

文章编号:1004-7220(2013)02-0195-06

组织工程软骨修复软骨缺损区域后的力学特性分析

门玉涛¹, 刘海英¹, 李江¹, 张述卿¹, 孙明林², 高丽兰¹, 张春秋¹

(1. 天津理工大学 复杂控制理论与应用重点实验室, 天津 300384; 2. 武警医学院附属医院 骨科, 天津 300162)

摘要: **目的** 利用组织工程技术建立体外软骨缺损实验模型,研究修复区人工软骨和宿主软骨的力学特性。**方法** 采用一种琼脂糖凝胶作为人工软骨,制作猪软骨深层缺损,在缺损处仿临床植入人工软骨,用生物胶黏接,建立组织工程修复膝关节软骨缺损的体外模型;在压缩载荷作用下,通过数字图像相关技术研究组织工程软骨植入缺损后修复区即刻力学行为。**结果** 压缩过程中界面处没有出现开裂现象,压缩分别为软骨层厚度的3.5%、5.6%、7.04%和9.0%时获得了修复区中间层应变分布图和应变变化曲线。压缩量从3.5%增加到9%时,在垂直软骨面方向上宿主软骨最大压应变增加75.9%,人工软骨最大拉应变增加226.99%;在平行软骨表面方向,交界处最大拉应变增加116.9%,增加量远高于宿主软骨区和人工软骨区;对于修复区剪应变,随着压缩量增加交界处剪应变方向发生相反的改变。**结论** 软骨组织工程修复缺损效果有很大的不确定性,这与修复区的力学环境有关。组织工程软骨植入缺损后,修复区受到复杂应变状态,随着压缩量增加,界面处、宿主软骨、人工软骨都发生较大的应变变化,界面处垂直软骨面方向的应变由压应变可转化为拉应变,平行软骨表面方向的拉应变有显著增加,交界处剪应变方向甚至发生了相反的改变,而且剪应力数值迅速增加。这种复杂应变状态造成修复区细胞力学环境的较大变化,还可能引起界面的开裂,影响缺损修复过程,这些力学环境变化应受到临床治疗的重视。

关键词: 组织工程; 软骨缺损; 压缩载荷; 力学特性; 数字图像相关

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

Mechanical properties of instantly repaired articular cartilage defects by tissue engineering

MEN Yu-tao¹, LIU Hai-ying¹, LI Jiang¹, ZHANG Shu-qing¹, SUN Ming-lin², GAO Li-lan¹, ZHANG Chun-qiu¹ (1. Key Laboratory for Control Theory & Applications in Complicated Industry Systems, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; 2. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanical properties of both artificial cartilage and host cartilage by establishing the in vitro model of tissue engineered cartilage for repairing defects. **Methods** The agarose gel as an artificial cartilage was implanted in a deep cartilage defect connected with biological adhesive to set up the in vitro model of tissue engineered articular cartilage defects. Under the compression load, the instant mechanical behavior of the repair area was studied using the digital image correlation technology. **Results** There was no cracking phenomenon occurred at the interface during the compression process. The Strain distributions at middle layer of the repair area were obtained when the cartilage thickness appeared changes with 3.5%, 5.6%, 7.04% and 9.0% by the compression, respectively. When the compressing change increased from 3.5% to 9%, the maximum compressive strain of host cartilage was increased by 75.9%, and the maximum tensile strain of artificial cartilage was increased by 226.99% in the vertical direction of cartilage surface. In the direction parallel with cartilage surface, the maximum tensile strain at the interface was increased by 116.9%, and the increment was far

收稿日期:2012-03-27; 修回日期:2012-07-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11172208, 31000422)。

