

# 低强度脉冲超声治疗骨质疏松性骨折的实验研究

王磊 曾炳芳 张先龙

**摘要:** **目的** 通过实验研究评价低强度脉冲超声(Low-intensity Pulsed Ultrasound, LIPUS)对大鼠骨质疏松性骨折的治疗作用。**方法** 实验用4.5月龄的雌性SD大鼠26只,20只去势后10周证实已发生骨质疏松,建立双侧股骨中段骨折模型,按标准筛选,最后有9只进入治疗实验。造模后第2日起采用自制低强度脉冲超声仪随机对一侧后肢进行治疗,每天20 min,超声波频率为1.5 MHz,脉宽200  $\mu$ S,重复频率1 KHz,强度为50 mW/cm<sup>2</sup>;另一侧作对照。治疗6周后处死大鼠,取双侧股骨分别行组织学观察、X线摄片,并采用3点弯曲试验比较两侧骨痂的力学性能。**结果** 实验侧LIPUS治疗6周后与对照侧比较骨折愈合进程加快,软骨性骨痂向骨性骨痂的转化更明显,更多的原始骨小梁进入改建期。两者的最大载荷、最大应力和弹性模量分别为93.79  $\pm$  12.44和53.13  $\pm$  11.69 ( $P < 0.01$ ),32.57  $\pm$  11.30和19.57  $\pm$  4.20 ( $P < 0.05$ ),577.78  $\pm$  176.54和358.77  $\pm$  144.24;实验侧分别比对照侧高76.53%、66.43%和61.04%。**结论** 低强度脉冲超声治疗能明显促进大鼠骨质疏松性骨折的愈合过程,改善骨痂的力学特性,为临床上治疗骨质疏松性骨折提供新的思路和方法。

**关键词:** 低强度脉冲超声;骨质疏松;骨折

**Experimental treatment of osteoporotic fracture in rats by low-intensity pulsed ultrasound** WANG Lei, ZENG Bingfang, ZHANG Xianglong. Department of Orthopaedic Surgery, Sixth Shanghai People's Hospital, Shanghai 200233, China

**Abstract: Objective** To evaluate the therapeutic effect of low-intensity pulsed ultrasound(LIPUS) on osteoporotic fracture in rats. **Methods** Twenty-six female 4.5-month-old SD rats were involved in the study,20 of which underwent bilateral ovariectomy. Ten weeks later when the osteoporosis was confirmed, the 20 rats had their bilateral femoral shaft closely fractured. After selection only 9 rats finally entered the experiment. The day after fracture a hind limb was chosen to receive LIPUS as treatment and the other one was taken as control. The LIPUS was done 20 minutes daily with a 200  $\mu$ S, burst of 1.5 MHz sine waves repeated at 1 KHz and an average intensity of 50 mW/cm<sup>2</sup>. Six weeks after treatment, the rats were sacrificed and their bilateral femurs taken for histological study, radiography and biomechanical analysis by three point bending test. **Results** The LIPUS treated femurs showed more rapid bone healing, accelerated endochondral bone formation and more bone remodeling than the control. The three-point bending test revealed that, the peak load, maximum stress and elastic load were 93.79  $\pm$  12.44 versus 53.13  $\pm$  11.69 ( $P < 0.01$ ), 32.57  $\pm$  11.30 versus 19.57  $\pm$  4.20 ( $P < 0.05$ ), and 577.78  $\pm$  176.54 versus 358.77  $\pm$  144.24, respectively, with the values in the experimented sides being 76.53%, 66.43%, and 61.04% higher than those in the control sides, respectively. **Conclusions** LIPUS accelerates the healing of osteoporotic fracture in rats, and improves the mechanical strength of the callus, thus providing a new way to treat osteoporotic fractures clinically.

