

不同干预方式对失神经大鼠股骨生物力学的影响

朱生根*

新余学院体育学院,江西 新余 338004

中图分类号: R318.01 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 01-0059-04

摘要: **目的** 观察神经生长因子、电刺激对去神经大鼠股骨生物力学的影响,为临床防治失神经废用性骨质疏松提供参考。**方法** 50 只健康雄性大鼠随机抽签法分为 A 组(假手术组、10 只)、B 组(造模组、40 只)。造模组大鼠右侧股神经和坐骨神经行切除术,然后再随机分为 4 组(每组 10 只);假手术组行同样手术,但不切除股神经和坐骨神经;去神经组大鼠每天只注射生理盐水;电刺激组每次刺激持续 20 分钟、每天两次,采用 2 Hz 频率单一方波刺激;神经生长因子组给予外源性 NGF(2 U/kg·d) 进行注射;联合组注射方式和刺激方式分别同神经生长因子组和电刺激组。实验 30 天后取材,剥离右侧股骨进行结构力学和材料力学指标检测,再进行评价。**结果** 与假手术组相比,神经生长因子组在最大载荷($P < 0.01$),结构刚度、极限强度均明显降低($P < 0.05$);电刺激组和联合作用组指标差异不明显。与去神经组相比,电刺激组和联合作用组除在能量吸收差异不显著外,其他指标明显偏高($P < 0.01$)。**结论** 去神经后股骨生物力学性能下降,电刺激和神经生长因子有利于防止或延缓骨质疏松的发生。

关键词: 电刺激;神经生长因子;失神经;生物力学;废用性骨质疏松模型

Effect of different intervention on femoral biomechanics in denervated rats

ZHU Shenggen

Department of Physical Education, Xinyu Sport College, Xinyu 338004, Jiangxi, China

Corresponding author: ZHU Shenggen, Email: zhuge27@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of electrical stimulation and exogenous NGF on the biomechanics of the femur in denervated rats and to provide reference to prevent and treat disused osteoporosis in the clinic. **Methods** Fifty healthy male SD rats were randomly divided into group A (sham operation group, 10 rats) and group B (model group, 40 rats). Rats in model group received excision of sciatic nerve and femoral nerve, and were further divided to 4 groups (10 rats in each). Rats in sham operation group received operation without excision of sciatic nerve and femoral nerve. Denervation rats received normal saline injection daily. Electrical stimulation was processed in ES group and NGF + ES group twice per day, with a 2Hz simplification square wave. Rats in NGF group received injection of 2U/kg·d exogenous NGF. Rats in combination group received the same treatment in ES group and NGF group. The right femurs were collected for structural and material examination after 30-day experiment. **Results** Compared to sham group, the maximum load, structure stiffness, and ultimate strength in the NGF group were remarkably reduced ($P < 0.01$). The difference of the indices was not significant between electrical stimulation group and the combination group. Compared to the denervation group, indices in ES group and NGF group were remarkably increased except energy absorption ($P < 0.01$). **Conclusion** After the denervation, the femoral mechanical property decreases. Electrical stimulation and nerve growth factor are beneficial to prevent or delay the occurrence of osteoporosis.

Key words: Electrical stimulation; NGF; Denervation; Biomechanics; Disuse osteoporosis model

废用性骨质疏松是由于骨骼机械刺激张力减少而引起的骨量减少,神经受损而导致的瘫痪、术后长期制动和太空飞行期间等都可导致废用性骨质疏松症。这种疾病可给患者带来很多麻烦和并发症,如疼痛、肢体畸形以及易发骨折等,近年来越来越多的

引起医学界关注,各国学者从致病原因、发病机理、防治措施等不同角度对此病进行了大量的相关研究。研究表明外源性神经生长因子和电刺激在治疗废用性骨质疏松方面有作用,但两者对预防废用性骨质疏松作用研究较少,本研究是采用与临床发病方式较为一致的去神经大鼠废用性骨质疏松模型,

