

机械振动对去卵巢后骨质疏松骨折大鼠雌激素和脑源性神经营养因子表达的影响

龚怡静¹ 刘明月¹ 刘斌¹ 姜婷² 上官恒毅¹ 汪学红¹

¹武汉体育学院,武汉 430079; ²华中科技大学同济医学院附属协和医院,武汉 430022

通信作者:汪学红, Email:287615517@qq.com

【摘要】目的 探讨机械振动对去卵巢后骨质疏松骨折大鼠海马雌激素和骨折端脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法** 选取3月龄雌性Wistar大鼠30只,按照随机数字表法将其分为对照组、去卵巢组、振动组,每组10只。对照组建立骨折模型,去卵巢组和振动组建立去卵巢后骨质疏松骨折模型,采用频率35 Hz、每日20 min、每周5 d的全身垂直振动作用于振动组。干预2周和6周后,采用X线评价各组大鼠的骨折愈合情况,并通过酶联免疫吸附实验和免疫印记法分别检测大鼠海马雌激素、骨折端BDNF的含量。**结果** 干预2周和6周后,振动组大鼠骨折愈合率较对照组和去卵巢组高($P<0.05$)。振动组大鼠干预2周和6周后的海马雌激素含量[(0.72 ± 0.03) ng/ml、(1.19 ± 0.03) ng/ml]较对照组和去卵巢组高($P<0.05$),干预2周和6周后的骨折端BDNF含量[(0.26 ± 0.01) ng/ml、(0.39 ± 0.06) ng/ml]较对照组低、较去卵巢组高($P<0.05$)。大鼠骨折端BDNF表达水平与其骨折愈合率高度相关。**结论** 机械振动可以促进大鼠海马雌激素和骨折端BDNF表达,加速去卵巢后骨质疏松大鼠骨折愈合。

【关键词】 骨质疏松症; 骨折; 振动; 雌激素; 脑源性神经营养因子

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(89100213)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.12.002

The effects of mechanical vibration on the expression of estrogen and brain-derived neurotrophic factor after ovariectomy

Gong Yijing¹, Liu Mingyue¹, Liu Bin¹, Jiang Ting², Shanguan Hengyi¹, Wang Xuehong¹

¹Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China; ²Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Wang Xuehong, Email: 287615517@qq.com

【Abstract】 Objective To explore any effect of mechanical vibration on the expression of estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in ovariectomized rats with an osteoporotic fracture. **Methods** Thirty 3-month-old female Wistar rats were divided randomly into a control group, an ovariectomy group and a vibration group, each of 10. Fractures were induced in the rats of all three groups. Twenty minutes of whole-body vertical vibration was applied to the vibration group at a frequency of 35Hz, 5 days a week for 6 weeks. After 2 and 6 weeks the fracture healing of each group was evaluated using X-rays, the levels of hippocampal estrogen were measured using enzyme-linked immunosorbent assays and fracture-end BDNF was quantified by immunoblotting. **Results** After 2 and 6 weeks of vibration the average fracture healing in the vibration group was significantly greater than in the other 2 groups. The average estrogen content in the hippocampus of the vibration group was significantly higher than in the other 2 groups after both 2 and 6 weeks, while the average BDNF content in their fracture ends was significantly lower. The BDNF expression at the fracture end was significantly correlated with the fracture healing. **Conclusion** Mechanical vibration can promote the expression of estrogen and BDNF in the hippocampus and accelerate fracture healing in osteoporotic rats.

【Key words】 Osteoporosis; Fracture; Vibration; Estrogen; Neurotrophic factors

Funding: Youth Fund of National Natural Science Foundation Projects(89100213)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.12.002

骨质疏松骨折是绝经后的常见问题之一^[1]。该病的治疗药物价格昂贵且存在副作用^[2],临床使用受限。机械振动作为安全、经济的物理治疗手段之一,应用逐渐广泛^[3],但治疗机制尚未完全阐明。有研究表明,雌激素在机械振动治疗骨质疏松骨折中扮演着重要角色^[4],而海马可以分泌雌激素,进而弥补大鼠去卵巢后周围雌激素分泌不足的问题^[5]。雌激素与其受体结合可促进脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的 mRNA 转录^[6],其基因与骨质疏松症有关^[7]。本研究采用机械振动干预去卵巢后骨质疏松骨折大鼠,观察其在大鼠骨折愈合过程中对海马雌激素和骨折端 BDNF 表达的影响及作用机制,以期治疗绝经后骨质疏松骨折提供理论依据。

