

文章编号:1004-7220(2012)05-0572-05

模拟微重力对大鼠关节软骨力学特性的影响

牛海军¹, 王青², 王月香³, 孙联文¹, 李德玉¹, 樊瑜波¹

(1. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100191;
2. 南方医科大学 生物医学工程学院, 广州 510515; 3. 中国人民解放军总医院 超声科, 北京 100853)

摘要: **目的** 基于大鼠尾吊实验,研究模拟微重力对关节软骨组织力学特性的影响。**方法** 通过14 d的尾吊实验建立模拟微重力作用的大鼠模型,获得12块后肢大腿骨关节处软骨样本,运用高频超声测量技术获取大鼠关节软骨特定位置因自由膨胀引起的组织应变,基于三相模型估计软骨组织的轴向弹性模量,并比较尾吊组 and 对照组大鼠关节软骨的力学特性。**结果** 尾吊组大鼠后肢特定测量位置处软骨厚度的平均值略小于对照组,但差异不显著;尾吊组大鼠特定位置关节软骨组织的平均轴向弹性模量为 (5.05 ± 2.98) MPa,小于对照组 $((6.31 \pm 3.37)$ MPa),两者存在着显著差异($P < 0.05$)。**结论** 微重力环境会影响关节软骨组织的力学特性,本研究结果为人类长期的太空活动提供参考信息。

关键词: 模拟微重力; 关节软骨; 力学特性; 吊尾模型; 高频超声; 轴向模量

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of simulated microgravity on mechanical properties of rat articular cartilage

NIU Hai-jun¹, WANG Qing², WANG Yue-xiang³, SUN Lian-wen¹, LI De-yu¹, FAN Yu-bo¹ (1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Biomechanics and Mechanobiology, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China; 2. School of Biomedical Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Ultrasound, the General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of simulated microgravity on mechanical properties of articular cartilage based on the tail suspension test in rats. **Methods** Six rats underwent tail suspension for 14 days and the other 6 rats were kept under normal earth gravity as controls to obtain 12 cartilage samples from the femur. Site-specified swelling strains were measured using high frequency ultrasound in all cartilage samples subjected to osmotic loading. The uniaxial modulus of the cartilage was determined by the triphasic theoretical model. The mechanical properties of articular cartilage in experimental and control group were also compared. **Results** The 14-day tail suspension induced a minor decrease in cartilage thickness at specified site, but the change was not significant. Compared with the control group, the uniaxial modulus of articular cartilage at specified site was significantly decreased from (6.31 ± 3.37) MPa to (5.05 ± 2.98) MPa after tail suspension ($P < 0.05$). **Conclusions** The long-time microgravity condition may affect biomechanical properties of the articular cartilage. This result will provide some useful information for the long-term human spaceflight.

Key words: Simulated microgravity; Articular cartilage; Mechanical properties; Tail suspension model; High frequency ultrasound; Uniaxial modulus

收稿日期:2011-10-03; 修回日期:2011-12-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31170896, 30872720)。

通讯作者:樊瑜波,教授, Tel: (010) 82339152; E-mail: yubofan@buaa.edu.cn。

在长期进化过程中,人类形成了与地球重力环境相适应的生理结构与功能。航天实践活动表明,失重会对宇航员的肌骨系统造成严重危害^[1-3]。为更好地研究失重对人体造成伤害的机制、提出有效的对抗措施,美国宇航局于20世纪70年代建立了能在地面模拟空间微重力生物效应的动物模型—大鼠尾吊模型^[4],现已被广泛应用于各种相关实验研究中。

基于大鼠尾吊实验,许多研究者探索了模拟微重力条件下骨丢失的机理与对抗措施^[5-8],但是对同样起着承重、润滑和摩擦等重要作用的关节软骨的研究却很少,微重力环境中软骨组织的生理变化不清楚。关节软骨是一种特殊形式的结缔组织,组织内无血供,完全依靠携带营养成分的隙间液体维持正常生理功能,而液体主要通过软骨组织之间的运动挤压扩散进入组织内部。因此可以猜测,在微重力环境下,由于软骨失去某些常规应力负荷刺激,可能会引起组织营养、代谢、生物合成等障碍,进一步可能造成其力学特性的变化。Wang等^[9]首次使用超声显微镜研究了模拟微重力条件下大鼠关节软骨形态和声学参数的变化,结果显示特定部位软骨的厚度与表面粗糙度发生了变化,局部表面出现轻微的早期骨关节炎迹象,但未探索软骨组织力学性能的变化。

