

·基础研究·

45Hz 全身振动预防尾吊模型大鼠骨质丢失的研究*

谈 诚^{1,2,3} 马 超¹ 李志利² 柯 征³ 宫 赫³ 张 明³ 陈善广²

摘要 目的:探讨低频全身振动对尾吊大鼠骨质丢失的预防效果。**方法:**28 只雄性成年大鼠,随机分为 4 组:尾部悬吊组(SUS),尾部悬吊+地面刺激组(S+G,地面刺激:15min/d, 5d/周),尾部悬吊+振动刺激组(S+V, 振动刺激:45Hz, 0.2—0.5g, 15min/d, 5d/周)及对照组(CON)。8 周后,对各组股骨骨密度(BMD),血清中钙(Ca),磷(P),碱性磷酸酶(ALP)含量及胫骨的三点弯曲实验进行了观察。**结果:**经过 8 周的悬吊,S+V 组股骨头(主要为松质骨)骨密度明显高于 SUS 和 S+G 组,但仍低于 CON 组($P<0.05$)。而股骨中段(主要为皮质骨)骨密度在各组之间没有明显差别($P>0.05$)。三点弯曲结果显示 S+V 组胫骨最大载荷和刚度系数与 S+G 组和 SUS 组之间没有显著差异($P>0.05$)。血清中 Ca, P, ALP 含量在各组之间差异没有显著性意义。**结论:**45Hz 低频全身振动能在一定程度上延缓尾吊大鼠的后肢骨质丢失现象,提示其具备了成为长期失重飞行防护措施的可能。

关键词 低频全身振动;骨质丢失;防治措施;松质骨;皮质骨

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0200-04

Study on 45Hz whole body vibration in preventing the rats' bone substances loss induced by tail suspended/
TAN Cheng, MA Chao, LI Zhijian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 200—203

Abstract Objective:To investigate the effect of low frequency whole body vibration in preventing the rats' bone substances loss induced by tail suspended. **Method:**Twenty-eight male adult rats were divided randomly into 4 groups, including tail suspended group (SUS), tail suspended + ground stimulus group (S+G, ground: 15min/d, 5d/week), tail suspended + vibration group (S+V, vibration: 45Hz, 0.2—0.5g, 15min/d, 5d/week), and control group (CON). Bone mineral density (BMD) of femur, and concentration of Ca, P and ALP in serum were examined after 8 weeks experiment. The tibia and humerus were taken to experiencing the 3-point bending test to explore the anti-load ability changes. **Result:** After 8 weeks tail suspended in rats, the BMD of femur head (mainly trabecular bone) in S+V group were significantly higher than that in SUS and S+G group, but lower than that in CON group ($P<0.05$). The BMD of middle femur (mainly cortical bone) showed no great changes between 3 groups. The max load and stiffness coefficient of tibia in S+V group were higher than that in SUS and S+G group, but there was no statistical difference among these 3 groups ($P>0.05$). There were no changes of the concentration of Ca, P and ALP in serum between 3 groups. **Conclusion:**The 45Hz whole body vibration can prevent bone substances loss and sustain bone's mechanical properties in rats during tail suspended to some extent, which means that 45Hz whole body vibration possess the potential to be a good countermeasure in preventing bone substances loss during long-duration loss-weight space flight.

Author's address Biomechanics Lab, School of Mechanical and Vehicular Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing, 100081

Key words low frequency whole body vibration; bone substances loss; countermeasure; trabecular bone; cortical bone

长期的失重飞行可以导致骨质丢失,肌肉萎缩,心血管功能失代偿及其他生理性障碍。其中,骨质丢失和肌肉萎缩对于长期的失重飞行而言是最为严重的危害之一^[1],主要表现包括:骨骼抗载荷能力的下降,负钙平衡,肌肉萎缩,以及运动能力受限等。根据国外太空飞行的数据,在外太空飞行时,骨质丢失的量约为 1%/月,在失重飞行的早期即可出现,并贯穿整个太空失重飞行过程,呈持续性丢失,而且其恢复的时间,比所经历失重飞行的时间要长得多,甚至可能根本无法恢复^[2]。当航天员返回地球或进入其他引力星球时,极易出现骨折或者机体活动受限的情况。

