

不同频率振动应变对成骨细胞增殖及分化能力的影响

查丁胜 陈建庭 邓轩庚 孙学刚 佟丽 王建钧 翁科捷 金大地

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)05-0303-05

摘要:目的 观察不同频率振动应变(vibration strain)对体外培养成骨细胞细胞周期、增殖能力及分化的影响,确定最佳振动频率。方法 应用自制复合振动仪,将振动强度 0.5 g (g 为加速度),不同频段 $3\sim 10$ 、 $15\sim 30$ 、 $25\sim 45$ 、 $50\sim 80$ 和 $80\sim 100\text{ Hz}$ 振动应变分别作用于成骨细胞,振动应变加载后分别检测细胞周期、细胞增殖能力(MTT法)及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性的变化。结果 $15\sim 30$ 和 $25\sim 45\text{ Hz}$ 频段诱导成骨细胞周期循环($P<0.01$),促进细胞增殖($P<0.01$),增强ALP活性($P<0.01$); $80\sim 100$ 和 $3\sim 10\text{ Hz}$ 频段抑制细胞周期循环($P<0.01$); $80\sim 100\text{ Hz}$ 频段抑制细胞增殖($P<0.01$); $50\sim 80$ 和 $80\sim 100\text{ Hz}$ 频段抑制ALP活性($P<0.01$)。结论 不同频率振动应变对成骨细胞周期、增殖能力、ALP活性均有影响,振动应变促进成骨细胞增殖及分化的最佳频率为 $15\sim 45\text{ Hz}$ 。
关键词: 振动应变; 不同频率; 成骨细胞; 细胞周期; 增殖; 碱性磷酸酶

Effects of different frequency of vibration strain on proliferation and differentiation potency in osteoblast *in vitro* ZHA Dingsheng, CHEN Jianting, DENG Xuangeng, et al. Department of Orthopaedic Surgery and Spine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different frequency of vibration strain on cell cycle, proliferation and alkaline phosphatase(ALP) activity in cranium osteoblast of 1 day old SD rat *in vitro*. **Methods** Osteoblasts were subjected to vibration strain of magnitude(0.5 g -the earth acceleration) and different frequency ($3\sim 10\text{ Hz}$, $15\sim 30\text{ Hz}$, $25\sim 45\text{ Hz}$, $50\sim 80\text{ Hz}$, $80\sim 100\text{ Hz}$) by using vibration strain loading system respectively. The cell cycle of the cell was detected by the Flow Cytometry, MTT colorimetric method was used to assess the proliferation, ALP activity was detected by ALP assay kit. **Results** Quickened circulation of cell cycle, increased cell proliferation and enhanced ALP activity were observed when the cells were exposed to vibration strain at $15\sim 30\text{ Hz}$, $25\sim 45\text{ Hz}$ frequency($P<0.01$). In contrast, exposure of osteoblasts to vibration strain(at $80\sim 100\text{ Hz}$ and $3\sim 10\text{ Hz}$) resulted in down-regulated circulation of cell cycle($P<0.01$) and cell proliferation was inhibited at $80\sim 100\text{ Hz}$ frequency($P<0.01$), lower ALP activity was detected at $50\sim 80\text{ Hz}$ and $80\sim 100\text{ Hz}$ frequency($P<0.01$). **Conclusion** Different frequency of vibration strain can affect the circulation of cell cycle, the cell proliferation and ALP activity, and the optimum frequency of promoting the proliferation and differentiation in osteoblast is $15\sim 45\text{ Hz}$.

Key words: Vibration strain; Different frequency; Osteoblast; Cell cycle; Proliferation; Alkaline phosphatase

骨质疏松症及骨质疏松性骨折是危害中老年人健康的常见病,尤以绝经后妇女为甚。近年来对物理疗法(力学、电磁学)防治骨质疏松症的基础及临床研究是骨质疏松症防治研究的热门^[1-9]。机械振

动是力学刺激形式之一。相关研究表明,振动因具有良好的促进骨形成效应,在治疗骨质疏松症及预防老年性骨丢失中有广阔的应用前景^[10-13]。振动应力有利于骨的成熟与改进,但振动强度及振动频率影响振动成骨效果,目前国内外对振动频率的研究因实验方法及实验模型不同,得出的结论有很大区别^[14-20],总的频率范围集中在 $1\sim 100\text{ Hz}$ 。我们用自行研制的复合振动仪观察在其他振动参数相同,频率 $3\sim 100\text{ Hz}$ 范围内,不同频段的振动应变对体外

