

体外冲击波对骨质疏松兔股骨髁部松质骨影响的实验研究

张堃 刘建 孟国林 袁志 郭炜 梁国穗 秦岭 张钦 张志敏 李毅

中图分类号: R965 R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)06-0381-04

摘要:目的 观察体外冲击波对骨质疏松兔股骨髁部松质骨的成骨作用。方法 采用卵巢切除法(OVX)对 30 只 5 月龄雌性新西兰兔去势,5 个月建立骨质疏松模型。所有动物随机分为 3 组,每组 10 只,其中一组为空白对照组(A 组),其余两组(B 组和 C 组)动物右侧股骨髁部进行体外冲击波(ESW)处理,冲击波能流密度 0.47 mJ/mm^2 ,脉冲 2000 次。于处理前、处理后 4、8 w 时分 3 批处死动物,分离右侧股骨远端,进行 micro-CT 测量分析。结果 micro-CT 三维重建分析表明,冲击波处理后 4 w(B 组)及 8 w(C 组)时实验组的 BMD、BMC 和骨小梁立体测量学的指标与对照组的差别有统计学意义,其中 C 组的 BMD 分别比 A 组和 B 组增高 79.9% 和 14.0%,尽管 C 组在 BMD、BMC 和骨小梁立体测量学等指标方面均较 B 组优,但两组测量结果的差别无统计学意义。结论 体外冲击波可以促进骨质疏松被处理局部骨小梁的改建,改善骨小梁的三维结构,增加骨质密度。

关键词: 骨质疏松; 体外冲击波; 显微 CT

Effect of extracorporeal shock wave on femoral condyle trabecular bone in an osteoporosis rabbit model

ZHANG Kun, LIU Jian, MENG Guolin, et al. The Orthopaedics Institute of PLA & Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: **Objective** To investigate the treatment effects of extracorporeal shock wave(ESW) on femoral condyle in an osteoporosis rabbit *in vivo*. **Methods** Thirty New Zealand white rabbits were ovariectomized for 5 months to establish osteoporosis animal model. All animals were randomized into 3 groups: group A (sham), group B (4 weeks of treatment) and C (8 weeks of treatment). In group B and C, high-energy shock wave (energy flux density: 0.47 mJ/mm^2 , 2000 impuls) was applied to the right femoral condyles. All animals were sacrificed 4 (group B) or 8 (group C) weeks after ESW treatment and underwent micro-CT scan. **Results** Micro-CT analysis showed that bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and micro-architectural parameters in group B and C were significantly higher than those in group A. The BMD in group C was 79.9% and 14.0% higher than that in group A and group B respectively. Although BMD, BMC and micro-architectural parameters in group C were higher than those in group B, no significant differences were detected between the two groups. **Conclusions** ESW can improve the reconstruction and remodeling of cancellous bone and increase the BMD and BMC in the osteoporosis rabbit model. It can be used as local treatment for osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; ESW; Micro-CT

骨质疏松骨折是目前严重威胁老年人生活的疾病之一。骨质疏松症是以骨量减少、骨组织微结构破坏、骨脆性增加而极易发生骨折为特征,一旦发生骨折,其临床治疗非常困难,是老年人致死和致残的

重要原因。因此,对骨质疏松的防治越来越受到重视。目前对于骨质疏松的防治主要采用药物治疗,但是,药物治疗周期长、副作用明显、见效慢,很难在短时间内迅速提高骨密度及骨强度。研究证明,体外冲击波疗法(Extracorporeal Shock Wave Treatment, ESWT)在骨折及骨不连等疾病的治疗中发挥着重要的作用,特别在骨形成过程中起着重要的作用^[1],而骨质疏松表现为骨吸收的增强和骨形成的减弱。因此,本研究拟采用体外冲击波处理骨质疏松局部骨

基金项目: 陕西省国际科技合作重点项目(2005KW-14)

作者单位: 710032 西安,第四军医大学西京医院全军骨科研究所(张堃、刘建、孟国林、袁志、张钦、张志敏、李毅);第四军医大学西京医院泌尿外科(郭炜);香港中文大学(梁国穗、秦岭)

通讯作者: 刘建, Email: ljreny@fmmu.edu.cn

组织,根据体外冲击波的成骨作用,观察其能否影响骨小梁改建过程,增加骨矿含量和改善骨质量。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备

