

文章编号:1004-7220(2017)01-0083-05

不同强度周期性动态力学载荷对微重力下 骨质疏松的影响

韩 标, 张新昌, 李 昊, 张西正
(军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要: **目的** 探讨生理性周期动态力学载荷与过载对微重力致骨质疏松的作用及影响,为宇航员长时间外太空活动发生的相关骨科疾病寻找一种简便的预防或治疗方案。**方法** 利用尾吊的方法模拟太空微重力环境,建立小鼠骨质疏松模型。32只 C57BL/6J 正常小鼠随机分为正常组、尾吊组、生理性载荷组和过载组;尾吊的同时对两施加力学载荷组小鼠左侧胫骨进行周期性动态力学加载。实验4周后对比分析各组小鼠后肢胫骨力学性能、骨小梁微观参数、生化指标以及成骨相关基因表达结果。**结果** 与正常组相比,尾吊组小鼠胫骨松质骨大量流失,胫骨生物力学性能明显降低,骨微观结构严重破坏、成骨活性显著减弱。生理性载荷可使骨力学性能及骨小梁微观结构有明显的改善,成骨活性增强、相关基因表达显著上调($P < 0.05$)。过载也能改善微重力下骨质疏松的状况,但改善效果不明显($P > 0.05$)。**结论** 尾吊可成功模拟微重力环境,复制骨质疏松模型;生理性载荷可有效对抗微重力致骨质疏松的发生与发展;过载也能使得微重力所致骨质疏松有所改善,但是结果与尾吊组相比没有显著性差异。

关键词: 微重力; 骨质疏松; 尾吊; 力学载荷; 对抗作用

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.01.014

The effect of periodic dynamic mechanical load with different intensity on microgravity-induced osteoporosis

HAN Biao, ZHANG Xin-chang, LI Hao, ZHANG Xi-zheng (*Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China*)

Abstract: Objective To investigate the role and influence of physiological loading and overloading on microgravity-induced osteoporosis, so as to find a reliable way to prevent or treat related-orthopedic disorders in astronauts induced by long-time space activity. **Methods** The microgravity environment in space was simulated by tail-suspension experiment, then the osteoporosis models of mice were built. A total of 32 C57BL/6J mice were randomly and evenly separated into four groups: normal group (normal), tail-suspension group (TS), physiological loading group (loading) and overloading group (overloading). Periodic dynamic mechanical load was applied on the left tibia in loading group and overloading group during tail-suspension test. After four weeks, tibial mechanical properties, micro-parameters of bone trabecular, biochemical indices and osteogenesis-related gene expression in each group were compared and analyzed. **Results** A great loss of tibial cancellous bone, significantly lower tibial biomechanical expression, serious damage of microstructure and weaker osteogenic activity were found in tail-suspended mice as compared with those of normal group. Physiological loading could clearly improve mechanical properties of bones, microstructure of bone trabecular, osteogenic activity and relative gene expression ($P < 0.05$). Overloading could also improve the condition of microgravity-induced osteoporosis, but the effect was not obvious ($P > 0.05$). **Conclusions** Tail-suspension can successfully simulate microgravity environment

收稿日期:2015-12-30; 修回日期:2016-02-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31370942,11432016)。

通信作者:张西正,教授,博士研究生导师,E-mail: z84656716@yahoo.com。

and duplicate osteoporosis model. Physiological loading can effectively prevent the emergence and development of microgravity-induced osteoporosis, while overloading can also counter microgravity-induced osteoporosis, but the results have no significant differences.

Key words: Microgravity; Osteoporosis; Tail suspension; Mechanical loading; Counteracting

重力在人体骨骼系统的正常生长及功能维持方面起着重要作用,长期脱负荷可导致机体的废用性骨质疏松症。例如:病人长期卧床休养导致骨受到的力学载荷减少,骨吸收大于骨形成,造成骨量的快速丢失^[1];在太空失重条件下,宇航员骨代谢发生显著性改变,成骨分化标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、骨钙素(bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins, BGP)及I型胶原(collagen I, Col I)基因的表达明显下调,最终影响骨骼结构,导致骨质疏松症的出现^[2],这些改变严重影响了宇航员的健康和工作以及返回地球的再适应能力,并成为长时间航天飞行的主要障碍之一。早期Wolff提出假说:“骨在需要的地方就生长,在不需要的地方就吸收”,说明骨的生长、吸收及重建都与骨的受力有密切关系。力学稳态理论认为,骨组织在生长发育过程中会随着外界力学环境的改变而不断改变自身结构和功能。研究表明,成骨细胞及其前体细胞对力学刺激极为敏感,可以将力学信号转换为生物信号;而生理性活动(如拉伸等)可以使骨密度增加^[3],促进骨形成,进而提高对抗骨损伤的能力^[4]。

