

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：The effect of low intensity ultrasound stimulation on the
osteoblasts

(英、中文) 不同低強度超音波刺激對於骨母細胞之影響

計畫類別：☐ 個別型計畫 ☒ 整合型計畫

計畫編號：N S C 89 - 2213 - E002 - 189 -

執行期間：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

個別型計畫：計畫主持人：

共同主持人：

整合型計畫：總計畫主持人：張恆雄

子計畫主持人：孫瑞昇

註：整合型計畫總報告與子計畫成果報告請分開編印各成一冊，
彙整一起繳送過國科會。

處理方式：☐ 可立即對外提供參考

☐ 一年後可對外提供參考

☒ 兩年後可對外提供參考

(必要時，本會得展延發表時限)

執行單位：台大醫學院骨科

中華民國九十年十一月十日

不同低強度超音波刺激對於骨母細胞之影響

The Effects of Low Intensity Ultrasound Stimulation on Osteoblasts

計畫編號：NSC 89-2213-E-002-189

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：孫瑞昇

台大醫學院 骨科

共同主持人：

執行機構及單位名稱

計畫參與人員：林政鞍

一、中文摘要

骨母細胞 (osteoblast) 活性在骨折癒合或骨質疏鬆過程扮演重要角色，與造骨能力相關，在臨床上，超音波刺激已證實可加速骨折癒合的速度，本研究目的在以體外培養的模式，探討不同強度超音波刺激對於骨母細胞之影響。

首先我們架設超音波刺激系統，由刺激水槽、去氣泡槽、加熱槽組成形成一恆溫循環系統；超音波輸出參數：1MHz 2msec on 8msec off，及五種不同刺激強度 150, 300, 600, 1200, 2400 mW/cm²。骨母細胞以 5×10^4 cells/ml 種植密度培養在 3 公分培養皿上，靜置 24 小時後更換培養液並接受 15 分鐘超音波刺激，最後收取上清液分析 PGE₂ 及細胞染色。

在細胞型態觀測上，2400 mW/cm² 刺激組細胞有剝離的現象；細胞數分析結果，在接受 600 mW/cm² SATP 刺激組有增加趨勢，並有統計上差異 ($p < 0.05$)；在 PGE₂ 表現方面，600、1200 mW/cm² 刺激組能誘發出較多 PGE₂ ($p < 0.05$)，最大及最小強度皆無效果。

由此實驗模式發現，在接受適當強度超音波刺激不但會加速骨母細胞生長，且會增加 PGE₂ 表現，其中 PGE₂ 在超音波開啟之生化路徑上應扮演著重要角色。

關鍵詞：治療性超音波，骨母細胞，體外培養、前列腺素

Abstract

The purpose of this study is to compare the effects of different far-field or near-field low intensity ultrasound stimulation on the osteoblasts and to clarify the relationship between prostaglandin E₂ and osteoblast

proliferation. We use an in-vitro far-field (240 mm), short term (15 minutes) exposure model to investigate the effects of 1 MHz, 1 : 4 pulsed, and five different spatial-average temporal-peak intensity (150, 300, 600, 1200, 2400 mW/cm²) ultrasound stimulations on osteoblasts. Optimum intensity in this study was 600 mW/cm², and cell density and prostaglandin E₂ secretion could be significantly stimulated at this intensity. This research may indicate that the growth of osteoblasts by ultrasound stimulation was at least partly due to increases in the synthesis and secretion of PGE₂. This well-controlled model can lead to further research on the biological mechanisms for ultrasound.

Keywords: In vitro, PGE₂, Osteoblasts, Therapeutic ultrasound

二、緣由與目的

創傷治療中最難癒合的莫過於骨折了，由於是體內硬度次高的區域，並存有大量鈣化的基質，一旦外力介入造成骨斷裂，修復時間將長達半年。一般骨外科醫師除了對於病患做適當的清瘡及外固定，還會加入適當的物理刺激如電刺激及超音波刺激等等，加速病患癒合的時間。

