 B 组紧密,均可见新骨形成。免疫组化结果:VEGF 及 bFGF 在正常兔的肩袖腱骨面几乎不表达。造模后第 2 周及第 4 周,B,C,D,E 组 VEGF 及 bFGF 的表达水平明显高于 A 组,但 C,D,E 组 VEGF 及 bFGF 高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$),且 E 组 VEGF 及 bFGF 的表达水平高于 C,D 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。造模后第 8 周,B,C,D,E 组 VEGF 及 bFGF 的表达水平下降,但仍明显高于 A 组,差异有统计学意义($P<0.05$),而各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。生物力学测定结果:B,C,D,E 组所有标本最大负荷时均断裂在网上肌止点缝合处。在各时间点,A 组的最大负荷值明显高于 B,C,D,E 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。肩袖重建术后第 2 周,B,C,D,E 各组间最大负荷差异均无统计学意义。肩袖重建术后第 4 周及第 8 周,C,D,E 组的最大负荷值均明显高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$),C,D 组间最大负荷值,差异无统计学意义($P>0.05$),E 组的值明显高于 C,D 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**续筋接骨液与 APRP 均能促进肩袖腱骨愈合,其作用机制可能与上调 VEGF 及 bFGF 的表达有关;续筋接骨液与 APRP 联合应用促进肩袖腱骨愈合的能力优于二者单独应用。

[关键词] 续筋接骨液;自体富血小板血浆;肩袖;腱骨愈合

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)08-0001-07

Experimental Study on the Auxo-action of Xujin Jiegu

Liquid and APRP on Tendon Bone Healing of Rabbit Rotator Cuff

XIE Qiuen¹ HE Jiang² XIE Xinjun¹ XU Yonggui¹ GUO Yantao¹ LIU Xin¹ ZHANG Bo²

¹ The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

² Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of Xujin Jiegu liquid and APRP on tendon bone healing after rotator cuff reconstruction in rabbits and its mechanism. **Methods:** 45 healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into five groups of A, B, C, D and E, with 9 cases in each group. Group A was the normal group, group B was the model group, group C was the Xujin Jiegu liquid group, group D

基金项目:2017 年湖南省教育厅科学研究项目(17C1225)

¹ 湖南中医药大学第一附属医院(长沙,410007)

² 湖南中医药大学

was the APRP group, and group E was the Xujin Jiegu liquid + APRP group. Group A accepted one treatment. After the rotator cuff injury models were successfully made in the bilateral shoulder joints of group B and C, group B was administered with saline for 8 weeks, and group C was administered with Xujin Jiegu liquid for 8 weeks. In group D and E, a rotator cuff injury model was established on both sides and rotator cuff reconstruction were performed. APRP gel was applied locally and the wound was well sutured. Group D was administered with saline for 8 weeks, and group E was administered with Xujin Jiegu liquid for 8 weeks. 3 rabbits in each group were killed at the 2nd, 4th and 8th week respectively, and their histological staining, expression of VEGF and bFGF and the biomechanical measurements were detected. **Results:** HE staining showed that the tendon fibers of normal supraspinatus muscle were arranged regularly, and the typical four-layer structure including tendon fibers, fibrocartilage, calcified fibrocartilage and bone were observed. At the 2nd week after rotator cuff reconstruction, the inflammatory reaction in group C, D and E was significantly lighter than that in group B, and there was a certain amount of neovascularization. At the 4th week after rotator cuff reconstruction, the osseous surface of tendon began to bind loosely in group B. Group C, D and E were more compact than group B, and the number of round chondrocytes in group E was significantly more than that in model group, and the arrangement of collagen fibers was more regular. In group E, the regular arrangement of collagen fibers and round chondrocytes infiltrated into each other. On the 8th week after rotator cuff reconstruction, new bone formation was found in group B, C, D and E, and the tendon bone interface in group C, D and E were more compacted as compared with that of group B. Immunohistochemical results showed that VEGF and bFGF were almost not expressed on the osseous surface of rotator cuff tendon in normal rabbits. At the 2nd and 4th week after modeling, the expression level of VEGF and bFGF in group B, C, D and E were significantly higher than that in group A. The level of VEGF and bFGF in group C, D and E were higher than that in group B ($P < 0.05$), and the expression of VEGF and bFGF in group E were higher than that in group C, D ($P < 0.05$). At the 8th week after modeling, the expression of VEGF and bFGF in group B, C, D and E decreased. But they are still significantly higher than that in group A ($P < 0.05$), but there was no significant difference among group B, C, D and E ($P > 0.05$). Biomechanical results: all specimens in group B, C, D and E were ruptured at the sutures of supraspinatus muscle at the maximum load. At each time point, the maximum load of group A was significantly higher than that of group B, C, D and E ($P < 0.05$). At the 2nd week after rotator cuff reconstruction, there was no significant difference in maximum load among groups B, C, D and E. At the 4th and 8th week after rotator cuff reconstruction, the maximum load values in group C, D and E were significantly higher than those in group B ($P < 0.05$), but there was no significant difference between group C and D ($P > 0.05$). The value in group E was significantly higher than that in group C and D ($P < 0.05$). **Conclusion:** Both Xujin Jiegu liquid and APRP can promote the healing of the rotator cuff tendon-bone interface, and its mechanism may be related to up-regulating the expression of VEGF and bFGF. The combined application of Xujin Jiegu liquid and APRP is better than only application of two.