目前,在太空中已经使用了多种防护措施,以改善航天员的生理情况,保障生命安全。但是,几乎所有的防止肌肉萎缩和骨质丢失的措施,包括功能训练(自行车功量计、平板跑台、拉力器等),企鹅服(产生持续的身体纵向的力负荷,大约相当于在肩部产

* 基金项目:载人航天基础研究课题(SJ200605);香港理工大学基础研究基金(1-BB81)

1 北京理工大学机械与车辆工程学院生物力学实验室,北京,100094

2 中国航天员科研训练中心重力生理实验室

3 香港理工大学健康技术与信息系

作者简介:谈诚,男,博士

收稿日期:2008-08-27

生约 80%体重的力量),下体负压舱等装置,都无法实现完全防止骨质丢失的发生^[3]。

最近的临床实验和动物研究结果表明,低幅($<100\mu\text{g}$),低频(10—90Hz)的全身振动,可以有效地增加骨质量,防止骨质疏松的发生。接受振动刺激的绝经期后妇女,脑瘫患儿以及动物实验的结果^[4-6],都证实了振动刺激能显著增加骨密度,刺激骨质形成,增强肌力,提高身体的平衡性,甚至对于心血管系统也有一定的保护作用。

本研究尝试通过对模拟失重的尾吊大鼠进行全身振动刺激,探讨低频低幅的全身振动刺激能否有效地防护尾部悬吊所引起的骨质丢失现象,对其作为长期失重环境下的防护措施的可性开展研究。

1 实验方法

1.1 实验对象

28 只 5 月龄雄性 SD 大鼠,体重 $460\pm 40\text{g}$,由香港中文大学动物中心提供。根据随机化的原则分为 4 组,包括单纯尾吊组 (SUS, $n=7$),尾吊+地面刺激组 (S+G,地面刺激方式:去除悬吊模式,地面自由活动 15min/d, 5d/周, $n=7$),尾吊+振动组 (S+V,振动方式:大鼠在固定装置内,呈四足站立姿势,接受来自足底的 45Hz 垂直方向全身振动,振动加速度 $0.2\text{—}0.5\text{g}$, 15min/d, 5d/周, $n=7$),以及地面对照组 (CON, $n=7$)。在实验中,所有大鼠均在独立的笼内生活,接受 12h:12h 的日昼夜节律,室内温度控制于 $20\pm 1^\circ\text{C}$ 。实验前,所有大鼠均接受 3d 的适应性生活,自由饮水和取食。大鼠尾吊模型是按照既往研究方法^[7],后肢离开地面,保持身体纵轴(头尾向)与地面水平之间夹角为 -30° 。所有动物均接受每日监护。

1.2 材料的获取

大鼠在悬吊 8 周后,通过注射过量麻醉剂的方法处死。迅速取后肢双侧股骨、胫骨以及前肢肱骨,去除骨骼上附着的肌肉、韧带及结缔组织,称重后置入 -20°C 冰箱中保存。所有标本待取材结束后一起进行相应的检测和分析。

1.3 骨密度检查

所有待测的右侧股骨标本于进行实验前 12h 从冰箱中取出,室温下解冻。在 STRATEC XCT-2000 pQCTTM (香港理工大学康复医学系提供,Stratec 公司,德国)上进行骨密度的观察。分别扫描股骨上端(以松质骨为主)和股骨中段(以皮质骨为主)。股骨上端以股骨头顶端为起始部位,按照与股骨纵轴垂直的扫描平面,向股骨远心端连续扫描 8 张图像,间隔 0.5mm。股骨中段以股骨纵轴中点为起始部位,扫

