

· 基础研究 ·

脉冲电磁场对大鼠胫腓骨骨折愈合的影响

刘朝旭 吴华 杨勇 李贵振 赵文春 汤翔宇

【摘要】目的 研究脉冲电磁场对大鼠胫腓骨骨折愈合的影响,并探讨其作用机制。**方法** 选择 30 只 Sprague-Dawley 雄性大鼠,建立右侧胫腓骨中段骨折模型后随机分为刺激组与对照组。刺激组大鼠接受频率为 15 Hz、强度为 1.0 mT 的脉冲电磁场刺激。分别于术后第 1,2,3,4,5 周末,拍摄 X 线片评价骨折愈合情况;相同时间点鼠尾静脉取血,采用对硝基苯磷酸盐法检测血清碱性磷酸酶(ALP)活性,酶联免疫吸附分析法检测大鼠骨钙素(BGP)含量,偶氮胂Ⅲ法测定钙离子含量,磷钼酸盐复合物直接分析法测定磷离子含量。于术后第 3,5 周末行病理学切片检查,观察骨痂组织学变化。**结果** 与对照组相比,刺激组骨折部位骨痂的形成量增加,骨折线消失加快,血清中 ALP 活性提高($P < 0.05$),血清中 BGP 的含量增加($P < 0.05$),骨痂中软骨内化骨和成熟小梁骨提前出现,骨痂中胶原基质的含量增加,骨痂塑形进程加快。**结论** 频率 15 Hz、强度 1.0 mT 的脉冲电磁场对大鼠胫腓骨骨折愈合有显著的促进作用。

【关键词】 脉冲电磁场; 碱性磷酸酶; 骨钙素; 血清钙

The effects of pulsed electromagnetic field on healing of tibia and fibula fractures in rats LIU Chao-xu*, WU Hua, YANG Yong, LI Gui-zhen, ZHAO Wen-chun, TANG Xiang-yu. * Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: WU Hua, Email: wuhua360@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To study the effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) in promoting tibia and fibula fracture healing in rats. **Methods** Thirty rats were divided randomly into two groups after establishing the animal model of artificial tibia and fibula fracture: a PEMF treated group and a control group. Radiographs were taken immediately postoperatively and once a week thereafter until being sacrificed after week 5. The blood was sampled to measure the activity of alkaline phosphatase (ALP) and the concentration of bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins (BGP), calcium and phosphate in serum once a week, respectively. Histological sections were taken at weeks 3 and 5 to observe the pathological change of bony callus. **Results** PEMF of 15 Hz and 1.0 mT could significantly increase the amount of bony callus, significantly increase the amount of bony callus, promote the disappearing of fracture lines and the appearance of endochondral ossification and mature bone trabecula. The amount of collagen in bony callus raised and the process of callus moulding accelerated in PEMF treated group. In addition, the activity of ALP ($P < 0.04$) and the concentration of BGP ($P < 0.05$) in serum increased. **Conclusions** The PEMF of 15 Hz and 1.0 mT can obviously promote fracture healing of tibia and fibula in rats.

【Key words】 Pulsed electromagnetic field; Alkaline phosphatase; Bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing protein; Serum calcium

Bassett 等^[1]于 20 世纪 70 年代首次提出利用脉冲电磁场(pulsed electromagnetic field, PEMF)治疗骨折不愈合。后来,电磁场又被提出可以用于先天性骨缺损、关节固定失败、骨坏死(如股骨头无菌性坏死)、骨移植及脊柱椎体骨性融合术后等的治疗。多年来,电磁场作为一种物理疗法在治疗骨不连和促进骨愈合等

骨科领域得到了广泛的研究,证明其在缩短愈合时间、提高愈合质量等方面有良好的疗效。但利用电磁场治疗上述疾病的具体机制到目前为止尚不明确。本实验从血液生化学和组织形态学的角度探讨 PEMF 促进骨折愈合的作用机制,为临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

美国 Sigma 公司提供的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、对硝基苯酚磷酸盐;美国 ADL 公司提供的大鼠骨钙素(bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing protein, BGP)酶联免疫吸附

