

·基础研究·

本文引用: 王宝娟, 郑曙光, 周玉平, 刘 杨. 探讨不同浓度碘乙酸钠对家兔早期膝关节骨性关节炎模型的诱导及病理改变[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(3): 316-319.

探讨不同浓度碘乙酸钠对家兔早期膝关节骨性关节炎模型的诱导及病理改变

王宝娟¹, 郑曙光^{1*}, 周玉平², 刘 杨¹

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 华北理工大学, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的** 探讨不同浓度碘乙酸钠对家兔早期膝骨性关节炎(osteoarthritis, OA)模型的诱导及病理改变, 确定建立 OA 模型的最小有效药物浓度。**方法** 将 36 只新西兰大白兔随机分为正常(A)组、模型(B~F)组, 共 6 组, 每组 6 只。A 组左膝关节腔注射 0.2 mL 无菌生理盐水; B~E 组左膝关节腔按照 2.5、5、7.5、10 mg/kg 剂量各注射 0.2 mL 的碘乙酸钠溶液, F 组注射剂量与 E 组相同, 同时以 30 min/d 分 2 次驱赶运动为干预因素。建模 14 d 后, 采用 HE 染色及骨性关节炎组织病理学评分(Mankin 评分)观察各组软骨的病理改变。**结果** Mankin 评分与 A 组相比, B、C 组差异无统计学意义($P>0.05$), D、E、F 组差异有统计学意义($P<0.05$); 与 E 组比较, F 组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 模型 D 组药物浓度 7.5 mg/kg 为建立 OA 模型的最小有效药物剂量, 且模型建立方法操作简单、创伤小, 能够保证膝关节稳定性及实验动物的成活率。

[关键词] 骨性关节炎; 膝关节; 软骨细胞; 动物模型

[中图分类号] R965.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.03.007

Induction of Early Knee Osteoarthritis Model in Rabbits with Different Concentrations of Sodium Iodoacetate and Its Pathological Changes

WANG Baojuan¹, ZHENG Shuguang^{1*}, ZHOU Yuping², LIU Yang¹

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the induction of early knee osteoarthritis (OA) model in rabbits with different concentrations of sodium iodoacetate and its pathological changes, and to identify the minimum effective drug concentration for establishing an OA model. **Methods** Thirty-six New Zealand white rabbits were randomly divided into one normal group (group A) and five model groups (groups B-F), with 6 rabbits in each group. Group A was injected with 0.2 ml sterile saline into the left knee joint cavity. Groups B-E were injected with 0.2 ml sodium iodoacetate solution into the left knee joint cavity at doses of 2.5, 5, 7.5, and 10 mg/kg, respectively. Group F did driving movement (30 min/d, twice daily) as the intervention factor in addition to the treatment for group E. The pathological changes of cartilage in each group were evaluated by HE staining and the histopathological score of OA (Mankin score). **Results** There were no significant differences in Mankin score between group A and groups B and C ($P>0.05$), but there were significant differences in Mankin score between group A and groups D, E, and F ($P<0.05$). There was no significant difference in Mankin score between group F and group E ($P>0.05$). **Conclusion** The drug concentration (10 mg/kg) in group D was the minimum effective dose for establishing OA model. The method of establishing OA model is simple and minimally invasive, which can ensure the stability of knee joint and the survival rate of experimental animals.

[Keywords] osteoarthritis; knee joint; chondrocyte; animal model

[收稿日期] 2018-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82660823)。

[作者简介] 王宝娟, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医基础理论与民族医药。

[通讯作者] * 郑曙光, 男, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: 332126632@qq.com。

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)为一种退行性病变,系由于年龄的增长、肥胖、劳损、创伤、关节先天性异常、关节畸形等诸多因素引起的关节软骨退化损伤、关节边缘和软骨下骨反应性增生,又名骨关节炎、退行性关节炎、老年性关节炎肥大性关节炎等,临床表现为缓慢发展的关节疼痛、压痛、僵硬、关节肿胀、活动受限和关节畸形等^[1]。近年来骨性关节炎的发病率逐渐上升,严重影响患者的生活质量和生活水平。近年来研究人员在致力于治疗骨性关节炎的基础上,建立OA模型的方法并展开相应的研究,实验多使用啮齿目动物^[2](大鼠、小鼠、豚鼠)、马、羊、犬、猪、新西兰大白兔等,因兔性情温顺,体型适中,行走时下肢负重,接近于人类的下肢负重情况,所以是最常用的动物模型。现阶段建立OA的动物模型的方法也是多种多样,例如机械制动法、关节腔注射药物、手术方法等^[3],本实验摸索不同剂量碘乙酸钠行家兔膝关节腔内注射诱导建立OA模型的可行性,为OA模型建立提供更简便和成功率高的方法。

