

低强度脉冲超声对骨质疏松症小鼠模型的作用

何柳¹ 王然² 王晓文³ 崔瑞瑞¹ 谢柳倩¹ 程宣⁴ 唐劲天^{4*}

1. 北京中医药大学生物制药系,北京 100102
2. 北京市海淀区疾病预防控制中心,北京 100094
3. 清华大学玉泉医院,北京 100049
4. 清华大学工程物理系,北京 100084

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 06-0657-04

摘要: 目的 低强度脉冲超声具有促进成骨细胞增殖和矿化的作用,本实验在以往细胞实验的基础上,探究一定参数的超声对骨质疏松症小鼠模型的作用。方法 采用8周龄SPF级BalB/C雌性小鼠,对其实施双侧卵巢切除术建立小鼠骨质疏松症模型,并确定建模成功。实验设置空白对照组、阳性对照组(雌激素灌胃)和超声实验组。阳性对照组给予含结合雌激素(1.24 μg/只)的超纯水溶液灌胃。超声组选用频率为1.5 MHz强度为40 mW/cm²的超声照射脊柱5 min,每周5次,持续8周后检测脊柱区域骨组织密度和生物力学性能。结果 建模后小鼠血清中雌二醇含量降低,并且骨密度明显下降。经过后续干预治疗后,雌激素治疗组和超声组骨密度有一定提高。生物力学测试结果显示雌激素组和超声组较对照组而言,脊柱最大载荷和最大位移均有所提高。实验后对模型小鼠五脏进行病理切片,未见血点,细胞结构完整。结论 本实验成功建立了小鼠骨质疏松症模型,低强度脉冲超声能够提高骨质疏松症小鼠模型的骨密度,增加骨强度和骨韧性且该参数的超声具有良好的生物安全性。

关键词: 低强度脉冲超声;骨质疏松症;骨密度;卵巢切除术;雌激素

Effects of low-intensity pulsed ultrasound on mouse osteoporosis model

HE Liu¹, WANG Ran², WANG Xiaowen³, CUI Ruirui¹, XIE Liuqian¹, CHENG Xuan⁴, TANG Jingtian⁴

1. Department of Biopharmaceuticals, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102
2. Haidian District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100094
3. Yuquan Hospital of Tsinghua University, Beijing 100149
4. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Corresponding author: TANG Jintian, Email: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn

Abstract: Objective Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) promotes osteoblast proliferation and mineralization. This experiment explores the effect of LIPUS on mouse osteoporosis model on the basis of our previous cell experiments. **Methods** Eight-week-old healthy female BalB/C mice (SPF grade) were ovariectomized bilaterally to establish the mouse osteoporosis model. After the models were established, mice were divided into blank control (CON), positive control group (estrogen group, ESG), and LIPUS group. The mice were gavaged 1.24 μg estrogen containing distilled water each in the ESG. The mice were irradiated on the spine using ultrasound (1.5 MHz, 40 mW/cm²) for 5 minutes in the LIPUS group. Each mouse was treated 5 times per week for 8 weeks. Eight weeks later, bone mineral density and biomechanical properties around the irradiated spine were measured. **Results** Serum estradiol and bone mineral density decreases obviously after establishing the osteoporosis model in mice. After the follow-up intervention treatment, bone mineral density increased in a certain extent in LIUPS and ESG. Biomechanics detection showed that the maximum load and maximum displacement improved in ESG and LIUPS compared with those in CON. No bleed points were observed and the cell structure was intact in organ histological section after the experiments. **Conclusion** We successfully establish the mouse model of osteoporosis. The results show that low-intensity pulsed ultrasound is a safe method that can improve bone mineral density in osteoporotic mice and enhance bone strength and bone tenacity.

Key words: Low-intensity pulsed ultrasound; Osteoporosis; Bone mineral density; Ovariectomy; Estrogen

低强度脉冲超声(LIUPS)是一种声压波,其强度范围 $1 \sim 50 \text{ mW/cm}^2$,通过高频压力波的形式将机械能传递入生物体内,达到对生物体的刺激作用,引起介质内分子的震荡和碰撞,从而在细胞间产生微机械作用力,进而诱导发生一系列的细胞水平的生化反应^[1-3]。小鼠成骨细胞株(MC3T3-E1)实验证实LIPUS具有促进该细胞增殖分化和矿化的作用^[4]。本实验使用细胞实验筛选出的最佳超声参数—— 1.5 MHz , 40 mW/cm^2 的超声进行动物实验,进一步验证LIPUS的有效性和安全性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物来源:8周龄SPF级BalB/C小鼠18只,体重 $20 \sim 22 \text{ g}$,由清华大学生物医学测试中心实验动物平台提供并饲养。采用小鼠标准饲料饲养,自由进食饮水,14/10 h明暗交替,环境恒温 $20 \sim 26^\circ\text{C}$,恒湿 $40\% \sim 70\%$ 。所有动物实验均通过清华大学动物使用与管理委员会审查批准。