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(06024394)

作者单位:510515 广州,南方医科大学附属南方医院脊柱骨病科(查丁胜、陈建庭、邓轩庚、王建钧、翁科捷、金大地),南方医科大学中医药学院(孙学刚、佟丽)

通讯作者:陈建庭,Email:chenjt99@sina.com

大鼠成骨细胞细胞周期、增殖能力及分化的影响,确定振动应变促进成骨细胞增殖及分化的最佳频率范围,为进一步研究振动防治骨质疏松症提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 复合振动仪的设制:振动仪自行设计制造,由控制箱及振动机两部分组成,噪音低、控制精准度高,操作方便。主要技术参数:最大负荷:100 kg,频率范围:3 ~ 100 Hz,扫频范围:3 ~ 100 Hz,振幅MMp-p 0 ~ 5 mm,加速度范围 0 ~ 3 g,振动方向:垂直,振动波形:正弦波,电源电压(V) $220 \pm 20\%$ 。

1.1.2 主要试剂与仪器:主要试剂:DMEM培养液(GIBICO BRL, USA),胎牛血清(GIBICO BRL, USA),MTT(Sigma BRL, USA),胰酶(Sigma BRL, USA),II型胶原酶(Sigma BRL, USA),双抗(广州威佳生物技术公司),碘化丙啶(Sigma BRL, USA),氟化钠(NaF)(上海生工生化试剂公司),DMSO(Sigma BRL, USA),TritonX-100(Sigma BRL, USA),碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物研究所)。主要仪器:自动恒温CO₂培养箱(美国Harris),超净工作台(苏州净化设备厂),倒置相差显微镜(德国Leica公司),流式细胞仪(美国),酶标仪(美国Sigma公司),高速冷冻离心机(日本Hitachi公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与振动应变加载:取状态良好同步化生长的第6代成骨细胞,随机分为A、B、C、D、E、F和G 7组。A、B组为非加力组,其中A组为空白对照组,细胞给予DMEM(含10% FBS)培养液培养,B组为NaF(成骨细胞促增殖剂)阳性对照组,细胞给予DMEM(含10% FBS, 1×10^{-5} mol/L NaF)培养液培养,C、D、E、F和G组为加力组,细胞给予DMEM(含10% FBS)培养液培养的同时,分别施加3 ~ 10、15 ~ 30、25 ~ 45、50 ~ 80及80 ~ 100 Hz频段的振动应变,各加力组其他振动参数一致(振动强度 0.5 g,振动形式:正弦振动,振幅MMp-p 0 ~ 5 mm,振动时间:每次振动40 min,每天振动2次)。

1.2.2 成骨细胞培养及鉴定:参照Wang^[21]新生大鼠颅盖骨酶消化法培养并鉴定所培养的细胞为成骨细胞。

1.3 观察内容和检测指标

1.3.1 成骨细胞周期测定:将第6代成骨细胞以 3×10^3 个/ml密度接种于6孔培养板,每孔2 ml,每

组分别重复5孔,细胞培养24 h后更换相应培养液。A、B组置于振动仪加载台上(时间与加力组相同),不予振动,C、D、E、F和G组置于振动仪加载台上并施加不同频段的振动应变(其他振动参数相同)。各组细胞每隔2 d更换1次培养液,继续培养6 d。力学刺激完成后,弃去原培养液,消化、离心收集细胞,悬于0.1 ml PBS中迅速注入1 ml 70%冷乙醇后,置于4℃冰箱中保存至少24 h。测定时,将细胞离心(1500 r/min, 10 min)收集,用PBS清洗2次后经500目尼龙网过滤,调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml。取0.2 ml加入RNAase 0.2 ml(5 mg/50 ml) 37℃消化30 min后,取出放入冰浴中,加入0.4 ml PI(5 mg/100 ml)对DNA进行染色30 min,振荡器振匀,避光。立即送流式细胞仪行细胞周期测定,在波长488 nm、30 nW氩离子激发光条件下,每份样品检测 1×10^4 个细胞。采用流式细胞仪检测细胞DNA含量,通过其专用细胞周期分析软件,计算出各样本中G₁期、S期、G₂/M期细胞百分比,细胞群体的增值活性和DNA合成速度用增值指数(proliferation index, PI)表示, $PI = (S + G_2/M) / (G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$ 。

