

骨 科 学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002001

水浴法低强度脉冲超声治疗对老年小鼠早期骨代谢
血生化指标影响

陈俊林,刘宝茹,汪 威,罗 东,李成海,陈锦云,陈文直,王 嫣

(重庆医科大学生物医学工程学院、省部共建国家重点实验室培育基地-重庆市超声医学工程重点实验室、
重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆 400016)

【摘要】目的:初步探索水浴法超声治疗装置的可行性,研究水浴法超声治疗对老年小鼠早期骨代谢血生化指标影响。**方法:**44 只雌性 C57BL6 小鼠随机分为 12~14 个月的假照组和超声组,20~23 个月的假照组与超声组。构建水浴超声治疗装置并采用低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound,LIPUS)水浴法进行辐照。采用 COMSOL 5.3 软件包对水浴超声治疗装置进行理论仿真模拟,绘制声压分布图。小鼠眼眶取血,使用全自动生化仪检测血钙离子(calcium,Ca)与血磷离子(phosphorus,P)水平。采用酶联免疫吸附测定法检测骨特异性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase,BALP)与 I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列(β isomer of C-terminal telopeptide of type I collagen, β -CTX)。**结果:**水浴法 LIPUS 能成功穿透骨皮质,在骨髓腔仍有声压分布。20~23 个月的小鼠与 12~14 个月小鼠对比,血 Ca、P 与 β -CTX($P=0.611$, $P=0.660$, $P=0.855$)无统计学差异,但其 BALP 水平明显降低[(2.24 ± 0.70) vs. (4.35 ± 1.87), $P=0.002$]。12~14 个月与 20~23 个月的超声组的小鼠与假照组相比血 Ca 水平明显下降[(8.42 ± 0.29) vs. (9.59 ± 0.30);(8.86 ± 0.64) vs. (9.82 ± 0.32), $P=0.000$],血 P 水平明显上升[(10.33 ± 1.09) vs. (8.99 ± 0.76);(10.17 ± 1.17) vs. (8.49 ± 0.72), $P=0.014$; $P=0.002$]。BALP 的表达水平明显提高[(6.17 ± 1.09) vs. (4.35 ± 1.84);(5.05 ± 0.94) vs. (2.24 ± 0.70), $P=0.006$; $P=0.000$], β -CTX 的表达只在高龄组明显下降[(114.8 ± 19.72) vs. (189.1 ± 57.94), $P=0.047$]。**结论:**水浴法超声治疗装置的构建是可行的,并有效改善老年 C57BL6 小鼠的早期的骨代谢生化指标。

【关键词】低强度脉冲超声;水浴法;骨代谢生化指标**【中图分类号】**O426.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-08Effect of underwater low intensity pulsed ultrasound on early biochemical
markers of bone metabolism in aged mice

Chen Junlin, Liu Baoru, Wang Wei, Luo Dong, Li Chenghai, Chen Jinyun, Chen Wenzhi, Wang Yan

(State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-Founded by Chongqing and the Ministry of
Science and Technology; College of Biomedical Engineering; Chongqing Key Laboratory of Biomedical
Engineering, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To preliminarily explore the feasibility of underwater low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) device, and to study its effect on early biochemical markers of bone metabolism in aged mice. **Methods:** A total of 44 female C57BL6 mice were randomly divided into sham control group and ultrasound group (both groups were divided into 12-14 month subgroup and 20-23 month subgroup). An underwater LIPUS device was constructed and used for irradiation in the corresponding groups. A theoretical simulation of the underwater LIPUS device was carried out using COMSOL 5.3 software, and a sound pressure distribution map was drawn. Orbital blood samples were collected from the mice and tested for serum levels of calcium (Ca) and phosphorus (P) using an automatic biochemical analyzer; the levels of bone alkaline phosphatase (BALP) and β isomer of C-terminal telopeptide of type I collagen (β -CTX) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** The underwater LIPUS was able to penetrate the cortical bone with sound pressure distributed into the medullary cavity. Compared with the mice aged 12 to 14 months, the mice aged

