

短期低钙饮食对去卵巢大鼠股骨生物力学特性的影响

张岩 黎韵萍 周鸿奇 吴春福 黄文秀

摘要: 目的 考察短期低钙饮食对去卵巢大鼠股骨生物力学特性的影响。方法 大鼠假手术或去卵巢处理 5 周后, 按照饮食中钙含量不同, 分作 4 组: 假手术常钙饮食组(SN); 假手术低钙饮食组(SL); 去卵巢常钙饮食组(ON); 去卵巢低钙饮食组(OL)。设 C 组为正常对照组。分食喂养两周, 收集尿液, 腹主动脉取血, 收集股骨, 低温保存。对股骨中段进行三点弯曲生物力学实验, 并通过 Western blotting 检测近端股骨蛋白表达。结果 双因素方差分析表明, 去卵巢可显著提高血清 ALP 水平($P < 0.001$)和尿液 DPD 水平($P < 0.01$), 并降低股骨弹性模量($P < 0.05$)和材料韧性($P < 0.05$)等材料力学特性。单独短期低钙饮食因素对股骨生物力学影响不显著, 但去卵巢大鼠配以低钙饮食后(OL 组), 可显著降低股骨硬度、能量吸收、韧性等生物力学指标。低钙饮食组大鼠近端股骨维生素 D 受体(VDR)蛋白表达提高。结论 大鼠去卵巢后体内呈现高骨转换状态; 短期低钙饮食可加重大鼠由于去卵巢后股骨生物力学性能的损害; 低钙饮食对骨矿代谢有一定影响。

关键词: 去卵巢; 低钙饮食; 股骨; 生物力学

Effect of short-term dietary calcium deficiency on biomechanical properties of femurs in ovariectomized rats

ZHANG Yan, LI Yunping, ZHOU Hongqi, et al. Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To study the effect of short-term dietary calcium deficiency on the biomechanical properties of femur in ovariectomized rats. **Methods** Sham operated and OVX rats were divided into four groups based on the dietary calcium level 5 weeks after the operation; Sham+NCD(normal calcium diet) (SN); Sham+LCD (low calcium diet) (SL); OVX+NCD (ON); OVX+LCD (OL). Another group (C) was taken as normal control. Two weeks later, urine specimens were collected and blood was taken from the abdominal aorta. Femurs were collected and stored at -20°C for three-point bending test in the diaphysis. Protein expression in proximal femur was detected by Western blot. **Results** Two-way ANOVA analysis showed that the levels of serum ALP ($P < 0.001$) and urine DPD ($P < 0.01$) were significantly elevated after OVX, and femoral elastic modulus ($P < 0.05$) and toughness ($P < 0.05$) was reduced. Significant decrease of biomechanical markers, stiffness, energy absorption and toughness was observed in OL group, but not in those with short-term low calcium intake only. Vitamin D receptor (VDR) expression of proximal femur in LCD group was higher than that in NCD group. **Conclusions** Active bone turnover is observed in ovariectomized rats which can be aggravated by short-term dietary calcium deficiency. Calcium restriction has certain influence on bone mineral metabolism.

Key words: Ovariectomy; Low calcium diet; Femur; Biomechanics

骨质疏松是一种代谢性骨病, 随着人均寿命的延长, 其发病率呈上升趋势。妇女绝经后骨质疏松的发病率显著高于男性, 这与绝经后性激素水平下

降有密切关系, 而且, 绝经后妇女肠钙吸收率和肾钙储留率下降, 加之饮食钙不足, 活动减少, 更加速了骨质疏松症的发生与发展^[1]。动物实验表明, 雌性大鼠去卵巢后可造成骨质疏松, 另一方面, 给动物低钙饮食, 也可加速其骨丢失, 引起骨骼病变^[2]。对于两种因素对骨的综合作用, 先前研究多局限于对骨密度, 骨几何参数的考察, 而本研究旨在全面考察骨生物力学的变化, 以期今后抗骨质疏松药物的研

基金项目: 香港特别行政区科技研究发展计划(AOE/P-10/01)项目资助课题(GYD-53)

作者单位: 110016 沈阳, 沈阳药科大学药学院(张岩、吴春福); 香港理工大学(黎韵萍、周鸿奇、黄文秀)