1.3.2 成骨细胞增殖能力测定:将第6代成骨细胞以 1×10^3 个/ml密度接种于96孔培养板,每孔200 μ l,每组分别重复6孔,并设3个不含细胞的完全培养基做空白对照,细胞培养24 h后更换相应培养液。A、B组置于振动仪加载台上(时间与加力组相同),不予振动,C、D、E、F和G组置于振动仪加载台上并施加不同频段的振动应变(其他振动参数相同)。各组细胞每隔2 d更换1次培养液,继续培养3 d。力学刺激完成后,弃去原培养液,每孔加入无血清DMEM培养液200 μ l及MTT 15 μ l,在37℃、CO₂分压为5%条件下继续孵育4 h,弃去培养液,加入DMSO 150 μ l室温下静置10 min,再振荡5 min,于酶标仪492 nm波长下测定个孔的吸光度(A)值。

1.3.3 碱性磷酸酶(ALP)活性的检测:将第6代成骨细胞以 2×10^3 个/ml密度接种于12孔培养板,每孔1 ml,每组各2块板(一块板培养3 d,另一块板培养5 d),每块板分别重复8孔,细胞培养24 h后更换相应培养液。A、B组置于振动仪加载台上(时间与加力组相同),不予振动,C、D、E、F和G组置于振动仪加载台上并施加不同频段的振动应变(其他振动参数相同)。各组细胞每隔2 d更换1次培养液,分别继续培养3和5 d。力学刺激完成后,吸除孔内培养液PBS洗涤2次,每孔加入0.1% Triton-100 1 ml,4℃过夜。根据ALP检测试剂盒说明,每块板每孔

取 5 μ l 细胞裂解液注入 96 孔培养板 ,加入基质液及缓冲液各 50 μ l ,充分混匀后 37℃ 孵育 15 min ,加入 150 μ l 显色剂混匀 ,于酶标仪 520 nm 波长下测定各孔的吸光度值(A 值) ,同时设标准及空白对照 ,每孔细胞测 4 次取平均值。按公式 碱性磷酸酶(金氏单位/100 ml)=(样品管吸光度 $\times$ 标准管酚的含量(0.005 mg) $\times$ 100 ml)/(标准管吸光度 $\times$ 0.05 ml)计算 ALP 活性。

1.4 统计学处理

结果用 SPSS 11.5 统计软件 ,数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA) ,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 不同频率振动应变对成骨细胞周期的影响

经统计学分析 ,加力组细胞受不同频率振动应变加载 6 d 后 ,各组细胞周期时相与对照组相比 ,均有不同程度变化。G₁ 期细胞 ,与 A 组(空白组)相比 ,B、D、E 组显著减少($P < 0.01$) ,C、G 组比 A 组增

多($P < 0.01$) ;与 B 组(阳性对照组)相比 ,D 组显著减少($P < 0.01$) 。S 期细胞 ,B、D、E 组比 A 组增加 ,但只有 D 组差异有统计学意义($P < 0.05$) ,C、G 组较 A 组略较少 ,差异无统计学意义。G₂ + M 期细胞 ,B、D、E 组比 A 组显著增加($P < 0.01$) ,D 组比 B 组显著增加($P < 0.01$) 。PI ,B、D、E 组比 A 组显著增加($P < 0.01$) ,D 组比 B 组显著增加($P < 0.05$) 。实验结果分析表明 ,振动对成骨细胞周期不同时相具有调节作用。与空白组相比较 :成骨细胞促增殖剂 NaF 及 15 ~ 30、25 ~ 45 Hz 频段的振动应变降低了 G₁ 期细胞数目(分别降低 8.07%、14.10%、6.84%) ,提高了 S 期细胞数目(分别提高 31.49%、51.16%、10.67%) 及 PI(分别提高 24.00%、42.07%、19.66%) 80 ~ 100、3 ~ 10 Hz 频段的振动应变提高 G₁ 期细胞数目(分别提高 2.41%、3.40%) ,减少 S 期细胞数目(分别减少 16.97%、25.32%) 及 PI(分别减少 5.64%、9.48%) 50 ~ 80 Hz 频段的振动应变对成骨细胞周期各时相无显著影响(表 1)。