作者介绍:陈俊林, Email: chenjunlin1993@foxmail.com,

研究方向:超声与康复。

通信作者:王 嫣, Email: wangyancq@cqmu.edu.cn。

基金项目:重庆市科委基础与前沿研究计划一般资助项目(编号:
cstc2016j-cyjA0599)。优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190305.1640.006.html>
(2019-03-06)20 to 23 months had no significantly different serum levels of Ca, P, and β -CTX ($P=0.611$, 0.660 , and 0.855 , respectively), but had a significantly reduced BALP level (4.35 ± 1.87 vs. 2.24 ± 0.70 , $P=0.002$). Compared with the sham control group, the ultrasound group had a significantly reduced serum Ca level (12-14 month subgroup: 9.59 ± 0.30 vs. 8.42 ± 0.29 , $P=0.000$;

20–23 month subgroup: 9.82 ± 0.32 vs. 8.86 ± 0.64 ; $P=0.000$), a significantly increased serum P level (12–14 month subgroup: 8.99 ± 0.76 vs. 10.33 ± 1.09 , $P=0.014$; 20–23 month subgroup: 8.49 ± 0.72 vs. 10.17 ± 1.17 , $P=0.002$), a significantly increased expression level of BALP (12–14 month subgroup: 4.35 ± 1.84 vs. 6.17 ± 1.09 , $P=0.006$; 20–23 month group: 2.24 ± 0.70 vs. 5.05 ± 0.94 , $P=0.000$), and a significantly decreased expression level of β -CTX (only in the 20–23 month subgroup: 189.1 ± 57.94 vs. 114.8 ± 19.72 , $P=0.047$). **Conclusion:** It is feasible to construct an underwater LUPUS device, and it can effectively improve the early biochemical markers of bone metabolism in aged C57BL6 mice.

【Key words】low intensity pulsed ultrasound; underwater treatment; biochemical markers of bone metabolism

老年性骨质疏松症是原发性骨质疏松的一种, 呈现为成骨活性明显降低而破骨活动仍维持一定水平的“低转换”型骨质疏松的特点^[1]。我国的流行病学研究表示 60 岁以上的老年人群骨质疏松的发生率已达 45% 以上, 而 70 岁以上的老年人群骨质疏松的发病率则可达 55% 以上^[2]。目前针对骨质疏松症防治对策, 相较于药物治疗法会存在潜在的副作用, 临床指南更推荐非药物治疗^[3]。低强度脉冲超声 (low intensity pulsed ultrasound, LIPUS) 作为对骨组织有效的力学信号的物理疗法的一种, 有效避免了药物应用的副作用, 还具有无创伤、无电离辐射、价格低廉等优点^[4]。美国食品与药品监督委员会 (Food and Drug Administration, FDA) 分别于 1994 年和 2000 年批准了 LIPUS 用于新鲜骨折和骨不连的临床治疗^[5]。骨折和骨量丢失在干预时某些生物机制相似, 因此 LIPUS 可能是改善骨量丢失的重要潜在手段。骨量减少是全身性的骨代谢紊乱, 若直接使用 LIPUS 进行局部辐照所起作用显然有限, 更佳的治疗方案需要进一步的探索, 为此本研究拟构建一种 LIPUS 水浴法以进行小鼠的全身辐照。

骨代谢生化标志物是反映身体内骨代谢转化情况的指标, 在体液中的改变相对于骨密度而言更早, 可以及时反映全身骨骼骨吸收与骨形成的动态变化情况, 因此检测骨代谢生化指标对骨质疏松症的早期诊断、判断骨量减少的程度、预测骨折风险以及抗骨质疏松疗效判定方面均有重要价值^[6]。本研究将对水浴法超声治疗方案进行初步探索, 并进一步探究水浴法超声对老年小鼠的早期骨生化指标的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