目前,研究软骨组织力学特性的常规设备为材料试验机,实验者通常采用夹具通过拉伸、压缩等方法获得软骨的蠕变和应力松弛特性,并基于各种力学模型计算组织的弹性模量。但是对于大鼠这种小型动物来说,由于软骨尺寸小、厚度薄,上述方法并不适合。Narmoneva等^[10-11]提出了一种适用于小动物软骨力学特性研究方法,该方法基于对组织膨胀应变的测量,通过软骨三相模型估算得到组织轴向弹性模量,为尾吊大鼠软骨组织力学特性研究提供了手段。结合高频超声测量对动物软骨组织弹性模量的提取,已经证明了该技术的有效性^[12-14]。

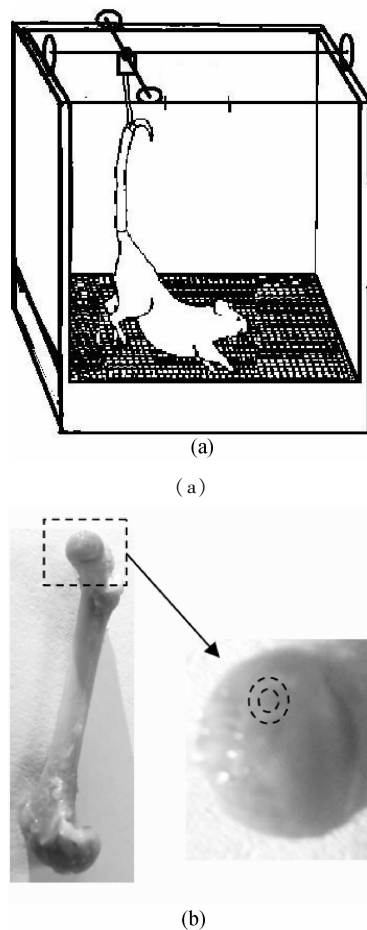
本研究运用软骨三相模型,结合软骨组织自由膨胀超声观测技术,估计软骨组织的轴向弹性模量,通过尾吊组和正常组大鼠关节软骨组织力学特性的对照,研究模拟微重力对关节软骨力学特性的影响。

1 方法

1.1 尾吊模型

6月龄 Wistar 雄性大鼠 12只,体重 290 ~

320 g。先在动物室饲养1周以适应环境,而后随机分为对照组和悬吊组各6只。悬吊大鼠采用头低位以模拟失重效应,单只饲养在特制的鼠笼内,自由进食、饮水。饲养温度保持在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,给以12 h光照与12 h黑暗交替环境。饲养14 d后,对大鼠进行麻醉处死,取左右后肢大腿骨关节处软骨制作实验样本。软骨表面首先经两位骨科医生检查,检查前未告知医生软骨样本属于哪个组,医生仅通过软骨表面粗糙度、光滑度等评判该软骨样本是否正常。评判后切割得到用于膨胀实验的软骨样本,样本下部保留一定厚度的骨,冷冻于 -20°C 的冰箱中。图1为大鼠尾吊示意图,同时给出后肢腿骨和软骨样本测量点位置。



(b) 图1 大鼠尾吊示意图(a)及大鼠大腿骨照片和测量点位置(b)
Fig.1 Sketch of the tail-suspension rat (a) and picture of the rat femur and measuring point (b)