描平面与股骨纵轴垂直,向远心端连续扫描 5 张图像,间隔同前。扫描图像即刻存入计算机内,通过仪器自带的分析软件进行分析处理。

1.4 骨骼三点弯曲实验

双侧胫骨、双侧肱骨于进行实验前 12h 从冰箱中取出,在万能材料实验机 INSTRON (香港理工大学健康技术与信息系提供,Instron 公司,美国)上进行三点弯曲实验。加载间距 20mm,加载速度 $2\text{mm}/\text{min}$,匀速加载至标本断裂。计算机描记出载荷-变形曲线,分析实验数据并换算得到最大载荷和弯曲刚度系数(stiffness coefficient)指标。

1.5 血清学骨代谢指标测定

所有大鼠在处死前,从心脏采血约 3ml。常温离心 ($3000\text{r}/\text{min}$, 20min),取上清液,置于 -20°C 冰箱中保存。所有样本在标本采集结束后 2d 同时进行检测。于 7080 全自动生化分析仪 (香港理工大学健康技术与信息系提供,HITACHI 公司,日本)上测量血清中 Ca、P 及 ALP 含量。

1.6 统计学分析

所有数据于 SPSS11.0 上进行。数据以均数 $\pm$ 标准差表示。方差分析明确各组间是否存在显著差异,使用团体 t 检验验证各组两两之间是否存在明显差别,使用重复测量的方差分析对不同时间点的各组生理指标进行分析。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 模拟失重大鼠前后体重变化

实验前,各组之间体重没有差别。体重随时间变化的结果显示,开始悬吊后,S+G, SUS 组体重迅速下降,尤其以第二周最为明显。此后体重逐渐上升,但与实验前比较,无论是第 2、4、6、8 周,与实验前体重都存在显著的下降 ($P<0.05$),S+V 组在第 2 周体重有明显的下降 ($P<0.05$),但在第 4、6、8 周体重逐渐上升,与实验前相比无显著差异 ($P>0.05$)。

组间比较的结果显示,S+G, S+V, SUS 组与 CON 组之间存在显著差异 ($P<0.01$)。S+G, S+V, SUS 组之间在第 2、4、6 周时没有显著差别 ($P>0.05$),但在第 8 周时,S+V 组体重明显高于 SUS 和 S+G 组 ($P<0.05$),SUS 和 S+G 组之间差异没有显著性意义。见表 1。

2.2 大鼠骨骼重量的变化

经过 8 周的悬吊后,股骨、胫骨和肱骨重量在各组之间差异无显著性 ($P>0.05$)。见表 2。

2.3 大鼠股骨骨密度的变化

骨密度检查结果显示,振动刺激对于松质骨的

表 1 不同悬吊时间下各组大鼠体重变化

($\bar{x} \pm s, g$)

组别	实验前	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
CON 组	460.1±52.3	495.2±49.0 ^①	518.8±55.8 ^①	521.6±57.9 ^①	527.7±55.7 ^①
S+G 组	455.4±25.8	384.6±39.0	408.7±23.1	408.6±42.6	421.0±19.4
S+V 组	460.7±38.5	414.8±38.5	431.0±48.2	447.4±49.3	466.0±34.7 ^②
SUS 组	461.5±37.8	385.2±38.7	407.5±32.8	418.6±39.6	421.7±30.4

①与 S+G、S+V、SUS 组比较 $P<0.01$;②与 SUS 组、S+G 组比较 $P<0.05$;S+G 和 SUS 组比较 $P>0.05$

影响大于对皮质骨的影响。经过 8 周的尾部悬吊后, S+V、S+G 和 SUS 组大鼠股骨松质骨(股骨头)骨密度较 CON 组有明显程度的下降($P<0.05$),但 S+V 组显著高于 S+G 和 SUS 组($P<0.05$)。在皮质骨部位(股骨中段),变化趋势与松质骨相同,但没有显著性差异($P>0.05$)。见表 3。

