

专用四肢关节磁共振在兔膝关节软骨缺损修复中的应用

曾旭文¹, 梁治平¹, 陈鸿辉^{2*}, 钟敏之¹, 陈松¹, 杨小红², 梁佩红²
(暨南大学医学院附属第四医院 1.放射科; 2.创伤研究所 广东 广州 510220)

摘要:【目的】研究新西兰成年白兔膝关节软骨缺损修复后的低场强专用四肢关节磁共振诊断价值。【方法】40只兔左膝关节随机分为两组:A组:通过手术形成软骨缺损,不植入Ⅱ型胶原;B组:缺损内填充Ⅱ型胶原,术后2、6、12、18周分别行专用关节MR扫描,扫描后取材,行组织学检查。【结果】A、B两组手术区均显示有规律的动态MR改变,结合组织学分析,A组是软骨缺损的自我修复过程,B组是填充物的成熟过程。12周时两组均可见关节软骨信号,B组软骨信号较光滑,与组织学结果相符。【结论】专用四肢关节MR检查具有评价关节软骨修复的潜力,可望成为一种无创的软骨修复术疗效评价方法。

关键词: 磁共振成像; 软骨缺损; Ⅱ型胶原

中图分类号: R816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0413-05

Research of Low Field Intensity Joint MR Scan in Rabbit Knee Articular Cartilage Defect Repair

ZENG Xu-wen¹, LIANG Zhi-ping¹, CHEN Hong-hui^{2*}, ZHONG Min-zhi², CHEN Song²

(1. Department of Radiology, 2. Traumatic Institute, The Fourth Affiliated Hospital, Jinan University Medical college, Guangzhou 510220, China)

Abstract: 【Objective】 To research the diagnostic value of low field intensity joint MR in majority New Zealand albino rabbit knee articular cartilage defect repair. 【Method】 40 New Zealand albino rabbit left knee were divided into two group: A group: cartilage defect were made by operation, but type II collagen were not implant; B group: type II collagen were implant in the defect. Two group of rabbit left knees were scan in joint MR at 2,6,12, and 18 weeks after operations, histological anatomy were done after MR scan. 【Results】 Two group of rabbit knees showed regular dynamic MR appearance, associated with the histological anatomy, the cartilage defect nature repair process were seen in A group; the packing material maturation process were seen in B group. 12 weeks after operations, articular cartilage signal were seen in both two groups, articular cartilage signal in B group were smooth. 【Conclusion】 Low field intensity joint MR is potential in articular cartilage defect repair evaluation, it maybe a diagnostic method in articular cartilage defect repair without trauma.

Key word: magnetic resonance imaging; articular cartilage defect; type II collagen.

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4): 413-417]

骨关节炎、剥脱性骨软骨炎、外伤等原因均可造成关节软骨的损伤,导致关节疼痛、积液和并发功能障碍。由于关节软骨再生能力极为有限,传统的治疗方法一直存在较大困难。近年来涌现了许多修复软骨缺损的新技术,如应用间质材料、软骨细胞、间质干细胞等填充骨缺损是其中一个研究

方向,而如何评价其疗效,已成为修复后面临的新问题。MR对软骨疾病的良好显示能力,在该方面的应用前景倍受关注^[1-3]。本研究应用四肢关节磁共振对兔膝关节软骨缺损Ⅱ型胶原植入修复术后进行扫描,初步探讨软骨修复疗效的关节MR诊断价值。

收稿日期: 2008-12-12

基金项目: 广东省医学科学研究基金(A2007509);广州市科技攻关项目(200623-E0371);广州市卫生局重点项目(2006-ZDi-03);广州市医药卫生重点项目(2006-ZDi-04)

作者简介: 曾旭文,硕士,主任医师,从事骨关节影像诊断工作; * 通讯作者: 陈鸿辉,教授,博士生导师, E-mail: hongchen@21cn.com

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

将 40 只新西兰成年纯种雄兔随机分为 2 组: A 组对照组(只手术,不植入材料);B 组为 CII 组(通过手术植入 II 型胶原基质海绵),每组 20 只。术后分别于 2,6,12,18 周 4 个时间点取材。每组每个时间点 5 只动物。

