

## · 基础研究 ·

# 仿生组织工程软骨修复关节软骨损伤的效果及应用超声弹性成像方法检测价值分析

马宁 刘雨丰 陈明学 王月香 万一群 刘舒云 睦翔 郭全义

**【摘要】** 目的 体外构建的仿生组织工程软骨修复羊膝关节软骨损伤,通过组织学染色、点压力学分析、超声弹性成像检查来评价修复效果,探讨超声弹性成像方法评估再生软骨质量的可行性。方法 共选用雄性山羊12只,随机分A、B、C三组,A组空白对照组2只,仅做股骨髁负重区直径6 mm全层软骨缺损;B组单纯仿生软骨(ECM)支架修复组4只,在股骨髁负重区软骨缺损处仅植入仿生软骨支架;C组仿生软骨支架复合自体骨髓间充质干细胞(BMSCs)组6只。取自体髌骨骨髓血分离骨髓间充质干细胞培养,细胞浓度达到 $1 \times 10^7$ 个/毫升后加入仿生软骨支架中,将构建好的仿生组织工程软骨植入股骨髁软骨缺损中。每组的羊均先在左膝造模,术后3个月再右膝造模,待右膝术后3个月时先行超声弹性成像检查,然后取材行评分,病理染色、糖胺多糖(GAG)含量测定、力学检测分析。结果 3个月和6个月的A组基本无软骨组织修复。在大体评分、病理评分、GAG含量测定、点压力学测试的结果显示C组优于B组( $P < 0.05$ ),并且B组与C组中的6月数据均明显优于3个月( $P < 0.05$ )。其中C组动物6个月取材发现重建软骨更接近正常软骨组织。修复组织大体形态结果,点压力学测试结果与超声弹性成像检查结果对比基本一致。结论 利用组织工程方法构建仿生软骨可治疗早期软骨损伤,复合自体骨髓间充质干细胞的仿生支架能达到更好的修复效果。软骨损伤经过仿生软骨修复后恢复周期在6个月以上。超声弹性成像检查软骨修复效果可作为术后复查简单快捷有效的方法。

**【关键词】** 超声; 弹性成像技术; 软骨; 组织工程; 仿生支架

**The effect of bionic tissue-engineered cartilage in repairing articular cartilage injury and the test value of ultrasonic elastography method** Ma Ning, Liu Yufeng, Chen Mingxue, Wang Yuexiang, Wan Yiqun, Liu Shuyun, Sui Xiang, Guo Quanyi. Institute of Orthopaedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Guo Quanyi, Email: doctorguo\_301@163.com

**【Abstract】 Objective** In vitro construction of bionic tissue engineering cartilage and repair goat knee cartilage injury. Use of histological staining, mechanical analysis, ultrasound elastography examination, evaluation of the repair effect of this method, and the feasibility of noninvasive ultrasound evaluation. **Methods** 12 male goats were randomly divided into A, B, C three groups. Group A: two in blank control group. The knee weight-bearing area was 6 mm in diameter, with a full-thickness cartilage defect. Group B: four goats, Only bionic cartilage scaffold was implanted in the defect of the Weight-bearing area of the femoral condyle. Group C: six goats used the Bionic cartilage scaffolds were combined with autologous bone marrow mesenchymal stem cells was implanted in the defect of the Weight-bearing area of the femoral condyle. BMSCs were isolated from bone marrow blood and cultured. When the concentration of cells reached  $1 \times 10^7$  cells/ml, they were load in to the bionic cartilage scaffold. The constructed bionic tissue engineering cartilage was implanted into the femoral condyle cartilage defect. In each group, the goat was made in the left knee first, then in the right knee three months after the operation, and then in the right knee three months after the operation, the ultrasonic examination was first, and then the gross score, pathological staining, GAG content determination and mechanical detection. **Results** In group A, there was no cartilage repair at there and six

months. The results of gross score, pathological score, GAG content and mechanical detection showed that group C was better than group B ( $P<0.05$ ). Moreover, in group B and group C, the 6 month group was better than the 3 month group ( $P<0.05$ ). In group C, the 6 month group was closer to the normal cartilage tissue. The results of repair gross morphology and indentation test were consistent with those of ultrasonic elastography. **Conclusions** Using tissue engineering to construct bionic cartilage to treat early cartilage injury has a reliable therapeutic effect, and with the participation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells can achieve better repair effect. The recovery period of cartilage injury after bionic cartilage repair is more than 6 months. Ultrasound elastography can be used as a simple, rapid and effective method to evaluate the recovery effect of cartilage transplantation.