材料与方 法

一、实验动物和分组

选取 3 月龄雌性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Wistar 大鼠 30 只,体重 260~300 g,由湖北省疾病预防控制中心提供[SCXK(鄂)2008-0005],适应性饲养 1 周后,按照随机数字表法将其分为对照组、去卵巢组、振动组,每组 10 只。

二、实验试剂与仪器

1.实验试剂:RIPA 总蛋白裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)、增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)检测试剂盒均产自美国;大鼠雌激素酶联免疫吸附测定试剂盒产自中国。

2.实验仪器:SW-CJ-1FD 型超净工作台、DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-400D 型转移电泳仪槽、TGL-16 型冷冻离心机均产自中国;UBIS-5000 型定量超声骨密度扫描仪产自法国。

三、造模方法

参照文献[8]中所述方法,大鼠禁食 6 h 后,予以麻醉并固定。对照组大鼠切除双侧卵巢周围等质量的脂肪组织,去卵巢组与振动组均摘除双侧卵巢。术后 3 个月,采用超声骨密度扫描仪检测大鼠的股骨骨密度,以确定去卵巢后骨质疏松模型制备成功。术后 5 个月,将大鼠麻醉并固定,暴露其右后肢股骨干,用克氏针固定后,于股骨中段制造切口并徒手掰断,随后骨折复位。

四、机械振动干预

骨折术后 5 d,将振动组大鼠置于振动台上进行振动干预。具体参数:频率 35 Hz,振幅 2 mm,纵向振动,加速度 0.5 g,每日 20 min,每周 5 d。对照组、去卵巢

组大鼠在相同时间内,于关闭的振动台上自由活动^[9]。

五、样本提取和检测

振动干预 2 周和 6 周后,从各组中随机取出 5 只大鼠,拍摄其右后肢股骨 X 线片,采用 X 射线片评分系统评价骨折愈合情况,骨折愈合率=(骨折愈合只数/总只数)×100%^[10]。随后脱颈处死,取其海马和骨折端骨痂组织,置于冰箱(-80℃)中备用^[10]。

1.雌激素检测:采用酶联免疫吸附实验测定海马雌激素的表达水平,所有实验操作均按照试剂盒说明书进行。

2.BDNF 检测:提取骨折端骨痂组织总蛋白,测定蛋白浓度。95~100℃水浴 5 min,十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分离,出胶,转印至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)进行抗体孵育,用 ECL 化学发光液检测 BDNF 蛋白含量。

六、统计学方法

采用 SPSS 22.0 版统计学软件进行数据处理。计量资料采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示组间差异具有统计学意义;采用 Pearson 相关性分析检验变量间关系, $P<0.05$ 表示变量之间存在相关性, $|r| \geq 0.8$ 表示变量间高度相关。

结 果

一、3 组大鼠干预 2 周和 6 周后的骨折愈合情况

与对照组大鼠比较,去卵巢组大鼠干预 2 周和 6 周后的骨折愈合率较低($P<0.05$)。与去卵巢组大鼠比较,振动组大鼠干预 2 周和 6 周后的骨折愈合率较高($P<0.05$)。详见表 1、图 1。

表 1 3 组大鼠干预 2 周和 6 周后的股骨骨折愈合率 [只(%)]

组别	只数	干预 2 周	干预 6 周
对照组	10	2(20.0%)	5(50.0%)
去卵巢组	10	0(0.0%) ^a	2(20.0%) ^a
振动组	10	1(10.0%) ^b	6(60.0%) ^b

注:与对照组同时时间点比较,^a $P<0.05$;与去卵巢组同时时间点比较,^b $P<0.05$

二、3 组大鼠干预 2 周和 6 周后海马雌激素的含量比较

与对照组大鼠比较,去卵巢组和振动组大鼠干预 2 周和 6 周后的海马雌激素含量较高($P<0.05$)。与去卵巢组大鼠比较,振动组大鼠干预 2 周和 6 周后的海马雌激素含量较高($P<0.05$)。详见表 2。