低强度脉冲超声仪 (重庆海扶医疗科技股份有限公司), 医用耦合剂 (天津华科医疗器械公司), 全自动生化分析仪

(IDEXX 公司, 美国), I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列 (β isomer of C-terminal telopeptide of type I collagen, β -CTX) 和骨源性碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 恒温箱 (上海一恒公司), ELX-800 酶标仪 (Biotek 公司, 美国), Milli-Q 纯水仪 (Merck 公司, 德国)。

1.2 实验动物

44 只 SPF 级别雌性 C57BL6 小鼠购于重庆医科大学实验动物中心 (许可证编号: SYXK[渝]2017-0023), 体质量 18–30 g, 饲养环境为温度 (25 ± 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (40 ± 10)%, 12 h 昼夜交替, 自由饮食饮水。小鼠适应性饲养 7 d 后, 按照月龄分为 12–14 月龄组 ($n=22$)、20–23 月龄组 ($n=22$)。2 月龄组中再随机分为假照组 ($n=10$) 和超声组 ($n=12$)。

1.3 LIPUS 水浴法辐照

超声辐照采用水浴法进行辐照, LIPUS 仪配备的 6 个超声探头 (直径: 34.8 mm) 分别固定于自制的固定板下方。圆柱形的水浴槽与探头的直径相仿, 下方开口与声透膜连接。声透膜与探头之间用耦合剂封闭后固定。纳入实验的小鼠经脱毛, 加入 30 $^{\circ}\text{C}$ 脱气水, 保留小鼠头部在水面上。采用自制活动限制器置于水槽内防止小鼠活动过多以及逃出。自制活动器直径小于水槽, 其下方有网状开孔, 允许空气流通便于小鼠呼吸。超声辐照参数如下: 声强 200 mW/cm^2 、频率 0.3 MHz、重复频率 1 kHz、占空比 20%、每次辐照时间 20 min, 1 次/d, 持续 30 d。假照组除探头无能量输出外与其他操作相同。小鼠经适应性假照训练 3 d 后无异常躁动表现则纳入实验。水浴法超声辐照方法如图 1 所示。

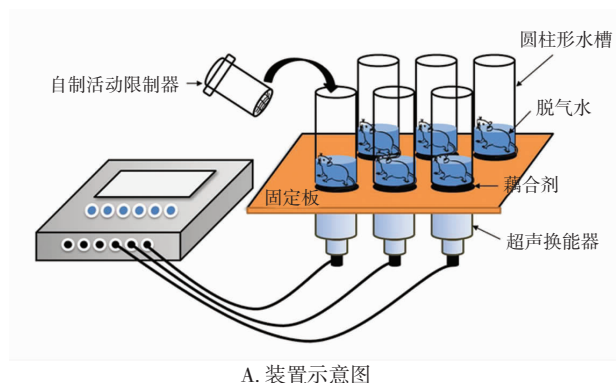
1.4 水浴法超声装置理论仿真模拟

使用 COMSOL Multiphysics[®] 5.3 软件进行 LIPUS 水浴法进行理论仿真模拟, 进一步探索其方案的可行性。解剖小鼠测量各层结构的厚度, 设置超声波依次穿过的结构顺序如下: 水-皮肤-肌肉-骨皮质-骨髓, 见表 1, 参数设置参考生物组织的声衰减系数^[7]。根据超声波通过各层结构的声压绘制声压分布图。

1.5 骨代谢生化指标检测

小鼠在超声辐照完毕后, 经眼眶取血采样。样品经离心 (3 000 r/min , 10 min) 后, 取上清, 于重庆医科大学宠物医院进行检测, 余量上清置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。采用全自动生化检测仪测定血钙 (calcium, Ca), 血磷 (phosphoru, P) 水平。取

出-80℃冰箱的样本,采用 ELISA 法按试剂盒推荐步骤检测 BALP 和 β -CTX 的表达水平。BALP 试剂盒灵敏度为 0.1 ng/mL, β -CTX 试剂盒灵敏度为 5 ng/L。



