

轻度承重活动对卵巢切除大鼠骨密度 组织计量和生物力学的影响

陈柏龄, 廖威明, 李佛保, 付明, 徐栋梁

(中山医科大学附属第一医院骨科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨轻度承重活动对绝经后骨质疏松的防治作用。【方法】4月龄36只雌性大鼠分组: ①假去势组, ②去势组, ③去势加制动组。②、③组行双侧卵巢切除术, ③组还用胶布带将其右后肢制动于腹部(使右后肢不能进行承重活动)。各组大鼠分笼喂养, 保持日常活动, 术后12周分别检测和分析大鼠右侧股骨骨密度、组织计量学和生物力学的变化。【结果】与假去势组比较, 去势组大鼠股骨骨密度下降, 骨小梁体积比下降, 骨小梁平均厚度和骨皮质平均厚度减少, 骨吸收表面和类骨质表面明显增加, 同时其生物力学性能变差, 但骨密度、骨皮质平均厚度及骨强度指标在统计学上与假去势组无显著性差异; 而去势加制动组大鼠其股骨骨密度下降、骨小梁体积比下降及骨小梁平均厚度和骨皮质平均厚度减少更加明显, 生物力学性能更差, 骨密度、骨皮质平均厚度及股骨强度指标在统计学上与假去势组有显著性差异。【结论】去势雌性大鼠若保持轻度承重运动, 则能保持相对较好的骨质量, 缺乏承重运动则骨质量显著变差, 提示轻度承重活动对防治绝经后骨质疏松具有显著性作用。

关键词: 负重; 生物力学; 骨质疏松; 绝经后; 骨密度

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0187-05

Effect of Light Weight-bearing Activity on Bone Mineral Density, Histomorphometry and Biomechanics in Ovariectomized Rats

CHEN Bai-ling, LIAO Wei-ming, LI Fo-bao, FU Ming, XU Dong-liang

(Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of light weight-bearing activity on postmenopausal osteoporosis. 【Methods】36 female rats were randomly divided into 3 groups: ① Sham, ② Ovx (ovariectomized), ③ Ovx+Im (ovariectomized and immobilized). All the group's maintained daily activity. And because of being immobilized, the right hind limbs of the third group lacked weight-bearing activity. 12 weeks after ovariectomy, the BMD (bone mineral density), histomorphometry and biomechanics of the right femurs of rats were measured and analyzed. 【Results】Comparing with the Sham group, the Ovx group's right femurs were manifested with the decrease of BMD, TBV (trabecular bone volume), MTT (mean trabecular thickness) and MCT (mean cortex thickness), while the increase of RS (resorption surface) and OS (osteoid surface). Meanwhile their biomechanic nature declined. But statistically the BMD, MCT and the criteria of mechanical strength were not significant decrease. Otherwise, the Ovx+Im group's right femurs showed more apparent decrease of BMD, TBV, MTT and MCT. And the biomechanic nature was worse. Comparing with the Sham group, the BMD, MCT and the criteria of mechanical strength of the Ovx+Im group were statistically significant decreased. 【Conclusion】If maintaining light weight-bearing activity, the ovariectomized rats were able to maintain relatively better bone quality. A lack of light weight-bearing activity would cause the decline of bone quality. Thus the study

收稿日期: 2000-11-20

基金项目: 国家教委博士点基金(9754)

作者简介: 陈柏龄(1968-), 男, 海南儋州人, 博士生, 主治医师, 主要研究骨质疏松症。

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

suggested light weight-bearing activity was significantly effective on the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis.

Key word: weight-bearing; biomechanics; osteoporosis; postmenopausal; bone density

运动对骨质疏松(OP)的防治作用早已肯定,但临床上有关不同类型、不同强度的运动对OP防治作用的报道有矛盾^[1]。由于OP患者多为老年人,许多并不适合作较重度的运动,故研究轻度运动意义重大。本研究拟通过分析去势雌性大鼠在保持日常活动情况下,右下肢承重和非承重对其右侧股骨骨密度、组织计量学和生物力学性能的变化,探讨轻度承重活动对绝经后骨质疏松的防治作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组

4月龄SD雌性大鼠(中山医科大学动物实验中心提供)36只随机分3组:①假去势组(Sham):仅切开腹部,不切除卵巢;②去势组(Ovx):切除双侧卵巢,右后肢不制动;③去势加制动组(Ovx+Im):切除双侧卵巢,并用胶布带将其右后肢制动于腹部,避免右后肢承重。各组体质量无显著性差异。术后室温下分笼(80 cm×40 cm×40 cm)饲养,每笼6只,保持日常活动。标准饲料含钙质量分数为0.66 g/100 g,维生素D 1 500 U/100 g,自由饮水。