1 材料与方法

1.1 实验设计

小鼠由军事医学科学院动物实验中心提供。将32只(雌雄各半)2~3月龄野生型C57BL/6J小鼠随机等分为4组,分别为对照组(normal)、尾吊组(tail suspension, TS)、生理性载荷组(load)和过载组(overloading)。适应性饲养1周后,对照组正常饲养,其他3组尾悬吊饲养4周。尾吊期间,尾吊组小鼠不作其他处理,生理性载荷组小鼠后肢左侧胫骨施加周期性动态力学载荷(使其胫骨中段受到的峰值应变约为 $2.5 \times 10^3 \mu\epsilon$),过载组小鼠后肢左侧胫骨施加力学载荷产生的微应变约为 $5.0 \times 10^3 \mu\epsilon$ 。基于前期研究结果,选取加载时间为20 min,加载频率为15 Hz,每3 d 1次^[4]。实验周期结束后,处死小鼠,断

头取血,静止10 min后, 3×10^3 r/min离心30 min,取上层血清。同时,剥离出小鼠后肢离体胫骨。

1.2 实验内容

1.2.1 骨小梁微观结构检测 骨微观参数分析采用小动物活体计算机断层扫描系统SkyScan 1076(SkyScan公司,比利时)进行Micro CT扫描实验。扫描电压、电流分别为74 kV、140 mA,扫描精度为9 μm ,测量指标为骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁模式因子(Tb. Pf)和骨小梁分离度(Tb. Sp)。

1.2.2 三点弯曲力学试验 与传统的骨干三点弯曲法不同,采用干骺端三点弯曲法测量小鼠胫骨的生物力学性能^[5]。通过Instron 5685力学加载试验机输出数据。设定初始预载荷为0.5 N,加载速度为3 mm/min,测量指标分别为断裂载荷、断裂位移、断裂能量和断裂应力。

1.2.3 血清AKP与BGP含量 为观察小鼠成骨活性的变化,测定小鼠血清AKP及BGP含量。AKP活性采用AKP试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测,BGP含量用OT/BGP Elisa试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)测定。

1.2.4 qRT-PCR实验 为了观察力学载荷对成骨基因的影响,分别检测骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、Col I和AKP 3种基因,以 β -actin为内参,并以尾吊组为对照组分析比较各组相关成骨基因相对表达量的高低。将备用的离体胫骨放入液氮研磨后,加入TriZOL试剂(Invitrogen公司,美国)提取总RNA,然后进行逆反应转录生成cDNA,最终将cDNA混合物进行扩增,设置扩增程序(95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min;共40个循环)。引物信息见表1。最终结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[6]。

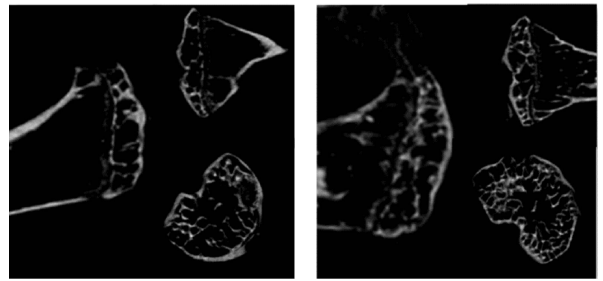
1.3 数据分析

实验数据采用均值 \pm 标准差表示(数据均取自3次独立试验),采用单因素方差分析,组间比较采用LSD-*t*比较法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表1 PCR 引物信息

Tab.1 PCR primer sequences

引物	序列 5' -3'
β-actin	正: GATTACTGCTCTGGCTCCT
	反: ACTCCTGCCTTGCTGATCC
BMP-2	正: TGTGAGGATTAGCAGGTCTT
	反: TCGTTTGTGGAGCGGATG
Col I	正: CAGTGGCGGTTATGACTT
	反: CTGCGGATGTTCTCAATCT
AKP	正: GAAGGAGGCAGGATTGAC
	反: ATCAGCAGTAACCACAGTC