A. 装置示意图



B. 单个超声晶元辐照实验图

图 1 LIPUS 水浴法辐照方法示意图

表 1 COMSOL Multiphysics® 5.3 软件理论仿真
模拟中的参数使用

组织	密度 (kg/m ³)	声速 (m/s)	声衰减系数 (Np/m)	厚度 (mm)
水	1 000	1 500	0.025	1.0
皮肤	1 190	1 600	34.000	0.8
肌肉	1 090	1 595	15.000	1.0
骨皮质	1 800	3 380	140.000	0.4
骨髓腔	1 010	1 550	2.000	3.0

1.6 统计学分析

骨代谢生化指标等计量指标使用 Graph pad prism 6 软件包进行分析,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合正态分布、方差齐性的多组资料采用单因素方差分析,事后组间分析采用 Turkey 法,正态方差不齐资料比较时使用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

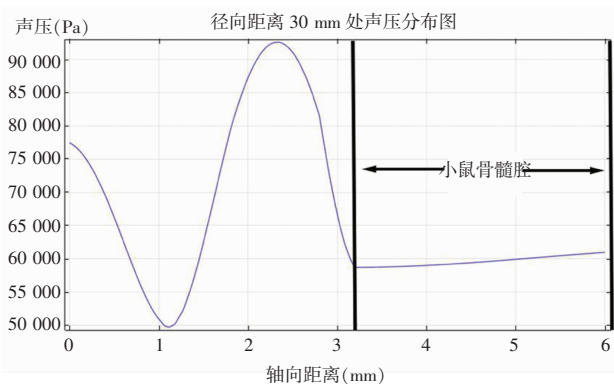
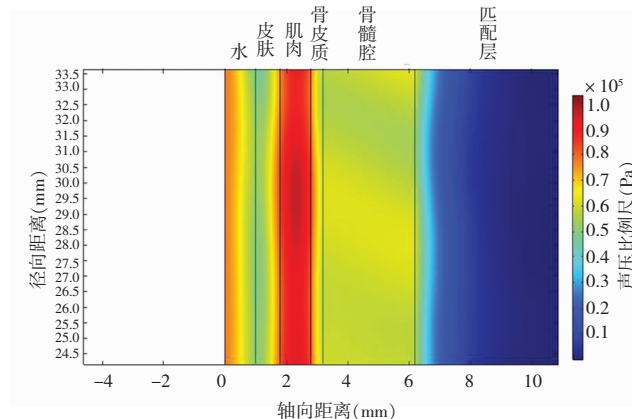
2.1 小鼠的一般情况

代养至 20~23 月龄的 C57Bl6 小鼠较 12~14 月龄组别的

小鼠自主活动与日均进食减少,毛色变淡,稀疏,部分个体存在“斑秃”,对操作的反应较为迟缓。20~23 月龄组中自发性肿瘤的小鼠排除实验外($n=1$)。

2.2 水浴法超声装置理论仿真模拟

COMSOL Multiphysics® 5.3 软件所绘制声压分布结果显示如图 2 所示,超声波依次透过水(耦合剂)、皮肤、肌肉、骨皮质、骨髓腔,到达骨髓腔内仍然有超声能量沉积,其声压约为初始声压的 60%,说明采用构建水浴法 LIPUS 治疗的方案是可行的。