表 1 不同组别不同频率振动应变对成骨细胞周期的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	G ₁ (%)	S(%)	G ₂ + M(%)	PI(%)
A 组	74.99 $\pm$ 0.50	7.78 $\pm$ 3.28	16.68 $\pm$ 1.01	24.46 $\pm$ 2.73
B 组	68.94 $\pm$ 0.47*	10.23 $\pm$ 2.16	20.10 $\pm$ 0.48*	30.33 $\pm$ 2.09*
C 组	77.54 $\pm$ 0.35*	5.81 $\pm$ 0.58	16.33 $\pm$ 0.45	22.14 $\pm$ 0.95
D 组	64.42 $\pm$ 1.95*▲	11.76 $\pm$ 2.02**	22.99 $\pm$ 0.61*▲	34.75 $\pm$ 2.50*▲▲
E 组	69.86 $\pm$ 0.70*	8.61 $\pm$ 2.12	20.66 $\pm$ 0.24*	29.27 $\pm$ 2.26*
F 组	75.79 $\pm$ 0.49	7.86 $\pm$ 3.07	15.99 $\pm$ 0.50	23.85 $\pm$ 3.13
G 组	76.80 $\pm$ 0.44*	6.46 $\pm$ 3.23	16.61 $\pm$ 0.55	23.08 $\pm$ 3.28

注 :与 A 组比较 ,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与 B 组比较 ,▲ $P < 0.01$,▲▲ $P < 0.05$

表 2 不同组别不同频率振动应变对成骨细胞增殖率的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	增殖能力(A 值)
A 组	0.331 $\pm$ 0.046
B 组	0.530 $\pm$ 0.029*
C 组	0.289 $\pm$ 0.025
D 组	0.595 $\pm$ 0.078*
E 组	0.684 $\pm$ 0.167*▲
F 组	0.258 $\pm$ 0.094
G 组	0.214 $\pm$ 0.026*

注 :与 A 组比较 ,* $P < 0.01$;与 B 组比较 ,▲ $P < 0.05$

2.2 不同频率振动应变对成骨细胞增殖能力的影响

经统计学分析 ,振动应变加载 3 d 后 ,各力学刺激组细胞增殖能力与对照组相比 ,均有变化。与 A 组(空白组)相比 ,B、D、E 组细胞增殖率显著增加($P < 0.01$) ,C 组细胞增殖率降低($P < 0.01$) ,C、F 组降低但差异无统计学意义($P > 0.05$) ;与 B 组(NaF 阳性对照组)相比 ,E 组细胞增殖率增加($P < 0.05$) ,D 组增加但差异无统计学意义(表 2)。

2.3 不同频率振动应变对成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性的影响

经统计学分析 ,加力组细胞受振动应变分别加载 3、5 d 后 ,各组细胞 ALP 活性与对照组相比 ,均有变化。①加载 3 d ,与 A 组(空白组)相比 ,B、D、E 组细胞 ALP 活性显著增加($P < 0.01$) ,C 组略升高($P < 0.05$) ,F、G 组 ALP 活性无明显改变 ;与 B 组

(NaF 阳性对照组)相比 ,D、E 组细胞 ALP 活性明显增加($P < 0.01$);②加载 5 d ,与 A 组(空白对照组)相比 ,B、D、E 组细胞 ALP 活性显著增加($P < 0.01$), C 组无明显改变 ,F、G 组 ALP 活性降低($P < 0.01$);与 B 组(NaF 阳性对照组)相比 ,D、E 组细胞 ALP 活性增加($P < 0.01$)(表 3)。

表 3 不同组别不同频率振动应变对成骨细胞 ALP 活性的影响(金氏单位/100 ml , $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALP 活性(加载 3 d)	ALP 活性(加载 5 d)
A 组	3.116 ± 0.113	5.051 ± 0.085
B 组	5.266 ± 0.217*	7.176 ± 0.343*
C 组	3.299 ± 0.125**	5.299 ± 0.125
D 组	7.502 ± 0.136*▲	8.502 ± 0.136*▲
E 组	8.214 ± 0.103*▲	8.727 ± 0.186*▲
F 组	3.194 ± 0.086	4.194 ± 0.086*
G 组	3.083 ± 0.093	4.208 ± 0.300*

注 :与 A 组比较 ,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与 B 组比较 ,▲ $P < 0.01$

3 讨论

成骨细胞是骨发生和骨形成的物质基础 ,在骨组织的更新活动中是最重要的功能细胞。成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收两者间保持动态平衡是骨活动保持正常状态的基础 ,而破骨细胞的活动亦受到成骨细胞的调控^[22]。因此 ,在研究振动对骨的效应中 ,成骨细胞是理想的首选细胞。

