

## 磁共振灌注成像监测组织工程骨血管化的实验研究

组织工程骨修复骨缺损的基础是血管化,它贯穿于整个的修复过程。尽管血管化对于骨组织的修复非常重要,但目前还没有理想的监测这个过程的手段[1]。我们采用近年来兴起的磁共振灌注成像(PWMRI)方法监测组织工程骨血管化的情况,旨在寻找一种无创、无辐射、高灵敏度的监测方法。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验动物分组及材料

成年恒河猴13只(由华南灵长类动物研究中心提供),雌雄不限,体质量3.0~4.5 kg,平均4.2 kg。26个下肢随机分为五组,每组5个,剩余1个备用,依据填塞的材料不同分组如下:A组: $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP)+骨髓基质干细胞(BMSCs)+血管束;B组: $\beta$ -TCP+血管束;C组: $\beta$ -TCP+ BMSCs;D组: $\beta$ -TCP;E组:空白对照。

骨髓基质干细胞(BMSCs)的培养:恒河猴麻醉后无菌操作下行髂骨多点穿刺,抽取2 ml骨髓。离心并用100目钢网过滤后接种于培养瓶内,加含15%胎牛血清的高糖DMEM(Hyclone公司)液,置于CO<sub>2</sub>孵箱内培养,每3天换液。待原代细胞长满瓶底,用0.25%胰酶-EDTA液将贴壁细胞消化分离,加条件培养基,置于CO<sub>2</sub>孵箱内继续培养,每2~3 d换液,选取第3代细胞,成骨诱导培养10 d左右。

$\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP):商品名为chronOSTM,由马特仕公司提供,直径12 mm,长度20 mm,横截面呈C型。

血管束来源:恒河猴胫骨内侧皮下隐动脉分支,其外径约0.8~1.0 mm。

#### 1.2 动物模型的制备

将恒河猴用速眠新II麻醉,用量为0.15 ml/kg,仰卧于手术台。取胫前直切口,沿胫前肌与胫骨间隙进入。于胫骨外侧放置7孔A0重建钛钢板,除第4孔外其余孔2.5 mm钻头钻孔,3.5 mm螺丝攻攻丝后钛螺钉固定。于钢板第3~5孔之间用线锯锯断胫骨,切除该段相应骨膜,造成2 cm的段缺性骨与骨膜缺损。然后根据动物分组填入相应材料,制备动物模型(图1)。



图1  $\beta$ -TCP填入骨缺损中,血管束穿过其中央

Fig.1 Bone defect filled with  $\beta$  TCP, with the vascular bundle in the center

1.2.1  $\beta$ -TCP与BMSCs的复合 将诱导培养的第三代BMSCs加DMEM制成细胞悬液，以 $5 \times 10^6$ /ml的密度用微加样器接种于 $\beta$ -TCP上，尽可能使细胞分布均匀，加入含15%胎牛血清的DMEM后静置于二氧化碳孵箱内继续培养3~5 d。

1.2.2 血管束的植入 在恒河猴胫骨内侧皮下找到隐动脉分支，纵向游离4~5 cm后经 $\beta$ -TCP的侧槽植入 $\beta$ -TCP中，血管束不切断。 $\beta$ -TCP嵌入骨缺损部位时，两端稍作修整，防止血管束受压。

### 1.3 磁共振灌注成像检查

术后4、8、12周实验动物均采用德国SIEMENS公司生产1.5 T超导型MR成像系统(Magneton Vision Plus VB33A)扫描检查。

1.3.1 常规扫描 采用快速自旋回波序列对恒河猴双侧胫骨进行横断面及冠状面扫描(T1、T2WI)，以选择合适的灌注成像平面。

1.3.2 灌注成像扫描 选择组织工程骨的中间横断面进行灌注成像扫描。采用快速小角度激发序列，TR 9 ms，TE 4 ms，激发角 $40^\circ$ ，矩阵 $256 \times 128$ ，扫描周期2 s。使用美国Medrad公司生产的自动高压注射器(spectris MRI injector)自恒河猴前臂头静脉注射对比剂(钆喷替酸葡甲胺Gd-DTPA，用量0.2 mmol/kg，注射速度3 ml/s)，在开始团注对比剂的同时启动灌注扫描程序，从而得到一动态图像系列(图2)。

