

膝骨关节炎合并骨质疏松症大鼠模型的建立与评估

周逸敏¹ 邱友利¹ 张俐^{1,2△}

[摘要] **目的:**模拟临床中老年女性绝经后合并骨关节炎的病理生理特点,建立膝骨关节炎合并骨质疏松症大鼠动物模型。**方法:**采用经典去卵巢法构建骨质疏松症模型后的大鼠加疲劳性跑台训练。18 只 6 月龄雌性 SD 大鼠,采用抽签法随机均分为空白对照组(正常组)、单纯去卵巢组(骨质疏松组)和膝骨关节炎合并骨质疏松组(模型组),每组 6 只。单纯去卵巢组和模型组在无菌条件下摘除双侧卵巢后,单纯去卵巢组常规喂养,模型组术后恢复 1 周后行跑台疲劳性训练 4 周,空白组不作任何处理。5 周后取右侧股骨、左侧膝关节、血清及尿液行组织学、力学及免疫学分析。**结果:**与空白组比较,单纯去卵巢组与模型组血清雌二醇浓度显著降低($P<0.01$),最大载荷、断裂载荷降低($P<0.05$);与单纯去卵巢组比较,模型组大鼠尿液 CTX-II 浓度明显升高($P<0.01$),模型组大鼠关节软骨呈现轻度软骨损伤。**结论:**采用经典去卵巢法能构建骨质疏松症模型,并在此基础上使用动物跑台进行疲劳性运动可以造成膝关节劳损,从而成功建立符合女性中老年膝骨关节炎合并骨质疏松症的新模型。

[关键词] 膝骨关节炎;骨质疏松症;动物模型;实验研究

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2017)09-0001-04

Establishment and Evaluation of Rat Model of Osteoarthritis and Osteoporosis of Knee Joint

ZHOU Yimin¹ QIU Youli¹ ZHANG Li^{1,2△}

¹Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

²Xiamen Medical School, Xiamen 361008, Fujian China.

Abstract Objective: Simulating the clinical older postmenopausal women combined osteoarthritis pathological physiology characteristic, to attempt to establish KOA+OP animal model. **Methods:** After the classic bilateral ovariectomy method to build osteoporosis model rats, adding the fatigue treadmill training. Using the lottery method randomly divided the eighteen 6-month female SD rats into blank group(normal group), ovariectomized group(osteoporosis group) and knee osteoarthritis with osteoporosis group(model group), 6 rats as a group. Ovariectomized group and model group under aseptic conditions after excision bilateral ovaries, regular feeding ovariectomized group, the model group postoperative recovery 1 week, fatigue treadmill training 4 weeks, don't make any deal with blank group. After 4 weeks of administration, take on the right side of the femur, left side of the knee joint, serum and urine was sampled to experiment histology, mechanics and immunological analysis. **Results:** Compared with blank group, ovariectomized group and model group had a significantly lower E2($P<0.01$), the maximum load, fracture load reduced($P<0.05$); Compared with ovariectomized group, model group rats urine CTX-II concentration increased significantly($P<0.01$), the model group rats present mild cartilage injury of articular cartilage. **Conclusion:** Using the method of classic to ovarian can build osteoporosis model, and on this basis, the use of animals run movement can cause knee strain fatigue line, thus successfully established in conformity with the female senile knee osteoarthritis with a new model of osteoporosis.

Keywords: knee osteoarthritis; osteoporosis; animal model; experimental study

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)和骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是临床常见病,临床中发现

不少患者同时患有骨质疏松和骨关节炎,其发病率都与年龄呈正相关^[1],是造成患者疼痛以及丧失劳动能力的主要原因。随着我国人口老龄化的加速, KOA 及 OP 所引起的退行性骨骼疾病对患者的生活质量产生了严重的威胁,两者虽然病理上存在差异,但又有相似之处,常常同时发病^[2]。由于二者的相关性暂未完全明确,因此建立 OP 合并 KOA 的动物模型来探讨其病理机制,将为临床中防治膝骨关节炎合并骨质疏松

基金项目:福建省自然科学基金项目(2016J01380)

福建省百千万领军人才

¹ 福建中医药大学(福州, 350122)

² 厦门医学院

△通信作者 E-mail: zhanglil626@163.com

症提供裨益。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 6 月龄 SD 健康雌性大鼠 18 只, 体重(438 ± 21)g, 所有 SD 实验大鼠均由海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2012-0002, 饲养于福建中医药大学实验动物中心(许可证号: SYXK(闽)2009-0001) SPF 级动物房, 饲养环境及饮食均符合动物饲养标准。

