

膝关节退行性骨关节炎动物模型研究进展

刘爱峰^{1△} 巩树伟¹ 何建浩¹ 涂智恒¹

【关键词】 膝关节;退行性骨关节炎;动物模型;研究进展

【中图分类号】 R274 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-0205(2020)03-0085-04

骨关节炎(OA)是当今世界上最常见的关节炎之一^[1],由于对人类 OA 的直接研究存在很大的困难,因此动物实验是探讨 OA 发病机制、药物治疗效果等一系列骨关节炎研究的重要途径之一^[2]。研究 OA 动物模型的目的是为了临床上更好地控制 OA,建立与人类关节炎一致的 OA 模型对治疗 OA 具有重要的意义,理想的 OA 动物模型应该在关节大小、结构、软骨损伤的产生和发病进展等方面与人类相似。目前 OA 造模的主要方法包括非手术方式和手术方式,非手术方式包括药物注射、关节固定术、关节冲击等^[3]。手术方法是通过各种手段导致关节不稳或者力线改变诱导 OA^[4],主要包括半月板部分或全部切除、内侧或外侧副韧带剥离、前交叉韧带或后交叉韧带(ACL 或 PCL)横切、内翻和外翻截骨、肌切除术、髌骨切除术等^[5]。

1 非手术方式造模

手术造模方法是动物 OA 研究中最常用的方法。然而,手术方法会混淆部分结果,难以分清最终导致疼痛和功能受限是手术本身的侵入性软组织破坏还是人为制造的骨关节炎^[6]。无创造模方法可避免手术造模而产生的并发症,并且更能代表日常动作慢性损伤的人类 OA。

1.1 基因敲除

随着转基因技术的发展,转基因动物模型为 KOA 研究提供了新的选择。动物研究发现,在骨关节炎的疾病过程中,通过基因敲除调控软骨细胞凋亡的相关基因会造成软骨细胞的过度凋亡,最终导致 OA 的发生^[7]。于斐等通过随机对照试验,发现通过 SIRT1 基因敲除,膝骨关节炎小鼠动物模型建立成功,且比假手术组 Mankin 评分升高更明显^[8]。

1.2 寒冷刺激

寒冷诱发局部血管收缩,血液循环不畅,致使组织缺血缺氧,同时寒冷可诱导细胞凋亡,破坏正常软骨及滑膜细胞的生存环境,随着细胞代谢产物的增多,引起肿瘤坏死因子- α (TNF- α),IL-1,IL-6 等多种炎症因子及趋化因子升高,最终引起关节软骨细胞和基质的降解^[9]。陈文超等利用寒冷刺激的方法制造 OA 模型,结果模型的关节肿胀情况、软骨组织损伤、X 线影像学改变以及生物代谢情况均符合 OA 的临床特征^[10]。

1.3 机械损伤

机械因素是 OA 发病和病情进展的主要病因之一^[11]。重力挤压、高速冲击或强体力劳动使 OA 患者软骨加速破损^[12]。Christiansen 设计了一款机械 OA 造模装置,其首次采用单一机械循环加压诱导膝关节损伤。十分精确的模拟了人体膝关节损伤相关的条件。该装置在麻醉的小鼠上进行,通过两个定制的加压平台组成,使小鼠膝关节屈曲 30°,利用俩平台的对抗挤压作用使股骨远端短暂的前半脱位。压缩力释放后,关节恢复到原来的位置,保持关节功能,这一过程使膝关节软骨以及半月板挤压、研磨。通过一次次的机械加压,使小鼠关节软骨退行性变和轻度 OA,在造模结束后观察到损伤后软骨下骨快速丢失,骨小梁快速恢复,关节间隙骨变窄。该模型具有易于实现,造模时间较短并且与人类慢性劳损相似度高度的优点。但也具有一定局限性,该造模系统在工作后 8 周内仅产生轻度 OA,对于较严重的 OA 模拟性较低^[13]。同样适用胫骨加压装置,Poulet 等进行改进实现了多次加载后模拟更加严重损伤的 OA^[14]。但若缺乏适当的负荷,如固定不动,可导致软骨变薄,蛋白多糖含量降低,这也可导致 OA 的发生。Imai 等将 16 只兔采用弹力单向牵引下颌固定颞下颌关节,4 周后取出被牵拉的颞下颌关节组织,发现关节中下颌部分向前移位、关节畸形、软骨部分损坏及骨赘形成。双侧均可见关节内纤维粘连,模拟了人类颞下颌关节紊乱,为以后的研究

