

超重环境对骨组织生物力学性能和形态结构的影响

于露¹, 韩标², 李昊³, 韦淑萍⁴, 张西正³

(1. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 北京 100191; 2. 桂林医学院 生物技术学院, 桂林 541199;
3. 军事科学院 系统工程研究院卫勤保障技术研究所, 天津 300161; 4. 武警后勤学院 人体形态学教研室, 天津 300309)

摘要:目的 探讨超重环境对骨组织生物力学性能及骨组织形态结构的影响,为航天员和飞行员安全飞行训练及最大耐受高重力值的确定提供理论支撑。**方法** 采用本课题组自主设计的超重加载平台构建超重新动物模型,加载方式为腹背方向承受向心加速度,加速度分别为 5、10、20 g,离心 45 s,1 次/d,5 d/周,连续 4 周。使用 Instron 5865 材料力学试验机对离体骨组织进行三点弯曲试验,通过测量力学参数的变化,分析超重环境对骨组织生物力学性能的影响;通过双能 X 线骨密度仪扫描、Micro-CT 扫描、骨组织染色等技术,检测骨矿物质含量、骨密度及骨小梁等形态学参数的变化,观察超重环境对骨组织形态结构的影响。**结果** 超重加载可显著降低小鼠胫骨的断裂应力及弹性模量。超重环境导致骨组织中骨体积分数下降,骨小梁厚度以及骨小梁数量显著降低,骨小梁排列紊乱。**结论** 超重环境对骨组织生物力学性能及骨组织形态结构的影响与超重载荷的强度密切相关。低(5 g)强度超重载荷能够降低骨小梁厚度,但对其力学性能的影响很小。中(10 g)、高(20 g)强度超重载荷能够显著触发骨流失以及骨力学性能的下降。随着超重载荷的增加,机体的生理调节无法阻止骨量和力学性能下降的趋势。

关键词: 超重力; 生物力学; 力学生物学; 骨组织; 骨重建

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.06.011

Effects of Hyper-Gravity Environment on Biomechanical Properties and Histomorphology of Bone Tissues

YU Lu¹, HAN Biao², LI Hao³, WEI Shuping⁴, ZHANG Xizheng³

(1. School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China; 2. College of Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 3. Institute of Medical Service and Technology, Academy of Military Sciences, Tianjin 300161, China; 4. Department of Human Morphology, Logistical College of People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of hyper-gravity environment on biomechanical properties and morphological structure of bone tissues, so as to provide theoretical support for safe flight training of astronauts and pilots and determination of the maximum tolerance value of hyper-gravity. **Methods** The hyper-gravity animal model was established by using the self-designed hyper-gravity loading platform. The loading mode was the ventral-dorsal direction which was subjected to centripetal acceleration of 5 g, 10 g, and 20 g, respectively (45 s, once a day, 5 d/week, for 4 weeks). Instron 5865 material testing machine was used to perform three-point bending test on *in vitro* tibia, and the influence of hyper-gravity environment on mechanical properties of

bone tissues was analyzed by measuring changes in mechanical parameters. Dual-energy X-ray absorptiometry, micro-CT scanning and bone tissue staining were utilized to test changes in bone mineral contents, bone mineral density, and to observe the influence of hyper-gravity environment on bone morphology. **Results** Hyper-gravity loading could reduce fracture stress and elastic modulus of the tibia in mice. The bone volume/total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and trabecular number (Tb.N) were significantly decreased, and the trabecular arrangement was disordered under hyper-gravity environment. **Conclusions** The effect of hyper-gravity on biomechanical properties and morphological structure of bone tissues is related to the intensity of hyper-gravity. Low-strength (5 g) overload can reduce Tb.Th, but has little effect on its mechanical properties. Moderate (10 g) and high-strength (20 g) overload can significantly trigger bone loss and decrease bone mechanical properties. With the increase of hyper-gravity load, physiological regulation of the body can not prevent the decline of bone mass and mechanical properties.