1.2 动物实验方法

手术兔麻醉后,无菌操作下暴露出股骨滑车部。在股骨内髁滑车面钻出直径 5 mm 深 3 mm 的全层关节软骨缺损区,软骨下骨板被完全破坏,用生理盐水清洗暴露缺损。A 组不填充任何物质作对照;B 组用大小一致的 II 型胶原基质海绵,制成球型,完全填充缺损处,稍稍压紧并使其表面与关节面平齐,确定其稳定负着在缺损处。术后使用青霉素 5 万国际单位/kg 预防感染。分笼饲养,在笼内自由活动。

1.3 MRI 检查

实验兔用 6 g/L 的戊巴比妥钠 2.6 mg/kg 经耳缘静脉麻醉后,送本院影像科检查。在 Artoscan-C 0.2T 专用四肢关节 MR 上进行常规横断、矢状面、冠状面扫描。扫描序列如下:SET1WI(TR 700 ms/TE 26 ms)、GRET1WI (TR 480 ms/TE 16 ms)、GRET2WI (TR 640 ms/TE 18 ms) 和 STIR (TR 1 900 ms/TE 26 ms/TI 75 ms), 矩阵 256 * 192、FOV 120 mm * 120 mm、层厚 2.0 mm(T1WI)、3.0 mm(T2WI)、层间距 0.2 ~ 0.3 mm。

1.4 标本取材时间和方法

术后分别于 2、6、12、18 周进行取材,每次 5 只,行 MRI 检查后,耳缘静脉空气栓塞致死,膝正中切口进入,横断髌韧带,切开关节囊,上翻髌骨,暴露股骨下端,软骨缺损修复情况拍照。剔除股骨下端附着的软组织,于股骨上部横行锯断,完整取出标本。标本用 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h,然后用 100 mL/L 甲酸脱钙 2 周。石蜡包埋,以全自动切片机进行 5 微米切片。

1.5 大体形态和组织学观察

1.5.1 术后大体形态观察及功能观察方法 术后观察实验兔姿态运动情况。连续观察术膝有无红肿热痛、切口愈合、关节液色泽、修复组织表面情况及其同邻近正常软骨关系等。

1.5.2 组织学观察 HE 染色方法、Safranin/O-Fast Green 染色、II 型胶原免疫组织化学染色 3 种方法:分别用于观察镜下软骨修复的组织学变化、软骨基质糖氨多糖分布和软骨细胞 II 型胶原的分布情况。

2 结 果

2.1 MRI 图像观察

不同时间点 A、B 组兔膝扫描均显示缺损区内与缺损表面的动态改变过程,经缺损区的 GRE T1 序列矢状面图像可见:

A 组兔膝:2 周(图 1A):关节内少量积液,周围组织水肿。缺损底部环绕低信号带,缺损内填充物信号较高。缺损表面未见软骨下骨和软骨信号。6 周(图 1B):关节内无明显积液,缺损底部环绕低信号带,缺损内信号较前降低,缺损区表面未见软骨下骨和软骨信号。12 周(图 1C):缺损内信号继续降低,缺损底部低信号带较前模糊,缺损区与周围骨髓分界较模糊,缺损表面出现毛糙的软骨下骨低信号和关节软骨高信号带。18 周(图 1D):缺损内信号与周围骨髓信号相仿,缺损底部低信号模糊,缺损区边界不清。缺损表面见软骨下骨和关节软骨,较菲薄,关节面硬化。