通讯作者: 张岩, Email: medicineyan@yahoo.com.cn

发及筛选提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验用饲料及仪器

标准动物饲料(1.0% Ca, 0.55% P), 购于广州中医药大学实验动物中心。常钙饲料(NCD-0.6% Ca, 0.65% P, Cat No: TD 98005), 低钙饲料(LCD-0.1% Ca, 0.65% P, Cat No: TD 98006), 由美国 Harlan Teklad 公司提供。生物力学测定仪为 Hounsfield material testing machine (Model H 10 KM, Hounsfield Test Equipment Limited, UK), 使用 QMat Testzone Version 4.4.27 软件 (Hounsfield Test Equipment Limited, UK) 分析处理数据。美国产全自动生化分析仪 (Abbott, ALCYON 300i)。

1.2 实验动物及分组

40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠, 4 月龄, 平均体重 309 g (购自广州中医药大学实验动物中心)。适应环境 1 周后, 其中 16 只做假手术处理 (Sham, 寻找双侧卵巢, 切除其旁边一小块脂肪组织), 16 只行双侧去卵巢 (OVX), 剩余 8 只作为正常对照 (C)。造模期间所有动物喂标准动物饲料。按照摄食量最少一组折算每只大鼠每天食物消耗量, 实验期间都按此食物量喂食。5 周后, 所有大鼠喂常钙饲料 2 d, 之后进行分食处理, 每组各 8 只: 假手术+常钙饲料 (Sham+NCD, SN); 假手术+低钙饲料 (Sham+LCD, SL); 去卵巢+常钙饲料 (OVX+NCD, ON); 去卵巢+低钙饲料 (OVX+LCD, OL), 正常对照组饲以常钙饲料 (此组并不完全等同于 SN 组, C 组可同时作为大鼠年龄对照组, 是合理实验设计所必需的)。整个实验期间自由饮用蒸馏水, 12 h 光照/黑暗交替, 室温 (23 ~ 25) °C。

1.3 动物取材

动物分食喂养 2 周后, 分别放置代谢笼, 收集 24 h 尿液。之后腹主动脉取血处死大鼠, 分离血清。取其下肢两侧股骨, 小心剔尽肌肉及筋膜。右侧股骨迅速投入液氮, 之后收集于 -80 °C 保存。用生理盐水沾湿纱布包裹左侧股骨, 置 -20 °C 保存。

1.4 生化指标测定

用全自动生化分析仪及相应试剂盒 (北京中生北控生物科技股份有限公司提供) 测定血清碱性磷酸酶 (ALP) 含量及尿液肌酐 (Cr) 含量; 使用 ELISA 试剂盒 (购于美国 Quidel 公司) 测定尿液脱氧吡啶交联 (DPD) 含量。

1.5 生物力学测定

股骨室温解冻 3 h 后, 放置实验仪器上, 对股骨中段进行三点弯曲力学实验。两支点跨距为 15 mm (L), 加力点下降速度 2 mm/min, 直至股骨断裂, 整个实验过程骨变形曲线 (load-deformation) 由电脑绘出 (图 1)。系统软件分析得到以下骨结构力学指标: 最大载荷 (F_M) 及对应变形 (D_M), 断裂载荷 (F_B) 及对应变形 (D_B), 硬度 (Stiffness, S), 能量吸收 (Energy, ε)。

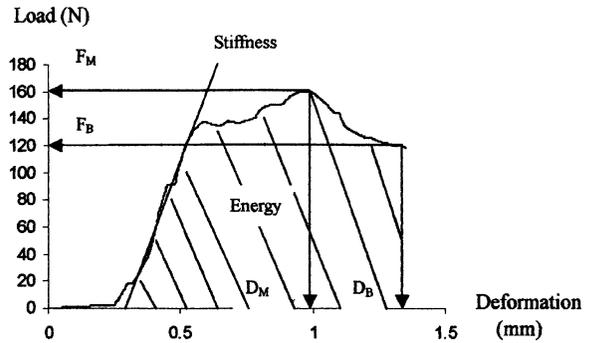


图1 载荷-变形曲线及结构力学指标

1.6 数据转换^[3,4]

根据先前文献报道方法, 假想断裂横截面为椭圆形, 用游标卡尺测定股骨断裂处外径及四点处的厚度 (图 2 所示), 则断裂处截面惯性矩 $I = (\pi/64) [ab^3 - (a-t_1-t_2)(b-t_3-t_4)^3]$ (由外径减骨厚度得到内径是对文献报道的直接测定内径方法的改进), 由 I 作中介, 根据相应计算公式可得到以下骨材料力学指标: ①应力 = $FLb/8I$; ②应变 = $6bD/L^2$; ③弹性模量 = $SL^3/48I$; ④韧性 = $\epsilon b^2/20I$ 。