*通讯作者: 朱生根, Email: zhuge27@163.com

用外源性神经生长因子 (NGF) 和电刺激联合作用, 研究两者联合作用对大鼠废用性骨质疏松的预防作用, 初步探讨神经生长因子、电刺激及二者联合作用对废用性骨质疏松预防作用的临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料

50 只雄性健康 SD 大鼠、2 月龄、体重 (206. 90 ± 14. 42) g (动物合格证号: 医动字, 01-2059), 购自华西医学部动物实验中心; DS-671 型电子秤 (上海产); 外源性神经生长因子冻干粉, 购自武汉海特生物制药股份有限公司 (批准文号: 国药试字 S20020117); 万能材料试验机 (美国 Instron 牌, 型号: 4302), 由四川大学高分子材料国家重点实验室提供; 日康牌 KT-90A 型神经肌肉电刺激仪。

1.2 实验方法

1.2.1 动物喂养: 在动物房 (室内通风, 室温控制在 20 ~ 25℃, 空气湿度 45% ~ 65%) 中适应喂养 1 周, 10 只/每笼, 标准喂养, 自由饮食。

1.2.2 分组及干预: 术前按体重随机将大鼠分成 A 组 (假手术组 SHAM 组, 10 只)、B 组 (造模组, 40 只), 其中 A 组手术方法同 B 组, 每天注射等体积的生理盐水; B 组造模成功后随机抽签法分为 4 组 (每组 10 只): 去神经组 (DN 组) 每天注射等体积的生理盐水、神经生长因子组 (NGF 组) 注射外源性神经生长因子 2 U/(kg·d)、电刺激组 (ES 组) 每次刺激持续 20 分钟、每天上下午各一次, 采用 2Hz 频率的单一方波刺激、出现大鼠右趾轻微屈伸为适宜强度。神经生长因子和电刺激联合作用组 (NGF + ES 组) 注射方式和电刺激方式分别同 ES 组和 NGF 组。术后 12 小时开始干预, 采用盲法评估。

1.2.3 模型制备: 注射 3% 的戊巴比妥钠 (25 mg/

kg) 进行麻醉, 固定四肢后无菌条件下于俯卧位行右侧后肢股外侧切口, 在股骨粗隆间水平找到并切断约 5 mm 坐骨神经, 快速用生理盐水冲洗伤口并缝合切口; 然后在大鼠仰卧位时行右侧腹股沟处正中纵切口, 在腹股韧带水平找到并切断约 5mm 的股神经, 同样快速冲洗缝合切口, 并在伤口喷洒消毒液进行消毒处理; A 组进行相同手术方法, 但不切除股神经和坐骨神经^[1-3]。术后均给予庆大霉素伤口外搽, 青霉素钠 25 万单位肌注/只/日, 同时伤口每日喷洒消毒液, 连续 3 天, 以预防感染。

1.2.4 指标检测: 实验 30 天后处死大鼠, 并立刻取出右侧股骨, 将其置于万能材料试验机上作三点弯曲实验, 加载参数: 速度 2 mm/min, 跨距 24 mm, 同时记录其载荷 - 形变曲线。获取结构力学参数和材料力学参数并计算相关数据。

1.2.5 统计分析: 全部采用 SPSS11. 5 软件系统统计处理, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用单因素方差分析进行组间比较, 组间差异采用 LSD 检验, 检验水准取双侧 $\alpha = 0. 05, P < 0. 05$ 为差异有统计学意义, $P < 0. 01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠一般情况

术后各组大鼠活动量明显减少, 进食减量, 体重下降, 部分伤口有水肿和化脓现象; 造模组右下肢瘫痪, 7 天左右, 术后伤口愈合良好。假手术组活动灵活, 未见右下肢瘫痪萎缩现象, 进食正常, 毛色光泽, 长势良好。造模组大鼠右下肢无主动屈伸功能, 活动相比假手术组明显减少, 进食也偏少; 各种干预手段中, 电刺激效果明显, 活力更佳, 体重增长也较快。

2.2 各组大鼠右侧股骨结构力学参数指标结果 (表 1)

