

低強度脈衝超音波刺激於關節軟骨修復影響之研究

鄭夏英¹ 吳俊賢¹ 張淑真² 楊善為³

¹義守大學通識教育中心

²義守大學生物醫學工程系

³高雄榮民總醫院骨科部

摘要

除了高齡化的影響外，近年來運動傷害，亦是造成軟骨受損退化病患增加的原因，因此膝關節軟骨的修復也逐年備受重視。低強度脈衝超音波(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)已經被應用於治療骨折，促進不癒合的部位使其正常的癒合。相關研究顯示 LIPUS 具有促進軟骨代謝的特點，然而於體內對於軟骨的修復效用則是有待探討。因此，本研究以日本大白兔作為受損軟骨的動物模型，擬探討低強度脈衝超音波體外刺激對於關節軟骨組織之影響。研究中軟骨缺損模型是以手術的方式於日本大白兔膝關節軟骨上製造缺陷，分為無接受 LIPUS 治療及接受 LIPUS 治療，最後以組織形態進行評估。初步結果顯示，經 LIPUS 治療與無 LIPUS 治療的組別相比，組織有較為顯著增生；然而，於軟骨缺損處軟骨細胞外基質，有經過 LIPUS 治療的組別並無顯著增生。本研究所使用的動物模型之軟骨損傷程度是較為嚴重程度，顯示 LIPUS 在嚴重的軟骨損傷上，修復效果並不顯著。

關鍵詞: 低強度脈衝超音波、關節軟骨、軟骨受損

通訊作者：楊善為 高雄市大中一路 386 號 高雄榮民總醫院骨科部主治醫師
電話：07-3422121-3048 Email：swyang@vghks.gov.tw

壹、緒論

因軟骨本身缺乏血管分布，而造成代謝速率緩慢之現象，故一旦受到損傷或發生病變後，其自行修復能力相當有限。除了高齡化的影響外，近年來運動傷害，亦是造成軟骨受損退化病患增加的原因，因此膝關節軟骨的修復也逐年備受重視。當病患其膝關節軟骨損傷尚未嚴重之時，多給予透明質酸的注射，藉由提高膝關節軟骨間的潤滑度以減緩軟骨組織的持續受損。但由於注射透明質酸僅是一種減緩軟骨再次損傷的方式，並不是一種完全根治的方法。此外，亦有利用細胞療法的方式，也就是植入軟骨細胞，其目的均不外欲恢復其正常分泌椎間盤基質，但從細胞的培養到植入，植入後的細胞如何順利存活、繁殖、分泌軟骨組織基質，以及營養的持續供應，卻是最大課題。是以，尋求對於關節軟骨組織具有影響之簡單操作、併發症少、侵入性小的治療方法，做為關節軟骨組織治療策略，為本研究之初始動機。

超音波(*ultrasound*)泛指任何聲波或振動的頻率，超過人耳聽力最高閾值 20 KHz。超音波廣泛應用於各個領域，在工業上，超音波常應用於材料內部非破壞性檢測方法；此外，超音波因具非游離性幅射之性質，其安全性及功效在長久以來的臨床案例中獲得驗證，所以在醫學上的應用與影響日益重要。超聲波是一種形式的機械能可傳輸到生物組織高頻聲學壓力波。它被用來作為診斷和治療的工具。通過增加組織的溫度，超聲波具有肌肉疼痛緩解和減少關節僵硬的功校，有強度的範圍從 1 到 3 W/cm²的。於臨床上，低強度脈衝超聲波(LIPUS)被利用於的療法治療骨折與不癒骨折促進骨癒合。相對於高強度的連續的超聲波在生物體組織中產生大量的熱，LIPUS (<100mW/cm²的)，而具有低得多的強度，因此不會產生高熱和組織破壞性。