通信作者:张春秋,教授, Tel:(022)60214133; E-mail:zhang_chunqiu@126.com。

more than that at the host cartilage area and artificial cartilage area. For shear strain at the repair area, the direction of shear strain at the interface changed oppositely with the compression increasing. **Conclusions** The repair effect of tissue engineered cartilage was uncertain due to the mechanical environment of the repair area. After the tissue engineered cartilage was implanted in the defect, the repair area was under the influence of complex strain states. The strains changed greatly at the interface both with the host cartilage and artificial cartilage as the compression increasing. The strain in the vertical direction of cartilage surface at the interface might change from compressive stain to tensile strain, which was significantly increased in the direction parallel with cartilage surface. The strain direction at the interface could even be changed oppositely, and the shear strain appeared rapidly increase. The complex strain states lead to such great changes in mechanical environment of the defect area, and may cause cracking at the interface, and even further affect the repair process. Therefore, attention should be given to this complex mechanical environment during cartilage defect repair process in clinical treatment.

Key words: Tissue engineering; Cartilage defect; Compression load; Mechanical properties; Digital image correlation

软骨受到创伤或退变后难以自我修复^[1],传统的软骨下骨微骨裂、钻孔、骨膜、软骨膜移植等治疗软骨缺损方法都各自存有不同的缺点。目前通过组织工程在体外构建软骨组织移植到缺损部位来治疗软骨缺损过程,正成为一种永久修复组织缺损理想的治疗方法^[2-3]。软骨组织工程修复缺损效果有很大的不确定性,一些消除了临床病症,但很多出现退化、变性、开裂或硬化,甚至引起宿主软骨退变^[4-5],这与组织工程软骨植入缺损区域后修复区的力学行为有关。

力学载荷对保持关节软骨正常的功能具有重要作用^[6-9],软骨细胞对不正常的载荷非常敏感,力学强度过大、废用等都能引起软骨退变甚至关节炎等疾病^[6-7,9]。异常力学状态可引起人工软骨退化、变性,接合处开裂或硬化,殃及宿主软骨^[6]。组织工程软骨植入缺损后人工软骨构建的弹性模量、植入物边界处、人体运动程度等都影响缺损处力学状态,进而影响修复软骨的结构、形态和代谢状态。组织工程软骨植入后缺损处的力学状态需要进行研究。无创性检测是体内研究的较好方法,目前更多研究在软骨缺损修复形态和结构完整性方面^[10],体内研究修复区力学特征还没有合适、可靠的方法。张述卿等^[11-12]利用有限元技术建立缺损植入修复模型,对缺损处进行滚压加载的仿真分析,探索人工软骨弹性模量、压缩量、滚动速度及缺损类型对修复处应力分布的影响规律。数字图像相关技术是一种研究生物组织力学性能的好方法^[13-14]。利用数字图像相关技术,对组织工程植入软骨缺损后的修复区力学特性进行分析,将加深对软骨组织工程治疗方法

的认识,有利于改善软骨缺损的修复效果,提高软骨组织工程技术水平。

1 材料与方 法

1.1 软骨缺损样本

实验选取8个月猪的股骨远端滑车处的新鲜关节软骨。垂直软骨表面切出带有下骨的软骨,下骨为实验把持固定部分,软骨面与下骨侧面尽量垂直,保证加载时垂直软骨表面。软骨缺损制作面积 $3\text{ mm} \times 5\text{ mm}$,为深层缺损类型。

1.2 人工软骨的制作

配置1.8%浓度的琼脂糖溶液,在微波炉内加热沸腾,注意不可喷出容器;加热后室温下自然放凉即可形成凝胶。不同浓度的琼脂糖溶液可形成不同弹性模量的凝胶,其中1.8%琼脂糖溶液可形成弹性凝胶,应变为0~0.5时,弹性模量为19.197 kPa(见图1)。