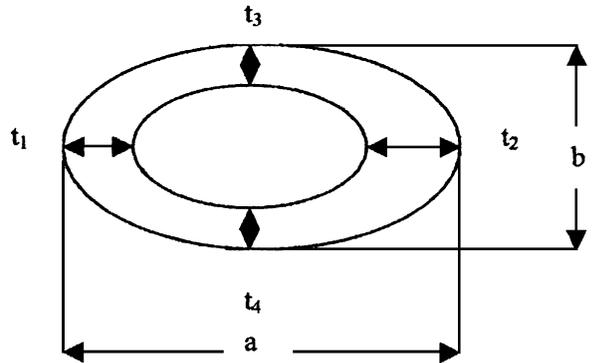


图2 截面惯性矩的计算

1.7 维生素 D 受体 (VDR) 蛋白分析

按照 Trizol 说明书操作步骤提取近端股骨蛋白。采用 Bradford 方法测定蛋白浓度。于 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 上样量为 30

μg 。之后电转移至 PVDF 膜, 经过阻断非特异蛋白, 清洗, 加一抗(兔多克隆抗 VDR, 使用浓度 1:1000), 清洗, 加二抗(羊抗兔 IgG HRP, 使用浓度 1:2000), 清洗, 最后使用 ECL 检测试剂, 于凝胶成像系统下对目标蛋白进行分析。

1.8 统计学分析

使用 GraphPad 公司 Prism 4 软件对数据进行统计分析处理。双因素方差分析(two-way ANOVA)考察不同处理因素(手术, 饮食)对目标变量的影响, 各组间均数比较使用 Bonferroni 方法, 正常对照组同其他组间比较使用双尾 t 检验。结果以均值 \pm 标准误表示, $P < 0.05$ 表示在统计学上有显著性差异。

2 结果

2.1 骨转换指标的变化

去势组大鼠血清 ALP 和尿液 DPD 同假手术 + 常钙饮食组(SN)比较有显著性差异(分别为 $P < 0.001$ 及 $P < 0.05$), 而两指标在 ON 与 OL 两组间的水平基本一致。双因素方差分析表明去势对这两指标的升高有统计学意义, 而短期低钙饮食无论是对假手术组, 还是去势组, 都没有影响。此结果说明去卵巢使大鼠处于高骨转换状态, 骨形成和骨吸收都

明显增强。结果及统计分析见表 1。

表 1 低钙饮食和(或)去卵巢对骨转换指标的影响

组别	血清 ALP(U/L)	尿液 DPD/Cr($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
C	93.0 \pm 5.5	63.3 \pm 4.3
SN	83.2 \pm 3.2	59.0 \pm 2.8
SL	94.8 \pm 6.0	80.6 \pm 8.2
ON	153.6 \pm 17.9***	102.2 \pm 11.9*
OL	148.9 \pm 6.5***	101.7 \pm 7.6*
双因素方差分析	P	
手术	< 0.001	< 0.01
饮食	0.3094	0.2644
交互作用	0.2894	0.2422

注: 与 SN 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.2 骨结构力学

股骨中段结构力学测定结果如表 2 所示。去卵巢或低钙饮食使骨结构硬度有下降趋势, 而去卵巢 + 低钙饮食组(OL)的结构硬度和断裂所需能量比 SN 组、ON 组都显著下降, 有统计学意义, 说明两种因素的综合作用使骨的结构硬度和结构韧性发生明显改变, 并且短期低钙饮食可严重破坏去卵巢大鼠的骨结构力学特性。各组间最大载荷、断裂载荷及相应的骨形变基本没有变化。

