

补钙对骨质疏松并发骨折大鼠的生物力学研究

李晋平 章明放 李忠武 石少辉 孙锐 赵风云

摘要: 目的 探讨补钙对骨质疏松并发骨折的大鼠模型生物力学的影响。方法 将105只6月龄Sprague-Dawley大鼠随机分5组:假切组(Sham)、去势组(OVX)、去势+L-苏糖酸钙高剂组、去势+L-苏糖酸钙中剂组、去势+L-苏糖酸钙低剂组。在去势手术后的第20d末(给药13d末)和第40d末(给药33d末)处死动物。取左前肢分别进行X光片拍摄、组织学切片的观察和三点弯曲生物力学试验测试。结果 X光片、组织学切片的观察都显示了正常对照组与模型对照组之间有明显的放射学和形态学改变;且给予L-苏糖酸钙不同剂量的钙剂后,骨折部位有不同程度愈合的放射学和形态学改变,尤以中剂量组最为显著。三点弯曲生物力学试验结果显示:给药13d和给药33d后,假切组的最大挠度、最大弯曲力和斜率与去势组相比均有显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);L-苏糖酸钙高、中、低剂组也与去势组相比有显著差异($P < 0.01$)。给药33d后,L-苏糖酸钙高($P < 0.01$)、中、低剂组和Sham组($P < 0.05$)的最大弯曲力与给药13d相比有显著差异;L-苏糖酸钙中剂组的斜率与给药13d相比也有显著差异($P < 0.01$)。结论 适量的钙剂能显著促进骨折愈合,改善骨痂质量,增强骨生物力学特性。

关键词: 骨质疏松;骨折;钙;生物力学

Biomechanics study of calcium supplementation on osteoporosis with fracture LI Jinping, Zhang Mingfang, LI Zhongwu, et al. Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China

Abstract: Objective To study the effect of calcium supplementation on ovariectomized rats with fracture. **Methods** One hundred and five six-month-old SD rats were randomly divided into 5 groups: sham, ovx, ovx + L-threose acid calcium of 200mg Ca/kg/day, ovx + L-threose acid calcium of 100mg Ca/kg/day, and ovx + L-threose acid calcium of 50mg Ca/kg/day groups. All rats were sacrificed at the end of 20 days after ovariectomy (13 days after therapy) and 40 days after ovariectomy (33 days after therapy) respectively. Left forelimb was carried out and tested by X-ray, histology and three-point-bending test. **Results** Both of the control and model control group presented radiologic and morphological changes which in different extend in different groups. The most remarkable changes was shown in the 100 mg Ca/kg/d group. **Conclusions** Proper calcium supplementation can fasten the fracture healing process, improve the quality of callus and enhance the biomechanical properties.

Key words: Osteoporosis; Fracture; Calcium; Biomechanics

骨质疏松是以骨量减少,骨显微结构异常,脆性增加的一种全身性骨骼疾病,易于发生骨折。绝经后骨质疏松是由雌激素降低引起的,多发生于老年妇女。钙剂作为防治骨质疏松常用药之一,已广泛应用于人们的生活和临床中。本研究是用去势大鼠并骨折的大鼠来造成骨质疏松并发骨折的模型,从生物力学角度来探讨服用钙剂对骨质疏松并发骨折的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

105只6月龄雌性Sprague-Dawley大鼠由北京中国医学科学院实验动物研究所提供,动物合格批号:scxk-00-0006。平均体重:283±15g。饲养于天津医科大学动物实验中心,温度:30~40%,湿度:21~23℃,明12h/暗12h。标准固体饲料喂养,

饮用天津自来水。

1.1.2 仪器

css-44100型电子万能实验机(长春材料实验机研究所)。控制方式为载荷-位移。载荷测量精度0.001N,位移测量精度0.001mm;

TOSHIBA KXO-15R 640mA X线机(日本产),用于X光检测;

Sakuka Tissue TEK WIP脱水机(日本产品);

Leica EG 1160石蜡包埋机(澳大利亚产品);

Leica 1516切片机(澳大利亚产品)。

1.1.3 药物

L-苏糖酸钙为白色粉末,批号990628,含钙量12.89%(北京巨能亚太生命科学研究中心提供),用蒸馏水溶解后,灌胃口服。按高、中、低剂量组的顺序,溶解度依次为38.65g/100ml,19.33g/100ml,9.66g/100ml。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模方法

105只6月龄SD大鼠随机选84只,以10%水合氯醛,3ml/kg剂量进行腹腔麻醉,无菌条件下背侧进路摘除双侧卵巢,制备成骨质疏松模型;另21只按上述麻醉方法,无菌条件下,假性切除卵巢(只切除部分卵巢脂肪),制备成假切(sham)组模型。以上105只大鼠均在无菌条件下切开左侧桡骨皮肤,钝性分离桡侧肌群,暴露桡骨中段,用咬骨钳咬断桡骨,保留尺骨,不固定桡骨,以制备成骨质疏松并骨折模型。如上方法可分组如下:

①L-苏糖酸钙高剂组(去势并骨折,1.54g/kg,相当于200mgCa/kg.day)21只;

②L-苏糖酸钙中剂组(去势并骨折,0.77g/kg,相当于100mgCa/kg.day)21只;

③L-苏糖酸钙低剂组(去势并骨折,0.38g/kg,相当于50mgCa/kg.day)21只;

④正常对照组(假切并骨折,非药物组)21只;

⑤模型对照组(去势并骨折,非药物组)21只。

1.2.2 试验处理

实验周期40d,待1w皮肤伤愈后,按上述实验方案每天灌胃给药。分别于术后第20d末(给药13d末)和第40d末(给药33d末)股动脉放血处死动物,取左前肢做X光检测、组织学检查、三点弯曲生物力学试验测试。

1.2.3 检测

X光检测:剔除附着肌肉,以背→前侧体位平

行排列,拍摄X光片。

组织学检查:含骨折断端骨组织以20%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙30d,常规脱水,包埋,切片,5 μ m厚,HE染色后镜检。

生物力学测试:取大鼠左前肢,去除表面软组织,用css-44100型电子万能实验机做三点弯曲试验。支点跨距为20mm,压头直径近似1.5mm,试验中加载速度为5mm/min,采用200N以内的小载荷量程。描计载荷-变形曲线。以压头位移近似弯曲中点挠度。测得的结果中以最大挠度代表所测材料的韧性;最大弯曲力(最大应力)代表材料的强度(极限强度);以斜率(弹性模量)代表材料的钙化程度(刚度)。

1.2.4 统计学方法

生物力学结果用均数 \pm 标准差表示,用SPSS统计软件进行单因素方差分析和两组间t检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

在105只SD大鼠中,每组有5只死亡,均为体质较差,虚弱而死。

2.2 放射学检查结果

去势20d(给药13d)时:正常对照组可见清晰骨折线,未愈合,两断端密度增高,成梭形膨大。模型对照组可见清晰较宽的骨折裂隙,两断端膨大,密度增高,但梭形膨大不明显。L-苏糖酸钙给药各组见骨折线模糊不清,断端梭形膨大且密度增高,部分例可见可辨的较窄的骨折裂隙,以高剂组和中剂组较好,骨折相邻处骨密度亦增高。

去势40d(给药33d)时:正常对照组骨折线大多模糊不清,梭形膨大仍存,密度增高,少数例可见密度低的骨折线。模型对照组仍可见清晰骨折线,断端密度增高,相邻骨干密度亦增高。L-苏糖酸钙给药各组大多骨折线已消失,梭形膨大仍存,密度明显增高,少数例梭形膨大缩小,仅表现为密度稍高,最佳组为中剂量组,依次为高剂量组和低剂量组。

2.3 组织学结果

去势20d(给药13d)情况:正常对照组可见断端由致密间叶成分充填,其中见软骨样基质和软骨细胞岛,骨膜反应性增生伴膜内成骨反应。模型对照组可见干骺端骨皮质变厚,骨断端由较致密的间叶组织填充,其间见软骨细胞岛,多少不一。对位不佳的几例

可见增生性间叶组织和透明软骨。L-苏糖酸钙给药各组可见断端多量间叶组织，透明软骨相间存在伴小灶性软骨基质钙化和相邻骨膜反应性增生和骨膜成骨。成骨细胞数量较多，伴类骨质形成，以中剂量为著。

去势 40d (给药 33d) 情况：正常对照组骨痂主由透明软骨和不规则海绵状骨构成，掺杂少许间叶组织，海绵状骨多由编织骨构成伴钙盐沉积，软骨基质钙化仍可见。模型对照组骨痂主由透明软骨、间叶组织和少许海绵状骨构成，也可见不规则钙盐沉积。L-苏糖酸钙给药各组骨痂多由海绵状骨和透明软骨构成，尤对位良好者。骨断端处见许多海绵状骨，软骨内成骨清晰可见，部分例可见较多破骨细胞伴骨吸收，局部编织骨向板层骨过渡，骨膜处膜内成骨亦清晰可见，且骨折处骨痂构成一个整体。个别例已难辨骨痂，只是骨折处由多量未改建

的海绵状骨构成，比较而言，给药各组仍以中剂量和高剂量组骨痂质量较好，次之为低剂量组。

2.4 生物力学结果

给药 13d 和给药 33d 末，SHAM 组的最大挠度、最大弯曲力和斜率与去势组相比均有显著差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)；L-苏糖酸钙高、中、低剂组与去势组相比也有显著差异 ($P < 0.01$)。同时，L-苏糖酸钙中或高剂组的某项力学指标比 SHAM 组或低剂组有显著差异 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。如表 1。

