

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.023

膝关节骨性关节炎动物模型研究进展*

张君涛¹, 吴超超²综述, 张栋林^{2△}, 张超¹审校

(1. 天津中医药大学第一附属医院骨伤科, 天津 300380; 2. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193)

[摘要] 随着社会人口老龄化的加剧, 膝关节骨性关节炎(KOA)成为提高老年人生活质量的一大障碍, 但其病因及发病机制尚不明确, 因此建立 KOA 动物模型来探讨其病理机制成为研究 KOA 的重要方法, 亦对探寻安全有效的 KOA 治疗手段具有十分重要的意义。目前研究者多采用 3 类方式造模, 即手术方式: 用手术方式改变动物解剖结构造成关节不稳、骨内高压或雌激素缺乏诱导动物膝关节发生退变; 非手术方式: 通过关节制动, 寒冷及撞击刺激, 关节腔药物注射等方式获得 KOA 动物模型; 自发模型: 通过人工选育或者基因工程的方式获得 KOA 动物模型, 本文就近年这 3 类 KOA 动物模型的研究进展进行综述。

[关键词] 骨性关节炎; 动物模型; 造模方法

[中图法分类号] R684.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)15-2061-03

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)又被称为膝关节退行性骨关节炎, 临床表现为关节软骨变性、破坏及骨质增生, 关节变形及关节周围组织功能减退等, 是临床常见危害老年人健康的骨关节疾病, 给社会增加沉重的负担。但其发病机制仍不明确, 临床上也没有特异性的治疗措施, 只能缓解症状, 所以建立骨性关节炎动物模型来探索其发病机制和防治手段成为科研热点。KOA 动物模型从造模方式上可分为手术方式、非手术方式、自发模型 3 类, 本文就这 3 类 KOA 动物模型的研究近况做一综述。

1 手术方法

1.1 关节内手术

1.1.1 Hulth 法 Hulth 法是 KOA 手术造模的经典方法。苏达明等^[1]采用 Hulth 法, 切断膝关节内侧副韧带和前后交叉韧带, 并整体切除内侧半月板, 造模后 6 周行 X 线检查证明成功建立兔 KOA 模型。肖春苟等^[2]切除兔膝关节内侧半月板和切断内侧副韧带, 术后 1 周强迫活动, 4 周成功复制兔 KOA 模型。

1.1.2 前交叉韧带切断法 此法较 Hulth 法对动物创伤和生理结构改变小, 能较全面反映 KOA 软骨退变的病理进程, 是近年建立 KOA 动物模型采用较多的方法^[3]。王君等^[4]采用前交叉韧带切断(ACLT)法造模, 造模 3 d 后, 将实验兔术肢对侧肢体固定于腹部增加术肢负重, 联合强制运动, 4 周即可造模成功, 此模型符合 KOA 临床特征, 且造模时间较单纯 ACLT 模型时间短。

1.1.3 半月板切除法 半月板具有稳定膝关节, 缓

冲压力负荷, 减少关节摩擦等作用, 缺失可造成膝关节磨损, 诱发 KOA 样改变。BAGI 等^[5]采用切除大鼠膝关节内侧半月板的方法, 10 周后影像学检查发现局部软骨受损和骨赘形成等 KOA 样改变, 成功建立大鼠 KOA 模型。陈康等^[6]应用兔单后肢双侧半月板切除联合前交叉韧带横断法, 术后第 2、6、10 周后大体观察和术肢标本病理改变都符合典型的 KOA 特征。

1.1.4 软骨缺损法 软骨缺损法造模可较好地观察膝关节骨关节炎发展及修复进程。但研究者发现, 软骨缺损直径小于 3 mm, 缺损深度未至软骨下骨, 制模术后 6 周, 缺损的软骨可获得局部或完全修复, 这样, 在造模研究中, 材料的诱导作用有与膝关节软骨缺损的修复, 之间的相关性就难以得到证明^[7]。赵森泉等^[8]为探讨何种运动强度以促进膝关节软骨全层缺损的修复采用在大鼠股骨面作一直径 3.2 mm 的全层软骨缺损方式造模, 造模 1 周后选择低、中、高 3 种运动干预, 连续 8 周后, 血清基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶抑制剂浓度及番红染色结果显示, 中等强度的运动干预更加有助于提高软骨细胞增殖, 促进软骨缺损部位的修复, 增加修复效果。