Key words: hyper-gravity; biomechanics; mechanobiology; bone tissues; bone remodeling

骨是维持人体的重要结构,也是人体承担力学载荷的主要器官。重力作为地球上恒定的力学刺激,对于维持骨生物力学性质稳定,影响和控制骨重建具有重要的作用^[1]。随着我国航空航天事业的飞速发展,超重环境对骨组织的影响也越来越受到关注。正常情况下,骨骼承受1 g重力载荷,这样的重力载荷不断刺激骨骼,使其产生功能适应性变化^[2]。由于细胞质和细胞内的细胞器,如细胞核、线粒体、细胞骨架等均有不同的密度,重力的改变可引起它们相对位置的改变。研究表明,骨骼内的力学感受细胞能够感受微重力-超重信号的刺激,加工整合后进行传导,影响细胞的功能,最终导致骨组织出现相应的结构变化以适应力学环境的需要^[3-5]。在执行任务和平时训练的过程中,由于飞行加速造成的超重,使飞行员颈椎的骨密度和全身的骨矿物质含量均增加^[6]。2 g超重环境可造成第1~3代小鼠股骨和骨盆长度以及第4颈椎和骨盆腔宽度增加,颈椎钙磷含量升高,股骨、腰椎钙磷含量降低^[7]。Vico等^[8]认为,超重刺激可通过增加松质骨的骨量,减少软骨形成,来抵抗微重力对骨的不良影响。Miwa等^[9]将MC3T3-E1细胞置于2~5 g环境中,其分化受抑制,增殖率显著增加。Searby等^[10]研究显示,10 g环境下,成骨细胞形态发生改变,微管网高度减少,但细胞活性不受影响。持续的超重(5~50 g)环境可促进大鼠成骨细胞分泌前列腺素E2,但细胞微管网高度降低。上述研究表明,超重可以改变骨组织的力学性能,骨组织、细胞形态及功能也会发生显著变化。然而,在超重的极端环境下,骨组织的生物力学特性改变及骨重建

机制尚不完全清楚。本文探讨超重环境对骨组织生物力学性能及骨组织形态结构的影响,为航天员和飞行员安全飞行训练以及最大耐受高重力值的确定提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级2~3月龄野生型C57BL/6J小鼠,购买于军事医学科学院实验动物中心,适应性饲养1周后进行试验。

1.2 方法

1.2.1 超重动物模型建立 取2~3月龄野生型C57BL/6J小鼠随机分为正常对照组和超重加载组,采用本课题组自主设计的超重加载平台对小鼠进行加载,加载方式为腹背方向承受向心加速度,加速度分别为5、10、20 g,离心45 s,1次/d,5 d/周,连续4周。正常对照组除重力条件不同(常重力)外,其余处理均与超重加载组相同。

1.2.2 三点弯曲力学试验 超重实验后处死动物,取其胫骨,使用Instron 5865材料力学试验机进行三点弯曲试验,采用0.1 N预加载载荷和3 mm/min加载速率,测量小鼠胫骨的断裂载荷、断裂能量、断裂位移和断裂应力。

1.2.3 骨密度扫描 超重实验后处死动物,取其胫骨,置于双能X线骨密度(bone mineral density, BMD)检查仪上进行扫描,测定BMD。

1.2.4 Micro-CT扫描 使用Micro-CT对小鼠胫骨微观结构进行分析。设定扫描电压为50 kV,分辨率为9 μm。选择近端松质骨3 mm区域作为主要

的研究范围,测量计算 BMD、骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁数目 (trabecular number, Tb. N) 及骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th) 等形态学参数的变化。

1.2.5 组织学分析 将固定好的胫骨组织放入脱钙液中浸泡脱钙 24 h,依次经过梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,切片切成 5 μm 骨小片后,行 HE 染色。

1.3 统计学方法

所有数据均来自 3 次独立实验,数据采用均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 超重环境下小鼠体重的变化

在实验周期内,每隔 7 d 测 1 次小鼠体重。结果表明,超重加载 4 周后,各组小鼠体重均有所增加;对照组小鼠体重在前 3 周持续增加,而后维持到第 4 周;5 g 组和 10 g 组小鼠体重在前 2 周先下降,第 3 周迅速上升,到第 4 周又缓慢下降;20 g 组小鼠体重在前 3 周持续增加,到第 4 周又缓慢下降。与对照组相比,相同时间内,超重加载后,小鼠体重

