

大鼠骨关节炎三种动物模型的建立及比较

王 婧¹ 张忠辉¹ 孙娇梦¹ 许传营² 俞 雁² 韩 伟^{1*}

(¹上海交通大学药学院再生组学实验室, 上海 200240;

²上海交通大学农业与生物学院兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘要 为探讨三种骨关节炎动物模型的建立方法、效果及其适用条件, 采用 Hulth 手术、碘乙酸关节腔注射、前交叉韧带切除处理, 对 SD 大鼠造骨关节炎模型, 并在适当时间, 取两侧膝关节进行切片, 比较各组骨关节大体形态及病理变化。实验结果表明, Hulth 模型组及碘乙酸模型组 6 周即可造模成功, 损伤程度较严重, 类似骨关节炎中晚期; 前交叉韧带切除模型组造模需 8 周以上, 病情类似骨关节炎早期或中期, 更适合用作发病机制、药物治疗方面的研究。

关键词 骨性关节炎; 动物模型; Hulth 模型; 碘乙酸; 前交叉韧带切除

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是由于关节软骨退变和关节表面边缘形成新骨的慢性退行性病变, 表现为骨赘的形成、软骨下骨增厚、滑膜肥厚、软骨腐蚀、关节腔变窄等特点。该病在中年以后多发, 发病率随年龄增长而增加, 60 岁以上则可达到 50%, 在 75 岁以上人群中, 80% 患有骨关节炎。该病的最终致残率为 53%, 是导致人群功能残疾, 造成经济损失和影响社会发展的主要疾病之一^[1-3], 在临床实践中尚无满意的治疗方法。目前, 尚没有一种能和临床相结合的骨关节炎模型, 这使骨关节炎关节软骨修复的研究受到很大限制。因此, 建立适合于临床的骨关节炎动物模型是对其发病机制、预防及治疗进行研究的必要手段。

目前骨关节炎动物模型主要有以下三种: ①关节内手术途径诱发骨关节炎; ②关节内注射药物诱发骨关节炎; ③自发型骨关节炎模型。本实验通过比较 Hulth 模型、碘乙酸注射模型和单纯切断前交叉韧带 3 种建模方式, 探讨其建立方法及其适用条件。

1 材料与方法

1.1 实验设计

实验动物采用 8 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重在 280~300 g, 无膝关节病变。随机分组, 组一: 12 只, 手术法切断前交叉韧带并切除内侧半月板; 组二: 12 只, 关节腔注射碘乙酸; 组三: 12 只, 单纯切断前交叉韧带。组四: 12 只, 无任何处理, 作为对照组。于术后各时间点窒息处死大鼠, 手术取出膝关节, 观察形态, 进行常规组织石蜡切片, 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 显微镜下观察软骨组织学特征。采用甲苯胺蓝(toluidine blue)进行染色, 观

察软骨基质损伤情况, 并对切片进行评分。

1.2 实验处理

1.2.1 Hulth 法 实验大鼠术前 12 h 禁食, 手术开始前称重。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg), 待其麻醉后, 仰卧位固定。无菌条件下取膝关节内侧纵切口长约 2 cm, 暴露膝关节, 然后切断前后交叉韧带及内侧副韧带, 完整切除内侧半月板, 注意勿损伤关节软骨面, 逐层缝合关闭伤口。术后每天每只大鼠注射丁胺卡纳霉素(规格为 100 000 U/ml, 注射浓度为 10 mg/kg), 连续注射 4 天, 不固定伤肢, 笼内自由活动。术后分别于 1、2、4、6 周处死大鼠, 取出膝关节进行常规组织切片、HE 及甲苯胺蓝染色, 显微镜下观察软骨组织学特征。

1.2.2 碘乙酸注射法 实验大鼠术前 12 h 禁食, 手术开始前称重。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg), 待其麻醉后, 仰卧位固定。膝关节腔内注射 100 μ l 碘乙酸溶液(1 g/L)^[4]。置于笼内自由活动, 膝关节不固定。术后分别于 1、2、4、6 周处死大鼠, 取出关节软骨组织进行常规组织石蜡切片、HE 及 Toluidine blue 染色, 显微镜下观察软骨组织学特征。