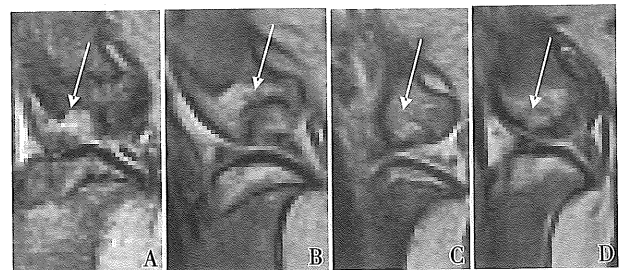


图 1 A 组兔膝缺损区 GRE T1 序列动态改变
Fig.1 A Group Rabbit Knee Defect Area GRE T1
Dynamic Appearance at 2,6,12, and 18 weeks

A: high signal in defect area at 2 weeks; B: lower signal than 1A in defect area at 6 weeks; C: coarse articular cartilage signal cover defect area at 12 weeks; D: thin articular cartilage signal and sclerotization cover defect area at 18 weeks.

B 组兔膝:2 周(图 2A):关节内无明显积液。填充物底部环绕低信号带,缺损内填充物呈中等信号,较 A 组低,填充物表面未见软骨下骨和软骨信号。6 周(图 2B):关节内无明显积液,填充物底

部环绕低信号带,填充物信号较前略降低,内可见斑点状低信号,未见软骨下骨和软骨信号。12周(图2C):缺损底部低信号带消失,填充物与周围骨髓信号相仿,边界无法分辨,表面出现略凹陷的软骨下骨低信号和清晰均匀弧线状关节软骨高信号带。18周(图2D):填充物边界不清,周围有硬化改变,高信号关节软骨清晰,厚薄均匀。

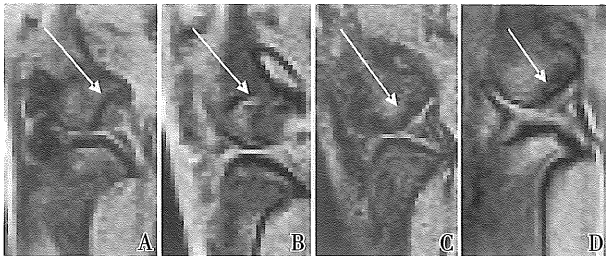


图2 B组兔膝填充区 GRE T1 序列动态改变

Fig.2 B Group Rabbit Knee Type II Collagen Implanted Area GRE T1 Dynamic Appearance at 2, 6, 12, and 18 weeks

A: moderately signal in implanted area at 2 weeks; B: lower signal than 2A in implanted area at 6 weeks; C: unclear implanted area border and smooth cartilage signal cover implanted area at 12 weeks; D: cartilage signal and sclerotization cover implanted area at 18 weeks.

2.2 术后功能观察及活体形态观察

术后一周观察术兔有轻微跛行。一周后膝关节活动基本恢复正常。其后连续观察术膝切口愈合可,仅A组(空白对照组)一兔发生局部感染,术后两周术口表面出现黄白色分泌物,窦道形成,经探查深至关节囊表面。

2.3 大体标本观察

A组兔膝:2周:缺损凹陷,其内少量肉芽。6周:缺损凹陷,内见肉芽、纤维组织。12周(图3A):缺损区主要见纤维组织,部分透明组织填充,表面粗糙,弹性差。18周:缺损边缘半透明组织增多,但中部凹陷,薄层纤维组织样物覆盖。B组兔膝:2周:乳白色、透明样凝胶物填充缺损。移植体比周围关节面轻微凹陷。6周:白色、半透明样组织填充,弹性较好。移植体比周围关节面稍毛糙。12周(图3B):白色、半透明样组织填充,弹性较好,表面较光滑。18周:同12周。