Keywords: Xujin Jiegu liquid; autologous platelet-rich plasma; rotator cuff; tendon bone healing

随着运动医学发展,肩袖损伤修复手术技术日益成熟,但术后仍存在较高的再撕裂发生率^[1-2]。因此不少研究者在如何促进腱骨界面的愈合,提高手术成功率方面做出了大量探索,其中 APRP 应用于肩袖修复得到广泛关注,但人体的实验结果存在一定争议^[3]。续筋接骨液是我院根据多年临床经验研制而成,应用于肩袖损伤临床疗效显著^[4]。因此,本研究通过建立兔肩袖损伤模型,探讨续筋接骨液与 APRP 联合应用对肩袖腱骨愈合的促进作用及作用机制,为临床推广应用提供实验依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45 只体健的新西兰大白兔被选定为本次实验动物,统一为雄性。由湖南中医药大学东塘动物实验中心代为采购,均为普通级且全部兔子骨髓俱发育成熟,体质量 2.0~2.5 kg,3 个月龄。出售单位为湖南太平

生物科技有限公司,许可证号为 SCXK(湘)2015-0004,实验单位许可证号为 SYXK(湘)2013-0005。饲料由湖南中医药大学东塘动物实验中心提供。采用普通饲料,定时、定人、定量单笼饲养。术前观察 1 周,确认无疾病。

1.2 实验药物与试剂

续筋接骨液(生产批号 20170316);生理盐水(国药准字 H43020173,产品批号 B17103101d);VEGF 试剂盒(生产编号 bs-0217R,北京博奥森生物技术有限公司);bFGF 试剂盒(生产编号 bs-0219R,北京博奥森生物技术有限公司)。实验所需 APRP 凝胶,目前国内外多参照 Sonnlleither 法制作,本次实验亦采用此法。

1.3 实验仪器、设备

主要仪器、设备包括:医用净化工作台(苏州医疗器械七厂)、离心机(德国 eppendoff 公司)、超低温冷冻存储箱(中科美菱)、充电式多功能电钻(盐城瑞奥科

技术有限公司)、MTS858 生物力学试验机(美国 MTS 系统公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组 选用 45 只健康的新西兰大白兔随机分为 A、B、C、D、E 共 5 组,每组各 9 只。A 组为正常组,B 组为模型组,C 组为续筋接骨液组,D 组为 APRP 组,E 组为续筋接骨液+APRP 组。

1.4.2 造模 研究肩袖损伤的动物模型较多^[5-7],本实验肩袖损伤模型建立方法参考文献^[8]。具体操作:在同一时间无菌的条件下,将兔固定于手术台上。以 20%氨基甲酸乙酯 4 mL/kg 在耳缘静脉注射,以施行全身麻醉。麻醉成功后,兔子被置于俯卧位。皮肤准备,清洁,常规消毒,铺无菌巾。在肩关节处做了约 2 cm 长的纵向手术切口。三角肌直接钝性分离,显示大结节上冈上肌肌腱的终止点。用缝线标记冈上肌肌腱,以便于在肩袖重建术中寻找切断的肌腱。再锐性切断冈上肌肌腱,并切掉 5 mm×5 mm 的肌腱组织,建立全层肩袖损伤的模型。检查无活动性出血后,闭合伤口。术后单笼关闭,不予以固定前肢,持续 3 d 青霉素 20 万单位肌肉注射,1 周后行肩袖重建手术。

