

# 垂直振动对大鼠腰椎小关节退变及骨密度影响的实验研究

刘博<sup>1</sup> 高天君<sup>2\*</sup> 马远征<sup>2</sup> 王亮<sup>2</sup> 黎立<sup>2</sup>

1. 河北北方学院,河北 张家口 075000

2. 解放军第309医院,北京 100091

中图分类号: R681.5+3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016)10-1246-05

**摘要:** 目的 观察大鼠腰椎小关节在不同振动频率下关节软骨退变程度及腰痛相关因子的表达情况,同时探究振动对骨密度的影响。方法 收集对照组和振动组(振动组接受15 min/d,频率5~60 Hz、振幅3 mm的垂直振动12 w)大鼠腰椎小关节软骨,采用HE染色和AB-PAS染色,进行Mankin评分评价软骨退变程度;免疫组化染色观察凋亡软骨细胞、COX-2、PGE<sub>2</sub>、CII在小关节突软骨表达;双能X线吸收法测量振动前后股骨颈骨密度。结果 对照组、5 Hz振动组、20 Hz振动组、60 Hz振动组小关节Mankin评分依次增加,有显著性差异( $P < 0.05$ );组间凋亡软骨细胞、COX-2、PGE<sub>2</sub>表达随着振动频率增加而显著性增强( $P < 0.05$ );对照组与5 Hz振动组CII表达差异不明显( $P > 0.05$ ),其余各组间CII表达差异明显( $P < 0.05$ );组间骨密度增加值无显著性差异。结论 长时间垂直振动可导致软骨退变,振动频率越大,小关节退变越重;振动与致痛因子表达具有相关性;5~60 Hz、3 mm振幅振动不能促进幼龄大鼠BMD增加。

**关键词:** 振动;腰椎小关节;免疫组化;原位末端标记法

## An experimental study on the effects vertical vibration on lumbar facet joint degeneration and bone mineral density in rats

LIU Bo<sup>1</sup>, GAO Tianjun<sup>2</sup>, MA Yuanzheng<sup>2</sup>, WANG Liang<sup>2</sup>, LI Li<sup>2</sup>

1. Hebei North University, Zhangjiakou, 075000

2. The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: GAO Tianjun, Email:tianjungao@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effects of different vibration frequencies on the occurrence of rat lumbar facet joint degeneration, low back pain-related factors and femur bone mineral density in rats. **Methods** The lumbar facet joints were harvested from rats in control group and vibration group (Vibration group rats were applied 15 min/d, 5 - 60 Hz frequency, amplitude of 3mm vertical vibration for 12 weeks). Sections of facet joints were stained with HE staining and AB-PAS staining, and the severity of cartilage degeneration was determined according to the Mankin score. Immunohistochemistry was used to examine the expression of apoptotic cells, CII COX-2 and PGE<sub>2</sub>. DXA was used to measure bone mineral density of femoral neck before and after the vibration. **Results** With the increase in Herz, the Mankin scores increased, and the severity of facet joint degeneration was significantly different among the groups ( $P < 0.05$ ). The number of apoptotic cells and content of COX-2 and PGE<sub>2</sub> increased significantly with increased frequency ( $P < 0.05$ ). The expression difference of CII between control group and 5Hz group was not statistically significant, but the difference among other groups was significant. The BMD of different groups was not significantly different. **Conclusions** Long-term vertical vibration can lead to cartilage degeneration, the higher the frequency, the greater the small joint degeneration. Vertical vibration was related to the expression of pain-related factors. 5-60Hz, 3mm amplitude of vertical vibration could not increase BMD of femoral neck in young-age rats.

**Key words:** Vibration; Lumbar facet joint; Immunocytochemistry; TUNEL

基金项目: 全军后勤“十二五”科研课题(CWS11J170)

\* 通讯作者: 高天君, Email:tianjungao@163.com

腰痛是患者就诊最常见的症状之一,直升机驾驶员、汽车驾驶员等人群中发病率较高。腰痛最常见的致病因素包括退行性骨关节炎(osteoarthritis,

OA)、椎间盘源性腰痛等<sup>[1]</sup>。其中OA的主要病理变化是关节软骨退变,其致病因素较多,常见的有炎症介质、异常机械应力等。有研究<sup>[2]</sup>发现异常应力可影响腰椎小关节正常的软骨组成,从而导致关节软骨退变,且退变程度与应力施加时间呈正相关。在少有的研究中,垂直振动作为应力的一种特殊形式,其对腰椎小关节退变及骨密度影响被列入本研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6w龄 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只, SPF 级, 体重(210 ± 10)g(解放军军事医学科学院动物中心提供), 合格证号为 SCXK-(军)2012-0004。实验经 309 医院动物实验伦理委员会许可后实施。