1.2.3 前交叉韧带切除法 实验大鼠术前 12 h 禁食, 手术开始前称重。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg), 待其麻醉后, 仰卧位固定, 两侧膝关节备皮。手术范围常规消毒, 无菌条件下, 膝前正中切口切开皮肤皮下组织, 找到白色的髌腱, 沿其内侧切开关节囊, 过伸膝关节致使髌骨外侧脱位(通常都是往膝部的外侧方向脱位)。屈曲膝关节, 找到前交叉韧带, 用

收稿日期: 2009-10-13 接受日期: 2010-03-11

* 通讯作者: Tel: 021-34204750, E-mail: weihan@stju.edu.cn

眼科剪剪断。伸直膝关节, 复位髌骨, 逐层缝合关闭伤口。前抽屉试验检验手术结果, 术后每天每只大鼠注射丁胺卡纳霉素(规格为 100 000U/ml, 注射浓度为 10 mg/kg)连续注射 4 天, 以防止伤口部位感染。实验大鼠放养于鼠笼内, 让其自由活动, 膝关节不固定。术后分别于 4、8 周处死大鼠, 取出关节软骨组织进行常规组织石蜡切片、HE 及甲苯胺蓝染色。显微镜镜下观察软骨组织学特征。

1.3 OA 评分及分级

参考 Mankin 法^[9]中的结构、细胞以及潮线的完整性标准, 对第 6 周的动物进行 OA 评分。

1.4 统计分析

评分结果用 SPSS 10.10 统计软件进行方差分析, 两两比较采用 q 检验, 显著性差异为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 膝关节形态观察

术后动物精神状态和进食良好, 自麻醉状态清醒后, 立刻可以自由活动。膝关节伤口处于干燥无感染, 愈合良好; 术后第 2 天, MIA 组关节腔出现瘤状肿胀, 5 天后逐渐消除; 术后 3 至 5 天 Hulth 模型组双膝梭型肿胀较明显, 关节腔积液, 双后肢力量减少, 活动频次减少, 1 周后逐渐好转, 膝关节不稳, 有异常活动度, 4 周后膝关节畸形肿大, 有异常骨性突起。对照组双膝无肿胀, 无关节腔积液, 无异常骨性突起。

2.2 组织形态学表现观察

2.2.1 空白对照组膝关节软骨 空白对照组软骨外观光滑, 色泽较亮, 软骨透明度较高, 边缘规整, 表面无充血, 未见明显软骨缺损。

2.2.2 实验组膝关节软骨 (1) Hulth 模型组: 术后 1 周, 软骨未见异常改变。术后 2 周, 膝关节内髌软骨失去原有光泽, 变暗淡, 部分区域出现轻度充血; 术后 4 周, 膝关节软骨表面色泽灰暗, 不平整, 质地变软, 厚度变薄; 术后 6 周, 关节软骨表面充血、有小裂缝, 股骨内侧髌出现大面积软骨缺损区, 均有骨赘生成。(2) 碘乙酸模型组: 术后 2 周, 关节囊肿大, 软骨表面稍暗淡; 第 4 周关节软骨发黄, 关节内髌出现小裂缝; 到第 6 周左右可以摸到明显的骨刺并韧带粘连。(3) 前交叉韧带切除组: 术后 2 周, 关节囊粘连, 软骨面缺少光泽; 第 4 周软骨表面不光滑, 软骨发黄, 色泽变暗; 第 6 周软骨发黄, 色泽变暗, 有小裂隙, 尤以股骨内侧为著; 第 14 周软骨结构破坏较严重, 股骨内外髌明显增生。

2.3 组织切片光镜观察结果

2.3.1 空白对照组膝关节软骨 从图 1A 和图 1B

中可以明显看到, 对照组软骨组织可大致分为四层, 为表层、移行层、柱状层和钙化层。表层细胞为梭形, 排列与关节软骨表面平行; 移行层细胞呈圆形, 细胞体积较表层略大, 排列无规律; 柱状层细胞较大, 排列成柱状, 与关节表面; 垂直钙化层细胞体积最大, 排列无规律, 软骨基质内有钙质沉着。