1.1.2 药物与试剂:红丽来结合雌激素片(新疆新姿源生物制药有限责任公司)、小鼠雌二醇(E2)酶联免疫试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)、苏木素伊红(HE)染色试剂盒(北京蓝博斯特生物技术有限公司)、戊巴比妥钠(北京化学试剂公司)、青霉素(华北制药股份有限公司)、甲醛溶液(西陇化工)。

1.1.3 设备与器材:超声试验仪(清华大学工程物理系自主研发)、双能X射线骨密度仪(Medilink Osteoview,北京大学体检中心骨密度室提供)、光学显微镜及倒置照相系统(Olympus, BX-51, DP70)、电子万能试验机(Zwick 2005,清华大学机械工程系提

供)、石蜡包埋机(LEICA EG1150 System)、冰冻切片机(LEICA CM1900)、手术器械(手术刀柄刀片,组织剪,线剪,缝合针线,止血钳,无菌巾单等购于科普家实验仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 建立小鼠骨质疏松症模型:手术器械高温高压灭菌,铺无菌巾单,小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉,侧卧位固定,剔除背部肋缘下、脊柱两侧背毛,皮肤局部使用75%酒精擦拭消毒,于末肋下1 cm与脊柱外侧2 cm交叉处做平行于脊柱的1 cm纵行切口,将皮肤牵向一侧,切开筋膜,钝性分离肌肉。进入腹膜,在肠系膜脂肪中找到呈红色红豆大小的卵巢,在子宫角上用丝线结扎输卵管,切断输卵管。夹起卵巢,丝线结扎其周围相连组织,切除卵巢。将组织复位,依次缝合肌肉层、皮肤层。将切下的卵巢固定于10%中性甲醛溶液中保存。使用相同的方法切除对侧卵巢。术后给予小鼠腹腔注射40万U青霉素。

1.2.2 血清雌二醇检测:在术前3 d和术后4 w分别对小鼠进行眼底静脉丛采血,取血量0.2 mL,静置数分钟,之后以转速 $3\ 000 \text{ r/min}$ 离心5 min,取上清液于 4°C 保存,用于血清雌二醇检测评价建模效果。

1.2.3 动物分组及干预治疗:18只小鼠随机分为3组:对照组(CON)、雌激素组(ESG)、低强度脉冲超声组(LIPUS)(表1)。将结合雌激素片研成细粉溶于超纯水,配置成 $4.13 \mu\text{g/mL}$ 的溶液,ESG组每日定时灌胃0.3 mL;LIPUS组固定小鼠四肢于解剖板上,背部毛发剔除干净,在裸露的脊柱区皮肤上涂抹超声导入胶,并将超声探头紧密固定于其上,打开超声试验仪,每日定时照射脊柱5 min。

表1 动物实验参数

Table 1 Parameters of the animal experiment

组别 (Group)	数量(只) (Number)	建模方式 (Modeling method)	干预剂量/参数 (Experiment parameter)
对照组 (Control)	6	摘除卵巢 (Bilateral ovariectomy)	—
雌激素组(Estrogen)	6	摘除卵巢 (Bilateral ovariectomy)	雌激素溶液灌胃0.3 mL/只 5 d/w,共8 w (Gavage with $1.24 \mu\text{g}$ estrogen, 5 d/w, 8 w)
低强度脉冲超声组 (LIPUS)	6	摘除卵巢 (Bilateral ovariectomy)	1.5 MHz , 40 mW/cm^2 , 5 min 超声照射 5 d/w,共8 w (1.5 MHz , 40 mW/cm^2 , 5 min LIPUS, 5 d/w, 8 w)

1.2.4 骨密度检测:术前3 d、术后4 w及干预完成

分别使用双能X射线骨密度检测仪对小鼠脊柱骨

进行扫描检测分析。

1.2.5 生物力学测试:实验干预周期完毕,将小鼠安乐死,解剖取脊柱并将附着的肌肉等组织剔除干净,用使用生理盐水浸润过的无菌纱布包裹备用。使用电子万能试验机对小鼠脊柱骨进行三点弯曲试验,两支点间跨距 24 mm,选取标定载荷 10 kg,加载速度 2 mm/min,直至骨折,记录最大载荷、脊柱骨断裂时的最大位移及载荷-位移曲线。

1.2.6 安全性评价:小鼠安乐死,取脊柱同时取出心、肝、脾、肺、肾,分装与 10% 的中甲醛固定,制备病理切片,HE 染色镜下观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件分析,所有数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,通过单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 判定其差异有无显著性。显著性差异的水平定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 血清雌二醇(E2)浓度检测

术后小鼠血清中雌二醇含量为 28.38 pg/mL,而手术前为 64.72 pg/mL ($P < 0.05$),统计学分析表明建模后雌二醇水平显著下降(表 2)。

表 2 小鼠血清雌二醇浓度

Table 2 Serum estradiol concentration in the mice

雌二醇 (pg/mL) (Estradiol)	建模前 (Before modeling)	建模后 (After modeling)
	64.72 ± 9.37	28.38 ± 10.26 *

注:与术前正常值相比, * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, compared with pre-operation.