1.4.3 APRP 凝胶的制备 肩袖损伤重建手术前 1 d,参照 Sonnleither 法在无菌条件下制作 APRP 凝胶,APRP 组和续筋接骨液+APRP 组总共 18 只兔子编好号。选取试管,分别将其对应好每只兔子,做好编号。具体流程:全身麻醉成功后,先取 10 mL 注射器,装好 1 mL 枸橼酸钠抗凝剂。再从兔耳中动脉抽取 8 mL 血液装入其中。将其混合均匀后,置于离心试管中。第 1 次 160g 离心 20 min,离心完毕后,可见全血被分为 2 层。底层为红细胞,上面一层为清液。且可见一浅黄色的薄层位于这 2 层的交界处。这一部分即 APRP 层。取另一离心试管,将交界面下红细胞 6 mL 以上全部上清液吸取出来,至于其中,混合均匀。第 2 次 400g 离心 15 min 后,吸出 3/4 上清液,余下 1 mL 摇匀即为 APRP。采用 1 000 U 凝血酶与 1 mL 质量分数为 10%的氯化钙混合配制成 0.1 mL 凝血剂。用 2 mL 注射器先后吸入 1 mL APRP,0.1 mL 凝血剂以及少量空气。6~10 s 后即凝固形成 APRP 凝胶。

1.4.4 肩袖重建术 造模成功 1 周后进行肩袖损伤重建手术。具体手术方法:麻醉成功后,沿原切口暴露冈上肌肌腱断裂端,将肌腱松解,使肌腱被拉回大结节的终止点而不受张力。于大结节的表面去皮质以获得更好的恢复条件。用克氏针,直径 1 mm,在大结节上做两个骨孔,应用改良的 Mason-Allen 方式,用 2 号缝线将肌腱缝合到原来的解剖止点处。确保缝合线牢固。查组织无明显出血后闭合伤口。APRP 组以及续

筋接骨液+APRP 组,在腱骨界面及其间隙内填充 APRP 凝胶。手术后,单笼关闭,均不予以固定。术后 3 d 均予以青霉素 20×10⁵ U 肌肉注射。药物干预从术后第 3 天开始。

1.4.5 药物干预 A 组:正常组,等剂量标准生理盐水灌胃,2 次/d,持续至肩袖重建术后第 8 周。

B 组:模型组,等剂量标准生理盐水灌胃,2 次/d,持续至肩袖重建术后第 8 周。

C 组:续筋接骨液组,严格按照续筋接骨液使用方法灌胃,2 次/d,持续至肩袖重建术后第 8 周。

D 组:APRP 组,等剂量标准生理盐水灌胃,2 次/d,持续至肩袖重建术后第 8 周。

E 组:续筋接骨液+APRP 组,严格按照续筋接骨液使用方法灌胃,2 次/d,持续至肩袖重建术后第 8 周。

给药剂量参照《药理实验方法学》中人-兔等效剂量折算公式($D_2 = D_1 \times K_2 / K_1 \times W_2 / W_1$,其中 D 为药物剂量, K 为常数, W 为动物体质量(kg), D_1 指人; D_2 指动物,人 $K_1 = 1.6$,兔 $K_2 = 10.1$)计算得出兔每次灌胃给药剂量(按 10 mL/kg 标准计算)。正常组、模型组和 APRP 组术后每日予等剂量标准的生理盐水灌胃(按 10 mL/kg 标准计算)。术后动物分笼饲养,并进行预防感染处理。分别于术后第 2,4,8 周将动物分批处死,每组每次处死 3 只。

1.4.6 取材 取重建的冈上肌肌腱的腱骨止点周围 3 cm 范围内,包括腱骨结合部的肱骨大结节组织以及肌腱组织,在冈上肌重建止点 3 cm 处横向截取冈上肌肌腹组织。修整并剔除多余软组织。4%多聚甲醛组织固定液浸泡保存待用。

1.4.7 观察内容及指标

1.4.7.1 组织学观察 苏木精-伊红染色观察腱骨界面愈合情况。切片在恒温箱中烤干,再经脱蜡染色,显微镜下观察、拍照。

1.4.7.2 免疫组化检查 VEGF 及 bFGF 的表达 应用链霉菌抗生物蛋白-过氧化物酶连结(Streptavidin-peroxidase,SP)法,以细胞质或(和)细胞核中着棕色者为阳性细胞,再用 Image-Pro Plus6.0 测取平均光密度(Mean Optical Density,MOD)为指标,MOD 值越大表示 VEGF 以及 bFGF 的表达越多。

1.4.7.3 生物力学检测 标本固定后应用 MTS 生物力学试验机进行生物力学拉伸试验,拉伸速度为 0.6 mm/s,强度为 2.5 N,记录腱骨界面承受的最大抗拉力值。