基金项目:国家自然科学基金(81873316)

国家自然科学基金(81673994)

¹ 天津中医药大学第一附属医院骨伤科(天津,300381)

[△]通信作者 E-mail:draifeng@163.com

提供了一个简洁的动物造模模型^[15]。

2 药物诱发造模

多种化合物注入实验动物的膝关节后,可以诱导实验动物出现类似人 KOA 的病理改变。由此可见,关节内环境与关节软骨代谢关系密切相关,该造模方法是研究药物治疗较理想的方法。常用的药物包括木瓜蛋白酶、胶原蛋白酶、尿激酶型纤溶酶原等。关节内注射碘乙酸盐、木瓜蛋白酶、胶原蛋白等化学物质,可破坏关节软骨结构从而诱导 OA^[16]。

2.1 木瓜蛋白酶

木瓜蛋白酶关节腔内灌注可诱导猪、鼠、兔等实验动物各类关节炎,其优点在于造模速度快、可进行重复、与造模效果与人类自然损伤类似。何俊君发现与正常实验兔比较,通过关节腔注射 4% 木瓜蛋白酶造模组的软骨表面略不平整,但无明显裂纹,软骨细胞分层欠规整,偶有软骨细胞聚集;滑膜表面增生显著,有炎性细胞侵入。且关节 Lequesne 和 Mankin's 评分均变高,皮肤温度增高,关节宽度增宽^[17],为了对不同关节炎造模方式效果进行横向比较,谭启钊将前交叉韧带切除手术组,木瓜蛋白酶关节腔注射组,以及卵巢切除术组三类造模方式进行比较,发现 8 周后前交叉韧带切除手术组和木瓜蛋白酶关节腔注射组软骨破坏比较严重,但卵巢切除术组软骨变化较轻^[18]。

关节内注射木瓜蛋白酶等化学物质诱导 OA 的过程中往往要使用其他化学催化剂,柳占彪提供了一种新型的造模催化方式“凝胶缓释法”,该方法以木瓜蛋白酶 0.05 mL(1.6 U)/关节剂量注入膝关节,并创造性的提出以温度作为催化剂,将关节局部在 50 ℃ 环境下作用 2 h,通过观察造模后大鼠关节肿胀、运动障碍和压痛的程度、以及病理组织学分析来评价该模型以及新型催化方式,结果显示:采用该造模方法得到的 OA 模型与中医上“肾虚血瘀型”膝关节炎相对应,与西医上“Kellgren-Lawrence 影像学分级”2 级关节损伤相对应,该操作成功克服了传统木瓜蛋白酶造模法中由于首次注药后关节肿胀而导致后期注药的困难,且简单易行,造模时间短,重复性好,成功率高(98%),适宜于“肾虚血瘀型”以及“KL 分型”2 级关节炎药物的动物模型使用^[19]。

2.2 碘乙酸盐

碘乙酸盐具有破坏关节软骨以及周围韧带等软组织的作用,将其注射至关节腔后还可以改变关节内力学环境,破坏其关节内稳态,改变软骨等新陈代谢。Pomonis 等研究了注射碘乙酸盐对比木瓜蛋白酶诱导大鼠以疼痛为主要症状的膝关节 OA,并通过影像学分析评估了关节退行性变,发现注射碘乙酸盐较木瓜蛋白酶能更好的诱以疼痛为主要症状的慢性关节变