以往的研究提出 LIPUS 可增強骨骨折癒合過程中的軟骨內骨化，可能是因為通過誘導軟骨細胞的增殖，促進了骨組織形成 (Ikeda et al., 2006; Nolte et al., 2001; 林玗竹、黃文濤、施科念, 2009)。亦有研究證實低強度超音波對於培養皿中的軟骨細胞具有正面的意義 (Korstjens, Van Der Rijt, Albers, Semeins, & Klein-Nulend, 2008; Zhang, Juckle, Francomano, & Spencer, 2002; 鄭益利, 2005)。從文獻研究上顯示，LIPUS 的特點在於促進關節軟骨代謝的效能(Ito et al., 2012; Li et al., 2011; Mukai et al., 2005)。然而，大部分動物實驗研究分析在骨關節炎的病理和生化的變化是在家兔或大鼠前十字韌帶，此種方式導致關節不穩定和誘導軟骨退化。然而，此種方式軟骨損傷的動物之間較難具有一致性。

超音波治療為非侵入式治療，可讓病人免於侵入性治療所造成之心理壓力與傷口復原問題，同時療程短、治癒率高、副作用小、恢復快速、不需麻醉、不需住院；許多的文獻已經證明以低強度超音波進行刺激有助於軟骨代謝的效能。因此，本研究擬探低強

度脈衝超音波體外刺激對於關節軟骨組織之影響，並進一步評估測試超音波於關節軟骨組織修復的治療可行性。研究中將以手術創造日本大白兔關節軟骨缺損做為動物模型，建立一致的可控制的軟骨損傷，可用於評估 LIPUS 對軟骨修復的效果。

貳、材料與方法

一、動物模型

本實驗選用十二隻成熟的雌性日本大白兔，體重 2.0 至 2.5 公斤之間。隨機分為二組：A1，經由手術製造軟骨缺損後不經 LIPUS 治療 (N = 6)；A2，手術製造軟骨缺損後經 LIPUS 治療實驗組 (N = 6)。本次動物實驗符合義守大學實驗動物照護(IACUC ISU99010)的規定。

二、動物實驗步驟

動物手術前一天禁食以利手術進行，使用動物用麻醉劑 (Zoletil 50, Tiletamine 與 Zolezepam 混合比例為 1:1) 進行肌肉注射將其麻醉 (使用劑量為 1 ml/kg)，待其麻醉昏迷後，將兔子後腿膝關節部位之兔毛剃除以碘酒與酒精消毒後，以手術刀劃開日本大白兔之膝關節處，找到膝關節軟骨位置後，利用鑽孔機製造一直徑約為 5 mm，接著將表皮縫合(Kuo, Chiang, Lan, Niu, & Chang, 2013)。

三、LIPUS 治療

利用 Exogen 低強度脈衝超音波設備(Smith & Nephew Inc, Memphis, TN, USA)進行體外超音波刺激，此設備產生 1.5 兆赫聲正弦波、200 μ s 脈衝、頻率 1kHz，峰值強度為 30 mW/cm^2 。每天刺激 20 分鐘右膝上的手術缺損部位，持續 3 個月。待三個月後犧牲兔子取出膝關節進行組織染色分析，以評估其對膝關節軟骨缺陷修復之成效。

四、軟骨形態評估

動物實驗完成後，依預定之時間將日本大白兔犧牲，將膝關節標本取出，進行軟骨表面形態的變化之觀察及分析。

五、組織化學染色評估

動物實驗完成後，依預定之時間將日本大白兔犧牲，膝關節標本進行解剖，固定在 10%福爾馬林 24 小時，由高汀和 Stewart 的流體的脫鈣 (等體積的 10%福爾馬林和 10%甲酸溶液)，並包埋在石蠟中。以 Hematoxylin & Eosin 染色和 Alcian blue 染色觀察損傷的軟骨層和軟骨修復效果評價。

參、結果與討論

從軟骨表面形態上發現，LIPUS 治療組的軟骨表面凹凸程度比沒有 LIPUS 治療組別來得平整。從圖 2 中可發現，沒經過 LIPUS 治療組中的缺陷仍然存在，增生組織不多（圖 2A）；而經 LIPUS 處理組的軟骨缺損處被新生的組織所涵蓋，形成粗糙的表面，而不是中空的缺陷（圖 2B）。

從組織病理學評估，無 LIPUS 治療組別顯示於缺陷關節軟骨層中間區域和徑向區（圖 3A）的厚度減少，同時沒有觀察到缺陷有新生組織修復。而在經由 LIPUS 治療組，雖然表面變得較為光滑，但在軟骨缺損處的增生組呈現的阿爾辛染色並不多（圖 3B），顯示軟骨細胞外基質並無明顯的增生。

