

低强度振动载荷对兔长骨再生速率的影响

佟世超^{1,2}, 唐振宏⁴, 刘娟¹, 申广浩¹, 翟明明¹, 景达¹, 李小康³, 郭征³, 罗二平¹

1.第四军医大学生物医学工程学院, 陕西 西安 710032; 2.第230医院, 辽宁 丹东 118000; 3.第四军医大学西京医院骨科, 陕西 西安 710032; 4.陕西省医疗器械检测中心, 陕西 西安 710032

【摘要】目的:比较低强度全身振动刺激(WBV)协同多孔钛合金(pTi)与单独pTi对骨缺损的修复效果的差异。**方法:** Ti-6Al-4V粉末制成的圆柱体多孔填充材料植入雌性新西兰白兔股骨外侧髁中。将实验动物按体重随机分为pTi组(对照组)和pTi+WBV组, 每组12只。pTi+WBV组于术后1周开始每天施加频率30 Hz、加速度0.5 g的垂直振动刺激1 h。取材前14天及前4天肌肉注射钙黄绿素。WBV刺激后6、12周取材, 定量比较pTi中的骨小梁矿化沉积率以及骨小梁表面的成骨细胞数量。**结果:** (1)pTi+WBV组6、12周骨缺损部位骨小梁生长速率明显高于对照组($P < 0.05$); (2)pTi+WBV组成骨细胞数量明显高于对照组。**结论:** WBV在骨缺损治疗中与pTi有协同作用, WBV能够促进骨小梁与钛合金的整合, 并能够提高体内骨形成活性。

【关键词】骨缺损; 骨再生; 多孔钛合金; 全身振动刺激; 骨矿化沉积率; 成骨细胞

【中图分类号】 R683.42

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-202X(2016)04-0364-04

Effects of low-level vibration load on bone regeneration rate of rabbit long bone

TONG Shi-chao^{1,2}, TANG Zhen-hong⁴, LIU Juan¹, SHEN Guang-hao¹, ZHAI Ming-ming¹, JING Da¹, LI Xiao-kang³, GUO Zheng³, LUO Er-ping¹

1. Department of Biomedical Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. 230th Hospital, Dandong 118000, China; 3. Department of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 4. Shanxi Medical Devices Testing Center, Xi'an 710032

Abstract: Objective To compare the repair effects of low-level whole body vibration (WBV) combined with porous titanium alloy (pTi) and pTi alone on bone defects. **Methods** Porous cylinder filling materials made of Ti-6Al-4V power were implanted into the lateral femur condyle of female New Zealand white rabbits which were randomly divided into the pTi group and pTi+WBV group according to the weight, each group of 12 rabbits. The rabbits in pTi+WBV group had been subjected to 1 h/d vertical WBV stimulation with frequency of 30 Hz and acceleration of 0.5 g since one week after the operation. All rabbits received intramuscular injections of 8 mg/kg calcein on 14 and 4 days before sacrifice. After WBV stimulation for 6 and 12 weeks, rabbits in each group were euthanatized for quantitatively comparing the mineral apposition rate of bone trabecula and the number of osteoblast on the surface of bone trabecula. **Results** After the WBV stimulation for 6 and 12 weeks, the bone trabecula regeneration rate of bone defects in pTi+WBV group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). And the number of osteoblast in pTi+WBV group was significantly higher than that in control group. **Conclusion** WBV and pTi has the cooperation on the treatment of bone defects. WBV can promote integration of pTi and bone trabecula, and enhance bone formation activity *in vivo*. **Key words:** bone defects; bone regeneration; porous titanium alloy; whole body vibration; bone mineral deposition rate; osteoblast

前言

因肿瘤、外伤等原因造成的骨缺损是骨科临床的常见病。自体骨移植是骨缺损病治疗的金标准^[1], 但由于其取材有限, 并且会引起多种并发症, 该方法的使用一直受到较大限制。多孔钛合金(porous Titanium alloy, pTi)是骨创伤修复物及人工关节等人体硬组织替代物的首选材料, 具有良好的生物相容性、抗腐蚀性和工艺性^[2-3], 但由于钛合金仍属于生物惰

【收稿日期】 2016-02-20

【项目基金】 国家自然科学基金(81471806)

【作者简介】 佟世超, 硕士研究生, 研究方向: 骨骼力学生物学及骨缺损修复, Tel: 18192504860, E-mail: tongshichao1987@163.com。

【通信作者】 罗二平(1959-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 力学生物学和电磁生物学, Tel: 13384983035, E-mail: luorping@fmmu.edu.cn。

