

不同能流密度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 韩娟 刘建 孟国林 袁志 张钦 梁国穗 秦岭

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)12-0871-06

摘要:目的 观察不同能流密度体外冲击波对骨质疏松兔股骨髁部松质骨成骨作用的差异。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 个月后建立骨质疏松模型。将所有骨质疏松兔随机分为 3 组,每组 10 只,其中一组为空白对照组(A 组),一组为体外冲击波(ESW)能流密度 0.28 mJ/mm^2 处理组(B 组),另一组为体外冲击波能流密度 0.47 mJ/mm^2 处理组(C 组),脉冲次数均为 2000 次,在实验组兔右侧股骨髁部进行体外冲击波(ESW)处理。于处理后 4、8 周时分二批每组处死 5 只动物,分离右侧股骨远端,进行显微 CT(micro-CT)测量分析。结果 micro-CT 三维重建分析表明,不同能流密度冲击波处理后 4 周时 B 组和 C 组在骨组织体积比(BV/TV)、骨小梁数目(Tb.N)等指标之间的差异有统计学意义,8 周时 B 组和 C 组分别在骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)和 BV/TV、骨表面积体积比(BS/BV)、骨小梁连接密度(Connectivity Density)等指标之间的差别有统计学意义,其中 C 组的 BMD 和 BMC 分别较 B 组增高 16.8% 和 10.6%,尽管 C 组在其他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 不同能流密度体外冲击波对骨质疏松局部治疗后,不同时间,其成骨作用不同,较高能流密度的体外冲击波在治疗后 8 周时,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、增加骨密度作用较优。

关键词: 骨质疏松; 体外冲击波; 显微 CT; 兔

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.12.001

Study on effect of different energy flux density extracorporeal shock wave on femoral condyle trabecular bone in osteoporosis rabbit model ZHANG Kun, HAN Juan, LIU Jian, et al. The Chinese Traditional Medicine Institute of Gansu Province, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To investigate the difference of bone formation effects of different energy flux density extracorporeal shock wave on femoral condyle in 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 were used 0.28 mJ/mm^2 energy flux density extracorporeal shock wave and group C were used 0.47 mJ/mm^2 , shock wave pulses are 2000. The right femoral condyles of all the test animal were applied. All animals were sacrificed after ESW treatment 4 or 8 weeks, and underwent micro-CT scan.

Results Micro-CT analysis showed that bone volume/tissue volume (BV/TV) and trabecular number (Tb.N) have significant differences on 4 weeks after ESW treatment between the group B and C. On 8 weeks after ESW treatment, the group C, bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone volume/tissue volume (BV/TV), bone surface/tissue volume (BS/TV) and trabecular connectivity density were higher significantly than those in group B, the BMD and BMC in group C were 16.8% and 10.6% higher than those in group B respectively. Although the other micro-architectural parameters in group C were higher than those in group B on 8 weeks after ESW treatment, but no significant differences were detected between the two groups. **Conclusion** In

基金项目: 陕西省国际科技合作重点项目(2005KW-14)

作者单位: 730050 兰州, 甘肃省中医药研究院(张堃、韩娟); 第四军医大学西京医院全军骨科研究所(刘建、孟国林、袁志、张钦); 香港中文大学(梁国穗、秦岭)

通讯作者: 刘建, Email: ljreny@fmmu.edu.cn

different time , different energy flux density extracorporeal shock wave used on osteoporosis animal made different effect. It is showed that higher energy flux density extracorporeal shock improve the reconstruction , remodeling of cancellous bone and increase the BMD is better than others on 8 weeks .

Key words : Osteoporosis ; Extracorporeal shock wave ; Micro-CT ; Rabbit

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]。我们通过应用 ESW 对骨质疏松兔局部骨组织进行冲击处理的实验研究 ,发现冲击波可在短期内提高局部骨松质的质量、增强骨质的强度^[2]。但是对于不同能流密度体外冲击波局部治疗的效果是否具有差异 ,哪个能量流密度的冲击波对骨质疏松局部治疗具有更好的作用呢?目前无统一标准 ,尚在研究中。本实验中 ,笔者设计采用较低和较高两种能流密度体外冲击波对骨质疏松兔局部骨组织进行处理 ,观察其成骨作用的差异 ,初步探究改善骨质疏松局部骨质质量较优的体外冲击波能流密度范围。