1.2 关节外诱导

1.2.1 改变关节应力 膝关节内的正常应力环境对关节软骨保持正常生理特性有重要的意义, 关节内应力增加或减小均可成功诱导建立 KOA 动物模型。杨松滨等^[9]采用手术切断内侧副韧带并切除部分髌韧带的方法造模, 造模 4、8 周时模型组动物血清中白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、基质金属

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51573137)。

作者简介: 张君涛(1977-), 副主任医师, 硕士, 主要从事中医骨伤及生物力学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: ytkfzqdl@foxmail.com。

蛋白酶(MMP)-13 水平均升高,较对照组有显著差异,表明切断内侧副韧带并切除部分髌韧带的方法可获得较为理想的兔膝关节炎模型。余存泰等^[10]在兔膝关节间隙上下各钻入 1 根克氏针,一组撑开克氏针两端建立关节低压应力动物模型,另一组拉紧克氏针两端建立关节高压应力动物模型,术后管型石膏伸直位固定术肢,发现低压应力模型首先出现软骨细胞功能减退,软骨细胞代偿性增生,然后基质破坏,最终诱发软骨整体退变;高压应力模型退变首先表现为软骨基质破坏,同时软骨细胞代偿性增生,然后软骨细胞退变,最终导致整个关节软骨退变。

1.2.2 破坏关节血液循环 膝关节血液循环改变是膝关节退变的影响要素之一。吴并生等^[11]采用手术分离并结扎兔单侧股静脉的方法,造成股骨内高压状态,术后强迫活动,12 周建立了符合早期 KOA 病理改变的动物模型。戴七一^[12]采用手术结扎并切断兔单侧臀下静脉、股静脉、大隐静脉的方式,造成股骨内高压诱发膝关节退变,在造模术后 8 周获得早中期兔 KOA 模型。

1.2.3 卵巢切除 切除雌性实验动物卵巢致雌性激素缺乏可成功诱发 KOA 动物模型^[13]。因此,王文胜等^[14]采用卵巢切除联合跑步建立大鼠膝 KOA 模型,造模 4 周时模型+上坡跑步组 Mankin 评分已达损伤标准,而模型+下坡组 Mankin 评分达损伤标准时间为造模 6 周,动态观察表明卵巢切除联合上坡疲劳跑台训练较单纯卵巢切除法更早出现原发性 KOA 软骨损伤,造模效率更高。

2 非手术方法

2.1 关节制动 膝关节长期制动可导致骨骼肌萎缩、韧带结构紊乱、半月板血供不足、关节内压力改变等变化,最终可出现与临床近似的膝关节退行性改变。钱洁等^[15]通过用石膏伸直位固定大鼠从踝到髌关节,制动后 3 周即有膝软骨表层细胞凋亡、蛋白多糖和 II 型胶原减少等早期退变特征,实验 6 周为中期 KOA 样改变,实验 8 周为晚期 KOA 样改变。

2.2 寒冷刺激 寒冷刺激法造模时间较短,且操作简单,造模效率高,是研究 KOA 的发病机制的理想实验动物模型,林强等^[16]采用寒冷刺激联合石膏固定的方法,将大鼠肢体于(4.0±0.8)℃水中处理 4 h,然后在石膏伸直位固定 4 h,连续 6 周后血清和滑膜组织中炎性细胞因子水平及关节软骨中 ADAMTs-4、ADAMTs-5 蛋白表达测定有统计学意义,成功建立大鼠 KOA 模型。

2.3 关节撞击 MROSEK 等^[17]认为快速的高强度撞击刺激能够穿透关节软骨作用于软骨下骨,因而诱

发 KOA 样改变,他们采用“落塔”微重力装置撞击成熟犬髌骨关节,6 个月后组织学检查发现,刺激区软骨基质符合早期 KOA 病理改变。

2.4 关节腔注射药物

2.4.1 尿激酶型纤溶酶原激活物 石辉等^[18]将尿激酶型纤溶酶原激活物注入兔膝关节腔,造成膝关节软骨退变,且退变程度随着时间增加逐渐加重,12 周后可造模成功,此模型可为研究 KOA 的病因、病理改变、发病机理及探寻治疗手段提供良好的实验工具。