### 1.2 腰椎小关节退变动物模型

1.2.1 动物分组:随机抽签分组:对照组 10 只, 编号为 A;振动实验组 30 只,分为 3 组,每组 10 只, 编号为 B、C、D,各组放入相同环境中单笼饲养。

1.2.2 建立模型:①A 组不做特殊处理。②将振动各组大鼠分批放入振动训练台的特制容器内,大鼠呈直立位,分别对 B 组、C 组、D 组施加 5、20、60 Hz 垂直振动,每组振动 15 min/d,振幅峰值为 3 mm,连续 12 w。在振动前后,用 5% 水合氯醛(7 mL/kg)经腹腔麻醉大鼠,双能 X 线吸收法测量股骨颈 BMD。

1.2.3 取材和处理:耳缘静脉空气栓塞法处死各组大鼠,收集 L<sub>5</sub>-L<sub>6</sub> 腰椎小关节软骨;4% 多聚甲醛溶液固定 24 h。15% 乙二胺四乙酸脱钙 7d。流水冲洗 24 h。梯度酒精脱水后二甲苯透明,石蜡包埋。六张为一组连续切片,层厚 4 ~ 5 μm,树胶封固。试剂来源:细胞凋亡检测试剂盒由上海罗氏制药公司提供;兔抗大鼠环氧化酶 2 抗体、兔抗大鼠 Collagen II 抗体、DAB 显色试剂盒、SABC 免疫组化试剂盒、AB-PAS 染液由武汉博士德生物工程有限公司提供,兔抗大鼠前列腺素 E<sub>2</sub> 抗体由上海恒远生物科技公司提供,余试剂由解放军 309 医院动物实验室提供。

### 1.3 光学显微镜观察

切片常规 HE 染色,光学显微镜观察切片,每组随机选取 5 张切片,高倍镜下随机选取 5 个视野,计数单位面积软骨细胞数量,观察软骨结构及潮线。按说明书进行 AB-PAS 染色,中性树胶封固,显微镜观察糖原染色情况。结合 Mankin 评分标准对软骨退变程度进行评分。

### 1.4 TUNEL 检测(kit-POD 法)

切片常规脱蜡入水,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 2 次,37°下 Proteinase K 修复抗原 30 min;0.01 mol/L PBS(PH7.4)漂洗 5 min × 3 次;37°下 5% 小牛血清封闭 15 min;37°下 5 μL TdT + 45 μL dUTP 混匀液 1 h;PBS 洗涤;小牛血清封闭;待玻片干后加 50 μL converter-POD 于标本上,37°C 下孵育 30 min;PBS 漂洗;20°C 下加 50 μL DAB,反应 10 min;PBS 漂洗 3 次;底物在显微镜下呈深棕色即用自来水终止反应;苏木素复染,5sec 后自来水冲洗。梯度酒精脱水、透明、封片;Olympus 显微镜摄片。每组随机选取 5 张切片,高倍镜下每张随机选取 5 个视野,计数单位面积内凋亡软骨细胞(阳性细胞呈棕黄色)。

### 1.5 COX-2 检测(SABC 法)

切片常规脱蜡入水;ddH<sub>2</sub>O 冲洗 2 min × 2 次;室温下 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 7 min;蒸馏水洗 3 次;切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉加热至沸腾后断电 5 min,重复 1 次修复抗原;冷却后 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min × 2 次;滴加 5% 小牛血清封闭液,室温下孵育 20 min;滴加 1:100 稀释兔抗大鼠 COX-2 抗体,37°C 下孵育 1 h;PBS 洗 2 min × 3 次;滴加生物素化山羊抗兔二抗,37°C 下孵育 20 min;PBS 洗 2 min × 3 次;滴加试剂 SABC,37°C 20 min;PBS 洗 5 min × 4 次;DAB 显色,镜下呈棕色终止反应;苏木素复染 1 min。PBS 代替一抗作为阴性对照。梯度脱水,透明,封片。显微镜摄片:每组随机选取 5 张切片,每张随机选取 5 个视野,图象分析软件计算出平均光密度。

