

· 基础研究 ·

超短波对兔激素性股骨头缺血性坏死骨组织 BMP-2 mRNA 的影响

孙强三 袁俊英 王道清 姜森 王晓红

【摘要】目的 观察超短波对兔激素性股骨头缺血性坏死骨组织中骨形态形成蛋白-2 表达的影响。**方法** 30 只新西兰大白兔分为正常组(4 只)和干预组(26 只),干预组采用马血清联合激素复制兔激素性股骨头坏死的模型,经 X 线验证造模成功的有 20 只,再随机分为超短波组(10 只)和造模组(10 只)。造模组不予任何干预;超短波组给予超短波治疗,第一个疗程 15 d,无热量;第二个疗程 15 d,微热量,治疗间隔 5 d。空气栓塞快速处死动物,并取兔双侧股骨头,应用实时荧光定量 PCR 检测骨组织中 BMP-2mRNA 的基因表达情况。**结果** 造模结束时,干预组 BMP-2 的表达为正常组的 0.2001 倍($P < 0.01$),差异有统计学意义;第一疗程结束时,超短波组 BMP-2mRNA 表达量为造模组的 2.738 倍,第二疗程结束时,超短波组 BMP-2mRNA 表达量为造模组的 10.1260 倍(均 $P < 0.01$),差异具有统计学意义。**结论** 超短波可以提高激素性股骨头坏死骨组织 BMP-2mRNA 的表达,从而促进缺血性坏死股骨头的修复。

【关键词】 股骨头缺血性坏死; 超短波; 骨形态发生蛋白-2

The effect of ultrashortwave therapy on the expression of BMP-2 in the early stages of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head SUN Qiang-san, YUAN Jun-ying, WANG Dao-qing, JIANG Miao, WANG Xiao-hong. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of ultrashortwave therapy on the expression of BMP-2 in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head (SANFH). **Methods** Thirty New-Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: a normal group (4 rabbits) and an intervention group (26 rabbits). An animal model of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head was induced through the intravenous injection of horse blood serum and the intraperitoneal injection of methylprednisolone in the intervention group. X-ray examination confirmed the successful induction of SANFH in 20 of the rabbits, who were then subdivided at random into an ultrashortwave therapy group (10 rabbits) and a model group (10 rabbits). The rabbits in the ultrashortwave group were treated with ultrashortwave therapy in two 15-day courses, with a 5-day interval between them. Non-thermal ultrashortwave therapy was given in the first course, then mild thermal ultrashortwave therapy was given in the second. Those in the model group were reared without ultrashortwave therapy. All the animals were sacrificed immediately after the end of the last treatment, and their femoral heads were sampled to observe the expression of BMP-2 using real time fluorescent quantitative PCR. **Results** The expression of BMP-2 mRNA in the intervention group was only one fifth of that observed in the normal group. It was 2.7 to 10 times that observed in the model group. Both differences were significant at the 1% confidence level. **Conclusion** Ultrashortwave therapy can promote the expression of BMP-2 and improve reactivation in avascular necrosis of the femoral head.

【Key words】 Avascular necrosis of the femoral head; Ultrashortwave; Bone morphogenetic protein-2

激素性股骨头缺血性坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH)是临床常见、多发病,因其高致残率一直受到临床医生普遍关注。不管何种原因所引起的股骨头坏死在病理上均表现为股骨头内及局部的血液循环障碍,引起骨的活性成分(骨细胞、骨髓细胞和脂肪细胞)死亡的一种过程^[1]。

本实验中我们应用超短波疗法治疗 SANFH,采用实时荧光定量 PCR(fluorescent quantization PCR, FQ-PCR)法检测超短波组与造模组骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达情况,为超短波临床治疗 SANFH 提供理论依据,并进一步探讨激素性股骨头坏死可能的发病机制。

材料和方法

基金项目:山东省自然科学基金项目(Y2006 C121)

作者单位:250033 济南,山东大学第二医院康复医学科

一、实验材料

1. 动物:24 周龄新西兰大白兔 30 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,由山东省医学科学院动物实验中心提供。饲养条件相同,分笼喂养。