2.4.2 木瓜蛋白酶 汪宗保等^[19]将木瓜蛋白酶和 L-半胱氨酸混合注射大鼠膝关节腔诱导建立大鼠 KOA 模型,通过环境扫描电镜发现注射 4~6 周可建立大鼠早期 KOA 模型,同时证明采用扫描电镜能压缩标本观测时间,比大体观察更早发现骨性关节炎的变化。

2.4.3 胶原蛋白酶 黄永明等^[20]将 II 型胶原蛋白酶注入 SD 大鼠膝关节腔内,7 d 后镜下观察发现,关节组织有早期 KOA 样改变,成功建立大鼠早期 KOA 模型,同时发现大鼠体质量、膝关节直径、组织病理、胸腺及脾脏重量和脏器系数等指标可为药物治疗 KOA 疗效和安全性评价、作用机制等方面的研究提供参考。

2.4.4 碘乙酸盐 许世兵等^[21]将碘乙酸盐注射到 SD 大鼠膝关节腔内,2 周后影像学和组织病理观察发现,膝关节股骨下端和胫骨平台关节面失平整,关节变形和关节软骨缺损,软骨细胞排列紊乱,股骨和胫骨端骨小梁面积显著减少,骨髓腔细胞增生等现象,成功建立大鼠 KOA 模型。另外,此研究采用活体成像技术可快速获取影像资料、动态跟踪观察,避免实验过程中动物损耗,实现同一个动物模型的动态观察。

其他物质如透明质酸酶、聚乙烯亚胺、雌二醇、肾上腺皮质激素、菲律宾菌素、软骨碎片或者异物等注入动物膝关节腔内也可致膝关节软骨退变,建立 KOA 动物模型^[22]。

3 自发动物模型

3.1 自发动物模型优点 自发 KOA 动物模型可避免其他方式造模操作误差等带来的影响,是研究 KOA 发病机制、膝关节软骨生化改变及 KOA 防治效果比较等方面的理想模型。

3.2 自然自发模型 研究者发现 C57 黑鼠可天然自发形成骨关节炎^[23],在 C57 黑鼠自发的基础上增加运动以增加关节负荷,C57 黑鼠 KOA 自发率显著增加^[24]。MURAOKA 等^[25]研究发现 12 个月龄的雄性 Hartley 豚鼠膝关节,可观察到表层软骨细胞丢失,糖

胺聚糖异常分布,胶原溶解、断裂和排列紊乱等退变特征,与人类 KOA 病理改变相似。但自然自发模型造模时间较长,限制了其在研究中的应用。

3.3 转基因模型 随着转基因技术的发展和运用,使转基因 KOA 动物模型成为可能。通过基因工程技术敲除调控软骨细胞凋亡的相关基因可使软骨细胞过度凋亡,模拟 KOA 的病理过程^[26]。RODRIGUEZ 等^[27]研究发现敲除小鼠 Col11a1 基因,可导致Ⅰ型胶原不能合成正常的胶原纤维,使小鼠表现出 KOA 样的病理特征。HYTTINEN 等^[28]研究发现 Col2a1 等位基因与软骨内骨形成有相关性,失活其等位基因可导致软骨形成障碍,导致关节软骨软化。于斐等^[29]采用敲除 15 个月龄小鼠沉默信息调节因子 1(SIRT1)的基础上腹腔注射 Tamoxifen 并切断单侧膝关节前交叉韧带和切除内侧半月板诱导建立膝关节骨关节炎模型,此 KOA 模型膝关节的退变与老年人 KOA 的发生过程相似。转基因 KOA 动物模型,由于造模成本高,与人类 KOA 的发病机制是否一致等问题,使得该类模型在 KOA 发病机制、防治等方面的研究较少采用。