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.03.004

基金项目:国家自然科学基金项目(50477043)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(刘朝旭、吴华、杨勇、李贵振),放射科(汤翔宇);海军工程大学电力电子技术应用研究所(赵文春)

通信作者:吴华,Email: wuhua360@yahoo.com.cn

分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒;上海产血清钙检测试剂盒和血清无机磷检测试剂盒。

美国 BIO-TEK 公司产 ELX-800UV 型酶标检测仪;美国柯达公司生产的数字式 X 线摄影机;Helmholtz 线圈式磁场发生器由海军工程大学电机系设计与制造,频率为 15 Hz,正弦波,强度连续可调。

二、实验动物

28 只清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 250~300 g,由同济医学院实验动物中心提供。

三、大鼠胫腓骨中段闭合性骨折模型建立及分组

手术前适应性饲养 1 周,参照梁春雨等^[2]介绍的方法制作大鼠胫腓骨中段闭合骨折模型。操作如下:以 10 g/L 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉大鼠后,将其仰卧位固定于手术台上,常规去毛、备皮、碘伏消毒;于右侧胫骨内侧做一 1 cm 长的纵行切口;钝性分离肌肉、神经和血管,显露胫骨;用线锯在胫骨与腓骨中部将其横行锯断,然后以直径约 1.0 mm 的克氏针逆行穿入骨折近端并从胫骨粗隆上方穿出,骨折复位后再将其顺行穿入骨折远段髓腔;用生理盐水冲洗,逐层关闭伤口。术后每只大鼠肌注青霉素 5 万 U,以预防感染。麻醉动物清醒后恢复自由活动和饮食,分为刺激组和对照组,每组 14 只。

四、PEMF 刺激

术后第 2 天开始对刺激组给予 PEMF 治疗:将大鼠放入磁场发生器的两个线圈之间,使磁力线可以穿过骨折部位,线圈距离骨折处约 3 cm;磁场强度为 1.0 mT,频率为 15 Hz,每次作用 3 h,每日 2 次(间隔 6 h)。对照组不予 PEMF 刺激,2 组均于实验第 3、5 周末处死。

五、测定指标

1. 拍摄 X 线片:分别于造模后第 1、2、3、4、5 周末,在同济医院放射科对刺激组和对照组大鼠拍摄 X 线片,评价骨折愈合情况。

2. ALP 活性检测:分别于造模前及造模后第 1、2、3、4、5 周末,采用鼠尾静脉取血法采血约 1 ml,室温静置 1 h 后于 4℃ 以 2500 转/min 的速度离心 15 min,取血清。取血前大鼠禁食 12 h,不禁水。采用对硝基苯磷酸盐法测定 ALP 活性,96 孔板每孔加入 10 μ l 血清反应 30 min,检测 λ 为 405 nm 时的吸光值,计算 ALP 活性(U/L/min)。

3. BGP 含量检测:分别于造模前及造模后第 1、2、3、4、5 周末按照上述方法取大鼠血清,采用 ELISA 法检测血清 BGP 含量。按照检测试剂盒说明书进行操作,检测 λ 为 450 nm 时的吸光值,以吸光度值为纵坐标(Y),相应的 BGP 标准品浓度为横坐标(X),作相

应曲线,样品的 BGP 含量可根据其吸光度值由标准曲线换算出相应的浓度。

4. 血清钙、磷含量检测:分别于造模前及造模后第 1、2、3、4、5 周末按照上述方法取大鼠血清,采用偶氮胂Ⅲ法测定钙离子含量,采用磷钼酸盐复合物直接分析法测定磷离子含量,具体操作按试剂盒说明书进行,浓度以 mmol/L 表示。

5. 病理学检测:于造模后第 3、5 周末,分别随机选刺激组和对照组大鼠各 7 只,断颈法处死,分离患肢胫腓骨,剔除软组织,用 10% EDTA 脱钙液脱钙 4 周,石蜡包埋,切片,HE 染色观察骨痂内成骨及骨小梁形态的改变,Masson 染色观察骨痂内软骨细胞及胶原基质含量。