超音波刺激最早可追溯到 1960 年代，Knoch 和 Klug 【1】兩位學者首先利用連續式超音波刺激治療骨壞死，強度為 500mW/cm²，並暗示超音波刺激對於骨折癒合會有正面的效果；1980 年代【2】，Duarte 繼續發展這樣的觀念，但改用脈衝式超音波刺激降低施予強度 (50mW/cm²)，並成功的在動物模式上加速骨折癒合；1990 年代，臨床報告陸續出

爐，Heckman【3】於 1994 年發表的文章中，67 位骨折病患中一半接受低強度超音波刺激、一半接受假性刺激，我們由結果發現超音波刺激大大的縮短治療時間；根據統計【4】，截至 1997/7/14，超過 300 位醫師已開過低強度超音波刺激處方，總病患數以達 6500 人，骨折從新骨折到不癒合之病人皆有。

病患發生骨折時，首先會誘發一系列炎性反應，其次是骨母細胞與軟骨細胞增生，最後進行骨重塑。前列腺素 E2(PGE2) 被發現在骨折位置上濃度會提高，Jee【5】於 1985 年發表經長期注射 PGE2 會增加骨量，國內張恆雄教授【6】於 1992 年也發現，在兔子骨折後接受超音波刺激，會誘發內生 PGE2，由此發現 PGE2 在骨癒合過程中扮演重要角色，且超音波刺激也會加速骨頭分泌。

另外，雖然目前利用超音波刺激應用在骨質疏鬆文獻較少，但由前面的介紹已知超音波刺激或許會活化造骨細胞的功能，也就是可改善骨流失的情況，為能詳細瞭解超音波刺激於微觀上的影響，本計畫利用骨母細胞體外培養模式探討超音波刺激對於骨母細胞的影響。

三、研究方法

骨母細胞培養

將初生 1 天 Wistar rat (台大動物中心) 手術取出頭蓋骨，剔除軟組織後剪碎，利用膠原蛋白酶依序將骨母細胞分離出來，離心後與含 10% 胎牛血清之培養液共同培養，待滿盤後利用 Trypsin-EDTA 分離細胞，以 5×10^4 cells/well 細胞量於 3cm 培養皿中培養，靜置一天後更換為含 1% 胎牛血清之培養液進行實驗。

超音波刺激系統

超音波需要介質作傳導，系統架設以循環水域為主，水必須流經去氣泡水槽及加熱槽，減少超音波刺激氣泡的干擾及維持刺激環境在恆定的溫度中 (37℃)，系統中還以步進馬達帶動超音波探頭轉動，增加細胞的暴露量，硬體架設如圖一所示。

實驗設計

實驗共分為五組，超音波刺激強度為 150,

300, 600, 1200, 2400 mW/cm² SATP (探頭輸出)，以一刺激組搭配一控制組進行實驗，接受超音波刺激後 (15 分鐘)，於 1 小時收取上清液 1cc，24 小時後細胞染色。

分析方法

影像分析系統：擷取 8 張細胞照片/盤，計算單位面積細胞數；酵素免疫分析法：利用商用分析組以酵素免疫法分析。

四、結果與討論

在細胞型態觀測上，2400 mW/cm² 刺激組細胞有剝離的現象 (圖二)；細胞數分析結果列於圖三，接受 600 mW/cm² SATP 刺激組有增加趨勢，並有統計上差異 ($p < 0.05$)；在 PGE2 表現方面，600、1200 mW/cm² 刺激組能誘發出較多 PGE2 ($p < 0.05$)，最大及最小強度皆無效果。

