文章编号:1000-5404(2014)23-2349-04

论著

50 Hz 0.1 mT 三角波电磁场提高大鼠峰值骨量

李少锋[1],陈克明[1],高玉海[2],周 建[2],成 魁[2],马小妮[2],周延锋[2],石文贵[2] (730070 兰州,甘肃农业大学生命科学技术学院[1];730050 兰州,兰州军区兰州总医院,骨科研究所[2])

[摘要] **目的** 研究50 Hz、0.1 mT三角波电磁场对大鼠峰值骨量(peak bone mass,PBM)的影响。**方法** 将5周龄的雌性SD大鼠分成对照组和实验组($n=9$)。实验组每天使用三角波电磁场处理90 min,对照组除不进行磁场干预外其他条件与实验组相同。在磁场处理中的第1、2、3个月末,腹腔麻醉测量骨密度(bone mineral density, BMD)。第3个月末心脏取血处死。ELISA试剂盒检测血清中碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase ,BALP)、瘦素(leptin, LEP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase 5b,Tracp 5b)含量,并进行骨形态计量分析。**结果** 实验组在1、2个月末,BMD检测与对照组相比无显著性差异($P>0.05$);3个月末,实验组BMD检测与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。血清生化检测结果显示实验组ALP含量上升,Tracp 5b和LEP含量下降,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)。实验组双荧光间距离和骨小梁宽度均高于对照组,有显著性差异($P<0.05$)。**结论** 低频三角波电磁场能够提高大鼠PBM。

[关键词] 三角波电磁场;骨密度;峰值骨量
[中图法分类号] R322.71; R339.57 [文献标志码] A

Triangle wave electromagnetic field (50 Hz, 0.1 mT) improves peak bone mass in rats

Li Shaofeng[1], Chen Keming[1], Gao Yuhai[2], Zhou Jian[2], Cheng Kui[2], Ma Xiaoni[2], Zhou Yanfeng[2], Shi Wengui[2] ([1]College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu Province, 730070; [2]Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of triangle wave electromagnetic field (EMF) on the peak bone mass in rats. **Methods** Female SD rats (5 weeks old) were randomly divided into 2 groups, control ($n=9$) and experimental group ($n=9$). The rats of the latter group were exposed to a triangle wave EMF at a frequency of 50 Hz and an intensity of 0.1 mT for 90 min every day, while those of the control group were under the same conditions as the experimental group except no magnetic field intervention. In 1, 2 and 3 months after magnetic treatment, bone mineral density was determined after abdomen anesthesia. All the rats were executed by drawing-out all the blood in their hearts in 3 months after treatment. ELISA was used to measure the serum contents of alkaline phosphatase (BALP), leptin (LEP) and tartrate resistant acid phosphatase (Tracp-5b). A computer-aided image processing system was employed to analyze the morphology of the femur after Van Gieson staining. **Results** No significant difference was found in bone mineral density between the experimental group and control in 1 and 2 months of magnetic intervention ($P>0.05$). But in 3 months, significant difference was seen ($P<0.05$). Serum biochemical results showed that the serum content of ALP was increased, and those of Tracp-5b and LEP were decreased, with significant difference when compared with the control ($P<0.05$). The distance of the double fluorescence and the average width of bone trabecula were significantly larger in the experimental group than the control ($P<0.05$). **Conclusion** Low frequency triangular wave electromagnetic field improves the peak bone mass in rats.

[**Key words**] triangle wave type electromagnetic field; bone mineral density; peak bone mass

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81270963) and the Major Special Project of Science and Technology of Gansu Province (092NKDA025). Corresponding author: Chen Keming, Tel: 86-931-8994329, E-mail: chkeming@lut.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81270963);甘肃省科技重大专项计划(092NKDA025)
[通信作者] 陈克明,电话:(0931)8994329, E-mail: chkeming@lut.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1607.016.html (2014-11-06)