**Key words:** Low-intensity pulsed ultrasound; Osteoporosis; Fracture

众多基础和临床研究已经证实,低强度脉冲超声(LIPUS)能明显促进骨折愈合,还可治疗骨不连,

而且操作简便、安全有效、无创伤性,具有广阔的应用前景;即便对于一些有吸烟、肥胖、使用激素等不利因素的骨折患者也能促进其愈合的进程<sup>[1]</sup>;但在国内外文献中尚未见用LIPUS处理骨质疏松性骨折

作者单位:200233 上海市第六人民医院骨科

通讯作者:王磊,Email:wanglei2264@sina.com

的相关研究和报道。笔者自制低强度脉冲超声仪用于处理大鼠实验性骨质疏松性股骨骨折,揭示并报告 LIPUS 对骨质疏松性骨折的治疗作用,为临床治疗骨质疏松性长骨骨折提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型

选用 4.5 月龄,体重 280~310 g 雌性 SD 大鼠共 26 只(由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供),随机取 20 只为去势组,6 只为假手术组。氯氨酮 0.1 g/kg 腹腔内注射麻醉,无菌操作下经腰背部切口暴露双侧卵巢,随机对 20 只大鼠实施双侧卵巢切除术;另外 6 只游离显露卵巢,不做切除;术后大鼠无一死亡。10 周后去势组和假手术组各 6 只大鼠,经双能 X 线骨密度仪(HOLOGIC, QDR-4000)测量比较,证实去势组大鼠已发生骨质疏松。

将去势的 20 只大鼠用氯氨酮麻醉后在无菌条件下沿髌骨内侧缘纵形切开皮肤,长 0.6~0.8 cm,使髌骨向外脱位,显露股骨髁间窝,逆行向股骨髓腔打入克氏针(长约 33 mm,直径 1.5 mm);将髌骨复位后用 3-0 号丝线缝合关节囊和骨四头肌腱扩张部,1-0 号丝线缝合皮肤切口。按文献报道自制三点弯曲骨折造模器<sup>[2]</sup>,滑块重量 500 g,自 25 cm 高度的自由落体造成大鼠双侧股骨中段闭合骨折。手术过程中有 1 例发生股骨髁劈裂;闭合骨折造模后经 X 线摄片发现 1 例发生股骨颈骨折,2 例股骨髁上骨折,4 例骨折线为螺旋形、长斜形(与骨干夹角 < 45°)或呈粉碎性骨折(骨块周径大于骨折端 1/3);另有 2 例因麻醉过量或创伤过大死亡。经严格按双侧股骨中段 1/3 的横行骨折标准进行筛选,结果有 10 只大鼠成功建立骨质疏松性骨折的实验模型入组进行研究;随机选一侧接受 LIPUS 治疗,另一侧作对照。术前半小时内起肌注青霉素钠盐,15 万 U/kg,连续 3 d,术后自由活动。

### 1.2 治疗方法

采用自制低强度脉冲超声治疗仪,探头直径 3 cm,经东风 75 型超声功率计和 E312A 型通用计数器测定强度(SATA)为 50 mW/cm<sup>2</sup>,频率 1.5 MHz,重复频率 1 KHz,脉宽 200 μs。将大鼠固定于特制水槽内,两侧探头距离大鼠股骨中段约 1 cm,其中一侧为假刺激。术后第 2 日起实验大鼠接受 LIPUS 治疗,每天 20 min。6 周后处死,取双侧股骨作如下检测。

### 1.3 观察指标

1.3.1 X 线摄片:标本取出后迅速将表面软组织剔

除干净,连同克氏针行 X 线摄片,比较骨折愈合情况。摄片后将内固定取出,标本用生理盐水纱布包裹,塑料袋密封后放入 -20℃ 冰箱保存。

1.3.2 生物力学测定:标本逐级解冻,室温下自然复温。用砂纸将骨痂两侧骨表面处理平整,丙酮表面脱脂,在岛津 2000-A 材料实验机上行股骨三点弯曲力学检测,跨距 20 mm,加载速度为 3 mm/min,测量最大载荷,并计算相应的最大应力和弹性模量。

1.3.3 组织学观察:取出克氏针,标本在 4℃ 下,用 4% 的多聚甲醛溶液(pH = 7.4)固定 24 h,10% EDTA 溶液脱钙 2~3 周,切取中段骨痂组织作石蜡切片,HE 染色观察。

### 1.4 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件作数据分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间样本均数比较采用 *t* 检验,结果  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