1 材料与方 法

1.1 动物及分组

健康成年新西兰大白兔36只,雌雄各半,体重(2.0±0.3)kg,复合饲料喂养。实验动物由贵阳中医学院动物所提供,许可证号:SYXK(渝)2017-0006。将36只新西兰大白兔随机分为6组,每组6只:正常(A)组,模型(B~E)组(分别按照2.5、5、7.5、10 mg/kg给予不同浓度的碘乙酸钠0.2 mL)、模型(F)组(碘乙酸钠10 mg/kg+运动)。

1.2 试剂

碘乙酸钠(艾科生物试剂有限公司,产品批号:115058),HE染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司;产品批号:G1120),EDTA脱钙液(北京索莱宝生物科技有限公司,产品批号:E1171)。

1.3 仪器

RM2245石蜡切片机(德国莱卡),KD-BM包埋机(浙江金华科迪有限公司),XSZ-HS3显微镜(重庆光学仪器厂),常规手术器械、1 mL注射器。

1.4 造模方法

用生理盐水溶解碘乙酸钠,配制成实验所需不同浓度的碘乙酸钠溶液。将家兔在无菌条件下,20%乌拉坦(4 mL/kg)麻醉,仰卧位固定于解剖台上,微屈家兔左膝关节,剪掉关节周围绒毛,消毒,以1 mL注射器由髌骨内侧下方斜上刺入关节腔,进针后出

现落空感为成功刺入关节腔。A组左膝关节腔注射0.2 mL无菌生理盐水;B-E组左膝关节腔按照2.5、5、7.5、10 mg/kg剂量各注射0.2 mL的碘乙酸钠溶液,F组注射剂量与E组相同,同时以30 min/d分2次驱赶运动为干预因素,连续驱赶干预14 d。建模14 d后兔耳缘静脉注射空气致栓塞方法处死。

1.5 主要观察指标

1.5.1 外观形态 兔处死后在左膝关节前正中切开皮肤,肉眼观察不同组关节滑膜形态及厚度、关节腔积液;观察关节软骨形态。

1.5.2 HE染色观察软骨病理改变 用骨刀将膝关节离断,浸入10%甲醛溶液固定,脱钙48 h直至骨质变软,取软骨及软骨下骨,修剪成0.5 cm×0.8 cm大小,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡包埋切片,分别用苏木素-伊红染色。常规脱蜡至水、蒸馏水冲洗5 min×3次、苏木素染色10 min、自来水冲洗5 min×2次、95%的乙醇5 s、伊红染色1 min、70%乙醇4 min、95%乙醇5 min、二甲苯I、二甲苯II各5 min、滴加中性树胶封片。每张切片选择3个不同视野,并参照Mankin关节软骨病理评分标准^[4-5]进行积分统计,见表1。

表1 骨性关节炎组织病理学分级 Mankin 评分(总分14分)

| 分级 | 观察指标 | 评分 |
|------|-----------|----|
| 结构 | 正常 | 0 |
| | 表面不规则 | 1 |
| | 血管翳和表面不规则 | 2 |
| | 到过渡带的裂隙 | 3 |
| | 到放射带的裂隙 | 4 |
| | 到钙化带的裂隙 | 5 |
| 细胞 | 软骨圈层破坏 | 6 |
| | 正常 | 0 |
| | 弥漫性细胞过少 | 1 |
| | 局部细胞增多 | 2 |
| | 细胞过少 | 3 |
| | 基质染色 | 正常 |
| 轻度减少 | | 1 |
| 中度减少 | | 2 |
| 重度减少 | | 3 |
| 未着色 | | 4 |
| 潮线 | | 完整 |
| | 被血管破坏 | 1 |