性^[20]。对于注射碘乙酸盐、木瓜蛋白酶、胶原蛋白等化学物质的造模特性并不明确。

2.3 胶原酶

胶原酶同样也是破坏关节软骨的一种化学物质,关节内注射胶原酶是通过消化软骨中的胶原蛋白和引起关节不稳定来诱导关节变性的一种造模方法。吕庆列使用 II 型胶原酶制作大鼠腰椎旁小关节炎症,发现注射 II 型胶原酶后软骨表面明显退化,软骨细胞明显减少,软骨出现大面积损伤、开裂,甚至脱落,改良 Mankin 评分显著升高,同时软骨基质蛋白多糖表达明显减少并出现了骨质疏松。关节内胶原酶注射和前交叉韧带横切作为无创手段以及创伤手段的造模代表,Hermeto 比较上述两种方法对兔骨关节炎的造模效果。其研究将 10 只成年兔随机分为胶原酶组和前交叉韧带切开术两组。胶原酶组采用 0.5 mL 胶原酶溶液注射处理,前交叉韧带切开组采用前交叉韧带治疗。发现 12 周后,关节形态、宏观评分、组织学检查均显示前交叉韧带切开组得分最高,软骨损伤较胶原酶注射组严重。

2.4 雌激素

雌激素与雌激素受体结合,包括雌激素核受体和雌激素膜受体,通过不同的机制保护关节软骨,且临床上绝经后肥胖妇女膝关节 OA 发生率明显增加,通常与雌激素过多有关。李勇等发现雌激素有促进关节炎形成的作用,其软骨组织中基质金属蛋白酶-1、白介素-1 表达较高,而二型胶原和 Notch2 的表达较低。

2.5 其他药物

菲律宾素、肾上腺皮质激素、透明质酸酶、软骨碎片或异物等注入实验动物关节腔,也可导致关节软骨的退变^[21]。

3 手术方式造模

通过手术方式使膝关节不稳定,关节应力发生变化,引起关节的退行性改变。关节应力负荷过大或不足改变软骨结构,刺激致炎细胞因子和蛋白酶的产生,破坏关节软骨合成,加速软骨基质的分解代谢,最终导致关节软骨的退变。

3.1 交叉韧带切除

交叉韧带的主要作用在于防止关节腔内股骨髁与胫骨平台前后相对移动,当交叉韧带切除后关节腔力学稳定性下降,导致关节软骨磨损加重。Pond-Nuki 模型是首个使用手术创伤手段制造的 OA 动物模型,其首次动物实验是通过切断狗的前交叉韧带模拟 OA。随后,该团队进一步将膝关节韧带切除术应用于小鼠 OA 模型,其关键技术在于使实验动物内侧半月板(DMM)失稳,导致术后 2 周后软骨退化,契合大部分人类 OA 特征^[22]。目前,该 OA 模型仍应用于大部

分 OA 研究中。但由于手术的并发症,此操作对关节周围组织的干扰会部分影响造模的精准性。Martin Libicher 等研究 Pond-Nuki 模型的模拟效果,其团队使用 Pond-Nuki 造模方法对 24 条比格犬进行手术造模,发现 12 周后,所有交叉韧带切除的膝关节均出现关节软骨后内侧面不规则,24 周内通过 CT 显示,关节后内侧面软骨表面被侵蚀,内侧半月板被破坏。24 周后,6 个膝关节中有 4 个出现后内侧面骨赘,48 周后所有手术膝关节均出现明显的关节损坏,且表现出不同程度的膝关节积液。说明在手术 6 周后到晚期关节变性 48 周后,Pond-Nuki 造模方法可成功的模拟早期骨关节炎的变化,包括软骨侵蚀,半月板变性和骨赘形成^[23]。Antonio Pozzi 等对 Pond-Nuki 模型交叉韧带切除后下肢生物力学特征进行研究,发现在交叉韧带横切后,膝关节接触压力峰值转移到胫骨平台的尾侧,使得平台中,前区域接触压力减少。这导致后方软骨以及半月板压力大于中前方。

3.2 Hulth 法

采用 Hulth 法是经典的手术造模方法。切除实验动物前后交叉韧带、内侧副韧带及内侧半月板,造成关节失稳、关节面的摩擦增加以及半月板所起的缓冲作用缺失,术后 12 周可得到 KOA 模型^[24]。方锐等通过 Hulth 法制作骨关节炎模型,造模后 6 周为早期改变,8 周为中期,12 周为晚期,体现了骨关节炎软骨从早期的代偿性增生,至失代偿后软骨细胞减少,软骨变软到剥脱缺失的过程。电镜下观察结果与组织学观察结果相符^[25]。