1.5 统计学方法

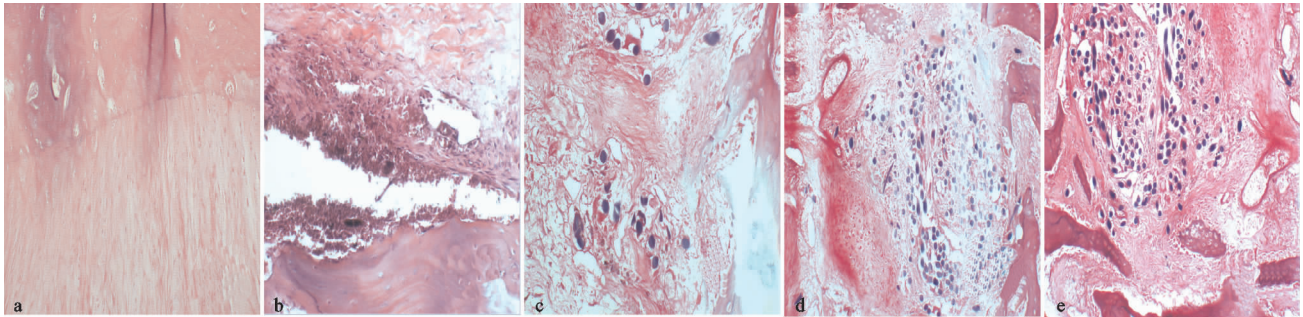
本实验数据采用 SPSS22.0 进行分析,计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用方差分析进行总体比较,组间两两比较采用 LSD- t 检验, $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 组织学观察结果

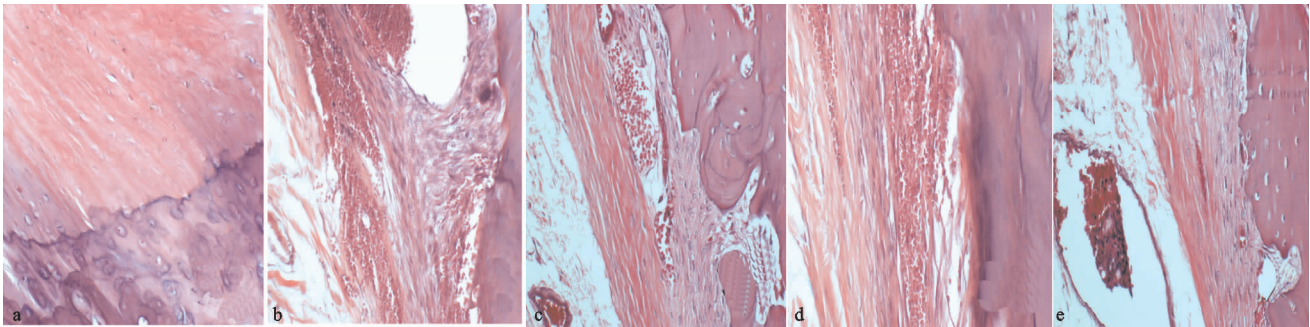
肩袖重建术后第 2 周,C,D 和 E 组炎症反应明显轻于 B 组,且有一定量的新生血管生成,见图 1。肩袖重建术后第 4 周时,B 组腱骨面开始疏松结合,C,D 和

E 组结合较 B 组紧密,且类圆形软骨细胞较模型组明显增多,且胶原纤维排列较规整,而 E 组可见排列较规则的胶原纤维与类圆形软骨细胞相互渗透生长,见图 2。肩袖重建术后第 8 周时,C,D 和 E 组的腱骨结合面明显较 B 组紧密,均可见新骨形成,见图 3。



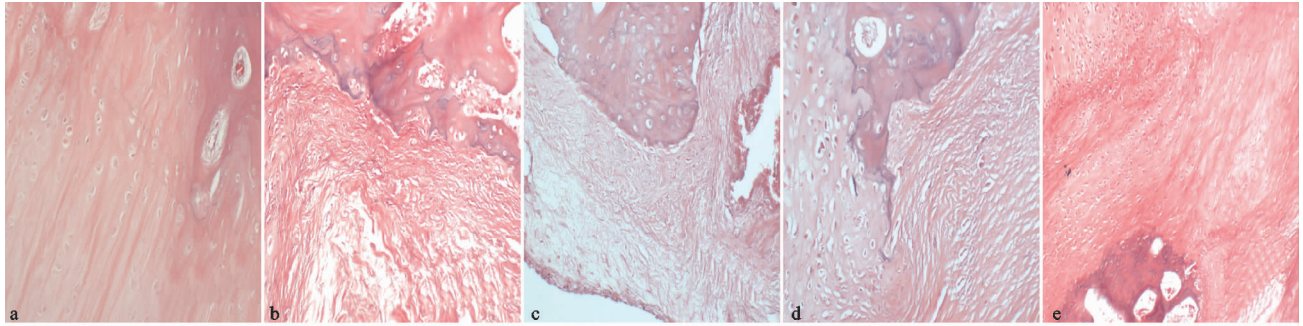
(a)正常组;(b)无明显愈合趋势,炎症反应重,无明显新生血管;(c)~(e)开始结合,可见一定量的新生血管,且炎症反应明显均较模型组轻