匹配层为超声波完全不反射的理想层面

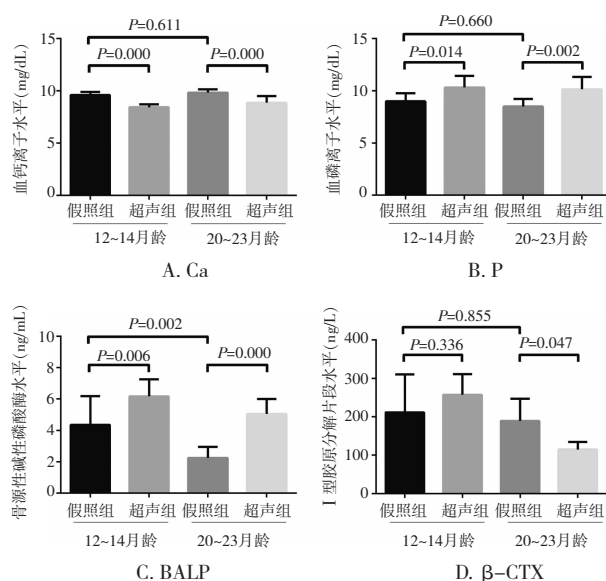
图 2 LIPUS 水浴法辐照的声压分布图

2.3 骨代谢生化标志物结果

如表 2 与图 3 所示,在假照组中,与 12~14 月龄小鼠相比,20~23 月龄小鼠的血清 Ca 和 P 的水平无统计学差异($P=0.611$ 、 $P=0.660$),BALP 的表达明显下降($P=0.002$),而 β -CTX 水平无统计学差异($P=0.855$)。在 12~14 月龄组别中,与假照组相比,超声组的小鼠血清 Ca 水平明显下降($P=0.000$),血 P 水平明显上升($P=0.014$),提示骨盐有沉积于骨组织的倾向。低强度超声治疗明显提高了 BALP 的表达水平($P=0.006$), β -CTX 的表达无统计学差异($P=0.336$)。此外,在 20~23 月龄组别中,与假照组相比,超声组的小鼠同样呈现血清 Ca 明显减少($P=0.000$)而血 P 明显增加($P=0.002$),同时血清中 BALP 的表达明显上升($P=0.000$), β -CTX 的表达明显下降($P=0.047$)。

表 2 假照组与超声组的血清骨代谢生化标志水平比较

月龄	组别	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	BALP (ng/mL)	β -CTX (ng/L)
12~14 月	假照组 (n=10)	9.59 $\pm$ 0.30	8.99 $\pm$ 0.76	4.35 $\pm$ 1.84	211.50 $\pm$ 98.82
	超声组 (n=12)	8.42 $\pm$ 0.29	10.33 $\pm$ 1.09	6.17 $\pm$ 1.09	257.30 $\pm$ 53.81
20~23 月	假照组 (n=10)	9.82 $\pm$ 0.32	8.49 $\pm$ 0.72	2.24 $\pm$ 0.70	189.10 $\pm$ 57.94
	超声组 (n=12)	8.86 $\pm$ 0.64	10.17 $\pm$ 1.17	5.05 $\pm$ 0.94	114.80 $\pm$ 19.72
F 值		26.380	9.018	20.070	10.180
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

图 3 各组间小鼠的血清 Ca、P、BALP、 β -CTX 水平比较柱状图

3 讨论

骨吸收与骨形成的平衡是机体维持骨量的重要因素,随着年龄的增长,成骨能力明显下降而破骨水平仍然维持在一定的水平是老年性骨量丢失的主要病因^[8]。在骨质疏松症的防治研究中,C57BL6 小鼠的骨骼发育特点与基因调控快速衰老的 SAMP 小鼠有一定的相似之处,其骨量在 2~3 月龄时快速增长,约 12 个月时达到峰值,此后随着年龄的增长而逐步下降,是研究老年性骨质疏松的候选模型^[9-10]。C57BL6 小鼠骨量在 12 个月后基本稳定,20~23 个月为老年期,属老年性骨质疏松高发时期,故本实验采用 12~14 月龄以及 20~23 月龄的小鼠纳入实验。

LIPUS 作为对骨组织有效的力学信号的物理疗法的一种,具有无创伤、无电离辐射、价格低廉等优点。已有相关报道 LIPUS 在骨折愈合中具有积极作用,如加速成骨^[11-12],减少骨量丢失^[13]等,而骨折和骨量丢失在干预时某些生物机制相似,因此低强度脉