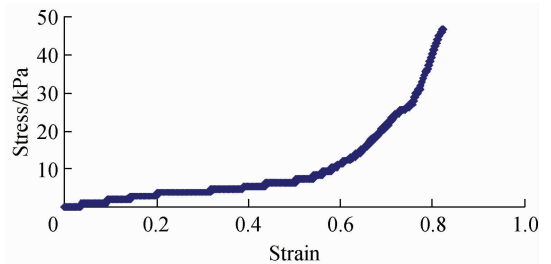


图1 浓度1.8%琼脂糖凝胶力学性质测试的应力-应变曲线

Fig. 1 Stress-strain curve of mechanical property test on 1.8% agarose gel

1.3 组织工程体外软骨缺损修复模型

首先把带有软骨缺损的离体软骨固定,再取与

缺损形状一致的人工软骨连接处涂上生物胶,2 ~ 4 s内植入缺损部位,稍微有水无妨,5 ~ 15 s内黏接,2 min后到达最终强度。生物胶为康派特医用胶,此胶已在临床上应用,适用于手术切口和创口的黏合。该产品的主要成份是氰基丙烯酸酯同系物,配有少量稳定剂、阻聚剂,规格型号:0.5 mL/支(北京瞬康医用胶有限公司生产)。图2为组织工程软骨缺损修复模型,缺损类型为深层缺损,人工软骨与宿主软骨交界面黏接良好。

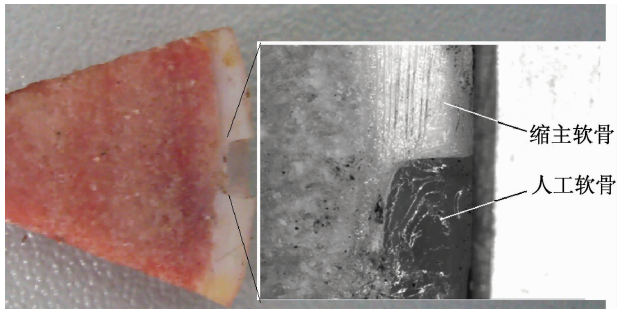


图2 组织工程软骨缺损修复模型

Fig.2 Model of tissue engineered cartilage for repairing defect

1.4 实验仪器与设备

微材料的力学性能测试系统(上海大学研制)包括采集图像的 CCD 摄像系统和材料拉伸/压缩加载装置及数字图像相关处理软件(见图3),该系统适用于毫米、微米量级材料的力学性能测试,成像系统最小可视范围为0.8 mm × 0.6 mm,微米量级的

位移分辨率,应变测量精度为 100 $\mu\epsilon$ 。

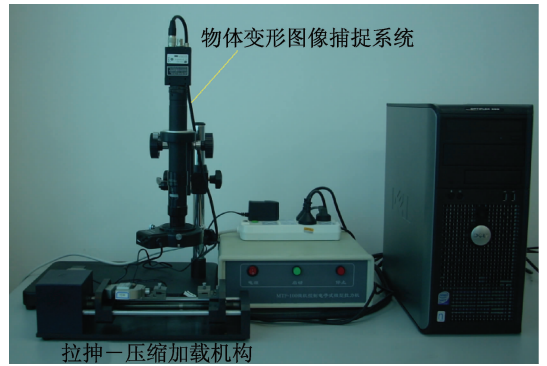


图3 微材料的力学性能测试系统

Fig.3 Mechanical testing system for micro-materials

1.5 实验测试

将试件的软骨下骨夹住,关节表面为另一夹头的施载面,调整加载机构,使试件的关节表面与加载机构的另一端相接触。调整显微镜的视场、焦距和光线亮度,由图像采集系统得到的图像中软骨组织的图像在显示器上清晰可辨(放大70倍),然后调节软件,使得仪器对软骨产生0.1 N预紧力。对试件施加压缩载荷,加载速度为1 mm/min,图像捕捉时间为2张/s。使软骨压缩量依次达到整个软骨层厚度的3.5%、5.6%、7.04%和9.0%。加载完成后对实验中捕捉的图像进行处理,压缩量分别为0%、5%、10%时的图片如图4所示。

