

超声造影评估兔人工骨血管化的实验研究

凌茵¹, 王莎莎², 陈泽鹏³, 夏远军³, 朱贤胜², 范俊儿²

1. 南方医科大学, 广东 广州 510515; 2. 广州军区广州总医院超声影像科, 广东 广州 510100; 3. 广州军区广州总医院骨科, 广东 广州 510100;

【摘要】目的:探讨超声在人工骨微血管生长过程中的应用价值, 为骨移植生长提供早期诊断信息。**方法:**15只新西兰兔分别行经典双前肢桡骨大段骨缺损模型造模, 植入珊瑚羟基磷灰石人工骨(CHA), 分别于第3、7、11、15、30、45天对实验动物双侧CHA行常规超声及超声造影检查, 观察微血管灌注情况。应用超声造影定量分析时间-强度曲线(TIC), 于CHA的4个等分点分别检测基础强度(BI)、峰值强度(PI)、增强强度(ΔSI)、BI/PI、达峰时间(TTP), 并与病理结果进行对照。**结果:**术后第3天超声造影显示CHA周边稍增强, 中央无增强;第7天周边明显增强, 中央稍增强;第15天中央见造影剂完全充盈。相同时间比较CHA的4个测量点的 ΔSI 、BI/PI、TTP值均无统计学意义($P>0.05$);比较不同时间的 ΔSI 、BI/PI、TTP值均有统计学意义($P<0.05$)。时间与 ΔSI 呈显著正相关, 与BI/PI、TTP呈显著负相关。**结论:**超声造影可早期显示CHA的微血管血流灌注情况, 为骨移植生长评估提供新型有价值的诊断依据。

【关键词】超声造影;珊瑚羟基磷灰石;骨移植;血管化;定量分析

【中图分类号】R329.4;R445.1

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)05-0445-05

Artificial bone angiogenesis in rabbits assessed with contrast-enhanced ultrasound: an experimental study

LING Yin¹, WANG Shasha², CHEN Zepeng³, XIA Yuanjun³, ZHU Xiansheng², FANG Jun'er²

1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Ultrasound, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510100, China; 3. Department of Orthopaedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510100, China

Abstract: Objective To study the diagnostic value of ultrasound in artificial bone angiogenesis and provide early diagnosis information for the growth of the transplanted bones. **Methods** A classic bone defect model in bilateral radius was established in 15 New Zealand rabbits implanted with coral hydroxyapatite (CHA). The microvascular blood perfusion of CHA was observed with conventional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound (CEUS) examination on the 3rd, 7th, 11th, 15th, 30th, 45th day after the bone transplantation. Each CHA was divided into 4 equal parts. Time intensity curve (TIC) of CEUS was used to detect the basic intensity (BI), peak intensity (PI), increased signal intensity (ΔSI), BI/PI, and time to peak (TTP) of the 4 parts, and the measurement data were compared with pathological results. **Results** CEUS showed that the peripheral CHA was slightly enhanced, while the central part was not enhanced on the 3rd day after the bone transplantation, but the central part was enhanced fully on the 7th day. The ΔSI , BI/PI, TTP at the same time were compared among the 4 parts in CHA and showed no significant difference ($P>0.05$), while the ΔSI , BI/PI, TTP at the different time showed obvious difference among the 4 parts ($P<0.05$). Time was positively correlated with ΔSI and negatively with BI/PI and TTP. **Conclusion** Microvascular blood perfusion of CHA can be displayed early with the use of CEUS, which can provide a valuable diagnostic evidence for the growth assessment of transplanted bones.

Keywords: contrast-enhanced ultrasound; coralline hydroxyapatite; bone transplantation; vascularization; quantitative analysis

【收稿日期】2017-01-16

【基金项目】国家自然科学基金(51303031);广东省自然科学基金(S2012010009743)

【作者简介】凌茵, 硕士研究生, 主治医师, E-mail: qingtian122527@163.com

【通信作者】王莎莎, 硕士生导师, 主任医师, E-mail: wss878333@163.com

前言

在现代战争、交通生产事故及各类骨科疾病中, 骨缺损难以避免。据统计, 在我国骨缺损或功能障碍患者已超过300万^[1], 而目前较常应用修补的方法是骨移植^[2], 自体骨疗效最佳但取材有限, 故研制移