**【Key words】** Ultrasonography; Elasticity imaging techniques; Cartilage; Tissue engineering; Bionic scaffold

软骨损伤在临床很常见,早期软骨损伤无有效的治疗方法<sup>[1]</sup>,并常常被忽视,导致骨关节炎的过早出现,这种不可逆的退变性疾病发病率逐年上升<sup>[2-3]</sup>。因软骨损伤治疗困难,所以治疗周期长,社会负担重,成人保守治疗效果不佳。如何早期有效的治疗近年来一直是研究的热点<sup>[4]</sup>,从修复材料的研发到各种干细胞用于软骨损伤的研究都在为解决临床问题寻找突破口<sup>[5-7]</sup>。目前基于组织工程技术修复软骨损伤快速发展,但相应的术后评价方法仅限于患者主观评分<sup>[8]</sup>,以及特殊 T2mapping 序列核磁检查<sup>[9]</sup>,且核磁检查费用昂贵,检查时间周期长,并需要设置特殊序列,耗费人力、设备资源、时间成本高。所以迫切需要一种对软骨移植术后既简单快捷又准确可靠的检查手段。在本研究中,我们观察利用自体的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)加载在仿生软骨支架中体外构建组织工程软骨来修复软骨损伤的效果,同时利用超声弹性成像原理初步探索超声评价软骨移植术后效果的可行性。

## 材料及方法

### 一、仿生软骨支架

由新鲜的猪关节软骨细胞外基质制作的仿生软骨支架,支架具有成分仿生和结构仿生特性。仿生软骨支架来源于解放军总医院骨科研究所<sup>[10]</sup>。

### 二、动物及细胞培养

大动物选成年中国山羊( $>25$  kg),抽取羊髌骨骨髓血 4 ml 分离培养,经体外鉴定为骨髓间充质干细胞<sup>[11]</sup>,收集 2~3 代细胞,富集细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/ml 用于构建仿生组织工程软骨。

### 三、仿生组织工程软骨体外构建

将仿生软骨支架放置于相同容积的聚丙烯模具中,将相同体积的细胞悬液多点注射入支架内部及表面,利用聚丙烯的疏水特性<sup>[12]</sup>,确保细胞悬液充分浸入支架内部及支架表面,温箱培养 2 h 后将支架-细胞复合体取出放入培养基中即可准备移植(图 1~4)。