1.2 试剂和仪器

大鼠血清 E2、尿液 CTX-II ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); ZH-PT 动物跑台(淮北正华生物仪器设备有限公司)、ELX800 型全自动酶标仪(美国 Biotek 公司); DMI 6000+ 型生物倒置显微镜(德国 Leica 仪器有限公司); 万能材料试验机、三点弯曲试验软件等由教育部省部共建重点实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 OP 模型的制备 将单纯去卵巢组(OVX 组)和膝关节关节炎合并骨质疏松症模型组(KOA+OP 组)行去卵巢术, 分组过程由指定人员负责。国内外研究者多运用去势大鼠这一经典方法模拟老年女性骨质疏松症发病的过程^[3], 本实验参考其步骤, 具体去势过程如下: 去卵巢在无菌条件下, 采用 10% 水合氯醛, 以 0.3 mL/100 g 剂量行腹腔内麻醉, 腹中线入路, 摘除双侧卵巢、末端子宫及周围脂肪组织, 结扎卵巢动脉, 生理盐水冲洗, 逐层缝合, 切口滴入 8×10^4 U 青霉素水溶液, 术后 3 d 内肌肉注射青霉素 8×10^4 U, 常规饲养, 自由饮水, 留心观察。空白对照组不做任何处理。

1.3.2 KOA 合并 OP 模型的制备与鉴定 单纯去卵巢组术后常规饲养, 膝关节关节炎合并骨质疏松症模型组(KOA+OP 组)去卵巢休息 1 周后, 行跑步台疲劳性训练, 跑步速度为 30 m/min, 60 min/d, 坡度为 16°, 每周休息 1 d, 连续训练 4 周。

鉴定方法: 于造模 5 周时, 采用酶联免疫吸附双抗体夹心法(Elisa 法)检测血清 E2 浓度, 用三点弯曲试验检测右侧股骨最大载荷、断裂载荷后, 比较空白组和 OVX 组差异, 以鉴定 OP 模型。取左侧股骨髁端行脱钙、石蜡包埋、苏木精-伊红染色观察, 并检测 24 h 尿液中 II 型胶原羧基端前肽(C Terminal propeptide of Collagen type II, CTX-II)含量, 对比 OVX 组及 KOA+OP 组差异, 以鉴定 KOA+OP 组模型成立。

1.4 标本采集与处理

1.4.1 大体标本的采集与处理 5 周时, 用 10% 水合氯醛水溶液, 以 0.3 mL/100 g 剂量行腹腔内麻醉后, 行抽腹主动脉血法处死。沿腹中线剪开腹腔, 钝性游离肠管和肠系膜, 暴露腹主动脉, 用采血针针头刺入腹主动脉(进针角度与主动脉之间约 15°), 待确保采血

针完好进入腹主动脉无刺破时, 另一头连接抗凝管, 彻底抽取动脉血, 静置 1 h, 在 3 000 r/min, 4 °C 条件的离心机中离心 20 min, 取上清液行血清 E2 含量检测, 余下血清保存于 -80 °C 冰箱中冻存以备用。剥离周围肌肉筋膜组织后取右侧股骨行力学检测, 左侧股骨髁行组织形态学观察, 代谢笼收集 24 h 尿液以检测尿液中 CTX-II 含量。

1.4.2 力学测试、组织切片及染色 取右侧股骨用浸有 0.9% 的生理盐水纱布包裹放入封装袋, 保存于 -80 °C 冰箱中, 之后采用三点弯曲试验检测股骨最大载荷、断裂载荷, 以鉴定 OP 模型。取左侧股骨髁端用 4% 多聚甲醛固定, 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙, 脱水包埋做石蜡切片、苏木精-伊红染色并在光镜下观察, 进行 Mankin 评分^[4]。

1.5 主要观察指标

血清中 E2 含量, 尿液 CTX-II 含量, 右侧股骨最大载荷及断裂载荷等骨生物力学指标, 左膝关节行病理组织切片, 观察形态学, 参考 Mankin 评分标准^[4]对其进行评分并分期。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 对多样本均数进行单因素方差分析(ANOVA), 各组间比较采用独立样本 *t* 检验, 统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

SD 大鼠空白组无异常; 卵巢切除组术后活动状况均良好, 腹部手术部位愈合良好; KOA+OP 模型组在跑台训练中, 前两周状态良好, 第三周开始有 2 只大鼠速度减慢, 跟不上跑台速度; 所有大鼠均纳入统计分析。