均有下降趋势(见图 1)。

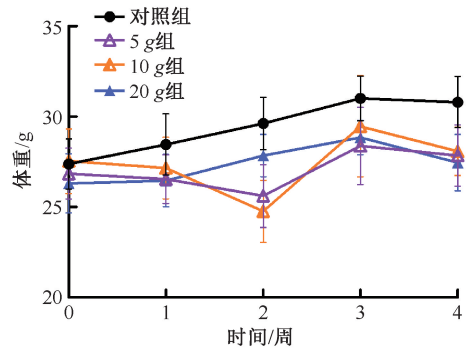


图 1 超重环境下小鼠体重变化 (n=13)

Fig. 1 Changes for body weight of mice in hypergravity environment

2.2 超重环境对骨组织生物力学性能的影响

超重环境对小鼠胫骨的断裂位移、断裂载荷、断裂应变无显著影响,超重加载可降低小鼠胫骨的断裂应力,5 g 组、10 g 组和 20 g 组分别降低 65.2%、63.2%、78.2%,与对照组相比,超重加载各组断裂应力均存在显著差异。超重加载后,弹性模量分别降低 70.9%、80.4%、77.6%,与对照组相比,超重加载各组的弹性模量均存在显著差异(见图 2)。

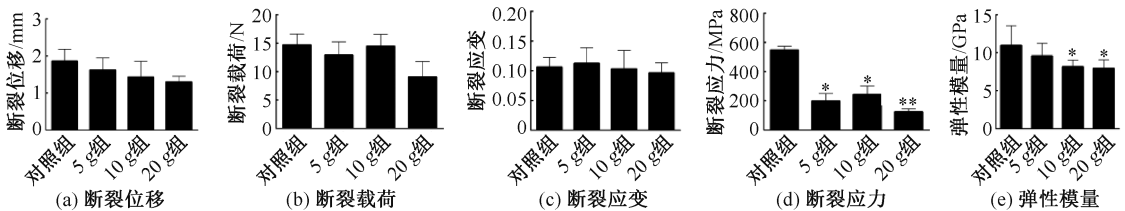


图 2 超重环境对骨组织生物力学性能的影响

Fig. 2 Effects of hypergravity on tibia mechanical properties (a) Fracture displacement, (b) Fracture load, (c) Fracture strain, (d) Fracture stress, (e) Elastic modulus

注: *与对照组比较, $P < 0.05$; **与对照组比较, $P < 0.01$; $n = 5$ 。

2.3 超重环境对骨组织形态结构的影响

超重加载后,小鼠胫骨骨密度无明显变化。5 g 组、10 g 组和 20 g 组骨体积分数分别降低 22.4%、38.7% 和 25.4%,与对照组相比,10 g 组骨体积分数存在显著差异。超重加载后,5 g 组、10 g 组和 20 g 组骨小梁厚度分别降低 18.0%、18.1% 和 20.5%,与对照组相比,超重加载各组骨小梁厚度均存在显著

差异。5 g 组、10 g 组和 20 g 组骨小梁数量分别降低 6.0%、25.3% 和 6.4%,与对照组相比,10 g 组的骨小梁数量存在显著差异。并且,20 g 组骨皮质厚度显著低于对照组。HE 染色结果表明,对照组胫骨附近骨小梁的排列规律,方向一致;超重环境下,骨小梁排列紊乱,细胞簇成群出现在 10 g 组和 20 g 组(见图 3)。