植替代物具有广阔的前景,是现今骨移植领域的前沿与热点^[3]。近年来随着骨组织工程学的发展,具有生物活性的移植材料不断出现且部分已用于临床^[4],决定其成活关键环节是早期移植血管化的程度^[5-7],但至今尚未有微创的有效评估办法。随着超声造影技术的发展,其已广泛应用于临床各器官病变微灌注的评价及与微血管密度相关的研究^[8-10],但将其用于观察移植骨早期血管化程度的研究,国内外尚少有报道。本实验选取已在临床广泛使用的珊瑚羟基磷灰石人工骨(CHA)^[11-12]为材料,旨在探索超声造影评估移植骨早期血管化程度的可行性,为临床或实验室研究移植替代物的早期血管化提供新型有利的诊断信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及材料 超声造影剂(UCA)选用声诺维(SonoVue)六氟化硫微气泡注射液,购自意大利Bracco有限责任公司。戊巴比妥钠,购自北京普博斯生物科技有限公司。肝素钠注射液,购自上海第一生化药业有限公司。0.9% NaCl注射用生理盐水,由广州军区总医院药剂科提供。CHA,由广州军区总医院骨科实验室提供。

1.1.2 实验动物 健康新西兰大耳雄性白兔15只,由广州军区广州总医院动物实验中心提供。兔龄:3~6个月,体质量2.4~3.2 kg。本实验获得广州军区广州总医院实验动物伦理委员会批准。

1.1.3 实验设备 超声仪器为美国GE公司Logic E9型彩色多普勒超声诊断仪,自带造影技术及超声定量分析功能,9L-D线阵高频探头,频率为6~9 MHz。电子天平,购自北京赛多利斯科学仪器有限公司,型号为PRACTUM5100-1CN,量程5.1 kg,精度1 g。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 对15只新西兰兔分别行经典双前肢桡骨大段骨缺损模型造模^[13],骨缺损长度为20 mm,植入20 mm×3 mm×3 mm的CHA,术后包扎,抗感染,常规饲养。实验前,选取兔耳缘静脉,置入22G留置针,注射3%戊巴比妥钠,按1 mL/kg麻醉并行双前肢术区备皮,取仰卧位固定于动物板上。

1.2.2 超声造影剂配置 按照SonoVue说明书配置,1支25 mg冻干粉剂与5 mL注射用生理盐水混合摇匀,微泡密度为 2×10^9 g/mL,微泡浓度为 2×10^8 个/mL,与人血浆等渗。

1.2.3 超声检查 通过超声定位每段兔前肢CHA的4个等分点,即两端及中央平分的两点。术后第3、7、11、15、30、45天分别在这4个点上对CHA行灰阶、彩

色多普勒(CDFI)、能量多普勒(CDPI)、B-Flow及CEUS检查,观察其微血管生长情况。在整个实验过程中,探头与兔前肢皮肤之间要求有足够的耦合剂,避免对实验兔前肢的压迫,且常规超声频率固定为8.4 MHz,CEUS期间保持仪器固定以下值:机械指数(MI)为0.14,频率Res,增益12%,动态范围57 dB,仪器输出功率为10%,聚焦深度3 cm。

超声造影实验过程:通过22G留置针,造影剂经兔耳缘静脉0.01 mL/kg团注,随后1.5 mL生理盐水冲管。团注造影剂时启动图像采集,选取横切面观察90 s,记录CHA造影情况,并用Logic E9自带DICOM格式进行储存。为了避免影响,每次造影间隔时间不小于10 min。

1.2.4 定量分析 运用Logic E9自带的TIC-Analysis功能,分别对不同时像的CHA的4个测量点行定量分析,测量基础强度(BI)、峰值强度(PI)、增强强度(Δ SI,PI与BI的差值)、BI/PI及达峰时间(TTP)。其中感兴趣区(ROI)取样面积相同,每次测量均选取3个不同的取样点,取平均值后进行评估。

1.2.5 病理对照 分别于术后第3、7、11、15、30、45天各取一实验兔双前肢的CHA行病理制备,行HE染色,比较微血管生长情况与超声造影分析结果。

1.2.6 统计学处理 采用SPSS22.0统计软件进行数据分析,计量资料采用均数±标准差表示。各组间对比均采用配对样本 t 检验。为探讨时间与 Δ SI、BI/PI、TTP的关系,采用双变量相关分析(Pearson)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