2.3.2 实验组膝关节软骨 (1) Hulth 模型组: 术后 1 周, 软骨组织学表现接近正常, 各层细胞排列有规律性, 偶见少量细胞簇集现象(图 1C 和图 1D)。术后 2 周, 软骨组织学表现为轻度软骨损伤, 软骨基质染色不均匀。软骨细胞排列紊乱, 细胞簇集较 1 周时明显, 潮线完整(图 1E 和图 1F)。术后 4 周, 软骨退变, 表层凹凸不平, 细胞簇集现象更加明显, 个别出现软骨细胞增生, 且有核碎、核溶现象, 潮线基本完整(图 1G 和图 1H)。术后 6 周, 以重度软骨损伤为主, 软骨表层出现较大缺损区, 软骨细胞层分离, 潮线消失, 软骨下骨及骨小梁有断裂现象, 钙化层难以分辨(图 1I 和图 1J)。(2) 碘乙酸模型组: 术后 1 周, 细胞成簇排列, 甲苯胺蓝染色较深(图 2C 和图 2D)。术后 2 周, 细胞体积小, 表层细胞较小呈椭圆形, 中层细胞呈不规则的柱状, 深层细胞则呈团状位于软骨囊内(图 2E 和图 2F)。术后 4 周, 软骨出现明显损伤, 表面大部分区域失染严重(图 2G 和图 2H)。术后 6 周, 关节软骨层腐蚀殆尽, 表面仅残存稀少的软骨细胞, 且细胞肥大呈空泡状, 软骨下骨裸露(图 2I 和图 2J)。(3) 前交叉韧带切除组: 术后 2 周, 软骨层开始变薄, 胫股骨边缘开始出现空腔, 软骨细胞有部分出现簇聚, 较大体积的软骨细胞有向软骨表面移行的趋向(图 3C 和图 3D)。术后 4 周, 软骨层继续变薄, 软骨细胞开始成簇分布, 细胞逐渐减少, 排列较混乱(图 3E 和图 3F)。术后 6 周, 出现严重的软骨缺损, 基质缺失, 导致软骨专一性染料无法着色, 大部分区域失染并伴有软骨细胞坏死。软骨下骨开始硬化(图 3G 和图 3H)。术后 14 周, 软骨细胞增大, 细胞缺损, 死亡已达 50% 以上(图 3I 和图 3J)。

2.4 评分结果及统计分析

依 Mankin 法^[9]中的按照结构、细胞排列方式, 基质着色效果, 潮线的完整性以及软骨表面损伤, 对模型组和空白对照组术后 6 周的动物进行评分, 所得结果如表 1 及图 4 所示。表 1 中括号外是平均值, 括号内是 SD 值。评分结果用 SPSS 10.1 统计软件进行方差分析, 两两比较采用 q 检验, 显著性差异均为 $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨关节炎动物模型种类繁多, 从其产生的原因来看, 可分为两大类: (1) 诱发性或实验性模型, 即通过

