

低强度脉冲超声波防止废用性骨质疏松症

刘沐青¹, 郭霞², 王晓云²

1. 清华大学附属玉泉医院手外科, 北京 100049

2. 香港理工大学康复治疗科学系, 香港 999077

摘要 肢体长期制动导致的骨质疏松症在临床中较为常见。本实验应用低强度脉冲超声波 (LIPU) 治疗大鼠废用性骨质疏松, 试图探讨 LIPU 在防止废用性骨质丢失方面的作用及其作用机理。将 40 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只。髌腱切除组 (2 组): 切除左侧髌骨和 5mm 髌韧带, 其中一组接受 LIPU 治疗, 一组无治疗; 神经切除组 (2 组): 切除左侧坐骨神经 1cm, 其中一组接受 LIPU 治疗, 另一组无治疗。超声波治疗组于左侧胫骨近端接受低强度脉冲超声波治疗。所有动物于 4 周后安乐死, 取材。对双侧大鼠胫骨进行骨定量 CT (pQCT) 检查, 测量平均骨密度 (aBMD), 以及骨小梁面积、周长, 计算骨小梁体积 (BV/TV, %)、宽度 (Tb. Wi, μm)、数量 (Tb. N, mm) 和分布 (Tb. Sp, μm)。对结果数据进行统计学分析发现, 所有动物的 aBMD 均有减少。在髌腱切除组, 经过 LIPU 治疗的胫骨 aBMD 没有显著降低 ($P < 0.05$), 于神经切除组有减低 ($0.01 < P < 0.05$)。在神经切除组中, 经过 LIPU 治疗的骨小梁体积明显高于非治疗组 ($P < 0.01$)。骨小梁宽度和骨小梁分布也有相应的差异 ($0.01 < P < 0.05$)。骨的形态学观察也有同样表现。由此可见, LIPU 可以对防止废用性骨质疏松, 尤其是无神经损伤的动物模型。

关键词 废用性骨质疏松症; 低强度脉冲超声波; 骨形态计量学; 骨密度

中图分类号 R683, Q681

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)11-0043-04

Effects of Low Intensity Pulsed Ultrasound on Prevention of Disused Osteoporosis

LIU Muqing¹, GUO Xia², WANG Xiaoyun²

1. Department of Hand Surgery, Yuquan Hospital, Tsinghua University, Beijing 100049, China

2. Department of Rehabilitation Sciences, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong 999077, China

Abstract This paper studies the therapeutic effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPU) on prevention of disused osteoporosis, by testing on tenotomy and neurectomy rats. A total of 40 male Sprague-Dawley rats were randomly assigned into four groups, each with 10 animals. They are tenotomy groups, which underwent left patellar-tenotomy, with/without ultrasound treatment and neurectomy groups, which underwent left sciatic-neurectomy, with/without ultrasound treatment. The ultrasound treatment groups were treated with $30\text{mW}/\text{cm}^2$ pulsed low-intensity ultrasound stimulation for 15 minutes a day on the lateral site of the left legs. The sham ultrasound groups (those without ultrasound treatment) did not receive any ultrasound treatment. All animals were euthanized after 4 weeks. Both tibias of rats were prepared for peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT). Average Bone Mineral Density (aBMD) was measured. For the study of bone histomorphometry of proximal tibia, trabecular bone morphometry measurements were performed on the area beginning 1mm proximal to the growth plate (epiphysis). Total tissue area, trabecular area, and perimeter were measured. These endpoints were used to calculate the trabecular bone volume (BV/TV, %), trabecular width (Tb. Wi, μm), trabecular number (Tb. N, mm) and trabecular separation (Tb. Sp, μm) according to the methods of Parfitt *et al.* Statistical analysis was performed by using SPSS 11.5 data analysis software. All data were expressed as the mean $\pm$ SD, and difference were considered significant if $P < 0.05$. The decrease of aBMD in the operated tibia versus non-operated tibia was 16%, and that was 17% in the neurotomy group. In ultrasound groups, aBMD did not decrease significantly in tenotomy group ($P > 0.05$). But difference was found between operated and non-operated tibia in neurotomy group ($0.01 < P < 0.05$). Moreover, in neurotomy groups, difference was found in bone loss percentage change between groups with and without ultrasound treatment. There was