低強度脈衝超聲波(LIPUS)是一種壓力或聲波的能力，傳輸機械能轉化為生物組織。許多研究文獻顯示 LIPUS 能刺激成骨，以達骨折癒合的效能。雖然許多體外研究報告指出，LIPUS 對關節軟骨代謝有正面的做用，但於體內的研究較少。Li et al. (2011) 發現 LIPUS 促進兔膝關節骨性關節炎的軟骨修復。Naito et al. (2010)也提出 LIPUS 於大鼠骨關節炎軟骨上，可增加第二型膠原蛋白的合成。在本研究中，觀察到 LIPUS 治療後組織有新生組織的增長，但僅有少量的阿爾辛藍被觀察到。從此可知，沒有明顯軟骨細胞增殖或正常細胞外基質的分泌。本研究的結果與其他文獻研究有著不同的結果，其原因可能是在本研究所使用的動物模型之軟骨損傷程度是較為嚴重程度，而以前研究使用的是較為輕度骨關節炎的模型。換句話說，LIPUS 軟骨修復的效果可能會對廣泛如此嚴重的軟骨損傷修復效果較差；在嚴重的軟骨損傷上，若以 LIPUS 刺激，軟骨缺損所增殖是纖維化的組織，這與正常的細胞外基質相異。

肆、結論

本研究利用膝關節軟骨損傷的動物模型，探討 LIPUS 對於軟骨修復之影響。初步結果顯示經 LIPUS 處理後，軟骨缺損有組織增生之現象，然而沒有顯著正常組織增生的效果，顯示 LIPUS 對於嚴重的軟骨損傷修復效果不盡理想。然而對於大多病患膝關節軟骨損傷尚未嚴重之時，是為淺層軟骨缺損或初期退化，因此 LIPUS 在較為淺層軟骨缺損上的治療效果，仍需要進一步研究探討。

參考文獻

林琍竹、黃文濤、施科念 (2009)。探討骨碎補結合低強度超音波在類造骨細胞(MG-63)之效應。 *台灣應用輻射與同位素雜誌*，52(2)，653-659。

- 鄭益利 (2005)。超音波對人類軟骨細胞的生物效應 (碩士論文)。取自臺灣博碩士論文知識加值系統。
- Ikeda, K., Takayama, T., Suzuki, N., Shimada, K., Otsuka, K., Ito, K. (2006). Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sciences*, 79, 1936-1934.
- Ito, A., Aoyama, T., Yamaguchi, S., Zhang, X., Akiyama, H., Kuroki, H. (2012). Low-intensity pulsed ultrasound inhibits messenger RNA expression of matrix metalloproteinase-13 induced by interleukin-1 β in chondrocytes in an intensity-dependent manner. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 38(10), 1726-1733.
- Korstjens, C.M., van der Rijt, R.H., Albers, G.H., Semeins, C.M., Klein-Nulend, J. (2008). Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 46(12), 1263-1270.
- Kuo, S. M., Chiang, M.Y., Lan, C. W., Niu, G.C. C., Chang, S. J. (2013). Evaluation of nanoarchitected collagen type II molecules on cartilage engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 101A, 368-377.
- Li, X., Li, J., Cheng, K., Lin, Q., Wang, D., Zhang, H., An, H., Gao, M., Chen, A. (2011). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on MMP-13 and MAPKs signaling pathway in abbit knee osteoarthritis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61(2), 427-434.
- Mukai, S., Ito, J., Nakagawa Y, Akiyama, H., Miyamoto, M., Nakamura, T. (2005). Transforming growth-B1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 31, 1717-1721.
- Naito, K., Watari, T., Muta, T., Furuhashi, A., Iwase, H., Igarashi, M., Kurosawa, H., Nagaoka, I., Kaneko, K. (2010). Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) increases the articular cartilage type II collagen in a rat osteoarthritis model. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(3), 361-369.
- Nolte, P. A., Klein-Nulend, J., Albers, G.H., Marti, R.K., Semeins, C.M., Goei, S.W., Burger, E.H. (2001). Low-intensity ultrasound stimulates endochondral ossification in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 301-307.
- Zhang, Z. J., Juckle, J., Francomano, C. A., Spencer, R.G. (2002). The influence of pulsed low-intensity ultrasound on matrix production of chondrocytes at different stages of differentiation : an explants study. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 28, 1547-1553.