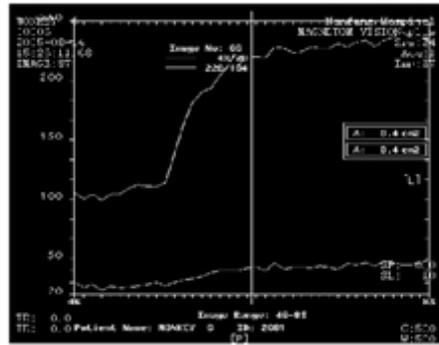


图2 术后12周信号强度-时间(SI-T)曲线，上方曲线为A组，下方曲线为E组  
Fig.2 Signal-time curves at week 12 postoperatively in groups A (upper) and E (lower)

1.3.3 图像处理及参数计算 将组织工程骨中部横断面作为感兴趣区(ROI)，由计算机自动生成信号强度-时间(SI-T)曲线和SI-T表。依据SI-T表中的数据计算ROI SI-T曲线的最大线性斜率( $SS_{\max}$ ) $SS = [(SI_{\text{end}} - SI_{\text{prior}}) / (SI_{\text{baseline}} \times T)] \times 100$  (%/s) 其中 $SI_{\text{end}}$ 和 $SI_{\text{prior}}$ 分别代表SI-T曲线上信号强度增幅最大的两相临时间点的信号强度， $SI_{\text{baseline}}$ 代表信号强度的基线水平，以对比剂到达受检组织前相应ROI的信号强度平均值代表此值，信号强度T为时间分辨率2 s。

### 1.4 X线检查

术后4、8、12周拍摄恒河猴双胫骨正侧位X线片。拍摄条件：电压 42 kV，电流100 mA，曝光时间0.12 s，球管距离台面80 cm。在PACS影像工作站获得电子图像，将所得照片统一调节为窗位：1400，窗宽：1660。直接在工作站上测得各组骨缺损区内的透光度。

### 1.5 放射性核素骨显像

术后4、8、12周行放射性同位素检查。GE公司Hawkeye SPECT-VG/8S 型扫描仪；显像剂： $^{99m}\text{Tc}$ -MDP，剂量：370 MBq(10 mCi)；采集条件：探头为低能高分辨准直器，能峰140 keV，窗宽20%，矩阵 $512 \times 512$ ，放大1.5。恒河猴上肢前臂浅静脉注药4 h后，采集一幅静态显像即延迟相，以骨缺损处 $1\text{cm} \times 2\text{cm}$ 大小的矩形为感兴趣区(ROI)，同位素计数，为排除每只恒河猴注射剂量的差异，均以左侧股骨中段同样大小ROI的同位素计数为标准，将双侧胫骨骨缺损部位ROI的同位素计数分别与之相比，求得ROI的同位素计数比值(图3)。



图3 术后8周ECT照片，右侧为A组，左侧为C组  
Fig.3 ECT image at week 8 postoperatively in groups A (right) and E (left)

## 1.6 统计分析

所有数据采用SPSS 10.0软件包统计分析，实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，多组数据样本采用重复测量数据的方差分析(多重比较采用LSD法)，相关分析采用双变量相关分析， $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 磁共振灌注成像

2.1.1  $SS_{vmax}$ 的方差分析提示 5个组间对比有统计学意义( $F=15.122$ ,  $P=0.000$ )；不同周数对比有统计学意义( $F=666.425$ ,  $P=0.000$ )；周数与组别之间有交互作用( $F=27.149$ ,  $P=0.000$ ) 带有血管束移植的A、B两组SI-T曲线的 $SS_{max}$ 术后8周与4周相比均有较大幅度的提高(A组： $P=0.003$ ，B组： $P=0.033$ )，C、D两组SI-T曲线的 $SS_{max}$ 术后8周与4周相比均有提高(C组： $P=0.001$ ，D组： $P=0.017$ )，术后12周与8周相比亦有提高(C组： $P=0.042$ ，D组： $P=0.036$ ，表1)。

表1 各组不同周数 MRI 灌注曲线的基线及斜率值

Tab.1 Baseline and maximum slope rates of PWMRI curves in each group at different postoperative time points ( $n=5$ ,  $Mean \pm SD$ )

