

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.009

低强度脉冲超声对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用

周 崑¹, 周 伟², 陈文直¹, 王智彪¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院 HIFU 肿瘤中心, 重庆 400010; 2. 四川省广安市人民医院内三科, 广安 638001)

【摘 要】目的: 观察低强度脉冲超声(Low intensity pulsed ultrasound, LIPU)对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用。方法: 向 9 只成年健康新西兰兔膝关节腔内注射 0.1% 美蓝溶液 0.5 ml, 随机选择一侧作为治疗组给予 5 min LIPU 治疗, 另一侧作为对照组进行假治疗。随后处死实验兔, 取股骨髁间窝关节软骨标本, 在解剖显微镜下拍照。测量照片上美蓝从软骨表面渗入软骨内的深度, 将测量结果作配对分析。结果: 5 min LIPU 治疗组美蓝渗入兔膝关节软骨较假治疗组深, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: LIPU 能促进美蓝渗入正常兔膝关节软骨, 可能会增加关节软骨营养。

【关键词】超声治疗; 软骨; 关节

【中国图书分类法分类号】R454.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-09

Low intensity pulsed ultrasound for promoting penetration of methylene blue into knee cartilage of normal rabbit

ZHOU Kun¹, ZHOU Wei², CHEN Wenzhi¹, WANG Zhibiao¹

(1. Clinical Center for Tumor Therapy, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. the Third Department of Internal Medicine, the People's Hospital of Guang'an in Sichuan Province)

【Abstract】Objective: To observe the effect of low intensity pulsed ultrasound(LIPU) on penetration of methylene blue into knee cartilage of normal rabbit. Methods: 5 ml 0.1% Methylene blue solution were injected into both articular cavities of hind legs of nine New Zealand rabbits. One of the hind legs of each rabbit was distributed randomly into treatment group and treated with LIPU, while the other into control group with dummy treatment. All animals were sacrificed after a five-minute LIPU treatment. Cartilages of femur intercondylar fossa were removed and cut into slices, and the photos were taken under anatomic microscope. The depths of methylene blue penetrating into articular cartilage were measured. Pair matched analysis was performed to learn if there is a significant difference between the two groups. Results: Penetration of methylene blue into articular cartilage in LIPU group were deeper than that in control group($P < 0.05$). Conclusion: LIPU enhances methylene blue penetration into articular cartilage, which indicates LIPU may improve nutrition supply of articular cartilage.

【Key words】ultrasound therapy; cartilage; articular

关节软骨是没有血管的组织^[1]。对关节软骨营养来源的认识经历了一个较长期的过程。目前认为, 在幼年动物, 关节软骨的营养来自软骨下骨和关节滑液(Synovial fluid)^[2-4]。在成年动物, 关节软骨的营养只来自于关节滑液^[5-7]。关节的正常运动是关节滑液向关节软骨内渗入的重要因素^[8]。没有关节滑液的营养供应, 关节软骨将发生基质丢失和软骨退变^[9]。

低强度脉冲超声(Low intensity pulsed ultrasound, LIPU)能促进关节软骨全层缺损修复, 在缺损部位形成透明软骨样修复组织^[9-11]。其促进软骨损伤修复的机理有: 促进软骨细胞 aggrecan 基因表达, 刺激蛋白多糖的合成和释放, 促进软骨

细胞 I 型和 II 型前胶原 mRNA 表达^[12, 13]; 还可能促进软骨缺损填充组织中的间充质干细胞增殖和定向分化为纤维母细胞和软骨母细胞^[11]。

然而, 不论是细胞增殖或代谢水平增强, 均需足够营养物质供给^[14]。有研究表明 LIPU 能促进血液中的小分子物质向关节滑液内弥散, 并可能促进关节滑液的渗出^[15]。但是, LIPU 是否增加关节滑液内的物质向关节软骨内渗入, 达到改善关节软骨的营养的目的, 尚无直接证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 9 只纯种成年健康新西兰兔, 雌雄不分,

作者介绍: 周 崑(1974-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 肿瘤学、超声治疗学、良恶性疾病的超声治疗。

通信作者: 王智彪, 男, 教授, Email: wangzhibiao@haifu.com.cn。

质量 2.0~2.5 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要仪器 LIPU 治疗仪 (重庆医科大学医学超声工程研究所,中国);解剖显微镜(Olympus,日本);游标卡尺,精度 0.02 mm(江苏,中国)。