性材料,其无法与骨组织实现化学键的融合,而只能与骨组织以机械铆合的形式相结合,使其骨整合能力受到很大的限制。其次,钛合金的生物力学强度仍难以与骨组织实现充分的匹配。目前在临床使用的钛合金为Ti-6Al-4V,虽然其弹性模量已较其它金属材料低很多,但仍远高于正常人体骨组织。弹性模量的巨大差异会在植入体与骨组织之间产生应力屏障,从而影响种植体与骨组织的整合^[4]。骨整合能力的不足会造成钛合金植入体的松动甚至脱落,影响治疗效果甚至导致治疗失败。因此,加强种植体与骨组织之间的整合,对保证治疗效果具有重要意义。大量的实验证实,高频(20~100 Hz)、低强度(<1 g, g 为重力加速度, $1g=9.8m/s^2$)全身振动刺激(Whole Body Vibration, WBV)具有很强的促骨形成作用和一定程度的抑制骨吸收作用,能够显著抑制由废用和去势造成的骨质疏松,对骨折愈合也有较好的治疗效果^[5-7]。但是, WBV 是否能够显著提高骨缺损植入体的骨整合能力,目前国内外仍未见研究报道。本实验以兔股骨骨缺损模型为实验对象,将pTi与WBV刺激结合起来,通过钙黄绿素荧光标记分析骨组织在钛合金表面的生长速率,并通过甲苯胺蓝染色观察成骨细胞活性,旨在探索一种可能提高植入体骨整合效果的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 pTi生物植入材料的制备

通过AutoCAD软件设计出pTi的三维多孔结构模型,通过电子束熔融技术将Ti-6Al-4V粉末加工成底面直径6 mm、高8 mm、孔隙率70%、孔隙直径约1 mm的多孔圆柱体。制作好的材料如图1所示。

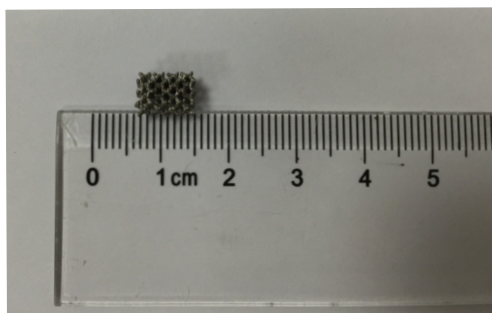


图1 Ti-6Al-4V多孔钛合金植入材料
Fig.1 Implant materials of Ti-6Al-4V porous titanium alloys

1.2 实验动物

雌性新西兰大耳白兔24只,体质量(3.0 ± 0.4) kg,由第四军医大学实验动物中心提供并饲养。实

验全过程饲喂标准颗粒饲料,饮水符合实验动物饲养要求,所有操作步骤经《第四军医大学实验动物管理及伦理委员会》批准。

1.3 兔长骨骨缺损模型的建立

实验动物禁食8 h,术前称体质量,肌肉注射戊巴比妥钠溶液(3%, 30 mg/kg)、盐酸塞拉嗪注射液(速眠新Ⅱ, 0.1 mL/kg)麻醉,左侧股骨外侧区域常规备皮,碘伏消毒铺单,在股骨远端靠近关节处做一纵向切口,使股骨外侧髁充分暴露,使用医用钻制作直径6 mm、深8 mm圆柱形骨缺损区域,使用医用过氧化氢溶液和无菌生理盐水冲洗缺损部位,清除血及碎骨,植入pTi,缝合切口,碘伏消毒。术后连续3 d注射青霉素(4万U/只)预防感染。实验兔单笼饲养,不限活动,自由摄取食水,密切观察状态。

1.4 振动设备及WBV的施加

实验采用电磁吸合式振动台,台面尺寸100 cm×100 cm,最大载荷100 kg。通过振动测量仪(VIB-5, 上海星晟检测仪器有限公司生产)校准,调节振动频率30 Hz,加速度0.5 g。实验兔术后1周称体质量,按体质量随机分为实验组(pTi+WBV组)和对照组(pTi组),实验组动物每天施加WBV刺激,时长1 h。刺激施加过程中使用带气孔的透明聚乙烯箱将实验兔倒扣在振动台上,使用透明胶带固定,密切观察箱内动物状态。对照组动物每天置于振动实验台上1 h,不施加WBV刺激。

1.5 钙黄绿素荧光标记

钙黄绿素荧光溶液的配制过程如下:称取钙黄绿素0.8 g、碳酸氢钠3.2 g溶于100 mL无菌生理盐水中,避光条件下搅拌使其充分溶解,配制成浓度为8%的溶液,4℃避光保存。实验兔分别于取材前14天和4天以1 mL/kg剂量进行肌肉注射。