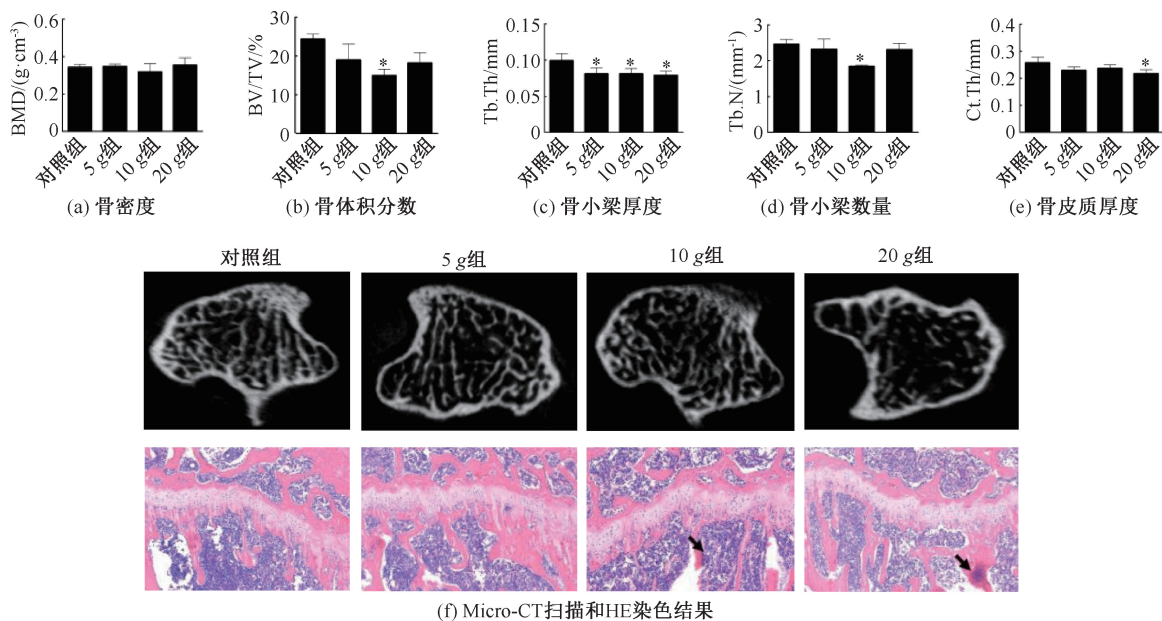


图3 超重环境对骨组织形态结构的影响

Fig. 3 Effects of hypergravity on microstructure of bone tissue (a) BMD, (b) BV/TV, (c) Tb. Th, (d) Tb. N, (e) Ct. Th, (f) Results of micro-CT scanning and HE staining

注: *与对照组比较, $P < 0.05$; 图3(f)中箭头指细胞簇; $n = 3$ 。

3 讨论

随着我国空间探索、科研活动、飞行训练活动的日益增多,保障宇航员和飞行员的身体健康作为基本需求,引起越来越多的重视。正常情况下,骨骼承受 $1g$ 的重力载荷;载人航天器发射与返回过程中,航天员承受的加速度为 $4 \sim 10g$;而当应急逃逸或是着陆冲击瞬间,超重加速度远远高于正常水平^[11]。航母舰载机、歼10及歼11等现代高性能战斗机战斗和训练时,飞行员遭受 $9 \sim 12g$ 的高加速度冲击,超过了人体生理耐受极限^[12]。航天员和飞行员经历的超重过载持续时间一般在数十秒至数分钟之间,为了适应重力环境的变化,他们需要在地面进行大量的超重适应性训练。这些重大活动和超重训练强度对航天员和飞行员的身体健康和人身安全产生重大的影响。

目前对超重的研究可以在空中和地面进行,主要利用直线和(或)旋转方式获得高加速度从而模拟超重环境^[13-14]。直线式加速可在空中进行,需要借助飞行器,成本较高,在地面进行时需要的空间较大;旋转式加速是目前应用最广的模拟超重的方

式,利用离心机提供高向心加速度,操作简便,可行性强。本文采用本课题组自主设计的旋转式超重加载平台对 C57BL/6J 小鼠进行慢性、持续时间较短的超重加载,使其腹背方向承受向心加速度,最大加速度为 $20g$,这种加载方式接近于航天员平时训练的方式。结果显示,超重环境下,小鼠体重先下降后升高而后再缓慢下降,与正常对照组相比,相同时间内超重加载组小鼠的体重均有下降趋势,说明超重环境可对小鼠的生理功能产生影响。

超重环境下骨组织的力学性能也发生改变。Kohles 等^[15]研究发现,大鼠在 $2g$ 环境下暴露 14 d,其股骨中段皮质骨力学性能发生改变,骨组织弹性模量和剪切模量分别增长 2.2% 和 4.3%,泊松比 ν_{12} 、 ν_{21} 、 ν_{13} 、 ν_{31} 也发生明显变化。Martinez 等^[16]研究发现,在 $2g$ 环境下,大鼠股骨长度、皮质骨面积及骨干前侧和内侧皮质骨的厚度显著减少,但骨密度、胶原蛋白及钙水平没有明显变化。三点弯曲试验是目前一种最常用且简单易行的测量骨生物力学参数的研究方法。本文通过胫骨三点弯曲实验,得到不同重力环境下的骨组织力学性质的变化情况。本文结果表明,超重加载可降低小鼠胫骨的