图 1 各组在 2 周时组织学观察结果(苏木精-伊红染色,200×)



(b)为模型组;(c)~(e)腱骨面的结合明显较模型组紧密,可见类圆形软骨细胞,而(e)可见大量类圆形软骨细胞增生,可见排列较规则的胶原纤维与其相互渗透生长

图 2 各组在 4 周时组织学观察结果(苏木精-伊红染色,200×)



(c)~(e)腱骨界面的结合明显较(b)紧密,且可见新骨形成,(e)初步形成了类似腱骨止点的四层结构

图 3 各组在 8 周时组织学观察结果(苏木精-伊红染色,200×)

2.2 免疫组化结果

2.2.1 不同时间点标本内 VEGF 的 MOD 值

各组在不同时间点标本内 VEGF 的 MOD 值见表 1。

表 1 各组在不同时间点标本内 VEGF 的 MOD 值($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 2 周 | 4 周 | 8 周 |
|-----|----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| A 组 | 6 | 0.033±0.014 | 0.035±0.015 | 0.032±0.013 |
| B 组 | 6 | 0.267±0.020 ¹⁾ | 0.107±0.020 ¹⁾ | 0.087±0.020 ¹⁾ |
| C 组 | 6 | 0.452±0.024 ¹⁾ | 0.332±0.017 ¹⁾²⁾ | 0.098±0.017 ¹⁾ |
| D 组 | 6 | 0.468±0.017 ¹⁾²⁾ | 0.320±0.009 ¹⁾²⁾ | 0.095±0.010 ¹⁾ |
| E 组 | 6 | 0.523±0.039 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ | 0.392±0.017 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ | 0.105±0.016 ¹⁾ |
| F | | 410.375 | 567.229 | 21.237 |
| P | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:1)与 A 组比较, $P<0.005$;2)与 B 组比较, $P<0.005$;3)与 C 组比较, $P<0.005$;4)与 D 组比较, $P<0.005$ 。

2.2.2 不同时间点标本内 bFGF 的 MOD 值

各组在不同时间点标本内 bFGF 的 MOD 值见表 2。

表 2 各组在不同时间点标本内 bFGF 的 MOD 值($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 2 周 | 4 周 | 8 周 |
|-----|----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| A 组 | 6 | 0.032±0.012 | 0.035±0.015 | 0.037±0.015 |
| B 组 | 6 | 0.193±0.023 ¹⁾ | 0.135±0.037 ¹⁾ | 0.082±0.023 ¹⁾ |
| C 组 | 6 | 0.377±0.023 ¹⁾²⁾ | 0.240±0.022 ¹⁾²⁾ | 0.088±0.021 ¹⁾ |
| D 组 | 6 | 0.390±0.021 ¹⁾²⁾ | 0.228±0.015 ¹⁾²⁾ | 0.083±0.015 ¹⁾ |
| E 组 | 6 | 0.427±0.018 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ | 0.305±0.016 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ | 0.097±0.021 ¹⁾ |
| F | | 434.002 | 130.275 | 0.821 |
| P | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:1)与 A 组比较, $P<0.005$;2)与 B 组比较, $P<0.005$;3)与 C 组比较, $P<0.005$;4)与 D 组比较, $P<0.005$ 。

从上表可以得出:造模后第 2 周及第 4 周,B,C,D 和 E 组 VEGF 及 bFGF 的表达水平明显高于 A 组,但 C,D 和 E 组 VEGF 及 bFGF 表达水平高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$),且 E 组 VEGF 及 bFGF 的表达水平高于 C,D 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。造模

后第 8 周,B,C,D 和 E 组 VEGF 及 bFGF 的表达水平下降,但仍明显高于 A 组,差异有统计学意义($P<0.05$),而各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 生物力学检测结果

生物力学检测结果见表 3。

表 3 各组在不同时间点各标本的最大负荷值($\bar{x} \pm s, N$)

| 组别 | 例数 | 2 周 | 4 周 | 8 周 |
|-----|----|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| A 组 | 6 | 70.000±2.280 | 80.167±3.488 ⁵⁾ | 85.083±2.836 ⁵⁾⁶⁾ |
| B 组 | 6 | 24.000±3.464 ¹⁾ | 32.167±3.430 ¹⁾⁵⁾ | 47.667±2.805 ¹⁾⁵⁾⁶⁾ |
| C 组 | 6 | 25.000±3.578 ¹⁾ | 38.000±2.757 ¹⁾²⁾⁵⁾ | 53.667±2.805 ¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾ |
| D 组 | 6 | 25.833±3.697 ¹⁾ | 38.417±2.577 ¹⁾²⁾⁵⁾ | 53.750±3.029 ¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾ |
| E 组 | 6 | 27.750±3.402 ¹⁾ | 44.250±2.564 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ | 59.750±2.859 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾ |
| F | | 214.705 | 248.295 | 156.934 |
| P | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:1)与 A 组比较, $P<0.005$;2)与 B 组比较, $P<0.005$;3)与 C 组比较, $P<0.005$;4)与 D 组比较, $P<0.005$;5)与第 2 周比较, $P<0.017$;6)与第 4 周比较, $P<0.017$ 。两两比较采用 LSD 检验, $\alpha'=a/n(a=0.05,n$ 为比较次数)。