1 只实验大鼠用 LIPUS 治疗至第 3 天出现伤口感染,从实验中剔除;其余 9 只试验情况良好,双膝关节活动自如,至 6 周后顺利取材;其中 6 例标本作 X 线摄片,并测量骨痂的生物力学性能;另 3 例作组织学观察。

### 2.2 X 线摄片

治疗侧骨痂密度较高,6 例中有 5 例(83%)骨折线已基本消失;对照侧骨折端虽有部分骨痂形成并连接,但仅 2 例(33%)骨折线较模糊,其余 4 例骨折线仍较明显。两侧骨痂生成量无明显差异,治疗侧稍多于对照侧。

### 2.3 生物力学参数

治疗侧骨痂的最大载荷、最大应力和弹性模量分别高于对照侧 76.53%、66.43% 和 61.04%,其中最大载荷和最大应力显著高于对照组(分别为  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 两侧骨痂的生物力学参数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	大鼠数 (只)	最大载荷(N)	最大应力(MPa)	弹性模量(MPa)
治疗侧	6	93.79 ± 12.44*	32.57 ± 11.30**	577.78 ± 176.54
对照侧	6	53.13 ± 11.69	19.57 ± 4.20	358.77 ± 144.24

注:与对照侧比较 \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.05$

### 2.4 组织学观察

去势大鼠骨折 6 周时软骨内骨化过程基本完成,大量类骨质形成,软骨性骨痂逐渐为骨性骨痂所

替代(图 2),在实验侧这一现象更为明显,骨性骨痂比例明显增加,表面成骨细胞数量增多,体积增大且胞浆染色较深,同时破骨细胞数量也较多,功能活

跃,与对照侧比较有较多的原始骨小梁已进入改建期。

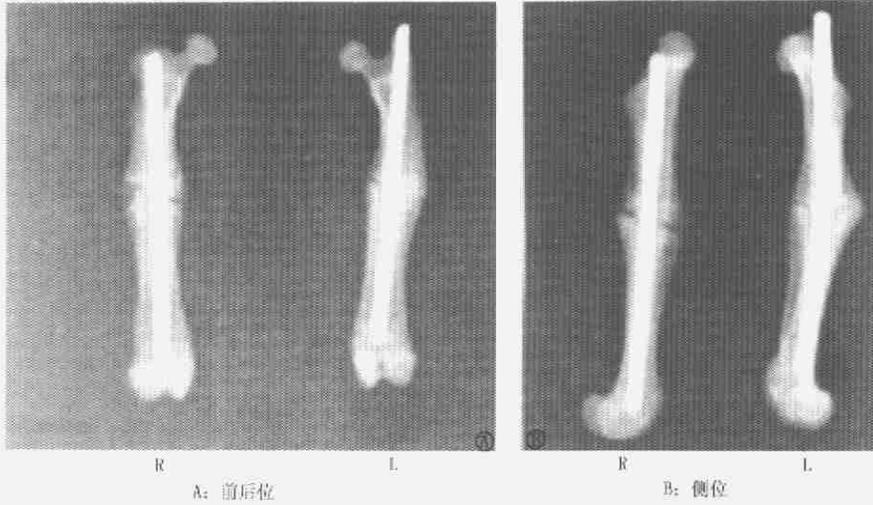


图 1 大鼠双侧股骨实验性骨质疏松性闭合骨折经 LIPUS 治疗 6 周。实验侧(L)骨折线基本消失,骨痂密度较高;而对照侧(R)骨折端虽有部分骨痂形成并连接,但骨折线仍较明显,骨痂密度较低