4 展 望

建立动物模型来探讨 KOA 发病机理和寻求安全有效的治疗手段成为研究 KOA 的重要方法。造模方法很多,但每种方法都有其优缺点,手术途径制作的模型,操作较复杂,创伤较大,但诱导成功率高,稳定性好;关节内注射造模,造模时间短,受其他因素干预少,主要适用于软骨病变及药物防治的研究,但注射模型诱发的软骨基质分解代谢强烈,病程及组织病理学变化与关节不稳所导致 KOA 差异较大。自发模型和转基因模型收到外界干扰较少,能够避免造模操作的误差对研究的影响,是研究 KOA 发病机制等方面理想的模型,但自发造模时间较长的缺点限制了其在研究中的使用。转基因模型因造模成本高,其诱发机制和人类的发病机制的相似性还有待确定,使得转基因模型较少被采用。现阶段的研究还没有发现一种较完美的动物模型,因此研究者需要根据研究的需要,结合各种 KOA 动物模型的特点,选择适合的动物模型。

参考文献

[1] 苏达明,赵军华,黄志远,等.健膝强骨丸对膝骨关节炎家兔模型关节软骨病理改变的影响[J].中国组织工程研究,2014,5(5):657-662.

[2] 肖春苟,邹锦慧,李力强,等.以改良 Hulth 法建立兔膝骨性关节炎关节软骨的病理变化[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(12):1-3.

[3] 何名江,张洪美,荆琳,等.骨关节炎动物模型:谁最适宜你的研究? [J].中国组织工程研究,2013,17(46):8069-8074.

[4] 王君,何炳书,李笑萍.兔膝关节负重模型的建立[J].中国老年学杂志,2005,25(9):1079-1080.

[5] BAGI C M,ZAKUR D E,BERRYMAN E, et al. Correlation between μ CT imaging, histology and functional capacity of the osteoarthritic knee in the rat model of osteoarthritis[J]. J Transl Med,2015,13(1):276.

[6] 陈康,陈津俊,符红娜,等.兔膝关节炎模型建立的探讨[J].实验动物科学,2014,31(5):33-35.

[7] Charalambous C P. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg Am,1993,75(4):532-553.

[8] 赵森泉,毛新润.跑台运动干预膝关节软骨全层缺损修复[J].中国组织工程研究,2017,21(16):2478-2483.

[9] 杨松滨,刘益杰,冯伟,等.基于关节力学失稳方法建立兔膝骨关节炎模型[J].上海中医药杂志,2015,49(4):11-15.

[10] 余存泰,徐中和,黄公怡.应力导致关节软骨退变机制的实验研究[J].实用骨科杂志,2004,10(5):411-414.

[11] 吴并生,薛华新,刘晋,等.超短波对家兔膝关节骨关节炎形成过程的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2003,25(1):7-10.

[12] 戴七一,阮萍,覃学流,等.揉髌手法对兔膝关节软骨组织细胞增殖的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(2):541-544.

[13] HØEGH-ANDERSEN P,TANKÓ B,ANDERSEN L, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application[J]. Arthritis Res Ther,2004,6(2):169-180.

[14] 王文胜,陈伟,沈堡垒,等.上、下坡跑台训练膝骨关节炎模型大鼠关节软骨及炎症因子的变化[J].中国组织工程研究,2016,20(2):197-201.

[15] 钱洁,邢雪松,梁军.大鼠膝关节炎动物模型的两种实验方案[J].实验室研究与探索,2014,33(11):23-27.

[16] 林强,祁文兵,白明华,等.中药复方及其拆方制剂对寒冷刺激结合石膏固定骨关节炎模型大鼠血清和膝关节滑膜组织中相关炎症因子的影响[J].中国医药,2016,11(10):1524-1529.

[17] MROSEK H,LAHM A,ERGGLELET C, et al. Subchondral bone trauma causes cartilage matrix degeneration: an immunohistochemical analysis in a canine model[J]. Osteoarthritis Cartilage,2006,14(2):171-178.

[18] 石辉,何斌,史晨辉,等.用尿激酶型纤溶酶原激活物建立兔骨关节炎模型的研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2006,24(1):66-69.