### 1.6 PGE<sub>2</sub> 和 CII 含量检测

方法同上。

### 1.7 统计学处理

使用 SPSS18 软件进行分析,结果  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析和 LSD 检验,检验水平  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织大体观察

A 组关节表面光滑、无裂隙,色泽亮白;B 组关节表面尚平滑,色白微黄,关节边缘粗糙不光滑。C 组关节表面色泽暗淡,偏淡黄,软骨表面可见裂隙,边缘可见少量骨赘形成;D 组关节表面粗糙不平,色泽晦暗,关节表面弹性下降,部分关节透明软骨层缺损(图 1)。

### 2.2 HE 染色结果观察

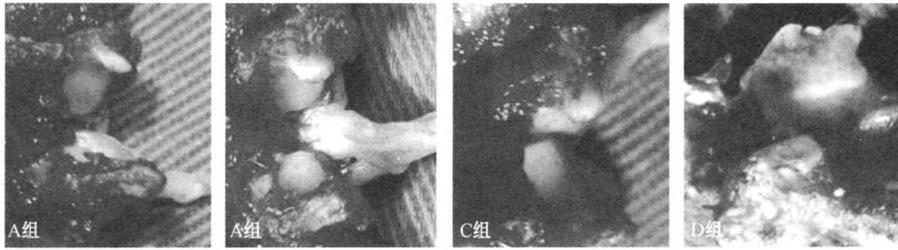


图1 大鼠腰椎小关节

Fig.1 Image of rat facet joint of lumbar

A组软骨浅表层、中间层、放射层及钙化软骨层层次清晰,潮线连续,软骨细胞排列有序,胞浆和基质着色均匀。B组软骨层次紊乱但可分,潮线欠连续,胞浆基质着色不均,中间层和放射层软骨细胞代偿增生,排列欠规则,可见细胞成簇和肥大软骨细

胞。C组软骨部分细胞失染,呈梭形,钙化软骨层细胞增生,潮线模糊,基质着色减低。D组软骨裂隙达深层,层次不可分,中上层细胞数量减少明显,排列无序,细胞核失染现象和空泡细胞增多。潮线模糊不清,胞浆和基质染色浅染,着色不均(图2)。

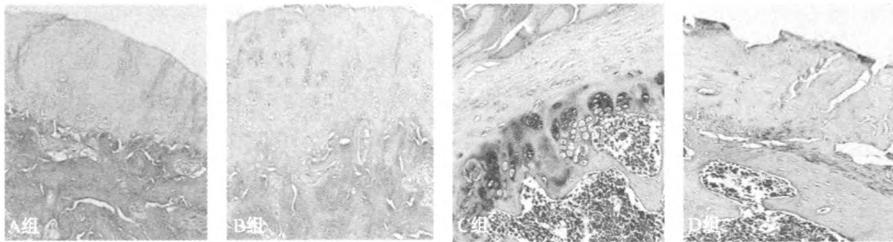


图2 大鼠腰椎小关节组织 HE 染色(×200)

Fig.2 Image of HE staining in rat facet joint of lumbar(×200)

2.3 腰椎小关节软骨 Mankin 评分结果

实验组评分均明显大于对照组( $P < 0.05$ ),实验组软骨退变程度较对照组严重;随着频率增加,软骨退变程度加重,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),60Hz组退变程度最重。Mankin评分见表1。

2.4 COX-2、PGE<sub>2</sub>、CII 平均光密度及软骨凋亡细胞数量结果

A组 COX-2、PGE<sub>2</sub> 主要表达于软骨浅表层和中上层,随着频率增加,其在软骨深部表达增加(图3);其在 B-D 组平均光密度较对照组高,随着振动频率增加而增加,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );

表1 不同组别腰椎小关节软骨 Mankin 软骨组织学-组织化学评分( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Table 1 The mankin score of lumbar facet joint cartilage of different groups( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Group	n(例)	Mankin score
Group A	10	0.80 ± 0.63
Group B	10	3.10 ± 0.57 *
Group C	10	5.80 ± 1.23 * #
Group D	10	8.70 ± 1.25 * #*

注:与A组比较,\* $P < 0.05$ ;与B组比较,# $P < 0.05$ ;与C组比较,^ $P < 0.05$

Note:Compared with group A,\* $P < 0.05$ ;compared with group B,# $P < 0.05$ ; compared with group C,^ $P < 0.05$