(a) 尾吊组

(b) 对照组

图1 小鼠胫骨松质骨扫描图片

Fig.1 Scanned pictures of tibia cancellous bone in mice

(a) Tail-suspension group, (b) Control group

2 结果

2.1 骨质疏松评价

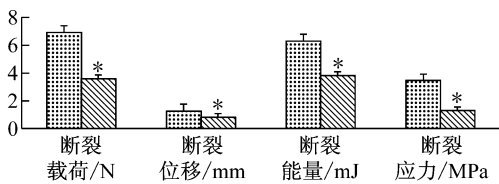
小鼠尾悬吊4周后,与正常饲养小鼠相比,尾吊组小鼠骨组织大量流失,骨生物力学性能明显降低,骨微观结构发生破坏,成骨活性显著减弱,说明成功复制了骨质疏松模型(见图1、2)。

2.2 不同强度周期性动态力学载荷对微重力下骨质疏松的作用

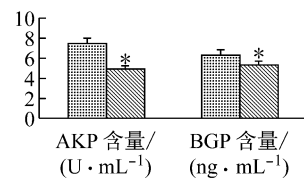
图3所示为骨小梁微观结构参数分析结果。尾吊组小鼠骨小梁微观结构严重破坏,主要表现在Tb. N、Tb. Th和BV/TV显著降低,Tb. Sp和Tb. Pf增加;对小鼠后肢胫骨施加 $2.5 \times 10^3 \mu\epsilon$ 微应变后,

与尾吊组相比,生理性载荷组小鼠胫骨微观结构得到显著改善,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$);当胫骨承受 $5.0 \times 10^3 \mu\epsilon$ 微应变时,该组骨小梁微观结构与尾吊组相比有改善的趋势,但改变程度没有显著性差异($P > 0.05$)。

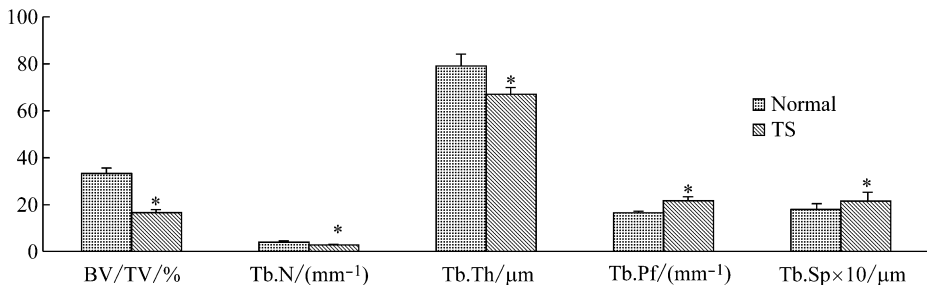
图4所示为胫骨三点弯曲力学试验结果。尾吊组小鼠在尾吊后出现宏观力学性能的减弱,主要表现为断裂载荷、断裂位移、断裂能量和断裂应力均显著下降,推测与骨微观结构被破坏以后,导致宏观力学性能下降有关;相比尾吊组,生理性载荷组改善了小鼠胫骨的宏观力学性能($P < 0.05$);过载组也可稍改善尾吊导致的力学性能下降,但作用不明显($P > 0.05$)。



(a) 三点弯曲力学实验结果



(b) 血清AKP与BGP含量



(c) 对照组和尾吊组小鼠胫骨骨微观参数比较

图2 骨质疏松评价结果(* $P < 0.05$)

Fig.2 Evaluation results of the osteoporosis model (a) Tibia mechanical properties in three-point bending test, (b) Content of serum AKP and BGP, (c) Comparison of trabecular micro-parameters between normal group and TS group

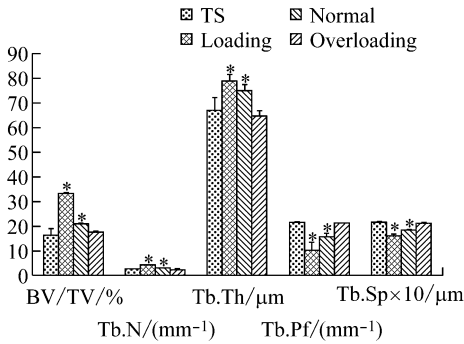
图3 骨小梁微观结构参数对比 (* $P < 0.05$, 与TS组相比)

Fig. 3 Comparison of trabecular micro-morphology parameters

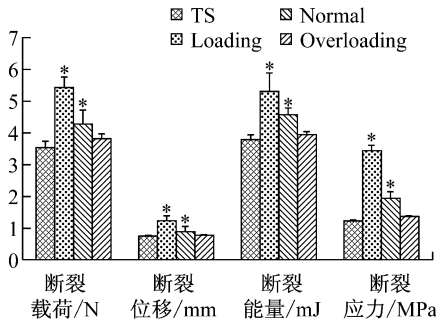
图4 干骺端三点弯曲力学试验结果 (* $P < 0.05$, 与TS组相比)