1 材料与方法

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 ,手术 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) ,较低能流密度 ESW 处理组(B 组 ,能流密度为 0.28 mJ/mm^2 ,脉冲 2000 次) ,和较高能流密度 ESW 处理组(C 组 ,能流密度 0.47 mJ/mm^2 ,脉冲 2000 次) ,每组 10 只 ,所有动物定量喂食(200 g/d) ,自由饮水 ,饲养温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$,相对湿度为 $40\% \sim 70\%$ 。

1.3 ESW 处理

实验组 20 只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 1 次 ,ESW 能流密度设定 :B 组为 0.28 mJ/mm^2 ,C 组为 0.47 mJ/mm^2 ,脉冲次数均为 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 天及去势 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

空白组免于卵巢切除术后 5 月、实验组分别于 ESWT 处理后 4、8 周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($44\text{ mltnbe-}21\text{ }\mu\text{m-}150\text{ mins}$,threshold :1044)下对每个标本扫描并三维重建 ,测定 BMD 及 MBC ,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 $\pm$ 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 观察

实验组动物在 ESWT 处理后局部出现轻微的发红、肿胀 2~4 天后消失 ,被处理肢体无活动障碍。所有动物进食、水基本正常 ,无动物死亡。

2.2 双能 X 线骨密度仪 BMD 检测结果

结果显示 ,去势后兔腰椎和股骨近端 BMD 明显下降 ,与去势前骨密度值的差别有统计学意义($P < 0.05$) ,并且去势后兔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。

表 1 去势前后兔腰椎及股骨近端 BMD 骨密度仪测定结果(mg/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

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

2.3 Micro-CT 检测结果

2.3.1 BMD 和 BMC 测定结果 :统计结果显示 ,C 组股骨髁部 BMD 和 BMC 的测定均值无论是在处理后 4 周还是 8 周 ,都高于 B 组。其中在 8 周时 ,B、C 两组 BMD 和 BMC 之间的差异有统计学意义(P 值分别为 0.02、0.048)(图 1)。

2.3.2 BV/TV 和 BS/BV 测定结果 :BV/TV 和 BS/BV

测定后统计结果显示 ,C 组股骨髓部 BV/TV 的测定结果在处理 4 周和 8 周时均高于 B 组 ,其差值具有统计学意义(P 值分别为 0.019、0.013)。而 BS/

BV 的测定结果在处理 4 周和 8 周时均低于 B 组 ,其中在 8 周时 ,B、C 两组之间的差异有统计学意义(P 值为 0.042)(图 2)。

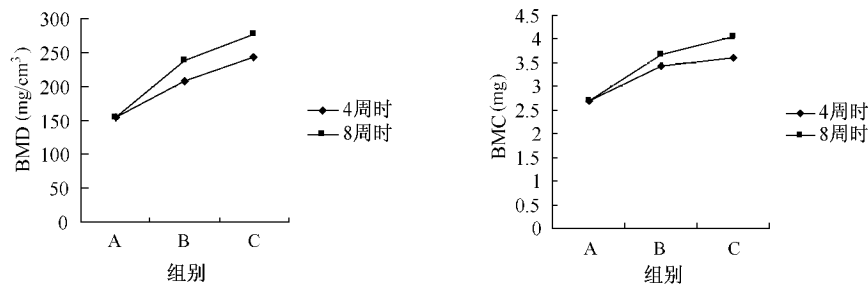


图 1 BMD 和 BMC 测定结果

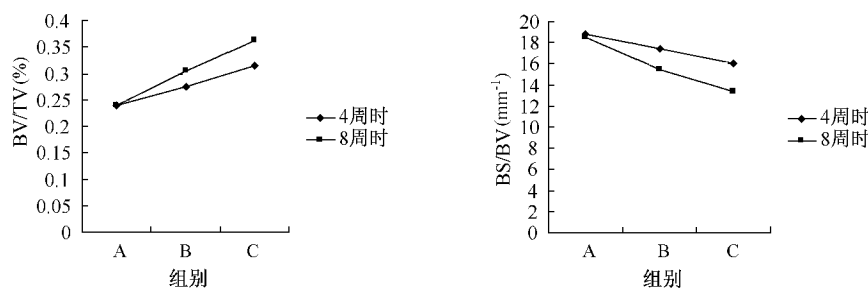


图 2 BV/TV 和 BS/BV 测定结果

2.3.3 Tb.N (mm⁻¹) 和 Tb.Sp (mm) 测定结果 :Tb.N 和 Tb.Sp 测定结果显示 ,C 组股骨髓部 Tb.N 和 Tb.Sp 的测定结果在处理 4 周和 8 周时均高于 B 组。统计发现 ,在体外冲击波处理后 4 周时 ,Tb.N 在 B、