1.2 卵巢切除

戊巴比妥钠腹腔内麻醉(50 mg/kg),在无菌条件下经腹腔切除双侧卵巢(病理切片证实)。

1.3 取标本

各组大鼠均于术后12周处死,以过量戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,称重,完整取出右侧股骨置于低温冰箱内。

1.4 检测指标

1.4.1 体质量 检测大鼠实验前和处死时的体质量。

1.4.2 股骨直径、面积和骨密度[BMD, $\rho_{\text{bmd}} / (\text{g}/\text{mm}^3)$] 分别测量右侧股骨上、中、下段3个截面的直径、面积,求取其平均值。以双能X线骨密度仪(QDR4500 Fanbeam X-ray Bone Densitometer, HOLOGIC)测量股骨颈骨密度。

1.4.3 骨组织形态计量学检测 取股骨颈作组织切片,利用全自动图象分析系统(IBAS 2.0 by

Kontron German, 中山医科大学图象分析室)进行检测,每张切片选择4~5个视野,检测以下参数:

①骨小梁体积百分比(trabecular bone volume, TBV/%) : 骨小梁体积占骨髓腔总体积的百分比;②类骨质表面百分比(osteoid surface, OS/%) : 骨小梁类骨质表面占骨小梁总表面积的百分比;③骨吸收表面百分比(resorption surface, RS/%) : 骨小梁吸收表面占骨小梁总表面积的百分比;④骨小梁平均厚度[mean trabecular thickness, MTT, $b(\text{MTT}) / \mu\text{m}$];⑤骨皮质平均厚度[mean cortex thickness, $b(\text{MCT}) / \mu\text{m}$]。

1.4.4 生物力学检测 从冰箱里取出股骨复温,以万能材料试验机(MTS858 Bi-axial Material Test Machine, MTS Inc. USA)作整骨三点弯曲试验。为减少扭转效应,被检测的股骨两端以直径1.5 mm的克氏针垂直股骨长轴钻入固定,两端跨距为24 mm,然后两克氏针再固定在支架上,加载速度为2 mm/min,检测过程由计算机系统以0.2 s自动记录瞬时压力和变形数据直至发生骨折。由于克氏针参与了承载过程,因此所得数据受到克氏针弹性的影响,但因为整个检测条件和过程都是相同的,故并不影响各组间的比较。

根据直梁弯曲理论,测量以下生物力学指标:

①极限载荷(maximum load force, $F_{\text{l,max}} / \text{N}$);②强度极限(maximum stress, $\sigma_{\text{max}} / \mu\text{Pa}$);③最大挠度比(maximum strain, $f_{\text{max}} / \%$);④弹性系数(Elasticity, $E / \mu\text{Pa}$);⑤韧性系数[Flexibility, $K / (\mu\text{m} / \text{N})$]。

1.5 统计学分析

将所有数据输入计算机SPSS 8.0软件进行统计学分析,采用ANOVA进行单因素方差分析及SNK- q 法进行组间两两比较。

2 结果

2.1 大鼠实验前和处死时的体质量和股骨直径、面积、骨密度

各组大鼠实验前和处死时的体质量和股骨直径、面积、骨密度测定结果见表1:①各指标均近似

正态分布; 股骨面积方差不齐, 应用平方根转换后, 方差转为齐性; ②各组大鼠实验后体质量均明显增加, 但各组之间实验前和处死时的体质量无显著性

差异; ③去势组骨密度下降, 但与假去势组无显著性差异; 去势加制动组骨密度下降更明显, 与去势组和假去势组均有显著性差异。

表 1 各组大鼠体质量及其右侧股骨直径、面积和骨密度检测

Table 1 Results of body mass and diameter, area and BMD of the right femurs of the groups¹⁾

Group	<i>m</i> (Body mass) / g		<i>d_{rf}</i> / mm	<i>S_{rf}</i> / mm ²	ρ_{bmd} / (g/mm ³)
	0 week	13 week			
Sham	299.33±18.65	423.25±14.08	3.55±0.11	9.91±0.14	0.2860±0.011
Ovx	293.25±13.67	425.67±17.70	3.60±0.10	9.98±0.53	0.2782±0.0099
Ovx+Im	302.75±19.68	423.00±25.77	3.61±0.06	10.10±0.34	0.2581±0.0081 ^{2),3)}
<i>F</i>	0.904	0.085	1.447	0.798	24.806
<i>P</i>	0.415	0.919	0.25	0.459	0.000

