

· 论 著 ·

从生物力学角度探讨酒精对大鼠股骨干及股骨头影响的实验研究

申意伟^{1,2} 徐西林² 张晓峰^{1*} 李雪¹ 吕航² 张骋¹ 白洋¹ 李佐峰³ 范桢亮¹ 赵军¹

1.黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040;

2.黑龙江中医药大学附属第二医院,黑龙江 哈尔滨 150001;

3.东北师范大学数学与统计学院,吉林 长春 130024

中图分类号: R285. 5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 03-0313-05

摘要: **目的** 探究长期酒精灌胃对大鼠股骨干及股骨头生物力学的影响。**方法** 35只SD大鼠随机分组,其中酒精组20只给予46%酒精每周灌胃4次,空白组15只,灌胃等体积生理盐水。4个月后取双侧股骨干行三点弯曲试验,双侧股骨头行压缩试验,SPSS 23.0软件进行统计分析。**结果** 与空白组相比,酒精组股骨干弹性模量、刚度系数、最大载荷、破坏载荷等力学参数均降低,而韧性系数、弹性应变、最大应变、弹性挠度和最大挠度不同程度地增加,差异均有统计学意义($P<0.05$);酒精组大鼠股骨头弹性载荷和最大载荷均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 长期酒精摄入可降低大鼠股骨干及股骨头抵抗外力的生物力学性能,使骨折风险增加。

关键词: 生物力学;酒精;骨折;股骨干;股骨头

Experimental study on the effect of alcohol on the femoral shaft and femoral head in rats from the perspective of biomechanics

SHEN Yiwei^{1,2}, XU Xilin², ZHANG Xiaofeng^{1*}, LI Xue¹, LV Hang², ZHANG Cheng¹, BAI Yang¹, LI Zuofeng³, FAN Zhenliang¹, ZHAO Jun¹

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China

2. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China

3. School of Mathematics and Statistics, Northeast Normal University, Changchun 130024, China

* Corresponding author: ZHANG Xiaofeng, Email: zxf455@sina.com

Abstract: Objective To explore the effect of long-term alcoholic gavage on the biomechanics of femoral shaft and femoral head in rats. **Methods** Thirty-five Sprague-Dawley rats were randomly divided into groups. Among them, 20 rats in the alcohol group received 46% alcohol for four times a week, and 15 rats in the blank group received an equal volume of normal saline. Four months later, the bilateral femoral head was subjected to a three-point bending test, and the bilateral femoral head was compressed. SPSS 23.0 software was used for statistical analysis. **Results** Compared with the blank group, the elastic parameters such as elastic modulus, stiffness coefficient, maximum load, and failure load of the femoral shaft in the alcohol group decreased, while the toughness coefficient, elastic strain, maximum strain, elastic deflection, and maximum deflection increased to varying degrees. All the differences were statistically significant ($P<0.05$). The elastic load and maximum load of the femoral head in the alcohol group decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Long-term alcohol intake reduces the biomechanical properties of the femoral shaft and femoral head in rats against external forces, which increases the risk of fracture.

Key words: biomechanics; alcohol; fracture; femoral shaft; femoral head

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774343);黑龙江省中医药科研项目(ZHY18-066);黑龙江中医药大学科研基金项目(201811);哈尔滨市应用技术与开发项目(2017RAXXJ047)

* 通信作者: 张晓峰, Email: zxf455@sina.com

酒精消费已成为全球最严重的药物滥用障碍之一。慢性长期酒精摄入对多种器官有害,包括大脑、心脏、肝脏、肌肉和骨骼^[1-3]。虽然最近的研究表明,适量酒精摄入可能对骨性能和矿物质密度有

益^[4],但短期过量或长期慢性酒精摄入可能与骨重建受损和骨折风险增加呈正相关^[5],甚至导致骨坏死发生^[6-7]。骨骼生物力学作为评价骨结构力学和材料力学特性的重要方法^[8-9],从生物力学角度探讨酒精对骨组织的影响,尤其是对股骨头的影响,具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10周龄雄性SD大鼠35只,清洁级,体质量(275±12)g,由辽宁沈阳长生科技有限公司提供,实验动物质量合格证编号:SCXK(辽)2015-0001。屏障系统[实验动物使用许可证:SYXK(黑)2016004]条件下,标准颗粒饲料喂养,周期照明,室内室温20~25℃,相对湿度40%~70%,实验期间动物自由饮食和饮水。