2.4 组织学结果

2.4.1 HE染色 A组兔膝:2周:缺损内大量肉芽组织填充,可见少量炎症细胞浸润,底部及边缘

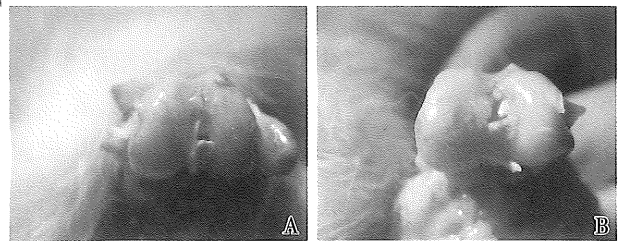


图3 A、B组兔膝12周大体观察

Fig.3 Group A and B rabbit knee macroscopic observation at 12 weeks

A: some hyaline tissue in A group rabbit knee defect area with poor resilience and coarse surface; B: white or translucent tissue in B group rabbit knee implanted area with good resilience and smooth surface.

可见部份新骨形成。6周:缺损内炎症减轻,底部及边缘可见大量新生骨小梁,表层有类软骨组织形成。12周(图4A):缺损仍未填满,主要由纤维组织填充,底部及边缘可见骨组织和软骨增生,镜下形态与正常软骨组织区别较大。18周:缺损表面软骨样组织或纤维组织覆盖,底部及边缘软骨增生较前多,但是镜下形态仍与正常软骨组织区别较大。B组兔膝:2周:表层可见较完整的软骨层,软骨及软骨下骨之间分界清楚,缺损区内仍有大量未降解的材料。6周:大片新生骨和类软骨组织填充,表层新生软骨组织完整,排列整齐;缺损区底部已形成正常的骨小梁结构。12周(图4B):缺损区已填平,表层新生软骨形成,其形态及排列大致正常,潮线形成,但表层出现部分纤维化现象。18周:同12周。

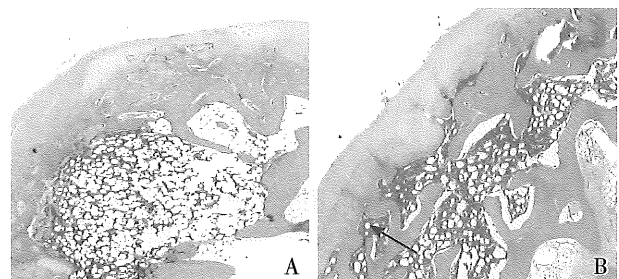


图4 A、B组兔膝12周组织学观察

Fig.4 Group A and B rabbit knee histological observation at 12 weeks

A: defect area mostly filled by fibrous tissue, little bone and cartilage tissue were seen in bottom and border, quite different from normal cartilage tissue. HE $\times 50$; B: new cartilage form in implanted area surface layer, configuration and distribution were similar to normal cartilage tissue, tide mark form (arrow). HE $\times 100$

2.4.2 Safranin'O-Fast Green 染色 A 组兔膝:2 周以绿染组织为主,红染的软骨基质及组织少见。6 周,中央小部分软骨基质染红色。12 周,底部及边缘可见部份红染的基质。18 周同 12 周。B 组兔膝:2 周以绿染组织为主,表层可见粉红色的类软骨组织覆盖于移植材料之上。6 周,表层新生软骨组织完整,但基质染色较浅,与正常红染的组织比较仍然有效大差别。12 周,表层软骨基质的染色较浅,与周围相连正常组织。18 周同 12 周。

3 讨 论

近年来,软骨缺损修复术的快速发展,MR 在软骨缺损修复方面的应用备受关注。MRI 具有良好的软组织分辨率,能进行多方位、多参数成像。由于关节软骨主要由少量的软骨细胞和大量的细胞外基质所组成,而基质的主要成分为水、分子胶原和蛋白多糖^[4],因而 MR 可清晰显示关节软骨病变范围以及软骨与周围组织结构的关系,其优于 X 线、CT、及超声,目前已成为非侵入性评价关节软骨病变的影像学首选方法。专用四肢关节 MR 与高场全身 MR 比较,具有简便、经济、开放性良好等优点,对于膝关节软骨、半月板的病变显示亦受到学者们的认可^[5-6]。

