

BEMF 对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 bFGF 表达的影响及意义

谢肇 李起鸿 许建中 孟萍

摘要：目的 观察 BEMF 对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 bFGF 蛋白表达的影响，探讨 BEMF 治疗骨质疏松的机理。方法 6 月龄雌性未孕 Wistar 大鼠 40 只，按体质量随机分为模型组（OVX），假手术组（Sham），仿生脉冲电磁场治疗组（BEMF + OVX，EM），雌激素治疗组（Estrogen + OVX，E）。OVX、EM、E 组行双侧卵巢切除术，Sham 组行假手术。术后第 9 W 开始治疗，E 组行苯甲酸雌二醇肌肉注射，0.5 mg/kg，1 次/2 W。EM 组大鼠暴露于仿生脉冲电磁场治疗，1 h/1 次/d，OVX、Sham 组不予以任何处理，作为对照组。治疗 10 W 后处死各组实验动物，测量腰椎骨密度、椎体的最大载荷、扫描电镜观察椎体骨结构的变化。采用免疫组化检测椎体骨组织中 bFGF 蛋白表达情况并以图像分析进行组间比较。结果 治疗 10 W 后 EM 组大鼠骨密度、椎体的最大载荷较 OVX 组显著性增高（ $P < 0.05$ ），骨结构明显改善。bFGF 的表达主要位于成骨细胞、骨细胞，EM 组椎体骨组织中 bFGF 表达显著性高于 OVX 组（ $P < 0.01$ ）。结论 提高骨组织中 bFGF 的表达是 BEMF 治疗骨质疏松的重要机理之一。

关键词：仿生脉冲电磁场；绝经后骨质疏松；碱性成纤维细胞因子

Impact of bionics pulsed electromagnetic fields on the expression of bFGF in the bone tissue of ovariectomy osteoporosis rats XIE Zhao, LI Qihong, XU Jianzhong, et al. Department of Orthopaedics, Shouhwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract：**Objective** Observing the impact of bionics pulsed electromagnetic fields on of bFGF protein expression in the bone tissue of Ovariectomy Osteoporosis Rats and to explore the mechanism of the therapeutic effect of bionics electromagnetic fields in postmenopausal osteoporosis. **Methods** Forty 6-month old female Wistar rats were randomly divided into four different groups according to body mass: ovariectomy group (OVX), sham operation group (Sham), E group (Estrogen + OVX) and EM group (BEMF + OVX). All rats were subjected to bilateral ovariectomy except sham operation group. After 8 weeks operation, E group rats were given estrogen 0.5 mg/kg, 1/2 W. EM group rats were exposed to bionics electromagnetic fields, 1h/d. OVX and Sham group rats were given nothing. All the treatments were kept for 10 weeks. After the treatments finished, measuring the markers as follow: the bone mineral density (BMD X lumbar vertebrae), the maximum load of lumbar vertebrae, bone morphology (lumbar vertebrae) were observed by scan electric microscope. The expression of bFGF protein with immunochemistry. **Results** Compared with OVX group, BMD and the maximum load significantly increased at the lumbar vertebrae in EM group ($P < 0.05$). Scan electric microscope observation showed trabecular volume and trabecular connections increased in EM group than in OVX. Imaging analyses showed that BEMF stimulation exposure significantly elevated the expression of bFGF protein than that in OVX group. **Conclusions** BEMF are useful in the treatment of postmenopausal osteoporosis resulting from ovariectomy. What the BEMF stimulation exposure done, facilitating bFGF protein expression in bone tissue may be one of mechanisms of therapeutic efficacy of BEMF on postmenopausal osteoporosis.

Key words：Bionics electromagnetic fields; Postmenopausal osteoporosis; bFGF

骨质疏松发生的病理过程为持续性进行性加重

过程，近年来多种细胞因子在该过程中的重要作用正逐渐为研究者所发现。骨组织细胞因子表达的相对稳定状态受到破坏将影响到骨改建活动的内在平衡，出现骨吸收-形成脱耦联从而发生骨质疏松。碱

性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在骨代谢中具有重要调节作用,骨组织中 bFGF 表达的减少是绝经后骨质疏松发病的重要环节^[1],改善骨组织 bFGF 的表达对骨质疏松的治疗具有重要价值^[2,3]。笔者通过观察仿生脉冲电磁场(bionics electromagnetic fields, BEMF)对去卵巢大鼠骨组织 bFGF 表达的影响,对 BEMF 治疗骨质疏松的机理进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验仪器、药品及试剂