收稿日期: 2010-01-21

作者简介: 刘沐青, 副主任医师, 研究方向为骨质疏松症, 电子信箱: liumuqing2@hotmail.com

no difference in tenotomy group. In neurotomy groups, BV/TV of operated tibia decreased significantly for ultrasound group as compared with the group without ultrasound treatment ($P<0.01$). There were also differences between operated and non-operated tibia in Tb. Wi, Tb. Sp between groups with and without ultrasound treatment ($0.01<P<0.05$). In tenotomy groups, there was only difference in BV/TV between operated and non-operated tibia in groups without ultrasound treatment. The study confirms the effect of LIPU on the prevention of the bone loss in disuse osteoporosis, especially in the disuse model without nerve injury. And the nerve distributed in the tissue may play an important role. The mechanism of the nerves acting on the bone growth needs further investigation.

Keywords disused osteoporosis; low intensity pulsed ultrasound; bone histomorphometry; bone mineral density

0 引言

肢体长期制动废用会由于缺乏运动对骨髓产生的机械刺激而导致骨质丢失。在废用性骨质疏松的研究中,多种动物模型被广泛采用,包括:石膏管型固定、肌腱切断、周围神经切断或半侧脊髓切断等。1989年,Weinreb等^[1]将切断坐骨神经和切断肌腱的动物股骨骨质丢失的程度进行比较,发现动物后肢固定后骨质疏松是由于骨吸收增加和成骨减少产生的。近年来,利用这种动物模型对废用性骨质疏松进行研究^[2-4],取得了令人满意的结果。如今,人们开始关注超声波对治疗和防止骨质疏松症的作用^[5]。在动物和人体实验中,低强度超声波对加速骨折愈合的疗效已经得到证实。然而其机制尚不明。超声波是一种机械能,即一种可以穿透并进入人体组织的压力声波,其频率超出人类听力所及的范围。虽然用于促进骨折愈合的低强度脉冲超声 (Low Intensity Pulsed Ultrasound, LIPU) 强度只有 $30\text{mW}/\text{cm}^2$,但它仍然是一个机械力量,而骨骼系统对机械刺激的敏感性很强,超声波可以通过这种机械刺激影响骨量和骨形态。在本实验中,对切断坐骨神经和腓神经诱发的废用性骨质疏松模型进行研究,比较 LIPU 对废用性骨质疏松的治疗作用,以确定感觉神经的损伤是否会影响 LIPU 的治疗作用,并进一步讨论其可能的生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验设计

Sprague-Dawley 大鼠 (购买自香港中文大学) 40 只, 2~3 个月龄, 雄性, 随机分配到 4 个组, 每组 10 只, 分组进行手术。腓神经切除组: 切除左侧 5mm 腓神经和腓骨, 关闭伤口。其中一组接受 LIPU 治疗 (TTUS), 一组无治疗 (TT 组)。神经切除组: 定位左侧坐骨神经位置, 切开皮肤, 钝性分离肌肉, 暴露坐骨神经, 切除神经 1cm, 关闭伤口。其中一组接受 LIPU 治疗 (NTUS), 另一组无治疗 (NT)。

1.2 超声波治疗程序

术后 24h, 每日对 TTUS 和 NTUS 组大鼠进行超声波治疗。大鼠麻醉后, 于左侧胫骨近端剃毛, 涂布耦合凝胶, 放置直径为 2.5cm 的换能器探头, 探头覆盖范围包括胫骨近端骨骺, 干骺端和骨干。使用频率为 1.5MHz 的超声波, 脉冲时长 200ms, 间歇 800ms, 输出强度为 $30\text{mW}/\text{cm}^2$, 治疗时间为 15min, 每日一次。所有治疗都于同一时段进行, 实验周期为 28d。

1.3 骨定量 CT 扫描

对双侧大鼠胫骨进行骨定量 CT (peripheral Quantitative Computed Tomography, pQCT) 扫描 (M-pQCT540.001.E, Stratec Medizintechnik GmbH) 检查, 测量平均骨密度 (average Bone Mineral Density, aBMD)。扫描参数设置: 在膝关节远端 2mm (骨骺) 至 10mm (骨干) 间扫描, 每层间距为 1mm。