峰值骨量(peak bone mass,PBM)是正常生理条件下骨骼发育至成熟期时的骨量,一般以骨密度表示,是人一生所能达到的最大骨量。近年研究表明,PBM与骨质疏松症(osteoporosis,OP)的关系极为密切[1-3]。PBM越高,则以后发生OP的几率越低、时间越晚。随着生物医学工程学的发展,电磁场提高PBM的生物学效应为OP的治疗提供了一种新的思路和方法。该方法最大的优点是无创伤、无感染、操作简单、费用低廉,并可长期使用[4]。目前,国内外有众多学者都在进行电磁场提高PBM的研究,其中大多数采用的是脉冲电磁场[5-7]。本课题组采用正弦波和三角波电磁场在细胞水平证实,两种电磁场能够促进成骨细胞在骨发生和骨形成过程中成熟分化,并得到了一些具体的实验参数[8-10]。与此同时,本课题组的高玉海等[11]在动物实验中证实正弦波电磁场提高大鼠的PBM存在时间效应。本实验基于课题组前期结论,研究低频三角波电磁场对PBM的影响。为电磁场延缓OP的发生提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及材料

SD雌性大鼠[甘肃中医学院动物SPF级实验中心,许可证号:SCXK(甘)2011-0001],水合氯醛(天津大茂化学试剂公司,中国),双能X线骨密度仪(GE公司,美国),酶标仪(Bio Tek公司,美国),BALP试剂盒(上海研吉公司,中国)、TRACP 5b酶试剂盒(上海研吉公司,中国),LEP试剂盒(上海研吉公司,中国),荧光显微镜(奥林巴斯公司,日本),Technovit® 9100树脂包埋试剂盒(Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG,德国),SP1600硬组织切片机(LEICA公司,德国)。

1.2 低频电磁场骨质疏松治疗仪

低频电磁场骨质疏松治疗仪由本实验室自行研制(专利号:ZL 201120528586.0)。磁场强度在0~9 mT、频率在5~100 Hz范围内精确可调。治疗线圈采用经过特殊设计和排列的3组线圈,运行期间磁场环境均匀稳定。

1.3 实验动物分组及处理

1个月龄SD雌性大鼠18只,SPF级,体质量(110±5)g。在本实验室适应1周后,分成实验组和对照组。实验组每天用50 Hz 0.1 mT三角波电磁场处理90 min。对照组不进行磁场处理,其他条件均与实验组相同。实验期间自由进食进水。每周测量1次大鼠体质量。

1.4 骨密度检测

第1、2、3个月末腹腔麻醉后(10%的水合氯醛)双能X线骨密度仪(GE公司,美国)检测BMD。第3个月末骨密度检测后心脏取血处死。同时检测椎骨和股骨BMD。处死前10 d和前3 d,于皮下分别注射双荧光标记物:盐酸四环素(5 mg/mL)和钙黄绿素(2 mg/mL)。

1.5 内脏器官称量及病理学检查

将心、肝、脾、肺、肾及子宫取出后,剥离干净周围的脂肪组织并称质量,计算器官指数。随后福尔马林溶液固定,行病理切片检查。器官指数又称脏器指数,是用器官的质量除以大鼠的体质量,表示药物或者其他外界干涉对机体器官毒性的影响,器官指数增加表示脏器有充血、水肿、增生、肥大等变化。下降表示脏器萎缩、退行性变化等。

1.6 血清生化指标检测

心脏取血后,半径9.5 cm,1 500 r/min离心5 min,分离血清,冻存于-80 ℃备用。ELISA试剂盒测定BALP、TRACP 5b、LEP,于酶标仪450 nm处测定光密度值[$D(450)$],并通过标准曲线计算每孔中BALP、TRACP 5b、LEP的量。

1.7 骨组织形态分析

将一侧股骨用95%的酒精保存,后用Technovit® 9100树脂包埋试剂盒包埋,再用LEICA SP1600硬组织切片机切片,切片宽度为50 μm,切片后用胶水封固,封固后用1 200~2 000目砂纸打磨,每组挑选出制片质量最清晰的5个切片,然后在荧光显微镜下观察双荧光现象并拍照。然后进行苦味酸-品红(van gieson,VG)染色,显微镜下观察骨组织形态,并用IPP6.0图片分析软件进行骨形态计量学分析。

1.8 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件完成,数据以$\bar{x}\pm s$表示,不同组间差异采用单样本t检验。