苯甲酸雌二醇由上海第九制药厂生产(1995 沪准字 009004)。bFGF 免疫组化试剂盒为博士德公司产品。法国 GK 公司 CHALLENGER 全身双能 X 线骨密度测定仪,附小动物骨密度测定软件。INSTRON 1011 型万能材料机(美国)。AMRAY 1000B 扫描电镜(美国 AMRAY 公司)。生物医学图像分析系统(CM-2000 B 型,北京航空航天大学)。Union 2000 仿生电磁场骨质疏松治疗仪(大鼠型):脉冲磁场频率 8 和 12 Hz/sec;频率自动跳变周期:30 sec;最大磁场强度:11 mT;强度自动跳变周期:60 sec。信号功率谱:10~250 Hz,主要功率频段为 2~75 Hz,由中国医学科学院生物医学工程研究所屈承端教授提供。

1.2 实验方法

1.2.1 模型的建立、动物的处理及标本的制备

6 月龄雌性未孕 Wistar 大鼠 40 只,体质量 250 ± 50 g,由第三军医大学实验动物中心提供。按体质量随机分为假手术对照组(Sham-operation, Sham)、卵巢切除组(ovariectomized, OVX)、卵巢切除+雌激素替代治疗组(OVX+ERT, E)、卵巢切除+仿生电磁场治疗组(OVX+BEMF, EM)等 4 组,每组各 10 只。4 组大鼠分别乙醚吸入麻醉,在严格的无菌操作下,取腰椎后侧正中切口,椎旁钝性分离肌肉组织,切开腹膜,进入腹腔。OVX 组、E 组、EM 组行双侧卵巢切除术,Sham 组手术入路同前,不行卵巢切除。术后各组大鼠分笼饲养。动物在 24 ± 2℃、湿度 60%~70%、定期紫外线消毒和通风、10/14 h 间隔照明的情况下,自由摄取标准饲料和消毒蒸馏水。于术后 8 w 造模成功。E 组于第 9 w 开始采用苯甲酸雌二醇肌肉注射 0.5 mg/kg,1 次/2 w。EM 组于第 9 w 开始采用中国医学科学院生物工程研究所研制的仿生脉冲电磁场骨质疏松治疗仪(大鼠型)进行全身治疗,动物在均匀磁场中自由活动,1 h/d。OVX、Sham

组不行任何干预。各组动物饲养条件同上。

1.2.2 标本的采集

于开始治疗后 10 w,麻醉下 4 组动物统一开胸放血处死。处死前大鼠活体先行 DEXA 腰椎骨密度测定。处死各组大鼠进行解剖,取出腰 1 椎体(L1),剔净软组织。L1 在 CSA-1 A 超声波发生器 300 mA 洗涤 20~30 min 后,投入 3% 戊二醛溶液中,待行扫描电镜观察。生物力学测定:取出 L₃ 椎体剔净软组织,用剪刀小心剪下椎间盘、棘突及附件,并用细纱纸打磨成上下平面平行与纵轴垂直的三棱柱,标本制取后用生理盐水纱布包裹,置于 -20℃ 低温冰箱保存,进行椎体压缩实验。bFGF 的免疫组化检查采用博士德公司的 SABC 试剂盒进行实验。一抗为 bFGF。处死各组大鼠,取 L₂ 椎体,仔细剥离附着在 L₂ 椎体上的软组织,在 4℃、4% 多聚甲醛保存固定 48 h, PBS 充分漂洗,再经过 10% EDTA PBS(pH 7.4) 4℃ 下脱钙 3~4 w,隔天换液 1 次,脱钙完成,蒸馏水冲洗,70%~80%~90%~95%~100% 乙醇梯度脱水各 4 h,二甲苯透明 12 h,浸透液浸透,石蜡包埋。切片机纵行连续切片,切片厚 6 μm,将切片粘贴于用 10% 多聚赖氨酸包埋的载玻片上,60℃ 烤箱中烘烤 12~24 h。按常规进行免疫组化检查。