给药 33d 天末，L-苏糖酸钙高 ($P < 0.01$)、中、低剂组和 SHAM 组 ($P < 0.05$) 的最大弯曲力与给药 13d 末相比有显著差异性；L-苏糖酸钙中剂组的斜率与给药 13d 相比也有显著差异 ($P < 0.01$) (未在表中标出)。

表 1 去势并骨折给药 13 天和 33 天生物力学结果 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 最大挠度 (mm) | | 最大弯曲力 (N) | | 斜率 (MPa) | |
|-----------|----|-------------|--------------|----------------|--------------|----------------|----------------|
| | | 给药 13d | 给药 33d | 给药 13d | 给药 33d | 给药 13d | 给药 33d |
| L-苏糖酸钙高剂组 | 8 | 3.43±0.49** | 3.85±0.26** | 22.1±1.22** | 26.25±2.99** | 22.35±1.39** | 24.17±6.24** |
| L-苏糖酸钙中剂组 | 8 | 3.51±0.32** | 3.81±0.37** | 22.95±0.81** | 27.20±4.14** | 18.73±2.19***# | 27.76±6.99** |
| L-苏糖酸钙低剂组 | 8 | 3.35±0.27** | 3.60±0.45** | 21.68±1.42**\$ | 26.36±4.28** | 17.35±1.20***# | 20.00±4.69**\$ |
| SHAM 组 | 8 | 3.29±0.41** | 3.42±0.44**# | 21.65±1.43**\$ | 25.57±3.67** | 18.00±1.76***# | 21.87±4.79**\$ |
| OVX 组 | 8 | 2.70±0.56 | 2.90±0.40 | 17.26±0.95 | 19.22±4.06 | 10.09±1.80 | 11.59±5.45 |

注：与 OVX 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，与高剂组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与中剂组比较，\$ $P < 0.05$ ，

\$\$ $P < 0.01$

3 讨论

生物力学特性是反映骨的生长代谢情况的一个重要指标，它是骨量、骨结构连续性、骨皮质厚度及骨材料特性的综合反映^[1]。对骨进行生物力学实验研究不但有助于对骨质量进行直接评价，而且也是评价各种对抗骨丢失时最佳方法之一^[2]。三点弯曲力学试验是常用的骨生物力学特性测定方法之一。

去势的雌性大鼠常作为绝经后骨质疏松动物模型，已被国际社会所公认。由于去卵巢造成雌激素水平降低，进一步引起 PTH、CT、1, 25 (OH)₂D₃ 等多途径骨吸收增强，超过骨形成作用，导致骨质丢失^[3,4]。Kalu 等^[5]报道卵巢切除后骨转换加快，成骨活动和破骨活动均增强，但破骨活动超过成骨活动，从而造成骨质丢失。最终导致骨质疏松。并且，人为骨折形成骨质疏松并骨折模型与

一般的骨折在愈合方式上相似，软骨内成骨与膜内成骨共同参与了骨质疏松骨折的修复，且以软骨内成骨为主^[6,7]。从郝永强等^[8]研究结果中可知，在实验动物双侧卵巢切除后雌激素缺乏所诱发的骨质疏松性骨折愈合过程中，软骨性骨痂生成量多，但向骨性骨痂演变过程延缓。本研究组织学结果显示，不论去势 20d 还是去势 40d，模型对照组的骨断端均有间叶组织和软骨细胞岛/透明软骨等成分构成，与以上结论相符。同时，放射学检查结果显示，模型对照组的骨折裂隙比正常对照组的清晰，且断端密度增高。除了组织学和放射学结果外，骨生物力学参数的测定对于骨质疏松动物模型的建立有着重要的意义。在本研究中，给药 13d 和给药 33d 骨痂所做的三点弯曲生物力学试验显示，正常对照组的最大挠度、最大弯曲力和斜率均显著高于模型对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。从以上几方面都说明了去势并骨折的模型对照组建立成功。