本研究对兔膝关节进行多序列、多平面的扫描,基于既往的实验总结^[7]:正常兔膝软骨在 GET1WI、GET2WI 上均显示为弧形高信号影,信号均匀,厚薄均一,约 1~2 mm,软骨与低信号软骨下骨分界非常清晰。在 SET1WI 序列上,软骨呈中等或稍高信号,显示不如前两个序列清晰。但在 GET2WI 序列上关节积液呈高信号,与软骨难区别;而在 GET1WI 积液呈中等信号,能与软骨区别。因此,我们认为 GRE T1 序列经手术区的切面最适合于不同时间点的动态观察。

A 组缺损区信号由高渐降至与周围骨髓信号相仿,为早期新鲜肉芽组织及炎症浸润改变,渐被纤维增生、新生骨小梁代替的过程。缺损底部环绕低信号影,2~6 周时考虑为类似骨髓损伤后^[8]含铁血黄素沉积的改变,随着陈旧出血的吸收,该信号环亦渐模糊,12 周后该低信号影则主要为纤维组织增生所致。缺损区表面在 12 周后出现软骨下骨低信号,为修复的骨和纤维组织信号,表面覆盖的环状高信号,为较为毛糙的关节软骨信号。而在

18 周时,可见骨质硬化,考虑轻度创伤关节炎和退形性变。

B 组填充物由中等信号渐改变至与周围骨髓信号相仿,为 II 型胶原填充物逐渐成熟,填充材料渐降解、吸收,被新生骨小梁取代的过程。缺损底部环绕低信号影 12 周时已基本消失,考虑为 B 组骨髓陈旧出血吸收后,纤维化不明显。缺损区表面在 12 周后出现软骨下骨和关节软骨信号,较 A 组清晰、光滑,结合病理考虑为关节软骨生长较 A 组良好所致。

从 A、B 两组的 MRI 和组织学结果综合分析: B 组填充区底部的低信号影至 12 周时已基本消失,填充区边界与周围正常骨髓信号分界不清,而 A 组则至 18 周仍可见,成为缺损区与周围正常骨髓信号有的分界标志,推测这是 B 组的早期出血炎症和后期纤维化均较 A 组轻的差别所致,杨小红等^[1]进行 II 型胶原修复兔膝关节的动物实验,过程中发现材料填充可以减少出血,限制炎症,与我们的研究的结果符合。因此,我们认为,低信号持续存在提示缺损区修复后仍与周围正常骨髓组织融合不佳,低信号的消失提示填充区与周围骨组织融合良好,填充物成熟,缺损修复良好。因此,该低信号影的持续存在与否应是软骨缺损区修复 MR 评价的重要指标之一。

同时,至 12 周时,A、B 组均有关节软骨修复,但 A 组主要是由类软骨样组织修复,因此 MR 表现略为毛糙。而 B 组在 6 周时,组织学已可见软骨组织,在 12 周时则潮线形成,因此至 12 周时 MR 上的软骨下骨和软骨信号较为光滑,这一差别提示 II 型胶原海绵填充有利于软骨缺损区的修复。在 A、B 两组,MR 所见软骨信号的出现滞后于组织学所见,这可能是镜下改变累积至宏观影像所见需要一段时间所致。Minas 等^[9]研究自体软骨细胞种植治疗软骨缺损,形成的修复组织在 7~12 周时,细胞外基质膨胀,伴 II 型胶原和蛋白聚糖的产生,具有凝胶样连续性;Miyata,等^[10-11]观察狗膝关节软骨缺损修复的研究中,MR 检查从 10 周开始出现较大片的软骨信号带,但仍未融合成连续的软骨信号带,与我们的实验观察结果是相互支持的。