3.3 划痕技术

“划痕技术”作为手术手段中创伤最小的方法近年来使用较多^[26]。2002 年,Marijnissen 创建了一种犬科动物的退行性软骨损伤模型来模拟 OA,其研究使用 10 条比格犬,在不损伤软骨下骨的情况下,在其股骨髁负重区通过“划痕技术”破坏关节软骨,术后 10 周增加关节负荷。随后对关节损伤和炎症进行评估,并与 Pond-Nuki 模型进行比较。组织学分析显示,在“划痕”模型中,软骨损伤周围有软骨细胞聚集,蛋白多糖减少。滑膜炎症较轻。软骨的生化分析显示了基质蛋白多糖增加、蛋白多糖含量、胶原损伤等符合 OA 特征,与 Pond-Nuki 模型造模结果相似。在技术的优点在于开口小,防止大范围的软组织损伤,且不易感染^[27]。Mastbergen 进一步确定此模型退化特征是否可以代表 OA 渐进特征,其对 20 条雌性的比格犬右膝关节股骨髁负重区关节软骨进行“划痕”损伤,术后强迫负重。术后 10 周发现骨关节炎特征^[28]。

4 其他方式造模

肥胖是导致骨关节炎发生以及发展的最重要的因

素,同时也是最可能预防的危险因素之一。大量研究表明,BMI 与膝盖、脚和手的骨关节炎发生有很强的联系。Collins 认为肥胖是制造 OA 动物模型的一种新方法,其通过前交叉韧带切开术大鼠模型与高脂/高蔗糖饮食诱导肥胖模型(DIO)对比,探讨肥胖模型的可行性以及模型质量。让大鼠连续 12 周食用高脂肪/高蔗糖或食物,发现肥胖模型与对侧肢体机械干扰模型以及与前交叉韧带切开术大鼠模型在关节功能以及理化检查结果方面均相似,提示肥胖可能以非机械方式诱导 OA^[29]。

5 展望

膝关节退行性骨关节炎研究中,动物模型很大程度上提高了研究者对 OA 的病理生理学理解,并将在未来继续成为高价值的研究工具^[30]。但由于各 OA 模型各有优缺点,目前并不存在单一的动物模型可以完美地模拟人类 OA 的所有方面。较小的动物更适合用于基础病理生理学研究以及早期治疗干预,大型动物模型更适合进行人体临床试验之前的预试验^[31]。无创模型可以较精准的模拟人类原发性 OA,而手术模型更接近于再现人类剧烈创伤后 OA^[32]。膝关节退行性骨关节炎临床治疗呈现阶梯化治疗趋势,精准治疗和保膝治疗是未来治疗方向。在 OA 研究领域内无论选择哪种模型,都应该尽早采用标准化的组织学评价体系。这为以后膝关节退行性骨关节炎基础和临床研究提供科学合理的动物模型做出贡献。

参考文献

- [1] THOMAS A C, HUBBARD-TURNER T, WIKSTROM E A, et al. Epidemiology of posttraumatic osteoarthritis [J]. Journal of Athletic Training, 2016, 52(6): 491-496.
- [2] MILLER R E, MALFAIT A M. Osteoarthritis pain: what are we learning from animal models? [J]. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2017, 31(5): 676-687.
- [3] SANTOS F M, DIAS R S, DE OLIVEIRA M D, et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2019, 13(5): 73-75.
- [4] ISHIJIMA M, KANEKO H, OKADA Y, et al. Cartilage/chondrocyte research and osteoarthritis: current concept and future perspective for diagnosis and treatment of osteoarthritis of the knee [J]. Clinical Calcium, 2018, 28(6): 749-759.
- [5] LIANG D, SUN J, WEI F, et al. Establishment of rat ankle post-traumatic osteoarthritis model induced by malleolus fracture [J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2017, 18(1): 464-472.
- [6] BLANDINE P. Non-invasive loading model of murine osteoarthritis [J]. Current Rheumatology Reports, 2016, 18