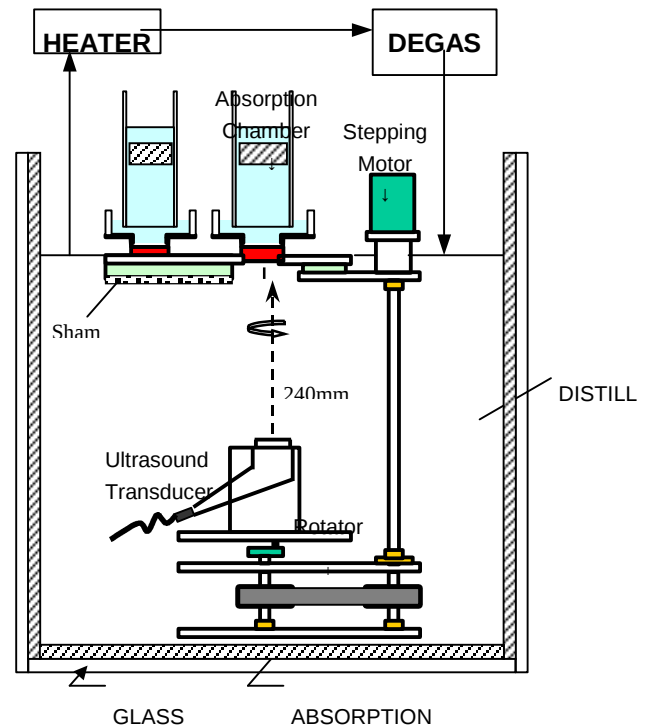
雖然臨床上超音波刺激已漸漸使用在骨折癒合治療中，但詳細分子間之機轉上不明確，在我們的報告中，我們證明了在大鼠骨母細胞體外培養實驗中，超音波刺激會促進 PGE2 生成及細胞生長，所以在機轉的討論中，PGE2 應扮演其中一重要媒介因子。另外我們由物理角度來看，超音波也提供一機械力於細胞系統，我們由一些機械應力刺激方面，如剪力及張力等，也會促進 PGE2 分泌，所以，所有機械力必定參與一個以上相同路徑誘發生物效應。

本研究乃構思以體外培養模式，探討超音波刺激對於骨細胞的生物效應，解決臨床醫學的疑惑，並期能在機轉上做更深入的探討，提供超音波治療在骨質疏鬆症之應用評估。

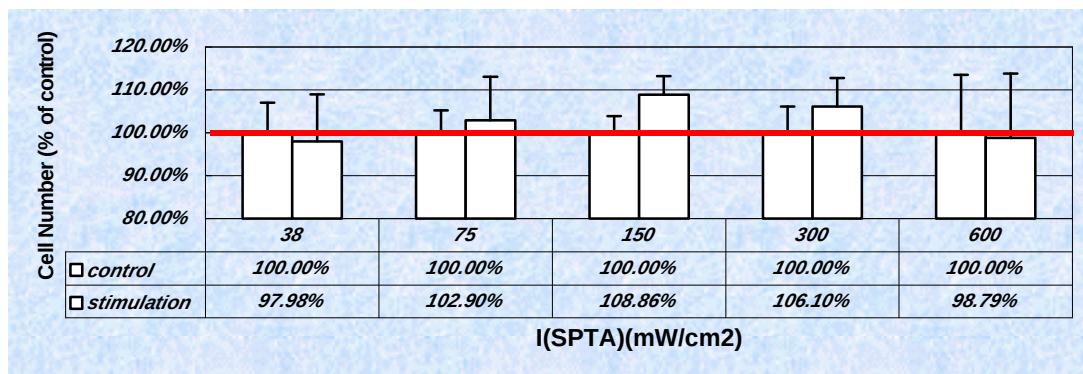
五、參考文獻

- [1] Knoch H-G., "Beitrag zur Wirkungsweise der Ultraschallenergie. Schriften der Med". Akademie Dresden 6:81-87, 1967.
- [2] Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedic & Traumatic Surgery*. 101(3):153-9, 1983.
- [3] Heckman JD. Ryaby JP. McCabe J. Frey JJ. Kilcoyne RF. Acceleration of tibial

- fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume*. 76(1):26-34, 1994 Jan
- [4] **Mayr** E. Frankel V. Ruter A. Ultrasound--an alternative healing method for nonunions?. *Archives of Orthopaedic & Trauma Surgery*. 120(1-2):1-8, 2000.
- [5] **Jee** WS. Ueno K. Deng YP. Woodbury DM. The effects of prostaglandin E2 in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcified Tissue International*. 37(2):148-57, 1985 Mar.
- [6] Tsai CL. **Chang** WH. Liu TK. Song GM. Ultrasonic effect on fracture repair and prostaglandin E2 production. [erratum appears in Chin J Physiol 1992;35(2):168]. *Chinese Journal of Physiology*. 35(1):27-34, 1992.



圖一：超音波刺激系統



圖二：不同強度超音波刺激對於細胞成長的影響