在各时间点,A 组的最大负荷值明显高于 B,C,D 和 E 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。肩袖重建术后第 2 周,B,C,D 和 E 各组间最大负荷差异均无统计学意义。肩袖重建术后第 4 周及第 8 周,C,D 和 E 组的最大负荷值均明显高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$),C 和 D 组间最大负荷值差异无统计学意义($P>0.05$),E 组的值明显高于 C 和 D 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

肩袖损伤的主要临床表现为肩关节持续性疼痛和活动功能受限,尽管人们对该疾病的诊治水平日益提高,但疗效仍不尽人意^[9-10]。目前中药在临床中得到了广泛使用,梅杰等^[11]通过对肩袖损伤后行关节镜手术的患者进行研究,在指导其康复治疗时配合口服复方夏天无片进行治疗,发现配合口服复方夏天无片的患者优良率明显高于单一康复治疗的患者。从中医角度来说,肩袖损伤属于“筋伤”的范畴,而肝与筋关系密切。中医学认为,肝主筋,人体筋的营养来源于肝脏。筋伤都会发生一些气滞、血瘀的变化,所以它的发病机制主要与气血两方面相关,气与血又密切相关。从脏

腑角度看,肝藏血而主疏泄,以血为体,以气为用,性主生发,宜条达舒畅,由此得出,肝在气血运行中发挥着不可或缺的作用。受损之初都有血瘀,而“败血归于肝”,所以首先要改善肝血气调节功能,以调理气血,促进血液循环,消除血瘀。

续筋接骨液是由湖南中医药大学第一附属医院骨伤科根据多年临床经验而研制的院内制剂,由当归、赤芍、丹参、土鳖、生地黄、骨碎补、续断、自然铜、杜仲、枸杞、川芎、甘草组成,临床疗效显著。本方主要选用具有行气活血、消肿止痛的中药。从药物性味归经而论,大多可归入肝经,具有调肝理气活血之功效,诸药合用,共奏行气而不伤气,活血而不耗血,消肿止痛之功。组方充分遵从了从“肝”论治的思路。

目前 APRP 的应用涉及基础与临床的多个领域^[12-14],它是自身外周血液经过离心和分离而获得,其中含有高浓度的血小板,血小板活化后可释放大量不同类型的细胞生长因子^[15-16],例如 VEGF,bFGF 以及肝细胞生长因子(HGF)等。在组织损伤后修复的过程中,这些因子起着非常关键的作用。APRP应用于临床有以下几个优势:1)APRP 是一种自体来源,具有

良好的生物相容性,无免疫排斥反应,减少了传染病传播风险,临床使用更为安全;2)APRP 虽然为自体来源,但制备工艺对人体创伤小,制备简单,制备成本低,操作过程简单,易于学习和掌握;3)APRP 被凝血酶激活后呈胶体状态,可有利于阻止血小板的流失,使其能够长时间的在腱骨界面释放生长因子及细胞因子;4)APRP 含有白细胞,具有抗感染作用;5)向体内注射 APRP,它可以在体内形成纤维蛋白支架,从而引导细胞迁移以及新的细胞外基质形成。由于 APRP 的安全性及其便于使用的优点,APRP 已被用于修复骨缺损并促进骨再生、修复肌腱和韧带损伤、治疗慢性运动损伤及脊柱融合等方面^[17-18]。Deprés-Tremblay G 等研究者利用家兔建立肩袖损伤动物模型,并在局部应用冻干壳聚糖-富血小板血浆(CS-PRP),在此复合物作用下,最终发现冈上肌腱与肱骨头附着处获得良好愈合^[19]。因此本实验中采用 APRP 作为续筋接骨液的阳性对照物。