2. 药品与试剂:甲基强的松龙,规格为 500 mg/瓶,1 ml 双室瓶,上室含稀释液(苯甲醇 9 mg 及注射用水),下室为甲泼尼龙酸钠及辅料;马血清,规格为 500 ml/瓶,美国;逆转录试剂盒 TAKARA,大连宝生物公司;BMP-2 荧光定量试剂盒 TAKARA,大连宝生物公司。

3. 超短波治疗仪:采用上海产 LDT-CD31 型落地式超短波治疗机,频率 40.68 MHz,波长 7.3 m,最大输出功率 200 W,200 mm × 150 mm 电极两个。AMI7000 实时荧光定量扩增仪(ABI 美国应用生物公司)。

二、模型复制及检验方法

30 只新西兰大白兔,分为正常组($n=4$)和干预组($n=26$)。

干预组:采用李子荣等^[2]的造模方法进行复制模型,选择兔耳缘静脉,分别于第 1 周和第 3 周,静脉滴注马血清 10 ml/kg 体重。然后于第 5 周腹腔注射甲基强的松龙 40 mg/kg 体重(500 mg 甲基强的松龙稀释用 50 ml 生理盐水稀释,按稀释倍数注射 4 ml/kg 体重),每日 1 次,连续注射 3 d。干预组造模后,对动物进行麻醉,在 Kodak Direct View CR 800 下观察双侧股骨头,6 只不符合要求被剔出实验,剩余 20 只兔符合股骨头早期坏死标准,随机将其再分为超短波组($n=10$)和造模组($n=10$)2 个亚组。

正常组:选择兔耳缘静脉,分别于第 1 周和第 3 周注射与干预组等量的生理盐水,于第 5 周腹腔注射生理盐水(4 ml/kg 体重),每日 1 次,连续注射 3 d。

三、实验干预

正常组和造模组不作任何治疗。超短波组给予超短波治疗,兔双髋部对置电极,间隙 2 ~ 3 cm。第 1 个疗程,超短波无热量治疗 15 d,每日 1 次,每次 15 min,中间间隔 5 d,第 2 个疗程,超短波微热量治疗 15 d,每日 1 次,每次 15 min。

四、FQ-PCR 检测

超短波组 2 个疗程结束后,与正常组和造模组同时采用空气栓塞处死,快速取兔双侧股骨头,提取股骨头的总 RNA,紫外线分光光度法测量其含量和纯度。设计引物的碱基序列如下, β -Actin——F 5'-TGCGG-GACATCAAGGAGAA-3', R 5'-AGGAAGGAGGGCTG-GAACA-3'; BMP-2——F 5'-TTTGCTCAACTCCGT-GAACTCTAA-3', R 5'-ACACCCACAACCCTCCACA-3',大连宝生物公司合成。cDNA 合成试剂盒,按说明书操作,反转录体系液配置为 20 μ l,1000 ng 的总 RNA,设置反应条件为 42℃,10 ~ 15 min;95℃,2 min。PCR

反应体系总量为 20 μ l,其中上述 cDNA 2.0 μ l、SYBR premix 10 μ l、上下游引物各 0.4 μ l。PCR 扩增条件为预变性 95℃ 10 s;95℃ 5 s,60℃ 31 s,40 个循环。

五、图像分析及统计学分析

实时荧光定量 PCR 数据收集主要由 AMI7000 自带软件完成,通过软件可以计算出所有样本的起始循环数(Ct),公式法^[3]计算得出目的基因的量,数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、X 线结果

复制模型后第 2 周验证造模情况,正常组关节面完整,组织结构清晰,骨密度均匀,详见图 1。干预组可见股骨头点片状骨质疏松,骨密度不均匀,骨小梁界限模糊,符合 Ficat 分期 I 期表现,详见图 2。



图 1 正常组兔股骨头 X 线片 图 2 干预组兔股骨头 X 线片

超短波治疗后,超短波组兔股骨头外形完整,部分标本骨质疏松,骨小梁较为清晰,骨密度减低,未见有软骨下骨折和股骨头塌陷,详见图 3。造模组可见股骨头结构不清,可见广泛的囊性变及硬化区,有的可见股骨颈部位骨折。尚未见软骨下骨折和股骨头塌陷,详见图 4。