冲超声可能是改善骨量丢失的重要潜在手段。以往的研究中,Wu 等^[14]以卵巢切除术制作大鼠腿骨骨质疏松模型 LIPUS 治疗的右侧股骨湿重和骨小梁数量有增加,一定程度上说明 LIPUS 可加速成骨作用,减少骨量丢失。何柳等^[15]同样采用卵巢切除术建立小鼠骨质疏松症模型后通过 LIPUS 局部辐照脊柱区,其脊柱区骨组织密度和生物力学性能皆有显著改善,而雌激素水平亦显著提高。而本研究采用适龄生理性退变的小鼠进行超声辐照,其功能变化更接近老年时期骨量丢失而不仅限于雌激素水平的改变,更有利于评价 LIPUS 对老年性骨量丢失的疗效。骨量丢失是全身性的骨代谢紊乱所引起的,以往研究中多采用的局部区域 LIPUS 辐照所起的作用有限,本研究探索的一种水浴法 LIPUS 辐照方式保证覆盖了较大的治疗面积,可能为骨量丢失的防治提供新思路。超声波在水中的衰减几乎可以忽略不计且束射性良好^[16],为优良的透声窗。本实验拟搭构水浴法 LIPUS 辐照小鼠的装置,经过 COMSOL Multiphysics® 5.3 软件进行理论仿真模拟,声压分布结果显示 LIPUS 在依次经过水、皮肤、筋膜和肌肉等软组织、骨皮质,到达骨髓腔内仍然有超声能量的沉积,说明 LIPUS 水浴法治疗装置的搭建是可行的。LIPUS 的机械效应和温热效应均可促发若干物理化学变化从而影响机体代谢,由于水作为超声传导的媒介几乎没有声能量的吸收而产热极低,其温热效应的影响极乎其微。老年时期的活动减少导致骨骼力学信号异常是老年性骨质疏松的重要病因之一,而 LIPUS 可能通过机械效应弥补骨骼缺乏的力学信号从而调节骨骼重建过程^[17-18],其机制可能与刺激骨髓间充质干细胞的活动有关^[19]。

Angel 等^[20]与 Lai 等^[21]研究报道了 LIPUS 辐照能提高 BMP-2 与 TGF- β 等相关成骨因子的表达水平从而加速骨愈合。老年时期的骨代谢异常为本研究重点,骨代谢生化指标较骨密度而言变化更早,还能预测一定单位时间未来时间的骨量变化,因此

应用水浴超声刺激小鼠后骨代谢生化指标的早期变化可以评估干预的效果。Ca 离子与 P 离子在血液中一般维持相对稳态。BALP 为成骨细胞的特异性产物,其反映的是成骨的活性,而 β -CTX 为细胞外基质中成熟的胶原纤维降解产物,其反映的是骨吸收能力^[2],两者为评价骨重建平衡的重要指标。与年轻的小鼠对比,老年的小鼠血 Ca、P 与 β -CTX 无统计学差异,但其 BALP 水平明显降低,可见老年时期的成骨的活性大大降低而骨吸收仍然维持一定的水平,符合老年性骨量丢失的“低转换”的特征。经过水浴超声辐照后小鼠的血 Ca 降低,血 P 上升,促进了血钙入骨,有骨盐沉积于骨组织的倾向。此外,超声组的 BALP 水平皆明显升高,成骨活动比假照组活跃,但 β -CTX 在 12~14 月龄与 20~23 月龄的小鼠反应各异,推测年轻时期机体可能对破骨能力的调节更强,更不易受外界条件影响,然而老年期的破骨活动受到 LIPUS 的抑制。

综上所述,本实验成功搭建 LIPUS 水浴法治疗装置,LIPUS 水浴辐照能提高血 BALP 水平促进成骨,降低老年时期 β -CTX 的水平从而抑制破骨活动,有效改善老年 C57BL6 小鼠的早期的骨代谢生化指标。随着大型的水疗康复设备以及超声治疗学的发展,两者的联合应用可能为临床治疗老年性骨质疏松提供新的治疗思路。本研究亦为 LIPUS 水浴法治疗的初步探索,尚存在不完善之处。骨重建的调节是缓慢而复杂的过程,尚需要建立长期稳定的实验模式,而进一步研究 LIPUS 水浴法治疗的参数与机制都需要更多类型的数据支撑。