2.4 大鼠骨骼抗载荷能力的变化

大鼠胫骨和肱骨加载实验结果表明,胫骨的最大抗载荷能力和刚度系数在各组之间存在差异。CON 组明显高于其他各组($P<0.05$),S+V 组、S+G 组和 SUS 组之间没有明显差异($P>0.05$)。肱骨的加载实验结果显示各组之间无显著性差异。见表 4。

2.5 大鼠血清中 Ca、P 及 ALP 含量的变化

经过 8 周的悬吊,大鼠血清中的 Ca、P 及 ALP 在各组间没有显著差异($P>0.05$)。见表 5。

表 2 悬吊 8 周后各组骨骼重量变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	股骨	胫骨	肱骨
CON 组	1.67±0.28	1.22±0.16	0.73±0.24
S+G 组	1.54±0.18	1.07±0.13	0.74±0.19
S+V 组	1.59±0.17	1.14±0.14	0.80±0.11
SUS 组	1.52±0.27	1.05±0.17	0.69±0.10

表 3 尾部悬吊和振动刺激对大鼠骨密度影响 ($\bar{x} \pm s, mg/m^2$)

组别	股骨头	股骨中段
CON 组	640.1±60.7 ^①	1075.9±18.8
S+G 组	528.2±40.6	987.5±37.5
S+V 组	564.4±60.7 ^②	1036.7±33.2
SUS 组	508.3±20.0	1005.2±20.1

①CON 组与 SUS、S+V、S+G 组比较 $P<0.05$,②S+V 与 SUS 和 S+G 组比较 $P<0.05$ 表 4 尾部悬吊对大鼠骨骼抗载荷能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

测试项目/ 受试骨	CON 组	S+G 组	S+V 组	SUS 组
胫骨				
最大抗载荷能力(N)	121.08±12.94 ^①	106.12±7.90	112.51±6.73	110.73±10.34
刚度系数(N/mm)	152.72±11.92 ^①	124.53±13.00	138.69±13.91	128.55±18.02
肱骨				
最大抗载荷能力(N)	106.39±21.43	113.36±116.76	116.76±17.06	109.28±14.86
刚度系数(N/mm)	222.21±46.03	244.41±27.94	255.83±63.85	231.66±56.59

①与其他各组比较 $P<0.05$ 表 5 模拟失重大鼠血清 Ca、P 及 ALP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	CON 组	S+G 组	S+V 组	SUS 组
P(mmol/L)	2.78±0.34	2.57±0.38	2.53±0.46	2.61±0.17
Ca(mmol/L)	3.36±0.38	3.06±0.36	3.17±0.23	3.20±0.32
ALP(U/L)	164.0±11.8	145.8±36.9	146.8±29.4	157.2±28.4

3 讨论

大量的动物实验和临床研究证实,低频(10—90Hz)低幅($<100\mu\epsilon$)的全身振动刺激能够有效改善老年绝经期后妇女、脑瘫患儿、尾部悬吊小鼠等各种原因引起的骨质丢失现象^[4-6]。因此,有学者认为,振动刺激有可能成为一种新型有效的防护长期失重飞行所导致骨质丢失的措施。目前,美国和欧洲航天局均已经开展了有关全身振动对于航天飞行骨质丢失和肌肉萎缩防护效果的研究工作,但具体报道的文献很少,相关的地面研究工作则主要是针对地面模拟失重动物的研究(尾部悬吊大鼠、小鼠)^[8-9]。研究结果表明了低频低幅的全身振动刺激能显著增加悬吊大鼠和小鼠后肢骨骼骨密度,刺激骨质形成,从而对抗了由于尾部悬吊所导致的后肢骨质丢失现象。Denial B^[10]则从气-液分子交换水平对振动作作为人工重力的可行性进行了分析,认为尽管受到多种因素(包括如温度、接触界面)的限制,但振动可以增加气-液分子交换过程,从而增强骨骼和肌肉的代谢,完全有可能成为人类在太空中所使用的人工重力。