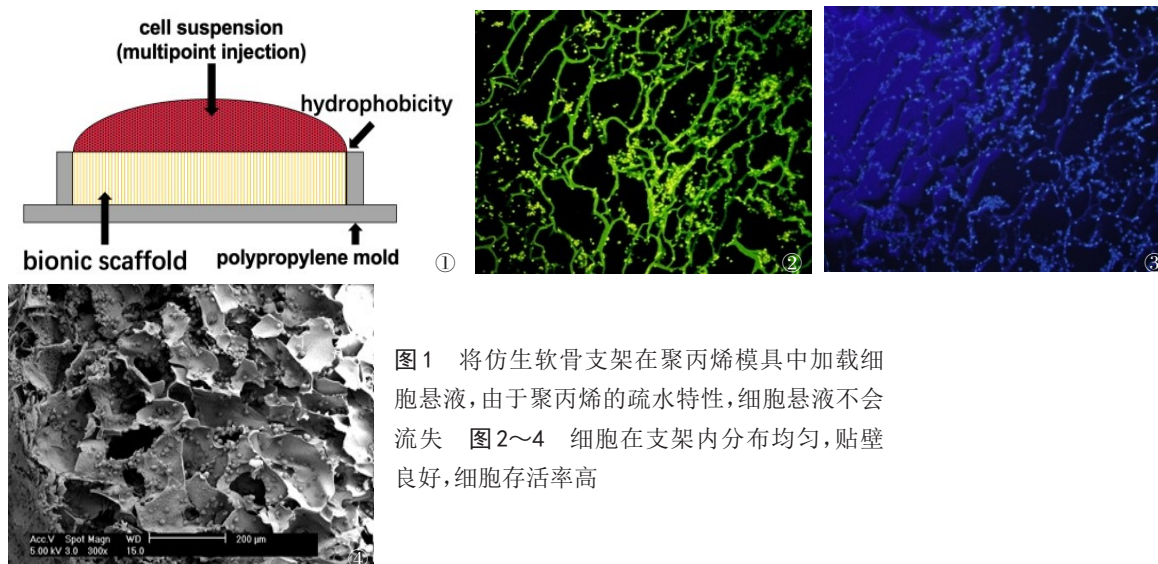


图1 将仿生软骨支架在聚丙烯模具中加载细胞悬液,由于聚丙烯的疏水特性,细胞悬液不会流失 图2~4 细胞在支架内分布均匀,贴壁良好,细胞存活率高

#### 四、按动物分组进行组织工程软骨移植

12只雄性山羊随机分为3组(图5),A组空白对照组2只,仅在股骨髁负重区做直径6 mm 全层软骨缺损;B组单纯仿生软骨支架修复组4只,在股骨髁上述相同位置植入不加细胞的仿生软骨支架;C组仿生软骨支架复合自体 BMSCs 组6只。将构建

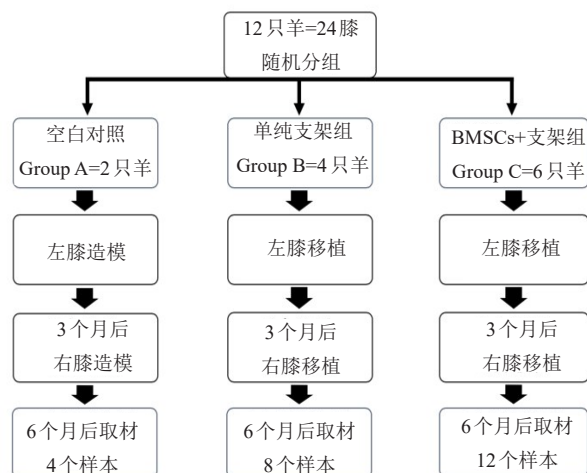


图5 动物分组

好的仿生组织工程软骨植入股骨髁负重区软骨缺损中。每组的羊均先进行左膝造模及修复手术,待左膝术后3个月后再进行右膝的造模及修复手术,待右膝术后3个月时取材。

#### 五、检测指标

取材前先对膝关节股骨髁进行超声弹性成像检查<sup>[13-14]</sup>,留存影像数据,取材后对组织标本进行大体观察评分<sup>[15]</sup>,Wakitani 软骨损伤修复病理评分<sup>[16]</sup>(番红 O、甲苯胺蓝、Ⅱ型胶原免疫组化染色),重建

的组织工程软骨进行点压力学测试软骨刚度值<sup>[17-18]</sup>。

#### 六、统计学分析

采用 SPSS 11.5(IBM, 美国)软件进行统计学分析,计量资料采用 K-S 检验是否符合正态分布,对大体评分、Wakitani 病例评分、GAG 含量测定、软骨刚度值采用单因素方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示,检验水准  $\alpha$  值取双侧 0.05。

## 结 果

### 一、影像结果

取材前通过超声弹性成像检查(图6~7),可以很明显区分出软骨损伤区域,并在各个取材时间点仿生软骨修复区可见明显变化,通过超声检查可明确判断软骨损伤范围、移植物是否脱落(图6)。超声弹性成像检查可初步测量软骨杨氏模量(图7),从而间接反映重建软骨的刚度。

### 二、组织病理结果

A 组明显缺乏软骨修复组织,B 组较 A 组有明显的修复组织,仿生软骨支架可使修复区呈现出Ⅱ型胶原特征,但胶原结构紊乱,修复区内软骨细胞含量较少,与正常软骨之间存在脱离现象,且软骨表面随着时间变化逐渐出现分层现象。C 组的修复较 B 组仍有明显优化,胶原排列稳定,保持了仿生软骨支架原有结构,表现为透明软骨特性,修复区内软骨细胞数量丰富,接近正常软骨组织,修复区与正常软骨连接紧密,且修复的透明软骨表面光滑,并随着时间变化到6个月时软骨下骨的潮线结构也逐渐修复完成(图8)。