- (7):1-7.
- [7] 王波,梁松,李媛,等. 滤泡辅助性 T 细胞及 Th9 在可诱导共刺激分子基因敲除小鼠类风湿关节炎模型中的作用[J]. 国际免疫学杂志,2018,41(5):509-513.
 - [8] 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.
 - [9] 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性因子的影响[J]. 中国医药,2016,11(10):1524-1529.
 - [10] 陈文超,周然,王永辉,等. 骨灵膏及其拆方对骨关节炎模型大鼠炎性细胞因子与聚蛋白多糖酶的影响[J]. 中医杂志,2016,57(3):245-249.
 - [11] DELL'ISOLA A, SMITH S L, ANDERSEN M S, et al. Knee internal contact force in a varus malaligned phenotype in knee osteoarthritis(KOA)[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*,2017,25(12):2007-2013.
 - [12] 于咏,李心乐,刘大全,等. 机械加载减轻骨关节炎小鼠的病理进展[J]. 天津医药,2019,47(5):479-483.
 - [13] CHRISTIANSEN B A, ANDERSON M J, LEE C A, et al. Musculoskeletal changes following non-invasive knee injury using a novel mouse model of post-traumatic osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2012,20(7):773-782.
 - [14] POULET B, HAMILTON R W, SHEFELBINE S, et al. Characterising a novel and adjustable non-invasive murine knee joint loading model[J]. *Arthritis Rheum*,2011,63(1):137-147.
 - [15] IMAI H, SAKAMOTO I, YODA T, et al. A model for internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit[J]. *Oral Diseases*,2010,7(3):185-191.
 - [16] LAMPROPOULOU ADAMIDOU K, LELOVAS P, KARADIMAS E V, et al. Useful animal models for the research of osteoarthritis[J]. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*,2014,24(3):263-271.
 - [17] 何俊君,黄泽灵,张应生,等. 早期骨关节炎动物模型的建立与评价[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2019(4):358-360.
 - [18] 谭启钊,牛国栋,赵振达,等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点[J]. 中国实验动物学报,2019,34(4):450-455.
 - [19] LIU A, WANG P, ZHANG J, et al. Restoration effect and tribological behavior of hyaluronic acid reinforced with graphene oxide in osteoarthritis[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*,2019,19(1):91-97.
 - [20] POMONIS J D, BOULET J M, GOTTSCHALL S L, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain[J]. *Pain*,2005,114(3):339-346.
 - [21] 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.
 - [22] WENZ W, HORNUNG C, CRAMER C, et al. Effect of glucosamine sulfate on osteoarthritis in the cruciate-deficient canine model of osteoarthritis[J]. *Cartilage*,2017,8(2):173-179.
 - [23] POZZI A, KIM S E, CONRAD B P, et al. Ex vivo pathomechanics of the canine Pond-Nuki model[J]. *PLoS One*,2013,8(12):e81383.
 - [24] 李炳辉,牛东生,孙玺淳,等. 直立负重法与 Hulth 法建立兔膝关节关节炎模型的对比研究[J]. 宁夏医科大学学报,2013,35(3):256-258.
 - [25] 方锐,卢勇,孟庆才,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,2010,14(7):1218-1222.
 - [26] HERMETO L C, ROSSI R, JARDIM P H, et al. Comparison between two different experimental models of osteoarthritis in rabbits; intra-articular collagenase injection and anterior cruciate ligament transection[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*,2016,31(9):602-607.
 - [27] MARIJNISSEN A C, VAN ROERMUND P M, TEKOPPELE J M, et al. The canine 'groove' model, compared with the ACLT model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2002,10(2):145-155.
 - [28] MASTBERGEN S C, MARIJNISSEN A C, VIANEN M E, et al. The canine 'groove' model of osteoarthritis is more than simply the expression of surgically applied damage[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2006,14(1):39-46.
 - [29] COLLINS K H, REIMER R A, SEERATTAN R A, et al. Using diet-induced obesity to understand a metabolic subtype of osteoarthritis in rats[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2015,23(6):957-965.
 - [30] 黎丹东,李琳琳,张旭辉. 膝关节关节炎非手术治疗的动物实验研究进展[J]. 医学综述,2018,24(10):2057-2063.
 - [31] 谭启钊,牛国栋,赵振达,等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点[J]. 中国实验动物学报,2019,27(4):450-455.
 - [32] MAERZ T, NEWTON M D, KURDZIEL M D, et al. Articular cartilage degeneration following anterior cruciate ligament injury: a comparison of surgical transection and noninvasive rupture as preclinical models of post-traumatic osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2016,24(11):1918-1927.

(收稿日期:2019-11-04)