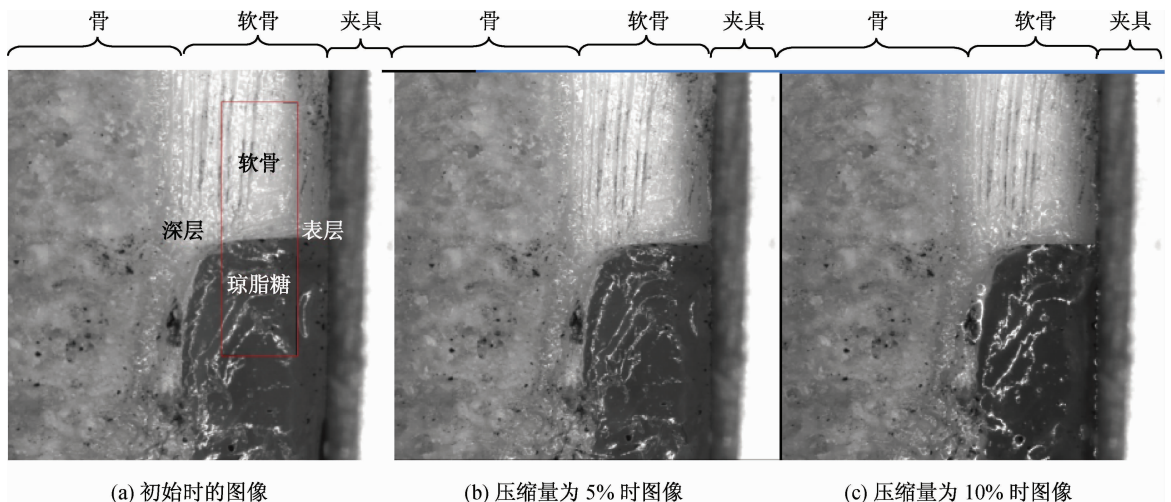


图4 采集系统得到的变形图像(框内为应变研究区)

Fig.4 Image of the deformation in experiment (a) The initial image, (b) 5% compression image, (c) 10% compression image

图4(a)的框内为应变研究区,图中从左到右是 x 轴(垂直软骨表面),从上到下是 y 轴(平行软骨表面),得到每张图像相对应的各层位移、应变分布数

据(见图5);其中取研究区平行软骨表面的中间层将数据信息转化成曲线图(见图6),并根据数据和曲线整理得出结论。

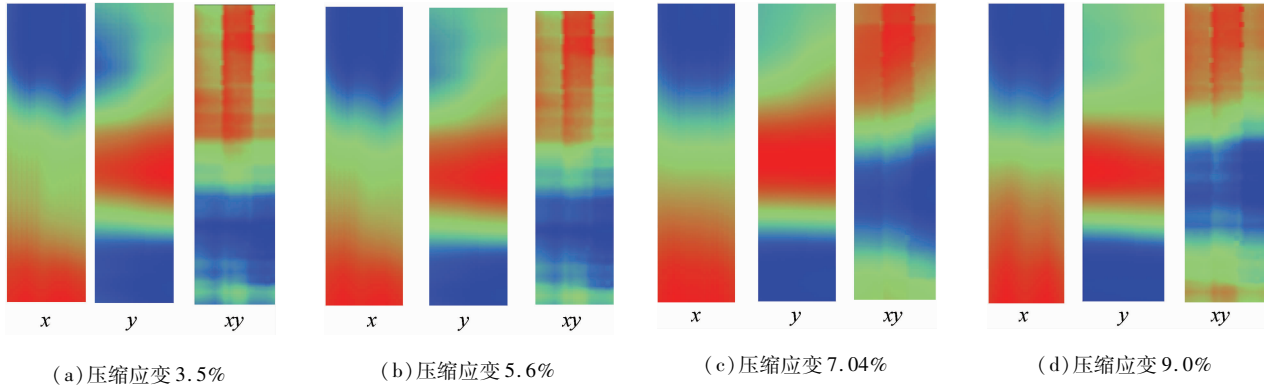


图5 压缩变形分别在软骨层厚度的3.5% (a)、5.6% (b)、7.04% (c)和9.0% (d)时 x 方向应变、 y 方向应变、 xy 剪应变分布

Fig. 5 x -direction strain, y -direction strain, xy -shear strain distributions when compression deformation was 3.5% (a), 5.6% (b), 7.04% (c) and 9.0% (d) of cartilage thickness, respectively