2.1 KOA 合并 OP 模型的鉴定

2.1.1 三组大鼠血清中 E2 浓度 图 1 显示: 6 月龄雌性 SD 大鼠去除卵巢后, 血清中 E2 含量明显低于空白组, 大鼠行跑台训练后 E2 水平有所回升, 但仍与正常空白组差异明显。与空白组比较, $*P < 0.01$, $F = 118.231$; 与 OVX 组比较, $\Delta P < 0.01$, $t = 4.13$ 。

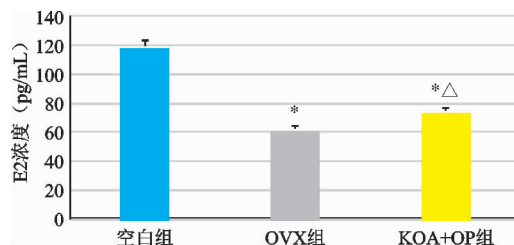


图 1 三组大鼠血清中雌二醇(E2)含量比较

2.1.2 三组大鼠右股骨最大载荷及断裂载荷结果

图 2 显示: 与空白组相比, OVX 组和 KOA+OP 组的最大载荷和断裂载荷均降低($P < 0.05$), 说明去卵巢组大鼠骨生物力学发生改变, 股骨质量较空白对照组

下降;KOA+OP 组最大载荷和断裂载荷较 OVX 组更高($P<0.05$),说明大鼠适当运动后,可以改善骨骼微结构,提高骨质量。最大载荷:与空白组比较,* $P<0.01$, $F=21.94$;与 OVX 组比较, $\Delta P<0.01$ 。断裂载荷:与空白组比较,* $P<0.01$, $F=35.45$;与 OVX 组比较, $\Delta P<0.01$ 。

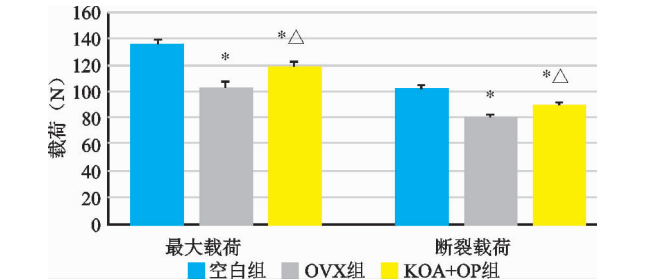


图 2 三组大鼠股骨最大载荷、断裂载荷比较

2.1.3 两组大鼠尿液中 CTX-II 含量结果 表 1 显示:KOA+OP 组大鼠尿液中 CTX-II 含量与 OVX 组

比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 两组大鼠尿液中 CTX-II 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CTX-II (pg/mL)
OVX 组	6	66.73±5.71
KOA+OP 组	6	119.47±9.79

注:与 OVX 组比较, $P<0.01$, $t=4.652$ 。

2.1.4 三组大鼠关节软骨光镜下组织学形态比较 图 3~5 显示:空白组软骨表层规则,细胞数量及形态正常,基质着色均匀,潮线清晰,软骨面无破坏;与空白组相比,OVX 组软骨表层及中深层细胞轻微减少,潮线不及空白组清晰,基质着色变浅。而 KOA+OP 组大鼠软骨表面毛糙,不光滑,基质着色不均,表层、移行层、辐射层、钙化层分层不明显,弥漫性细胞过多且排序规则,潮线紊乱。