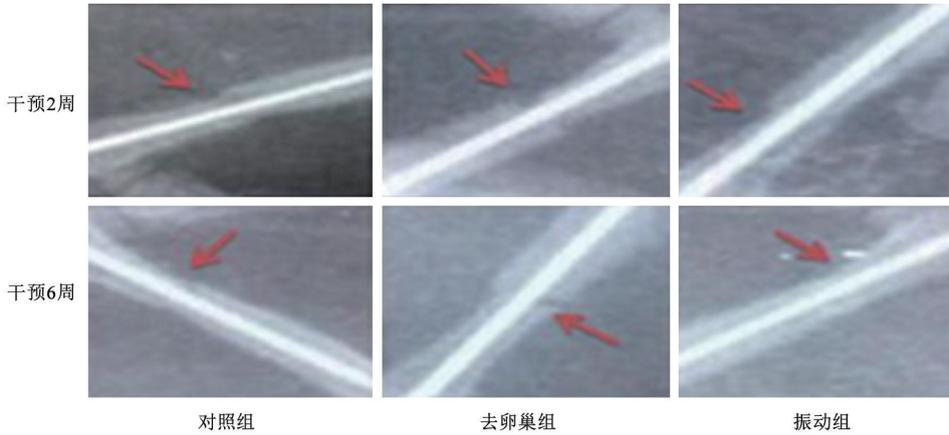


图 1 3 组大鼠股骨骨折的 X 线结果

表 2 3 组大鼠干预 2 周和 6 周后海马雌激素的含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	干预 2 周	干预 6 周
对照组	10	0.41±0.03	0.43±0.03
去卵巢组	10	0.53±0.03 ^a	0.81±0.02 ^a
振动组	10	0.72±0.03 ^{ab}	1.19±0.03 ^{ab}

注:与对照组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与去卵巢组同时时间点比较,^b $P < 0.05$

三、大鼠干预 2 周和 6 周后海马雌激素表达水平与骨折愈合率的相关性分析

干预 2 周和干预 6 周后,各组大鼠海马雌激素的表达水平与对应的骨折愈合速率符合正向线性关系,且干预 6 周后的正向线性关系优于干预 2 周后,但各组大鼠海马雌激素表达水平与骨折愈合率的相关性分析显示无相关性($P > 0.05$)。详见图 2。

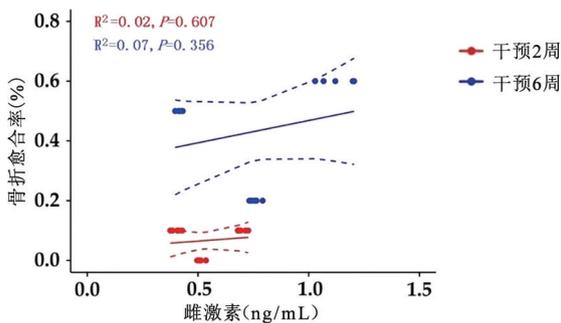


图 2 大鼠干预 2 周和 6 周后海马雌激素表达水平与骨折愈合率的相关性分析

四、3 组大鼠干预 2 周和 6 周后骨折端 BDNF 的表达变化

与对照组大鼠比较,去卵巢组和振动组大鼠干预 2 周和 6 周后,骨折端 BDNF 含量较低 ($P < 0.05$)。与去卵巢组大鼠比较,振动组大鼠干预 2 周和 6 周后,骨折端 BDNF 含量较高 ($P < 0.05$)。详见表 3、图 3。

表 3 3 组大鼠干预 2 周和 6 周后骨折端 BDNF 的表达变化 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	干预 2 周	干预 6 周
对照组	10	0.45±0.03	0.41±0.03
去卵巢组	10	0.07±0.00 ^a	0.03±0.01 ^a
振动组	10	0.26±0.01 ^{ab}	0.39±0.06 ^{ab}

注:与对照组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与去卵巢组同时时间点比较,^b $P < 0.05$