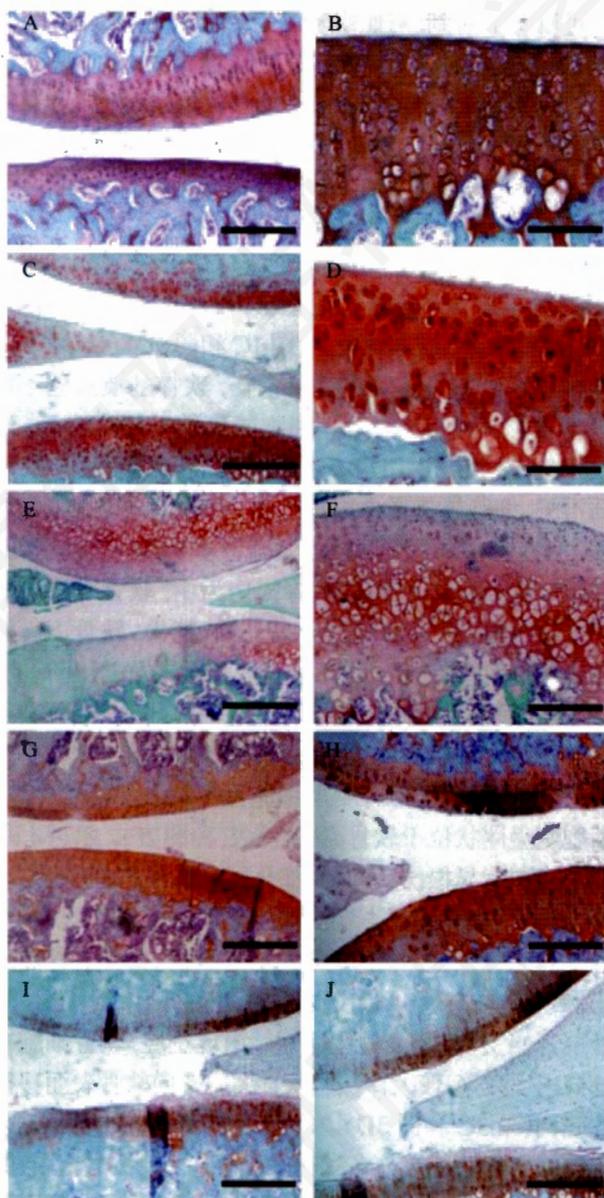


Fig.1 Microscopic appearance of OA sections of articular cartilage defects of Hulth-induced group in mature rats (Safranin-O & fast-green staining)

A, B: sham group; C, D, E, F, G, H, I, J: the sections of Hulth group after 1 (C, D), 2 (E, F), 4 (G, H), 6 (I, J) weeks of post-surgery, respectively. Bar (left panel) = 500 μm , bar (right panel) = 200 μm .

各种操作如制动、手术、关节内注药、关节内植入异物等诱导 OA 产生; (2) 自发性模型, 即实验动物未经过任何人工处置, 在自然情况下所发生的, 或者由于基因突变的异常表现通过遗传育种保留下来的 OA 动物模型, 如 C57 小鼠等^[6]。虽然以上模型诱发机制各不相同, 但共同之处就是都出现软骨的退行性病变并继发骨质改变。尽管大鼠的关节几何形状与人类稍有不同且软骨不含硫酸角质素, 但由于成本