5 月龄雌性新西兰系统种大白兔 30 只(第四军医大学实验动物中心提供),体重(2.5 ± 0.28) kg,双能 X 线骨密度仪(美国 Lunar 公司)测定其腰椎和股骨近端 BMD,采用卵巢切除的方法行去势处理,术后 5 月后,再次测定其腰椎和股骨近端的 BMD,测得所有动物 BMD 的均值低于去势前的均值减去 2.5 SD,确定为骨质疏松动物模型成功建立。

1.2 实验动物分组

将 30 只骨质疏松兔随机分为 3 组,即空白对照组(A 组)、ESWT 4 w 组(B 组)和 ESWT 8 w 组(C 组),每组 10 只,所有动物定量喂食(200 g/d),自由饮水,饲养温度 20~25℃,相对湿度为 40%~70%。

1.3 ESW 处理

实验组 20 只骨质疏松兔(按动物模型制备的卵巢切除后 5 个月骨质疏松兔)肌肉注射速眠新 II 号全身麻醉,采用国产 NE-VB 型电磁波源性体外碎石机对右侧股骨髁部进行 ESW 处理一次,ESW 能流密度设定为 0.47 mJ/mm²,脉冲 2000 次,焦点长度为 15 mm,焦点半径为 5 mm。

1.4 双能 X 线骨密度仪检测

分别于去势前 3 d 及去势 5 月后检测各兔腰椎和双侧股骨近端 BMD。以确定骨质疏松模型是否成功建立。

1.5 Micro-CT 检测

空白对照组兔于建模成功后、实验组分别于 ESWT 处理后 4、8 w 时采用耳缘静脉空气栓塞法处死,分离右侧股骨远端,分别将每组的 10 个标本放入 Micrio-CT(GE-LSP micro-CT,美国 GE 公司,第四军医大学全军骨科研究所提供)样品杯中,在相同条件(44mL tube-21 μm-150 mins,threshold :1044)下扫描并对每个标本行三维重建,测定 BMD 及 BMC,分析其骨小梁数量、厚度、连接密度、及骨骼体积比等骨小梁立体测量学指标。

1.6 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析和 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 大体观察

实验组动物在 ESWT 处理后局部出现不同程度的发红、肿胀,2~4 d 后消失,被处理肢体无活动障碍。所有动物进食基本正常,无动物死亡。

2.2 双能 X 线骨密度仪 BMD 检测结果(表 1)

表 1 去势前后免腰椎及股骨近端 BMD 骨密度仪测定结果(mg/cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	腰椎	股骨
去势前	274 ± 32	293 ± 38
去势后	185 ± 28	189 ± 41

表 1 结果显示,去势后免腰椎和股骨近端 BMD 明显下降,与去势前骨密度值的差别有统计学意义($P < 0.05$),并且去势后免腰椎和股骨近端的骨密度均值小于去势前骨密度的均值减去 2.5 SD。

2.3 Micro-CT 检测结果(表 2、3)

表 2 Micro-CT 检测股骨远端 BMD 及 BMC 结果($\bar{x} \pm s$)

组别	BMD(mg/cm ³)	BMC(mg)
A	154.53 ± 32.25	2.69 ± 0.31
B	243.81 ± 33.05	3.61 ± 0.13
C	277.37 ± 14.79	4.06 ± 0.27

表 2 统计结果显示,B 组和 C 组股骨远端的 BMD 和 BMC 均值明显高于 A 组(F 值分别为 25.71、39.2, P 值均 < 0.001)。B、C 两组 BMD 的差异无统计学意义($P = 0.082$),而它们 BMC 的差异有统计学意义($P = 0.014$)。

表 3 Micro-CT 检测股骨远端骨小梁立体测量学指标结果($\bar{x} \pm s$)

组别	相对体积比 (BV/TV) %	骨小梁数量 (Tb.N) mm ⁻¹	骨小梁间距 (Tb.Sp) mm	骨小梁厚度 (Tb.Th) mm	骨小梁连接密度 1/mm ³
A	23.9 ± 2.9	1.41 ± 0.21	0.70 ± 0.12	0.11 ± 0.02	5.22 ± 0.76
B	31.4 ± 1.3	2.02 ± 0.17	0.49 ± 0.06	0.14 ± 0.01	6.92 ± 0.32
C	36.2 ± 1.6	2.22 ± 0.26	0.45 ± 0.05	0.15 ± 0.01	12.98 ± 1.23