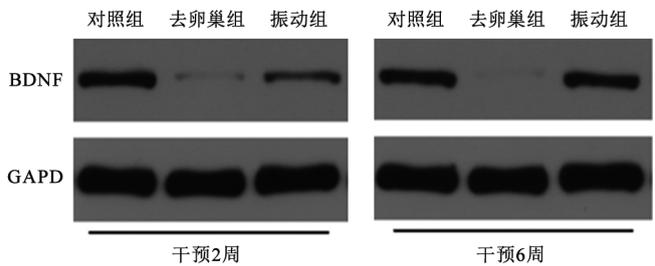


图 3 3 组大鼠干预 2 周和 6 周后骨折端 BDNF 的表达情况

五、大鼠干预 2 周和 6 周后骨折端 BDNF 表达水平与骨折愈合率的相关性分析

干预 2 周和 6 周后,各组大鼠骨折端 BDNF 的表达水平与对应的骨折愈合速率符合正向线性关系,且干预 6 周后的正向线性关系优于干预 2 周后。大鼠骨折端 BDNF 表达水平与骨折愈合率的相关性分析显示存在高度相关性 ($|r| > 0.8, P < 0.05$)。详见图 4。

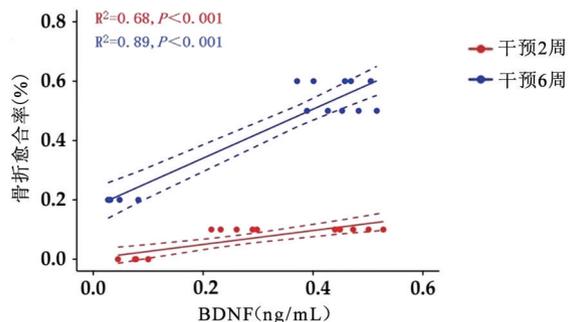


图 4 大鼠干预 2 周和 6 周后骨折端 BDNF 表达水平与骨折愈合率的相关性分析

讨 论

骨骼是一种力学敏感组织,机械应力在骨折愈合和成骨过程中起着积极作用^[11]。机械振动不仅可以直接刺激骨细胞,还可通过促进骨组织内部的间质液流动,进而在骨内膜表面产生不同程度的流体剪切力或流动电势,而流动电势的产生可调控旁分泌因子的合成,促进前列腺素 E2 释放,加速骨基质的合成;此外,其他因子也会在骨质中合成,如一氧化氮、胰岛素样生长因子等,这些因子对刺激成骨细胞生长、抑制破骨细胞增殖、促进骨折愈合有重要的作用^[12-13]。在破骨细胞中,机械振动的作用机制主要是抑制破骨细胞分化因子信号的相关传递,增加破骨细胞抑制因子的表达活性,减低破骨细胞活性;在成骨细胞中,机械振动的作用机制主要围绕着抑制经典的 Wnt 信号传导通路和增加成骨细胞中 DNA 合成等展开,通过促进 DNA 表达产物中胶原蛋白的产生,进而提高骨密度,增强骨的物理性能^[14-15]。机械振动对于促进骨折愈合或改善骨折不愈合有一定效果。Tezval 等^[16]研究发现,机械振动可以改善股骨近端的骨强度,进而影响骨折愈合。机械振动作为一种非药物、非侵入式的治疗,在绝经后骨质疏松骨折愈合中的应用越来越广泛。本研究中大鼠的 X 线扫描结果,提示机械振动可以促进去卵巢后骨质疏松大鼠的骨折愈合。

Chow 等^[17]研究发现,在无雌激素介入的情况下,体外振动干预并不能显著促进去卵巢大鼠的骨折愈合。说明雌激素在机械振动治疗骨质疏松骨折中的作用是非常重要的^[18]。海马具有内分泌功能,其所分泌的雌激素^[19]可作用于海马,调节海马蛋白表达,亦可作用于骨,促进骨量增加。Kerr 等^[20]研究表明,振动可沿躯体内部向海马传递振动所产生的应力,提高雌性大鼠海马的依赖性学习和记忆能力。本研究表明,机械振动可促进去卵巢后骨质疏松骨折大鼠海马的雌激素表达,与对照组比较,去卵巢组海马雌激素表达水平升高,但骨折愈合速度较慢,与 Huang 等^[21]研究中发现的增加外源性雌激素可促进去卵巢后骨质疏松大鼠骨折转归不符,其原因可能是作用于骨折端的海马雌激素含量不足。