2.2 小鼠骨参数评价

手术后小鼠脊柱区高骨密度区域面积(绿色部分)较手术前明显减少,而低骨密度区域面积(红色部分)相应增加(图 1)。定量分析骨密度(BMD)、高骨密度区域面积(Area)、骨量(BMC)结果显示,手术后骨密度和骨量较手术前都有明显降低(表 3)。干预过程中,因意外,LIUPS 组小鼠死亡一只,其余各小鼠生长良好,并进入后续结果检测。ESG 组和 LIUPS 组高骨密度区域面积有一定增加,数据

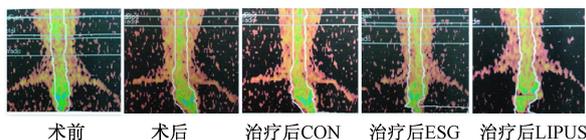


图 1 小鼠脊柱区骨密度对比

Fig. 1 Comparison of bone mineral density of the spine area in mice

定量分析结果显示,LIPUS 组的骨密度和骨量值较对照组有所提高 ($P < 0.05$),其余各组无明显差异(表 3)。

表 3 小鼠脊柱区骨密度定量分析

Table 3 Quantitative analysis of bone mineral density of the spine area in mice

项目	BMC(g)	Area (cm ²)	BMD(g/cm ²)
手术前 (pre-operation)	0.393 ± 0.048	1.75 ± 0.16	0.203 ± 0.005
手术后 (post-operation)	0.347 ± 0.053 *	1.68 ± 0.19	0.189 ± 0.007 *
治疗后 CON (CON after treatment)	0.351 ± 0.052	1.84 ± 0.13	0.191 ± 0.004
治疗后 ESG (ESG after treatment)	0.311 ± 0.047	1.33 ± 0.21	0.234 ± 0.003 *
治疗后 LIPUS (LIPUS after treatment)	0.381 ± 0.054	1.70 ± 0.14	0.224 ± 0.004 *

注:与术前正常值相比, * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, compared with pre-operation.

2.3 脊柱骨生物力学检测

三点弯曲试验结果显示,ESG 组和 LIUPS 组的最大载荷和最大位移均较对照组有提高 ($P < 0.05$),提示骨强度和骨韧性在雌激素灌胃治疗和低强度脉冲超声治疗后均有一定增强。

表 4 生物力学检测结果

Table 4 Results of the biomechanics measurement

组别 (group)	最大载荷 (F_{max} , N)	最大位移 (d_{max} , mm)
对照组 (Control)	1.92 ± 0.16	5.7 ± 0.4
雌激素组 (Estrogen)	2.62 ± 0.13 *	6.7 ± 0.7 *
低强度脉冲超声组 (LIPUS)	2.81 ± 0.14 *	6.9 ± 0.6 *

注:与术前正常值相比, * $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, compared with pre-operation.

2.4 安全性评价

取经干预后的 LIPUS 组小鼠的各主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)做病理切片,HE 染色后在镜下进行组织学形态观察,发现各脏器外观完整、色泽正常,无病理学改变,无非正常血点,细胞结构较完整,无异常现象(图 2)。说明该参数的脉冲超声具有一定的安全性。

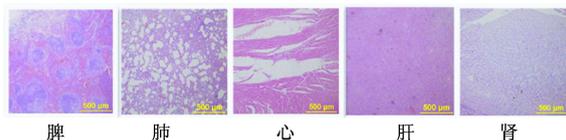


图 2 主要脏器病理切片

Fig. 2 Pathological sections of the main organs

3 讨论

骨质疏松是一种以骨量减少,骨脆性增加为特点的病症,是老年人及绝经后妇女引发骨折的主要原因之一。建立合适的骨质疏松动物模型,是开展研究骨质疏松防治的关键步骤。小鼠是医学实验中最广泛常用的实验动物,近年来陆续有学者将其用于研究骨质疏松症的相关治疗^[5-7]。双侧卵巢摘除法常用的建立骨质疏松动物模型的方法,去势雌鼠能够很好的模拟人类闭经后骨质疏松状态。在卵巢切除后的2~3 d,由于雌激素缺乏子宫发生萎缩,OVX后1 w足以消除雌激素影响^[8,9]。故本实验在术前3 d和术后4 w分别取血,比较手术前后血清E2水平变化,发现OVX组E2水平显著下降,从而确定手术成功,实验继续进行。