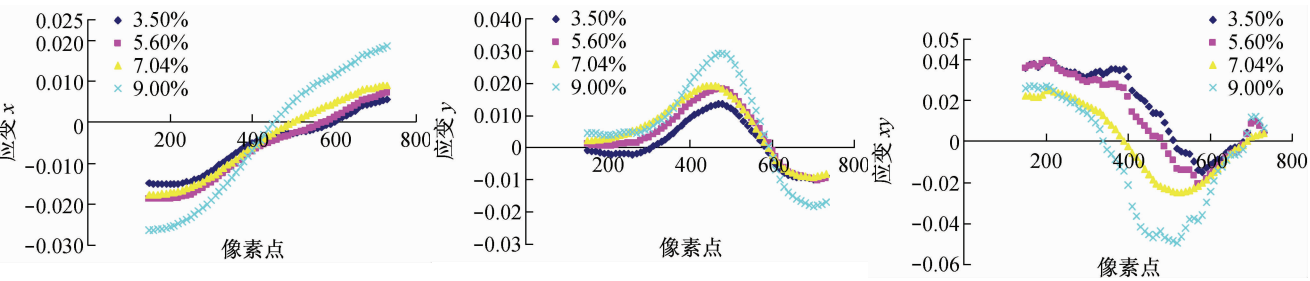


图6 修复区中间层宿主软骨-人工软骨应变分布曲线(横轴为像素坐标(图5中 y 方向),其中像素坐标460处为交界面)

Fig. 6 Strain distributions at middle layer of the repair area

2 结果

压缩过程中界面处没有出现开裂现象。图4(a)框内的应变场分别见图5。图6给出了修复区中间层应变分布曲线,横轴为 y 方向的像素坐标,其中像素坐标460处为交界面。在垂直软骨表面的 x 方向从宿主软骨-人工软骨区应变由压应变到拉应变变化,交界面处为压应变,相对宿主软骨应变减少,靠近交界面处的人工软骨也是处于压应变,随交界面距离增加变化成拉应变状态;随着压缩量增加靠近软骨区的压缩应变范围扩大,压缩量为9%时远离交界面人工软骨是拉应变;压缩量从3.5%增加到9%时,宿主软骨最大压应变增加75.9%,人工软骨最大拉应变增加226.99%。

在平行软骨表面的 y 方向,加载压缩3.5%时交界处宿主软骨和人工软骨皆为拉应变,宿主软骨靠近深层有压应变分布,而人工软骨大部分为压应变;随着压缩量增加交界处拉应变区变大,宿主软骨靠近深层压应变分布区减少,压缩量为9%时压应变几乎消失,人工软骨压应变区减少,仍然存在;压缩量从3.5%增加到9%时,交界面处最大拉应变增加116.9%,增加量远高于宿主软骨区和人工软骨区。

对于修复区 xy 剪应变,远离交界处宿主软骨 xy 剪应变高于交界处,远离交界处人工软骨 xy 剪应变也高于交界处,但远离交界处宿主软骨和人工软骨的剪应变方向相反;随着压缩量增加,交界处 xy 剪应变方向发生相反的改变。