2 结果

2.1 大鼠体质量及一般情况

对照组和实验组在实验期间一切正常,体质量差异无统计学意义($P>0.05$,图1)。饮食饮水及精神状态都无差异。

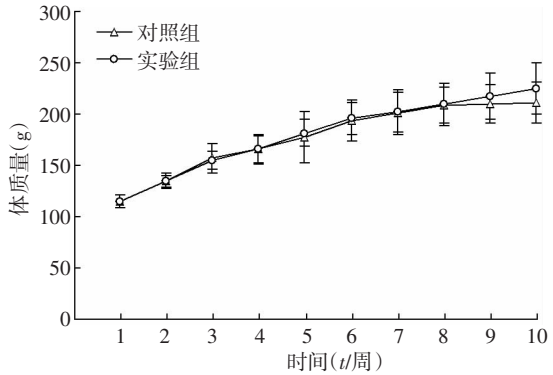


图1 实验期间2组大鼠体质量变化情况($n=9,\bar{x}\pm s$)

2.2 骨密度检测结果

1、2个月末实验组BMD与对照组比较,没有显著性差异($P>0.05$,表1)。3个月时,实验组BMD值显著高于对照组($P<0.05$,表1)。同时,实验组与对照组相比,股骨BMD显著增高($P<0.05$),与全身BMD保持一致。椎骨BMD增高,但BMD没有显著性差异($P>0.05$,表1)。

表1 不同时间2组大鼠BMD值变化(g/cm^2, $n=9,\bar{x}\pm s$)

组别	全身BMD	股骨BMD	椎骨BMD
对照组1个月	0.142±0.010	-	-
实验组1个月	0.141±0.008	-	-
对照组2个月	0.142±0.010	-	-
实验组2个月	0.146±0.005	-	-
对照组3个月	0.143±0.007	0.136±0.009	0.149±0.007
实验组3个月	0.153±0.007[a]	0.149±0.008[a]	0.156±0.010

a:$P<0.05$,与对照组3个月比较

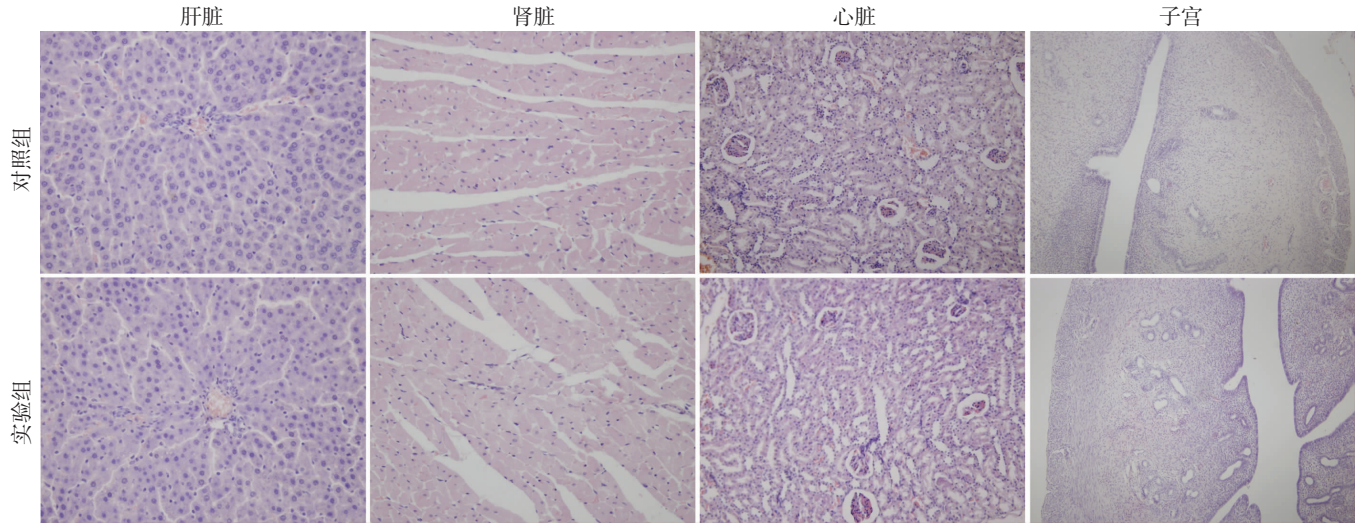


图 2　2 组大鼠器官组织病理对比观察（HE ×100）

2.3　生化指标检测结果

实验组骨形成指标 BALP 含量显著高于对照($P<0.05$，表 2)；骨吸收指标 Trap-5b 的含量显著低于对照组($P<0.05$，表 2)；LEP 含量显著低于对照组($P<0.05$，表 2)。

表 2　2 组大鼠血清 BALP、LEP、Tarp-5b 检测结果($n=9, \bar{x}\pm s$)