六、统计学分析

实验所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 版统计软件,应用单因素方差分析进行统计学处理。

结 果

一、X 线片结果

造模后第 1 周末,X 线摄片显示刺激组与对照组大鼠胫腓骨骨折线清晰,骨折部位复位良好,模型建造成功。第 2 周末,对照组大鼠胫腓骨骨折线仍清晰可见,刺激组大鼠胫腓骨骨折线已略显毛糙模糊,并出现骨痂。第 3、4、5 周末的 X 线片显示刺激组与对照组都有骨痂形成,但差别显著:刺激组骨痂形成迅速,骨痂量多,第 4 周末腓骨骨折线已经消失,胫腓骨骨折断端均被大量梭形骨痂包绕;第 5 周末胫骨骨折线基本消失,骨折端愈合,腓骨骨折处的骨痂有减少吸收的迹象,已经开始骨痂塑形。对照组骨痂形成缓慢,骨痂量少,至第 5 周末仍可看到胫骨的骨折线。见图 1。

二、血清 ALP 活性检测结果

刺激组与对照组血清 ALP 活性均呈升高趋势。造模后第 2 周,刺激组血清 ALP 活性较对照组高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);第 4、5 周,刺激组血清 ALP 活性较对照组高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

三、血清 BGP 含量检测结果

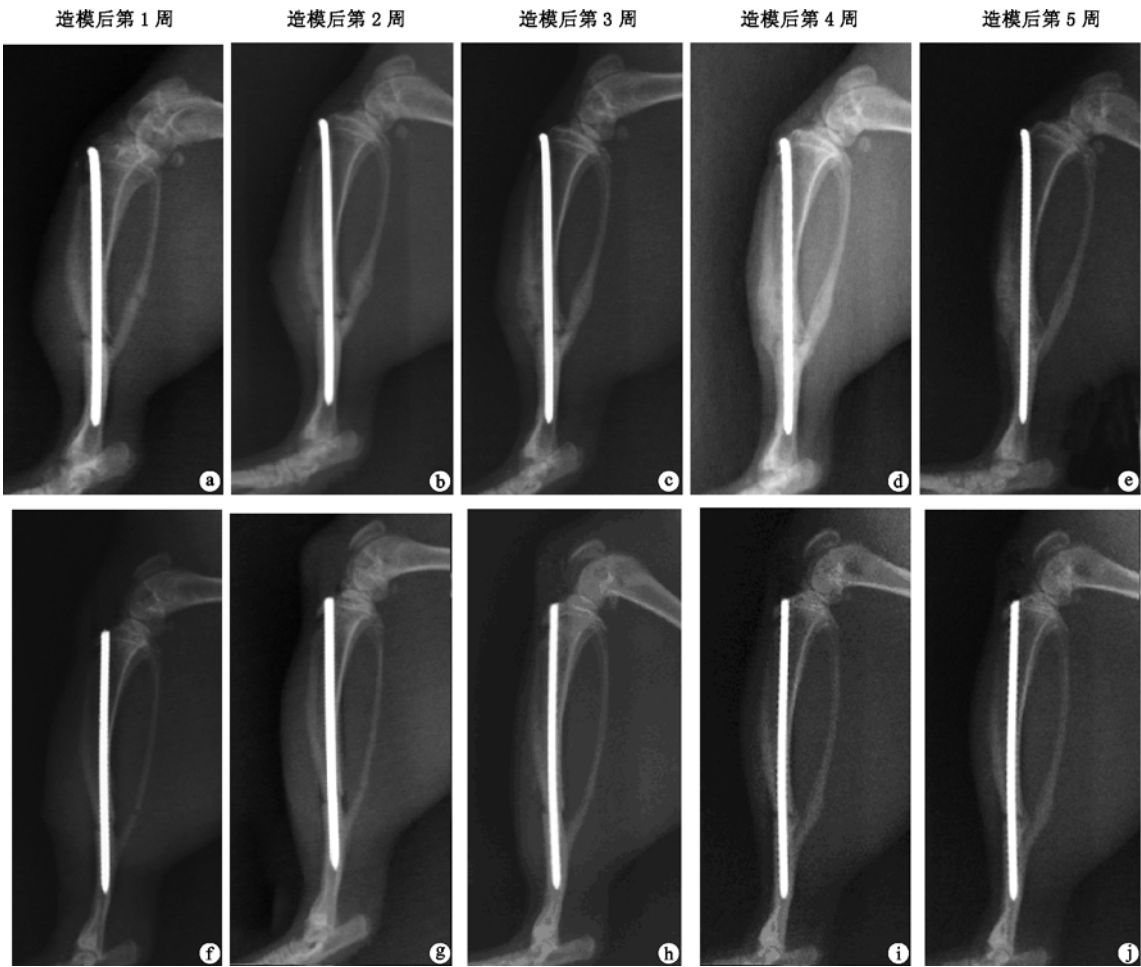
2 组血清 BGP 含量均呈升高趋势。造模后第 3、4、5 周,刺激组血清 BGP 含量较对照组高,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 1。