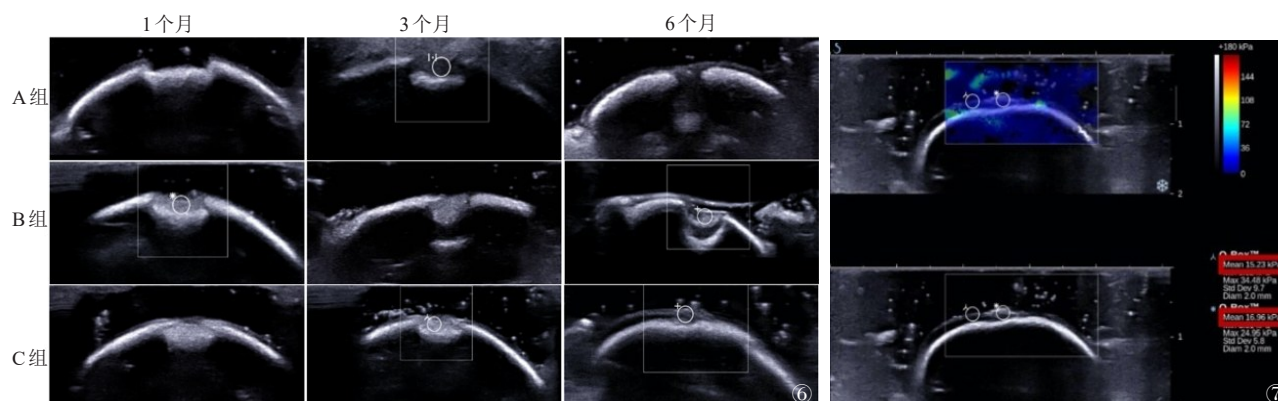


图6 通过超声弹性成像检查,A组的损伤区无组织填充。B组中损伤区可见组织填充,说明移植物未脱落。C组中的移植物经过6个月修复后,可见影像学表现逐渐接近正常软骨 图7 超声弹性成像可初步测量修复区软骨的杨氏模量,间接反映修复软骨的硬度。测量C组的6个月组同一标本修复区弹性模量接近正常,测量最小面积直径为2 mm

注:“\*”表示修复区 Max24.95kp, Mean16.96kp;“Y”表示正常区 Max34.48kp, Mean15.23kp,



### 三、统计分析结果

从大体标本结果看,A组修复效果明显不如B组和C组所以在GAG含量测定及软骨刚度值测量结果中我们只对B、C组的数据与正常软骨对比,分别进行单因素方差分析。对B组和C组的3月、6月两个取材时间的组织标本进行分析,大体评分( $F=4.267, P=0.022$ ), Wakitani 软骨修复病理评分( $F=5.339, P=0.039$ ), GAG 含量测定( $F=5.014, P=0.006$ ), 软骨刚度值( $F=4.379, P=0.013$ ), 结果显示各组间具有可比性,通过两两比较,C组的6月组与B组的6月组的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),C组的6月与3月两个时间点标本之间的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),C组的6月组与正常软骨组织的GAG含量、软骨刚度值差异无统计学意义( $P>0.05$ ),结果说明C组的6月组修复效果明显优于其他各组,并接近正常软骨(图9~12)。

## 讨 论

仿生软骨支架是由天然软骨细胞外基质经过冷冻干燥技术制作而成的具有材料仿生及结构仿生的特性<sup>[9]</sup>,完全仿生了正常软骨的构造特性,与国外的单层膜性补片 MACI 对比<sup>[20]</sup>,我院研发的仿生软骨支架具有立体结构,内部为规律排列的纵向孔隙结构<sup>[21]</sup>,有利于细胞均匀分布,分布的方向与关节面

垂直,符合正常软骨细胞分布特点,且非常有利于关节液对种子细胞的营养代谢,所以利用仿生软骨支架来修复损伤的软骨缺损能最大限度还原软骨的生长环境。自体的骨髓间充质干细胞具有获取方便,供区影响小,体外培养过程中未经过任何诱导干预,最终目的是要使骨髓间充质干细胞再功能化<sup>[22]</sup>,以构建新的组织或器官。本实验还改进了细胞与支架的复合方法(图1~4)。以往只是简单的将细胞悬液滴加在支架表面,细胞流失多,真正复合进支架的细胞数量不均衡,而将支架放入与其体积完全一样的聚丙烯模具中,将与支架相同体积的细胞悬液均匀的多点注射入支架内部,由于聚丙烯的疏水特性<sup>[13]</sup>,细胞悬液不会流失所以能完全缓慢的浸入支架内部,不但能保证有足够的细胞数量有效的进入支架内,还可确保实验样本的均衡性,细胞悬液还能在支架上表面形成水平分布层,这样更接近正常软骨细胞的分布,有利于进一步的组织修复。通过AO-PI染色、Hoechst33258染色、电镜扫描结果显示(图1),细胞均匀分布于支架内部,且细胞存活率高。结果完全符合预期。