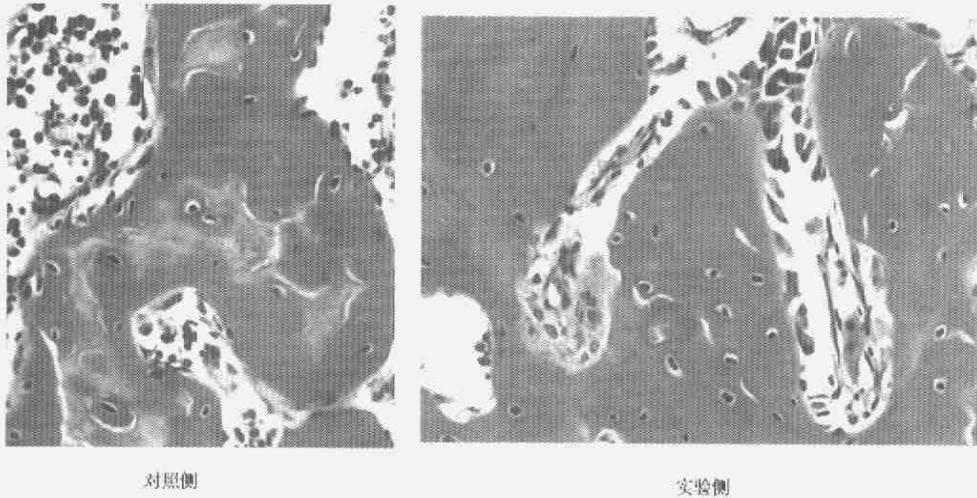


图 2 大鼠双侧股骨实验性骨质疏松性闭合骨折经 LIPUS 治疗 6 周。实验侧与对照侧比较,软骨内骨化较完全,骨性骨痂所占比例较大,骨改建现象明显(HE × 200)

### 3 讨论

目前临床上已广泛应用 LIPUS 治疗新鲜骨折、骨折延迟愈合或不愈合、节段性骨延长等<sup>[1]</sup>,并显示出明显的促进骨愈合的作用。由于其安全有效,无创伤性,美国食品与药物管理组织(FDA)分别在 1994 年和 2000 年对于前两者的临床使用予以批准认可。然而查阅国内外文献发现,在一些多中心、双盲的临床试验中<sup>[3]</sup>虽然包含有松质骨的桡骨远端骨折病例,但文献作者没有对部分老年患者作年龄性别分层的统计分析,也未提及患者骨质疏松程度与 LIPUS 疗效之间的关系,关于 LIPUS 治疗骨质疏松

性骨折的研究至今未见有相关报道。

在本实验中,笔者按照文献报道的<sup>[1]</sup>,临床上广泛使用的工作参数自制低强度脉冲超声治疗仪,仅在诊断用超声强度范围内稍作调整,适当增加了 LIPUS 的能量,期望获得更好的疗效。研究结果首次证实,LIPUS 治疗(每天 20 min,频率 1.5 MHz,脉宽 200  $\mu$ s,重复频率 1 KHz,强度为 50 mW/cm<sup>2</sup>)能明显促进实验性骨质疏松性骨折愈合进程,改善骨痂的力学特性,有效提高愈合质量。

根据 Wolff 定律,骨的形成和结构随机械负荷的大小和方向而改变。LIPUS 在一定程度上代表着一种机械信号,虽然其强度比外力负荷所产生的应力小

了几个数量级,但其频率要比后者高出数个级别,这种低强度、高频率的机械信号,至少在理论上可以替代一定的外力刺激。同时,由于超声波特有的空化效应,可以导致周围局限性液体流动——微流而使组织细胞产生容积和运动的变化,并对细胞膜形成剪切应力,改变了一些离子和分子的跨膜转运。Parvizi 等<sup>[4]</sup>用 LIPUS 刺激体外培养的幼鼠软骨细胞,观察到细胞外被荧光标记的  $\text{Ca}^{2+}$  内流明显增加,而且当使用钙螯合剂降低培养液中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度或使用  $\text{Ca}^{2+}$ /ATP-酶抑制剂时,直接抑制了超声刺激下的蛋白多糖合成,这也提示了 LIPUS 是通过软骨细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的增加而激活了信号传导,刺激了基质蛋白多糖的合成,促进了软骨内骨化过程。学者们还发现,成骨细胞和骨膜细胞在 LIPUS 作用下,骨钙素等成骨相关基因的表达都有明显的增加<sup>[5,6]</sup>。大量的实验证实 LIPUS 能影响骨组织细胞的信号传导。