1.1.3 主要试剂 美蓝(中国医药集团上海化学试剂公司,上海,中国)。

1.1.4 干预药物 戊巴比妥钠(长春农牧大学兽医研究所,吉林,中国);超声耦合剂(杭州讯得影像材料厂,浙江,中国)。

1.1.5 LIPU 治疗仪 LIPU 治疗仪由重庆医科大学医学超声工程研究所设计制造。包括电源供给系统、功率发生器(功率源)和超声换能器 3 部分。LIPU 信号的强度 10~100 mW/cm²,频率 0.5~3.0 MHz,脉冲宽度 200 μ s,重复频率 1 kHz。

1.2 方法

1.2.1 关节腔内注射染料及 LIPU 的治疗 实验兔双膝关节部剪毛,以 3%戊巴比妥钠按 25 mg/kg 剂量经静脉注射麻醉成功后,在双侧膝关节腔内注射 0.1%美蓝溶液各 0.5 ml,仰卧位固定于操作台上,双膝关节呈完全伸直位。随机选取一侧为治疗侧,另一侧为对照侧。治疗侧给予 LIPU 治疗。治疗时将治疗头紧贴实验兔的膝关节皮肤,治疗头和皮肤之间涂以超声耦合剂,治疗过程中不移动治疗头的位置。对照侧给予假治疗。

LIPU 治疗参数为:强度 30 mW/cm²,频率 0.6 MHz,脉冲宽度 200 μ s,重复频率 1 kHz,治疗时间 5 min。假治疗只将治疗头紧贴涂有超声耦合剂的兔膝关节皮肤处 5 min,但不发射超声波。

1.2.2 标本收集和照片拍摄 治疗结束后立即以过量戊巴比妥钠经耳缘静脉注射处死实验兔。打开关节腔,脱脂棉球吸干关节腔内液体,获取股骨髁间窝关节软骨标本,包括关节软骨和软骨下骨。垂直于关节软骨作切片,获取的切片标本包含从关节软骨到软骨下骨,切片厚 0.5 mm,于解剖显微镜下放大 10 倍观察,并拍摄照片。

1.2.3 美蓝渗入深度的测量 以游标卡尺测量照片上美蓝从软骨表面渗入软骨内的深度。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS11.0 统计分析软件进行分析。统计学分析方法为配对 *t* 检验,设定 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

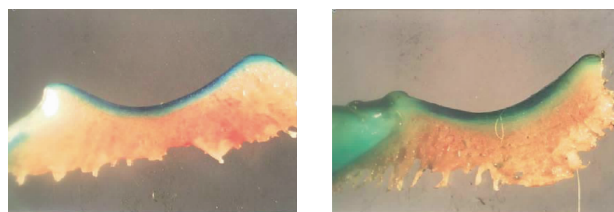
2 结果

2.1 美蓝渗入软骨内的镜下形态

解剖显微镜下观察,美蓝向关节软骨内的渗入深度在关节软骨的左、中、右各部分不完全一致。一般在中段渗入较深。10 倍镜下,在着色区和非着色区交界处,可见一条界线。见图 1。

2.2 美蓝渗入深度的测量结果

实验组和对照组美蓝渗入兔膝关节软骨的深度测量结果及统计分析结果见表 1、图 2。



A. 对照组美蓝渗入关节软骨解剖显微镜图(10 $\times$) B. LIPU 组美蓝渗入关节软骨解剖显微镜图(10 $\times$)

图 1 美蓝渗入 2 组兔膝关节软骨的深度对比图

Fig.1 Comparison of the depth of methylene blue penetrating into rabbit articular cartilage between two groups

表 1 美蓝渗入兔膝关节软骨的深度测量结果及统计分析结果

Tab.1 Comparison of the depth of methylene blue penetrating into rabbit articular cartilage between LIPU and control groups

组别	动物数(只)	渗入深度($\bar{x} \pm s$, mm)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
LIPU组	9	2.28 $\pm$ 0.85	3.315	<0.05
对照组	9	1.58 $\pm$ 0.44		

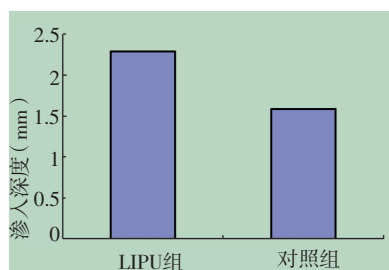


图 2 美蓝渗入 2 组兔膝关节软骨的深度对比图

Fig.2 Comparison of the depth of methylene blue penetrating into rabbit articular cartilage between LIPU and control groups