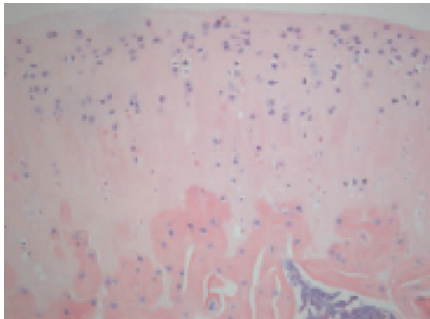


图 3 空白对照组(200×),软骨表层规则,细胞数量及形态正常,无簇集现象,基质着色均匀清晰,潮线清晰完整

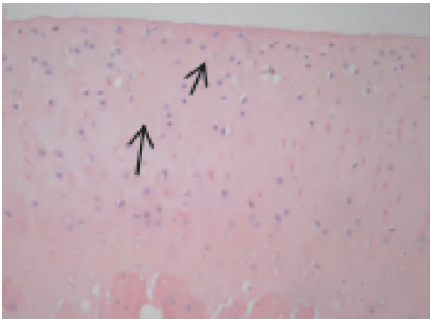


图 4 OVX 组(200×),软骨表面无明显裂隙,软骨表层及中深层细胞轻微减少,基质着色变浅,潮线紊乱

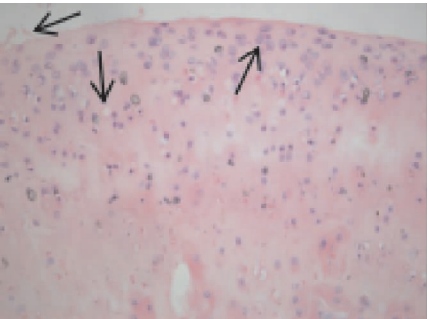


图 5 KOA+OP 组(200×),软骨表面毛糙,不光滑,中深层弥漫性细胞过多且排序不规则,基质着色不均,潮线紊乱不完整

2.1.5 三组大鼠关节软骨 Mankin 评分 采用关节软骨 Mankin 病理评分标准:0~2 分为正常软骨,3~5 分为软骨表面纤维化,6~7 分为中度软骨损伤,8~10 分为重度软骨损伤,10 分以上为软骨完全缺失。

图 6 Mankin 评分结果显示:与空白组比较,OVX 组和 KOA+OP 组差异均有统计学意义($P<0.01$);与 OVX 组比较,KOA+OP 组差异有统计学意义($P<0.01$)。与空白组比较:* $P<0.01$, $t=22.633$; $\Delta P<0.01$, $t=23.499$ 。与 OVX 组比较:▲ $P<0.01$, $t=6.635$ 。

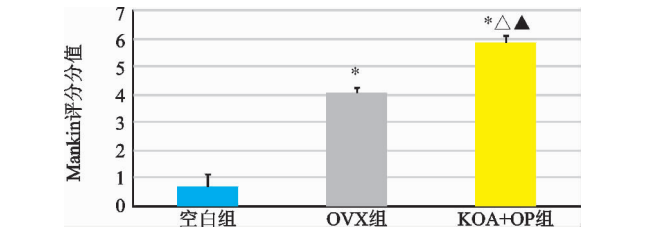


图 6 三组大鼠左膝关节软骨 Mankin 评分

3 讨论

骨关节炎是一种常见的慢性退行性骨关节病,主要是以关节软骨的退变和关节边缘及软骨下骨质再生为特点^[5]。而骨质疏松症是以骨量低下,骨微结构损

坏,骨生物力学特点发生改变,导致脆性增加和骨折的风险性升高的一种全身骨骼疾病^[6]。虽然近年来越来越多的国内外研究者对二者的关系进行探讨,但还未能得出一致的观点。因此,研究二者的相关性,动物模型作为研究的重要手段,起着不可替代的作用。

去除雌性大鼠双侧卵巢法是经典的骨质疏松模型法^[7],Hulth 法为膝关节关节炎的经典造模方法^[8]。有研究者联合上述两种方法成功构建 KOA 合并 OP 动物模型^[9],也有研究者通过单纯去卵巢法成功建立 KOA 合并 OP 新模型^[10]。通过手术直接损伤交叉韧带和关节软骨,创伤较大,与老年性 KOA 的发病机制不相符合,而非手术法虽然对膝关节无直接创伤,但成模时间过长。为进一步观察 KOA 和 OP 两者之间的关系,本课题根据老年女性膝关节关节炎和骨质疏松的发病机制,为构建膝关节关节炎合并骨质疏松动物新模型进行了实验研究。

有研究者实验研究证明 E2 作为女性最主要的雌激素,与全身骨密度呈正相关^[11],其分泌降低普遍认为是由于绝经后卵巢功能衰退,造成女性体内雌激素

的紊乱,成骨细胞与破骨细胞的不平衡导致骨吸收高于骨形成从而导致骨质疏松,因此绝经后妇女体内 E2 分泌降低是导致骨质疏松发病的主要因素。骨质量包括骨结构、骨量以及骨的强度,而骨生物力学是研究在外界作用力下的骨组织力学特性和生物学效应,主要反映了骨的结构和力学特征,是骨质量评定的一种有效方法^[12]。本实验结果中,OVX 组较空白组 E2 含量明显降低($P<0.01$),且最大载荷与断裂载荷 OVX 组均低于空白组($P<0.05$),说明去势雌性大鼠骨质疏松模型建立成功。