本实验将续筋接骨液与 APRP 应用于肩袖重建术后,其促进肩袖腱骨愈合的作用可以从以下两方面实验结果进行讨论。

首先,从组织形态学结果来看,正常冈上肌腱腱骨面紧密结合,肌腱纤维排列规整,可见肌腱纤维、纤维软骨、钙化纤维软骨、骨的典型四层结构。在肩袖重建术后第 2 周时,模型组腱骨面无明显愈合趋势,炎症反应重,无明显新生血管,而续筋接骨液组、APRP 组及续筋接骨液+APRP 组开始结合,可见一定量的新生血管,且炎症反应明显较模型组轻。在肩袖重建术后第 4 周时,续筋接骨液组、APRP 组及续筋接骨液+APRP 组腱骨面的结合明显较模型组紧密,可见类圆形软骨细胞,而续筋接骨液+APRP 组可见大量类圆形软骨细胞增生,可见排列较规则的胶原纤维与其相互渗透生长。在肩袖重建术后第 8 周时,续筋接骨液组、APRP 组及续筋接骨液+APRP 组腱骨面的结合明显较模型组紧密,且可见新骨形成,续筋接骨液+APRP 组初步形成了类似腱骨止点的四层结构。

其次,从生物力学方面进行分析,正常组标本最大负荷时均断裂在冈上肌止点处,模型组、续筋接骨液组、APRP 组及续筋接骨液+APRP 组所有标本最大负荷时均断裂在冈上肌止点缝合处。肩袖重建术后第 2 周时,模型组、续筋接骨液组、APRP 组及续筋接骨液+APRP 组之间最大负荷值无明显差异,因为术后 2 周内腱骨愈合以局部瘢痕性增生为主。肩袖重建术后第 4 周及第 8 周,续筋接骨液组、APRP 组及续筋接骨液+APRP 组的最大负荷值明显高于模型组,且续筋接骨液+APRP 组的最大负荷值明显高于续筋接骨液组和 APRP 组。此时,腱骨界面愈合逐渐达到纤维

软骨性增生,甚至新骨形成。

因此,不难得出以下结论:1)续筋接骨液与 APRP 均能促进肩袖腱骨愈合;2)续筋接骨液与 APRP 联合应用时二者具有协同促进作用,促进腱骨愈合的能力明显优于单独应用。

此外,对续筋接骨液与 APRP 促进腱骨愈合的作用机制在本实验中进行了初步探讨。目前已有研究者发现 VEGF 及 bFGF 等细胞因子能够在腱骨愈合中发挥重要作用,VEGF 是目前所知唯一特异作用于血管内皮细胞的细胞因子。有研究表明新生血管的生成在腱骨愈合的过程中起着比成骨更为重要的作用,因为新生血管的再生意味着肌腱周围的骨再生。VEGF 的生物学特征主要体现在三个方面:1)能够增加微血管的通透性。2)能够特异性地与血管内皮细胞受体结合,促进血管内皮细胞的分裂和增殖,进而导致新生血管的生成^[20],目前临床多种药物都是以 VEGF 作为靶点研制而成^[21]。3)VEGF 作为一种局部内生性调节剂,正常人体液中也含有低量的 VEGF,但一般不参与新生血管生成,因此外源性 VEGF 可作为内源性之补充来促进腱骨愈合。bFGF 是成纤维生长因子家族的一员,在神经系统和心脏中表达丰富,并且具有促进血管生成和细胞增殖迁移等作用。bFGF 是血小板衍生生长因子,具有强大的促进干细胞分化,成骨细胞、成纤维细胞等增殖和分化的功能。此外,bFGF 不仅由血液中的白细胞产生,肌腱细胞及成纤维细胞也可释放,因此在肩袖修复的整个过程中其表达高度上调,促进新血管形成及成纤维细胞增殖^[22],诱导单核细胞以及间充质细胞分化,促进骨组织长入肌腱等。

本实验免疫组化结果显示:VEGF 及 bFGF 在正常的肌腱当中几乎不表达,而在肩袖损伤后表达明显增多,在第 2 周时达到峰值,且持续整个腱骨愈合过程。在肩袖重建术后第 2 周及第 4 周时续筋接骨液组、APRP 组和续筋接骨液+APRP 组的 VEGF 与 bFGF 的表达明显高于模型组,续筋接骨液+APRP 组的表达水平高于续筋接骨液组和 APRP 组。在肩袖重建术后第 8 周,续筋接骨液组、APRP 组和续筋接骨液+APRP 组的 VEGF 与 bFGF 的表达虽与模型组无明显差异,但其表达水平仍明显高于空白组。这是因为在肌腱愈合早期,是以血管长入为主要过程,而在肌腱愈合的后期主要是在生理力学的刺激和生物化学作用下,修复部位肌腱形态的重塑过程。因此,初步推断续筋接骨液与 APRP 促进肩袖腱骨界面愈合的作用机制可能与上调 VEGF 及 bFGF 的表达有关。