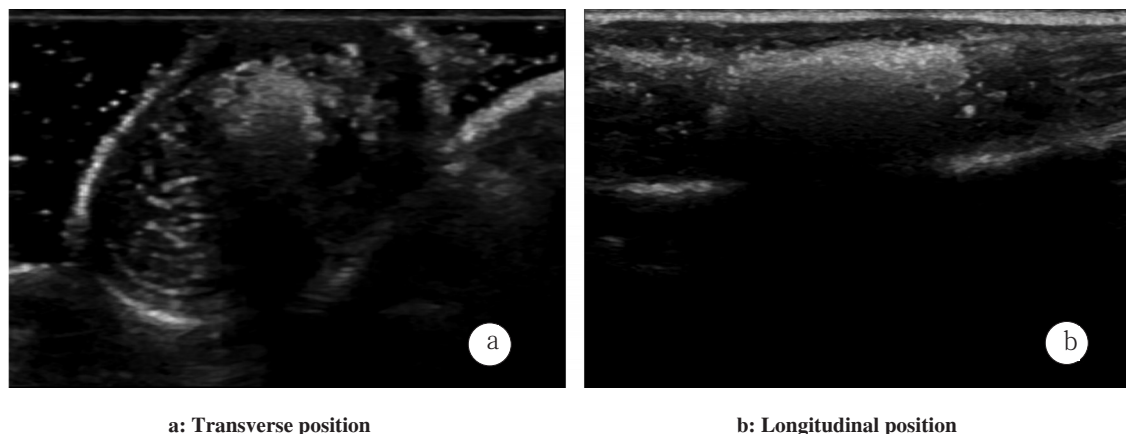
2 结果

2.1 常规超声观察

第3天起,灰阶超声显示CHA呈圆柱形实性稍高回声,内见筛孔样点状无回声,均匀分布,显示清晰,双侧骨折断端相临紧密,对位对线良好,周围软组织回声稍低(图1)。第11天起,CDFI显示CHA内见点状血流信号,PW呈低阻力动脉血流频谱,与CHA闪烁伪像及周围软组织血流分辨困难。第45天CHA表面反射较前明显,骨质显示较前模糊,筛孔样结构显示欠清。实验过程中CDFI、CDPI及B-Flow对CHA的血流情况显示欠佳,边缘均见彩色伪影。

2.2 超声造影观察

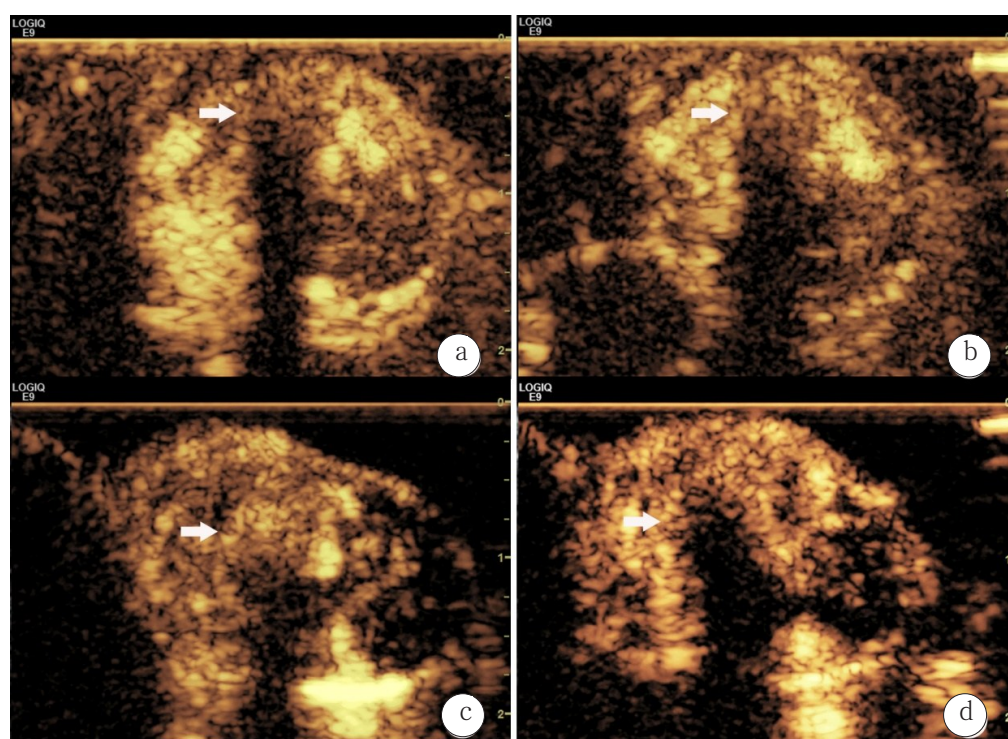
第3天,CHA外周区见稍高增强,与周围软组织界限欠清,中央区增强不明显。第7天,CHA外周及中央区均见造影剂充盈,周边组织较中央增强明显。第15天,CHA外周及中央区增强强度相近。第45天,CHA表面反射增强,中央部出现后方衰减情况,故造影显像不佳。详见图2。