然而骨质疏松性骨折的愈合有其自身的病理特点。在对双侧卵巢切除大鼠的骨质疏松性骨折研究中发现,骨折愈合过程中软骨性骨痂生成量相对较多,但向骨性骨痂演变过程延缓,同时小梁状骨表面成骨细胞数量相对减少,成骨能力相对降低<sup>[7]</sup>。而且骨痂内胶原纤维疏松、排列紊乱,与主应力方向不一致,从而导致骨折愈合质量降低,最终表现为骨痂的各项生物力学指标明显降低<sup>[8]</sup>。LIPUS 促进骨折愈合的作用明显,理论上恰巧能弥补骨质疏松性骨折愈合过程中的不足。Yang 等<sup>[9]</sup>实验发现,LIPUS 能刺激大鼠股骨骨痂中的软骨细胞较早地分化并上调 aggrecan 基因的表达,软骨基质蛋白合成增加,后期则较早地出现软骨细胞肥大,从而促进了软骨内骨化的进程。我们的实验发现,去势大鼠骨质疏松性骨折第 6 周时软骨细胞肥大伴基质钙化,软骨痂逐渐为初级小梁骨替代;在 LIPUS 作用下,软骨内骨化进程加快,骨性骨痂形成较完全,提示了骨质疏松性骨折的早期愈合阶段被整体加速,因而骨痂的生物力学性能明显改善。其内在的机理是否类似于 LIPUS 对普通骨折愈合的作用还有待于从分子生物学水平进一步深入研究。

Sterck 等<sup>[10]</sup>研究发现,骨质疏松患者的骨细胞在体外机械应力较长时间的刺激下  $\text{PGE}_2$  合成不再增加,提示了骨质疏松可能导致骨细胞对应力刺激反应下降。Warden 等<sup>[11]</sup>认为大鼠卵巢切除后骨转换加快,成骨细胞活性增强的程度有限,可能会限制 LIPUS 的效应。此外,6 周后骨痂外层较坚硬也会阻挡部分 LIPUS 的传导。上述作用是否会影响 LIPUS

对骨质疏松性骨折愈合后期的疗效,而且雌激素下降导致的破骨细胞活性增强是否会抑制 LIPUS 进一步的疗效,抑或 LIPUS 对破骨细胞可能产生一定的功能调节作用,这些均有待于进一步探索。

根据本研究结果的分析可以推断,LIPUS 能有效促进实验性骨质疏松性骨折的愈合,但目前未见有关报道。由于实验模型较复杂,部分数据离散性较大,如弹性模量虽相差 60% 以上,统计学分析却是差异无显著性。因此有必要进一步规范实验操作,加大样本量,并将研究深入到细胞分子水平,深入探讨其内在的作用机制;同时适当延长治疗和观察时间,从而更好地理解 and 掌握 LIPUS 治疗骨质疏松性骨折的作用规律,为临床解决这一棘手难题提供新的思路和方法。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, et al. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83-A:259-270.
- [2] Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, 1984, 2:97-101.
- [3] Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, et al. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, 79:961-973.
- [4] Parvizi J, Parvizi J, Greenleaf JF, et al. Calcium signaling is required for ultrasound stimulated aggrecan synthesis. *J Orthop Res*, 2002, 20:51-57.
- [5] Naruse K, Miyauchi A, Itoman M, et al. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res*, 2003, 18:360-369.
- [6] Leung KS, Cheung WH, Zhang C, et al. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop*, 2004, 418:253-259.
- [7] 张先龙, 睦述平, 曾炳芳. 骨质疏松对卵巢切除大鼠骨折愈合影响的超微结构研究. *中华外科杂志*, 2001, 39:241-243.
- [8] Nankung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*, 2001, 28:80-86.
- [9] Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res*, 1996, 14:802-809.
- [10] Sterck JG, Klein-Nulend J, Lips P, et al. Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress *in vitro*. *Am J Physiol*, 1998, 274(6 Pt 1):E1113-1120.
- [11] Warden SJ, Bennell KL, Forwood MR, et al. Skeletal effects of low-intensity pulsed ultrasound on the ovariectomized rodent. *Ultrasound Med Biol*, 2001, 27:989-998.