表 1 各组大鼠右侧股骨结构力学参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of structure mechanic parametrers of the right femur among the groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	最大载荷 (N)	断裂载荷 (N)	结构刚度 (N/mm)	能量吸收 (N·mm)
	Max-load (N)	Break-load (N)	Stiffness (N/mm)	Energy resorption (N·mm)
SHAM	87. 40 ± 8. 24■■■	54. 71 ± 9. 83■■■	127. 36 ± 14. 96■■■	61. 11 ± 6. 55■
DN	71. 61 ± 3. 65▲▲	38. 02 ± 6. 12▲▲	100. 13 ± 7. 53▲▲	54. 32 ± 7. 87▲
NGF	77. 16 ± 4. 24▲▲■	44. 93 ± 8. 96■	112. 05 ± 11. 87■	57. 19 ± 4. 30
ES	82. 25 ± 3. 52▲▲■	53. 09 ± 11. 24■■■	119. 29 ± 7. 79■■■	57. 89 ± 4. 62
NGF + ES	85. 80 ± 2. 19■■■	54. 11 ± 10. 81■■■	125. 69 ± 10. 75■■■	60. 14 ± 4. 21

Note: compare to SHAM group, ▲: $P < 0. 05$, ▲▲: $P < 0. 01$; compare to DN group, ■: $P < 0. 05$, ■■: $P < 0. 01$.
表 1 表明: 结构力学中, DN 和 NGF 组的最大载荷与 SHAM 组相比均具高度显著性差异 ($P < 0. 01$), ES 组与 SHAM 组差异具显著性 ($P < 0. 05$), NGF + ES 组与 SHAM 组差异不具有显著性

($P > 0.05$); NGF + ES 组、ES 组和 SHAM 组与 DN 组之间存在高度显著性差异 ($P < 0.01$), NGF 组与 DN 组间具显著性差异 ($P < 0.05$)。在断裂载荷和结构刚度方面,相比 SHAM 组,只有 DN 组存在显著性差异 ($P < 0.01$),其他无统计学意义;但是相比 DN 组,ES 组、NGF + ES 组都具有显著性差异 ($P < 0.01$)。能量吸收方面各种之间差异不具统计学意义。

2.3 各组大鼠右侧股骨材料力学参数指标结果 (表 2)

表 2 各组大鼠右侧股骨材料力学参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of material mechanic parametrers of the right femur among the groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	极限强度 (N/mm ²)	最大应变 (%)	弹性模量 (MPa)
Group	Max-intensity (N/mm ²)	Max-strain	Elastic module (MPa)
SHAM	34.29 ± 2.21 ■■	2.65 ± 0.27 ■■	6160.89 ± 697.32 ■■
DN	28.39 ± 2.01 ▲▲	3.17 ± 0.41 ▲▲	4796.36 ± 605.93 ▲▲
NGF	29.10 ± 2.68 ▲	2.89 ± 0.28 ■	5518.33 ± 535.11 ■■
ES	31.07 ± 3.52 ■	2.77 ± 0.20 ■■	5611.33 ± 372.39 ■■
NGF + ES	32.29 ± 3.07 ■■	2.76 ± 0.26 ■■	5913.50 ± 404.02 ■■

Note: compare to SHAM group, ▲: $P < 0.05$, ▲▲: $P < 0.01$; compare to DN group, ■: $P < 0.05$, ■■: $P < 0.01$.

由表 2 可知:在材料力学参数对比中,相比 SHAM 组,只有 DN 组存在显著性差异,其它组与之相比无统计学意义。但是相比 DN 组,除了 NGF 组在极限强度方面差异不显著外,其它各组在极限强度、最大应变和弹性模量方面都具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前对废用性骨质疏松动物模型研究方法较多,与其他模型相比,神经瘫痪引起局部骨质疏松在本质上更接近肌肉无力收缩造成的废用性骨质疏松临床客观实际^[4],而且发生骨质疏松更快。研究表明,大鼠单侧后肢行坐骨神经切除术可以有效建立废用性骨质疏松模型^[4,19],造模 4 周左右即可发生显著性骨质疏松^[1]。为使造模更彻底,本课题改为单侧切除坐骨神经和股神经,并确保大鼠能够独立进食具备一定的生活能力,以便使实验得以顺利实施。从实验结果看出,去神经组与对照组在生物力学性能方面具有显著的差异,说明本研究所采用的废用性骨质疏松模型是切实可行且成功的。