本次大动物实验结果显示,以自体骨髓间充质干细胞复合仿生软骨支架组经过6个月的修复效果最好。超声弹性成像检查与对应取材后的标本从大体形态、点压力学测试结果对比,影像学结果与取材结果基本一致,移植物均未出现脱落现象。所以超

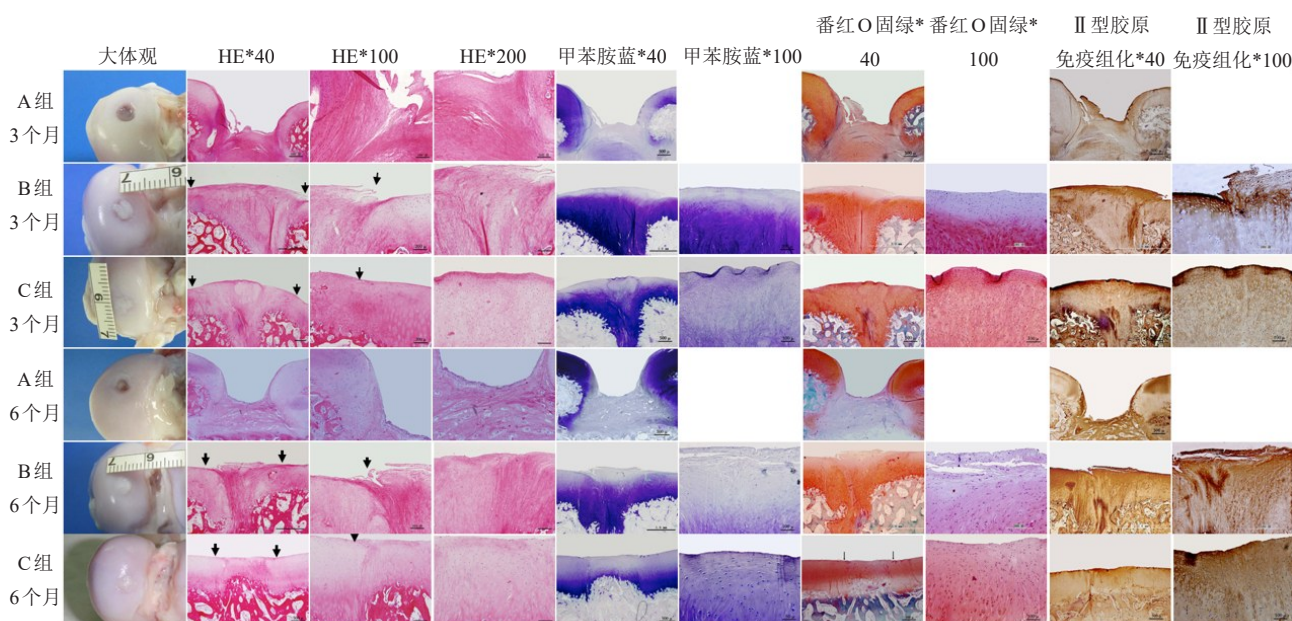


图8 A组在3个月,6个月均无明显的填充及修复。B组在仅有支架的参与下修复区虽然有填充,修复区内细胞较少,从3个月到6个月逐渐出现退化,软骨分层,脱落。C组在细胞和支架联合参与下骨髓间充质干细胞逐渐定向分化为透明软骨细胞,从3个月到6个月的修复过程中,Ⅱ型胶原表达逐渐接近正常组织并完成替代修复,软骨潮线结构逐渐恢复。超声弹性成像评估