在本研究中,我们主要观察了垂直方向上的全身振动对长期尾吊大鼠后肢骨骼系统的影响。结果发现,经过较长时间的振动刺激,悬吊+振动组大鼠股骨上端(松质骨)骨密度、体重等指标较单纯悬吊组及悬吊+地面刺激组有显著的增加($P<0.05$),说明振动刺激能在一定程度上防止尾部悬吊所导致的骨质丢失现象。悬吊+地面刺激组的结果证实了这种刺激是由振动引起,而非地面刺激的作用。

关于振动刺激是如何刺激骨质形成的机制,Rubin C^[4,9]认为是由于力学刺激直接作用于骨骼的效果。Wolff 定律指出,力学刺激直接作用于骨骼,导致骨骼局部的应力应变发生变化。当应变变量在一定的范围(1000—3000 $\mu\epsilon$)时,能够有效地刺激骨质的生长。动物和人体实验的结果也证实约 30—90Hz 的低幅振动刺激(作用 20—30min)能够有效地刺激骨形成^[4-6,11-12]。这与我们的研究结果基本一致。但是,另外一些学者^[13-16]开展了左右摇摆式全身振动研究,结果表明在增加肌肉锻炼,提高机体平衡性上,短时间(2—4min/d)的锻炼量即能够取得很好的作用。而对于骨骼而言,即使增加振动时间(20min),也没有什么明显的效果。作者认为,低频低幅的全身

振动,即使对于骨骼系统有保护作用,也可能是通过肌肉发挥的效果。由于下肢肌群的自发性收缩频率约为 20—25Hz,而实验所使用的振动刺激频率正好是落于该频域范围。在受到振动刺激时,下肢肌群收缩次数增加,起到增强肌肉锻炼的作用,进一步作用于骨骼系统,从而实现对骨骼的锻炼。在本研究中,我们对肌肉重量的变化做了观察,同样显示了对肌肉具有较好的保护作用。结果提示了垂直方向的全身振动刺激可能同时对骨骼和肌肉系统发挥了作用。但这两者之间是互为因果,还是振动刺激通过不同途径分别发挥作用,还有待于进一步研究的证实。

在本研究中,我们证实了悬吊大鼠松质骨对振动刺激的敏感性要大于皮质骨的变化。Rubin C^[17]和 Alesha BC^[18]指出,低频低幅的全身振动刺激,对松质骨有较好的刺激作用,但对于皮质骨而言,则没有明显的效果。不过,对于这一结论,两位作者均保持了谨慎的态度,认为还需要大样本的实验结果支持。在本研究中,我们得到与以上研究类似的结果,但同时,也仍然存在着一些条件因素可能对本实验结果产生的影响,包括:①在本研究中,每组样本的例数相对较少(n=7),动物个体差异较大,容易导致结果无法达到显著差异的统计学水平。②既往研究的观察对象均为雌性(包括大鼠和小鼠)^[8-9,17-18],而在本研究中,我们所使用的是成年雄性大鼠。考虑到性激素可能参与悬吊大鼠对重力消失因素下骨质丢失的发生机制^[19],因此,在本研究中,性别上的差异是否会导致结果上的不同,还有待于进一步证实。③三点弯曲主要验证的是夹具中间部位的骨骼抗载荷能力,这一部分主要是由皮质骨组成,而对于位于长骨两端的松质骨,实际上并未包含在骨骼的抗载荷能力观察之内。总之,振动刺激究竟是如何影响皮质骨和松质骨的调节,还需要更多的研究来进行探讨。

有研究表明^[1-3],尾部悬吊模型所导致的骨质丢失,是骨骼系统一种局部改变,而非全身性变化,主要表现为原来的承重骨部位(后肢)存在明显的骨质丢失现象,而在头部或前肢等部位,则没有明显变化,甚至有轻度增高的趋势。这一现象与人在太空中的变化是基本一致的^[1]。在本研究中,各组之间血清中的 Ca、P 及 ALP 含量没有明显的变化,提示了这种骨质丢失现象主要是一种局部改变。对于这一结论,还需要在增加更多的样本,选择更加敏感指标,开展更深入研究的基础上才能得以证实。