BDNF 属于神经营养因子,是雌激素下游基因组靶标,具有神经保护作用^[22-23]。相关研究揭示了 BDNF 的非神经营养功能,在 2000 年被 Asaumi 等^[24]发现存在于小鼠骨形成细胞中,提示可通过自分泌和旁分泌调控骨形成;2014 年 Kilian 等^[25]证实 BDNF 存在于骨折后骨形成的各个阶段;此后,Guo 等^[26]研究证实,通过 RNA 干扰影响 BDNF 表达可以抑制大鼠成骨细胞分化,证实 BDNF 对促进骨愈合具有积极作用。

Zhang 等^[27]的一项研究报道了 BDNF 在骨折愈合中的潜在机制,即促进小鼠胚胎成骨细胞迁移并上调整合素 $\beta 1$ 的表达,可加速骨折愈合。Deng 等^[28]在体外实验中,进一步证实了 BDNF 可增强小鼠胚胎成骨细胞成骨、迁移和增殖。Guo 等^[26]研究也发现 BDNF 与骨质疏松骨折有关,说明 BDNF 可能是治疗绝经后骨质疏松骨折的潜在靶点。本研究中,机械振动可以促进去卵巢后骨质疏松骨折大鼠骨折端 BDNF 表达,且大鼠骨折愈合速率与骨折端 BDNF 表达水平呈高度正相关,与 Zhang 等^[27]研究报道的血清 BDNF 水平与骨密度呈正相关的结果类似。

综上所述,机械振动通过促进大鼠海马雌激素和骨折端 BDNF 表达,加速去卵巢后骨质疏松大鼠骨折愈合。但本研究未对海马雌激素和骨折断端 BDNF 表达之间的通道展开研究,进而阐述机械振动促进去卵巢后骨质疏松大鼠骨折愈合的机理,存在一定的局限性,在今后的研究中将进一步完善。

参 考 文 献

- [1] Lu J, Huang L, Chen W, et al. Bilateral percutaneous kyphoplasty achieves more satisfactory outcomes compared to unilateral percutaneous kyphoplasty in osteoporotic vertebral compression fractures: a comprehensive comparative study[J]. J Back Musculoskelet Rehabil, 2022, 7(1): 210225. DOI: 10.3233/BMR-210225.
- [2] Si L, Winzenberg TM, Chen M, et al. Residual lifetime and 10 year absolute risks of osteoporotic fractures in Chinese men and women[J]. Curr Med Res Opin, 2015, 31(6): 1149-1156. DOI: 10.1185/03007995.2015.1037729.
- [3] He Z, Zheng J, Liu S, et al. The effect of whole-body vibration in osteopenic patients after total knee arthroplasty: a randomized controlled trial[J]. Aging Clin Exp Res, 2022, 34(6): 1381-1390. DOI: 10.1007/s40520-021-02043-2.
- [4] Chow SK, Leung KS, Qin J, et al. Mechanical stimulation enhanced estrogen receptor expression and callus formation in diaphyseal long bone fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic rats[J]. Osteoporos Int, 2016, 27(10): 2989-3000. DOI: 10.1097/01.mpa.0000246658.38375.04.
- [5] Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, et al. Estrogen synthesis in the hippocampus[J]. Cell Tissue Res, 2011, 345(3): 285-294. DOI: 10.1007/s00441-011-1221-7.
- [6] Chen J, Li Q, Saliuk G, et al. Estrogen and serotonin enhance stress-induced visceral hypersensitivity in female rats by up-regulating brain-derived neurotrophic factor in spinal cord[J]. Neurogastroenterol Motil, 2021, 33(10): 14117. DOI: 10.1111/nmo.14117.
- [7] 杨曼, 卢冰婕, 段媛媛, 等. 骨质疏松症易感基因 BDNF 的遗传学关联分析及功能研究[J]. 遗传, 2017, 38(8): 11. DOI: 10.16288/j.ycz.17-145.
- [8] 洪勇良, 王艺喆, 黄婉莹, 等. 密骨方对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨折愈合过程中神经纤毛蛋白 1 表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23(4): 19-22.
- [9] 汪学红, 孙大明, 周丹丹, 等. 机械振动对去卵巢大鼠骨折愈合