Group	4 weeks		8 weeks		12 weeks	
	Baseline	Slope rate(%/s)	Baseline	Slope rate(%/s)	Baseline	Slope rate(%/s)
A	85.84±5.17	13.64±2.06 <sup>b</sup>	96.61±3.41	19.45±1.79 <sup>b</sup>	100.14±5.68	20.20±1.72
B	81.57±4.80	12.70±2.12 <sup>b</sup>	84.68±5.17	16.59±1.78 <sup>b</sup>	88.00±4.12	19.24±1.54
C	14.28±2.02	8.13±1.83 <sup>d1</sup>	24.94±3.22	15.02±2.41 <sup>d</sup>	33.65±4.66	18.57±1.71 <sup>d2</sup>
D	13.37±1.64	8.04±2.14 <sup>d1</sup>	20.28±1.44	12.63±2.67 <sup>d1</sup>	27.79±1.73	16.48±1.42 <sup>d2</sup>
E	13.96±2.88	8.87±2.31	17.35±4.73	9.63±2.59	19.44±4.84	12.55±2.03

<sup>b</sup> $P=0.003$ ; <sup>b</sup> $P=0.003$ ; <sup>d1</sup> $P=0.001$ ; <sup>d</sup> $P=0.042$ ; <sup>d2</sup> $P=0.017$ ; <sup>d2</sup> $P=0.036$

2.1.2 A、B两组基线水平高于另外三组(均为 $P=0.001$ )，随着术后周数的延长，五组SI-T曲线的基线水平不断增高。

### 2.2 X线检查

2.2.1 各组透光度对比有统计学意义( $F=214.545$ ,  $P=0.000$ )，A组术后12周与8周相比下降值有统计学意义( $P=0.001$ )；B、C两组术后12周与8周相比下降值有统计学意义(B组： $P=0.002$ ，C组： $P=0.021$ ，表2)。

表 2 各组术后不同时间点 X 光片透光度和 ECT 之 ROI 比值

Group	4 weeks		8 weeks		12 weeks	
	Transmittance	ROI ratio	Transmittance	ROI ratio	Transmittance	ROI ratio
A	566.20±13.16	12.10±2.77 <sup>*</sup>	503.00±13.32 <sup>ab</sup>	16.23±1.56 <sup>bc</sup>	413.00±22.45 <sup>cd</sup>	11.52±2.17
B	576.20±17.61	10.60±1.47	555.00±14.65 <sup>b</sup>	12.27±1.72	519.20±9.78 <sup>b</sup>	9.53±1.09
C	583.20±14.27	4.19±0.81 <sup>*</sup>	565.20±10.28 <sup>ac</sup>	5.32±0.65 <sup>ac</sup>	541.40±15.37 <sup>ac</sup>	3.85±0.76
D	618.00±20.77	2.84±0.67	603.00±16.91	3.31±0.62	584.60±14.69	2.34±0.82
E	879.40±12.44	0.78±0.06	874.40±13.07	0.82±0.07	867.80±11.84	0.86±0.05

<sup>\*</sup>P=0.001; <sup>a</sup>P=0.020; <sup>b</sup>P=0.002; <sup>c</sup>P=0.021; <sup>d</sup>P=0.042

2.2.2 术后12周, A组5个样本的 $SS_{\max}$ 与透光度呈负相关( $r_s=-0.892$ ,  $P=0.042$ )。其他组和时间段 $SS_{\max}$ 与透光度无明显相关。

### 2.3 放射性核素骨显像

2.3.1 术后8周与4周相比A、C两组ROI同位素计数比值增高有统计学意义(A组:  $P=0.020$ , C组:  $P=0.042$ )。术后8周与4周相比B、D两组ROI同位素计数比值无统计学意义(B组:  $P=0.056$ , D组:  $P=0.074$ )。

2.3.2 术后8周, A组5个样本的同位素计数比值与相同时间点的 $SS_{\max}$ 呈正相关关系( $r_s=0.899$ ,  $P=0.038$ )。其它组和时间段同位素计数比值与 $SS_{\max}$ 无明显相关。

## 3 讨论

组织工程骨的血管化是指血管长入并分布于人工材料内的过程, 它是维持人工骨活力, 加速骨愈合的关键。目前促进组织工程化人工骨血管化的主要方法有: (1) 血管束移植; (2) 应用生长因子; (3) 血管内皮细胞联合成骨细胞与支架材料复合; (4) 预构组织工程化血管等[2]。以往检测组织工程骨血管化主要有ECT及组织学切片的方法[3]。

普通X-线检查是最简单易行的监测方法, 通过对组织工程骨透光度的比较或者X-线片光密度的测定, 间接反映组织工程骨血管化程度及成骨能力。该方法无创、成本较低、也可进行定量分析是其主要优点。但组织工程化人工骨移植术后4周已有明显的血管化, 而钙盐的沉积改变较晚, 实验结果也证实术后8至12周组织工程骨透光度改变才有统计学意义, 所以, X-线片对组织工程骨血管化的早期监测无能为力, 灵敏度差, 且存在辐射情况。