1.2 主要试剂和仪器

电子万能材料试验机(Instron 5569,英斯特朗-美国),哈尔滨工业大学材料科学与工程实验中心拥有;精密游标卡尺,精密度0.001mm(上海首丰精密仪器有限公司);精密切割机(ZQ-50智能精密切割机,天津帝诚联硕科技有限公司);无水乙醇(上海振兴化工一厂),无菌蒸馏水稀释制成体积分数为46%的酒精溶液。

1.3 分组及实验方法:

适应性喂养1周,随机分组,其中酒精组20只,46%(v/v)按10g/(kg·d)灌胃,每周连续灌胃4天,停3天;空白组15只,相同时间相同方式灌胃等体积生理盐水,各组大鼠均自由饮水、摄食。

1.4 动物处死和骨组织标本获取

4个月后各组大鼠均在腹腔注射戊巴比妥钠麻醉下处死,立即完整分离双侧股骨及右侧胫骨近端。逆行剔除软组织,游离肌肉肌腱,避免刀片等锐器划伤骨表面(如有损伤则剔除)。在冰浴上,精密切割锯沿股骨头下缘完整切下双股骨头,并用砂纸将股骨头断面磨平。用生理盐水浸透纱布包裹,放入液氮冷却后转至-80℃中保存,备做骨生物力学试验。

1.5 股骨干三点弯曲实验

室温下,将股骨标本缓慢解冻,保持其湿度,放置在力学实验机支架上(Instron 5569,英斯特朗-美国),曲面向下,使股骨中点、两支点中心与加载点重合,匀速加载至标本断裂,描记出载荷-变形(挠度)曲线(图2)。测试温度23℃,试验机载荷测量精度0.001N,位移(挠度)测量精度0.001mm,支

座跨距20mm,压头直径为1.5mm,加载速度1mm/min,选用1000N以内的小载荷量程,用游标卡尺测量断骨内径和壁厚,精度0.001mm,记录并分析实验数据。

1.6 股骨头压缩实验

将股骨头下断面磨平,用游标卡尺测量股骨头下缘到软骨面最远处记为股骨头的高度,并测量股骨头直径。将湿润的股骨头标本置于电子万能材料试验机(Instron 5569)上,加载速度为1mm/min记录实验数据,绘制载荷-变形曲线(图2),其他测试条件同股骨干三点弯曲实验。压缩试验中为了减少边界效应,在断面涂润滑剂。

1.7 右侧胫骨近端 HE 染色

骨组织标本放入4%多聚甲醛(pH=7.4)中浸泡3d达到充分固定,然后用体积分数为10%乙二胺四乙酸(EDTA,pH=7.4),室温下脱钙28d,脱水、石蜡包埋、切片(3μm厚度),光镜下观察分析。

1.8 统计学处理

力学试验数据处理按照相应公式计算^[10],实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 23.0统计软件,对符合正态分布且方差齐性资料行 t 检验,反之行非参数检验。变量间相关性行Pearson检验,如有相关性,则进一步行线性回归分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

酒精组较空白组骨小梁数量减少,骨小梁厚度变窄、间隙增大,骨密度降低。见图1。

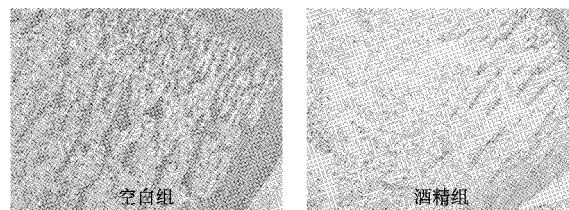


图1 右胫骨 HE 染色

Fig.1 HE staining for the right tibia

图2为股骨头压缩试验和股骨干三点弯曲试验所记录的载荷-形变曲线图,图中A-B考虑股骨头软骨形变为主,受游离股骨头断面不平整导致应力集中影响较大。B-C考虑股骨头软骨下形变为主,曲线呈直线变化,属弹性形变。C-D为塑性形变,载荷对股骨头产生不可逆损伤。D-E为股骨头被外力破坏,由于有机质和关节软骨的存在,加之骨小梁间隙尚存,碎裂骨片间位移、相互作用导致应力集中-破