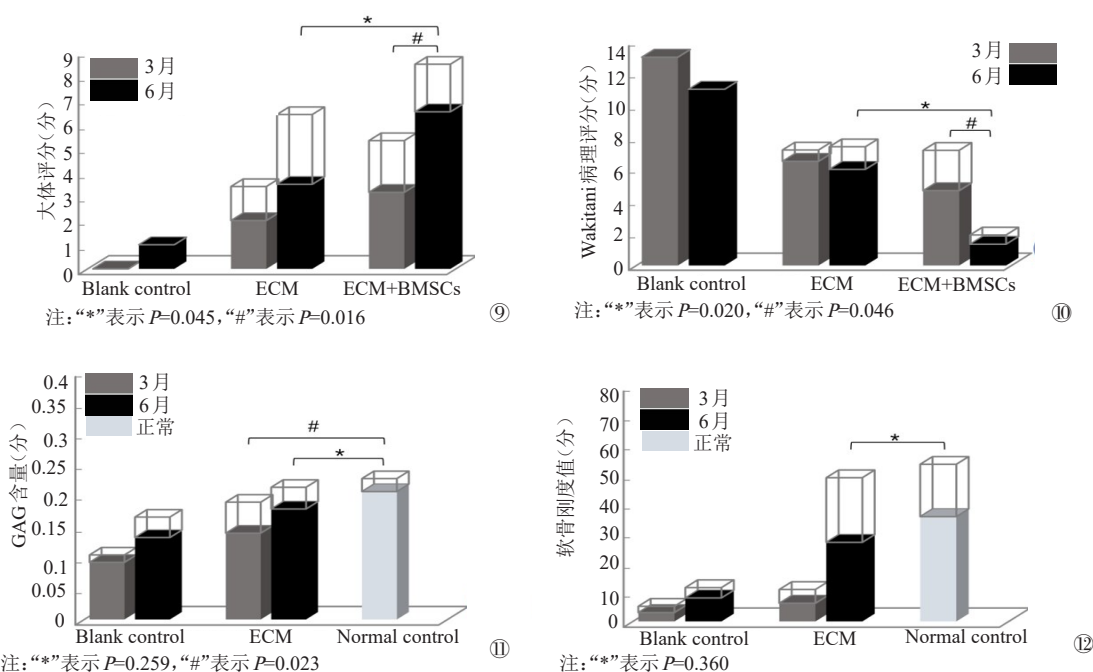


图9~12 统计学分析图。图9 修复组织大体评分统计分析结果显示细胞联合支架组修复效果最好,并以6个月修复效果最佳;图10 Wakitani病理评分结果仍以细胞联合支架的6个月组效果最佳,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ );图11 修复区的GAG含量测定结果分析细胞联合支架修复6个月组的GAG含量与正常软骨差异无统计学意义( $P>0.05$ );图12 软骨刚度测量结果显示细胞联合支架的6个月组软骨刚度接近正常软骨,差异无统计学意义( $P>0.05$ )

声可以为术后随访监测提供方便快捷的解决方法。超声弹性成像测量最小限定区域为直径2毫米范围,若将来此方法用于临床,人的软骨厚度比羊膝关节软骨略厚,通过有经验的超声医生会获得更准确测量结果。所以超声弹性成像在软骨损伤及软骨移植术后随访的应用还需要进一步的研究。标本中A组空白缺损组基本无修复,说明软骨损伤后短期内靠自身修复很难,超声检查完全证实,软骨缺损6个月内无法快速修复。而B组天然仿生软骨支架能给修复过程提供结构支撑,和有利于透明软骨的生长环境,但没有细胞的参与,修复区仿生软骨支架的天然Ⅱ型胶原组织逐渐代谢退化,出现分层及裂隙,说明缺少软骨细胞分泌Ⅱ型胶原无法完成替代修复而出现退化。C组有了骨髓间充质干细胞的参与,由仿生支架提供透明软骨的生长环境,细胞逐渐定向分化为透明软骨并分泌Ⅱ型胶原逐渐完成替代修复,通过特异染色也获得证实。我们对所有结果进行量化比较,包括大体评分、Wakitani病理评分及GAG定量、软骨刚度值分析等研究结果都表明B组与C组具有显著性差异,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),C组6个月组与正常软骨的GAG含量、软

骨刚度值测试结果对比分析,结果无显著性差异,说明修复的组织基本接近透明软骨。超声弹性成像技术以其方便,快捷的特点为术后随访移植软骨状态提供了新的方法。

本研究表明,仿生软骨支架联合自体骨髓间充质干细胞更能有效修复关节软骨损伤,要达到基本接近正常软骨,修复时间要6个月以上。超声弹性成像技术可以作为术后移植软骨监测的检查手段。本研究结果可以为组织工程技术修复软骨损伤的临床应用提供可靠依据。