1.4 骨形态计量学

术后 28d, 所有大鼠麻醉后以 4% 多聚甲醛灌注, 完整取下双侧胫骨, 固定在 4% 多聚甲醛中超过 12h。所有标本 (每组 10 对) 用 10% EDTA 溶液脱钙 4 周。再将标本于 30% 饱和蔗糖水溶液中过夜, 做 $6\mu\text{m}$ 冰冻切片 (Leica Model CM1900), HE 染色。对胫骨近端的骨小梁形态观察、测量, 该区域近端 1mm 处为生长板 (骨骺)。根据 Parfitt 等^[6-7]的方法, 测量、骨小梁面积, 周长, 计算 BV/TV , Tb. Wi, Tb. N 和 Tb. Sp。

1.5 统计分析

用 SPSS 11.5 数据分析软件进行统计学分析。将双侧 (手术侧与非手术侧) aBMD、 BV/TV , Tb. Wi, Tb. N, Tb. Sp 进行配对 t 检验。手术侧/非手术侧骨密度比值为骨丢失百分比, 将超声治疗与非超声治疗组的骨丢失所百分比进行独立 t 检验。所有数据都以平均值 $\pm$ 标准差 ($\text{mean} \pm \text{SD}$) 表示, 若 $P<0.05$, 则认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pQCT

无论切除腓神经还是坐骨神经都导致不同程度的骨质疏松。在非 LIPU 治疗组中, 将手术侧与非手术侧 (正常骨) 的 aBMD 进行比较, 发现手术侧胫骨 aBMD 在骨骺水平显著低于正常骨 ($P<0.01$, 图 1); 而在骨干水平则没有显著性差异 ($P>0.05$, 图 1)。比较各组骨骺 aBMD 水平, 发现在腓神经切除组中, 经过 LIPU 治疗的胫骨 aBMD 与正常骨相比没有经过治疗的显著降低 ($P<0.05$, 图 2); 神经切除组, 经过 LIPU 治疗后, aBMD 与正常骨仍存在差异 ($0.01<P<0.05$, 图 2)。

2.2 骨形态计量学

表 1 是骨骺水平骨形态计量学指标的结果。在神经切除组中, 经过 LIPU 治疗的 BV/TV 明显高于非治疗组 ($P<0.01$)。Tb. Wi 和 Tb. Sp 也有相应的差异 ($0.01<P<0.05$)。

这种骨形态变化由图 3 可以看出。在神经切除组, 手术侧胫骨与非手术侧胫骨 (右侧) 比较, 骨小梁明显变薄, 并且更加分散。在腓神经切除组, 只有骨小梁体积有此变化。

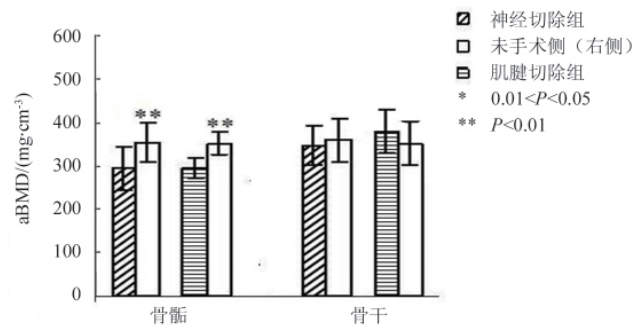


图 1 非超声波治疗组胫骨骨骺和骨干的 aBMD 比较
Fig. 1 aBMD of epiphysis and diaphysis of tibias in Sham-LIPU groups

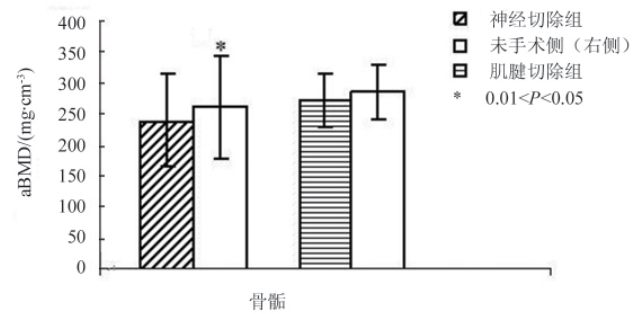


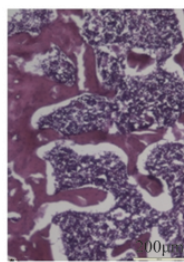
图 2 LIPU 治疗组骨骺的 aBMD 比较
Fig. 2 aBMD of epiphysis in LIPU groups

表 1 胫骨骨骺骨形态计量学结果 (mean±SD)
Table 1 Bone histomorphology of epiphysis tibia (mean±SD)