表 3 结果表明,A 组的各项检测指标与 B、C 两组的差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01),其中 B、C 两组 BV/TV 和骨小梁连接密度检测结果的差异有统计学意义(P 值分别为 0.003、 < 0.001)。虽然 C 组的 Tb.N、Tb.Sp 和 Tb.Th 检测结果高于 B 组,但其差异无统计学意义(P 值分别为 0.165、0.428、

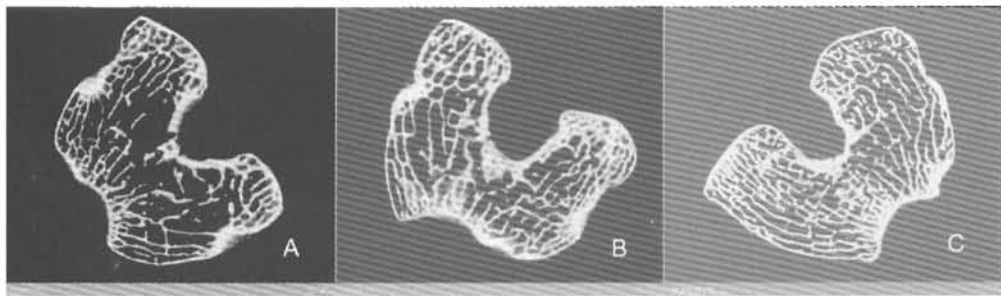


图 1 股骨远端体松质骨重建二维图像

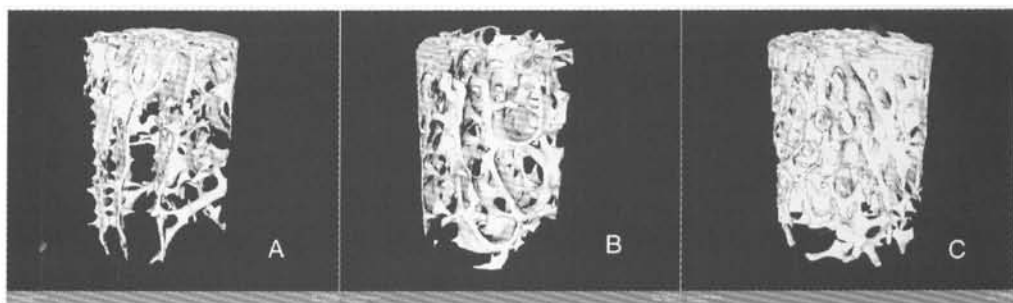


图 2 股骨远端体松质骨重建三维图像

0.105)。相同条件下进行重建的二维和三维图像也直观地显示了各组骨小梁形态和结构的差别。

图 1 从左至右分别为 A、B、C 组。B、C 组较 A 组骨小梁结构明显改善,表现为骨小梁数目增多,排列平行、方向一致,孔隙率减低。

图 2 从左至右分别为 A、B、C 组。B、C 组的三维构筑明显优于 A 组,可见骨小梁数量增加,排列致密,骨小梁的连接率增高而孔隙率明显降低,尤以 C 组明显。

3 讨论

3.1 兔骨质疏松动物模型建立的确立

对于骨质疏松的诊断,需要获得正常群体的骨密度值,但目前尚无正常新西兰兔骨密度正常值的文献报道,本实验参照《WHO 骨质疏松症诊断标准》,以同期正常对照组的骨密度值作为正常值对实验组进行诊断,若实验组的骨密度值低于正常值减去 2.5 倍标准差,即可诊断为骨质疏松。本实验结果显示,所选动物在去势 5 月后骨矿物质密度低于去势前骨密度的均值减去 2.5SD ($P < 0.05$),证明兔骨质疏松模型已经建立。

3.2 体外冲击波疗法的促成骨作用

3.2.1 机械力化学转导作用:应力刺激在骨的生长、吸收和重建中起着重要的调节作用。ESW 作为

一种物理信号,在不同介质之间传导时,会在界面之间、组织细胞表面产生拉应力、压应力和剪切应力。成骨细胞通过感受机械刺激,并将生物刺激转化为生化信号,进一步影响细胞基因表达^[2,5],活化骨髓基质干细胞,促进成骨细胞增殖,对骨再生起着重要的作用^[6,9]。

3.2.2 空化效应:冲击波在人体组织内传导时,因组织内含有小气泡,气体会在压强骤变的情况下以极快的速度膨胀,在小范围内产生较高的能量。该效应可起到松解黏连、改善局部血液循环,从而达到治疗效果^[10]。