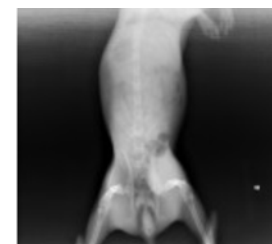


图 3 超短波组兔股骨头 X 线片 图 4 造模组兔股骨头 X 线片

二、FQ-PCR 结果

模型复制成功后,干预组兔股骨头骨组织 BMP-2 的表达量为正常组的 0.2001 倍($P < 0.01$),差异有统计学意义。第一个疗程治疗结束时,超短波组 BMP-2 的表达量是造模组的 2.7438 倍($P < 0.01$),差异有统计学意义。第二个疗程治疗结束时,超短波组 BMP-2 的表达量是造模组的 10.1260 倍($P < 0.01$),差异具

有统计学意义,详见图 5 和表 1。

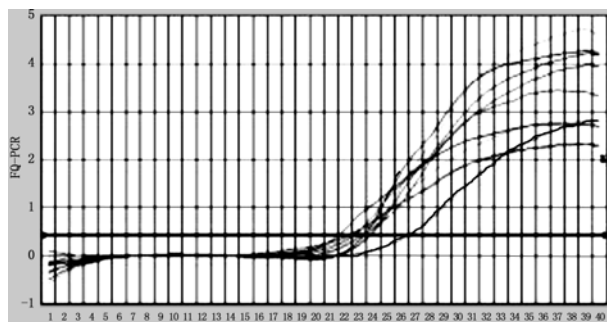


图 5 BMP-2 一次扩增曲线图

讨 论

本研究结果显示,造模成功后,干预组骨组织 BMP-2 的含量较正常组明显减少,说明激素对 BMP-2 有抑制作用,推测可能与激素使骨髓基质细胞向成骨细胞分化减少有关^[4]。骨形态发生蛋白是多功能生长因子,属于转化生长因子- β 超家族,是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白,能够在体内诱导骨和软骨形成的因子,对骨骼胚胎的发育和再生修复起重要作用^[5]。BMP 通过与受体结合而发挥生理效应,BMP-2 的靶细胞是血管周围的、游离的、未分化的间充质细胞,其诱导过程首先增补向骨祖细胞分化的间充质细胞,刺激骨祖细胞分化为骨系细胞^[6]。BMPs 还涉及调节细胞的增殖、生存、分化和凋亡,但它们是以常位和异位诱导骨、软骨、韧带和腱形成能力为标志。激素导致股骨头 BMP-2 表达减少,可能与激素造成的骨髓脂肪化有关。脂肪化的机理尚不清楚,可能的推测有①激素引起高脂血症,细胞吞噬脂滴增多,逐渐发生脂变;②激素抑制细胞中线粒体基质酞辅酶 A 脱氢作用^[7];③引起肝脏固醇载运蛋白明显减少,阻碍细胞的脂类代谢和转运,导致脂肪变性。也有研究提示糖皮质激素可能在基因水平中发挥作用,直接诱导骨髓干细胞分化为脂肪细胞^[7,9];他汀类药物通

过降低血脂能提高 BMP-2 表达水平^[10],这些均可作为我们研究的佐证。

本研究结果中,超短波组骨组织 BMP-2 的基因表达明显高于造模组,提示,超短波治疗可促进兔骨组织 BMP-2 的表达。超短波是高频振荡电路反复放电形成的高频振荡电流,具有电和磁效应。因此推测超短波产生的高频电场能够增加胞液中的钙离子浓度,而钙离子增加可直接或通过激活调钙蛋白来激活蛋白激酶,进而引起蛋白磷酸化反应,改变胞内一系列信号通道。葛保健等^[11]的研究亦表明:电磁场能使骨髓间充质干细胞 BMP-2 mRNA 显著表达,而它的显著表达则是干细胞向骨源性细胞转化并增殖的确切信号之一。BMP 因其异位诱导活性在修复骨缺损的研究中得到广泛应用^[12],近来美国食品与药物管理局已经批准 rhBMP-2 可以应用于临床治疗,可见 BMP-2 的疗效已经得到了权威机构的认可^[13]。Simank 等^[14]用可吸收的 BMP-2 手术注入用酒精造成的局部股骨头缺血性坏死的绵羊的股骨头中,在术后三周可观察到股骨头的明显修复。汤亭亭等^[15]用 BMP-2 基因转染干细胞成功修复羊股骨头坏死。