神经生长因子已成为神经科学领域中最活跃的课题之一。大量研究已经证实神经生长因子是神经损伤的有效修复药物,随着研究的不断深入,发现在

骨组织中也有神经生长因子的表达^[5-6]。现已发现外源性神经生长因子有促进骨折愈合的作用^[7-9]。外源性神经生长因子能提高失神经大鼠血清 BGP,降低血清 TRACP 水平,减轻去神经支配后大鼠骨质疏松的程度^[2,20]。目前已有实验表明成骨细胞有 LNGFR,通过与 NGF 的结合传递细胞间的信息,促进成骨细胞的活性,达到增强成骨能力。Malcangio^[10]发现 NGF 能刺激大鼠脊髓以旁分泌或内分泌的方式释放 SP、CGRP,将其转运到骨折局部刺激成骨,表明其对骨生成可能有一定的促进作用。本实验采用大鼠神经切除术,所以选用神经生长因子作为实验的干预方式之一。力学刺激可以促进新骨形成,力学刺激作用于骨组织时,骨组织会因力学效应发生相应的应变,通过骨细胞感知周围力学信号的大小和变化,然后转化为生物学信息,以此来调节骨代谢,达到骨骼的塑建,适应或满足骨骼力学功能的需要^[11-12]。Kaynak D、Chen SC^[13-16]分别研究电刺激可以潜在引发骨重建、骨钙沉积和骨密度提高,对骨组织修复有积极意义。电刺激是一种临床操作简便,成本低并且应用广泛的物理治疗方式,实验研究也表明其对骨代谢有良好影响,具有潜在的提高骨生成作用,所以本研究选用该干预措施,并通过神经生长因子和电刺激联合作用观察联合作用对骨代谢的协同或叠加效应。电刺激和神经生长因子联合作用生物力学结果表明骨的结构力学和材料力学性能可以得到较好的保持,指标与假手术组相近,且大部分指标都优于去神经组,差异显著,对预防废用性骨质疏松的发生表现出较为理想效果。

骨的强度是骨质疏松的中心环节,是否会发生骨折对骨质疏松患者来说是最关心最重要的。通常情况下骨骼会受到各种不同的形式载荷如压缩、拉伸、弯曲、扭转等产生应力形变,因此在实验中通常采用测定骨的生物力学性能来评价骨强度,其目的是了解骨骼在外力负荷作用下力学强度的变化以及骨的刚度和稳定性^[17]。因此动物实验中,从实效角度可认为评价骨质量比骨密度更有优势^[18]。通过股骨三点弯曲实验表明,与假手术组相比,在材料力学和结构力学方面,各指标都优于去神经各组大鼠,说明神经损伤对骨力学性能的影响明显;但是相比去神经组,神经生长因子组、电刺激组以及神经生长因子和电刺激联合组的力学指标又较理想;特别是在最大载荷、断裂载荷、结构刚度、弹性模量、极限强度等指标上,电刺激组和联合作用组比去神经组具高度显著性差异 ($P < 0.01$)。但是,神经生长因子

在预防去神经骨质疏松方面还是初步尝试,其用量方式、时间、剂量、途径并没有统一的标准,这可能给实验结果造成影响,并且干预措施的作用机理还需等待实验进一步研究。

【 参 考 文 献 】

[1] GAO Jun,ZHANG Qiande,ZHANG Xi,et al. Establishment and evaluation of disuse osteoporosis animal model[J]. Guangdong Medical Journal,2012,33(18):2728-2731.

[2] LI Junhan, HUANG Lei. A Research on Preventing Disuse Osteoporosis in the Indicator of Bone Metabolism Biochemistry through Passive Movement and Electricity Stimulation[J]. Journal of Beijing Sport University,2009, 32(8):54-56.