3 讨论

关节软骨是没有血管的组织^[1]。对关节软骨营养来源的认识经历了一个较长期的过程。1743 年,William Hunter 向血管内注射红色液体石蜡后记载道:“脂肪、腺体和韧带都被染成红色。但是没有一点色斑出现在软骨上”。1920 年,Strangeways 观察了关节表面生长的游离体,认为其营养来自关节滑液^[6]。到 19 世纪 50 年代,对这个问题还存在争议。有学者认为关节软骨营养来自关节滑液,也有学者认为来自关节囊及软骨下骨的血管,还有学者认为二者兼而有之^[7]。进一步的研究使人们逐渐认识到骨骼成熟度影响了关节软骨的营养来源。在幼年动物骨骺尚未闭合时,关节软骨的营养来自软骨下骨和表面的关节滑液^[2-4]。在成年动物,关节软骨的营养只来自于关节滑液^[5-7]。关节的正常运动是关节滑液向关节软骨内渗入的重要因素^[6]。没有关节滑液的营养供应,关节软骨将发生基质丢失和软骨退变^[8,18]。

在病理情况下,软骨细胞将发生自发性修复反应,代谢增强^[19,20],然而不能持久保持,软骨细胞继而发生退变。这种软骨细胞继自发性修复后的退变反应,被认为是病变关节软

骨缺乏足够营养供应、不足以满足修复需要的结果^[23]。

2001 年, Weishaupt 等对健康成人静脉注射钆标记的 DTPA (Gd-DTPA), 并用 LIPU (强度 30 mW/cm², 频率 1.5 MHz, 脉冲宽度 200 ms, 重复频率 1 kHz, 治疗时间 2 周, 每天 1 次, 每次 20 min) 治疗。结果发现, LIPU 能够促进 DTPA 向关节滑液内弥散, 并可增加关节滑液的渗出^[15]。DTPA (二乙烯三胺五乙酸, 分子式 HOOCCH₂N[CH₂CH₂N(CH₂COOH)₂]₂) 是分子量 393 的小分子, 与关节滑液成分中的葡萄糖等的分子量是同一数量级。这提示 LIPU 可能促进葡萄糖等小分子物质向关节滑液中的弥散。不过, 这个实验只是证明了 LIPU 能促进小分子物质向关节滑液内弥散, 尚未证明 LIPU 是否增加关节滑液内的小分子物质向关节软骨内渗入, 而达到改善关节软骨营养的目的。

美蓝 (Methylthioninium Chloride, 亚甲蓝, 分子式 C₁₆H₁₈ClN₃S·3H₂O) 是分子量 373.90 的小分子, 与 DTPA 接近, 与葡萄糖等的分子量也是同一数量级。将美蓝直接注射到关节腔中, 成为关节滑液的组成成分, 再给予 LIPU 治疗, 治疗后观察关节软骨内美蓝浸染情况, 就能够反映 LIPU 治疗后, 关节滑液内的小分子物质向关节软骨内渗入情况。结果发现, 经过短时间的 LIPU 治疗, 与对照组相比, 美蓝渗入关节软骨更深 ($P < 0.05$), 美蓝向关节软骨内渗入明显增加, 提示葡萄糖等小分子物质向关节软骨内的渗入也可能在 LIPU 治疗作用下明显增加。

因此, LIPU 在促进小分子物质向关节滑液内弥散, 增加关节滑液内的小分子物质向关节软骨内渗入都有明显作用, 能够改善关节软骨的营养, 这是 LIPU 有利于关节软骨损伤修复的原因之一。

由于在放大 10 倍的照片上进行测量, 测得的美蓝渗入深度值是实体测量的 10 倍, 使测量精度提高了一个数量级。每个测量数据与实际数据是一一对应关系, 对测量数据进行分析同样反映了美蓝渗入关节软骨的深度和 LIPU 治疗组与对照组之间的相对关系。因此, 在统计学处理和结果解释时, 没有将测量数据还原为实际数据, 但这并不影响统计学结果的解释。