1.6 荧光标记观察

术后6、12周通过耳缘静脉注射过量盐酸塞拉嗪注射液的方法处死实验动物,取左侧股骨置于80%乙醇中固定1周,经脱水、浸塑,包埋于甲基丙烯酸甲酯溶液中,凝固后使用硬组织切片机(Leica SP1600)切成大约50 μm厚的薄片,使用荧光显微镜(LEICA DM LA)观察荧光标记。

1.7 成骨细胞观察

取左侧胫骨近心端固定于4%多聚甲醛中1周,EDTA脱钙,石蜡包埋,切成大约5 μm厚的薄片,甲苯胺蓝染色观察成骨细胞。

1.8 统计学分析

使用SPSS19.0进行统计学分析,计量资料使用均数±标准差表示,实验组和对照组差异采用单因素

方差分析进行检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

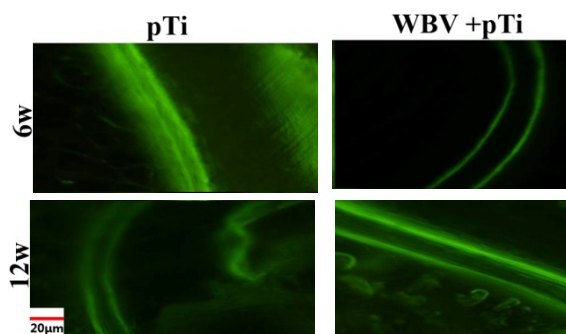
2.1 钙黄绿素荧光标记检测结果

在硬组织切片中可以观察到两条大致平行的亮绿

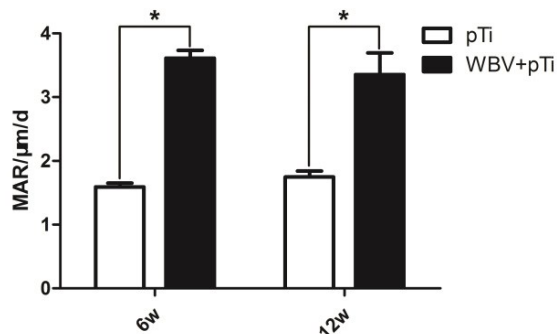
色荧光标记线, 见图 2a。两线之间的沉积时间为 10 d, 使用图像处理软件测量双线之间的距离, 可计算得到:

矿化沉积率(MAR)=双荧光间距(μm)/10

计算结果显示, 实验组 6、12 周 MAR 均高于对照组且有统计学差异($P < 0.05$)。见图 2b。



a: Image of calcein fluorescent labeling ($\times 40$)



b: MAR comparison at different points in time

图2 6周、12周钙黄绿素荧光双标

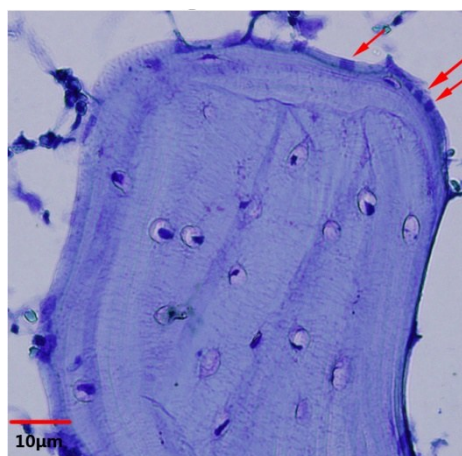
Fig.2 Calcein fluorescent double-labeling at 6th week and 12th week

WBV: Whole body vibration; pTi: Porous titanium alloy; MAR: Mineral apposition rate. * $P < 0.05$

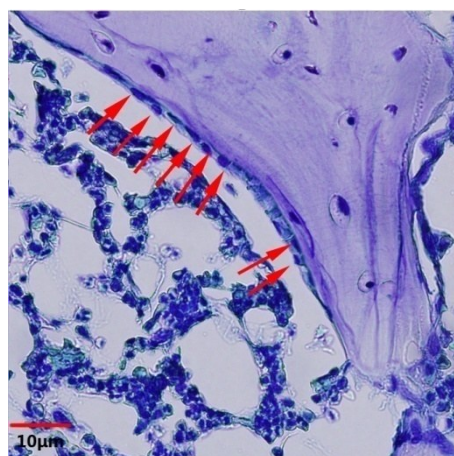
2.2 pTi 中骨小梁表面成骨细胞染色

将甲苯胺蓝染色的胫骨切片置于镜下观察, 可见 WBV 刺激 12 周后 WBV+pTi 组骨小梁表面成骨细

胞数量明显多于 pTi 组($P < 0.05$), 提示 WBV 对于 pTi 中骨小梁表面骨形成活性有促进作用。见图 3。



a: Control group (pTi)



b: Experimental group (WBV+pTi)