断裂应力,当加载强度为 20 g 时,胫骨断裂应力显著下降,说明超重环境下小鼠骨组织抵抗弯曲载荷的能力大大降低。低强度的超重加载(5 g)可使胫骨弹性模量下降,随着加载强度的不断增加(10、20 g),弹性模量不断下降,提示小鼠胫骨组织弯曲变形的能力随着重力加载强度的加大逐渐降低。骨组织的力学性能由其结构、组成成分等多种因素共同决定,为了探究力学性能改变的原因,本文从骨组织形态学角度开展进一步研究。

骨具有力学适应性,在局部应力、应变的作用下,能够适应性改变其形态结构^[17]。骨组织的宏观力学特性与其微观结构密切相关^[18]。因此,探讨超重环境下骨组织微观形态的变化,对分析骨组织力学性质改变的原因具有重要价值。Micro-CT 扫描结果显示,超重环境下骨体积分数减少,说明胫骨承受的极限强度降低,导致骨断裂危险性大大增加。超重环境下,骨皮质厚度降低导致其宏观力学性能的改变,表现为三点弯曲实验中小鼠胫骨断裂应力以及弹性模量下降。超重加载组小鼠胫骨骨小梁厚度均下降。在 10 g 加载强度下,骨体积分数以及骨小梁数量均下降,说明超重加载可导致骨量的流失,推测超重环境下小鼠体重的降低与此相关。通过 HE 染色发现,正常重力环境下,小鼠胫骨近端骨小梁排列方向整齐一致;超重加载后,骨松质内骨小梁排列混乱。根据 Wolff 定律,骨小梁的生长方向与主应力方向一致,说明慢性、持续时间较短、腹背方向的超重加载可对骨组织微观结构产生显著影响。本文推测,骨组织微观结构改变与超重强度以及加载方向密切相关,骨皮质和骨松质结构不同导致其对重力的敏感性不同。本文还发现,超重加载后,成骨细胞成簇聚集在骨小梁附近的骨膜处,可能是由于超重力载荷作用于骨组织,造成骨流失,骨组织内力学微环境发生变化,骨组织响应力学信号的刺激,导致骨形成增加。此外,超重环境可对小鼠神经、感知等产生影响,从而影响骨。前庭器官可检测加速度的变化并将其转化为神经信号,神经信号被运送到中枢神经系统反射性地调节生理功能。研究表明,前庭功能与肌肉和骨代谢也密切相关^[19]。前庭系统具有高度可塑性,重力环境改变可引起连接运动神经和交感神经系统前庭功能的可塑性变化,而交感神经系统是肌肉和骨骼

的重要调节器。Vignaux 等^[20]研究发现,累及部分交感神经系统的迷路切除术或前庭障碍(vestibular lesion, VL)的啮齿类动物,其骨量减少。3 g 超重环境中暴露 4 周,小鼠抗重力肌的重量和肌纤维以及 MyoD 等肌肉分化基因的表达均增加;VL 或者使用肾上腺素能 β 受体阻断剂普萘洛尔抑制交感神经系统,可拮抗超重力引起的肌肉和骨骼的变化^[21]。上述结果表明,重力变化通过小鼠的前庭系统及随后的交感神经外流影响肌肉和骨骼。超重可通过前庭系统增强小鼠骨骼肌中卵泡抑素的表达,卵泡抑素可拮抗肌肉生长抑制剂的功能,从而促进骨骼肌生长,抑制骨吸收。重力变化诱导的循环卵泡抑素可能通过抑制肌肉生长抑制剂诱导的骨吸收参与超重环境下骨量的增加^[22]。