综上所述,续筋接骨液与 APRP 均能通过上调 VEGF 及 bFGF 的表达促进新生血管的生成,加速肩袖腱骨界面的愈合,且二者联合使用效果更佳,为临床

提供了实验依据,但本研究尚需进一步的临床试验。

参考文献

- [1] BEN-NAFA W,MUNRO W. The effect of corticosteroid versus platelet-rich plasma injection therapies for the management of lateral epicondylitis:a systematic review [J]. SICOT J,2018,4:11.
- [2] 谭明伟,吴美平. 肩关节镜下缝合桥技术修复全层肩袖损伤 30 例[J]. 中国中医骨伤科杂志,2018,26(1):59-60.
- [3] GRAIET H,LOKCHINE A,FRANCOIS P,et al. Use of platelet-rich plasma in regenerative medicine: technical tools for correct quality control[J]. BMJ Open Sport Exerc Med,2018,13(1):e000442.
- [4] 李梓宸,谢心军,谢求恩,等. 针刀松解联合续筋接骨液内服治疗肩袖损伤的临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志,2019,27(8):32-34.
- [5] HASHIMOTO E,OCHIAI N,KENMOKU T,et al. Macroscopic and histologic evaluation of a rat model of chronic rotator cuff tear[J]. J Shoulder Elbow Surg,2016,25(12):2025-2033.
- [6] LEBASCHI A,DENG X H,ZONG J,et al. Animal models for rotator cuff repair[J]. Ann N Y Acad Sci,2016,1383(1):43-57.
- [7] 闫明童,翟申浩,褚国庆,等. 肩袖肌腱损伤动物模型的建立及初步研究[J]. 中国运动医学杂志,2019,38(5):406-411.
- [8] 李奉龙,姜春岩,鲁谊,等. 兔肩袖损伤模型的建立及初步组织学研究[J]. 中国组织工程研究,2012,16(20):3685-3689.
- [9] 叶鹏,李奉龙,姜春岩,等. 巨大及不可修复肩袖损伤的治疗进展[J/CD]. 中华肩肘外科电子杂志,2017,5(3):231-236.
- [10] CHIANCA V,ALBANO D,MESSINA C,et al. Rotator cuff calcific tendinopathy:from diagnosis to treatment[J]. Acta Biomed,2018,89(1-S):186-196.
- [11] 梅杰,季卫平,邹光翼,等. 复方夏天无片在关节镜肩袖损伤修复术后应用的疗效分析[J]. 中成药,2017,39(2):440-442.
- [12] KUFLER D P. Variables affecting the potential efficacy of PRP in providing chronic pain relief[J]. J Pain Res,2019,12:109-116.
- [13] KADRY M,TAWFIK A,ABDALLAH N,et al. Platelet-rich plasma versus combined fractional carbon dioxide laser with platelet-rich plasma in the treatment of vitiligo:a comparative study[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol,2018,11:551-559.
- [14] CLENDENEN N,GINDE A. Efficacy of platelet-rich plasma as conservative treatment in orthopaedics [J]. Blood Transfus,2018,16(6):473-474.
- [15] SINNOTT C,WHITE H M,CUCHNA J W,et al. Autologous blood and platelet-rich plasma injections in the treatment of achilles tendinopathy:a critically appraised topic[J]. J Sport Rehabil,2017,26(3):279-285.
- [16] ZUMSTEIN M A,LÄDERMANN A,RANIGA S. The biology of rotator cuff healing[J]. Orthop Traumatol Surg Res,2017,103(1S):S1-S10.
- [17] SHAMS A,EL-SOOPD M,GOUUAL O,et al. Subacromial injection of autologous platelet-rich plasma versus corticosteroid for the treatment of symptomatic partial rotator cuff tears[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol,2016,26(8):837-842.
- [18] HURLEY E T,LIM FAT D,MORAN C J,et al. The efficacy of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in arthroscopic rotator cuff repair:a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Am J Sports Med,2019,47(3):753-761.
- [19] DEPRÉS-TREMBLAY G,CHEVRIER A,SNOW M,et al. Freeze-dried chitosan-platelet-rich plasma implants improve supraspinatus tendon attachment in a transosseous rotator cuff repair model in the rabbit[J]. J Biomater Appl,2019,33(6):792-807.
- [20] BENTLEY K,Chakravartula S. The temporal basis of angiogenesis[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2017,372(1720):20150522.
- [21] HEGDE P S,WALLIN J J,MANCAO C. Predictive markers of anti-VEGF and emerging role of angiogenesis inhibitors as immunotherapeutics[J]. Semin Cancer Biol,2018,52(2):117-124.
- [22] BIAO C. Advances in the treatment of rotator cuff lesions by cytokines[J]. Front Biosci,2017,22(3):516-529.

(收稿日期:2020-01-11)