超声波是一种机械波, 而且与多数机械波不同, 超声波还是一种纵波。纵波, 指质点的震动方向与传播方向平行, 作类似于弹簧样的往复震动, 而横波质点的振动方向与波的传播方向垂直。因此, 当 LIPU 作用于软骨表面时, 超声波将如波浪样反复将软骨表面的物质推挤向软骨, 其中必然有合适大小的小分子通过组织间隙被“推挤”进入软骨内。同时, 软骨还是一种组织均匀的器官, 超声波易于在软骨内传播, 可以在软骨全层发挥“推挤”作用, 进一步将软骨浅层的小分子“推挤”向软骨深层。此外, 脉冲超声与连续波超声相比, 超声波的发射是间歇式的, 理论上, 这能够明显降低超声波的热效应而主要发挥其机械效应, 选择 LIPU, 能够进一步降低热效应。因此, LIPU 的机械作用, 是 LIPU 促进美蓝、葡萄糖等小分子物质向关节软骨内深入的主要机制。

参 考 文 献

- [1] Nehrer S, Minas T. Treatment of articular cartilage defects[J]. *Investigative Radiology*, 2000, 35(10): 639-646.
- [2] Brower T D. The growth and nutrition of articular cartilage[J]. *J Bone and Joint Surg*, 1967, 49-A(5): 1008.
- [3] Brower T D, Hsu W. Isolation of chondroitin sulphate S35 from articular cartilage of rats[J]. *J Biol Chem*, 1951, 189(1): 187-190.
- [4] McKibbin B, Holdsworth F W. The nutrition of immature joint cartilage[J]. *J Bone and Joint Surg*, 1966, 48-B(4): 793-803.
- [5] Brower T D, Akahoshi Y, Orlic P. The diffusion of dyes through articular cartilage in vivo[J]. *J Bone and Joint Surg*, 1962, 44A(3): 456.
- [6] Maroudas A, Bullough P, Swanson S A V, et al. The permeability of articular cartilage[J]. *J Bone and Joint Surg*, 1968, 50-B(1): 166-177.
- [7] Honner R, Thompson R. The nutritional pathways of articular cartilage: an autoradiographic study in rabbits using ³⁵S injected intravenously[J]. *J Bone and Joint Surgery*, 1971, 53-A(4): 742-748.
- [8] Lauge-Pedersen H, Aspenberg P. Synovial fluid depletion: successful arthrodesis without operative cartilage removal[J]. *J Orthop Sci*, 2003, 8(4): 591-595.
- [9] Cook S D, Salkeld S L, Popich-Patron L S, et al. Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound[J]. *Clin Orthop*, 2001, (391 S): 231-243.
- [10] 贾小林, 陈文直, 周伟, 等. 低强度脉冲超声对关节软骨缺损修复影响的初步观察[J]. *中国超声医学杂志*, 2003, 19(12): 889-891.
- [11] 贾小林, 陈文直, 司海鹏, 等. 超声对兔关节软骨损伤的修复作用[J]. *中华创伤杂志*, 2004, 20(2): 97-99.
- [12] Jia X L, Chen W Z, Si H P, et al. Effect of ultrasound in repair of rabbit articular cartilage injury[J]. *Chin J Trauma*, 2004, 20(2): 97-99.
- [13] Parvizi J, Wu C C, Lewallen D G, et al. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression[J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(4): 488-494.
- [14] Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in atelocollagen gel[J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 59(2): 201-206.
- [15] Pedowitz R A, Gershuni D H, Crenshaw A G, et al. Intraarticular pressure during continuous passive motion of the human knee[J]. *J Orthop Res*, 1989, 7(4): 530-537.
- [16] Weishaupt D, Schweitzer M E, Rawool N M, et al. Effects of low-intensity ultrasound on the diffusion rate of intravenously administered Gd-DTPA in healthy volunteers[J]. *Investigative Radiology*, 2001, 36(8): 493-499.
- [17] Strangeways T S P. The nutrition of articular cartilage[J]. *British Med J*, 1920, 1(3098): 661-663.
- [18] Eckholm R. Articular cartilage nutrition[J]. *Acta Anat*, 1951, 15(21): 1-76.
- [19] 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴, 主编. 现代组织学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003. 231-280.

Cheng L Z, Zhong C P, Cai W Q. Modern histology[M]. Shanghai: Shanghai science and technology literature publishing company, 2003. 231–280.

[19] Ryu J, Treadwell B V, Mankin H J. Biochemical and metabolic abnormalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage[J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(1):49–57.

[20] Teshima R, Treadwell B V, Trahan C A, et al. Comparative rates of proteoglycan synthesis and size of proteoglycans in normal and os-

teoarthritic chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 1983, 26(10):1225–1230.

[21] Mankin H J, Johnson M E, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. J Bone Joint Surg Am, 1981, 63(1):131–139.

[22] Nehrer S, Minas T. Treatment of articular cartilage defects[J]. Investigative Radiology, 2000, 35(10):639–646.