- 中成纤维细胞生长因子 23 抗体的调节作用[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(1):3. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2020.01.034.
- [10] 王艺喆, 李婷婷, 孙大明, 等. 机械振动对去卵巢骨折大鼠 miR-214-3p、IL-1 β 的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2021, 43(10):871-874. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.10.002.
- [11] Steppe L, Liedert A, Ignatius A, et al. Influence of low-magnitude high-frequency vibration on bone cells and bone regeneration[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 10(8): 1221. DOI: 10.3389/fbioe.2020.595139.
- [12] Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT. Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains[J]. J Biomech, 2000, 33(3): 317-325. DOI: 10.1016/s0021-9290(99)00210-9.
- [13] Coughlin TR, Niebur GL. Fluid shear stress in trabecular bone marrow due to low-magnitude high-frequency vibration[J]. J Biomech, 2012, 45(13): 2222-2229. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2012.06.020.
- [14] Rauch F, Adachi R. Sclerostin: more than a bone formation brake[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(330): 330fs7. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf4628.
- [15] Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton[J]. Eur Cell Mater, 2012, 24: 278-291. DOI: 10.22203/ecm.v024a20.
- [16] Tezval M, Biblis M, Sehmisch S, et al. Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rat as an osteopenia model[J]. Calcif Tissue Int, 2011, 88(1): 33-40. DOI: 10.1007/s00223-010-9423-7.
- [17] Chow S, Leung KS, Cheung WH. Estrogen receptor expression in osteoblasts is not enhanced in vitro by low-magnitude high-frequency vibrational stimulation in the absence of estrogen[J]. J Orthop Translat, 2016, 7:123-124. DOI: 10.1016/j.jot.2016.06.156.
- [18] Steppe L, Krüger BT, Tschaffon M, et al. Estrogen receptor α signaling in osteoblasts is required for mechanotransduction in bone fracture healing[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9:782355. DOI: 10.3389/fbioe.2021.782355.
- [19] Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H, et al. Estrogen synthesis in the hippocampus[J]. Cell Tissue Res, 2011, 345(3):285-294. DOI: 10.1007/s00441-011-1221-7.
- [20] Kerr NA, Sanchez J, Moreno WJ, et al. Post-stroke low frequency whole body vibration improves cognition in middle-aged rats of both sexes[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 8: 942717. DOI: 10.3389/fnagi.2022.942717.
- [21] Huang K, Sun YQ, Chen XF, et al. Psoralen, a natural phytoestrogen, improves diaphyseal fracture healing in ovariectomized mice: a preliminary study[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4): 368. DOI: 10.3892/etm.2021.9799.
- [22] Mehta K, Pandey KK, Kaur B, et al. Resveratrol attenuates arsenic-induced cognitive deficits via modulation of Estrogen-NMDAR-BDNF signalling pathway in female mouse hippocampus[J]. Psychopharmacology (Berl), 2021, 238(9):2485-2502. DOI: 10.1007/s00213-021-05871-2.
- [23] Song Q, Huang W, Ye W, et al. Neuroprotective effects of estrogen through BDNF-transient receptor potential channels 6 signaling pathway in the hippocampus in a rat model of perimenopausal depression[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 7: 869274. DOI: 10.3389/fnagi.2022.869274.
- [24] Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, et al. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing[J]. Bone, 2000, 26(6):625-633. DOI: 10.1016/s8756-3282(00)00281-7.
- [25] Kilian O, Hartmann S, Dongowski N, et al. BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing[J]. Ann Anat, 2014, 196(5):286-295. DOI: 10.1016/j.aanat.2014.06.001.
- [26] Guo Y, Dong SS, Chen XF, et al. Integrating epigenomic elements and GWASs identifies BDNF gene affecting bone mineral density and osteoporotic fracture risk[J]. Sci Rep, 2016, 6:30558. DOI: 10.1038/srep30558.
- [27] Zhang Z, Hu P, Wang Z, et al. BDNF promoted osteoblast migration and fracture healing by up-regulating integrin β 1 via TrkB-mediated ERK1/2 and AKT signalling[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10792-10802. DOI: 10.1111/jcmm.15704.
- [28] Deng L, Lai S, Fan L, et al. miR-210-3p suppresses osteogenic differentiation of MC3T3-E1 by targeting brain derived neurotrophic factor (BDNF)[J]. J Orthop Surg Res, 2022, 17(1):418. DOI: 10.1186/s13018-022-03315-x.

(修回日期:2022-10-12)

(本文编辑:凌 琛)