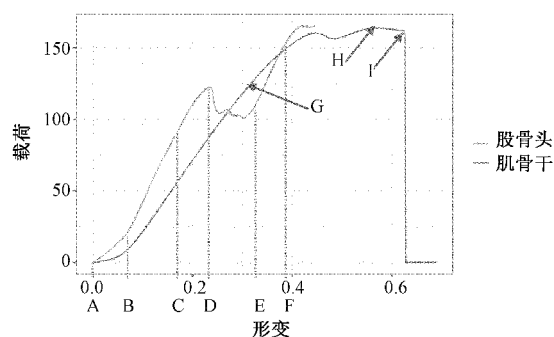


图2 载荷-形变曲线图

Fig.2 Load-deformation curve

梁间隙几乎完全消失,变化多呈直线趋势。G为股骨干屈服点,代表骨抵抗形变的能力;H为最大载荷点,代表骨所能承受极限外力,表征骨抵抗破坏的能力;I为破坏载荷点,有时与H点重合,是对骨小梁强度、结构连续性、皮质厚度、横截面积和材料质量的反映。

2.1 大鼠股骨干结构力学参数比较

与空白组相比,酒精灌胃组大鼠股骨干最大载荷、破坏载荷等结构力学参数均不同程度地减少,弹性挠度和最大挠度不同程度地增加,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),股骨干弹性载荷、破坏挠度及弯曲能量未见显著变化 ($P>0.05$),见表1。

表1 股骨干三点弯曲试验测试大鼠股骨干结构力学参数($\bar{x}\pm s$)Table 1 Three-point bending test to test the structure mechanical parameters of the femoral shaft in rats($\bar{x}\pm s$)

组别	弯曲能量/(N×mm)	弹性载荷/(N)	最大载荷/(N)	破坏载荷/(N)	弹性挠度/(mm)	最大挠度/(mm)	破坏挠度/(mm)
酒精组	20.966±6.456	117.060±16.057	168.895±6.159*	125.275±25.573*	0.703±0.062	0.703±0.136*	1.236±0.303
空白组	18.055±1.501	130.087±10.203	184.256±15.859	156.968±33.083	0.278±0.0288	0.515±0.094	0.968±0.309
t值	1.389	2.097	2.575	2.225	3.267	3.467	1.498
P值	0.183	0.052	0.020	0.041	0.005	0.003	0.082

注:与酒精组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 大鼠股骨干材料力学参数比较

与空白组相比,酒精灌胃组大鼠股骨干弹性模量、刚度系数材料力学参数均不同程度地减少,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);股骨干韧性系数、弹性

应变和最大应变均不同程度升高,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);其中,弹性应力和最大应力未见显著变化 ($P>0.05$),见表2。

表2 三点弯曲试验测试大鼠股骨干材料力学参数($\bar{x}\pm s$)Table 2 Three-point bending test to test the material mechanical parameters of the femoral shaft in rats($\bar{x}\pm s$)

组别	弹性模量/(GPa)	弹性应力/(MPa)	最大应力/(MPa)	弹性应变/(%)	最大应变/(%)	刚性系数/($10^3\text{N}\times\text{mm}^2$)	韧性系数/($10^{-3}\text{mm}/\text{N}$)
酒精组	5.632±0.317*	107.546±17.405	115.384±26.343	0.019±0.003*	0.038±0.008*	56.071±4.457*	2.988±0.231*
空白组	6.617±1.076	103.401±13.888	123.792±24.992	0.015±0.001	0.028±0.004	78.868±12.758	1.941±0.252
t值	2.488	0.562	0.692	3.063	3.026	4.800	9.053
P值	0.024	0.581	0.498	0.007	0.008	<0.001	<0.001

注:与酒精组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 大鼠股骨头压缩试验参数比较

与空白组相比,酒精灌胃组大鼠股骨头弹性载荷和最大载荷均不同程度地降低,差异均有统计学

意义 ($P<0.05$);股骨头能量吸收及最大形变率弹性应力和最大应力未见显著变化 ($P>0.05$),见表3。

表3 股骨头压缩试验力学参数($\bar{x}\pm s$)Table 3 Mechanical parameters of compression test for the femoral head($\bar{x}\pm s$)

组别	弹性载荷/(N)	最大载荷/(N)	最大形变率/(%)	能量吸收/(N×mm)
酒精组	91.565±13.945*	118.683±14.504*	0.215±0.019	20.137±2.246
空白组	155.105±41.761	178.032±47.399	0.176±0.084	30.622±16.705
W值	4	4	36	16
P值	0.011	0.011	0.134	0.329

