

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.

Tan QZ, Niu GD, Zhao ZD, et al. Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat models of osteoarthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):450 – 455.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2019. 04. 005

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

谭启钊¹,牛国栋²,赵振达¹,李思维¹,宋纯理²,冷慧杰^{1*}

(1. 北京大学第三医院骨科,北京 100191; 2. 北京脊柱疾病重点实验室,北京 100191)

【摘要】 目的 探讨不同骨关节炎(osteoarthritis, OA)动物模型中软骨下骨和关节软骨的病理改变特征。

方法 采用三种SD大鼠骨关节炎模型,将24只6月龄雌性大鼠随机分为4组:假手术对照组(Sham, $n=6$),前交叉韧带切除手术组(ACLT, $n=6$),木瓜蛋白酶关节腔注射组(Papain, $n=6$),以及卵巢切除手术组(OVX, $n=6$)。造模后8周取膝关节,胫骨平台行Micro-CT扫描分析,关节软骨行甲苯胺蓝染色、Mankin评分,比较软骨下骨和关节软骨改变情况。结果 造模操作后8周,不同OA模型的软骨破坏程度有所不同。ACLT和Papain组软骨破坏比较严重,OVX组软骨变化较轻。所有OA模型中的软骨下松质骨均发生改变,OVX组相对于Sham对照组,软骨下骨微结构显著疏松,而ACLT组与Papain组相对于Sham对照组,软骨下骨微结构没有显著改变,但相对于OVX组,有显著性差异。三种OA模型的软骨下骨板厚度都较Sham组减少。结论 三种动物模型软骨下骨和关节软骨都发生明显病理改变,并且改变有所不同。不同OA模型代表不同病理,预示着软骨下骨所发挥的作用有所不同,这为进一步研究不同类型OA发生发展的机制,以及将软骨下骨作为OA治疗的可能靶点提供了更多的依据。

【关键词】 骨关节炎;骨关节炎动物模型;关节软骨;软骨下骨;骨小梁分析

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2019) 04-0450-06

Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat models of osteoarthritis

TAN Qizhao¹, NIU Guodong², ZHAO Zhenda¹, LI Siwei¹, SONG Chunli², LENG Huijie^{1*}

(1. Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China.

2. Beijing Key Lab of Spine Diseases, Beijing 100191)

Corresponding author: LENG Huijie. E-mail: lenghj@bjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the pathological changes of subchondral bone and cartilage in different osteoarthritis

(OA) models. Methods Three Sprague Dawley (SD) OA models were used and twenty-four female rats were divided into four groups randomly: control group (Sham, $n=6$), anterior cruciate ligament transection operations group (ACLT, $n=6$), papain joint cavity injection group (Papain, $n=6$) and ovariectomy group (OVX, $n=6$). After 8 weeks, all knee joints were extracted. Subchondral bone specimens from tibia plateau were scanned, and trabecular parameters were obtained. Articular cartilage specimens were stained by toluidine blue, and OA was scored according to Mankin's histological grading system. Results After 8 weeks, the OA severity of cartilage are different for different OA models. Severe cartilage damage was observed in the ACLT and Papain groups. Only mild cartilage damage was occurred in the OVX group. Subchondral bone in all OA models also changed at week 8 post operation. Subchondral trabecular bone in the OVX group became looser than the Sham group. Subchondral

【基金项目】国家自然科学基金(11872076,11472017,11002004)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (11872076,11472017,11002004).
【作者简介】谭启钊(1992—),男,硕士,主要从事骨性关节炎方面的研究。Email: tanqz@bjmu.edu.cn
【通信作者】冷慧杰(1975—),男,博士,副研究员,主要从事骨与关节生物力学研究。Email: lenghj@bjmu.edu.cn

trabecular bone in the ACLT group and Papain group didn't change significantly compared with the Sham group, but had significant difference from the OVX group. Thickness of subchondral bone plate in all groups became thinner than the Sham group. **Conclusions** Both subchondral bone and cartilage changed with OA progress for all the three OA animal models. Those alterations in different OA models are different, which implies that subchondral bone might play different roles for different types of OA. This study will provide us more evidences to further investigate mechanisms of different types of OA and more insight to treat subchondral bone as an OA therapeutic target.