1.2.3 指标测定

1.2.3.1 bFGF 免疫组化结果观察:以细胞胞浆出现棕黄色染色为阳性。bFGF 免疫组化结果图像分析:bFGF 免疫组化切片经 Olympus 光学显微镜观察照相,每一个标本照相 4 张(4 个视野)。采用北京航空航天大学医学图像分析系统测定计算每一个视野(统计场)的阳性染色平均光密度(optical density, OD)。每一个标本分析 4 个视野,每一组测定 10 个标本。

1.2.3.2 骨密度测定:处死前,给予 1% 戊巴比妥钠 3 ml/kg 腹腔注射麻醉,当大鼠呈稳定的昏睡状态达到 5 min 以上时,放置与 CHALLENGER 双能 X 线骨密度仪的探头下,应用小动物软件进行腰椎(L₁~L₅)骨密度值测定。

1.2.3.3 生物力学测定:生物力学试验前取出冰箱冻存的大鼠 L₃ 椎体,室温下复温。椎体压缩测试:将磨制好的椎体置于实验机(INSTRON 1011 型万能材料机,美国)上,取加载速度每分钟 1 mm 进行测试,测定腰椎最大载荷。

1.2.3.4 扫描电镜观察:超声洗涤后的 L₁ 置于 3% 戊二醛溶液中固定 24 h, 0.1 mol/L PBS 漂洗 2

次,每次 10 min,乙醇逐级脱水(30% ~ 50% ~ 70% ~ 80% ~ 90% ~ 100% ~ 100%,每次 10 min)醋酸异戊脂置换 10 min,二氧化碳临界点干燥,镀膜,在 AMRAY 1000 B 扫描电镜下观察腰 1 椎体骨小梁的形态并照相。

1.3 统计学处理

所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用 SPSS 10.0 统计软件进行多组间 F 检验,并用 LSD 检验进行各组间的两两比较。 $P < 0.05$ 为显著差异; $P < 0.01$ 为非常显著差异。

2 结果

2.1 大鼠椎体骨密度及椎体生物力学测定结果(见表 1)

与 Sham 组相比,OVX 组腰椎骨密度下降($P < 0.01$);EM 组腰椎骨密度低于 Sham 组($P < 0.05$)。与 Sham 组相比 EM 组腰椎骨密度均显著性升高($P < 0.05$)。EM 组椎体最大载荷较 OVX 组明显增强($P < 0.05$)。

2.2 骨组织中 bFGF 蛋白阳性表达为胞浆棕黄色染色,见表 2。bFGF 表达主要位于骨小梁周围的成骨细胞、骨衬细胞、骨细胞以及骨基质。不同组别骨组织中表达不同(图 1 ~ 4)。Sham 组骨组织中 bFGF 有

阳性染色成骨细胞、骨衬细胞、骨细胞以及骨基质呈棕黄色。OVX 组骨组织中,阳性成骨细胞、骨衬细胞、骨细胞数量明显减少。图象分析表明:OVX 组骨组织 bFGF 的平均光密度值较其余 3 组显著减弱($P < 0.01$)。EM 组与 Sham 组无显著差异($P > 0.05$)。说明 BEMF 具有提高骨组织中 bFGF 的能力。

表 1 治疗 10 W 后不同组别大鼠骨密度、椎体最大载荷($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	椎体骨骨密度 (g/cm^2)	椎体最大载荷 (N)
OVX	10	$0.218 \pm 0.016^{**}$	$101.43 \pm 5.63^{**}$
Sham	10	0.291 ± 0.027	116.12 ± 7.67
EM	10	$0.271 \pm 0.014^{* \# \#}$	$114.94 \pm 3.02^{\# \#}$
E	10	$0.279 \pm 0.013^{\# \#}$	$109.93 \pm 4.08^{* \# \#}$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#} P < 0.05$, $^{\# \#} P < 0.01$

表 2 治疗 10 W 后不同组别之间 bFGF 表达平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	平均光密度
OVX	10	0.214 ± 0.0177
sham	10	$0.322 \pm 0.0134^{\# \#}$
EM	10	$0.309 \pm 0.0131^{\# \# \#}$
E	10	$0.308 \pm 0.011^{\# \# \#}$

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\#} P < 0.05$, $^{\# \#} P < 0.01$