四、血清钙、磷含量检测结果

2 组血清钙浓度均呈降低趋势。造模后第 1 周,刺激组血清钙浓度较对照组低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);第 2、3、4、5 周,刺激组血清钙浓度明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。

2 组血清磷浓度均呈升高趋势。造模后第 1,5 周,刺激组血清磷浓度较对照组高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其余各时间点刺激组血清磷浓度也高于

对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第 2,3,4,5 周,刺激组的血清钙磷乘积均较对照组高,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 2。



注:a~e 为刺激组;f~j 为对照组

图1 X 线片检查结果

表1 2 组大鼠血清 ALP 活性及 BGP 浓度比较

		($\bar{x} \pm s$)	
组 别	只数	血清 ALP 活性 (U/L/min)	血清 BGP 浓度 ($\mu\text{g/L}$)
刺激组	14		
造模前		329.75 $\pm$ 33.62	3.02 $\pm$ 0.51
造模后第 1 周		337.38 $\pm$ 45.01	3.04 $\pm$ 0.63
造模后第 2 周		352.75 $\pm$ 56.18 ^a	3.21 $\pm$ 0.74
造模后第 3 周		341.84 $\pm$ 98.15	3.94 $\pm$ 0.92 ^a
造模后第 4 周		364.62 $\pm$ 25.43 ^b	4.15 $\pm$ 0.61 ^a
造模后第 5 周		425.91 $\pm$ 47.28 ^b	4.52 $\pm$ 0.77 ^b
对照组	14		
造模前		327.94 $\pm$ 42.75	3.03 $\pm$ 0.47
造模后第 1 周		323.63 $\pm$ 22.44	3.12 $\pm$ 0.55
造模后第 2 周		305.67 $\pm$ 59.47	3.10 $\pm$ 0.14
造模后第 3 周		287.40 $\pm$ 28.27	3.25 $\pm$ 0.66
造模后第 4 周		292.03 $\pm$ 39.06	3.75 $\pm$ 0.58
造模后第 5 周		349.96 $\pm$ 48.53	3.81 $\pm$ 0.47