在本实验研究中,A、B 两组 MR 表现均显示有规律的动态改变,A 组是软骨缺损的自我修复过程,B 组是填充物的成熟过程,而两组最终均可

见软骨信号的出现, Kangarlu 等^[12]对照分析软骨修复术后山羊膝关节 MR 扫描与组织学所见, 两者相关性良好, 本实验结果与其相符。

综上所述, 本实验初步证明, 专用四肢关节 MR 检查能够显示软骨缺损区修复或填充物成熟的过程, 能够清晰显示修复新生的关节软骨, 具有评价关节软骨修复疗效的潜力, 可望成为一种无创而简便的软骨修复疗效评价方法。

参考文献:

- [1] 杨小红, 李斯明, 叶惠贞, 等. II 型胶原海绵修复兔膝关节软骨缺损的组织学观察 [J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(3/4): 236-239.
- [2] 傅明, 梁海翔, 何爱珊. 异体骨结合骨髓间质干细胞移植治疗骨缺损的动物实验 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(5): 515-519.
- [3] Yulish BS, Montanez J, Goodfellow DB, et al. Chondromalacia patellae: assessment with MR imaging [J]. Radiology, 1987, 164(3): 763-766.
- [4] 张权, 黄煌渊, 陈世益, 等. 实验性髌股关节退变性关节炎关节软骨的病理改变 [J]. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(15): 123-124.
- [5] 陈兴灿, 潘永青, 刘森, 等. 正常膝关节半月板及关节软骨的低磁场 MRI 表现 [J]. 中国医学影像学杂志, 2006, 14(1): 33-36.
- [6] 吕文涛, 王芝文, 赵宝钰, 等. 低场强磁共振诊断膝关节半月板损伤 [J]. 中国医学影像学杂志, 2006, 14(3): 226-229.
- [7] 曾旭文, 梁治平, 钟敏之. 实验兔膝关节软骨的专用低场四肢关节磁共振扫描研究 [J]. 国际医药卫生导报, 2008, 14(21): 16-18.
- [8] 曾旭文, 梁治平, 步军. 低场强四肢关节磁共振在膝关节骨挫伤中的应用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(5): 550-552.
- [9] Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation [J]. Am J Knee Surg, 2000, 13(1): 41-50.
- [10] Miyata S, Numano T, Homma K, et al. Feasibility of noninvasive evaluation of biophysical properties of tissue-engineered cartilage by using quantitative MRI [J]. J Biomech, 2007, 40(13): 2990-2998.
- [11] Chang QI, Huang CL. Effects of moving training on histology and Biomarkers Levels of articular cartilage [J]. Surg Res, 2006, 3(135): 352-363.
- [12] Kangarlu A, Gahunia HK. Magnetic resonance imaging characterization of osteochondral defect repair in a goat model at 8 T [J]. Oste Cart, 2006, 4(1): 52-62.
- (编辑 张恩健)
-
- (上接第 399 页 from page 399)
- antigen-specific T-cell responses in atherosclerosis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14(4): 166-172.
- [9] 战萍萍, 李玉杰. 共刺激分子 CD40/CD40LB7/CD28 与动脉粥样硬化 [J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(8): 467-470.
- [10] Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, et al. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation [J]. J Exp Med, 1991, 173(3): 721-730.
- [11] Reynolds J, Tam FW, Chandraker A, et al. CD28-B7 blockade prevents the development of experimental auto-immune glomerulonephritis [J]. Clin Invest, 2000, 105(5): 643-651.
- [12] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2002, 91(4): 281-291.
- [13] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [14] Russell ME, Hancock WW, Akalin E, et al. Chronic cardiac rejection in the LEW to F334 rat model. Blockade of CD28-B7 costimulation by CTLA-4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis [J]. J Clin Invest, 1996, 97(3): 833-838.
- [15] 刘金来, 朱强锋, 郝宝顺. 辛伐他汀含药血清对 U937 单核巨噬细胞 MMP-及 TIMP-1 表达与分泌的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(5): 501-505.
- [16] Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, et al. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice [J]. Proc Natl Sci USA, 2000, 97(13): 7458-7463.
- [17] Gotsman I, Gupta R, Lichtman AH. The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(12): 2493-2495.
- (编辑 孙慧兰)