放射性核素骨显像是上世纪70年代以来用以判断骨盐代谢活性的技术之一, 其影响因素取决于局部骨组织的血液供应的完善和骨内血液的流动率。 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 是一种亲骨性较强的有机磷酸盐, 静脉注入机体后经血流到达植骨区, 与骨内的羟基磷灰石晶体发生离子交换, 除晶体表面具有很强的 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ 吸附作用外, 未成熟的骨胶元对其亦有较高的亲和力。因此, 在骨代谢活跃部位呈现核素浓集区, 反之则出现核素冷区。利用此原理, 可以较早地判断移植骨的血流灌注及存活情况。实验结果提示: 除空白组外, 术后4周各组ROI的同位素计数比值均大于1, 说明各实验组材料有不同程度的血管化, 在术后8周达高峰。这证明放射性核素骨显像可以对组织工程骨的血管化进行早期监测以及定量分析, 并具有较高的灵敏度, 但需要使用放射性药物为其最大缺点。

CT灌注成像是指在静脉注射对比剂的同时对选定的层面进行连续多次扫描, 以获得该层面内每一像素的时间-密度曲线, 根据该曲线利用不同的数学模型计算出血流量、血容量、对比剂的平均通过时间、对比剂峰值时间等参数, 以此来评价组织器官的灌注状态。目前CT灌注成像技术在颅脑的临床应用较多, 由于其基础研究相对薄弱, 缺乏创新, 另外新型造影剂的研制滞后, 其他实质性脏器的应用主要在动物实验和临床探索阶段[4]。

磁共振灌注成像是继CT、普通X-线之后的无创检查技术[5]。它的工作原理是: 经静脉团注对比剂后, 当

对比剂首次通过受检组织时,由于对比剂主要分布在毛细血管内,而毛细血管外分布量很少,血管内外浓度梯度最大,引起局部微观磁场的均匀性发生改变,邻近氢质子的弛豫加快,Gd-DTPA在低浓度时,以缩短T1弛豫时间为主,信号强度随浓度的增加而增加;而在高浓度时,以缩短T2弛豫时间为主,导致信号强度随浓度的增加而持续下降。信号的变化受弥散因素的影响最小,主要反映微血管分布及毛细血管血流灌注情况,用于评估局部组织活力及功能。磁共振灌注成像常应用于骨骼-软组织肿瘤的良恶性鉴别[6],孟俊非等[7]通过研究证明:SI-T曲线的最大线性斜率 $SS_{max}$ 能够较好地反映肿瘤组织的血管化和血流灌注情况。因此,我们将 $SS_{max}$ 作为监测组织工程骨血管化的一项重要指标。实验结果中 $SS_{max}$ 和组织工程骨的成骨量直线相关,也充分证明了 $SS_{max}$ 与组织工程骨血管化程度之间的关系。统计分析的结果提示,带血管束移植的A、B两组术后第4周至第8周 $SS_{max}$ 的增幅最大,A组最为明显,这表明处于快速血管化阶段。术后第12周, $SS_{max}$ 虽然增加,但无统计学意义,表明血管化已达成熟阶段,这与国内外学者研究结果基本相同[8],[9]。无血管束移植的C、D两组,术后4、8、12周 $SS_{max}$ 呈均匀递增趋势,说明其血管化进程缓慢,从而证明血管束移植是促进组织工程化人工骨血管化的一种较好的方法。同时,放射性核素骨显像结果和磁共振灌注成像的结果基本吻合,均提示组织工程骨的血管化在术后第8周达到高峰。

磁共振灌注成像方法监测组织工程骨血管化的优缺点:通过几种监测方法的对比可以发现磁共振灌注成像具有以下优点:(1)有多个成像参数并能提供丰富的目标信息;(2)通过对 $SS_{max}$ 定量计算,实现对组织工程骨血管化的半定量分析;(3)能早期监测组织工程骨血管化,且灵敏度高;(4)无电离辐射、安全可靠;(5)属于无创伤检查。同时,该方法也存在一些不足,价格较高、所需时间较长、以及需要一定的设备和技术以及相关软件支持等。