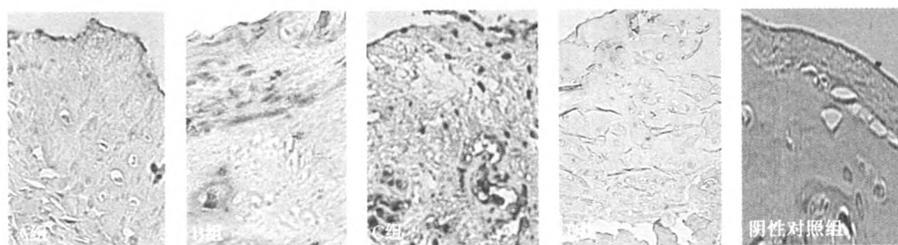


图3 腰椎小关节组织 COX-2 表达情况(×400)

Fig.3 Image of COX-2 expression in rat lumbar facet joint(×400)

A 组和 B 组 CII 平均光密度没有统计学差异 ( $P > 0.05$ ), C 组、D 组与 A 组、B 组有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 振动组软骨凋亡细胞数量高于对照组, 组

间差异有统计学意义, 随着频率增加, 深层软骨凋亡细胞呈增加趋势 (图 4), 平均光密度和凋亡数量见表 2。

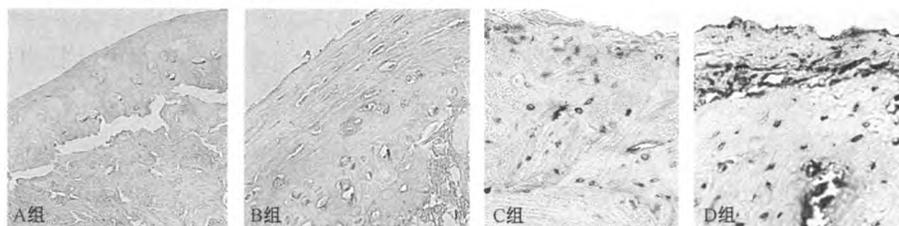


图 4 腰椎小关节组织软骨细胞凋亡情况 ( $\times 400$ )

Fig. 4 Image of chondrocyte apoptosis in rat lumbar facet joint ( $\times 400$ )

表 2 不同组别软骨细胞中 COX-2、PGE<sub>2</sub>、CII 平均光密度值及凋亡细胞数 ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Table 2 The average optical density of COX-2, PGE<sub>2</sub> and CII and the number of apoptotic cells of different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 40$ )

Group	COX-2 AOD	PGE <sub>2</sub> AOD	CII AOD	细胞凋亡数
Group A	0.147 ± 0.029	0.119 ± 0.018	0.348 ± 0.041	14.6 ± 3.3
Group B	0.211 ± 0.068 *	0.174 ± 0.031 *	0.323 ± 0.030 **	26.3 ± 6.1 *
Group C	0.320 ± 0.052*	0.246 ± 0.040*	0.222 ± 0.035*	39.1 ± 7.3*
Group D	0.377 ± 0.0430	0.340 ± 0.0510	0.157 ± 0.033	50.1 ± 8.6

注: 与 A 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P > 0.05$ ; 与 A 组和 B 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 A 组、B 组、C 组比较, ^  $P < 0.05$

Note: Compared with group A, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P > 0.05$ ; compared with group A and B, #  $P < 0.05$ ; compared with group A, B and C, ^  $P < 0.05$

### 2.5 大鼠股骨颈 BMD 检测结果

振动后各组间 BMD 及净增量没有统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 说明 5、20、60 Hz 垂直振动不能促进幼龄大鼠 BMD 增加 (见表 3)。

表 3 不同组别大鼠股骨颈 BMD 值 ( $\bar{x} \pm s, n = 40, g/cm^2$ )

Table 3 BMD value of rats femoral neck in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 40, g/cm^2$ )

组别	振动前 BMD	振动后 BMD	BMD 净增量
Group A	0.1757 ± 0.0056	0.1961 ± 0.0035	0.0205 ± 0.0032
Group B	0.1739 ± 0.0027	0.1987 ± 0.0062	0.0234 ± 0.0035
Group C	0.1764 ± 0.0016	0.1977 ± 0.0053	0.0213 ± 0.0044
Group D	0.1771 ± 0.0011	0.1989 ± 0.0013	0.0222 ± 0.0020