## 参考文献

- Newman, P A. Articular cartilage repair [J]. Am J Sports Med, 1998, 26(2): 309-324.
- Culvenor AG, Øiestad BE, Harvi FH, et al. Prevalence of knee osteoarthritis features on magnetic resonance imaging in asymptomatic uninjured adults: a systematic review and meta-analysis [J]. Br J Sports Med, 2019, 53(20): 1268-1278.
- Nicola V, Shivappa N, Brendon S, et al. The relationship between the dietary inflammatory index and prevalence of radiographic symptomatic osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative [J]. Eur J Nutr, 2019, 58(1): 253-260.
- 袁雪凌, 孟昊业, 刘若西, 等. 软骨干细胞修复软骨损伤及治疗骨

- 关节炎的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(9): 890-892.
- 5 马志洋. 组织工程软骨缝合技术及缝合材料的研究与进展 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21): 3937-3940.
- 6 兰伟伟, 陈维毅. 骨软骨组织工程研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2019, 36(3): 504-510.
- 7 郝春香, 黄靖香, 眭翔, 等. 藻酸钙复合自体软骨细胞修复羊膝关节负重区软骨缺损的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2019, 27(2): 165-170.
- 8 Ali Mohammed Ahmed Khamis, Hatem GS, Eslam Karam Allah Ramadan, et al. Correction notice to: Arabic translation and validation of three knee scores, lysholm knee score (LKS), Oxford knee score (OKS), and international knee documentation committee subjective knee form (IKDC) [J]. SICOT-J, 2019, 5: 27.
- 9 陈思然, 安颖颖, 展影, 等. 股骨滑车发育不良致髌股关节软骨损伤 T2mapping 序列定量评估 [J]. 中华医学杂志, 2019, 99(21): 1651-1655.
- 10 彭礼庆, 罗旭江, 张彬, 等. 人关节软骨细胞外基质来源组织工程支架的制备和评估 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(34): 5436-5441.
- 11 Acharya C, Adesida A, Zajac P, et al. Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(1): 88-97.
- 12 Romain R, Imane D, Mohamed AA, et al. Superhydrophobicity of composite surfaces created from polymer blends [J]. J Colloid Interface Sci, 2020, 560: 596-605.
- 13 Khaled W, Stefan R, Bruhns OT, et al. Ultrasonic strain imaging and reconstructive elastography for biological tissue [J]. Ultrasonics, 2006, 44: e199-e202.
- 14 Jing L, Qian ZH, Wang KY, et al. Non-invasive Quantitative Assessment of Muscle Force Based on Ultrasonic Shear Wave Elastography [J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45(2): 440-451.
- 15 Moran M, Kim HK, Salter RB. Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion [J]. J Bone Joint Surg Br, 1992, 74-B(5): 659-667.
- 16 Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage [J]. J Bone Joint Surg Am, 1994, 76(4): 579-592.
- 17 Wang YS, Yuan XL, Yu K, et al. Fabrication of nanofibrous microcarriers mimicking extracellular matrix for functional microtissue formation and cartilage regeneration [J]. Biomaterials, 2018, 171: 118-132.
- 18 Zhang Y, Liu S, Guo W, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(7): 954-965.
- 19 鹿亮, 刘彬, 尚希福, 等. 脱细胞软骨细胞外基质取向支架复合软骨细胞构建组织工程软骨的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(3): 291-297.
- 20 Kon E, Filardo G, Martino AD, et al. ACI and MACI [J]. J Knee Surg, 2012, 25(1): 017-022.
- 21 Zheng X, Yang F, Wang S, et al. Fabrication and cell affinity of biomimetic structured PLGA/articular cartilage ECM composite scaffold [J]. J Mater Sci Mater Med, 2011, 22(3): 693-704.
- 22 Romain C, Demoor M, Miranda C, et al. Comparison of the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and umbilical cord blood intended for cartilage tissue engineering [J]. Stem Cell Rev Rep, 2020, 16(1): 126-143.

(收稿日期: 2020-03-06)

(本文编辑: 吕红芝)

马宁, 刘雨丰, 陈明学, 等. 仿生组织工程软骨修复关节软骨损伤的效果及应用超声弹性成像方法检测价值分析 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2020, 6(2): 62-67.