2.2 超声测量

超声测量系统如图2所示,系统由宽带超声脉

冲发射接收器(5900型, Panametrics, 美国), 50 MHz 聚焦超声探头 (Panametrics, 美国, 聚焦 12.7 mm), 400 MHz 数据采集卡(12400, Gage, 加拿大) 和信号处理软件构成。超声探头可上下移动, 盛放软骨样品的容器固定在可以移动的平台。系统轴向分辨率约为 40 μm , 如果设定软骨组织中超声传播速度为 1 640 m/s, 则测量中组织偏移量的分辨率约为 0.4 μm 。

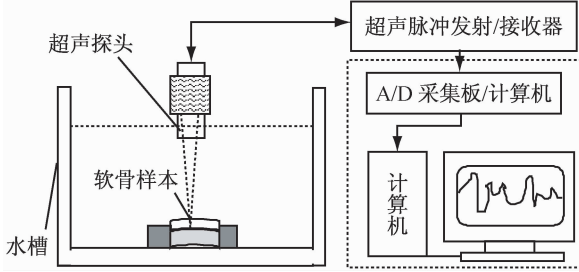


图2 软骨样本超声测量系统示意图
Fig. 2 Schematic diagram of the high frequency ultrasound system

实验前, 样品在室温解冻(约 25 $^{\circ}\text{C}$), 置于 2 mol 的 NaCl 溶液中 1 h。实验时, 容器中注入 2 mol 的 NaCl 溶液, 液面漫过超声探头, 样品固定于容器底部测试腔, 表面朝上, 周围用橡皮泥胶粘住防止溶液从侧面渗入。实验选择 2 mol NaCl 中的软骨状态为参考状态, 在参考状态下离子被有效屏蔽, 膨胀效果可以忽略^[11-14]。把 2 mol 浓度的溶液替换为 0.15 mol, 样品在溶液中膨胀并达到平衡状态, 膨胀过程用超声监测, 实验持续 2 h。超声回波信号经采集后存入计算机。通过跟踪超声回波信号, 可以得到软骨组织的变化, 以初始平衡状态时(2 mol)的软骨层厚为基准, 计算得到组织在 0.15 mol 的溶液达到平衡时的偏移量, 并计算其应变变量。模量估计程序用 Mathematic 软件编写, 具体的计算过程参考文献^[12-14]。

2.3 软骨轴向弹性模量的提取

当外部溶液浓度变化引起的软骨膨胀达到平衡状态后, 软骨组织内所有力(渗透压、适用压和拉应力)的总和为 0^[13-14]。根据混合物理论, 平衡状态下软骨中混合物的总应力 σ 主要由两个分量组成: 隙间流动压和软骨材料的弹性张力, 总应力可以表示为

$$\sigma = \sigma^s + \sigma^w + \sigma^+ + \sigma^- = -pI + \lambda_s \text{tr}(\varepsilon)I + 2\mu_s \varepsilon \quad (2)$$

式中: w, s, +, - 分别表示水、固态、阳离子和阴离子; ε 为无穷小应变张量; λ_s 和 μ_s 分别表示固态

的拉梅常数。其中, $p = p_{\text{Donnan}} + p_0 - T_1$, p_{Donnan} 和 p_0 分别为流体相中膨胀压的唐南分量和熵分量; 而 $T_1 = \frac{c_0^F k T N_{\text{Avo}}}{1.5} \cdot (1 - \varphi_0^w)$, 其中, c_0^F 是固定电荷密度, φ_0^w 是水体积分数。用式(2)计算应变变量 ε , λ_s 和 μ_s 是困难的, 为了简化计算, 假定软骨组织的所有膨胀效果都是由唐南效应引起的, 以前的研究显示这个假设是合理的^[10-13]。唐南压的线性本构表示可以从水和氯化钠离子穿过自由表面的平衡化学势的边界条件获得:

$$p \approx RT \left\{ \left[(c_0^F)^2 + (2c^*)^2 \right]^{1/2} - 2c^* - \frac{\text{tr} \varepsilon \cdot (c_0^F)^2}{\varphi_0^w \left[(c_0^F)^2 + (2c^*)^2 \right]^{1/2}} \right\} \quad (3)$$