Fig. 4 Tibia mechanical properties in three-point bending test for metaphyseal tibia

小鼠血清 BGP 与 AKP 测定结果见表 2。尾吊后小鼠 AKP 与 BGP 含量均显著减少,说明施加周期性动态力学载荷可增强成骨活性,并抑制微重力致骨质疏松的发生与发展。其中,生理性载荷作用显著($P < 0.05$),过载则作用不明显($P > 0.05$)。

表2 血清 AKP 与 BGP 含量对比 (* $P < 0.05$, 与尾吊组相比)

Tab. 2 Comparison of the serum AKP and BGP content

组别	血清 AKP 含量/ ($U \cdot mL^{-1}$)	血清 BGP 含量/ ($\mu g \cdot L^{-1}$)
尾吊组	4.97 ± 0.14	5.31 ± 0.17
对照组	$8.48 \pm 0.35^*$	$7.32 \pm 0.59^*$
生理性载荷组	$6.30 \pm 0.52^*$	$6.33 \pm 0.13^*$
过载组	4.29 ± 0.47	5.80 ± 0.24

图 5 所示为各组成骨相关基因表达结果。以尾吊组为基准组,生理性载荷可以有效上调 BMP-2、Col I、AKP 表达,增强成骨作用($P < 0.05$);过载亦有上述作用,但效果不显著($P > 0.05$)。

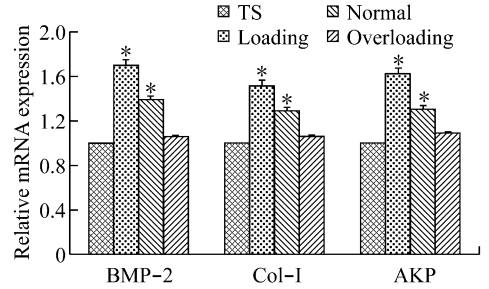
图5 BMP-2、Col I、AKP 基因表达结果对比 (* $P < 0.05$, 与TS组相比)

Fig. 5 Comparison of BMP-2, Col I and AKP mRNA expression

3 讨论与结论

在微重力环境下,机体受到相应的负荷减少,从而导致骨质丢失,易发生骨质疏松。本研究通过尾吊建立微重力环境,探讨不同强度周期性动态力学载荷对微重力下骨质疏松的作用。结果发现,小鼠经过 4 周尾吊后,表现出骨组织流失、骨微观结构破坏、骨力学性能降低、成骨细胞活性及相关基因表达下调的情况;与此同时,生理性力学载荷能有效改善骨组织微观结构,增强其宏观力学性能,上调成骨相关基因的表达;而过载也能对骨质疏松的状况有所改善,但是效果不明显。既往在细胞层面的研究发现,过载能抑制成骨细胞增殖和分化减弱,并且能诱导成骨细胞发生凋亡^[7-8],这与本文结果不同,推测原因如下:① 本研究为动物实验,尾吊一定时间后,骨流失较为严重,当施加超生理载荷后,骨组织流失进一步加重,这时机体会保护性激发代偿性补给,使骨组织趋向正常;② 在早期施加超生理载荷后,持续的过载会导致骨组织的疲劳性损伤,出现典型的骨微裂纹。相关研究表明,骨微裂纹的产生在早期会促进骨损伤的修复与重建^[9-11],对骨的再生是一种正向动力,会使骨组织向正常方向发展。而本实验加载时间较短,仅为 4 周,并不会使骨组织产生较为明显的损伤,故很有可能是产生微小裂纹后导致骨重塑增强。在后续研究中,将会保持关注这一现象,并进一步研究其发生的原因。

尾吊实验作为一种较为成熟的造模方法,通常采用大鼠作为研究对象^[12],而目前研究骨丢失的细胞多采用小鼠骨组织来源的细胞系。因此,本文采用小鼠作为研究对象,建立小鼠微重力致骨质疏松模型并加以评价,而后施加生理性载荷与过载,以研

究两种因素对微重力下骨质疏松的影响效果,且实验结果与相关研究结果相一致^[13-14]。研究发现,小鼠在最开始 72 h 内表现出较强的应激反应,如暴躁、稀便增加、进食减少等,在之后会慢慢趋于平稳。在实验过程中,前 3 天为适应性饲养,在小鼠进入平稳期后再进行实验。