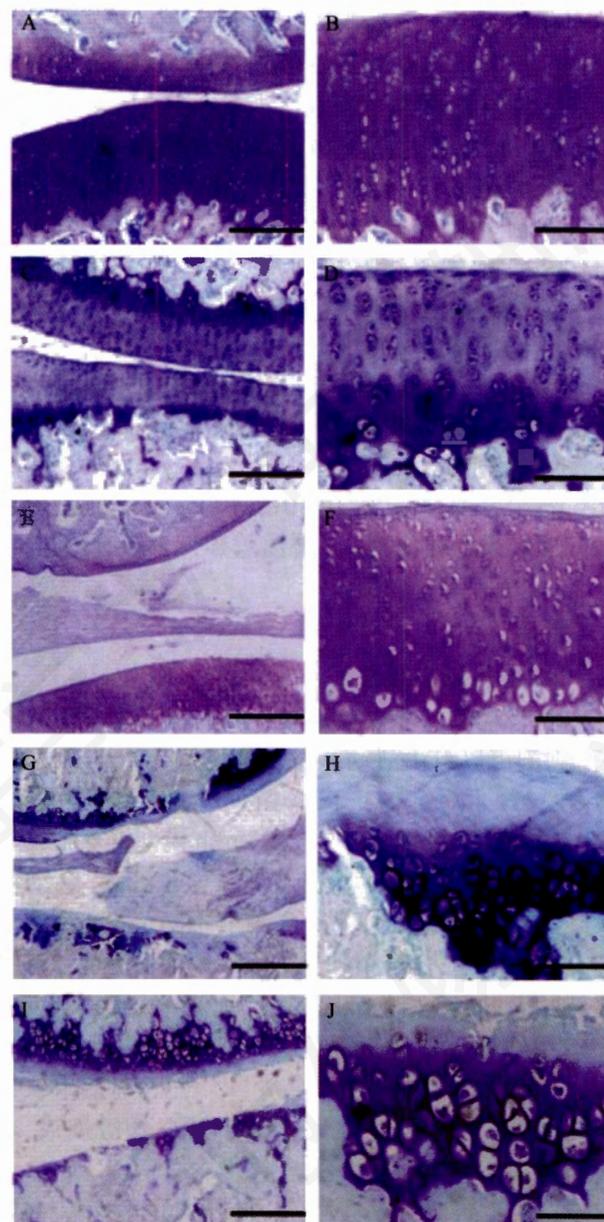


Fig.2 Microscopic appearance of OA sections of articular cartilage defects of mono-iodoacetate-induced group in mature rats (Toluidine blue staining)

A, B: sham group; C, D, E, F, G, H, I, J: the sections of mono-iodoacetate-induced group after 1 (C, D), 2 (E, F), 4 (G, H), 6 (I, J) weeks of post-surgery, respectively. Bar (left panel) = 500 μm , bar (right panel) = 100 μm .

低、造模方便、基因组研究成熟等原因称为骨关节炎造模首选动物。

根据不同的方法所建立的 OA 模型, 对后期实验的影响及后继治疗方法的选择不尽一致, 故在选择动物模型时, 应考虑到 OA 模型的特点、不同方法的造模机制、动物的种属及研究目的等。本实验比较了三种骨关节炎造模方法, 三者有特点各不相同。

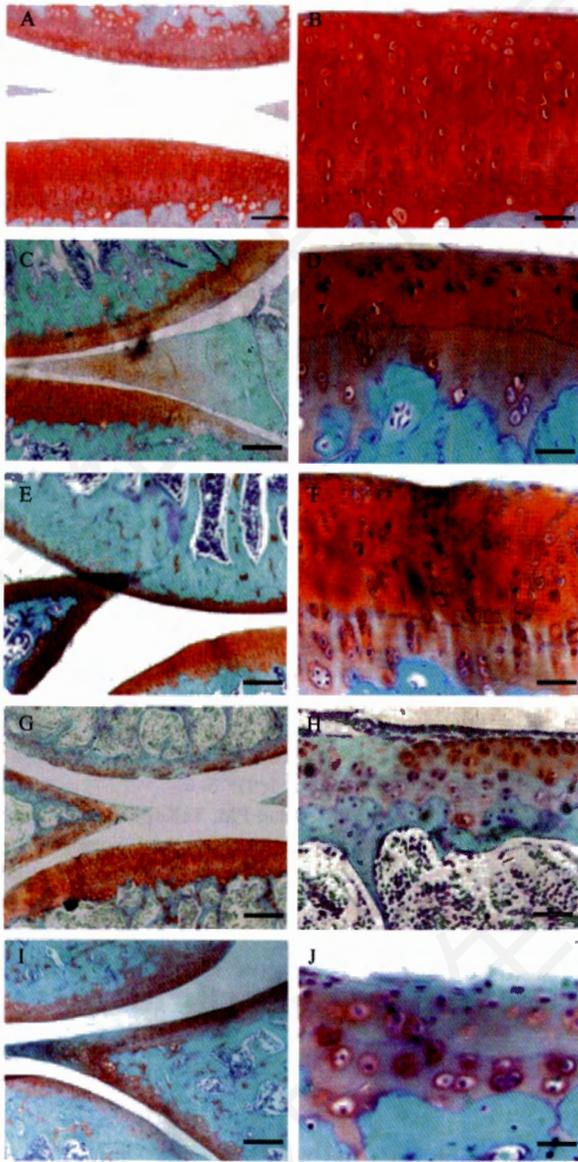


Fig.3 Microscopic appearance of OA sections of articular cartilage defects of ACLT-induced group in mature rats (Safranin-O & Fast-green staining)

A, B: sham group; C, D, E, F, G, H, I, J: the sections of ACLT group after 2 (C, D), 4 (E, F), 6 (G, H), 14 (I, J) weeks of post-surgery, respectively. Bar (left panel) = 500 μ m, bar (right panel) = 100 μ m.