常用于动物实验的LIPUS的强度一般设置为30-50 mW/cm²^[10-12],这个强度被认为对生物组织几乎不造成机械损伤,仅产生极微量的温热效应,但可产生稳定的空化效应和声冲流。已有文献初步证实LIPUS能够有效预防动物骨质疏松性骨折^[13,14],揭示了临床应用潜力。低频率的超声对骨组织衰减率更低,穿透骨组织的能力更强,输出同样的能量到达骨组织深处的更多。本实验使用1.5 MHz,40 mW/cm²的超声照射骨质疏松小鼠的脊柱,发现LIPUS组骨密度和生物力学参数均有一定提高,提示LIPUS应用于临床防治骨质疏松的可行性。

本实验成功建立了骨质疏松症小鼠模型,并证明了LIPUS对于卵巢摘除所致骨质疏松模型提高骨密度增加骨量有较好的效果。但由于本实验为LIPUS的早期尝试,尚存诸多不完善之处,有待进一步研究中改进:骨组织代谢活动缓慢,研究周期较长,所以LIPUS防治骨质疏松症的相关实验研究需要建立长期稳定的实验模式,以便更充分地研究骨组织的细微变化。LIPUS的最优参数及施加剂量如频率、强度、时间等仍需大量实验摸索,其作用机制仍需进一步探索。

【参 考 文 献】

[1] Khanna A, Nelmes RTC, Gougoulias N, et al. The effects of LIPUS on soft-tissue healing: a review of literature [J]. British Medical Bulletin, 2009, 89: 169-182.

[2] Mukai S, Iot H, Nakagawa Y, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondro-cytes [J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31 (12): 1713-

1721.

[3] Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF [J]. Injury, 2008, 39(2): 45-57.

[4] 王然, 马俊, 詹欣, 等. 低强度脉冲超声对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响 [J]. 科技导报, 2013, 31(32): 64-67. Wang Ran, Ma Jun, Zhan Xin, et al. Influence of LIPUS on proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells [J]. Science & Technology Review, 2013, 31(32): 64-67.

[5] Pavlin D SB, Dove R, Zadro, et al. Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes [J]. Calcified Tissue International, 2000, 67: 163-172.

[6] Kalu DN, Chen C. Ovarioectomized murine model of postmenopausal calcium malabsorption [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14: 593-601.

[7] 张金娟, 文斌, 张贵林, 等. 淫羊藿苷对骨质疏松模型小鼠骨组织形态计量学指标的影响 [J]. 贵州医药, 2010, 5(34): 404-405. Zhang Jinjuan, Wen Yu, Zhang Guiling, et al. Analysis of the effects of icariin on the mice with osteoporosis through index of histomorphometry of Bone [J]. Guizhou Medical Journal, 2010, 5(34): 404-405.

[8] MG O, V R, W C. Skeletal fracture associated with androgen suppression induced osteoporosis: the clinical incidence and risk factors for patients with prostate cancer [J]. J Urol, 2001, 166: 1724-1728.

[9] Khanna A, Nelmes RTC, Gougoulias N, et al. The effects of LIPUS on soft-tissue healing: a review of literature [J]. British Medical Bulletin, 2009, 89: 169-182.

[10] Akito S, Tadahiro T, Naoto S, et al. Daily low-intensity pulsed ultrasound-mediated osteogenic differentiation in rat osteoblasts [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, 41 (2): 108-115.

[11] Show HC, Chun YC, Shyh HW. The growth of osteoblasts stimulated by various time duration of low intensity pulsed ultrasounds [A]. Ultrasonics Symposium (IUS), 2009 IEEE International [C], 2009: 365-368.

[12] Suzanne L Ferreri, Roger Talish, Titi Trandafir, et al. Mitigation of bone loss with ultrasound induced dynamic mechanical signals in an OVX induced rat model of osteopenia [J]. Bone, 2011, 48(5): 1095-1102.

[13] Ozdemir F, Zateri C, Murat S. Evaluation of the efficacy of therapeutic ultrasound on bone mineral density in postmenopausal period [J]. Rheumatol Int, 2008, (28): 361-365.

[14] 张超, 梁国穗, 张颖恺, 等. 低强度脉冲超声波刺激人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(11): 657-660. Zhang Chao, Liang Guo-sui, Zhang Ying-kai, et al. The biological effects of low intensity pulsed ultrasound on human periosteal cells and marrow stromal cells in vitro [J]. Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2005, 27(11): 657-660.