在动物实验中,骨密度和骨形态学计量参数并不能作为诊断骨质疏松以及评价骨质疏松药物治疗效的金标准,故骨生物力学参数的检测在评价诊断和治疗骨质疏松方面应用广泛^[15-16]。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,但在前期实验中发现,采用传统的长骨干三点弯曲法检测各试验组骨力学参数并没有显著差异,原因可能是在骨质疏松发生早期,骨组织的变化主要发生于松质骨,而皮质骨的变化相对不明显;另外,胫骨的生理性弯曲导致在进行骨干三点弯曲法加载时容易使胫骨滑动,造成较为显著的误差。因此,本文选择了干骺端三点弯曲法^[17]。在实验过程中,为避免胫骨在加载时产生应力较大,将原始的椭圆形模具替换成马鞍形模具,这样既能增大胫骨与模具的接触面,同时又可避免滑动现象。这将有效避免由于干骺端弯曲产生剪切力影响试验结果,并使得松质骨力学参数的检测更为准确。实验结束后,分析所得数据发现,在采用干骺端三点弯曲法后,各组实验结果具有显著差异,与预期结果相符。

本研究通过尾吊饲养小鼠模拟微重力环境导致骨质疏松,尽管与真正意义上的太空微重力环境有一定差距,并不能完全展示出微重力环境下骨质疏松发生的过程,但是该模型作为一种较为成熟的模拟太空微重力环境的方法,其结果可以为太空长期作业人员提供一种可能的预防或治疗骨质疏松的方法。建议太空长期作业人员开展一定强度和规律的体能训练,但是训练强度不宜过强,以免发生疲劳导致的骨组织微损伤,进而使骨流失更为严重。

参考文献:

[1] MARTIN RB. Toward a unifying theory of bone remodeling [J]. *Bone*, 2000, 26(1): 1-6.
[2] OKADA A, ICHIKAWA J, TOZAWA K. Kidney stone formation during space flight and long-term bed rest [J]. *Clin Calcium*, 2011, 21(10): 1505-1510.
[3] 吴玉琼, 房兵, 江凌勇. 间歇牵拉应变对大鼠骨髓间充质干

细胞增殖与成骨分化的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(6): 574-578.
WU YQ, FANG B, JIANG LY. Effect of intermittent tensile strain on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(6): 574-578.
[4] LI H, LI RX, WAN ZM, et al. Counter-effect of constrained dynamic loading on osteoporosis in ovariectomized mice [J]. *J Biomech*, 2013, 46(7): 1242-1247.
[5] STÜRMER EK, SEIDLOVÁ-W UTTKE D, SEHMISCH S, et al. Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: Effect of estradiol, testosterone, and raloxifene [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(1): 89-96.
[6] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
[7] WAN ZM, LI JY, LI RX, et al. Bone formation in rabbit cancellous bone explant culture model is enhanced by mechanical load [J]. *Biomed Eng Online*, 2013, 12(1): 1-15.
[8] LI JY, LIU L, WAN ZM, et al. A novel co-culture system for interaction of mouse osteoblasts and osteoclasts [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2013, 17(15): 2693-2697.
[9] HERMAN BC, CARDOSO L, MAJESKA RJ, et al. Activation of bone remodeling after fatigue: Differential response to linear microcracks and diffuse damage [J]. *Bone*, 2010, 47(4): 766-772.
[10] VAN OERS RF, VAN RIETBERGEN B, ITO K, et al. Simulations of trabecular remodeling and fatigue: Is remodeling helpful or harmful? [J]. *Bone*, 2011, 48(5): 1210-1215.
[11] CARTER DR. Mechanical loading histories and cortical bone remodeling [J]. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36(suppl 1): S19-S24.
[12] 史晓, 王翔, 杜修东, 等. 大鼠尾悬吊骨质疏松模型初探 [J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(3): 341-343.
[13] AGUIRRE JI, PLOTKIN LI, STEWART SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(4): 605-615.
[14] BROWN JP, DELMAS PD, ARLOT M. Active bone turnover of the cortico-endosteal envelope in postmenopausal osteoporosis [J]. *J Clin Endocr Metab*, 1987, 64(5): 954-959.
[15] 顾冬云, 陈亚珠. 骨质疏松性骨力学性能的预测 [J]. *医用生物力学*, 2009, 24(1): 70-73.
GU DY, CHEN YZ. Prediction of Biomechanical properties of osteoporosis bone [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(1): 70-73.