(责任编辑:冉明会)

个案与短篇

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.010

腹茧症 1 例

王瑞锋¹, 周 虹²

(1. 重庆医科大学附属儿童医院感染消化科, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010)

【中国图书分类法分类号】R656.7

【文献标志码】B

【收稿日期】2011-11-16

1 病例报告

患者,女,24岁,G₀P₀,因B超发现盆腔包块2年余入院,包块无明显长大或消退,无腹胀腹痛,无异常阴道流血流液,无发热消瘦,大小便正常。患者既往月经规则,分别于23年前行“肠梗阻手术”,3年前行“左卵巢囊肿切除术”,具体过程不详。体格检查:下腹正中见约10cm纵行手术疤痕,右旁正中绕脐见7cm手术疤痕,向腹腔凹陷。妇科检查:右附件区扪及约60mm×60mm囊性包块,活动欠佳,压痛。B超提示:右附件区见94mm×51mm×61mm囊性包块,内为无回声,有分隔。入院诊断:盆腔包块待查:①卵巢囊肿?②输卵管积液?③包裹性积液?积极完善术前准备后,在全麻下行剖腹探查术,剔除原下腹部正中纵行手术疤痕,逐层进腹(解剖结构欠清),术中见:壁层腹膜缺如,肠曲、子宫、附件表面有多层灰白色、质韧、厚薄不均的膜状纤维组织覆盖,如蚕茧样,无法进入腹腔,在子宫位置,纤维膜状组织后可扪及正常大小子宫,质中,活动,但双附件区纤维组织增厚,无法扪及。在右附件区上方肠曲间扪及直径约60mm大小囊性包块,剪开层层包裹的膜状组织,穿刺抽出黄色清亮液体,吸尽囊液,探查囊腔为盲端,分离并切除少许囊壁送病检。为避免损伤,未继续分离。止血后,生理盐水冲洗盆腔,置入防粘液,常规关腹。囊壁病检结果示:纤维结缔组织囊壁,囊壁充血、出血,少许炎细胞浸润,局部见几个腺体,腺上皮无明显异型。术后诊断为:①盆腔包裹性积液;②腹茧症。患者术后恢复好,痊愈出院。

作者介绍:王瑞锋(1986-),男,硕士,

研究方向:感染消化疾病。

通信作者:周 虹,女,副教授,Email:zhouhong2006126@126.com。

2 讨 论

腹茧症(Abdominal cocoon, AC)又名先天性小肠禁锢症、小肠茧状包裹症、包膜内粘连性肠梗阻、小肠节段性纤维包裹症群、腹腔茧状包裹症等,发病机制不明,是一种罕见的腹部疾病,以盆腹腔部分或全部脏器被一层或多层纤维包裹为主要特征,包裹内容物以小肠最为常见,形似蚕茧。由 Foo KT 等^[1]于 1978 年首次报道并命名。

腹茧症分为原发性和继发性,原发性腹茧症发病原因不明,无腹部手术及外伤等病史,可能为先天发育异常(如大网膜缺如);继发性腹茧症有相对明确的病因,如外伤手术后、盆腔炎、结核性腹膜炎、病毒感染、药物影响、长期腹膜透析、地域和性别因素(屠金夫等^[2]分析 203 例腹茧症中,男:女=1.2:1)等。大多数患者无明显临床表现,有时可有腹痛、腹胀、恶心、呕吐等,腹部可出现质软包块,活动或非活动性,严重时可引起肠梗阻。B超可见包裹有肠管的肿块或囊性包块,X线下可发现全部或部分小肠积聚于某一部位,钡餐可见部分小肠肠管呈“扭麻花状”或“菜花征”聚集在脐周部^[3],CT可见包块内为折叠的小肠,肠管狭窄处被增厚的腹膜包裹(如图1),MRI可直接显示肥厚、迂曲的肠管,肠腔内气体、液体以及与大网膜粘连的情况。在出现以上情况时,均应考虑到腹茧症的可能,提高对该病的认识,从而可避免一些并发症和不必要的肠切除。适时的剖腹探查或腹腔镜检查也可提高该病诊断率^[4]。术中见小肠为一层连续的灰白色、质韧、形似蚕茧的包膜所覆盖,其临近脏器亦可被此膜覆盖,可确诊为腹茧症^[4,5]。无任何症状或症状轻微者可予以观察或保守治疗,如病情加重,出现肠梗阻、肠穿孔、腹膜炎等手术指征,均应

(下转 150 页)