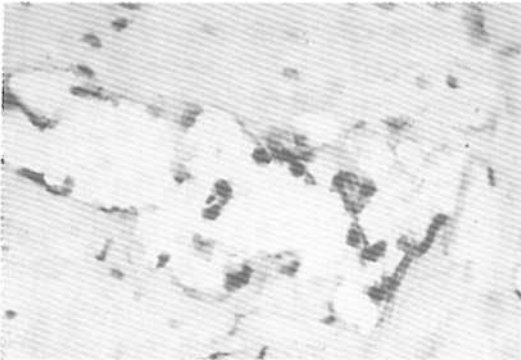


图 1 OVX 组 bFGF 染色阳性细胞。ABC × 400

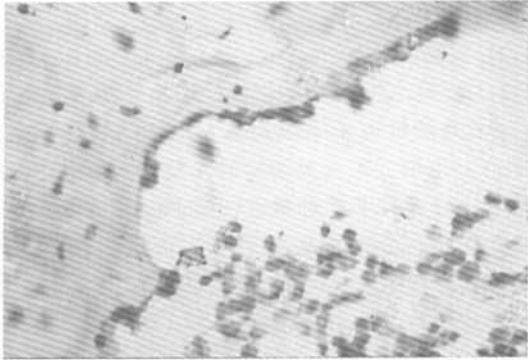


图 2 Sham 组 bFGF 染色阳性细胞。ABC × 400

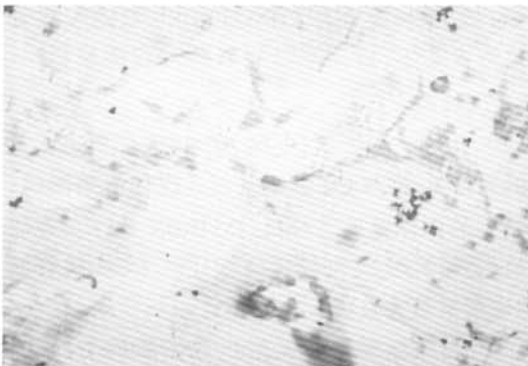


图 3 EM 组 bFGF 染色阳性的细胞。ABC × 400

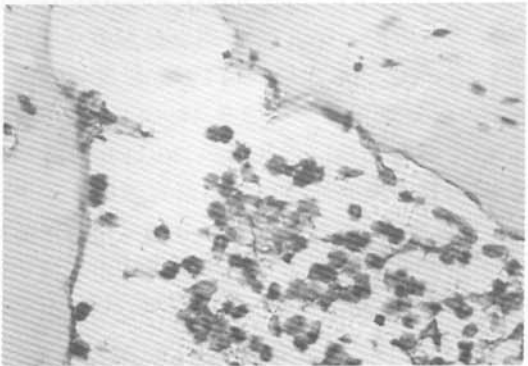


图 4 E 组 bFGF 染色阳性的细胞。ABC × 400

2.3 扫描电镜观察(图 5~8)

(1) Sham 组 :骨小梁排列纵横交错 ,互相连接成立体网状结构 ,骨小梁间距小。

(2) OVX 组 :骨小梁排列稀疏 ,骨小梁间隙增宽 ,部分区域的骨小梁出现断裂、游离残端。三维结构受到破坏并且出现骨小梁的缺如。骨小梁宽度与

正常对照组无显著性差异。

(3) E 组 :较模型组骨小梁数目增多、连接较为密集、三维结构部分恢复。

(4) EM 组 :骨小梁可见到不同程度的改善 ,骨小梁之间的连接增多 ,空间结构得到恢复。

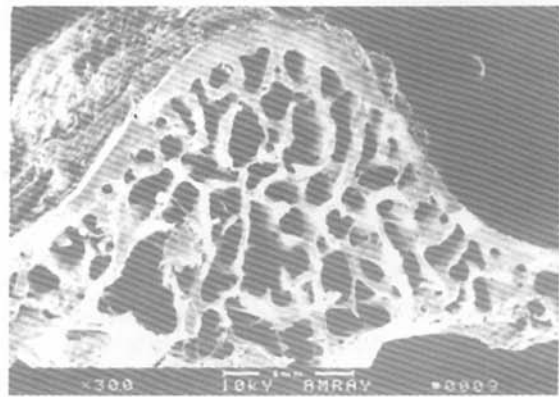


图 5 OVX 组(模型组)骨小梁明显减少、变细、排列稀疏,骨小梁间距加宽,部分区域的骨小梁出现断裂、残端游离,三维结构受到破坏,并出现骨小梁的空缺区域。(SEM×30)