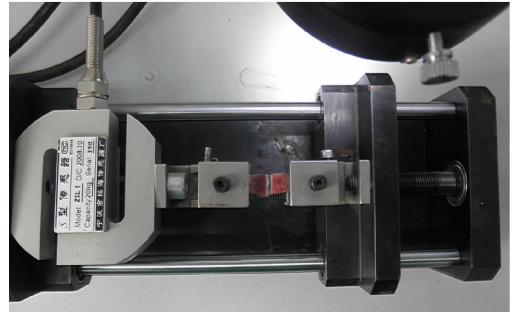
3 结论与讨论

本研究建立了组织工程软骨植入缺损区的体外修复模型,在压缩载荷作用下,通过数字图像相关技术研究修复区力学行为。实验表明,修复区受到复杂应变状态影响,随着压缩量增加界面处、宿主软骨、人工软骨都发生较大的应变变化,界面处 x 方向的应变由压应变可变化为拉应变, y 方向的拉应变有显著增加,交界处 xy 剪应变方向发生了相反的改变,而且剪应力数值迅速增加。这种复杂应变状态造成修复区细胞力学环境的较大变化,将影响缺损修复效果;另外这种力学状态可能引起界面的开裂,不利于修复过程发生,在临床治疗过程中这种复杂力学状态应当受到关注。

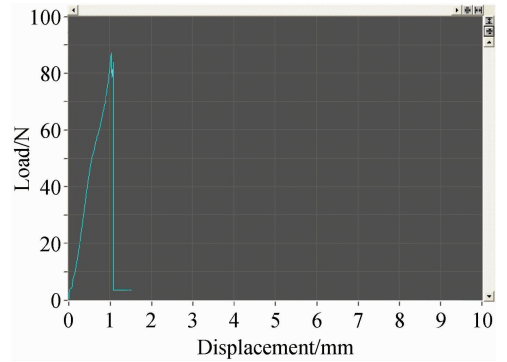
目前软骨组织工程修复缺损效果有很大的不确定性,这与组织工程软骨植入缺损后修复区的力学行为有关。力学行为主要受人工软骨的力学性能、界面处黏结程度影响。本研究中生物胶的黏接性较好,修复区的力学行为主要受琼脂糖凝胶的力学性能影响。取两块有下骨的软骨,软骨面用生物胶黏结,黏接面积 48.36 mm^2 ,最大拉力达 87.15 N (见图7),软骨与软骨之间黏结的最大强度可达 1.802 MPa ,远高于琼脂糖凝胶的强度,也高于软骨与琼脂糖界面的强度,提示修复区力学行为主要由较小的人工软骨弹性模量引起。浓度 1.8% 琼脂糖凝胶的弹性模量在应变 0.4 范围内为 19.197 kPa ,此数值小于宿主软骨 $0.45 \sim 2.1 \text{ MPa}$ (压缩应变率为 0.751 时从浅表层到深层的弹性模量)^[15]。对正常猪关节软骨的压缩实验得到应变随深度变化的指数形式归一化曲线(见图8),正常软骨的压缩应变相对均匀,从表面向深层应变是逐渐减小。图6修复区中间层宿主软骨 x 方向应变部分对应图8中大约深度 0.5 处的应变。本实验的加载速率是 1 mm/min ,还研究了正常猪软骨不同应变率下软骨弹性模量随深度变化,压缩速度越快,软骨的弹性模量越高^[15]。而琼脂糖凝胶的弹性模量相对线性,与软骨力学性能差距较大,造成组织工程软骨植入缺损修复区复杂的力学行为。

本实验只是采用一种弹性模量的人工软骨,仅揭示了软骨缺损修复区具有复杂力学状态。缺损修复区力学状态与人工软骨的弹性模量和界面的结合

有直接关系。如果要清楚研究组织工程植入软骨缺损后修复区的力学特征,还需要采用不同琼脂糖浓度做出梯度更高的弹性模量,分别植入缺损部位进行研究;在实验中发现琼脂糖凝胶脆性较大,这一点与天然软骨相差较大,以后可以加入卡拉胶调节增强人工软骨的韧性和弹性模量进行实验研究。另外,缺损修复区的力学状态受界面的黏接影响,本实验