表 2 低钙饮食和(或)去卵巢对大鼠骨结构力学的影响

组别	最大载荷(N)	最大变形(mm)	断裂载荷(N)	断裂变形(mm)	结构硬度(N/mm)	能量吸收($\text{N} \cdot \text{mm}$)
C	162.0 \pm 6.1	0.63 \pm 0.04	148.4 \pm 3.6	0.70 \pm 0.05	506.9 \pm 27.6	80.3 \pm 6.2
SN	158.4 \pm 9.6	0.59 \pm 0.04	143.2 \pm 13.2	0.75 \pm 0.04	496.2 \pm 32.3	81.2 \pm 4.8
SL	155.2 \pm 11.2	0.58 \pm 0.03	138.9 \pm 13.9	0.77 \pm 0.06	454.8 \pm 32.1	79.5 \pm 7.8
ON	168.2 \pm 7.0	0.56 \pm 0.03	147.9 \pm 10.9	0.86 \pm 0.07	477.8 \pm 31.3	83.7 \pm 3.8
OL	145.2 \pm 6.3	0.56 \pm 0.05	139.3 \pm 7.9	0.74 \pm 0.06	407.3 \pm 30.3* [#]	66.4 \pm 6.4* [#]
双因素方差分析	P					
手术	0.9887	0.3627	0.8248	0.5477	0.3194	0.3956
饮食	0.1495	0.3620	0.5774	0.4282	0.0974	0.1357
交互作用	0.2737	0.3600	0.8492	0.3211	0.6563	0.2153

注: 与 SN 组比较 * $P < 0.05$; 与 ON 组比较[#] $P < 0.05$

2.3 骨材料力学

股骨中段材料力学测定结果如表 3 所示。双因素方差分析表明, 去卵巢和低钙饮食都可以显著影响股骨中段截面惯性矩, 但作用方向相反, 雌激素缺乏导致截面惯性矩增大, 而低钙饮食可减小截面惯性矩。同时, 去势还可引起股骨弹性模量及材料韧性下降, 表现在同正常组相比, ON 组和 OL 组的弹性模量、材料韧性显著性降低, 有统计学意义, 而 ON、OL 两组间不存在显著性差异。

2.4 近端股骨蛋白分析

近端股骨维生素 D 受体(VDR)蛋白表达情况如图 3 所示。低钙饮食可明显上调 VDR 表达, 而雌激素缺乏使 VDR 表达下降, 说明饮食钙缺乏和雌激素缺乏对近端股骨 VDR 表达有不同的调控作用。



图 3 维生素 D 受体(VDR)蛋白表达

表3 低钙饮食和(或)去卵巢对大鼠骨材料力学的影响

组别	截面惯性矩 (mm ⁴)	最大应力 (MPa)	最大应变 (%)	断裂应力 (MPa)	断裂应变 (%)	弹性模量 (GPa)	材料韧性 (N/mm)
C	5.86±0.46	167.4±4.4	4.90±0.46	153.2±7.6	6.09±0.43	6.81±0.52	7.16±0.37
SN	5.76±0.43	164.4±6.1	4.74±0.33	143.1±5.3	6.37±0.31	6.31±0.54	7.39±0.47
SL	5.43±0.37	164.9±7.0	4.85±0.27	149.4±10.4	6.43±0.50	5.91±0.26	7.72±0.69
ON	7.40±0.66 [*]	156.7±3.9	5.30±0.46	137.4±4.6	7.67±0.77	4.64±0.60 [*]	6.63±0.38
OL	5.67±0.30	151.5±5.7	5.30±0.42	145.2±7.5	6.26±0.60	5.09±0.37 [#]	6.33±0.60 [*]
双因素方差分析				<i>P</i>			
手术	0.0477	0.0801	0.2054	0.5217	0.3509	0.0123	0.0470
饮食	0.0320	0.6851	0.8897	0.3591	0.2618	0.9594	0.9825
交互作用	0.1356	0.6261	0.8789	0.9174	0.2242	0.3595	0.5960

注:与SN组比较,^{*}*P*<0.05;与C组比较[#]*P*<0.05

3 讨论

3.1 骨代谢生化指标是用于评估骨转换率有效的方法,常用来监测骨质疏松的发展进程^[5]。血清ALP有50%来源于骨,由成骨细胞分泌,可作为骨形成的生化指标;而脱氧吡啶交联DPD是在骨吸收发生时,胶原的分解产物,随尿液排出,用来反映骨吸收状况^[6]。本实验结果揭示去卵巢造成的骨质疏松大鼠其骨形成和骨吸收都明显增强,体内呈现出高骨转换状态,这正符合临床上所观察到的绝经妇女的高骨转换型骨质疏松症。