1.6 统计学分析

用SPSS 16.0软件进行统计学处理,所有数据均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

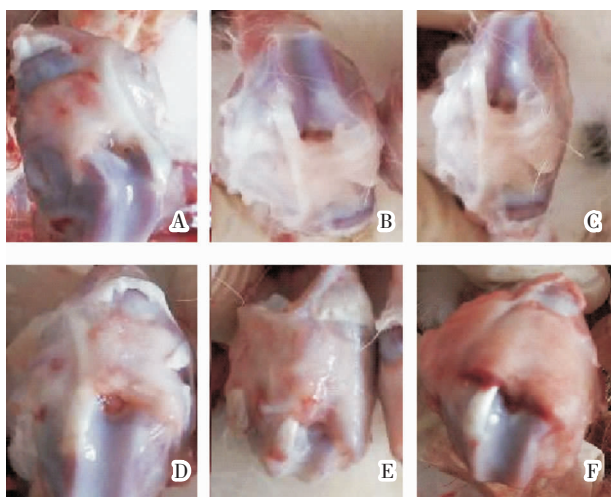
2 结果

2.1 外观观察

A组膝关节无红肿,屈伸功能正常;B、C组膝关节无明显红肿及屈伸功能障碍;D、E、F组可见左侧膝关节明显红肿现象及屈伸障碍,但E、F组程度更重。

2.2 滑膜形态观察

A组滑膜无增厚现象,滑膜光泽明亮,少量淡黄色关节液,见图1A;B、C组关节液无明显增多,滑膜无明显充血增生,见图1B及图1C;D组滑膜轻度充血增生,关节液少许增多,见图1D;E、F组可见关节液明显减少,滑膜增生明显,见图1E及图1F。



注:A.A组;B.B组;C.C组;D.D组;E.E组;F.F组

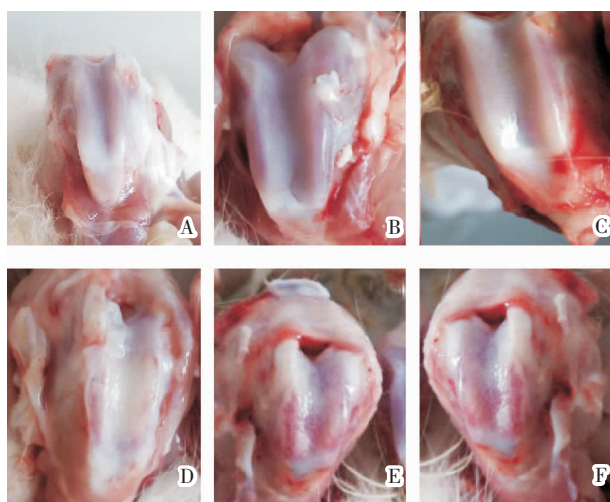
图1 兔膝关节滑膜形态观察图

2.3 关节软骨形态观察

A组关节软骨呈半透明浅白蓝色,表面光滑平整,无变形,无裂纹,无摩擦感,关节边缘整齐,见图2A;B、C组关节软骨表面无明显变化,关节边缘依旧完整,见图2B及图2C;D组关节软骨呈淡黄色,表面轻度凹凸不平,稍有粗糙感,见图2D;E组可见关节软骨呈灰黄色,失去原有光泽,表面粗糙,血管翳形成,见图2E;F组可见关节软骨表面粗糙,破坏严重,损伤较重,见图2F。

2.4 关节软骨光镜下观察

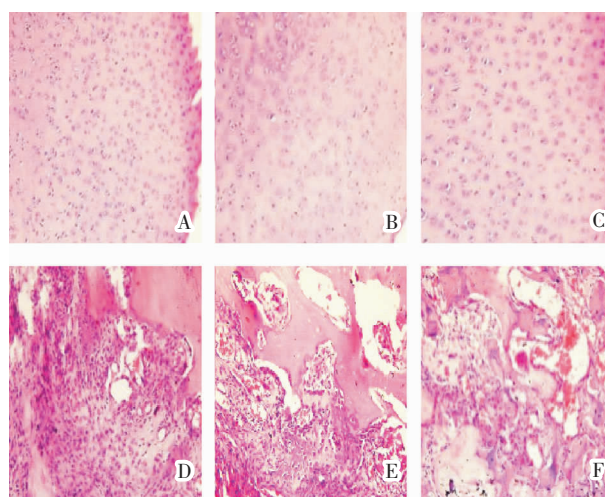
A组HE染色显示关节软骨结构正常,关节面光滑完整,细胞分布均匀,层次清楚,基质染色正常且均匀,潮线完整;见图3A;B、C组关节软骨细胞形态及结构未见明显改变,细胞核仍为圆形或椭圆形,



注:A.A组;B.B组;C.C组;D.D组;E.E组;F.F组

图2 兔膝关节软骨形态图

见图3B及图3C;D组可见软骨表层不完整,骨组织结构紊乱,可见簇集的软骨细胞,基质染色轻染,细胞数量增多,以中性粒细胞为主,可见明显的炎症细胞浸润,见图3D;E组可见软骨损伤程度严重,软骨层及软骨下组织出现明显的变性和崩解坏死,细胞数量增多且簇集分布严重,且较多为炎症细胞浸润,潮线完全消失,可见明显的溶骨现象,见图3E;F组可见细胞数量增加且多为炎性细胞,潮线完全消失,基质失染明显,见图3F。



注:A.A组;B.B组;C.C组;D.D组;E.E组;F.F组

图3 兔膝关节软骨观察光镜图(HE,×200)