(a) 样品加载时照片



(b) 拉伸载荷与位移

图7 康派特医用胶黏结软骨面的力学强度测试

Fig.7 Mechanical strength testing on Kang Piter medical adhesive

(a) Photo of the sample loading, (b) Tensile load and displacement

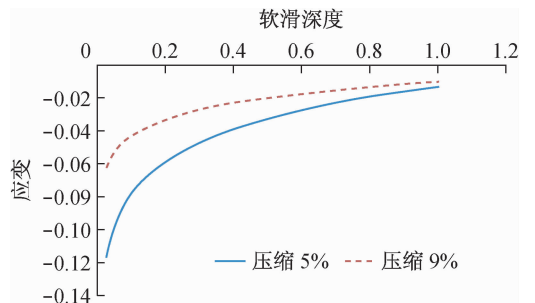


图8 两种应变下软骨随深度的应变变化曲线

Fig.8 Strain change of cartilage with depth under two different strains

中临床生物胶给人工软骨与宿主人工较好的黏接,没有出现裂缝,临床中黏接界面的黏结问题也需进一步研究。

另外,实验中采用的压缩载荷只是膝关节软骨受到的一种典型载荷,关节软骨还受到滚压载荷、滑动载荷的作用^[16],在这些载荷作用下研究修复区力学特征也是必要的,这样才能揭示关节软骨缺损修复区的力学行为,有利于改善软骨缺损修复植入时人工软骨力学性能,探索修复缺损时人工软骨合适的力学功能指标,提高软骨组织工程技术的水平。

参考文献:

- [1] 曹谊林. 组织工程学-理论与实践[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 1-74.
- [2] Ahmed TA, Hincke MT. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2010, 16(3): 305-329.
- [3] 姜宗来, 樊瑜波. 生物力学-从基础到前言[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 308-310.
- [4] Moran CJ, Shannon FJ, Barry FP, *et al.* Translation of science to surgery: Linking emerging concepts in biological cartilage repair to surgical intervention [J]. J Bone Joint Surg Br, 2010, 92(9): 1195-1202.
- [5] Farr J, Cole B, Dhawan A, *et al.* Clinical cartilage restoration: Evolution and overview [J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(10): 2696-2705.
- [6] Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: A research perspective [J]. Bone, 2003, 33(1): 1-13.
- [7] 毛昭宪. 骨科生物力学暨力学生物学(第3版)[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2009: 16-20.
- [8] Guilak F, Butler DL, Goldstein SA. Functional tissue engineering [M]. Germany: Springer, 2004: 332-400.
- [9] 戴冠戎. 骨与关节的力学生物学研究[J]. 医用生物力学, 2009, 24(S1): 1
- [10] 侯志超, 孙剑, 甄俊平, 等. 关节软骨损伤修复的MRI评价[J]. 国际医学放射学杂志, 2011, 34(5): 456-460.
- [11] 张述卿, 刘海英, 董黎敏, 等. 组织工程修复关节软骨缺损的力学环境研究[J]. 医用生物力学, 2009, 24(S1): 142-143.
- [12] 张述卿, 张春秋, 高丽兰, 等. 组织工程修复关节软骨缺损的力学状态研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3629-3632.
- [13] 张东升. 数字图像相关测量技术及其应用[J]. 医用生物力学, 2009, 24(2): 85-88.
- [14] Zhang DS. Digital image correlation: Theory and applications [J]. J Med Biomech, 2009, 24(2): 85-88.
- [15] Zhang D, Eggleton CD, Arola D. Evaluating the mechanical behavior of the arterial tissue using digital image correlation [J]. Exp Mech, 2002, 42(4): 409-416.
- [16] Gao LL, Zhang CQ, Dong LM, *et al.* Description of depth-dependent nonlinear viscoelastic behavior for articular cartilage in unconfined compression [J]. Mater Sci Eng C, 2012, 32(2): 119-125.
- [17] 张春秋, 孙明林, 李江, 等. 关节软骨体外构建力学环境的研究进展[J]. 医用生物力学, 2009, 24(6): 462-467.
- [18] Zhang CQ, Sun ML, Li J, *et al.* Advances of mechanical conditions in engineering cartilage tissue [J]. J Med Biomech, 2009, 24(6): 462-467.