式中: R 为常量; T 为绝对温度; c^* 是氯化钠溶液的浓度; 泊松比设定为常量 0.35, 软骨的轴向模量通过式 $H_A = \lambda_s + 2\mu_s$ 计算得到, 具体的计算过程参考文献^[10-13]。组织的固定电荷密度 c_0^F 和水体积分数 φ_0^w 是基于三相模型估计软骨轴向弹性模量的两个必要参数。以前的研究显示, 随着软骨退化, 组织的固定电荷密度 c_0^F 有所降低, 而水体积分数 φ_0^w 升高, 但是变化不大, 并且两个参数随软骨深度的变化趋势基本不变; Narmoneva 等^[10] 的研究也表明这两个参数的轻微变化对组织力学模量的估计不会造成很大影响, 故本文在计算模量时参考了 Flahif 等^[11] 获取的软骨组织的 c_0^F 和 φ_0^w 值, 其中水体积分数为常数 $\varphi_0^w = 0.8$, c_0^F 的取值在表层、中层和深层分别为 0.069、0.087 和 0.091 mol Eq/mL H_2O ^[11]。除此之外, 由于组织模量的预测值对泊松比不敏感^[15-16], 取 $\nu_s = 0.25$ 。

2.4 统计分析

计算得到的参数值以均值 + 标准差表示。因为样本数量较少, 故采用非参数统计分析方法(曼-惠特尼 U 检验方法)评估尾吊前后软骨样本力学参数的差异, 统计分析软件为 SPSS 17.0。

3 结果

所有软骨样本经两名医生的评价结果都为正常, 尾吊组和对照组大鼠关节软骨样本之间没有明显差异。大鼠后肢大腿骨关节处软骨组织在 NaCl 溶液中的超声回波信号如图 3 所示, 假设软骨中声速为 1 640 m/s, 从超声回波信号可以估算测量位置的样本软骨层厚度。

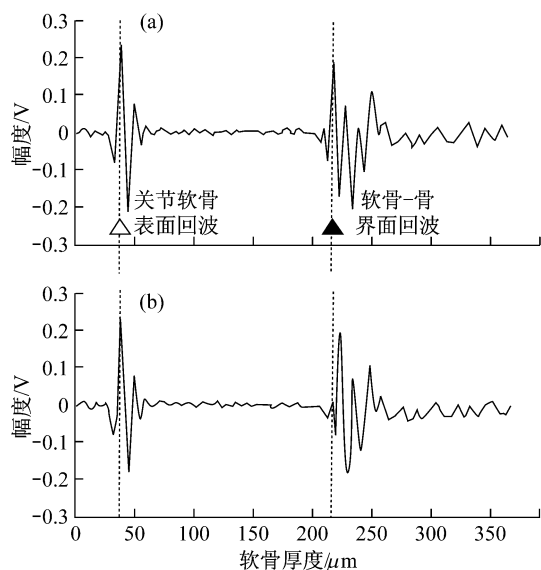


图3 大鼠关节处软骨组织在 NaCl 溶液中的超声回波信号 (a) 实验初始时刻, (b) 实验结束时刻

Fig.3 Ultrasound echo signal of the rat articular cartilage in NaCl solution (a) At initial time of the experiment, (b) At ending time of the experiment

与对照组相比较,尾吊组软骨样本的厚度平均值有所减小,尾吊组大鼠的软骨轴向弹性模量的平均值有所降低,统计分析显示两者的弹性模量之间存在显著性差异($P < 0.05$,见表1)。

表1 正常与尾吊大鼠关节软骨样本的特定测量位置的厚度与轴向弹性模量(* $P < 0.05$)

Tab.1 Thickness and uniaxial modulus of the articular cartilage in tail-suspension rat and normal rat at specified site

	软骨厚度/ μm	轴向弹性模量/MPa
正常组($n=12$)	114.87 ± 28.29	6.31 ± 3.37
尾吊组($n=12$)	$96.25 \pm 31.66^*$	$5.05 \pm 2.98^*$