注:最大形变率=最大载荷时股骨头被压形变/股骨头高度×100%。

2.4 酒精组股骨头最大载荷与股骨干弹性模量相关性分析

股骨干弹性模量是股骨重要生物力学参数,与骨的几何形状无关,反映骨内在刚度^[11]。为分析股骨头最大载荷与股骨干弹性模量相关性,行 Pearson 相关性检验, $t = 2.6108$, $P = 0.013$, 说明二者有相关性。由图 2 可知,股骨头最大载荷 ($F_{\max}$) 随着股骨干弹性模量 (modulus, M) 增大而呈现增大趋势。进一步,行线性回归分析得, $F_{\max} = 16.261 \times M + 26.509$ 。

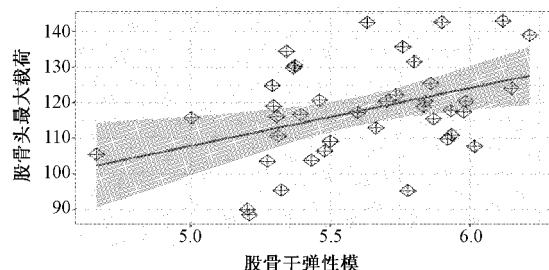


图 3 股骨头最大载荷 ($F_{\max}$) 与股骨干弹性模量 (M) 的散点图

注:图中蓝色直线为线性拟合直线,灰色区域为拟合残差区域。

Fig.3 Scatter plot of maximum femoral head load ($F_{\max}$) and femoral shaft elastic modulus (M)

3 讨论

关于酒精摄入对骨代谢的影响的组织学研究结果存在争议^[12],有证据表明剂量依赖性影响骨形成和再吸收的不平衡^[13]。总体而言,酒精诱导的骨重建调节的病因是多因素的,可能涉及对骨代谢直接和间接作用^[14]。酒精诱导的骨量丢失的间接作用继发于雌二醇 (E2) 水平的目标变化,PTH-维生素 D 轴的调节,生长刺激的肝胰岛素 (GH) 样生长因子 1 型 (IGF-1) 和氧化应激的影响。骨骼的结构会随着酒精摄入而发生变化,尤其是长期酗酒者,骨结构改变,力学性能随之而变。本研究中,长期大量灌胃酒精造成大鼠股骨生物学变化,股骨干的最大载荷、破坏载荷等结构力学参数均不同程度地减少,股骨干弹性模量、刚度系数材料力学参数均不同程度地减少,表明慢性酒精暴露对骨矿质形成有抑制作用,股骨干抵抗破坏性能减弱,骨脆性增加而易断,这种抑制作用可从股骨干生物力学变化可见一斑。胫骨近端病理染色亦验证了长期酒精摄入对骨代谢的影响 (图 1),体现了骨形态和功能的相关性^[15]。股骨干韧性系数、弹性应变和最大应变均不同程度升高,弹

性挠度和最大挠度不同程度地增加,提示股骨干有机质相对增多,该变化考虑无机质丢失过多所致。

可简单地将骨骼分为密质骨和松质骨^[16],骨骼是由多种材料 (有机质、无机质) 构成的复合体,呈非均匀分布的特点。股骨的形状较其他骨的形状更加接近空心圆筒,其应力分析可用空心圆筒近似,而其他骨的形状较复杂,分析的结果误差较大。最大载荷直接反映松质骨的骨小梁的骨质、结构的连续性、皮质骨的强度、骨的横截面积的大小等,是对骨质量的综合反映,可直接从荷载-变形曲线 (图 2) 上读取,本研究中股骨干和股骨头最大载荷均降低,提示酒精导致骨耐外力性能降低。结构力学参数主要反映出骨的结构特征的变化,它主要受到骨重建过程中骨的几何形状、体积、密度分布的变化的影响,当然,骨的强度、弹性模量等材料力学指标的变化对它也有一定影响。骨的成分与生物力学指标之间的关系变化是复杂的,需采用多方面的因素来衡量,总体而言,骨矿含量的变化对弹性区的影响较大,而有机质的变化对塑性区的变化影响较大。酒精抑制骨形成^[17],增加破骨细胞活性,使骨矿量减少,有机质相对增加,表现出股骨干弹性模量和刚度降低,股骨干韧性系数、弹性应变和最大应变均不同程度升高,关于酒精引起股骨干生物力学变化的详细分子及细胞机制需进一步研究。本研究采用游离股骨头进行压缩测试,消除了股骨颈和股骨干形变的影响。分析了酒精导致股骨头生物力学的变化,由于股骨头并非密度均匀、形态规则、组织单一的球体,除了坚硬的骨组织,表面覆盖较软的关节软骨,因此游离股骨头压缩实验表现出载荷先随形变缓慢上升,至软骨完全压平后,由于软骨下骨组织弹性形变表现出直线上升,变形至屈服点后,发生塑性形变,随后出现最大载荷,终止股骨头完全破坏。结果表明酒精可引起大鼠股骨头最大载荷减低,减弱股骨头抵抗外力性能,提示酒精导致股骨头坏死的风险。进一步分析表明,骨头最大载荷与股骨干弹性模量具有相关性,提示可从股骨干生物力学性能来粗略地评估酒精对股骨头的影响,为股骨头坏死的防治及疗效评估提供一种参考^[18]。