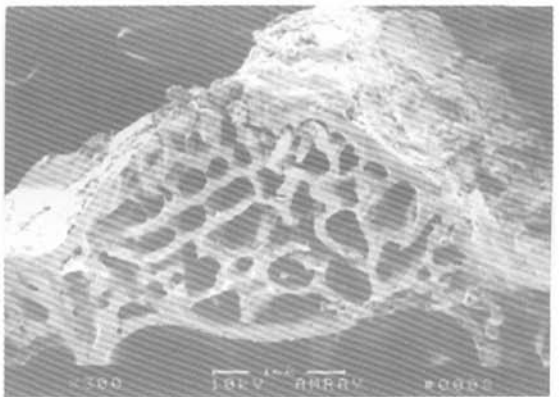


图 6 Sham 组(假手术组) 骨小梁排列纵横交错,互相连接呈网状,骨小梁间距小。(SEM×30)

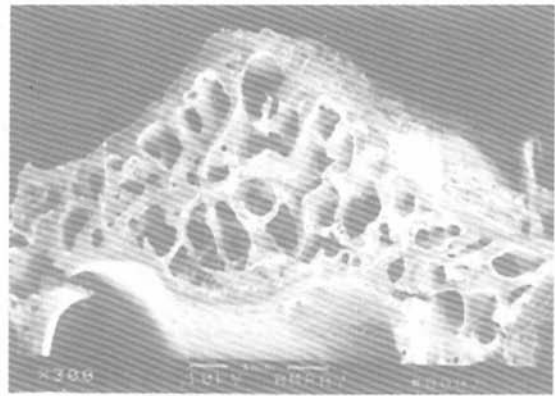


图 7 EM 组(BEMF + OVX)与模型组相比,骨结构出现明显的改善,骨小梁排列紧密,小梁之间的连接明显增多。(SEM×30)

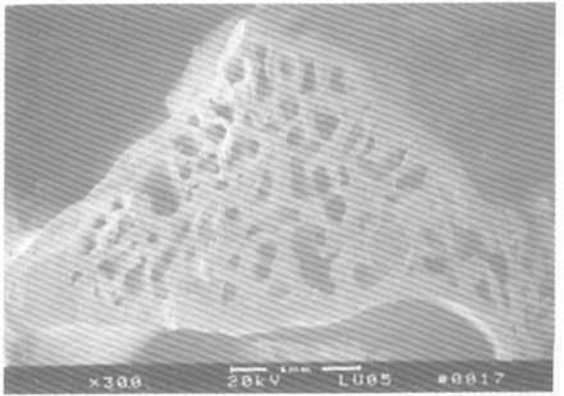


图 8 E 组(E + OVX)与模型组相比,骨小梁之间的连接增多,三维结构得到部分恢复。(SEM×30)

3 讨论

骨质疏松性骨折是骨质疏松症的严重并发症 ,预防骨质疏松性骨折的发生是治疗骨质疏松症的根本目的。因此 ,生物力学性能改善与否是衡量治疗骨质疏松手段有效性的一个极为重要的标准。然而活体情况下难以测定骨的生物力学性能 ,应用双能 X 线测定的骨密度是临床骨质疏松诊断及观察疗效的重要手段。Ebbesen 等^[4]的研究表明 ,对于完整的椎体来说 ,骨密度(BMD)对整体骨强度的影响仅占

40%~50% ,骨微细结构等骨质量因素对骨的生物力学性能具有较大贡献。因而在观察腰椎骨密度变化的同时 ,对椎体骨结构的变化进行了观察。本研究的结果显示 ,尽管 BEMF 治疗组腰椎骨密度仍不及 Sham 组($P < 0.05$),但 BEMF 治疗组腰椎骨密度较 OVX 组显著升高($P < 0.05$)。电镜观察显示 BEMF 治疗组骨小梁之间的连接增多 ,空间结构得到恢复 ,与 OVX 组相比骨结构得到明显优化。最大载荷是反映骨强度的重要指标 ,经 BEMF 治疗后椎体骨生物力学特性得到显著改善($P < 0.05$)。以上