振动可调节骨生长与重塑^[7] ,其效果受振动内在各种因素的影响 ,振动频率是振动内在重要因素之一 ,探讨骨重建的最佳频率成为必要。Xie 等^[14]研究发现 ,强度 0.3 g、频率 45 Hz 的振动使大鼠胫骨干骺端及骨骺骨小梁内破骨细胞的活性较年龄对照组分别低 33%、31% ,胫骨干骺端表层皮质骨的骨形成率较年龄对照组高约 30%。Tanaka 等^[15]研究认为 ,低振幅、宽频振动(0 ~ 50 Hz)能刺激 MC3T3-E1 细胞间质金属蛋白酶-9(MMP-9)基因表达上调 1.3 倍 ,与高振幅、低频(3 Hz)正弦应变复合作用时能够增强 MC3T3-E1 细胞骨钙素(OC)mRNA 表达上调 2.6 倍。Nagatomi 等^[16]在探讨力学载荷参数与成骨细胞功能相关性的实验中发现 :1.0 Hz 的压力载荷 ,加载 5 d ,每天加载 1 h 抑制成骨细胞增殖 ,但 0.25 Hz、每天加载 20 min 促进成骨细胞增殖 ;更重要的是 ,压力载荷(1.0 Hz、每天加载 1 h、加载 5 d)对成骨细胞各种基因的表达具有不同的影响 :加强

ALP mRNA 的转录和翻译 ,但对骨桥蛋白(osteopontin)基因的表达无影响。他们认为成骨细胞增殖能力与施加周期性压力的时间及频率有关。Rubin 等^[17]研究认为 0.3 g、30 Hz 的振动刺激 ,可使绵羊股骨近端松质骨密度较对照组增加约 34.2% ,骨小梁体积增加 32% ,骨小梁网眼数量增加 45% ,骨小梁网眼空隙减少 36%。Gilsanz 等^[18]通过人体实验证实 ,0.3 g、30 Hz 的振动治疗使患者腰椎松质骨及股骨中段皮质骨分别增加 2.1%($P = 0.025$)、3.4%($P < 0.001$) ,而对照组分别增加 0.1%($P = 0.74$)、1.1%($P = 0.14$) ,振动组较对照组分别增加 2.0%($P = 0.06$)、2.3%($P = 0.04$)。Verschuereen 等^[19]实验发现 ,振动训练(2.28 ~ 5.09 g ,35 ~ 40 Hz)组较阻力训练组及对照组分别提高等长状态及动态膝关节伸肌强度 15%、16%($P < 0.01$) ,提高髌关节密度 0.93%($P < 0.05$) ,而其他 2 组髌关节密度无明显改变。Rubin 等^[20]回顾动物实验结果发现 ,低强度($< 10 \mu\text{e}$) ,高频(10 ~ 100 Hz)的力学刺激能够使骨形成率加倍 ,抑制废用性骨质疏松 ,刺激骨生长。大量的研究表明 ,低强度 ,一定频率的振动载荷可促进骨形成 ,减少骨量丢失 ,增强骨密度 ,虽然报道中频率相差较大 ,但均在低频范围($< 100 \text{ Hz}$)。

本研究采用自行研制的复合振动仪 ,其主要特点为垂直正弦振动 ,振动台能周期性左右、前后摆动(复合振动) ,频率范围(3 ~ 100 Hz) ,可行扫频(3 ~ 100 Hz)振动 ,振动强度以加速度 g 表示(0 ~ 3 g) ,该振动仪能够准确控制振动参数。实验中使用扫频垂直振动 + 摆动 ,多次振动(每日 2 次) ,使施加的振动载荷为动态的应变而不是静态的应力 ,有利于加强细胞对力学刺激的敏感性^[23] ,重点观察在低振动强度下低频范围内不同频段振动对体外培养成骨细胞增殖和分化的影响。实验结果证明细胞力学加载模型是成功的。统计结果分析表明 :①15 ~ 30、25 ~ 45 Hz 频段的振动应变有利于使处于静息期的细胞进入分裂期 ,80 ~ 100 Hz 及 3 ~ 10 Hz 频段的振动应变抑制细胞分裂增殖 ,而 50 ~ 80 Hz 频段的振动应变对细胞增殖无显著影响。②15 ~ 30、25 ~ 45 Hz 频段的振动应变促进成骨细胞增殖能力 ,80 ~ 100 Hz 频段的振动应变抑制成骨细胞增殖能力 ,50 ~ 80、3 ~ 10 Hz 频段的振动应变对成骨细胞增殖能力无明显影响。③15 ~ 30、25 ~ 45 Hz 频段的振动应变提高成骨细胞 ALP 活性 ,且其升高的程度与力学刺激加载时间成正比。80 ~ 100、50 ~ 80 Hz 频段的振动应变在加载第 3 天时对 ALP 活性影响不大 ,继续加载 2 d