4 结论

超重环境对骨组织生物力学性能及骨组织形态结构的影响与超重载荷的强度密切相关。低(5 g)强度的超重载荷能够降低骨小梁的厚度,但对其力学性能的影响较小。中(10 g)、高(20 g)强度的超重载荷能够显著触发骨流失以及骨力学性能的下降。超重载荷越大,骨流失和力学性质下降程度越明显,造成的骨内力学微环境改变可能触发力学生物学相应,进而促进骨组织修复。本文研究结果进一步提示,在长期中、高强度的超重载荷下,仅靠骨组织自身的修复作用难以维持骨量和力学强度,故在飞行员、宇航员训练等情况下需要引起重视。

参考文献:

- [1] SHARMA A, SHARMA L, GOYAL R. Molecular signaling pathways and essential metabolic elements in bone remodeling: An implication of therapeutic targets for bone diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(1): 77-104.
- [2] SHIMOIDE T, KAWAO N, MORITA H, *et al*. Roles of Olfactomedin 1 in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 107(2): 180-190.
- [3] KAWAO N, MORITA H, IEMURA S, *et al*. Roles of Dkk2 in the linkage from muscle to bone during mechanical unloading in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2547-2566.
- [4] CLEMENT G, BOYLE RD, GUNGA HC. The effects of altered gravity on physiology [J]. *Front Physiol*, 2019,

- 10; 1447-1449.
- [5] 王佳明, 刘海英, 张春秋, 等. 不同重力对骨陷窝-骨小管系统传质的影响研究[J]. 医用生物力学, 2021, 36(S1): 174.
- [6] 朱伟, 张慧, 汪家春. 冲击性加速度对飞行员颈部的损伤与防护研究[J]. 中华航空航天医学杂志, 2009, 20(3): 228-232.
- [7] KITA S, IWASAKI K, ONISHI R, *et al.* Bone metabolism and formation of mice bred in a 2 G environment[J]. *Adv Space Res*, 2003, 32(8): 1453-1457.
- [8] VICO L, BAROU O, LAROCHE N, *et al.* Effects of centrifuging at 2 g on rat long bone metaphyses [J]. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1999, 80(4): 360-366.
- [9] MIWA M, KOZAWA O, TOKUDA H, *et al.* Effects of hypergravity on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells [J]. *Bone Miner*, 1991, 14(1): 15-25.
- [10] SEARBY ND, STEELE CR, GLOBUS RK, *et al.* Influence of increased mechanical loading by hypergravity on the microtubule cytoskeleton and prostaglandin E2 release in primary osteoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(1): C148-158.
- [11] 马爱军, 黄晓慧. 载人航天环境模拟技术的发展[J]. 航天医学与医学工程, 2008, 21(3): 224-232.
- [12] 孙喜庆, 张立藩. 大过载引起的意识丧失分析[J]. 国际航空, 1996(10): 59-61.
- [13] TOMINARI T, ICHIMARU R, TANIGUCHI K, *et al.* Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6614-6624.
- [14] WU D, ZHOU X, ZHENG C, *et al.* The effects of simulated + Gz and microgravity on intervertebral disc degeneration in rabbits [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16608-16617.
- [15] KOHLES SS, BOWERS JR, VAILAS AC, *et al.* Effect of a hypergravity environment on cortical bone elasticity in rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59(3): 214-217.
- [16] MARTINEZ DA, ORTH MW, CARR KE, *et al.* Cortical bone responses to 2G hypergravity in growing rats [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1998, 69(6 Suppl): A17-22.
- [17] LIU XS, WANG L, DE BAKKER CMJ, *et al.* Mechanical regulation of the maternal skeleton during reproduction and lactation [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2019, 17(6): 375-386.
- [18] AUGER JD, FRINGS N, WU Y, *et al.* Trabecular architecture and mechanical heterogeneity effects on vertebral body strength [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2020, 18(6): 716-726.
- [19] KAWAO N, MORITA H, OBATA K, *et al.* The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice [J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(19): e12979.
- [20] VIGNAUX G, NDONG JD, PERRIEN DS, *et al.* Inner ear vestibular signals regulate bone remodeling via the sympathetic nervous system [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(6): 1103-1111.
- [21] KEYAK JH, KOYAMA AK, LEBLANC A, *et al.* Reduction in proximal femoral strength due to long-duration spaceflight [J]. *Bone*, 2009, 44(3): 449-453.
- [22] KAWAO N, MORITA H, OBATA K, *et al.* Role of follistatin in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1191-1201.