4 结论

45Hz 的低频低幅的全身振动刺激,能在一定程

度上缓解尾部悬吊所导致的大鼠后肢骨质丢失现象,但防护效果相对有限。在结合其他锻炼模式的基础上可能会取得更好的效果。本研究由于实验条件所限,缺乏大样本的广泛研究。因此,还存在许多问题有待于进一步的工作来证实,例如振动方式、振动时间、作用机理、人体实验的结果,与抗阻锻炼方法的结合使用,进行大样本观察等。

参考文献

- [1] Russell TT. Physiology of a Microgravity Environment: Invited Review: What do we know about the effects of spaceflight on bone[J]. *J Appl Physiol*, 2000, 89(2): 840—847.
- [2] Vico L, Lafage MH, Alexandre C. Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo [J]. *Bone*, 1998, 5(S):95—100.
- [3] Peter RC, Angelo A, Andrea JR. Exercise and pharmacological countermeasure for bone loss during long-duration space flight [J]. *Gravitational and Space Biology*, 2005, 18(2): 39—58.
- [4] Rubin C, Turner S, Bain S, et al. Anabolism: Low level mechanical signals are anabolic to trabecular bone [J]. *Nature*, 2001, 412: 603—604.
- [5] Mester J, Kleinoder H, Yue Z. Vibration training: benefits and risks [J]. *Journal of Biomechanics*, 2006, 39: 1056—1065.
- [6] Jordan J. Good vibrations and strong bones [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288: 555—556.
- [7] 陈杰,马进,丁兆平,等.一种模拟失重影响的大鼠尾部悬吊模型[J]. *空间科学学报*, 1993, 13(2): 159—162.
- [8] Xie LQ, Busa B, Donahue LR, et al. Low-level mechanical vibrations enhance bone formation without loss of bone quality in the growing skeleton [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20: 349—354.
- [9] 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, 15:2225—2229.
- [10] Daniel B. Vibrations in space as an artificial gravity[J]. *Euro-physics news*, 2006, 37(3):21—25.
- [11] Lamothe JM, Zernicke RF. Rest insertion combined with high-frequency loading enhances osteogenesis [J]. *J Appl Physiol*, 2004, 96:1788—1793.
- [12] Ward K, Alsop C, Caulton J, et al. Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling CONditions [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19:360—369.
- [13] Torvinen S, Kannus P, Sievanen H, et al. Effect of a vibration exposure on muscular performance and body balance. Randomized cross-over study [J]. *Clin Physiol & Func Im*, 2002, 22(1):145—152.
- [14] Torvinen S, Sievanen H, Jarvinen TAH, et al. Effect of 4-min vertical whole body vibration on muscle performance and body balance: A randomized cross-over study [J]. *Int J Sport Med*, 2001, 23: 374—379.
- [15] Torvinen S, Kannus P, Jarvinen TAH, et al. Effect of four-month vertical whole body vibration on performance and balance [J]. *Med Sci Sport Exerc*, 2002, 34: 1523—1528.
- [16] Torvinen S, Kannus P, Sievanen H, et al. Effect of 8-month vertical whole body vibration on bone, muscle performance and body balance. A randomized CONtrolled study [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(2): 297—312.
- [17] Rubin C, Turner S, Mallinckrodt C, et al. Mechanical strain, induced non-invasively in the high frequency domain, is osteogenic to cancellous—but not cortical—bone [J]. *Bone*, 2001, 15(2): 2225—2229.
- [18] Alesha BC, Imranul A, Shigeo MT, et al. Low-amplitude, broad-frequency vibration effects on cortical bone formation in mice[J]. *Bone*, 2006, 39(4): 1087—1096.
- [19] 谈诚,张春林. 雄激素在失重骨丢失中的作用[J]. *航天医学与医学工程*, 2004, 17(4):309—312.