

兔骨性关节炎模型关节软骨的弥散张量研究

侯 进,梅颖洁,代月黎,许乙凯

(南方医院影像中心,南方医科大学,广州 510515)

【摘要】 目的 探讨弥散张量成像在膝骨性关节炎的应用价值。**方法** 选用成年新西兰大白兔 24 只,随机分成为 A、B、C、D 四组,将 A、B、C 组兔左膝关节注射木瓜蛋白酶水溶液,建立早、中、晚期关节软骨退变动物模型, D 组作为对照组。行膝关节常规扫描及弥散张量成像(DTI)扫描,扫描图像经后处理产生彩色图并与相应解剖图像叠加融合,分别测量关节软骨 FA 和 ADC 值。扫描完成后将动物处死,取膝关节软骨采用 HE 染色与阿尔新兰染色进行对照。**结果** 不同分级标准正常组及模型组软骨的各向异性及扩散特征存在显著的统计学差异;随着退变程度的加重,FA 值减低越明显,早期其 ADC 值先增高后降低。**结论** DTI 是一种量化反应兔骨性关节炎严重程度的技术。

【关键词】 弥散张量成像;表观弥散系数;骨性关节炎

【中图分类号】 R445.2 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.001.001

Diffusion tensor imaging study of rabbit osteoarthritis model

HOU Jin, MEI Ying-jie, DAI Yue-li, XU Yi-kai

(Imaging Center of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To explore rabbit osteoarthritis model and evaluate the cartilage degeneration of rabbits by DTI. **Methods** 24 New Zealand adult rabbits were divided into A, B, C, D groups randomly, and establish articular cartilage degeneration animal model in early middle and later periods, D group as the control group. FA and ADC values of articular cartilage were measured. Observe knee joint cartilage through histological HE staining and Alcian blue staining. **Results** The cartilage differences of anisotropy and diffusion characteristic between cases and controls were statistically significantly. The FA values gradually decreased while the ADC values increased at early stage then decreased. **Conclusions** DTI can quantitative analysis rabbit osteoarthritis cartilage degeneration.

【Key words】 Diffusion tensor imaging; Apparent diffusion coefficient; Osteoarthritis

骨关节疾病给人类造成的危害愈来愈受到国际医学界的关注及担忧,骨关节炎(osteoarthritis, OA)发病率随年龄增高而增加^[1],OA 是一个以关节软骨退行性改变为核心,累及骨质并包括滑膜,关节囊及关节其它结构的全方位,多层次,不同程度的关节疾病^[2]。随着磁共振技术的发展,磁共振

功能新的成像技术已广泛地应用于骨性关节炎软骨损伤早期评价的研究,磁共振扩散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)可定量分析水分子在不同方向上扩散的各向异性,从而观察组织的细微结构,无创性地提供常规磁共振不能提供的人体组织微观结构。它不仅能获取 ADC 值,而且更能获取

【作者简介】侯进(1981-),女,硕士,研究方向:磁共振功能成像。E-mail: 29765029@qq.com。

【通讯作者】许乙凯(1963-),博士生导师。E-mail: ykaivip@163.com。

反映水分子扩散各向异性数值 (fractional anisotropy, FA), 反应透明软骨胶原纤维微细结构变化, 研究显示 ADC 值和 FA 值对诊断早期软骨损伤均有较高的特异性和敏感性^[3]。但关节软骨尤其是对 OA 关节软骨的 DTI 研究不多, 需要更多的实验进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 动物模型建立和处理

选用成年新西兰大白兔 24 只, 合格证号为 [SCXK(粤)2011-0015], 将其随机分成为 A、B、C、D 四组, 其中 A、B、C 三组为处理组, 采用膝关节备皮、予 75% 乙醇消毒后, 屈曲 45° 以髌腱外缘、平髌骨下极处为进针点, 向髌间窝方向进针, 抵达股骨髌后回撤 2 mm, 注入 0.3 mL 体积分数 2% 木瓜蛋白酶水溶液^[4]。A 组 (一次注药组) 于模型制作完成后 24 h 内行 MR 检查; B、C 组于实验的 1、4、7 d 分三次注药制作模型, B 组于最后一次注药完成后 24 h 内行 MRI 检查, C 组于最后一次注药后一个月行 MRI 检查; D 组作为空白组。A、B、C 组检查结束后将兔麻醉后处死, D 组作为空白组分别在与 A、B、C 组扫描结束后随机取出两只麻醉后处死, 将处死后兔的双膝关节取下, 10% 甲醛浸泡, 待病理检查。