1) Note: *m* (body mass), *d_{rf}*, *S_{rf}* and ρ_{bmd} represent body mass, diameter, area and bone mineral density of the right femurs of the groups respectively; 2) Comparing with Sham group, *P*<0.05; 3) Comparing with Ovx group, *P*<0.05 (Analysis of variance by one way ANOVA and difference between two groups by Student-Newman-Keuls)

2.2 骨组织形态计量学

各组 TBV、OS、RS、MTT 及 MCT 结果见表 2:

①各指标均近似正态分布。类骨质表面百分比(OS)方差不齐, 应用平方根转换后, 方差转为齐性。②TBV: 去势组 TBV 减少, 与假去势组有显著性差异; 去势加制动组减少更明显, 与去势组和假去势组均有显著性差异。③OS: 去势组 OS 明显增加, 与假去势组有显著性差异; 而去势加制动组 OS

则明显减少, 与去势组有显著性差异。④RS: 去势组和去势加制动组均明显增加, 与假去势组有显著性差异。⑤MTT: 去势组 MTT 减少, 与假去势组有显著性差异; 去势加制动组减少更明显, 与去势组和假去势组均有显著性差异。⑥MCT: 去势组和去势加制动组均下降, 但仅去势加制动组与假去势组有显著性差异。

表 2 各组大鼠右侧股骨颈组织计量学检测

Table 2 Results of histomorphometry of the right femur necks of the groups¹⁾

Group	TBV / %	OS / %	RS / %	<i>b</i> (MTT) / μm	<i>b</i> (MCT) / μm
Sham	36.62±2.09	5.26±0.73	1.62±0.12	72.02±4.95	147.08±6.56
Ovx	20.37±2.45 ²⁾	8.10±0.98 ²⁾	2.27±0.15 ²⁾	53.17±6.38 ²⁾	143.53±8.52
Ovx+Im	13.17±1.75 ^{2),3)}	3.19±0.29 ^{2),3)}	2.19±0.30 ²⁾	46.35±4.24 ^{2),3)}	141.44±4.67 ²⁾
<i>F</i>	387.063	137.594	36.711	76.492	2.133
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.135

1) TBV: trabecular bone volume; OS: osteoid surface; RS: resorption surface; *b* (MTT): mean trabecular thickness; *b* (MCT): mean cortex thickness; 2) Comparing with Sham group, *P*<0.05; 3) Comparing with Ovx group, *P*<0.05 (Analysis of variance by one way ANOVA and difference between two groups by Student-Newman-Keuls)

2.3 生物力学

各组生物力学检测结果见表 3: ①各指标近似正态分布; 各组间方差齐性。②载荷极限: 去势组和去势加制动组均下降, 但仅去势加制动组与假去势组有显著性差异; ③强度极限: 去势组和去势加制动组均下降, 但仅去势加制动组与假去势组有显

著性差异; ④最大挠度比: 去势组增高, 而去势加制动组下降, 与假去势组有显著性差异; ⑤弹性系数: 去势组和去势加制动组均下降, 但仅去势加制动组与假去势组有显著性差异; ⑥韧性系数: 去势组和去势加制动组均增高, 但仅去势组与假去势组有显著性差异。

表3 各组大鼠右侧股骨生物力学指标检测

Table 3 Results of biomechanic of the right femurs of the groups¹⁾

Group	$F_{1, \max} / (N)$	$\sigma_{\max} / \mu Pa$	$f_{\max} / \%$	$E / \mu Pa$	$K / (\mu m/N)$
Sham	121.62 ± 5.21	148.52 ± 6.07	5.44 ± 0.25	2618.42 ± 318.71	14.27 ± 1.47
Ovx	117.67 ± 3.96	144.63 ± 5.79	6.55 ± 0.27	2254.67 ± 387.82	16.78 ± 1.21 ²⁾
Ovx+Im	112.02 ± 5.04 ^{2), 3)}	141.47 ± 4.93 ²⁾	4.53 ± 0.33 ^{2), 3)}	2167.75 ± 385.94 ²⁾	15.65 ± 1.52
<i>F</i>	12.297	4.738	48.576	5.134	9.661
<i>P</i>	0.000	0.016	0.000	0.011	0.000