注: 两两比较骨密度净增量,  $P > 0.05$

Note: The BMD net increase is compared in pairs,  $P > 0.05$

### 3 讨论

直升机驾驶员、汽车驾驶员、机械操作工等振动接触较多的人群是腰痛高发人群, 该现象被认为与腰椎小关节退变有关。退变的腰椎小关节出现软骨结构改变, 炎性致痛因子表达增加, 是小关节源性腰痛发生的直接诱因。异常动态载荷振动对腰椎小关节损伤明显, Mahjoub 等<sup>[3]</sup>认为, 超出关节缓冲系统承受能力的振动载荷是造成软骨退变的重要原因, 同时垂直振动增加上下关节突碰撞的机会和挤压的负

荷, 造成骨软骨微损伤累积, 逐渐发展为较大软骨结构破坏。腰椎小关节和椎间盘同属于腰椎三关节复合体结构, 具有结构相关性和功能一致性, 协同分散脊柱负荷、保持脊柱稳定性。杨达宇等<sup>[4]</sup>发现不同频率垂直振动可加速腰椎间盘退变, 进而间盘高度丢失, 造成复合体“三脚架”结构失衡, 腰椎小关节受力改变, 负荷加大, 造成软骨退变加速。本实验通过特制的容器使大鼠保持直立位, 模拟人类腰椎小关节受力环境, 通过对大鼠施加长时间的垂直振动, 使腰椎上下关节突之间接触频率和压应力负荷增加, 研究发现振动组软骨退变更重, 软骨成分和结构发生异常改变, 凋亡细胞和炎性因子表达增加。

II 型胶原纤维、蛋白聚糖和软骨细胞是软骨的主要组成成分, II 型胶原纤维可对抗张力, 而抗压力能力弱, 蛋白聚糖可对抗压力, 抗张力能力弱, 二者通过互补和含量代偿增加的方式对抗一定的振动载荷。本研究中 5 Hz 组 CII 含量较对照组差异不明显, 可能与软骨细胞在力学刺激下代偿合成 CII 有关。而随着振动频率增加, II 型胶原拉力和张力超负荷, 导致其超微结构破坏, II 型胶原纤维变细, 结构排列不齐整, 最终发生降解。OA 伴随软骨细胞凋亡, 本研究中, 随着振动频率加大, 软骨细胞凋亡明显增加。其原因可能为异常应力刺激炎性因子增

加、干扰细胞能量代谢有关<sup>[5]</sup>。此外,软骨细胞具有合成细胞外基质的作用,随着凋亡细胞增加,合成基质能力下降,基质含量下降造成软骨细胞支持环境改变,诱导细胞凋亡,形成恶性循环。

OA是关节软骨退变晚期的表现,关节炎症因子表达增加,COX-2表达异常是OA的标志炎症因子之一。异常振动载荷使组织中COX-2含量增加,进而上调PGE<sub>2</sub>的表达,促进OA发生。本实验结果显示振动频率与COX-2、PGE<sub>2</sub>表达呈正相关,说明振动有促进软骨关节炎形成的作用。PGE<sub>2</sub>是重要的炎症介质,其通过增加破骨细胞活性、刺激基质金属蛋白酶生成、聚集白细胞得方式,发挥致炎效力。PGE<sub>2</sub>是直接致痛物质,有研究<sup>[6]</sup>发现PGE<sub>2</sub>含量与VAS评分及Oswestry腰痛评分呈正相关。本实验结果显示振动组PGE<sub>2</sub>表达多于对照组,随着振动增加,COX-2和PGE<sub>2</sub>在全层软骨中表达增加,增大了与腰椎小关节或滑膜中的神经纤维接触的可能,从而直接诱发大鼠腰痛。同时PGE<sub>2</sub>有增加兴奋性氨基酸和P物质的释放及降低抑制性甘氨酸的作用,从而降低腰椎小关节痛阈,使其在较低应力下产生痛感<sup>[7]</sup>。此外,COX-2通过上调白三烯、缓激肽、PGE<sub>2</sub>等致痛物质表达,酶解神经根细胞膜磷脂,也可使痛觉过敏,从而诱发腰痛<sup>[8]</sup>。PGE<sub>2</sub>和COX-2既是炎症介质,又是致痛物质,提示腰椎小关节炎与腰痛发生密切相关,但本实验并未建立大鼠神经性疼痛模型,只能通过细胞因子分泌量间接评价振动对腰痛的效应。