研究结果说明 ,BEMF 在增加骨密度的同时 ,改善了骨结构 ,从而在整体上改善了椎体的生物力学性能。

目前低能量、极低频率的电磁场对骨质疏松的治疗作用已趋于公认 ,其潜在的作用机制目前仍局限于压电效应是成骨第一信号等传统生物物理学理论^[5] ,难以解释其对骨质疏松的治疗作用 ,有必要作进一步探讨。既往研究表明 ,bFGF 具有促进成骨细胞前体细胞的分化 ,增加培养的骨细胞中骨 Gla 蛋白表达促进骨形成的作用 ,同时促进破骨细胞凋亡^[6,7]。Rodan 等的研究也表明(bFGF)具有促进成骨细胞增殖和破骨细胞凋亡^[8]。Liang 等采用 bFGF 静脉注射治疗实验性骨质疏松 ,发现不但刺激了骨形成 ,干骺端松质骨髓腔有新生骨小梁形成^[2]。Nakamura 骨膜下应用 bFGF 发现骨量增加、失去连续性的骨小梁也重新连接^[3]。因此 ,探讨 BEMF 对 OVX-OP 大鼠骨组织 bFGF 蛋白表达的影响对揭示其治疗作用机制极为重要。为此 ,本研究中我们观察了 BEMF 对 OVX-OP 大鼠骨组织 bFGF 表达的影响。发现 BEMF 显著促进了 OVX-OP 大鼠骨组织中 bFGF 的表达($P < 0.05$) ,与雌激素治疗组无明显差别($P > 0.05$)。模型组大鼠骨组织 bFGF 蛋白的表达降低($P < 0.05$) ,同时骨量减少、骨小梁数量减少、骨生物力学性能减退 ,BEMF 治疗后 ,骨组织 bFGF 蛋白的表达明显增强 ,骨量增加、骨连接增加 ,骨生物力学性能得到改善。表明 BEMF 通过促进骨组织 bFGF 蛋白表达 ,调节骨吸收-形成 ,增加了骨量 ,改善了骨结构 ,从而改善了骨的生物力学性能。

有研究表明电刺激使细胞内的游离钙离子浓度增加到原来的 2.3 倍 ,认为电刺激成骨是通过钙离子^[9]。钙离子增加可以直接或通过激活钙调节蛋白间接激活一些蛋白酶 ,进而引起细胞增殖作用。电磁场刺激成骨细胞产生骨生长因子也可能通过同一途径。本研究发现仿生电磁场对 bFGF 蛋白表达的

促进作用 ,推测骨局部游离钙离子浓度增加 ,促进了 bFGF 蛋白的表达 ;也可能是通过促进其他生长因子的分泌 ,诱导 bFGF 蛋白的表达。尚有待于进一步探讨。

综上所述 ,仿生电磁场具有升高骨密度、改善骨结构 ,提高骨生物力学性能的作用。提高骨局部 bFGF 蛋白表达 ,调节骨代谢可能是治 BEMF 治疗骨质疏松的重要机制之一。

【 参 考 文 献 】

- [1] 范宏斌 ,王全平 ,蒋尔鹏 ,等 . 原发性骨质疏松症患者中轴骨 IL-6 ,bFGF 的免疫组化 . 中国矫形外科杂志 ,2001 ,8(4) :363-365.
- [2] Liang H , Pun S , Wronski TJ. Bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1999 Dec ;140(12) :5780-5788.
- [3] Nakamura K , Kurokawa T , Aoyama I , et al. Stimulation of bone formation by intraosseous injection of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats. *Int Orthop*. 1998 22(1) :49-54.
- [4] Elbese EN , Thomsen JS , Mosekilde L. Nondestructive determination of iliac crest cancellous bone strength by pQCT. *Bone*. 1997 Dec 21(6) :535-540.
- [5] Bassett CA , Valdes MG , Hernandez E. Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*. 1982 64(6) :888-895.
- [6] Hughes DE , Wright KR , Mundy GR , et al. TGF induces osteoclast apoptosis in vitro. *J Bone Miner Res* ,1994 9(suppl 1) :s138.
- [7] Jimi E , Shuto T , Ikebe T , et al. Basic fibroblast growth factor inhibits osteoclast-like cell formation[J]. *J Cell Phys* ,1996 ,168(2) :395-402.
- [8] Rodan SB , Wesolowski G , Thomas KA , et al. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connect Tissue Res*. 1989 20(1-4) :283-288.
- [9] Wang Q , Zhong S , Ouyang J , et al. Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. *Clin Orthop*. 1988Mar (348) :259-268.

(收稿日期 :2006-08-29)