[19] 汪宗保,徐亚林,廖威明,等.木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的电镜扫描[J].(下转第 2067 页)

zumab followed by maintenance pemetrexed-bevacizumab versus paclitaxel-carboplatin-bevacizumab followed by maintenance bevacizumab in patients with stage III B or IV nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(2):353-359.

- [19] KOSTY M P, WOZNIAC A J, JAHANZEB M, et al. Effectiveness and safety of post-induction phase bevacizumab treatment for patients with non-small-cell lung cancer: results from the ARIES observational cohort study[J]. *Target Oncol*, 2015, 10(4):509-516.
- [20] ROSELL R. What new therapeutic targets exist for EGFR-mutant NSCLC? [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(11):1184-1185.
- [21] SETO T, KATO T, NISHIO M, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(11):1236-1244.
- [22] ROSELL R, DAFNI U, FELIP E, et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with advanced non-small-cell lung cancer and activating EGFR mutations (BELIEF): an international, multicentre, single-arm, phase 2 trial[J]. *Lan-*

cet Respir Med, 2017, 5(5):435-444.

- [23] WANG X Q, ZHOU W J, LUO X Z, et al. Synergistic effect of regulatory T cells and proinflammatory cytokines in angiogenesis in the endometriotic milieu[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(6):1304-1317.
- [24] PAZARES L, HIRSH V, ZHANG L, et al. Monotherapy administration of sorafenib in patients with non-small cell lung cancer (MISSION) trial: a phase III, multicenter, placebo-controlled trial of sorafenib in patients with relapsed or refractory predominantly nonsquamous non-small-cell lung cancer after 2 or 3 previous treatment regimens[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(12):1745-1753.
- [25] SCOTT A J, MESSERSMITH W A, JIMENO A, et al. Apatinib: a promising oral antiangiogenic agent in the treatment of multiple solid tumors [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2015, 51(4):223-239.
- [26] SUN Y, NIU W, DU F, et al. Safety, pharmacokinetics, and antitumor properties of anlotinib, an oral multi-target tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced refractory solid tumors[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1):105.

(收稿日期:2017-11-06 修回日期:2018-01-14)

(上接第 2063 页)

中国组织工程研究, 2014, 2(2):177-182.

- [20] 黄永明, 潘建科, 郭达, 等. II 型胶原蛋白酶诱导 SD 大鼠膝关节关节炎模型的建立[J]. *广东医学*, 2015, 36(8):1145-1148.
- [21] 许世兵, 单乐天, 郭燕威, 等. 多光谱小动物活体成像技术在骨性关节炎模型评价中的应用[J]. *中国骨伤*, 2014, 6(6):466-470.
- [22] 马玉峰, 祁印泽, 王庆甫, 等. 关节内注射药物建立骨性关节炎动物模型研究进展[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(1):90-95.
- [23] 陈志达, 林瀚洋, 余志毅, 等. 膝关节关节炎动物模型研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(1):67-70.
- [24] 高宁阳, 曹月龙, 刘婷, 等. C57 黑鼠骨关节炎模型的关节病理积分与血清及滑膜中基质金属蛋白酶-3 白细胞介素-1 水平的相关性研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14(3):195-198.
- [25] MURAOKA T, HAGINO H, OKANO T, et al. Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of Guinea pigs with and

without spontaneously occurring osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(10):3366-3374.

- [26] 杜国庆, 丁道芳, 李玲慧, 等. 骨关节炎软骨退变基因调控的研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21(11):1089-1093.
- [27] RODRIGUEZ R, SEEGMILLER E, STARK R, et al. A type XI collagen mutation leads to increased degradation of type II collagen in articular cartilage[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(4):314-320.
- [28] HYTTINEN M, TÖYRÄS J, LAPVETELÄINEN T, et al. Inactivation of one allele of the type II collagen gene alters the collagen network in murine articular cartilage and makes cartilage softer[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(3):262-268.
- [29] 于斐, 雷鸣, 曾晖, 等. 高龄小鼠沉默信息调节因子 1 基因敲除后膝关节关节炎模型的建立[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(49):7895-7901.

(收稿日期:2017-11-02 修回日期:2018-01-10)