4 讨论

当软骨所处的外部溶液的浓度发生变化后,软骨组织将会产生微小形变,而利用具有显微分辨率的高频超声技术可以观测组织内部形变,结合三相模型就可以估计组织的轴向弹性模量,前期研究已经证明技术的有效性^[12-14]。本文基于该技术探索了模拟失重条件对大鼠关节软骨组织力学特性的影响。

早期研究结果显示,同一关节软骨不同位置的软骨厚度存在明显差异。同时,软骨组织的声学、力学特性与软骨的位置也密切相关^[9,17-18]。这是因为

不同位置软骨组织要适应不同的承载能力。这也是本实验中所有大鼠软骨样本都选择相同位置进行超声测量和力学模量计算的原因。

两周的尾吊足以造成大鼠后肢明显的骨质疏松^[19];但是对于软骨来说,本文的研究结果显示其变化远没有骨这么快。医生对所有软骨样本的主观评价结果都为正常,尾吊前后大鼠关节软骨表面的平滑程度和光泽度基本没有变化,也未出现损伤和表面组织的纤维化。尾吊组大鼠后肢特定测量位置处的软骨厚度平均值略小于对照组,但差异不显著。与 Wang 等^[9]的结果相比较,本实验测量得到的软骨厚度较小,原因可能与吊尾时间长短有关系,测量部位的偏差以及组织声速的变化也会对厚度的计算造成轻微影响。

与对照组比较,尾吊组大鼠软骨组织的平均轴向弹性模量有所减小,统计结果两组间存在差异($P < 0.05$)。由此推测,失重环境会影响软骨组织的力学特性。关节软骨是一种复杂的多相混合材料,主要由软骨细胞、纤维和基质构成,其中基质由水、蛋白多糖、胶原、少量脂肪和无机盐类组成,软骨组织的成分和结构决定了其独特的力学性质^[20]。在失重环境下,软骨组织的力学载荷会发生变化,组织内的静压力和渗透压力也会发生变化,载荷的减小可能会引起软骨组织间隙液体流动不畅,从而造成所需营养成分的输送不畅,会使软骨组织变薄^[21],软骨的退化因此发生。一般认为,软骨退化首先是蛋白多糖成分的减少,造成软骨组织间隙中液体的增加;进一步的退化将造成胶原结构的破坏,这些都可能造成软骨组织力学特性的变化。另外,脱负荷会影响软骨细胞、缺乏活动会造成关节退变等,这也是临床实验中经常采用关节固定来再造骨关节炎的原因^[22-24]。与关节固定不同的是,本实验仅仅去除了大鼠后肢重力方向的负荷,其他的主动运动并没有受限,所以软骨改变远不如完全关节固定那么明显。而关节固定时如果给予小范围的活动,可以有效地防止关节产生严重功能障碍^[25]。无论如何,本实验结果显示,基于膨胀实验结合三相模型的方法可以用来研究模拟微重力对大鼠软骨力学特性的影响。

大鼠尾吊已经成为一种模拟失重条件的常规实验手段,并被应用于各种研究中,但是尾吊模拟失重和实际空间失重是有区别的。在空间失重环境中生物体整个身体都不受重力影响,这和尾吊大鼠的其他身体部位,甚至整个生理系统的受力情况都明显

不同,可能对实验结果造成的影响,也是今后的研究中应该加以考虑的。在下一步研究中,还应对样本的组织学进行分析,获取更准确的个体软骨样本的生化参数,使得力学参数估计更准确,尽可能阐明因失重引起的样本结构变化对力学特性改变的影响。本研究结果还暗示,长期太空飞行可能增加航天员患关节炎的风险。

参考文献:

- [1] Oganov VS, Scheider VS. Skeletal system in Reston VA. Humans in spaceflight, effect of microgravity [J]. AIAA, 1996, 3(1): 247-266.
- [2] Vico L, Lafage MH, Alexandra C. Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo [J]. Bone, 1998, 22(s5): s 95-100.
- [3] Buckey JC. Bone loss: Managing calcium and bone loss in space [J]. Space Physiol, 2006, 5: 3-25.
- [4] Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects [J]. J Appl Physiol, 2002, 92(4): 1367-1377.
- [5] Garber MA, McDowell DL, Hutton WC. Bone loss during simulated weightlessness: A biomechanical and mineralization study in the rat model [J]. Aviat Space Environ Med, 2000, 71(6): 586-592.
- [6] Iwamoto J, Shimamura C, Takeda T, et al. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats [J]. J Bone Miner Metab, 2004, 22(1): 26-31.
- [7] Sun LW, Wang C, Pu F, et al. Comparative study on measured variables and sensitivity to bone microstructural changes induced by weightlessness between in vivo and ex vivo micro-CT scans [J]. Calcif Tissue Int, 2011, 88(1): 48-53.
- [8] 王超, 蒲放, 孙联文, 等. 尾吊大鼠股骨的力学性能和微观结构研究[J]. 医用生物力学, 2009, 24(s1): 140.
- [9] Wang Q, Zheng YP, Wang XY, et al. Ultrasound evaluation of site-specific effect of simulated microgravity on articular cartilage [J]. Ultrasound Med Biol, 2010, 36(7): 1089-1097.
- [10] Narmoneva DA, Wang JY, Setton LA. Nonuniform swelling-induced residual strains in articular cartilage [J]. J Biomech, 1999, 32(4): 401-408.
- [11] Flahiff CM, Narmoneva DA, Huebner JL, et al. Osmotic loading to determinethe intrinsic material properties of guinea pig knee cartilage [J]. J Biomech, 2002, 35(9): 1285-1290.
- [12] Zheng YP, Niu HJ, Arthur Mak FT, et al. Ultrasonic measurement of depth-dependent transient behaviors of articular cartilage under compression [J]. J Biomech, 2005, 38(9): 1830-1837.
- [13] Niu HJ, Wang Q, Zheng YP, et al. A new method for computing the uniaxial modulus of articular cartilages using modified inhomogeneous triphasic model [J]. Acta Mechanica Sinica, 2010, 26(1): 121-126.
- [14] 牛海军, 王青, 郑永平, 等. 运用四参数三相混合模型和瞬态超声成像技术提取关节软骨的弹性模量[J]. 科学通报, 2007, 52(1): 41-46.
- [15] Narmoneva DA, Cheung HS, Wang JY, et al. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in a canine model [J]. J Orthop Res, 2002, 20(1): 83-91.
- [16] Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, et al. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage [J]. J Orthop Res, 1991, 9(3): 330-340.
- [17] Brommer H, Brama PA, Laasanen MS, et al. Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: A biomechanical analysis [J]. Equine Vet J, 2005, 37(2): 148-154.
- [18] Laasanen MS, Saarakkala S, Toyras J, et al. Site-specific ultrasound reflection properties and superficial collagen content of bovine knee articular cartilage [J]. Phys Med Biol, 2005, 50(14): 3221-3233.
- [19] Bourrin S, Palle S, Genty C, et al. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats [J]. J Bone Miner Res, 1995, 10(5): 820-828.
- [20] Mow VC, Gu WY, Chen FH. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology, 3rd edition. Mow VC, Huiskes R, eds [M]. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [21] Moriyama H, Yoshimura O, Kawamata S, et al. Alteration in articular cartilage of rat knee joints after spinal cord injury [J]. Osteoarthritis Cartil, 2008, 16(3): 392-398.
- [22] Evans EB, Eggers GWN, Butler JK, et al. Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints [J]. J Bone Jt Surg, 1960, 42(7): 737-758.
- [23] Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions [J]. Osteoarthritis Cartil, 2002, 10(5): 408-419.
- [24] Hudelmaier M, Glaser C, Hausschild A, et al. Effects of joint unloading and reloading on human cartilage morphology and function, muscle cross-sectional areas, and bone density - A quantitative case report [J]. J Musculoskeletal Neuronal Interact, 2006, 6(3): 284-290.
- [25] Johnson DP. The effect of continuous passive motion on wound-healing and joint mobility after knee arthroplasty [J]. J Bone Joint Surg Am, 1990, 72(3): 421-426.