组别	BALP(U/L)	LEP(ng/mL)	Tarp-5b(IU/mL)
对照组	32.42 ±6.63	16.33 ±1.82	4.81 ±1.20
实验组	38.91 ±6.65[a]	13.85 ±3.02[a]	4.15 ±0.99[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.4　器官指数统计结果及病理切片对照

肾脏、子宫、心脏、肝脏实验组与对照组器官指数无统计学差异($P>0.05$，表 3)。从表 3 和图 2 的数据和病理切片观察发现，实验组和对照组肝脏、肾脏、心脏和子宫病理切片无差异。三角波电磁场没有对大鼠产生毒害作用。

表 3　2 组大鼠器官指数统计结果($n=9, \bar{x}\pm s$)

组别	肾脏	子宫	心脏	肝脏
对照组	0.586 ±0.024	0.293 ±0.025	0.323 ±0.040	2.633 ±0.201
实验组	0.599 ±0.061	0.308 ±0.078	0.321 ±0.028	2.529 ±0.075

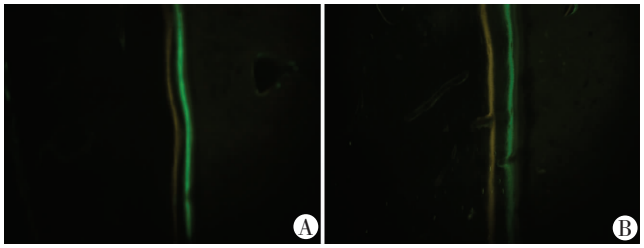
2.5　骨形态计量学分析

实验组双荧光距离显著高于对照组($P<0.01$，表 4)。实验组骨小梁的平均宽度显著高于对照组($P<0.05$，表 4)。图 3 为股骨的双荧光标记结果，代表矿盐沉积率，是一种骨形成指标。两荧光之间的距离代表骨 1 周的生长。图 4 为股骨的 VG 染色结果，由图可观察骨的内部结构和形态。

表 4　2 组大鼠双荧光距离及骨小梁宽度比较($n=5, \bar{x}\pm s$)

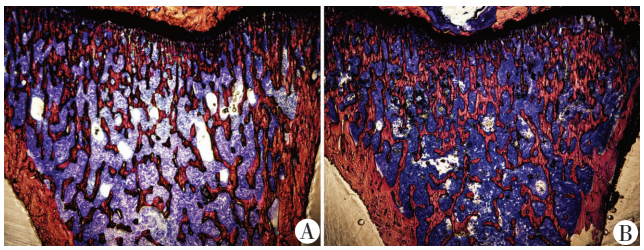
组别	双荧光距离（μm）	骨小梁宽度(mm)
对照组	0.374 ±0.176	4.210 ±0.025
实验组	0.599 ±0.201[a]	4.420 ±0.016[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较



A：对照组；B：实验组　黄色荧光是钙黄绿素；绿色荧光是盐酸四环素；两线之间的距离表示骨生长 7 d 的距离

图 3　2 组大鼠胫骨双荧光标记对比观察（荧光显微镜 ×200）



A：对照组；B：实验组　红色显示皮质骨和骨小梁；蓝色显示骨髓腔；黑色为骨骺线

图 4　2 组大鼠股骨组织形态对比观察（荧光显微镜 ×40）

3　讨论

低频电磁场刺激机体可以防止骨量丢失，改善骨组织微结构，促进骨形成。因其治疗简便、副作用小等优点被广泛地应用在临床和实验研究中[4-7,12-13]。目前大多数电磁场提高 PBM 的研究使用的波型都是脉冲波和正弦波。本实验以 BMD 为参考指标，因其可以通过 PBM 来反映骨的强度和抗骨折能力。股骨近端以及正位腰椎在反映骨的结构特性方面较其他测定部

位更有优势[2]。实验中以腰椎和股骨为标本具有科学性。骨小梁的排列和BMD的变化反映骨的内在强度,不受骨尺寸的影响[4]。高玉海等[11]报道正弦波电磁场提高了大鼠的BMD,骨的生长速度和骨小梁宽度均有显著性增加;成勇等[7]在脉冲电磁场的研究中也得到了类似的结果。本实验结果显示实验组的BMD显著高于对照组($P<0.05$);在骨的形态学分析结果中,实验组的骨小梁宽度和骨小梁数目以及骨小梁的整齐度和均匀度都高于对照组。三角波电磁场与正弦波和脉冲波有相近的作用效果。说明低频三角波电磁场能够改善骨组织微结构,并促进骨形成。