1) $F_{1, \max}$: maximum load force; σ_{\max} : maximum stress; f_{\max} : maximum strain; E : elasticity; K : flexibility; 2) Comparing with Sham group $P < 0.05$; 3) Comparing with Ovx group $P < 0.05$ (Analysis of variance by one way ANOVA and difference between two groups by Student-Newman-Keuls)

3 讨论

绝经后骨质疏松 (PMO) 的防治措施有药物疗法和运动疗法等。但至今由于药物的副作用及其昂贵的价格使药物的应用难以大众化。同时, PMO 患者多为老年人, 许多并不适合作较重度的运动, 重型 PMO 继发骨折患者根本就无法进行较重度的运动。因此, 研究轻度运动包括接近或相当于日常生活状况的体力活动对骨质疏松的防治作用非常必要, 这也是本实验的研究起因。

3.1 相当于日常生活状况的轻度承重活动在防治 PMO 中的意义

目前, 一般认为只有承重 (weight-bearing) 运动对防治 OP 才有肯定的效果³⁾。那么相当于日常生活状况的轻度承重活动如站立、步行等其效果如何? Rodahl 等^[3]研究长期卧床对钙代谢影响, 认为尿钙排泄的增多是由于长骨缺乏纵向压力所致。因为取仰卧位每天在自行车测功机上猛烈操作 1~4 h, 以及在轮椅上不活动静坐 8 h 均不能改变尿钙排泄增多现象, 而每天除了斜靠在床上外还站立 3 h, 则可使尿钙排泄恢复到正常值。可见仅是站立便对骨钙的代谢产生显著的影响。闫景龙等^[4]研究制动对去势雌性大鼠松质骨结构的影响, 显示若将后肢制动于腹部, 则右侧胫骨近端松质骨的三维结构损害更明显, 从而间接提示轻度承重活动对维持松质骨的三维结构有重要作用。

不过, 目前尚未见有人将轻度承重活动的效果和非承重活动的结果作系统的比较, 同时, 在骨的生物力学方面亦缺乏实验室资料。因此, 本实验从骨密度、组织计量学、生物力学 3 方面对轻度承重活动的效果作了较系统的研究, 并将其与非承重活动的结果作量的统计学比较, 探讨轻度承重活动对

绝经后骨质疏松的防治作用。本实验中由于大鼠是在笼中喂养, 限制了它们的活动强度, 根据 Bedford 运动模型及常用的体力活动强度分级标准^{5, 6)}, 大鼠所保持的日常活动属于轻度活动。因而, 各组大鼠除了去势加制动组大鼠的右后肢因为制动无法进行承重活动外, 其余的前后肢均保持日常的轻度承重活动。本研究显示, 雌性大鼠去势后, 骨的吸收活动非常活跃, 无论制动与否, 右侧股骨的骨吸收表面均明显增加。但若保持右后肢的轻度承重活动, 12 周后, 尽管右侧股骨骨密度下降, 骨小梁平均厚度、体积比和骨皮质平均厚度减少, 生物力学性能变差, 但其类骨质表面亦明显增加 (提示能维持较活跃的成骨活动), 骨密度、骨皮质平均厚度及骨强度指标 (载量极限、强度极限) 在统计学上与假去势对照组无显著性差异。而去势加制动组大鼠其股骨骨密度下降及骨小梁平均厚度、体积比和骨皮质平均厚度的减少较去势非制动组更加明显, 同时其类骨质表面也明显减少 (提示成骨活动受抑制), 生物力学性能更差, 骨密度、骨皮质平均厚度及股骨强度指标在统计学上与假去势对照组有显著性差异。由此可见, 去势雌性大鼠若保持轻度承重活动, 则能维持一定程度的骨生成作用, 并能保持相对较好的骨密度和骨生物力学性能, 缺乏承重活动则骨的生成作用明显受抑制, 骨密度显著下降, 骨的生物力学性能显著变差, 提示轻度承重活动对防治绝经后骨质疏松具有显著性意义。这在临床上为 PMO 患者尤其是重度 PMO 合并骨折患者的治疗提供了非常有意义的实验依据, 医务人员应该鼓励这些患者, 即使不能作较重度的活动, 亦应尽可能多些下床作诸如站立、扶拐行走、步行、双上肢用力推墙等轻度承重活动, 以维持对骨骼的有效刺激 (stimulus), 防止骨量的严重丢失和骨质量的下降。