半月板是膝关节的缓冲装置, 是位于股骨和胫骨的髌部之间的半月形纤维软骨盘。其作用在于承重,

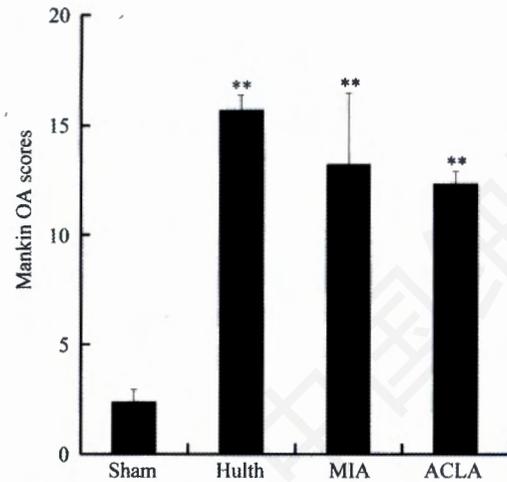


Fig.4 Total scores of the histological grading of Sham and OA groups in mature rats (P <0.01 vs Sham group)**

并使压力分布均匀, 增加关节稳定性, 润滑作用并且通过滑液的表面扩散, 有助于关节软组织的营养, 并且具有保护关节软骨的作用^[7]。半月板全切后会导致关节的不合槽运动, 由于动物膝关节的正常力学轴线遭破坏, 关节最大压力承受面由正常的外侧胫骨平台转至内侧胫骨平台与股骨内髌, 加之韧带的破坏引起关节不稳定, 局部关节软骨所承受的压力相对增加, 从而促使关节软骨发生变性^[8]。Hulth 法模型主要操作即完整切除内侧半月板, 减断前后交叉韧带及内侧副韧带。Hulth 法模型诱导成功率高, 稳定性好, 应用广泛, 特别适用于膝关节内注药预防和减轻软骨病理改变的研究^[9]。但由于此类模型经关节通路制作, 属于关节内手术, 手术创伤及炎症易影响模型成模早期软骨、滑膜的生化代谢。

将糖酵解抑制剂单体碘乙酸注入 SD 大白鼠膝关节, 在注射后 1 周内即可发现以软骨细胞区域性变性和坏死为特征的组织学改变, 在胫骨平台和股骨髌处还可出现软骨的全层性改变。单体碘乙酸抑制软骨细胞代谢, 引起软骨细胞死亡, 进而导致软骨基质降解。碘乙酸模型所引起的软骨基质降解迅速, 造模时间短, 关节注射创伤性小, 但模型病理病程和临床创伤性骨关节炎差距较大。

Table 1 The histological evaluation of Sham and OA groups by Mankin's methods

Group \bar{x} (SD)	Structure	Cellularity	Matrix staining	Tidemark integrity	Major cartilage defect (articulating surface)			Number of other defects
					Length	Width	Depth	
Sham	0.00 (0.00)	0.67 (0.58)	0.67 (0.58)	0.33 (0.58)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	1.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Hulth	3.00 (1.15)	3.00 (0.58)	2.67 (0.33)	2.00 (0.00)	1.67 (0.33)	1.67 (0.33)	2.33 (0.67)	0.67 (0.33)
MIA	1.67 (0.33)	2.5 (1.29)	2.25 (0.50)	1.50 (0.58)	1.00 (0.00)	1.00 (0.00)	1.00 (0.00)	0.50 (0.58)
ACLT	1.67 (0.58)	2.33 (1.53)	2.33 (0.58)	3.00 (0.00)	1.00 (0.00)	0.33 (0.58)	1.33 (0.58)	0.33 (0.57)