注:与对照组同期比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

表2 2 组大鼠血清钙、磷离子浓度及钙磷乘积比较

		($\bar{x} \pm s$)		
组 别	只数	血钙离子 浓度(mmol/L)	血磷离子浓度 (mmol/L)	血清钙磷 乘积
刺激组	14			
造模前		1.44 $\pm$ 0.09	3.51 $\pm$ 0.42	4.29 $\pm$ 1.61
造模后第 1 周		1.40 $\pm$ 0.11	3.55 $\pm$ 0.71 ^a	4.35 $\pm$ 1.73
造模后第 2 周		1.29 $\pm$ 0.20 ^a	3.57 $\pm$ 0.48	4.51 $\pm$ 1.39 ^a
造模后第 3 周		1.16 $\pm$ 0.59 ^a	3.51 $\pm$ 0.52	4.64 $\pm$ 1.26 ^b
造模后第 4 周		1.18 $\pm$ 0.02 ^b	3.61 $\pm$ 0.61	4.72 $\pm$ 1.55 ^b
造模后第 5 周		1.09 $\pm$ 0.06 ^a	3.62 $\pm$ 0.46 ^a	4.79 $\pm$ 1.45 ^a
对照组	14			
造模前		1.43 $\pm$ 0.12	3.47 $\pm$ 0.55	4.27 $\pm$ 1.47
造模后第 1 周		1.41 $\pm$ 0.07	3.43 $\pm$ 0.63	4.33 $\pm$ 1.51
造模后第 2 周		1.47 $\pm$ 0.36	3.52 $\pm$ 0.49	4.35 $\pm$ 1.42
造模后第 3 周		1.35 $\pm$ 0.10	3.50 $\pm$ 0.38	4.41 $\pm$ 1.33
造模后第 4 周		1.31 $\pm$ 0.11	3.54 $\pm$ 0.42	4.46 $\pm$ 1.24
造模后第 5 周		1.28 $\pm$ 0.09	3.55 $\pm$ 0.75	4.52 $\pm$ 1.37

注:与对照组同期比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

五、病理学结果

1. 大体标本:造模后第 5 周末可见对照组骨痂量明显少于刺激组,见图 2。

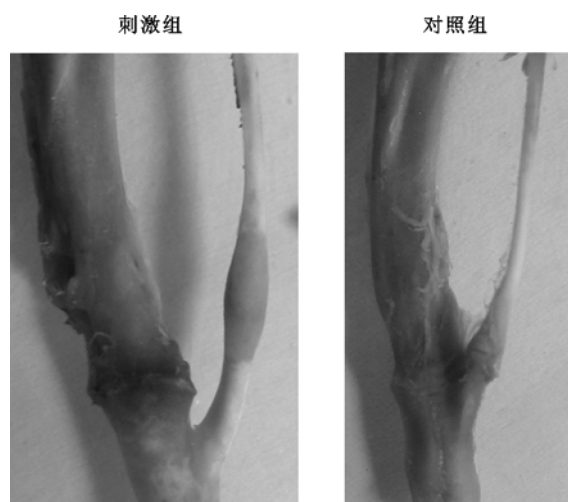
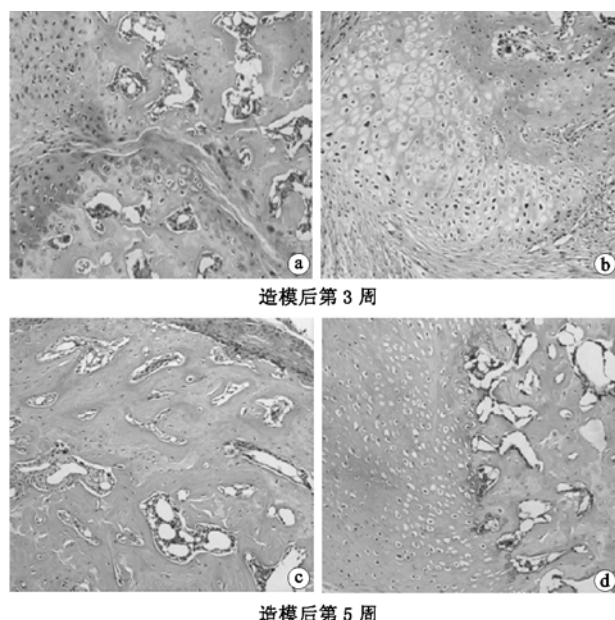


图 2 造模后第 5 周末骨折愈合情况(大体观)

2. HE 染色结果:2 组切片均显示纤维性骨痂逐渐演变为骨性骨痂,但是两种骨痂所占比例明显不同。造模后第 3 周末时,刺激组骨性骨痂明显多于纤维性骨痂,并出现成熟骨小梁,对照组却是以纤维性骨痂为主;第 5 周末时,刺激组已经全部变为骨性骨痂,而对照组骨性骨痂与纤维性骨痂比例相当。见图 3。