2.5 组织学 Mankin 评分

Mankin评分:与A组比较,B、C组差异无统计学意义($P>0.05$);与A组比较,D、E、F组差异有统计学意义($P<0.05$);与E组比较,F组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 膝骨性关节炎各组 Mankin 评分比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/(mg·kg ⁻¹) | 积分/分 |
|----|---------------------------|------------|
| A组 | - | 0.25±0.46 |
| B组 | 2.5 | 0.50±0.53 |
| C组 | 5 | 0.86±0.64 |
| D组 | 7.5 | 2.50±0.53* |
| E组 | 10 | 6.13±0.83* |
| F组 | 10 | 7.75±1.04* |

注:与A组比较,* $P<0.05$

3 讨论

目前,OA的造模方法有如下三种:关节固定法^[6],关节腔内手术法^[7-8],关节腔内注射药物的方法^[9]。虽然对于不同方法诱导膝骨性关节炎的报道很多,而关节腔内手术法建立OA模型的方法较为常用^[10],这种方法是通过造成关节不稳定的方式诱发OA,但也存在明显的劣势^[11],例如:造模时间过长、创伤较大、对动物生理结构改变较多、难以模仿慢性疾病的骨性关节炎的发病过程等。关节腔注射药物的方法因其建模所需时间较短,对实验动物的损伤较少,可以保证实验动物的成活率,逐渐被OA研究人员所接受。有研究报道^[12],因劳损是OA发病的病理因素之一,可将运动因素作为建立早期OA模型的主要干预因素之一,故本实验设立注射剂量相同的E、F组,同时F组以30 min/d分2次驱赶运动为干预因素,研究结果发现,与E组比较,F组软骨组织的病理切片Mankin评分差异无统计学意义($P>0.05$),故由此发现,在建立早期OA模型的过程中,运动不能够作为建立OA早期模型的主要干预因素。

目前国内外关于OA模型建立的实验研究中,采用关节腔注射碘乙酸钠溶液造模的文献较少,且目前较少有探讨碘乙酸钠溶液造成OA的最小有效药物浓度的实验研究。本实验采用关节腔注射碘乙酸钠溶液的方式建立OA模型,从造模开始到成模共用2周时间,建模过程中无实验动物死亡情况,

造模后第3天观察到D、E、F组左膝关节已经出现红肿现象,通过病理切片能够明显观察到各模型组膝关节软骨出现不同程度的损伤,并确定膝关节腔注射7.5 mg/kg的碘乙酸钠,已能够建立早期OA模型。关节腔注射碘乙酸钠的方法,简便易行、创伤小、动物成活率较高、实验周期短,建立早期OA模型采用此种方法更加适用,值得进一步研究应用。

参考文献

- [1] 沈金明,封蕾,陈杰,等.温针灸联合非甾体类消炎药治疗膝骨性关节炎的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):1008-1012.
- [2] 钱丽萍.骨性关节炎的实验动物模型[J].中国运动医学杂志,2012,31(11):1026-1029.
- [3] 宋寒冰,赵峰,葛圆圆,等.膝关节骨性关节炎动物模型建立的研究现状[J].中国医药导报,2017,14(30):46-49.
- [4] 柯晖.怀牛膝对兔骨性关节炎软骨组织影响的实验研究[D].武汉:湖北中医药大学,2012.
- [5] 方锐,艾力江·阿斯拉,卢勇,等.兔骨性关节炎模型构建及早中晚期的特点[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(7):1218-1222.
- [6] 孙鲁宁,赵燕华,黄桂成,等.木瓜蛋白酶诱导膝关节骨性关节炎模型兔滑膜病理变化与药物注射时间的关系[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(50):9311-9313.
- [7] 葛广勇,赵建宁,刘刚.膝骨性关节炎模型的分期特征[J].中国组织工程研究,2006,10(4):47-49.
- [8] 杨瑞甫,胡蕴玉,吴银松,等.兔骨性关节炎两种动物模型比较[J].中国矫形外科杂志,2006,14(19):1497-1499.
- [9] 侯婷婷,王岩峰.关节腔内注射医用臭氧对兔膝骨性关节炎模型基质金属蛋白酶-9表达的影响[J].解剖科学进展,2017(1):76-79.
- [10] 曾俊华,马笃军,彭力平,等.实验兔膝关节骨性关节炎模型的建立及鉴定[J].中国临床研究,2016,29(5):679-682.
- [11] 李文雄,孙赫,沈玮,等.SD大鼠骨性关节炎造模方法的筛选及优化探究[J].畜牧与兽医,2014,46(10):70-73.
- [12] 陈志达,林瀚洋,余志毅,等.膝骨性关节炎动物模型研究进展[J].风湿病与关节炎,2016,5(1):67-70.

(本文编辑 杨 璞)