本研究测试结果表明,长期酒精摄入导致大鼠股骨干刚性降低,骨头最大载荷与股骨干弹性模量具有相关性,提示可从股骨干生物力学性能来粗略地评估酒精对股骨头的影响;长期酒精摄入导致大鼠股骨干韧性相对增高,股骨干和股骨头抵抗外力性能降低,易发脆断,推测酒精导致骨组织矿质和有

机质成分变化,提示长期酒精摄入对骨组织的不良反应。

【参 考 文 献】

- [1] Di Rocco G, Baldari S, Pani G, et al. Stem cells under the influence of alcohol: effects of ethanol consumption on stem/progenitor cells [J]. CMLS, 2018, 10(11): 1-16.
- [2] Miranda RC, Pietrzykowski AZ, TANG Y, et al. MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2010, 34(4): 575-587.
- [3] Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2005, 29(12): 2077-90.
- [4] Jonsson I M, Verdrengh M, Brissert M, et al. Ethanol prevents development of destructive arthritis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(1): 258-263.
- [5] Song TH, Shim JC, Jung DU, et al. Increased bone mineral density after abstinence in male patients with alcohol dependence [J]. Clin Psychopharmacol Neurosci, 2018, 16(3): 282-289.
- [6] Chen J, Liu W, Cao Y, et al. MMP-3 and MMP-8 single-nucleotide polymorphisms are related to alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head in Chinese males [J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25177-88.
- [7] Wang Y, Yang X, Shi J, et al. Combination analysis of NOS3, ABCB1 and IL23R polymorphisms with alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head risk in Chinese males [J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33770-33778.
- [8] Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone mechanical properties in healthy and diseased states [J]. Ann Rev Biomed Engineer, 2018, 20(1): 119-143.
- [9] Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho J C, et al. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review [J]. J Biomechan Engineer, 2015, 137(1): 1-16.
- [10] 陈孟诗, 赖胜祥, 李良, 等. 大鼠的骨生物力学指标选取及测试[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(4): 547-51.
- [11] 程朋真, 宁芬茹, 李丹, 等. 不同保存方式对小鼠股骨力学性能的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2016, 33(6): 1133-1138.
- [12] Williams FM, Cherkas LF, Spector TD, et al. The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins [J]. Ann Rheumat Dis, 2005, 64(2): 309-310.
- [13] Luo Z, Liu Y, Liu Y, et al. Cellular and molecular mechanisms of alcohol-induced osteopenia [J]. CMLS, 2017, 74(24): 4443-4453.
- [14] Shankar K, Hidestrand M, Haley R, et al. Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats [J]. Endocrinology, 2006, 147(1): 166-178.
- [15] 依香叫, 燕梦云, 王松月, 等. Micro-CT 和骨力学测试观察刺老苞根皮对骨折大鼠的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(4): 473-478.
- [16] 胡慧婷, 李新宇, 陈维毅, 等. 股骨有限元建模及相应的生物力学分析[J]. 中北大学学报(自然科学版), 2014, 35(5): 576-580.
- [17] Liu Y, Kou X, Chen C, et al. Chronic high dose alcohol induces osteopenia via activation of mTOR signaling in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells (Dayton, Ohio), 2016, 34(8): 2157-2168.
- [18] Ma JX, He WW, Zhao J, et al. Bone Microarchitecture and Biomechanics of the Necrotic Femoral Head [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13345.

(收稿日期: 2018-11-19; 修回日期: 2018-12-14)