参 考 文 献

- [1] Alonsobouzon C, Duque G. Senile osteoporosis: an update[J]. *Revista Española De Geriátria Y Gerontología*, 2011, 46(4): 223–229.
- [2] 刘 璠. 骨质疏松性骨折的流行病学研究进展[J]. *实用老年医学*, 2010, 24(5): 356–359.
- [3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2017, 20(5): 413–443.
- [4] Niikura T, Yang LS, Iwakura T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) treatment for the patient with bone reconstruction by the masquelet technique using RIA[J]. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2016, 30(8): S4.
- [5] 陈俊林, 王 嫣. 超声波在干细胞治疗中的应用进展[J]. *集成技术*, 2018, 7(5): 36–46.
- [6] 方 岩, 魏宏顺, 朱 涛. 骨转化标志物在骨质疏松症中的应用进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2015, 36(6): 432–435.
- [7] 冯 若. 哺乳动物组织的超声性质研究进展[J]. *应用声学*, 1984, 3(1): 3–9.
- [8] Jilka RL, O'Brien CA. The role of osteocytes in age-related bone loss[J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2016, 14(1): 16–25.
- [9] Ferguson VL, Ayers RA, Bateman TA, et al. Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice[J]. *Bone*, 2003, 33(3): 387–398.
- [10] Chen H, Shoumura S, Emura S. Ultrastructural changes in bones of the senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis[J]. *Histology and Histopathology*, 2004, 19(3): 677–685.
- [11] Angle SR, Sena K, Sumner DR, et al. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound[J]. *Ultrasonics*, 2011, 51(3): 281–288.
- [12] Ganzorig K, Kuroda S, Maeda Y, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhances bone formation around miniscrew implants[J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(6): 902–910.
- [13] Uddin SM, Qin YX. Dynamic acoustic radiation force retains bone structural and mechanical integrity in a functional disuse osteopenia model[J]. *Bone*, 2015, 75: 8–17.
- [14] Wu S, Kawahara Y, Manabe T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation in an osteoporosis rat model[J]. *Pathobiology*, 2009, 76(3): 99–107.
- [15] 何 柳, 王 然, 王晓文, 等. 低强度脉冲超声对骨质疏松症小鼠模型的作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 2(6): 657–660.
- [16] Király M, Varga Z, Szanyó F, et al. Effects of underwater ultrasound therapy on pain, inflammation, hand function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis—a randomized controlled trial[J]. *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 2017, 21(3): 199–205.
- [17] Krishnamoorthy D, Frechette DM, Adler BJ, et al. Marrow adipogenesis and bone loss that parallels estrogen deficiency is slowed by low-intensity mechanical signals[J]. *Osteoporosis International*, 2016, 27(2): 747–756.
- [18] Ridha H. Connecting mechanics and bone cell activities in the bone remodeling process: an integrated finite element modeling[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2014, 2: 6.
- [19] Ruixin H, Weichen Z, Yu Z, et al. Combination of low-intensity pulsed ultrasound and C3H10T1/2 cells promotes bone-defect healing[J]. *International Orthopaedics*, 2015, 39(11): 2181–2189.
- [20] Angle SR, Sena K, Sumner DR, et al. Combined use of low-intensity pulsed ultrasound and rhBMP-2 to enhance bone formation in a rat model of critical size defect[J]. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2014, 28(10): 605–611.
- [21] Lai CH, Chen SC, Chiu LH, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF- β 1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs. osteogenic differentiation[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2010, 36(6): 1022–1033.
- [22] Cavalier E, Bergmann P, Bruyère O, et al. The role of biochemical of bone turnover markers in osteoporosis and metabolic bone disease: a consensus paper of the Belgian Bone Club[J]. *Osteoporosis International*, 2016, 27(7): 2181–2195.

(责任编辑: 张辉洁)