磁共振灌注成像的质量控制:(1)磁共振灌注成像使用的MR扫描机器必须具有EPI扫描功能,并且安装灌注软件。较为合适的机型为超导型MR,场强最好等于或大于1.5T,其梯度场强为22~25 mT/m。(2)EPI扫描序列分别有自旋回波序列(SE)和梯度回波序列(GRE),自旋回波序列(SE)的优点是磁化率伪影少,对毛细血管床内的对比剂敏感,缺点是对比剂用量较大。本实验采用自旋回波序列,以减少误差率。(3)目前在骨骼软组织肿瘤灌注成像研究中最常用的对比剂是钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA),它是一种顺磁性对比剂。为了保证对比剂早期位于血管而不进入组织,消除对比剂的再循环和漏出,对注射的对比剂的速率和注射量必须有一定要求。在肌骨系统灌注成像时注射速度不低于2 ml/s。同时为保证注射速率的一致性,最好使用磁共振专用高压注射器。(4)内固定器材的伪影控制。磁场中任何铁磁性或非铁磁性金属的出现,均可导致明显的磁场扭曲。铁、钴、镍等铁磁性金属进入磁场后,磁力线将高度集中于这些金属,从而使磁场均匀性受到严重破坏;铂、钛、钆等顺磁性金属集中磁力线的程度比铁磁性金属弱得多,但也影响主磁场的均匀性;在制作骨缺损模型时,应考虑到磁共振灌注成像检查时的金属伪影问题,严禁使用不锈钢器材。在本课题的预实验过程中,我们发现国产钛合金钢板螺丝钉的伪影要高于A0钛合金钢板螺丝钉,因而,在该实验过程中我们选择了7孔A0钛合金钢板螺丝钉作为骨缺损的内固定器材。另外,在选取感兴趣区时应避开伪影区。(5)灌注成像扫描层面的确定和感兴趣区的选择:为了观察植入血管束对血管化的影响,选择组织工程骨的横断面作为灌注成像扫描层面。具体平面是根据灌注检查前的磁共振平扫来确定的,要求选取的平面和胫骨的轴线垂直,并尽量选取组织工程骨的中部。恒河猴胫骨中段直径约1 cm,其横截面约1 cm<sup>2</sup>,因此,感兴趣区的面积应在0.8~1.0 cm<sup>2</sup>之间,还应把血管束形成的影像放在感兴趣区的中心部位。同一只实验动物不同周数灌注检查时,应参照第一次检查的结果,使灌注平面尽可能一致,选取感兴趣区的位置、大小也做到尽可能一样,以减少实验误差。

#### 参考文献:

[1]Guldberg RO. Micro-CT imaging technique to help tissue engineers improve bone regeneration[J]. Med Devices Surg Technol Week, 2005, 20: 350.

[2]樊征夫,杨志明.骨移植体及骨移植替代物在体内的血管化[J].生物医学工程与临床,2001,5(2):167-71.

[3]金丹,陈滨,裴国献,等.筋膜瓣促组织工程骨再血管化及山羊长段骨缺损的修复[J].中华实验外科杂

志, 2005, 22: 269-71.

[4]赵光明, 韩丹. CT灌注成像原理与技术[J]. 中国医学影像技术, 2003, 19: 636-8.

[5]Hawighorst H, Libicher M, Knopp M, et al. Evaluation of angiogenesis and perfusion of bone marrow lesions: role of semiquantitative and quantitative dynamic MRI [J]. Magn Reson Imaging, 1999, 10: 286-94.

[6]Catharina S, Maarje J, Pancras C, et al. Soft-tissue tumors: Value of static and dynamic gadopentetate dimeglumine-enhanced MR imaging in prediction of malignancy[J]. Radiology, 2004, 233: 493- 502.

[7]孟俊非, 吕衍春, 吕凤华, 等. 增强MR灌注成像在骨骼-软组织肿瘤良恶性鉴别诊断中的价值[J]. 中华放射学杂志, 2001, 35: 578-83.

[8]戚 超, 黄富国, 罗静聪, 等. 体外构建与体内构建组织工程骨的血管化研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6: 748-51.

Qi C, Huang FG, Luo JC, et al. A study on vascularization of tissue engineered bone constructed in vivo and in vitro[J]. Chin J Orthop Traumatol, 2004, 6: 748-51.

[9]Civelek A, Pacheco E, Vatarajam T, et al. Quantitative measurement of vascularization and vascular ingrowth rate of corraling hydroxyapatite ocular implant by  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP bone imaging[J]. Clin Nucl Med, 1995, 20: 779-87.

---

[回结果列表](#)