血清中的生化指标BALP和TRACP 5b反映体内骨代谢的一般状态,能够客观地反映骨形成和骨吸收。BALP含量的升高可以有效促进骨形成作用,TRACP 5b含量的降低可以有效降低骨吸收作用。BALP、TRACP 5b及LEP的检测后发现,实验组中BALP的含量高于对照组,TRACP 5b和LEP的含量低于对照组。生化指标的结果与骨密度的结果保持一致。在李志锋等[14]的脉冲电磁场刺激成骨分化的研究中BALP的活性比对照组有明显的提高。同样,高玉海等[11]提出正弦波可以提高大鼠的BALP含量。关志成等[13]的研究中脉冲电磁场可以降低血清TRACP 5b的含量。这就说明脉冲和正弦波电磁场在提高BALP和降低TRACP 5b上效果相同。瘦素对骨量的影响方面还存在着争议,但可以确定的是,瘦素水平的降低可以对骨量的提升产生影响[15-16]。

整个实验过程中两组大鼠的生长趋势保持一致,器官指数没有显著性差异。说明低频三角波电磁场提高大鼠PBM是安全可靠地。但是在实验中还发现,股骨和椎骨的BMD虽然都有提高但是椎骨的BMD没有统计学意义。我们将对此现象进一步研究,为低频电磁场提高PBM延缓OP的发生提供一些参考。

参考文献:

[1] 成魁, 王鸣刚, 陈克明, 等. 口服蛇床子素提高大鼠峰值骨量的研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(11): 1170-1174.

[2] WHO. 骨质疏松防治工作中期报告[C]. 全国骨质疏松诊断与防治研讨会资料, 2000: 21-28.

[3] Bonjour J P, Chevalley T, Ferrari S, *et al*. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis[J]. Salud Publica Mex, 2009, 51(Suppl 1): S5-S17.

[4] Jing D, Cai J, Wu Y, *et al*. Pulsed electromagnetic fields partially preserve bone mass, microarchitecture, and strength by promoting bone formation in hindlimb-suspended rats[J]. J Bone Mineral Res, 2014, 29(10): 2250-2261.

[5] 刘慧芳, 刘颖, 杨霖, 等. 脉冲电磁场治疗绝经后骨质疏松症的疗效观察[J]. 生物医学工程学杂志, 2014, 31(1): 48-52.

[6] 刘勇华, 涂萍, 吴和平. 脉冲电磁场辅助治疗原发性骨质疏松症疗效分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(3): 275-278.

[7] 成勇, 毕佳琦, 曲志伟, 等. PEMF对废用性骨质疏松大鼠骨形态及骨代谢作用的观察[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(2): 256-260.

[8] 周建, 王嘉琪, 马小妮, 等. 正弦交变电磁场对体外培养大鼠股骨骨组织的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2013, 30(3): 562-566.

[9] 周建, 李雪雁, 陈克明, 等. 50Hz正弦交变磁场对体外培养大鼠成骨细胞分化及BMP-2和collagen-I基因表达的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2010, 27(5): 2173-2177.

[10] Ming L G, Lv X, Ma X N, *et al*. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption *in vitro*[J]. Endocrinology, 2013, 154(3): 1202-1214.

[11] 高玉海,李 唯,陈克明,等. 正弦交变电磁场提高大鼠峰值骨量存在时间效应[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(15): 1557-1561.

[12] de-Girolamo L, Stanco D, Galliera E, *et al*. Low frequency pulsed electromagnetic field affects proliferation, tissue-specific gene expression, and cytokines release of human tendon cells[J]. Cell Biochem Biophy, 2013, 66(3): 697-708.

[13] 关志成, 杨小卫, 王黎明, 等. 脉冲电磁场对骨质疏松的生物效应[J]. 高电压技术, 2007, 33(2): 1-6.

[14] 李志锋, 程国政, 陈克明, 等. 不同强度脉冲电磁场对大鼠颅骨成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 西北国防医学杂志, 2010, 31(3): 179-181.

[15] Yadav V, Oury F, Suda N, *et al*. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure[J]. Cell, 2009, 138(5): 976-989.

[16] Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology [J]. Nature, 2012, 481(7381): 314-320.

(**收稿**:2014-06-12;**修回**:2014-09-26)

(编辑 汪勤俭)