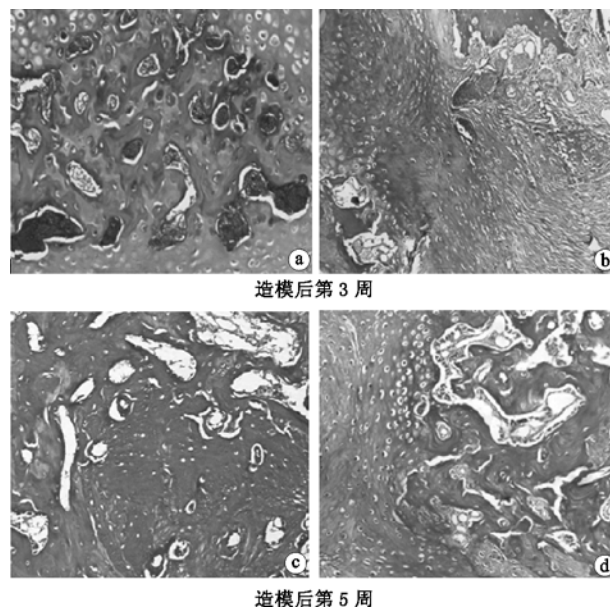


注:a、c 为刺激组;b、d 为对照组

图 3 刺激组与对照组造模后第 3 周和第 5 周骨痂形成情况 (HE 染色, ×100)

3. Masson 染色结果:造模后第 3 周末,对照组可见纤维肉芽组织,软骨细胞较多;而刺激组可以看到骨基质中出现大量初级骨髓腔,软骨细胞较对照组明显

减少,并可见较多的新生胶原成分。第 5 周末,对照组仍可以看到软骨细胞存在,但已经出现骨小梁结构;而刺激组可见大面积的骨基质,并已出现成熟的骨单位。见图 4。



注:a、c 为刺激组;b、d 为对照组

图 4 刺激组与对照组造模后第 3 周和第 5 周骨痂形成情况 (Masson 染色, ×100)

讨 论

电磁环境是骨组织所处的重要微环境之一,电磁场作为一种非侵入性治疗方法,在骨科领域主要用于治疗骨折延迟愈合及不愈合、先天性胫骨假关节以及骨质疏松等疾病,并已取得了较满意的疗效。骨折愈合是机体结缔组织的一种再生修复过程,该过程复杂而有序,主要涉及到两个方面的内容:第一是有关骨折修复的各种细胞的增殖活动,第二是有机基质的形成和无机盐的沉积^[3]。

ALP 可以分解有机磷酸化合物,产生大量的无机磷酸盐离子,促使其与该离子结合成磷酸钙而沉积于骨组织中,其含量变化可预示骨折愈合程度。成骨细胞分泌的 ALP 可以渗透入血液^[4],因此血清 ALP 可作为成骨细胞活跃性的指标,即观察骨折愈合的指标之一。Lohmann 等^[5]研究发现,PEMF 可以增强成骨样细胞的 ALP 活性;本实验室前期的体外实验也证明,电磁场可以促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,从而引起 ALP 活性升高^[6]。上述结论与本实验结果吻合,说明电磁场促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化可能是电磁场促进骨折愈合的作用机制之一。

BGP 是成骨细胞分泌的一种体内最丰富的非胶原骨基质蛋白,由骨和牙齿中的成熟成骨细胞合成,占骨

基质中非胶原蛋白的 25%, 占骨总蛋白的 2%。BGP 由成骨细胞合成、分泌以后, 大部分沉积在骨基质中, 小部分进入血液循环。当骨基质降解时, 其中的 BGP 便进入血液循环中。有研究表明, 血中 BGP 水平与骨中 BGP 水平呈正相关^[7], 因此测定血清 BGP 水平不仅可反映成骨细胞的活性, 在更大程度上反映了骨转换状况。葛保健等^[8]认为, 电磁场刺激对体外培养的小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 mRNA 表达有明显的促进作用。本实验发现, 骨折模型动物经过 PEMF 刺激以后, 血清 BGP 含量显著增高, 进一步说明 PEMF 可以提高成骨细胞活性, 加快骨痂形成以及塑形的速度。