3.2 骨生物力学是以工程力学理论为基础,研究骨组织在外界作用下的力学特性和骨在受力后的生物学效应,是对骨质量进行评定的一种可靠方法。骨生物力学的研究大体上可从结构力学特性和材料力学特性两方面考察。结构力学指标总结如表2,其性能与骨的尺寸和几何形状有关;材料力学指标总结如表3,其性能反映骨的自身强度和韧性,与骨的微细结构,骨骼中矿物质含量和骨密度有关。股骨干由皮质骨构成,雌激素缺乏可导致成年后骨外膜成骨小于骨内膜破骨,股骨横截面积增加。按照力学原理,骨分布离中心越远,骨的整体强度越大,并且与距离的平方成正比,即股骨可随其皮质的净扩大而使其力学性能得到一定程度的代偿。本实验ON组大鼠去卵巢7周后,未能观察到结构力学指标有显著性改变,可能与此代偿效应有关。但随着骨质疏松的加重,这种代偿优势会消失,谢肇等^[7]研究表明,大鼠去卵巢18周后,股骨结构力学性能显著降低。

雌激素缺乏和饮食钙缺乏可分别增大和减少股骨干横截面惯性矩,这可能与两种单独因素对中轴骨和附体骨的质量分布的影响不同造成的。相对于雌激素缺乏引起的大鼠体重增加,雌激素缺乏会使

骨生长滞缓,而低钙饮食虽不会影响骨的正常生长,保持同正常组相同的骨质量,但是却显著影响骨内部结构的重新分布,主要是引起中轴骨质量向附体骨的转移^[8]。骨材料韧性表示引起骨材料断裂所需吸收的能量,受骨矿盐含量,胶原纤维走向等骨基质成分变化的影响。弹性模量反映骨质的内在硬度,与骨的尺寸大小无关。大鼠去卵巢后使材料韧性和弹性模量降低,说明只需要较少的能量即可破坏骨质,而且内在硬度下降,表明骨的材料特性受损,这与体内雌激素缺乏造成的骨微细结构的变化直接相关。

低钙饮食对下颌骨的骨密度和骨矿含量的影响不如去卵巢的影响显著^[9],同样,在本实验中观察到低钙饮食对股骨生物力学特性的影响也不如去卵巢的影响显著,可能与以下原因有关:①陈建波等^[10]的研究指出低钙饮食对雌性大鼠股骨生物力学性能的影响不如对雄性大鼠显著。②骨生物力学性能的改变可能与低钙饮食时间长短有关,部分学者实验结果表明大鼠低钙饮食一月之上会损害骨结构力学性能^[11,12]。然而,对去卵巢大鼠配以低钙饮食,会加重体内雌激素缺乏引起的骨结构力学和材料力学特性的下降,这同低钙饮食能加速去卵巢大鼠骨丢失,骨密度下降等先前研究结果表现出一致性^[12,13],Kalu等^[14]学者认为这是由于饮食钙缺乏会提高大鼠骨对体内雌激素水平下降的敏感性。

3.3 钙是人体矿物质中含量最多的宏量元素,是维护骨骼健康的重要营养素。小肠、肾脏、骨骼是体内调节钙代谢的三大主要部位,小肠主要负责钙的吸收,肾脏负责钙的排泄及重吸收,而体内钙总量的99%贮存于骨骼内,相当于贮钙池。先前对低钙饮食动物的研究,主要涉及到对小肠及肾脏维生素D依赖型基因及蛋白的表达,而关于低钙饮食对骨中相关基因及蛋白表达的研究甚少。本研究指出,低

钙饮食组大鼠近端股骨的维生素 D 受体 (VDR) 蛋白表达显著增加, 因而增强维生素 D 对骨矿物质代谢的双向调节作用, 即可以促进新骨钙化, 又可促进骨钙溶出, 以弥补饮食钙的不足, 使骨盐不断更新, 维持体内钙的平衡。

3.4 结语

体内雌激素水平下降及日常钙摄入量不足是导致绝经妇女骨质疏松的直接因素。本研究提示, 去卵巢大鼠在低钙饮食条件下, 其骨质破坏程度更加显著, 因此, 绝经期妇女必须注意改变不当的饮食习惯, 提倡多吃富含钙的食物, 并能通过食物或晒太阳保证足够的维生素 D, 经常运动, 才能有效地预防骨质疏松。

【参 考 文 献】

- [1] Robert P. Heaney. Calcium needs of the elderly to reduce fracture risk. *J Am Coll Nutr*, 2001, 20: 192-197.
- [2] Seto H, Aoki K, Kasugai S, et al. Trabecular bone turnover, bone marrow cell development, and gene expression of bone matrix proteins after low calcium feeding in rats. *Bone*, 1999, 25: 687-695.
- [3] Kasra M, Vanin CM, MacLusk NJ, et al. Effects of different estrogen and progestin regimens on the mechanical properties of rat femur. *J Orthopaed Res*, 1997, 15: 118-123.
- [4] 崔伟, 刘成林. 基础骨生物力学(二)动物骨生物力学指标的选择及计算方法. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4: 90-92.
- [5] Ann Prentice, Jean-Philippe Bonjour, Francesco Branca, et al.