第一个疗程结束时,超短波组 BMP-2 的表达量为造模组的 2.7348 倍,而第二个疗程结束时,超短波组 BMP-2 的表达量为造模组 10.1260 倍,说明超短波促进骨组织表达 BMP-2 有时间相关性。股骨头坏死的早期血管外组织发生无菌性炎症反应,超短波无热量干预,可以改善神经功能,阻断或减轻病理性神经冲动引起的恶性循环,且使炎症组织中的钙离子增加、钾离子减少,抑制炎症组织的炎性反应。在第二个疗程,股骨头坏死病理变化进入修复期,微热量治疗可改善股骨头微循环状态,降低组织间的张力。我们以往的研究证实^[16-18]:微热量超短波治疗还可以降低血脂水平及血液黏度,恢复 TXA2/PGI2 的平衡,增加局部骨组织 VEGF 的表达,从而延缓或逆转激素性股骨头坏死的病理进展。

表 1 3 组 BMP-2 基因、 β -Actin 基因的平均 Ct 值及计算结果($\bar{x} \pm s$)

组 别	BMP-2. Ct 平均值	actin. Ct 平均值	BMP-2. Ct 平均值 - actin. Ct 平均值	Δ Ct (Ct 平均值试验组 - Ct 平均值对照组)	2 - $\Delta\Delta$ Ct
正常组	20.0725 $\pm$ 0.1348	22.1825 $\pm$ 0.1931	-2.1100 $\pm$ 0.0583	0 $\pm$ 0.0583	1
干预组	22.8450 $\pm$ 0.5284	22.6400 $\pm$ 0.2968	0.2050 $\pm$ 0.2316	2.3150 $\pm$ 0.1733	0.2001 ^a
造模组					
第 1 疗程	23.1850 $\pm$ 0.2105	22.8175 $\pm$ 0.0618	0.6375 $\pm$ 0.1487	0 $\pm$ 0.0618	1
第 2 疗程	23.0750 $\pm$ 0.1399	22.5375 $\pm$ 0.1907	0.7000 $\pm$ 0.0580	0 $\pm$ 0.0580	1
超短波组					
第 1 疗程	21.4025 $\pm$ 0.5576	22.7100 $\pm$ 0.2045	-1.3075 $\pm$ 0.3531	1.4562 $\pm$ 0.1486	2.7438 ^b
第 2 疗程	19.9400 $\pm$ 0.2075	22.5800 $\pm$ 0.1787	-2.6400 $\pm$ 0.0288	3.3400 $\pm$ 0.0220	10.1260 ^c

注: Δ Ct = BMP-2. Ct 平均值 - actin. Ct 平均值, $\Delta\Delta$ Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}, 目的基因的量 = 2 - $\Delta\Delta$ Ct, 与正常组比较,^a $P < 0.01$; 与造模组相比,^b P 、^c $P < 0.01$

综上所述,超短波治疗可以增加股骨头坏死骨组织 BMP-2 的表达,进而促进激素性股骨头坏死的修复,并且 BMP-2 的表达量与治疗时间正相关,这为临床应用超短波提供了理论基础,但是关于超短波作用的详尽机制,及超短波治疗的最佳剂量仍需进一步的深入探讨。

参 考 文 献

[1] 尤全喜. 专家谈股骨头坏死. 北京: 中医古籍出版社, 2003; 10-12.
[2] 李子荣, 张念非, 岳德波, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的诱导和观察. 中华外科杂志, 1995, 33; 485.
[3] Livak KJ, Schmitgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. Methods, 2001, 25: 402-408.
[4] 薛元锁, 时述山, 李亚非, 等. 激素性股骨头坏死病程中骨形态发生蛋白-2 的改变及意义. 中华实验外科杂志, 2000, 17: 455-456.
[5] 郑磊, 王前, 裴国献. 电磁方法促进骨愈合的机制探讨——骨生长因子. 国外医学生物医学工程分册, 1999, 22, 153-158.
[6] 马克昌, 冯坤, 朱太咏. 骨生理学. 郑州: 河南医科大学出版社, 2000; 119-120.
[7] Leteron P, Brahimi-Bourouina N, Robin MA, et al. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid beta-oxidation. Am J Physiol, 1997, 272; 1141-1150.
[8] Cui Q, Wang GJ, Su CC, et al. Lovastatin prevents steroid induced Adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop, 1997, 344; 8-19.
[9] Cui Q, Wang GJ, Balian G. Steroid-induced adipogenesis in bone ma-