后明显降低成骨细胞的 ALP 活性。④3 ~ 10 Hz 频段的振动应变在加载第 3 天时,轻度升高 ALP 活性,继续加载 2 d 后与对照组比,无明显改变。根据实验结果,总体认为在低振动强度(0.5 g)作用下,低频范围内,促进成骨细胞增殖、分化的有效频率范围为 15 ~ 45 Hz。

0.3 g、15 ~ 45 Hz 振动应变诱导成骨细胞细胞周期循环,上调 S 期和 G₂/M 期细胞的比率,促进成骨细胞增殖,使成骨细胞数目增加和细胞特性改变;同时,能显著增加成骨细胞内与合成代谢有关的细胞器含量及增强 ALP 活性,加强骨细胞代谢、改善微环境。Pavlin 等^[24]通过实验证实(1)机械载荷首先使成骨细胞发生分化,进而诱导骨基质的沉积;(2)ALP 是机械载荷诱导成骨细胞分化的早期标志。成骨细胞所分泌的骨型 ALP 是一种细胞外酶,分子量约 12 kD,在分化早期碱性磷酸酶的表达是成骨细胞分化的主要特征之一,能反应成骨细胞的功能。它在骨的矿化中起重要作用,ALP 通过水解有机磷酸酯,使局部无机磷浓度升高,促进磷酸钙沉淀,同时水解破坏焦磷酸、ATP 等生理性晶体生长抑制剂而启动和延续钙化。Genge 等^[25]通过体外实验证实,没有 ALP 的存在,骨组织钙化就不会发生。组织化学研究表明,骨组织中发生钙化的部位有 ALP 活性,ALP 的出现先于钙化的发生,而钙化发生后,ALP 迅速消失,说明 ALP 与钙化过程有关。成骨细胞总数增加、合成代谢加强及局部 ALP 活性加强可引起骨细胞及骨组织生物活性改变,这些积极因素在防治骨质疏松症中具有一定意义。

在体和离体实验表明,低频振动具有良好的成骨效应。同时,低频振动具有无创、副反应小的特点,在骨质疏松症防治方面具有广阔的临床应用价值。Rubin 等^[26]研究发现,低强度(< 1 g)的振动载荷在频率低于 20 Hz 时,振动强度能够完全传递到直立于振动平台志愿者的髌关节,当频率高于 25 Hz 时,传递到髌关节和脊柱的振动强度降低到 80%。在人体姿势松弛的情况下,振动强度的传递率降低到 60%,在膝关节屈曲 20°时,传递率进一步降低到 30%。明确有利于促进骨形成,提高骨密度的最佳振动频率、振动强度及研制具有临床应用价值的振动仪是今后振动防治骨质疏松症研究的热点。进一步从细胞分子生物学角度研究振动参数与成骨细胞功能相关的蛋白及基因的相关性将是必要的。

实验表明:不同频率振动应变中 15 ~ 45 Hz 频段诱导成骨细胞周期循环,促进细胞增殖,增强 ALP

活性有明显的作用,频率太高 80 ~ 100 Hz、频率太低 3 ~ 10 Hz 抑制细胞周期循环,频率太高 80 ~ 100 Hz 频段抑制细胞增殖,频段在 50 ~ 100 Hz 抑制 ALP 活性。不同频率振动应变对成骨细胞周期、增殖能力、ALP 活性均有影响,振动应变促进成骨细胞增殖及分化的最佳频率为 15 ~ 45 Hz。