1.2 磁共振成像方法

A 组在第一次注药后 24 h 内、B 组在第三次注药后 24 h 内、C 组在第三次注药后一个月进行扫描, A、B、C 组扫描的同时对同期 D 组进行磁共振成像。采用荷兰 Philips 公司生产的 Achieva 3.0T 超导型 MR 扫描仪、专用动物线圈, 行膝关节常规扫描, T1WI、T2WI 和 PDWI (加脂肪抑制), 再行 DTI 扫描分别测量关节软骨 FA 和 ADC 值。扫描参数: DTI 采用 EPI 序列, 总扫描时间: 07 min 55 s, FOV = 120 (RH) × 120 (AP) × 24 (FH), TR = 1000 ms, TE = 56ms, 层厚 = 2 mm, 像素 1.2 mm × 1.2 mm, NSA = 4, 翻转角 = 90° PDW 采用 TSE 序列: FOV = 80 mm × 80 mm × 36 mm, TR = 2013 ms, TE = 20 ms, 层厚 = 2.5 mm, 像素 = 0.40 mm × 52 mm。

扫描完成后将动物处死取膝关节软骨行 HE 染色与检测蛋白多糖含量的阿尔新兰染色 (彩插 5 图 1)。

1.3 图像后处理

采用 ImageJ 后处理软件, 在横轴位质子相图像

上, 手动绘制感兴趣区, 尽可能包括整个髌软骨面 (彩插 5 图 2), 在对应的 DTI 图像上测定平均的 ADC 和 FA 值。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件包, 采方差分析对各组处理组、对照组之间在不同时间点软骨的 FA、ADC 值变化进行分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FA 值各组间均有显著差异; ADC 值正常对照组与中期模型组无明显差异, 余各组间有显著差异。

2.2 随着退变程度的加重, FA 值减低越明显, 早期 ADC 值先增高后降低 (彩插 5 图 3, 表 1)

表 1 各模型组与正常组的 ADC、FA 值比较		
Tab.1 Compared with the change of of ADC and FA values in control group and each model group		
分组	FA	ADC (10 ⁻³ mm ² /s)
正常对照组 (Control group)	0.563 ± 0.178	1.287 ± 0.579
病例组早期 (OA early phase)	0.540 ± 0.721	1.391 ± 0.698
病例组中期 (OA middle phase)	0.506 ± 0.209	1.193 ± 0.613
病例组晚期 (OA later phase)	0.428 ± 0.324	0.709 ± 0.538
F	9.392	11.231
P	0.003	0.001

3 讨论

3.1 动物模型的选择和建立

骨关节炎是因多种致病因素所导致的以关节软骨退变为主要病理特征的一组临床综合症, 目前用于 OA 模型复制的动物有很多, 但其病理变化机制及病变进展速度有很大区别, 如何选择一合适的动物模型, 对研究来讲是成功的关键^[5-6]。鼠模型关节软骨退变的组织学特征与人类 OA 相似, 基本能满足要求, 但对于这种较小动物的关节来讲, 关节腔反复注射的创伤对实验影响较大; 猴子具有与人类最相似的结构, 但获之不易, 价格高, 研究跨度大; 犬、羊等大型动物关节较大, 较易操作造模, 可供实验用材料丰富, 但操作也并不简单, 经费不足也难以考虑。兔膝关节组织结构与人类接近, 可研究材料丰富, 其模型的软骨生化指标与人类 OA 非常接近, 兔性情温和, 手术操作较简单, 易于饲养和关节内注射, 关节体积较大, 可供研究的材料又远多于其他动物, 便于进行比较研究。

3.2 兔膝关节 OA 模型的病理及 MRI 分级

根据胶原纤维的排列方式不同, 关节软骨在组织形态学上从表层至深层可分为四层^[7]: ①表层,

构成关节软骨的最外层,由平行于关节面致密排列的薄层胶原纤维组成,蛋白聚糖 (proteoglycans, PGs) 在此层含量最低;②中间层,紧邻表层,胶原纤维随意向四周散开斜行排列,进入软骨表层;③深层:含有最丰富的 PGs 和胶原纤维,含水量很少,胶原纤维多呈垂直状排列,与钙化带间有一被称为“潮标”的清楚分界;④钙化层,含丰富的羟基磷灰石盐,细胞极少。