随着对骨关节炎的深入研究,发现 KOA 的影像学特征并不能反映其早期特征,而骨关节标志物有着发现早、价廉的优势,是近年来研究的热点。Ⅱ型胶原是软骨中的主要胶原成分,当关节软骨发生炎症反映,Ⅱ型胶原羧基前肽(C Terminalpropeptide of Collagen Type Ⅱ,CTX-Ⅱ)参与软骨的重建和修复,血液、尿液和膝关节液中的 CTX-Ⅱ浓度也会增加。骨关节骨性标志物 CTX-Ⅱ的检测不仅能早期反映关节软骨损伤^[13],亦有研究者发现跑台运动可导致关节损伤,尿液中 CTX-Ⅱ的表达升高,可作为早期诊断膝关节炎的手段^[14]。而在本课题组的早期研究中,已经证实去势大鼠行疲劳训练可以导致大鼠 KOA^[15]。本次实验结果中,KOA+OP 组去势大鼠经过 4 周跑台训练,30 m/min,60 min/d 后,检测两组大鼠尿液 CTX-Ⅱ浓度,结果显示跑步组(KOA+OP 组)较单纯去卵巢组(OVX 组)明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。结合大鼠左膝关节软骨形态学观察和 Mankin 评分,空白组大鼠膝关节无退化,OVX 组关节软骨表面纤维化,而行疲劳训练的 KOA+OP 组大鼠膝关节软骨主要以轻度损伤为主,是 3 组中最严重的。因此,无论从血清学测定骨关节软骨标志物 CTX-Ⅱ还是对大鼠膝关节软骨做形态学切片镜下观察均说明本次 6 月龄 SD 雌性大鼠骨关节炎合并骨质疏松的新模型成立。但通过 E2 浓度和最大载荷、断裂载荷结果发现,跑步组大鼠 E2 浓度和骨生物力学指标均高于单纯去卵巢组,但明显低于空白组,且去卵巢组大鼠和跑步组大鼠关节软骨 Mankin 评分均明显高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明对雌性大鼠去除双侧卵巢和行跑台训练对骨质疏松和膝骨关节炎有双重效应,适当的跑台训练能改变骨骼骨质量,改善骨质疏松症状,但又加重了骨关节的损伤。

因此,通过去除 6 月龄雌性 SD 大鼠双侧卵巢、行跑台疲劳性训练制备,并通过免疫学检测及病理组织切片观察等进行评估,能够建立符合女性中老年膝骨关节炎合并骨质疏松症病机的新模型。随着老龄化社

会的到来,骨质疏松症和骨关节炎的同时发病越来越被重视,该模型可为临床中骨关节炎合并骨质疏松症疾病的基础研究提供帮助。

参考文献

- [1] Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability (ROAD) [J]. J Bone Miner Metab, 2009, 27(5): 620-628.
- [2] 刘军. 骨质疏松与骨关节炎的相关性研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(15): 1389-1392.
- [3] Imai Y. Regulation of bone metabolisms by estrogen/estrogen receptors signaling [J]. Clin Calcium, 2013, 23(11): 1621-1626.
- [4] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips [J]. Surg Am, 1971, 53(3): 523-537.
- [5] 石晓明, 于占革. 骨关节炎发病机制的研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(24): 11607-11610.
- [6] 张智海, 刘忠厚, 李娜, 等. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(2014 版) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014(9): 1007-1010.
- [7] Saville PD. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis [J]. J Am Geriatr Soc, 1969, 17(2): 155-166.
- [8] 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.
- [9] 卢勇, 孟庆才, 方锐, 等. SD 大鼠骨性关节炎合并骨质疏松模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(46): 9092-9096.
- [10] 李楠, 王猛, 刘永明, 等. 卵巢切除术构建大鼠骨关节炎合并骨质疏松模型的可行性 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(13): 2413-2416.
- [11] 易伟莲, 廖德权, 林柏云, 等. 绝经后骨质疏松症患者性激素、细胞因子及骨代谢指标的变化及关系 [J]. 检验医学, 2012, 27(4): 296-298.
- [12] 马信龙, 马剑雄, 徐卫国, 等. 骨科生物力学研究的测量方法学专家共识 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014(9): 1039-1054.
- [13] 任戈亮, 桂鉴超, 王黎明, 等. Ⅱ型胶原羧基末端肽对骨关节炎早期诊断和病情评估的实验研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 3(5): 653-657.
- [14] 林静, 赵景新, 程广民. 跑台运动对大鼠尿液中 CTX-Ⅱ表达的影响 [J]. 河北医学, 2015, 21(2): 205-207.
- [15] 张俐, 李芑, 陈凯. 去势大鼠劳损性膝骨关节炎新模型的建立 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(11): 1-3.

(收稿日期: 2017-02-08)