3.2.3 痛觉神经感受器的封闭作用:冲击波对痛觉神经感受器的刺激,改变了感受器对疼痛的接受频率及其周围化学介质的组成,抑制神经末梢细胞,使后续向心冲动无法传递,因此可缓解局部疼痛^[11]。

3.3 Micro-CT 扫描在骨质疏松症检测中的应用

骨质疏松症的病理学改变包括质和量两方面,量变主要体现在 BMD 的下降,而质变主要表现在骨小梁的生长状况、骨矿化程度、骨质的堆积范围、微损伤等区域性组织形态学改变,如皮质骨和小梁骨容量下降,骨小梁断裂、稀疏。大量的动物实验和临床研究表明,单纯增加 BMC,并不相应的增加骨强度,有时反而降低^[12,13]。因而我们应用高分辨率的 Micro-CT 对股骨远端进行三维立体重建,通过软件

进行 BMD 和 BMC 的测定,分析测量骨小梁立体测量学指标,如骨小梁体积、骨小梁厚度、骨小梁空间距离及骨小梁连接密度等,以评估 ESW 对骨质疏松局部骨质的影响。结果表明,使用 micro-CT 在骨质疏松动物模型的检测中不仅可以全面、立体和连续的观察骨质量的变化,而且还可以对观测的骨组织同步进行 BMD 和 BMC 的测定,真正做到骨质疏松病理学检测的质与量结合。

本研究结果表明,应用 ESW 对骨质疏松局部骨组织进行冲击处理,在短期内可提高局部骨质的质量、增强骨质的强度,可作为预防骨质疏松骨折高发部位骨折发生的一种耗资少、安全有效、非侵袭的方法。Rompe 等^[3]在研究体外冲击波对骨科疾病的治疗作用时把冲击波的强度进行了分类:(0.08 ~ 0.28) mJ/mm² 为低能流密度,(0.28 ~ 0.60) mJ/mm² 为中能流密度,大于 0.60 mJ/mm² 为高能流密度。Wang 等^[14]应用 ESW 治疗兔股骨骨折研究发现,较高能量(0.47 mJ/mm²,4000 次)在增加 BMD、骨痂愈合时间、干灰和钙含量及骨最大载荷、最大应力、弹性模量等方面均优于低能量。本研究亦选用较高能量,而对于预防骨质疏松骨折局部 ESW 处理最佳的能流密度选择和合适的治疗时间尚需进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Dieter Gebauer, Edgar Mayr. Low-intensity pulsed ultrasound: Effects on nonunions. J Ultrasound in Medicine and Biology, 2005, 10 :1391-1402.
- [2] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger WC, et al. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. J Biomech, 2000, 33 :45-51.
- [3] Rompe JD, Kirkpatrick CJ, Kullmer K, et al. Dose-related effects of shock waves on rabbits tendon Achillis. J Bone Joint Surg, 1998,80 :

546-552.

- [4] Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats. J Bone, 2004, 34 :466-477.
- [5] Wang FS, Wang CJ. Physical Shock Wave Mediates Membrane Hyperpolarization and Ras Activation for Osteogenesis in Human Bone Marrow Stromal Cells. J Bioche And Biophy Res Com, 2001,287, (3) :648-655.
- [6] Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor VEGF- β and VEGF-C. J Cel Physiol, 1997, 173 (9) : 211-214.
- [7] Mayr WU, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelia growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. J Bone, 2002,30 :472-477.
- [8] Wang FS, Yang KD, Chen RF, et al. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta. J Bone Joint Surg Br, 2002, 84(3) :457-461.
- [9] Wang FS, Yang KD, Kuo YR, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. J Bone,2003, 32 (4) : 387-396.
- [10] Gregory J, Roehrig MD. The Role of Extracorporeal Shock Wave on Plantar Fasciitis. J Foot and Ankle Clinics of North America,2005, 10(4) :699-712.
- [11] Maier M, Averbek B, Milz, et al. Substance P and prostaglandin E₂ release after shock wave application to the rabbit femur. J Clinical Orthopaedics and Related Research, 2003, 406 :237-245.
- [12] Iegrand E, Chappard D, Pascaretti C, et al. Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. J Bone Miner Res,2000,15 :13-19.
- [13] Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue *in vivo*. J Bone Miner Res,2000,15 :60-67.
- [14] Wang CJ, Yang KD, Wang FS, et al. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. J Bone, 2004, 34 :225-230.

(收稿日期:2008-01-18)