兔膝关节腔内重复注射木瓜蛋白酶溶液可快速破坏、分解软骨基质,降解蛋白多糖。早期骨性关节炎模型组蛋白多糖减少,表层胶原纤维结构改变,主要表现为 II 型胶原含量基本不变,II 型胶原纤维的肿胀、胶原网的破坏;HE 染色软骨表面欠光整,可见簇集的软骨细胞, Mankin 评分 2~5, MRI 示关节软骨边缘毛糙。中期模型组软骨表层及中间层胶原纤维中断、纤维化,软骨细胞及蛋白多糖进一步减少;HE 染色软骨表层可见裂隙及纤维化改变,软骨细胞排列紊乱,软骨潮线不规则, Mankin 评分 8~9, MRI 软骨信号不均匀,边缘模糊。晚期模型组软骨破坏进一步加重,软骨缺损可达深层,累及潮线,可见大范围的纤维化改变,软骨细胞及蛋白多糖明显减少,HE 染色软骨纤维化可达深层,软骨细胞明显减少,潮线基本消失,钙化层难以分辨, Mankin 评分 9~11;磁共振示软骨信号不均,软骨面变薄、中断,关节腔明显积液。DTI FA 伪彩图可显示纤维的位置与走行(彩插 5 图 3)。

对照组 HE 染色表层光滑、平整,软骨细胞层次清楚,无簇集,潮线完整, Mankin 评分 0~1, 膝关节矢状位质子相可见关节软骨面光整、厚度均匀。

阿利新兰检测存在于软骨细胞周围的酸性粘多糖(硫酸软骨素),酸性粘多糖呈蓝色。而骨性关节炎病变首先表现为软骨基质的降解破坏与关节破坏区各种粘多糖减少,特别是酸性粘多糖减少,蓝色基质淡染。处理组行股骨、胫骨及髌骨阿尔新兰染色显示软骨周围的酸性粘多糖较对照组变浅,表明软骨基质较对照组减少。

鉴于兔膝关节横轴位 DTI 图像上髌骨显示清晰,另一方面,木瓜蛋白酶诱导骨性关节炎模型三部位软骨阿尔新兰及 HE 染色结果一致,故设髌软骨为测量的感兴趣区域。

3.3 兔膝关节 OA 模型的 DTI 实验结果分析

水分子的弥散运动表现分为各向同性弥散与各向异性弥散。高弥散区域具有高 ADC 值,低 ADC

值表示水分子弥散能力低。本研究结果发现,不同分组之间 ADC 值有统计学差别,且 ADC 在早期升高较为明显,随着退变程度的加重,ADC 值逐渐减低。我们推测此结果与软骨的生化改变有关。关节退变中基质组分的一种改变就是蛋白多糖的减少,其与 ADC 值的变化关系密切^[8],这与蛋白多糖对水分子的作用有关。正常软骨中蛋白多糖通过自身的负电荷结合水分子,从而维持其生物力学特性。在软骨病变早期,由于胶原纤维的结构发生改变和破坏,蛋白多糖减少及蛋白多糖的降解引起结合水的释放,导致软骨组织中结合水减少而关节间隙内的自由水增加;此外,II 型胶原的退变增加了关节表面的摩擦和对水的通透性,关节液可渗入软骨内,因此,早期退变关节软骨 ADC 值升高明显。骨性关节炎中晚期软骨变薄,出现纤维化,蛋白多糖大量流失,负电荷的减少直接导致软骨水分的减少,所以在骨性关节炎中晚期软骨 ADC 值逐渐减低。

FA 值为定量分析各向异性最常用参数,反映水分子弥散的各向异性成分与各相同性成分的比值,自由水脑脊液的 FA 值为 0。本兔子模型研究中,早期骨性关节炎退变主要是结构的改变,II 型胶原含量基本不变,II 型胶原纤维的肿胀、胶原网的破坏,减弱了对蛋白多糖的限制,导致自由水的增加,FA 值减低^[9-10];另外,电镜观察发现,随着骨关节炎的进展,胶原纤维走向方向异常,增粗的 II 型胶原纤维中出现了 I 型胶原纤维,这两方面都将导致骨性关节炎中晚期 FA 值的降低。

FA 值反映水分子弥散方向及反应组织结构的关系,提示 FA 值联合 ADC 值诊断软骨退变更为客观而准确^[11]。

3.4 本实验的不足和局限性

由于目前 DTI 的低空间分辨率,实验所得到的图像质量不高,随着技术和硬件的改进,这方面的不足有望克服。本实验的样本数较少,因此本结果需要更大样本量的研究进一步验证。

DTI 能够有效的反映软骨组织成分改变,可以无创性量化评估软骨早期损伤,在软骨修复术后评估中也可能会具有重要临床应用价值。

参考文献:

- [1] Brooks PM. The burden of musculoskeletal disease a global perspective[J]. Clin Rheumatol,2006,25:778-781.
- [2] Joseph GB, Baum T, Alizai H, et al. Baseline mean and

- heterogeneity of MR cartilage T2 are associated with morphologic degeneration of cartilage, meniscus, and bone marrow over 3 years data from the Osteoarthritis Initiative [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2012, 20(7): 727 - 735.
- [3] José G. Raya, Annie Horng, Olaf Dietrich, et al. Articular Cartilage; In Vivo Diffusion Tensor Imaging [J]. Radiology, 2012, 26: 551 - 559.
- [4] Bassar PJ, Mattiello J, Le Bihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging [J]. Biophys J, 1994, 66: 259 - 267.
- [5] Goebel JC, Pinzano A, Grenier D et al. New trends in MRI of cartilage: Advances and limitations in small animal studies [J]. Biomed Mater Eng. 2010, 20(3): 189 - 194.
- [6] 欧云生, 安洪, 等. 鼠骨关节炎动物模型建立的现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 41 - 44.
- [7] Disler DG, Recht MP, Mc cauley TR, et al. MR imaging of articular cartilage [J]. Skeletal radiol, 2000, 29: 367.
- [8] Raya JG, Melkus G, Adam-Neumair S, et al. Change of diffusion tensor imaging parameters in articular cartilage with progressive proteoglycan extraction [J]. Invest Radiol. 2011, 46 (6): 401 - 409.
- [9] Meder R, de Visser SK, Bowden JC, et al. Diffusion tensor imaging of articular cartilage as a measure of tissue microstructure [J]. Osteoarthritis Cartilage. 2006, 14(9): 875 - 881.
- [10] Raya JG, Melkus G, Adam-Neumair S, et al. Diffusion-tensor imaging of human articular cartilage specimens with early signs of cartilage damage [J]. Radiology, 2013, 266(3): 831 - 841.
- [11] Glaser C. New techniques for cartilage imaging: T2 relaxation time and diffusion-weighted MR imaging [J]. Radiol Clin North Am, 2005, 43(4): 641 - 653.

[修回日期] 2013-11-25

· 科普 ·

实验动物:是经过人工培育或者人工改造,对其携带的微生物和寄生虫实行控制、遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生物制品或药品检定,以及其他科学实验的动物。完全意义上的实验动物必须具备以下条件:

1. 实验动物培育方面:一是实验动物经过特定方法培育;二是新开发实验动物,应用符合特定要求的严格的方法进行培育。

2. 微生物控制方面:所有实验动物携带的微生物、寄生虫都是在人工严格的控制之下。由于实验动物携带的微生物和寄生虫不仅影响实验动物自身的健康,还可能影响到实验动物接触者(实验动物饲养人员和实验人员)的健康,同时对动物实验结果也会造成很大影响,因此为了保证人员健康、动物健康及动物实验结果的准确性、重复性等,实验动物的微生物控制也是非常重要的一个环节。

3. 遗传控制方面:实验动物必须遗传背景明确或来源清楚。所以实验动物是一类遗传限定的动物可以分为遗传不确定动物、部分遗传确定动物和同基因型动物三类。其中遗传不确定动物包括封闭群、遗传杂合群、远交选择群、分离杂交群、深入杂交系;部分遗传确定动物包括远交遗传背景的突变系、远交遗传背景的转基因动物和培育过程中的近交系;同基因品系包括近交系、同类近交系、重组近交系、重组同类系、染色体替换品系、F1 代杂交群、分离近交系、克隆动物、同卵双胞胎。

4. 应用方面:所有实验动物培育、饲养、控制等的最终目的就是应用与科学试验。目前广泛应用于生物医学、制药、化工、农业、畜牧、环保、军工、宇航等领域,在各领域里代替人类本身探索生命科学的真理。

实验动物学:是一门以实验动物为主要研究对象,并将培育的实验动物应用于生命科学及相关研究的一门综合性学科。简而言之,实验动物学是一门研究实验动物和动物实验的一门综合性基础应用学科。前者是以实验动物本身为对象,专门研究他的育种、保种(培育新品种、保持原有品系的遗传特性)、生物学特性(包括解剖、生理、生化、生殖及生态等特点)、繁殖生产、饲养管理以及基本能够的诊断、治疗和预防,以期达到如何提供标准的实验动物;后者是以实验动物为材料,采用各种方法在实验动物体内进行实验,研究动物实验过程中实验动物的反应、表现及其发生发展规律等问题,着重解决实验动物如何应用到各个科学领域中去,为生命科学及相关研究服务。