rror and osteonecrosis. ARCO News, 1994, 6; 117.
[10] 殷晓雪, 陈仲强, 党耕町, 等. 淫羊藿苷对成人成骨细胞增殖与分化的影响. 中国中药杂志, 2004, 30; 289.
[11] 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-β1 mRNA 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26; 262-265.
[12] Hoffmann A, Gross G. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2001, 11; 23-45.
[13] 袁泉. 骨形态发生蛋白基因在骨组织工程领域的研究进展. 国外医学生物医学工程分册, 2005, 28; 321-324.
[14] Simank HG, Manngold J, Sebald W, et al. Bone morphogenetic protein-2 and growth and differentiation factor-5 enhance the healing of necrotic bone in a sheep mode. Growth Factors, 2001, 19; 247-57.
[15] 汤亭亭, 陆斌, 岳冰, 等. 干细胞移植和 BMP2 基因治疗修复骨损伤和坏死的实验研究. 组织工程与重建外科杂志, 2005, 1; 34-38.
[16] 孙强三, 孙昭辉, 王晓红, 等. 超短波早期治疗激素性股骨头缺血性坏死的实验研究. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26; 729-731.
[17] 孙强三, 王道清, 王晓红, 等. 超短波或中药早期治疗对激素性股骨头缺血性坏死兔 TXA2-PGI2 平衡的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26; 729-731.
[18] 孙强三, 徐青, 孙昭辉, 等. 超短波早期治疗对兔激素性股骨头缺血性坏死病理变化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29; 227-230.

(修回日期: 2008-01-12)
(本文编辑: 阮仕衡)

· 短篇论著 ·

超短波和中频电疗法治疗颞下颌关节紊乱病的疗效分析

郑桂杰 曹蕾 傅照华

颞下颌关节紊乱病(temporomandibular disorders, TMD)是口腔颌面部常见疾病之一, 发病率高, 好发于青壮年, 据统计约有 20% ~ 40% 的人患有 TMD^[1]。TMD 是指累及颞下颌关节和(或)咀嚼肌系统, 引起咀嚼肌群平衡失调, 颞下颌关节及组成部分的功能、结构失常等一系列改变。其病因复杂, 病程迁延, 易反复发作。TMD 的治疗方法较多, 疗效不一。我科采用超短波和中频电疗法对 TMD 患者进行治疗, 并同时与药物治疗进行疗效对比, 发现前者疗效优于后者。现报道如下。

一、资料与方法

1. 一般资料: 选择 2005 年 5 月至 2006 年 12 月在我科就诊、符合 TMD 诊断标准^[2]、首次发病的 TMD 患者 75 例为研究对象。根据治疗方法不同将 75 例患者分为超短波和中频电治疗组(观察组)40 例和药物治疗组(对照组)35 例。2 组患者的年龄、性别、病程、病变类型等比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性, 见表 1。

2. 治疗方法: 观察组采用超短波和中频电疗法治疗。超短波治疗应用 DL-C 型五官超短波电疗机(汕头产), 波长为 6 m,

表 1 2 组患者一般临床资料比较

组 别	例数	性别(例, 男/女)	年龄 (岁)	病程 (d)	单侧 (例)	双侧 (例)	病变类型(例)		
							一型	二型	三型
观察组	40	22/18	29.3 ± 9.8	21.7 ± 13.6	36	4	24	15	1
对照组	35	20/15	32.4 ± 9.3	21.3 ± 14.9	32	3	22	12	1

注: 一型——咀嚼肌群功能紊乱, 二型——颞颌关节结构紊乱, 三型——颞颌关节器质性改变