PASSCLAM—Bone health and osteoporosis. *Eur J Nutr*, 2003, 42: 28-49.

- [6] 刘忠厚, 主编. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998, 216-219.
- [7] 谢肇, 李起鸿, 孟萍, 等. 仿生脉冲电磁场对去卵巢骨质疏松大鼠骨生物力学性能的影响. *中国康复理论与实践*, 2004, 10: 577-579.
- [8] Geng W, DeMoss DL, Wright GL. Effect of calcium stress on the skeleton mass of intact and ovariectomized rats. *Life Sci*, 2000, 66: 2309-2321.
- [9] Guizhen Jiang, Hiroko Matsumoto, Junichi Yamano, et al. Prevention of trabecular bone loss in the mandible of ovariectomized rats. *J Oral Sci*, 2004, 46: 75-85.
- [10] 陈建波, 李青南, 黄连方, 等. 低钙饮食对雌性大鼠股骨生物力学特性的影响. *医用生物力学*, 2003, 18: 46-49.
- [11] Yahara N, Tofani I, Maki K, et al. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskel Neuron Interact*, 2005, 5: 162-169.
- [12] Kaastad TS, Reikeras O, Madsen JE, et al. Effects of clodronate on cortical and trabecular bone in ovariectomized rats on a low calcium diet. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61: 158-164.
- [13] Kalu DN, Orhii PB. Calcium absorption and bone loss in ovariectomized rats fed varying levels of dietary calcium. *Calcif Tissue Int*, 1999, 65: 73-77.
- [14] Kasugai Y, Ikegami A, Matsuo K, et al. Effects of Tibolone (Org OD14) treatment for 3 months on ovariectomy-induced osteopenia in 8-month-old rats on a low-calcium diet; Preventive testing for 3 months. *Bone*, 1998, 22: 119-124.

(收稿日期: 2005-09-19)

(上接第 235 页)

关节镜下半月板切除术对膝关节周围骨密度的影响尚待研究。

【参 考 文 献】

- [1] Allen PR, Denham RA, Swan AV. Late degenerative changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1981, 66: 666-671.
- [2] Neyret P, Donell ST, Dejour H. Results of partial meniscectomy related to the state of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1993, 75: 36-40.
- [3] Rockbom P, Messner K. Long-term results of meniscus repair and meniscectomy: a 13-years functional and radiographic follow-up study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2000, 8: 2-9.
- [4] Dai LY, Zhang WL, Xu YK. Meniscal injury in children: long-term results after meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthroscopy*, 1997, 5: 77-79.
- [5] Petersen MM, Olsen C, Lauritzen JB, et al. Late changes in bone mineral density of the proximal tibia following total or partial medial meniscectomy: A randomized study. *J Orthop Res*, 1996, 14: 16-21.

- [6] Kavanagh BF, Dewitz MA, Istrup DM, et al. Charnley total hip arthroplasty with cement fifteen-year results. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1989, 71(10): 1496-1503.
- [7] McCarthy CK, Steinberg GG, Agren M, et al. Quantifying bone loss from the proximal femur after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1991, 73(5): 774-778.
- [8] Baratz ME, Fu FH, Mengato R. Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee; a preliminary report. *Am J Sports Med*, 1986, 14: 270-275.
- [9] Boume RB, Finlay JB, Papadopoulos P, et al. The effect of medial meniscectomy on strain distribution in the proximal part of the tibia. *J Bone Joint Surg [Am]*, 1984, 66: 1431-1437.
- [10] Johnson F, Leil S, Waugh W. The distribution of load across the knee: a comparison of static and dynamic measurements. *J Bone Joint Surg [Br]*, 1980, 62: 346-349.
- [11] Margulies JY, Simkin A, Leichter I, et al. Effect of intense physical activity on the bone-mineral content in the lower limbs of young adults. *J Bone Joint Surg [Am]*, 1986, 68: 1090-1093.

(收稿日期: 2005-07-19)