C 两组之间的差异有统计学意义(P 值为 0.035) ,而在 8 周时无统计学意义 ,Tb.Sp 在 4 周和 8 周时 B、C 两组间的差异都没有统计学意义(图 3)。

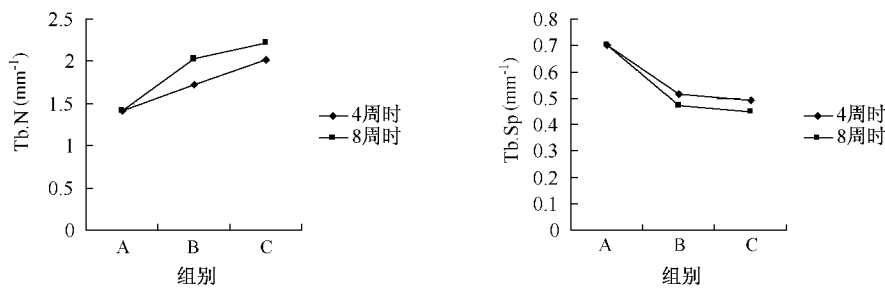


图 3 Tb.N 和 Tb.Sp 测定结果

2.3.4 Tb.Th (mm) 和 Connectivity Density (1/mm³) 测定结果 :Tb.Th 和骨小梁连接密度(Connectivity Density)测定结果显示 ,C 组在不同时期高于 B 组。统计发现 ,在体外冲击波处理后 8 周时 ,骨小梁连接密度在 B、C 两组之间的差异有统计学意义(P 值 < 0.001) ,而在 4 周时无统计学意义 ,Tb.Th 在 4 周和 8 周时 B、C 两组间的差异都没有统计学意义(图 4)。

2.3.5 Micro-CT 二维和三维重建 :Micro-CT 在相同条件下对髌部骨组织进行重建 ,其二维和三维图像

也直观地显示了各组之间骨小梁形态和结构的差别 (图 5)。

从图 6 可以看出 ,B、C 组骨小梁结构较 A 组明显改善。在相同的时间 ,C 组骨小梁的形态结构改善较 B 组更为明显 ,其中 C 组 8 周时骨小梁的形态结构最佳 ,表现为骨小梁数目增多 ,排列平行、方向一致 ,孔隙率减低。