骨质疏松症是一种以骨量下降和骨微结构破坏为特征的全身性骨病,振动在抗骨质疏松中有潜在价值。研究<sup>[9]</sup>发现一定频率复合振动能够促进成骨,力学信号过弱或过强抑制成骨,甚至导致骨细胞凋亡。而对于单向振动与骨密度的关系少有研究,本实验针对垂直方向与骨密度关系进行研究,发现振动组大鼠股骨颈BMD并未明显增加,说明其成骨作用不显著,这与报道的复合振动对骨密度影响不一致。产生这种现象可能因为①振动强度不宜,未能激活细胞活性物质和蛋白合成或振动时间短成骨周期不足<sup>[10]</sup>;②振动可通过影响肌肉牵张收缩增加骨应力,使骨骼生长,腰背肌纤维按复合方向排列,垂直振动使其他方向肌纤维承力减少,加速肌肉疲劳,甚至造成肌肉强直,使上述成骨效力减弱;③振动造成软骨退变、缺损,COX-2、PGE<sub>2</sub>等具有破骨作用细胞因子分泌增多,抑制骨质增加。改善骨密度需避免不适当强度的单向垂直振动。

本实验通过对大鼠施加长时间的垂直振动,发现5~60Hz的垂直振动可加速大鼠腰椎小关节软骨退变,且随着振动频率增加,软骨退变情况呈加重趋势,细胞结构和细胞组成均明显改变。从动物实验角度证明一定频率垂直振动是腰椎小关节退变的危险因素。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Li J, Muehleman C, Abe Y, et al. Prevalence of facet joint degeneration in association with intervertebral joint degeneration in a sample of organ donors. *J Orthop Res*, 2011, 29: 1267-1274.
- [2] 张继业,王吉兴. 高应力与腰椎小关节方向变化关系的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2013, (7): 648-653. (in Chinese)  
Zhang JY, Wang JX. Experimental study on the orientation of lumbar facet joints induced by high stress in rabbits[J]. *Chinese Journal of Spine and Spinal Cord*, 2013, (7): 648-653.
- [3] Mahjoub M, Berenbaum F, Houard X. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int*, 2013, 23: S841-846.
- [4] 杨达宇,高天君. 振动对大鼠骨质疏松及椎间盘退变影响的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2013, 19(5): 453-457.  
Yang DY, Gao TJ. Experimental study of the effect of vibration on osteoporosis and the degeneration of the lumbar intervertebral disc in rats[J]. *Chin J Osteoporos*, 2013, 19(5): 453-457. (in Chinese)
- [5] 郭磊,高天君,马远征,等. 不同振动频率对大鼠椎间盘退变及骨密度影响的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(5): 513-516 + 520.  
Guo L, Gao TJ, Ma YZ, et al. Experimental study of the influence of the different vibration frequency on the degeneration of the lumbar intervertebral disc and BMD in rats[J]. *Chin J Osteoporos*, 2014, 20(5): 513-516, 520. (in Chinese)
- [6] Pelletier JP, Johanne MP, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for this selection of new therapeutic targets[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(6): 1237-1247.
- [7] Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, et al. PGE<sub>2</sub> selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 34-40.
- [8] 姜志钊,李毅中. 环氧合酶-2、前列腺素E<sub>2</sub>在突出腰椎间盘中的表达及其意义[J]. *临床骨科杂志*, 2014, 06: 730-733.  
Jiang ZZ, Li YZ. Expression and clinical significance of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> in lumbar disc herniation [J]. *Journal of Clinical Orthopaedics*, 2014, 06: 730-733. (in Chinese)
- [9] 陆铁,仲维佳. 全身振动对预防老年女性骨质疏松性骨折的作用[J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 05: 1113-1116.  
Lu T, Zhong WJ. Effect of whole body vibration on the postmenopausal osteoporotic fracture [J]. *Chin J Clinicians*, 2012, 05: 1113-1116. (in Chinese)
- [10] Gaboury I, Corriveau H, Boire G, et al. Partnership for fragility bone fracture care provision and prevention program (P4Bones): study protocol for a secondary fracture prevention pragmatic controlled trial. *Implement Sci*, 2013, 24: 8-10.

(收稿日期:2016-05-02,修回日期:2016-07-15)