在骨折愈合过程中, 局部环境的微量元素代谢十分活跃^[9], 而钙则是骨折愈合过程中最重要的元素之一。血清中的钙、磷相互作用, 钙磷乘积维持在一定水平, 当超过 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 及 CaCO_3 的浓度积时, 钙磷就在骨的有机质中先形成胶体的磷酸钙, 再沉淀为 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 及 CaCO_3 , 即作为骨的无机盐成分沉淀于骨内。也就是说, 钙磷乘积升高, 有利于钙盐的沉积^[10]。这在我们的实验结果中也得到了验证: 刺激组血清钙浓度显著降低, 钙磷成积升高, 说明电磁场能促进体内的钙在骨痂形成部位沉积, 加快纤维性骨痂向骨性骨痂转化, 增加骨基质含量, 加速骨折愈合。

骨折愈合的过程复杂有序, 分为血肿形成、纤维性骨痂形成、骨性骨痂形成和骨痂改建或再塑 4 个阶段^[11]。本实验结果显示, PEMF 刺激可以提高骨折模型大鼠血清 ALP 活性以及血清 BGP 含量, 并可以促进钙盐在骨折部位沉积, 加快骨折愈合进程, 在相同时间内可以增加骨痂内骨性骨痂含量, 促进骨折愈合。上

述研究所见为 PEMF 在骨科领域的临床使用提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Bassett CA, Pilla AA, Pawluk RJ. A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. Clin Orthop, 1977, 124:128-132.
- [2] 梁春雨, 张柳, 赵文国, 等. 辛伐他汀对大鼠股骨骨折愈合的影响. 第四军医大学学报, 2006, 27:284-286.
- [3] 陈镇秋, 廖威明. 骨伤方冲剂对骨折愈合相关血生化指标的影响. 中医药学刊, 2006, 24:1324.
- [4] 王华松, 黄琼下, 许申明. 骨碎补对骨折愈合中血生化指标及 TGF- $\beta 1$. 中医正骨, 2001, 13:6.
- [5] Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. J Orthop Res, 2000, 18:637-646.
- [6] 郝海虎, 吴华, 张海军, 等. 工频电磁场对骨髓间充质干细胞增殖、分化及其胞浆内钙离子浓度的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29:217-220.
- [7] 杨伟民, 邵斌. 骨代谢生化指标与骨质疏松症. 中国骨质疏松杂志, 2004, 1:118-121.
- [8] 葛保健, 方真华, 赵文春, 等. 工频电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞 BMP-2 和 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26:262-265.
- [9] 蓝文正, 刘国栋, 沙因, 等. 骨折愈合过程中微量元素含量的研究. 中华骨科杂志, 1989, 9:200-204.
- [10] 卞俊, 陈海飞, 宣伟东, 等. 愈骨疗伤胶囊对骨折愈合及其相关血液生化指标的影响. 解放军药学学报, 2008, 24:215-217.
- [11] 李玉林. 病理学. 北京:人民卫生出版社, 2004:41.

(收稿日期:2009-02-20)

(本文编辑:吴 倩)

· 消息 ·

中国康复医学会第 6 届老年康复学术年会将于 2010 年 6 月在北京召开

中国康复医学会第 6 届老年康复学术大会将于 2010 年 6 月 11 日至 13 日在北京召开。本次论坛主题为:提高老年康复水平、关注老年生活质量, 欢迎国内外康复医学科、老年医学科及临床相关学科同仁参加会议并踊跃投稿。

征稿范围: 国内外老年病、老年康复发展趋势; 老年康复综合评估; 老年病康复经验; 老年人营养; 老年神经系统、骨关节病和内科疾病的康复治疗现状和进展; 物理治疗、作业治疗、言语治疗的现状和进展; 传统医学与老年康复; 社区康复; 老年康复经验技术交流; 康复工程等。

来稿要求: 未在国内外杂志上公开发表的康复医学领域最新研究成果等, 具有较强的科学性、先进性和实用性。征文格式请按科技期刊要求(包括目的、方法、结果、结论、参考文献), 文责自负。请一律采用电子版投稿, 论文投稿截止日期:2010 年 5 月 20 日。

会议专用 E-mail:lnkf2010@163.com。