三维构筑图像也直观地显示出各组的骨小梁数量密度、粗细程度、空间连接率等情况 ,结果同二维

重建。

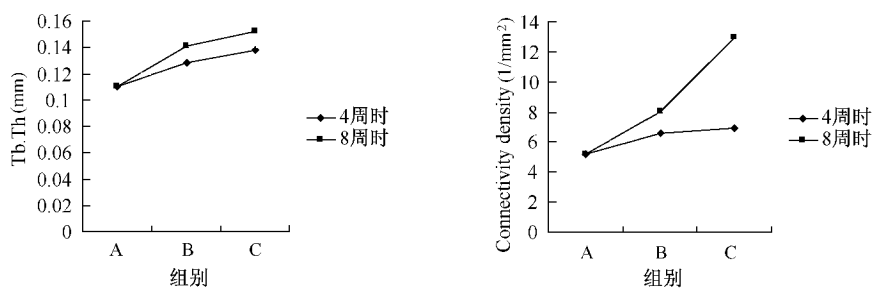


图 4 Tb.Th 和 Connectivity Density 测定结果

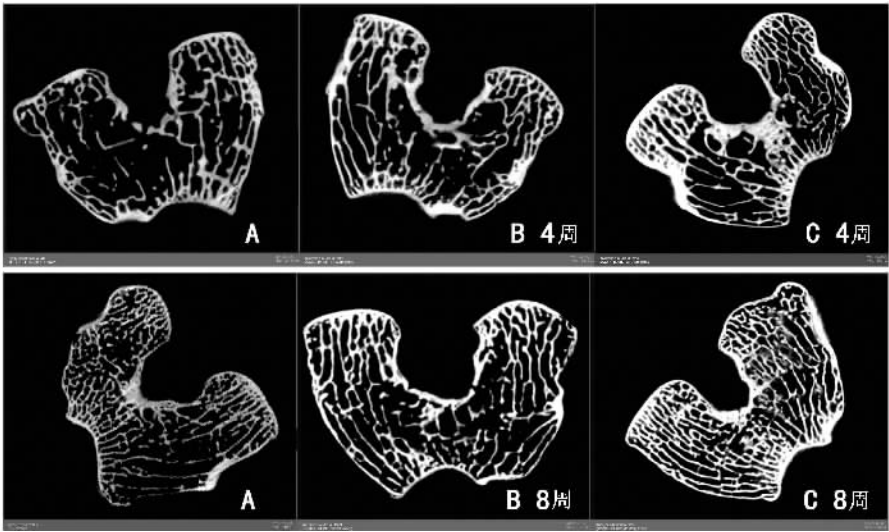


图 5 股骨髁部重建二维图像

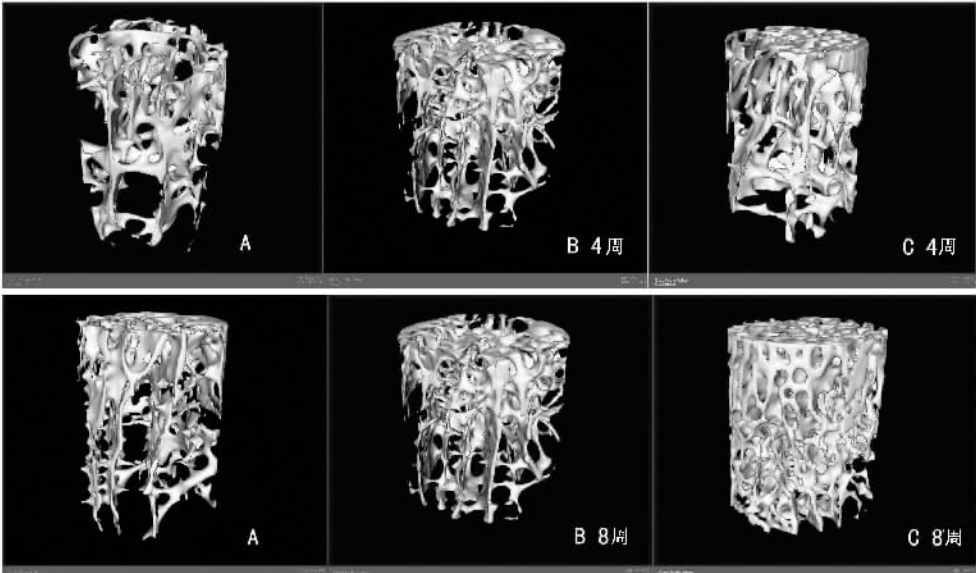


图 6 股骨髁部重建三维图像

3 讨论

3.1 骨质疏松骨折及骨质疏松症的治疗方法

在骨质疏松症中,脆而弱的骨骼骨折阈值明显地降低,从而受轻微的外力就易发生骨折。骨折给患者造成的痛苦巨大,并限制患者的活动,严重影响了患者的生活质量,甚至缩短寿命。骨折发生的部位比较固定,主要是胸腰椎椎体、桡骨远端、股骨上端、踝关节等。因此,对于骨质疏松症并发骨折的防治就尤为重要。目前对于骨质疏松骨折的预防主要是进行全身抗骨质疏松药物的治疗并辅以物理、营养治疗等,而对于已发生的骨折,一般只能应用手术的方法进行复位、固定治疗,使得骨折愈合和功能恢复。目前对于骨质疏松症的防治方法主要有:①物理学疗法,包括人工紫外线疗法、日光浴疗法和高频电疗等;②运动疗法;③营养疗法,主要是钙、维生素D、蛋白质及微量元素等的摄入;④药物治疗,主要有两大类,即促进骨形成的药物和抑制骨吸收的药物。有钙制剂、活性维生素D₃制剂、维生素K₂制剂、雌激素类制剂、降钙素类制剂、双膦酸盐类制剂等。而且,选择性雌激素受体(SERM)已开始利用于日常诊疗活动中;⑤矫形外科疗法,主要是处理骨质疏松症并发的骨折;⑥中医药疗法^[3],其中以药物治疗为主,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。