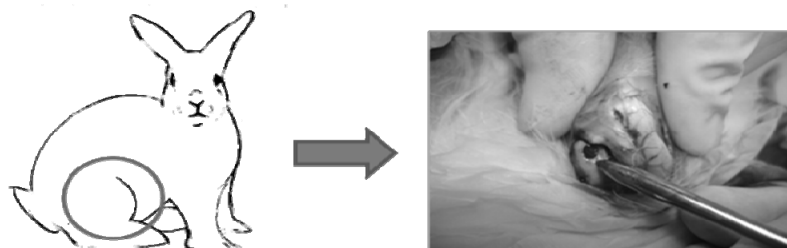


圖 1 於日本大白兔膝關節軟骨上製造之缺陷圖

(A)

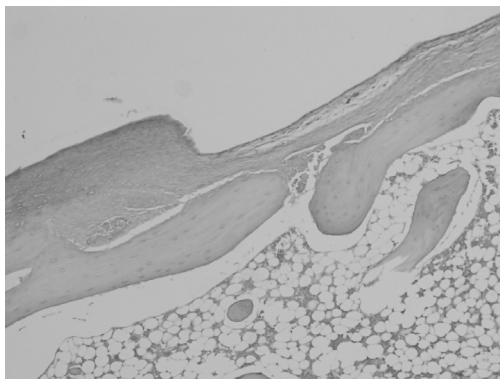


(B)



圖 2 動物實驗三個月犧牲之軟骨缺陷：(A)未經 LIPUS 處理；(B) 經 LIPUS 處理

(A)



(B)

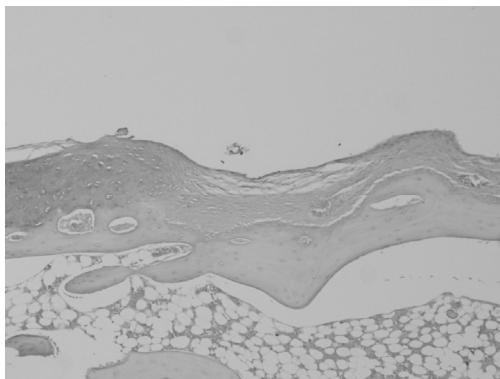


圖 3 動物實驗 Alcian blue 染色結果：(A)未經 LIPUS 處理；(B)經 LIPUS 處理

The Study of Low-intensity ultrasound stimulates on cartilage repair

Hsia-Ying Cheng¹, Chun-Shien Wu¹, Shwu-Jen Chang²,
Shan-Wei Yang^{3*}(Communication author)

¹I-Shou University Center for General Education

²I-Shou University Department of Biomedical Engineering

³Department of Orthopaedics Kaohsiung Veterans General Hospital Introduction

Abstract

Chondral injuries are common lesions of the knee joint. Variety of causes leads to chondral degeneration, such as aging degeneration or sport injury. As known, low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) has been used to treat fractures with non-union and to promote bone repair. However, the effects of LIPUS on articular cartilage repair still remains unclear till today. In the present study, we investigated the application of LIPUS on the repair of articular cartilage in a rabbit cartilage injury model. The rabbits were divided into two groups, that is, experimental group (with-LIPUS-treatment) and control group (without-LIPUS-treatment). The preliminary results showed that the cartilage defects with-LIPUS-treatment groups had filled with the obvious regenerated tissue compared to the without-LIPUS-treatment groups. However, there was no significant difference on the formation of cartilage extracellular matrix between the with-LIPUS-treatment and without-LIPUS-treatment groups under the characteristic Alcian-blue stain assay. In summary, LIPUS has no significant therapeutic effect in treating severe articular cartilage injury from this animal study.

Keywords: low-intensity pulsed ultrasound, cartilage injury