【参 考 文 献】

- [1] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse burst electromagnetic fields stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 2004 25:457-465.
- [2] Diniz P, Shomura K, Soejima K, et al. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* 2002 23:398-405.
- [3] Wan Yumin, Ma Yongjie, Wang Honghui, et al. Effects of low-frequency magnetic field on bone metabolism in hindlimb of unloaded rat. *Chin J Osteoporos* 2006, 12(4):350-353 (in Chinese).
- [4] Xie Zhao, Li Qihong, Xu Jianzhong, et al. Impact of bionics pulsed electromagnetic fields in relation to BMD and biomechanics of ovariectomy osteoporosis rats. *Chin J Osteoporos* 2006, 12(6):582-585 (in Chinese).
- [5] Tang Xiaoyun, Chen Jianting, Liu Wenjun, et al. Effect of pulse electromagnetic field on bone metabolism in ovariectomized rats. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation* 2004 (8)12:2316-2317 (in Chinese).
- [6] Flieger J, Karachalios T, Khaldi L. Mechanical stimulation in the form vibration prevents postmenopausal bone in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1998 63(6):510-514.
- [7] Rubin C, Turner AS, Bain S, et al. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 2001 412:603-604.
- [8] Robling AG, Hinant FM, Burr DB, et al. Shorter, more frequent mechanical loading sessions enhance bone mass. *Med Sci Sports Exerc* 2002 34(2):196-202.
- [9] Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, et al. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech* 2000 33(8):1087-1096.
- [10] Rubin S, Judex YXQ. Inhibition of osteopenia by low magnitude high frequency mechanical stimuli. *Drug Discovery Today* 2001, 6(16):848-858.
- [11] Judex S, Boyd S, Rubin C, et al. Adaptations of trabecular bone to low magnitude vibrations result in more uniform stress and strain under load. *Annals of Biomedical Engineering* 2003 31(1):12-20.
- [12] NSBRI Bone Loss Team Strategic Plan.[2003] [http://www.nsbri.org/Research/Strategic Plans/Bone Loss](http://www.nsbri.org/Research/Strategic%20Plans/Bone%20Loss).
- [13] Rubin C, Recker R, Cullen D, et al. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *Bone Miner Res* 2004, 19(3):343-351.

(上接第 307 页)

- [14] Xie L , Jacobson JM , Choi ES , et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone* 2006 39(5) : 1059-1066.
- [15] Tanaka SM , Li J , Duncan RL , Yokota H , et al. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* 2003 36(1) : 73-80.
- [16] Nagatomi J , Arulanandam BP , Metzger DW , et al. Frequency- and duration-dependent effects of cyclic pressure on select bone cell functions. *Tissue Eng* , 2001 , 7(6) : 717-728.
- [17] Rubin C , Turner AS , Bain S , et al. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 2001 412(6847) : 603-604.
- [18] Gilsanz V , Wren TA , Sanchez M , et al. Low-level , high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 2006 21(9) : 1464-1474.
- [19] Verschueren SM , Roelants M , Delecluse C , et al. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density , muscle strength , and postural control in postmenopausal women : a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res* , 2004 , 19(3) : 352-359.
- [20] Rubin CT , Sommerfeldt DW , Judex S , et al. Inhibition of osteopenia by low magnitude , high-frequency mechanical stimuli. *Drug Discov Today* , 2001 , 6(16) : 848-858.
- [21] Wang Hongfu. An atlas of bone cell and cell culture techniques. Shanghai : Shanghai Science And Technology Press , 2001 : 54-54(in Chinese).
- [22] Fu Shuping , Cai Yu , Zhang Ronghua. Adjustment of osteoblast on osteoclastic bone resorption. *Shaanxi Medical Journal* 2004 (33) : 11 : 1040-1041(in Chinese).
- [23] Robling AG , Hinant FM , Burr DB , et al. Shorter , more frequent mechanical loading sessions enhance bone mass. *Med Sci Sports Exerc* , 2002 34(2) : 196-202.
- [24] Pavlin D , Dove sb , Zadroz R , et al. Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model : effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* , 2000 67(2) : 163-172.
- [25] Genge BR , Sauer GR , Wu LN , et al. Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle mediated mineralization. *J Biol Chem* , 1988 263(34) : 18513-18519.
- [26] Rubin C , Pope M , Fritton JC , et al. Transmissibility of 15-Hertz to 35-Hertz vibrations to the human hip and lumbar spine : determining the physiologic feasibility of delivering low-level anabolic mechanical stimuli to skeletal regions at greatest risk of fracture because of osteoporosis. *Spine* 2003 , 28(23) : 2621-2627.

(收稿日期 : 2007-11-27)