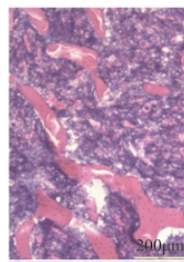
		<i>n</i>	<i>BV/TV</i> /%	Tb. Wi/ μ m	Tb. N/mm	Tb. Sp/ μ m
神经切除	OP	10	23.56±7.17**	53.31±11.12*	4.41±0.96*	256.94±93.42*
非 LIPU 治疗组	NOP		34.17±7.95	62.46±10.80	5.48±0.88	179.07±45.82
神经切除	OP	10	21.64±7.86**	34.23±12.71*	8.01±5.42	231.84±165.50*
LIPU 治疗组	NOP		36.71±13.14	46.67±13.35	8.86±4.78	148.02±103.71
肌腱切除	OP	10	36.26±4.96*	64.40±14.50*	5.79±0.94	161.62±27.57
非 LIPU 治疗组	NOP		50.58±1.08	84.24±14.25	5.97±0.43	120.91±34.47
肌腱切除	OP	10	24.72±4.31	51.30±6.46	4.87±0.88	229.71±51.49
LIPU 治疗组	NOP		28.79±5.47	51.88±7.80	5.65±0.91	190.27±41.91

注: OP,手术侧;NOP,非手术侧;*BV/TV*,骨小梁体积;Tb. Wi,骨小梁宽度;Tb. N,骨小梁数量;Tb. Sp,骨小梁分布。与非手术侧比较,* $0.01 < P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

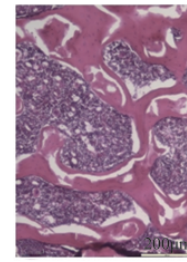
Notes: OP, operated; NOP, non-operated; *BV/TV*, Trabecular bone volume; Tb. Wi, Trabecular width; Tb. N, Trabecular number; Tb. Sp, Trabecular separation. *, $0.01 < P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared with NOP.



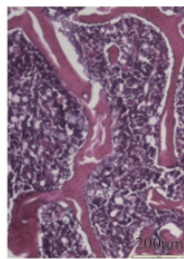
(a) 神经切除-非 LIPU 治疗组
(a) Neurotomy group with sham-LIPU treatment



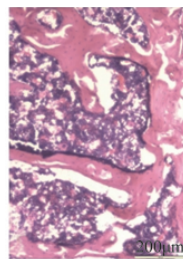
(b) 神经切除-LIPU 治疗组
(b) Neurotomy group with LIPU treatment



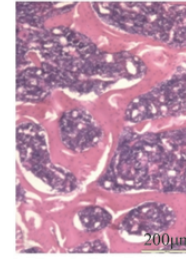
(c) 非手术胫骨
(c) Non-operated tibia



(d) 肌腱切除-非 LIPU 治疗组
(d) Tenotomy group with sham-LIPU treatment



(e) 肌腱切除-LIPU 治疗组
(e) Tenotomy group with LIPU treatment



(f) 非手术胫骨
(f) Non-operated tibia

图 3 胫骨骨骺 HE 染色
Fig. 3 HE staining of epiphysis in tibia

3 讨论

本实验结果表明,切除髌腱和切除坐骨神经导致的肢体废用均可造成骨量减少。本研究动物髌腱切除后胫骨骨量 aBMD 减少 16%,坐骨神经切除后 aBMD 减少 17%,这与以往的研究结果相似^[1]。Tuukkanen 等^[8]也指出,神经切除术后骨量丢失与石膏管型固定后骨量丢失程度相同。此外, BV/TV、Tb. Wi 和 Tb. Sp 在术后也有明显的变化。本实验所得数据肯定了这一结论。实验结果表明,哺乳动物骨骼缺乏生物力学功能刺激会导致骨质疏松。

与骨骺处骨密度变化不同,各组动物骨干 aBMD 均无显著减低。以往的实验显示,皮质骨和松质骨在解剖生物力学以及代谢特性等方面有着明显的不同^[9]。Frost^[10]指出,松质骨的代谢活性比皮质骨高 8 倍。Hiroshi 等^[11]指出,皮质骨密度在切除神经之后与未切除神经组没有显著差别。骨干与骨骺细胞组成的差异可能是导致这一结果的原因。