a: Transverse position

b: Longitudinal position

图1 移植后第3天CHA灰阶超声图

Fig.1 Gray scale ultrasonography image of coral hydroxyapatite (CHA) on the 3rd day after bone transplantation

a: On the 3rd day, a little of ultrasonic contrast agent (UCA) was found in the peripheral CHA and few in the central part; b: On the 7th day, a lot of UCA was detected in the peripheral CHA and a little in the central part; c: On the 15th day, the contrast-enhanced intensity in peripheral area was similar to that in the central part; d: On the 45th day, the reflection of peripheral CHA increased, and the central part showed posterior attenuation.

图2 移植后CHA超声造影图

Fig.2 Contrast-enhanced ultrasound image of CHA after bone transplantation

2.3 定量分析

2.3.1 CHA的4个观察点间对比 在每个时间窗内, 分别对比CHA的4个观察点的 ΔSI 、BI/PI、TTP值, 结果表明均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.2 不同时间组间对比 分别对比各时间组的 ΔSI 、BI/PI、TTP值, 其中每段CHA均取4个观察点的均值进行评估, 统计结果表明均有统计学意义(表1, $P<0.05$)。通过时间组与各造影定量的相关分析发

现, ΔSI 随时间的推移而增加, 呈显著正相关($r=0.871, P<0.05$); BI/PI、TTP值随时间的推移而减少, 呈显著负相关($r=-0.589/-0.871, P<0.05$)。

2.4 病理结果

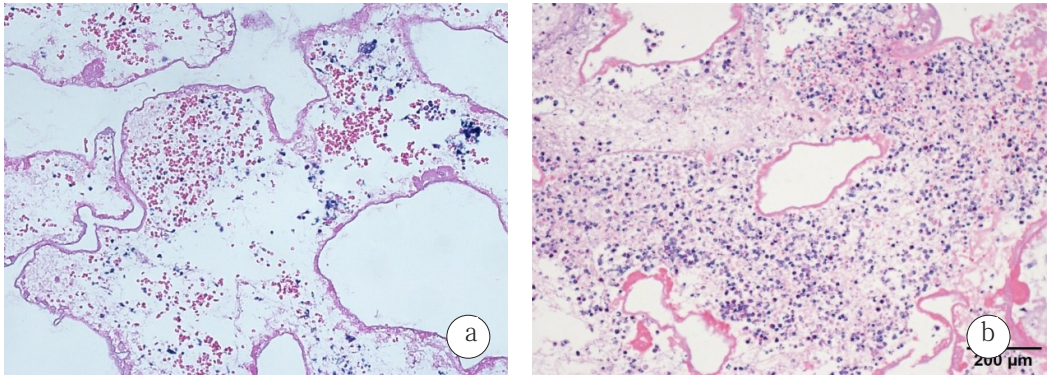
HE染色结果(图3)显示, 术后第3天, CHA周边见大量红细胞, 中央区见少量红细胞, 随着时间的推移, CHA内红细胞、纤维结构、多核巨细胞及单核细胞数量较前明显增加, 提示微血管生成较前增多。

表1 各时间CHA超声造影所测 ΔSI 、BI/PI、TTP值($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 ΔSI , BI/PI, TTP were measured with CEUS in different days ($Mean \pm SD$)

Days after bone transplantation	<i>n</i>	$\Delta SI/dB$	BI/PI	TTP/s
3 rd day	30	2.30±0.52	0.941±0.019	22.40±2.98
7 th day	28	5.11±1.28	0.912±0.023	19.37±2.72
11 th day	26	6.91±1.21	0.891±0.026	17.96±2.29
15 th day	24	8.69±1.42	0.867±0.027	14.52±2.11
30 th day	22	10.79±1.36	0.829±0.033	10.76±1.72

ΔSI : Increased signal intensity; BI: Basic intensity; PI: Peak intensity; TTP: Time to peak



a: On the 3rd day, a lot of red blood cells were detected in the peripheral CHA and few in the central part (HE, $\times 100$); b: On the 15th day, the CHA was full of red blood cells, multinuclear giant cells and mononuclear cells (HE, $\times 200$).