[3] GAO Jun,ZHANG Qiande,HU Jihong, et al. An investigation on the best time period for observation of disuse osteoporosis in rat [J]. Jiang su Med,2012, 38(10):1145-1147.

[4] SUN Ke, PENG Mingxing, LIU Lijun, et al. construction of an animal model of immobilization osteoporosis in young rats[J]. Journal of clinical pediatric surgery, 2004(2):103-105,131.

[5] HUANG Chengkua,SU Guosheng,WEI Wen,et al. Application of mecobalamin and nerve growth factor in related diseases [J]. modern journal of integrated traditional chinese and west medicine,2012,21(20):2277-2279.

[6] PENG Xing. Progress in the study of biological effects of growth factor nerve[J]. Lab Med Clin,2009, 6(3):203-204.

[7] Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, et al. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing [J]. Bone,2000,26(6):625-633.

[8] LIU Cheng. Exogenous nerve growth factor and fracture healing correlation Analysis[D]. Yangtze University,2012.

[9] GUO Guigao, SHI Changgui, SU Jiaca. Research progress of Nerve growth factor in promoting fracture healing [J]. int j orthop,2010,31(5):288-290.

[10] MalcangioM, GarrettNE, TomlinsonDR. Nerve growth factor treatement increases stimulus-evoked release of sensory neuropeptides in the rat Spinal Cord[J]. EurJNeurosci,1997,9;

1101-1104.

[11] XU Jian, YANG Dingzhuo, MA Jinfu, et al. effect of bone mechanical load on peak bone mass and exploration on the way of standardization for bone mass[J]. Modern Preventive Medicine, 2010(7):1306-1309.

[12] ZHONG Jing,QIU Bo,XU Huiming, et al. effect of mechanical vibration on muscle strength of lower limbs, bone mineral density, bone strength and body composition [J]. Modern Preventive Medicine,2008,22:4521-4523.

[13] Chen SC, Lai CH, Chan WP. Increases in bone mineral density after functional electrical stimulation cycling exercises in spinal cord injured patients[J]. Disabil Rehabil,2005,27(22):1337-1341.

[14] Pickering SA, Scammell BE. Electromagnetic fields for bone healing[J]. Int J Low Extrem Wounds,2002,1(3):152-160.

[15] Sierpowska J, Toyras J, Hakulinen MA, et al. Electrical and dielectric properties of bovine trabecular bone—relationships with mechanical properties and mineral density[J]. Phys Med Biol, 2003,48(6):775-786.

[16] Kaynak D, Meffert R, Gunhan M. A histopathologic investigation on the effects of electrical stimulation on periodontal tissue regeneration in experimental bony defects in dogs [J]. J Periodontol,2005,76(12):2194-2204.

[17] ZHANG Min, GUO Xiong, HE Shumei, et al. study on the bone martin,bmd and biomechanics among aged female rat [J]. Modern Preventive Medicine,2009,22: 4311-4313.

[18] WU Xianping, LIAO Er yuan, LU Zeyuan, et al. Correlations between bone mechanical propert ies and bone mass in rats[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 1999,5(3):1-4.

[19] DING Zhenqi, ZHANG Xigui, SHA Mo. The research on prevention of disuse osteoporosis w ith stimula tor of bone stress [J]. Chinese Journal of Osteoporosis,2010,12(2):121-124.

[20] GAO Run, LIU Jilin, ZHANG Suzhen, et al. the effects of NGF on denervated rats' bony trabeculae morphology[J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2003,18(11):667-669.

(收稿日期: 2014-07-14)

不同干预方式对失神经大鼠股骨生物力学的影响

作者: [朱生根, ZHU Shenggen](#)
作者单位: [新余学院体育学院, 江西新余, 338004](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2015(1)

引用本文格式: [朱生根, ZHU Shenggen](#) [不同干预方式对失神经大鼠股骨生物力学的影响](#)[期刊论文]-[中国骨质疏松杂志](#) 2015(1)