前交叉韧带对维持膝关节的稳定至关重要,主要的力学稳定功能包括限制胫骨过度前移和旋转、限制膝关节过伸和伸膝位的侧向活动,前交叉韧带断裂后,可使关节软骨压力传导紊乱,并最终导致关节软骨退行性改变^[7]。前交叉韧带切除模型手术简单创伤小,稳定性好,对动物生理结构改变较少,同时前交叉韧带切除诱发的软骨生化改变,能较好模拟人类外伤性诱发骨关节炎中产生的病理病程变化,这一模型广泛用于鉴别创伤性OA病程进展期间出现的软骨代谢障碍和组成成分的紊乱,同时为筛选抗骨关节炎药物提供了一种评价方法,但该法造模时间长,一般需6周以上才能造模成功。

从本次实验结果看,Hulth模型组软骨破坏较严重,类似骨关节炎中晚期,适合外科手术如关节软骨修补、关节置换手术方面试验研究^[10];化学药物注射模型所引起的软骨基质分解代谢强烈,其病程及组织病理学变化与关节不稳定所导致骨关节炎差异较大,与临床创伤性骨关节炎相差甚远。韧带切除模型组软骨破坏相对较轻,类似骨关节炎早中期,适合骨性关节炎发病机制、药物治疗方面试验研究^[11]。因此,实验室下一步药效学实验的动物模型将选用前交叉韧带切除造模法8周造模。

参考文献(References)

- 1 Sun BH, Wu CW, Kalunian KC. New developments in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 2007; 33(1): 135-48.
- 2 Holserbaum D, Yaqui TM. Genetics and osteoarthritis: Exposing the iceberg. *Arthritis Rheum*, 1999; 42(11): 397-405.
- 3 Bellamy N, Campbell J, Robinson V. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 18(2): 5328.
- 4 Guingamp C, Gegout Pottier P, Philippe L. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1670-9.
- 5 Salo PT, Hogervorst T, Seerattan RA. Selective joint denervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat. *J Orthop Res* 2002; 20(6): 1256-64.
- 6 朱彤,刘勇章,胡小鹏.家兔膝关节骨关节炎动物模型的建立. *医学临床研究* 2006; 23(8): 1188-90.
- 7 Pennock AT, Robertson CM, Emmerson BC. Role of a proinflammatory and matrix degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(5): 1529-36.
- 8 翟吉良,翁习生,邱贵兴.骨关节炎动物模型的建立及选择. *中国矫形外科杂志* 2007; 15(11): 843-5.
- 9 谢希,高洁生.骨关节炎动物模型研究进展. *医学综述* 2005; 11(1): 67-9.
- 10 胡阿威,张磊,张功礼.改良Hulth法骨关节炎动物模型的建立. *临床论坛*. 2003; 3(9): 5-6.
- 11 Marijnissen AC, van Roermund PM, TeKoppele JM, Bijlsma JW, Lafeber FP. The canine 'groove' model, compared with the ACLT model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(2): 145-55.

Establishment and Comparison of Three Types of Osteoarthritis in Mature Rats

Jing Wang¹, Zhong-Hui Zhang¹, Jiao-Meng Sun¹, Chuan-Ying Xu², Yan Yu², Wei Han^{1*}

¹Laboratory of Regeneromics, School of Pharmacy Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

²Shanghai Municipality Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract The aim of this study was to establish three types of osteoarthritis animal model in Sprague-Dawley mature rats, and determine the effects and applications of three types of osteoarthritis animal models. Rats were randomly divided into Hulth model group, Mono-iodoacetate-induced group, anterior ligament resection model group and sham group. After several weeks of post-surgery, articular cartilages were dissected, embedded in paraffin, sectioned, and performed histological evaluation. The results showed that Hulth model and mono-iodoacetate-induced groups were successfully carried out, and osteoarthritis morphology and symptoms were observed at 6 weeks after surgery, which was similar to the advanced stage of osteoarthritis. Osteoarthritis symptoms were also found at more than 8 weeks after surgery in the anterior ligament resection model group, which was similar to the early or mid-stage of osteoarthritis. In conclusion, anterior ligament resection model was more suitable to investigate the development and pathogenesis of osteoarthritis and potential drug candidates research.

Key words osteoarthritis; animal model; Hulth model; mono-iodoacetate; anterior ligament resection