在骨质疏松的治疗中,超声波辅助治疗开始受到关注。超声波是一种机械能,即能穿透并在人体中传播的高频率压力波^[12]。LIPU 可对组织产生微机械应力和应变。许多支持性证据表明,在体外,LIPU 可以刺激细胞转化并促进整个骨形成过程。在体研究中,LIPU 在促进骨折修复方面起到更加重要的作用,可促进软骨内成骨并加速该区域骨密度恢复^[13]。

4 结论

本实验结果表明,LIPU 能够防止废用性骨质疏松,在髌腱切除组效果尤为显著。切除髌腱的大鼠经过 LIPU 治疗后,切除髌腱侧(左侧)的胫骨骨密度以及骨小梁形态学参数与未手术侧(右侧)相比,无显著差异。而未经 LIPU 治疗的胫骨骨密度明显减低,说明 LIPU 刺激了骨形成,减少了骨质丢失。在神经切除组中,LIPU 的治疗就没有如此显著的作用。即使经过超声波治疗,此组动物的骨丢失和骨形态学变化仍然明显。

研究证实的 LIPU 可以对防止废用性骨质疏松,尤其是无神经损伤的动物模型,可能是组织中的神经分布在这一过程中起到重要作用,该机制尚待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Weinreb M, Rodan G A, Thompson D. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation[J]. *Bone*, 1989, 10: 187-194.
- [2] Tarvainen R, Amala I, Olkkonen H. Clodronate prevents immobilization osteopenia in rats[J]. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1994, 65(6): 643-646.
- [3] Iwamoto J, Takeda T, Katsumata T. Effect of etidronate on bone in orchidectomized and sciatic neurectomized adult rats[J]. *Bone*, 2002, 30: 360-367.
- [4] Thompson D D, Seedor J G, Weinreb M. Aminohydroxybutane bisphosphonate inhibits bone loss due to immobilization [J]. *Journal of Bone*

Mineral Research, 1990, 5(3): 279-286.

- [5] Warden S J, Bennell B, Matthews D. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury [J]. *Bone*, 2001, 5: 431-436.
- [6] Parfitt A M, Mathews C, Villanueva A R. Relationships between surface and thickness of iliac trabecular bone in aging and osteoporosis: Implications for the macroanatomic and cellular mechanism of bone loss [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1983, 72: 1396-1409.
- [7] Parfitt A M, Drezner M K, Glorieux F H. Bone Histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units [J]. *Journal of Bone Mineral Research*, 1987, 2: 595-610.
- [8] Tuukkanen J, Jaloara P, Vaananen K. Calcitonin treatment of immobilization osteoporosis rats[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1991, 141(1): 119-124.
- [9] Sander T, Felsenberg D, Kalender W A. Compact and trabecular components of the spine using quantitative computed tomography [J]. *Calcified Tissue International*, 1992, 50: 502-506.
- [10] Frost H M. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling [J]. *Calcified Tissue Research*, 1969, 3: 211-237.
- [11] Hiroshi Y, Takaaki I, Shinjiro T. Effects of sciatic neurectomy on the femur in growing rats: Application of peripheral quantitative computed tomography and Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 1999, 17: 259-265.
- [12] Duarte L R. The stimulation of bone growth by ultrasound[J]. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 1983, 101: 153-159.
- [13] Shimazaki A, Inui K, Azuma Y. Low intensity pulsed ultrasound accelerate bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits [J]. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2008, 2B: 1077-1082.
- [14] Klineberg I, Murray G. Osseoperception: Sensory function and proprioception[J]. *Advances in Dental Research*, 1999, 13: 120-129.

(责任编辑 王芷)

本期推理小游戏答案

老板是骗子,公司共有 36 人。
全公司的人都围在餐桌旁吃饭,并且都说左边的人不是老实人,也就是说骗子说自己左边的人不是老实人,骗子的左边必为老实人,老实人说自己的左边不是老实人,那老实人的左边必为骗子。所以一定是老实人和骗子交叉坐的。那么公司的人数就应该是偶数,这样老实人和骗子的数目才能相同。那么秘书的话就应该是正确的,公司共有 36 个人,老板是个骗子。

本期好玩的数学——细绳算时间答案

细绳 A、B 有 4 个头。先同时点燃 A 的两头与 B 的其中一头。当 A 绳两头火焰相遇而燃完时,正好用掉了 30 分钟。在此时,马上点燃 B 绳的另一头。于是,当 B 绳两头的火焰最终相遇而燃完时,意味着又过去了剩下时间的一半(即 15 分钟)。这样,加上前面的 30 分钟,就可以确定出一段 45 分钟的时间。