另一方面,生物力学研究对于防治骨质疏松药物疗效的判断也有着重要意义。生物力学指标反映了骨的内在质量和性能的改变,能表示骨的强度和抵抗外力的能力。骨应力-应变曲线可定量的反映骨的承受的载荷和载荷导致的骨变形之间的关系。在曲线中,最大梯度代表骨韧性,它是结构力学特性指标;最大弯曲力即最大应力代表骨强度,是骨的内在特性指标;曲线斜率代表骨钙化程度,提示骨的抗变形能力。在骨折预测方面,骨结构可能比骨量更重要^[9]。本试验结果中,给药的3个剂量组在给药的13d和33d末测得的最大梯度、最大弯曲力和斜率均高于模型对照组,说明给予钙剂后,桡骨的韧性变大,强度变高,抗变形能力增强,而且结果还显示,随着给药时间的延长,骨的强度和抗变形能力也在增强。这显示了钙在骨痂的愈合中发挥了重要作用。虽然并不是所有的力学指标都显示差异性,但这些力学指标也反映了随着给药时间的延长,一些力学指标也有增加的趋势。说明钙在骨痂愈合,骨强度和骨质量提高上起着关键的作用。而且许多研究也表明,补钙对绝经后妇女骨量的有益作用随绝经时间的延长而增强^[10]。同样,在组织学结果中,L-苏糖酸钙给药各组与模型对照组相比较,在给药13d时,给药组骨断端除了间叶组织和透明软骨的增多外,还相间存在伴小灶性软骨基质钙化和相邻骨膜反应性增生和骨膜成骨。以中剂量组为著;在给药33d时,给药组骨痂由透明软骨构成外,且海绵状骨增多,软骨内成骨清晰可见,局部编织骨向板层骨过渡,骨膜处膜内成骨清晰,且骨折处骨痂构成一个整体。比较而言,给药组仍以中剂量和高剂量组骨痂质量较好。在放射学结果中,L-苏糖酸钙给药组与模型对照组相比,骨折断端骨折线由模型组的清晰变为给药组的不清晰,梭形膨大明显,且密度增高。以上结果从形态学和放射学角度,均支持了生物力学的结果,说明了补适量的钙对骨痂愈合的促进作用。从以上分析说明,适量补钙不但提高了骨痂质量,而且还增强了骨的抗变形能力。钙作为抗骨质疏松药在骨质疏松并骨折愈合中可以起到积极作用。

另外,从骨折修复方面来说,软骨内成骨和膜内成骨参与了骨质疏松骨折的修复过程;软骨细胞生成软骨基质,成骨细胞生成骨基质,再加上钙盐沉积,于是骨组织形成。本试验中,补钙增加了机体对钙离子的摄入,可能促进了软骨基质和骨基质的

钙化,从而促进骨痂的形成。因此从以上两方面可以说钙盐沉积是骨折愈合中重要过程、骨折愈合的关键步骤^[11]。

此外,从本试验的整个结果中可以看出,L-苏糖酸钙中剂和高剂组的生物力学指标明显优于模型对照组和正常对照组并且有显著意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。这说明了抗骨质疏松药物的剂量也影响到了生物力学指标。正如一些文献中所陈述的那样,除药物种类外,药物剂量多少也能影响骨质的力学特性^[12]。

总之,从以上诸方面考虑,可认为适量钙剂在生物力学方面能够提高骨生物力学指标,促进骨折愈合,防治骨质疏松骨折起着积极的作用。钙作为防治骨质疏松的基础用药,已广泛应用于人们的生活和临床实践中。

【参 考 文 献】

- [1] Cao XS, Zhang LN, Wu XY, et al. Intermittent + 45° head-up tilt improves mechanical parameters of hindlimb unweighting in rats. *J Fourth Mil Med Univ*, 2000, 21 (6): 655-658.
- [2] 崔伟,刘成林.基础骨生物力学(一).中国骨质疏松杂志,1997,3(3):482-485.
- [3] 郭世级,罗先正,邱贵兴.骨质疏松基础与临床.天津科学技术出版社,181-193.
- [4] 侯淑琴,肖占森.绝经妇女骨代谢变化及雌激素对骨代谢的影响.中国骨质疏松杂志,2000,6(1):72-73.
- [5] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*, 1991, 15: 175.
- [6] 卿茂盛,陈小砖,邹志鹏.续断对大鼠骨质疏松性骨折愈合影响的生物力学实验研究.中国医学物理学杂志,2002,19(3):159-160.
- [7] 谢伟坚,黄雄飞,罗新乐,等.骨质疏松大鼠股骨骨折骨痂及腰椎的生物力学研究.中国临床解剖学杂志,2003,21(5):507-508.
- [8] 郝永强,戴克戎.实验性骨质疏松性骨折愈合方式的组织学观察.上海医学,1999,22(3):137-139.
- [9] Frost RM. Perspectives on our age-related bone mass: insights from a new paradigm. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1539-1546.
- [10] 刘忠厚.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998:622.
- [11] 黄遂柱,赵永强,陈凤苞,等.雌激素实验性骨质疏松症骨折的影响.中国骨质疏松杂志,2000,6(1):65-68.
- [12] 秦岭,梁国穗.骨生物力学在防止骨质疏松药物开发中的应用基础(一).中国骨质疏松杂志,2000,6(1):23-25.

(收稿日期:2004-10-15)