3.2 体外冲击波对骨质疏松局部治疗作用

体外冲击波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,研究提示:经体外冲击波治疗,硬化的骨端可产生微小新鲜骨折,这些刺激可以增加骨折局部的血供,并可能启动骨折愈合链式反应^[4]。体外冲击波作为一个损伤性刺激,引起了骨折区新的创伤反应,延长了炎症期,并激发炎症和较大的血管反应。大量新生毛细血管长入后,带来大量细胞因子和生长因子,其中包括有缺氧诱导因子-1(HIF-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、骨形成蛋白(BMPs)、转移生长因子 β (TGF- β)、胰岛素样生长因子(IGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)等,都在ESW对骨科疾病作用机制中起着重要作用,对细胞增殖与分化及新骨的形成,都有着诱导和调节作用^[5]。张堃等^[2]应用体外冲击波对骨质疏松局部骨组织冲击治疗的研究,结果表明,被冲击部位在短期内提高了局部骨质的质量、增强骨质的强度,但对于其作用机制,尚待进

一步研究。

3.3 体外冲击波治疗骨科疾病时的能流密度选择

到目前为止,对于体外冲击波治疗骨科疾病时,还没有比较统一的能量选择标准,不同的疾病、不同的组织及不同的部位等使用的能量均不一致,在特定部位应用体外冲击波的最佳剂量,尚在进一步的研究探索中。研究表明体外冲击波治疗效果可能具有剂量依赖性。能量过低可能达不到治疗目的,能量过高则损伤较重。Kaulesar等^[6]行体外实验发现,能量密度为0.33、0.42、0.54 mJ/mm²的体外冲击波在冲击1000次以上会引起皮质骨的改变,可致粉碎性骨折,碎片大小在0.1~0.3 mm²,而能量密度为0.60 mJ/mm²的体外冲击波则引起皮质骨的显著性破坏,甚至完全骨折,能量越高,引起皮质骨的改变越明显。Martini等^[7]用不同能量水平以及冲击次数的体外冲击波分别作用于人类成骨细胞样细胞,然后做细胞培养,研究表明影响体外冲击波治疗成功与否最重要的因素并不是冲击的总次数,而是冲击波的能量水平,能量过大就会对细胞造成破坏。Wang等^[8]在体外冲击波对兔股骨骨折的研究中发现,高能量组(0.47 mJ/mm²)的骨质量(包括骨密度、骨痂形态、骨灰含量和骨钙含量)和骨强度(包括峰值负荷、峰值压力以及弹性模量)的各项指标均显著高于对照组和低能量组(0.18 mJ/mm²),而对照组和低能量组之间的差异没有统计学意义。Rompe等^[9]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分为高、中、低3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。梁斌等^[10]的研究结果显示应用0.4~0.5 mJ/mm²能流密度的体外冲击波对骨不连治疗时,患处骨痂生长、骨愈合过程及愈合率均明显优于其他能力密度。

本研究结果表明,应用体外冲击波对骨质疏松局部进行治疗可改善局部骨质质量,增加骨质密度,促骨小梁改建、改善骨小梁的三维结构。而较高能量的体外冲击波疗效优于较低能量,且有时间差异,治疗后8周时疗效优于4周。因此,应用体外冲击波对骨质疏松局部进行治疗来改善骨质质量,预防骨质疏松骨折是可行的。但是,对于体外冲击波对骨质疏松骨质作用的机制,以及合适的能量选择,尚不明,还需进一步研究。

【参考文献】

[1] Scott M, Thomas W. Extracorporeal shock wave therapy: Clinical

- applications and regulation. J Clinical Tech ,2003 ,2(4) 358-367.
- [2] 张堃 ,刘建 ,孟国林 ,等 . 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 . 中国骨质疏松杂志 ,2008 ,14(6) : 381-384.
- [3] 中国老年学学会骨质疏松委员会 . 中国人群骨质疏松诊疗指南(2007 年版). 中国骨质疏松杂志 2007 增刊.
- [4] Wang CJ MD ,Huang HY ,Chen HH ,et al. Effect of Shock Wave Therapy on Acute Fractures of the Tibia : A Study in a Dog Model. Clin Orthop ,2001 ,387 :112-118.
- [5] 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. Bone , 2003 , 32(4) : 387-396.
- [6] Kaulesar Sukul DM , Johannes EJ , Pierik EG , et al. The effect of high energy shock waves focused on cortical bone : an *in vitro* study. J Surg Res ,1993 ,54(1) :46-51.
- [7] Martini L , Giavaresi G , Fini M , et al. Effect of Extracorporeal Shock Wave Therapy on osteoblastlike cell. Clin Orthop , 2003 , 1 (413) 269-280.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 梁斌 ,李宏宇 ,李丽春 ,等 . 不同能量级别体外冲击波与骨不连愈合的关系 . 中国矫形外科杂志 ,2007 ,15(24) : 1893-1894.

(收稿日期 :2009-07-31)