图3 CHA病理图

Fig.3 Pathological image of CHA

3 讨论

长期以来,治疗骨缺损一直是骨科临床中的难点和热点^[3]。目前骨组织工程学的发展为其开辟了一条崭新道路,同时也面临着许多问题,主要是移植物的血管化,即骨移植材料在植入后早期、快速地实现内部血运重建^[7]。通过周围血管的长入,移植材料建立血运获得营养,随之新生骨生成,从而达到修复目的;反之血管化不足将导致材料与周围组织间形成纤维囊,从而限制营养物质的摄取及代谢产物的排出^[6]。故骨组织工程技术的成败主要依靠支架材料血管网的建立^[7]。

传统移植骨血管化评估方法大致分为组织病理学和影像学检查^[14]。前者通过显微镜等技术,为评价的金标准,但碍于有创性,在临床实际应用中难于开展;后者是临床移植骨评估的首选检查手段,其中对血管化评估的报道主要包括放射性核素骨显像(SPECT)、CT及MRI^[14-16],但超声的应用目前尚少有报道。

根据超声的成像原理,当声波遇到高密度界面时将发生大量多次反射,故用常规超声检查骨质面时,声波无法穿透,成像困难。本实验采用的CHA是骨组织工程中一种目前较常应用于临床的支架材料,其通过天然珊瑚“水热反应”转换而来,留有天然多孔样结构,生物相容性好^[17-18]。本实验中,其在早期灰阶超声及CEUS中显示清晰,但在CDFI及CDPI评估中因彩色伪影的产生而显示欠佳。

本实验将超声造影技术应用于评价CHA的血管化,观察结果显示:术后第3天,CHA周边即可见少量造影剂充填,中央区无充填,与病理结果提示CHA周围部见大量红细胞、中央部见少量红细胞一致;术后第7天,造影剂完全充填入CHA,周围部多,中央部少;术后第15天,周围部与中央部增强程度相似,表明随着时间的增加,微血管自CHA周围长入中央,与病理结果CHA中央部红细胞、纤维结构、多核巨细胞及单核细胞数量逐渐增加提示一致;术后第45天,灰阶超声显示CHA表面反射增强,中央部后方产生衰减,由超声成像原理推断表面已有部分新生骨形

成。上述结果表明超声造影能早期观察CHA的血管化情况,与SPECT、CT及MRI相比,观察时间大大提前,更具敏感性。在超声造影定量分析中, ΔSI 是造影剂进入CHA的增强强度,反映红细胞进入CHA的数量。TTP是造影剂增强强度到达峰值的对应时间,与BI/PI一样反映红细胞进入CHA的速度。在各相同时间内,CHA的4个点的所有造影定量参数(ΔSI 、BI/PI、TTP)比较均无差异,说明CHA两端及中央部血管化程度相近,符合Moore^[19]、金行晴^[20]等对骨“爬行替代”学说的异议,即新骨形成细胞的来源是受植床而非植骨块。对比不同时间组的定量参数,发现时间与 ΔSI 呈显著正相关,与BI/PI、TTP呈显著负相关,表明CHA微血管灌注量随着时间的推移逐渐增加,到达峰值的速度逐渐加快。

综上所述,超声造影能较好地显示CHA早期血流灌注,虽在成骨后显像欠佳,有一定局限性,但与其他影像学方法比较,具有敏感、安全、移动便捷、廉价等优势,是一种可供临床评估移植骨血管化的新方法。

参考文献:

- [1] 辛雷, 苏佳灿. 人工骨修复材料的现状与展望[J]. 创伤外科杂志, 2011, 13(3): 272-275.
XIN L, SU J C. Current status and prospect of artificial bone repair materials[J]. Journal of Traumatic Surgery, 2011, 13(3): 272-275.
- [2] KNAACK D, TRAIANEDES K, DIEGMAN M, et al. Improved bone graft: EP2295088[P]. 2016.
- [3] HERNIGOU P. Bone transplantation and tissue engineering. Part II: bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries (Duhamel, Haller, Ollier and MacEwen)[J]. Int Orthopaed, 2015, 39(1): 193-204.
- [4] MIRON R J, SCULEAN A, SHUANG Y, et al. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA[J]. Clin Oral Implant Res, 2016, 27(6): 668-675.
- [5] LIU Y, LIM J, TEOH S H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(5): 688.
- [6] HARRIS G M, RUTLEDGE K, CHENG Q, et al. Strategies to direct angiogenesis within scaffolds for bone tissue engineering[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(19): 3456-3465.
- [7] 陈凯, 张超, 王路, 等. 骨组织工程中促进血管化策略的研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(4): 383-388.
CHEN K, ZHANG C, WANG L, et al. Progress on strategies to promote vascularization in bone tissue engineering [J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2015, 28(4): 383-388.
- [8] 戴晴, 姜玉新. 超声造影的临床应用[J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(1): 1-4.
DAI Q, JIANG Y X. Clinical applications of contrast-enhanced ultrasound[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2008, 30(1): 1-4.
- [9] WANG S, YANG W, FU J J, et al. Microflow imaging of contrast-enhanced ultrasound for evaluation of neovascularization in peripheral lung cancer[J]. Medicine, 2016, 95(32): e4361.
- [10] BELCIK J T, MOTT B H, XIE A, et al. Augmentation of limb perfusion and reversal of tissue ischemia produced by ultrasound-mediated microbubble cavitation[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2015, 8(4): e002979.
- [11] DU B, LIU W, DENG Y, et al. Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects *in vivo*[J]. Int J Nanomed, 2015, 10: 2555-2565.
- [12] 许瑾, 吴晶晶, 王晓冬, 等. 羟基磷灰石复合骨组织工程支架的研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2016, 13(2): 63-66.
XU J, WU J J, WANG X D, et al. Development of several biomimetic scaffold in bone tissue engineering[J]. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2016, 13(2): 63-66.
- [13] 金光辉, 张馨雯, 孙晓飞, 等. 组织工程化纳米羟基磷灰石/聚己内酯人工骨支架修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2015, 10(1): 36-40.
JIN G H, ZHANG X W, SUN X F, et al. *In vivo* experiments of tissue-engineered nano-hydroxyapatite/poly- ϵ -caprolactone scaffolds repair of segmental radius defects in rabbits[J]. Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing (Electronic Edition), 2015, 10(1): 36-40.
- [14] ÁNGEL E, STAHL A M, SHANJANI Y, et al. Vascularization in bone tissue engineering constructs[J]. Ann Biomed Eng, 2015, 43(3): 718-729.
- [15] CELIK T, YUKSEL D, KOSKER M, et al. Vascularization of coralline versus synthetic hydroxyapatite orbital implants assessed by gadolinium enhanced magnetic resonance imaging[J]. Curr Eye Res, 2015, 40(3): 346-53.
- [16] MICHEL G, BLERY P, PILET P, et al. Micro-CT analysis of radiation-induced osteopenia and bone hypovascularization in rat[J]. Calcif Tissue Int, 2015, 97(1): 62-68.
- [17] 尹庆水, 张余, 李兆麟, 等. 复合珊瑚羟基磷灰石人工骨的研制和临床应用[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2003, 18(3): 147-149.
YIN Q S, ZHANG Y, LI Z L, et al. Preparation of the composite rhBMP2/CHA bone graft substitutes and clinical application [J]. Chinese Journal of Bone and Joint Injury, 2003, 18(3): 147-149.
- [18] FILLINGHAM Y, JACOBS J. Bone grafts and their substitutes[J]. Bone Joint J, 2016, 98-B(1Supp.A): 6-9.
- [19] MOORE J B, MAZUR J M, ZEHR D, et al. A biomechanical comparison of vascularized and conventional autogenous bone grafts [J]. Plast Reconstr Surg, 1984, 73(3): 382.
- [20] 金行晴, 邱蔚六, 林国础. 血管化和非血管化骨移植种植体与骨结合的比较研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1993, 11(3): 163-166.
JIN H Q, QIU W L, LIN G C. Comparison of osseointegrated process of implant on vascularized and non-vascularized bone grafts[J]. West China Journal of Stomatology, 1993, 11(3): 163-166.

(编辑: 黄开颜)