图3 12周成骨细胞甲苯胺蓝染色($\times 40$)

Fig.3 Osteoblasts stained with toluidine blue at 12th week ($\times 40$)

3 讨论

3.1 WBV对骨小梁矿化沉积率的影响

目前, 钛合金已成为骨缺损临床治疗的常见材料, 而将钛合金制成多孔结构更加有利于钛合金与骨组织之间的结合。有研究表明多孔钛合金比聚醚醚酮有具有更好的骨修复效果^[8], 但钛合金作为一种

生物惰性材料, 与骨组织之间以机械铆合的方式结合在一起, 无法在骨小梁水平上实现稳定而牢固的整合, 从而影响钛合金植入体的稳定性, 对骨缺损的治疗效果有一定不良影响。已有大量实验表明 WBV 刺激可以促进动物和人类的松质骨合成^[9], 并且能够显著抑制骨质疏松动物模型的骨量流失, 提高皮质

骨密度^[10]。在研究中发现,在对植入多孔钛合金种植体的骨缺损兔施加每天1 h的WBV刺激后,在取材的两个时间节点,骨小梁的矿化沉积率均明显高于对照组,这表明WBV不仅能够提高骨质疏松骨的骨密度,对骨缺损修复过程中的骨形成也有一定的促进作用。同时,在实验过程中发现,实验组钛合金附近的荧光标记数量明显比对照组多,这表明WBV不仅可以提高骨组织在钛合金表面的生长速度,而且对在促进骨与pTi的整合方面,WBV也有着积极的促进作用。

3.2 WBV对成骨细胞数量的影响

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。在正常的骨组织中,成骨细胞的骨形成作用和破骨细胞的骨吸收作用是维持正常骨量的关键,当骨组织出现损伤时,成骨细胞的骨形成作用对骨损伤的愈合有重要影响。一些体外实验中发现,成骨细胞的增殖、分化和矿化受机械应力影响显著,对其施加一定参数的机械载荷可以促进成骨细胞的增殖。本实验中我们也发现,实验组的成骨细胞数量明显多于对照组,说明WBV可明显促进成骨细胞的增殖,结合钙黄绿素荧光双标的结果可以发现,WBV不仅可以促进骨缺损兔体内成骨细胞的增殖,还能提高成骨细胞在钛合金表面的矿化,加速钙沉积,从而提高骨小梁的生长速度,使骨组织与钛合金的整合更加牢固,降低种植体松动的风险,加快骨缺损的愈合。

4 结 论

综上所述,相对于单独植入多孔钛合金的骨缺损动物模型,全身振动刺激作用于植入多孔钛合金

的骨缺损动物可提高骨小梁矿化沉积率,提高成骨细胞在动物体内的表达,从而加快骨缺损的愈合,提高植入体的稳定性,降低松动脱落的风险。

【参考文献】

- [1] GIANNOUDIS P V, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E. Bone substitutes: an update[J]. Injury, 2005, 36(Suppl 3): S20-S27.
- [2] MURPHY C M, HAUGH M G, O'BRIEN F J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2010, 31(3): 461-466.
- [3] XUE W, KRISHNA B V, BANDYOPADHYAY A, et al. Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium [J]. Acta Biomater, 2007, 3(6): 1007-1018.
- [4] BONFIELD W. Designing porous scaffolds for tissue engineering [J]. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2006, 364(1838): 227-232.
- [5] RUBIN C, XU G, JUDEX S. The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli [J]. FASEB J, 2001, 15(12): 2225-2229.
- [6] XIE L, JACOBSON J M, CHOI E S, et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton[J]. Bone, 2006, 39(5): 1059-1066.
- [7] CORNISH J, CALLON K E, BAVA U, et al. Systemic administration of adrenomedullin (27-52) increases bone volume and strength in male mice[J]. J Endocrinol, 2001, 170(1): 251-257.
- [8] WU S H, LI Y, ZHANG Y Q, et al. Porous titanium-6 aluminum-4 vanadium cage has better osseointegration and less micromotion than a poly-ether-ether-ketone cage in sheep vertebral fusion [J]. Artif Organs, 2013, 37(12): E191-201.
- [9] CHRISTIANSEN B A, SILVA M J. The effect of varying magnitudes of whole-body vibration on several skeletal sites in mice [J]. Ann Biomed Eng, 2006, 34(7): 1149-1156.
- [10] TOTOSY DE ZEPETNEK J O, GIANREGORIO L M, CRAVEN B C. Whole-body vibration as potential intervention for people with low bone mineral density and osteoporosis: A review [J]. J Rehabil Res Dev, 2009, 46(4): 529-542.

(编辑:薛泽玲)