本实验仅观察了去势 12 周后雌性大鼠骨密度、骨组织计量学和生物力学的变化,轻度承重活动对去势后其它时期的作用效果尚待进一步研究。

3.2 影响 PMO 发展的有关因素

引起 PMO 的主要原因是雌激素的缺乏,但影响它的发展是多因素的,包括营养状态(钙,维生素 D,微量元素等),内分泌状态(甲状旁腺素,糖皮质激素升高,胰岛素等),运动水平,有无影响骨代谢的疾病以及遗传因素等均影响着它的发展和预后。本研究表明,雌性大鼠切除卵巢后因为雌激素的缺乏会引起明显的骨丢失,但若同时存在缺乏承重活动这个因素时,骨的丢失会更加严重。因此,在 PMO 的防治中,必须考虑到影响其发展的多因素性,采取综合的防治措施,才能达到最佳的防治效果。

本研究亦表明,轻度承重活动补偿不了因性激素缺乏所造成的骨丢失,PMO 的防治需要配合药物以及需要更高强度的体力活动。

3.3 在 OP 防治中运动强度的评价指标

在 OP 的防治中,应该用什么指标来评价运动强度?本研究提示,单纯应用历来采用的代谢当量(METS)和最大氧耗量的百分比[percentage of maximum oxygen consumption, ($V_{1, O_2} / V_{0, O_2, max}$) / (%)]作为指标是不合适的。因为在本实验中,由于各组大鼠均在同样大小的笼中饲养和活动,去势组和去势加制动组所消耗的代谢当量和最大氧耗量的百分比是基本相同的,而右后肢的负荷不同

却显著影响右侧股骨的代谢变化。日本已有学者提出应用“骨应激指数”(如在步行或跑步时,等于每一次运动中地面反作用力 \times 步数)作为指标,这方面有待进一步的研究和规范。

(致谢:衷心感谢本校统计教研室骆福添副教授对本实验检测结果的统计学分析给予悉心的指导和帮助)

参考文献:

- [1] Rodriguez L P. Physical activity, bone remodeling and osteoporosis [J]. An R Acad Nac Med Nadr, 1999, 116(4): 855.
- [2] Layne J E, Nelson M E. The effects of progressive resistance training on bone density: a review [J]. Med Sci Sports Exerg, 1999, 31(1): 25.
- [3] Astrand P O, Rodahl K. 运动生理学 [M]. 杨锡让译. 北京:人民体育出版社, 1982. 322 ~ 325.
- [4] 闫景龙,戴克戎,裘世静. 卵巢切除固定对大鼠松质骨结构的影响 [J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(5): 273.
- [5] Bedford T G, Tipton C M, Wilson N C, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures [J]. J Appl Physiol, 1979, 47(6): 1278.
- [6] Pollock M L, Gaesser G A, Butcher J D, et al. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness and flexibility in healthy adults [J]. Med Sci Sports Exerg, 1998, 30(6): 975.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 173 页)

- [4] Chen Z P, McQuillan A, Mohr G, et al. Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency gene 2 expression and chloroethylnitrosourea resistance in human glioma cell lines [J]. Neurosurgery, 1998, 42(5): 1112.
- [5] Monks A, Scudiero D, Skehan P, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines [J]. J Natl Cancer Inst, 1991, 83(11): 757.
- [6] van Osdol W W, Myers T G, Paull K D, et al. Use of the Kohonen self-organizing map to study the mechanisms of action of chemotherapeutic agents [J]. J Natl Cancer Inst, 1994, 86(24): 1853.
- [7] Chen Z P, Yarosh D, Garcia Y, et al. Relationship between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase levels and clinical response induced by chloroethylnitrosourea therapy in glioma patients [J]. Can J Neuro Sci, 1999, 26(2): 104.
- [8] Andersson B S, Sadeghi T, Siciliano M J, et al. Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs [J]. Cancer Chem Pharmacol, 1996, 38(5): 406.
- [9] Sitaram A, Plitas G, Wang W, et al. Functional nucleotide excision repair is required for the preferential removal of N-ethylpurines from the transcribed strand of the dihydrofolate reductase gene of Chinese hamster ovary cells [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(2): 564.
- [10] Leveillard T, Andera L, Bissonnette N, et al. Functional interaction between p53 and the TFIIH complex are affected by tumor-associated mutations [J]. EMBO J, 1996, 15(7): 1615.

(编辑 黄小延)