[Keywords] osteoarthritis, OA; animal model; articular cartilage; subchondral bone; trabecular analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种全球性的疾病, 60 岁以上的妇女的发病率为 50% 以上, 已经日益成为危害人类健康和加重社会负担的重要因素^[1]。骨关节炎最主要的特征表现为关节软骨的破坏缺损。然而, 软骨在关节中并不是孤立的组织, 与其相连的组织均对其退变发挥着作用, 尤其是软骨下方直接相连的骨骼 (软骨下骨), 更是引起了学者们的注意, 甚至有学者将软骨和软骨下骨作为一个整体来看待^[2]。近年来越来越多的研究表明软骨下骨代谢改变在 OA 进程中发挥重要作用, 甚至有研究认为软骨下骨是 OA 治疗的靶点^[3-5]。创伤型 OA 模型, 如前交叉韧带切除术 (anterior cruciate ligament transection, ACLT), 因为其成模快, 模型较成熟, 目前很多关于软骨下骨与 OA 关系的研究都是基于该模型展开^[4]。OA 的发病原因多样, 除了运动创伤病因外, 还有退行性、激素改变等因素。软骨下骨的改变在不同病因导致的 OA 中表现和所发挥的作用还并不明确。文献中常用的 OA 动物模型包括 ACLT^[6]、关节腔注射木瓜蛋白酶 (Papain)^[7]、双侧卵巢切除术 (ovariectomy, OVX)^[8] 等, 它们代表了不同病因的 OA。不同模型的 OA 软骨退变进程不一样, 同时, 软骨下骨代谢也有所不同。目前已经有研究比较了创伤性 OA 模型和软骨降解酶注射 OA 模型软骨下骨的变化特征^[9]。OVX-OA 模型中软骨下骨可能表现与其他模型不同, 所发挥的作用可能也不相同。本研究假设不同类型 OA 中软骨和软骨下骨的病理改变机制不同, 对不同病因的三种 OA 模型软骨与软骨下骨同时观察, 并进行模型之间的横向比较, 希望有助于人们更深刻的认识软骨下骨对软骨代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠, 24 只, 体重 (250±

15) g, 来源于北京大学医学部实验动物科学部【SCXK(京)2016-0010】, 进行编号, 根据编号随机抽取, 分为 4 组: 假手术对照组 (Sham, $n=6$), 前交叉韧带切除手术组 (ACLT, $n=6$), 木瓜蛋白酶关节腔注射组 (Papain, $n=6$), 以及卵巢切除手术组 (OVX, $n=6$)。大鼠在北京大学医学部实验动物部【SYXK(京)2016-0041】进行适应性饲养一周。饲养环境温度 (20±2)℃, 相对湿度为 40%~50%, 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由活动。

1.1.2 主要试剂和实验仪器

甲苯胺蓝试剂 (Amresco, 美国); 木瓜蛋白酶试剂 (美仑生物, 中国); EDTA 脱钙液 (博士德, 中国); 4% 多聚甲醛 (Biosharp, 中国); 戊巴比妥钠 (北京岚泰化工科技公司, 中国); 抗生素 (北京大学第三医院药房, 中国); micro-CT (Siemens, 美国); 梯度自动脱水机 (Leica, 德国); 全景数字病理切片扫描分析装置 (滨松, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备

(1) ACLT 诱导的骨关节炎模型

6 只 SD 大鼠于造模前 12 h 禁食, 用 2% 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 用量为 30 mg/kg, 待其麻醉后进行术前剃毛, 常规消毒, 铺巾, 在膝前正中切口切开, 皮肤皮下组织, 找到白色髌腱, 沿其内侧切开关节束, 同时使其膝关节过伸后屈曲膝关节找到前交叉韧带, 用眼科剪切断, 恢复其正常伸直位, 之后进行髌骨复位, 逐层缝合关节囊, 皮下组织和皮肤, 在缝合前再一次消毒, 并在术后进行抽屉实验验证确实切断了前交叉韧带。在术后每天注射抗生素连续注射 3 d, 预防术后感染。

(2) 木瓜蛋白酶注射模型

6 只 SD 大鼠在造模前 12 h 禁食, 手术时用 2% 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 用量 30 mg/kg, 等待其麻醉后取仰卧位, 在其膝关节髌骨下缘前内侧注射 100 μL 2% 的木瓜蛋白酶, 在 4, 7 d 分别再注射

一次。

(3) 卵巢切除动物模型

6 只雌性 SD 大鼠在手术前 12 h 禁食,手术用 2%戊比妥钠腹腔麻醉,待其麻醉后,剔除其腰椎旁到股骨处毛发,取俯卧位,酒精消毒,脊柱旁 1.5 cm 处小切口切开背部皮肤,分离皮下脂肪,找到卵巢和子宫拉出后,紧贴卵巢下部结扎卵巢动脉,手术剪紧贴结扎线减掉卵巢,纱布适当止血后,用生理盐水冲洗伤口后,逐层缝合肌层和皮肤。术后每天注射抗生素连续注射 3 d,预防术后感染。

1.2.2 标本收取

在术后 8 周用 10%过量麻醉法分别处死各组大鼠,取其膝关节,仔细剔除肌肉等周围软组织后,放入 4%的多聚甲醛溶液中固定 24 h。

1.2.3 Micro-CT 扫描重建

对膝关节标本进行扫描,扫描电压与电流分别设置为 80 kV,500 μ A,扫描后进行重建,重建好的图像分辨率为 13 μ m。将胫骨平台钙化软骨以下、髌线以上区域作为感兴趣区域,对骨体积百分比、骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度、软骨下骨板厚度参数进行分析。

1.2.4 软骨组织染色与 OA 评分

扫描重建完成后的标本放入 0.5 mol/L 的 EDTA 溶液中脱钙 5 周,每 3 d 换液一次,脱钙后用手术刀沿冠状位切取标本,大小为 1 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm,之后进行流水冲洗 10 h,酒精脱水。经自动梯度脱水机进行后续脱水。石蜡包埋,进行连续切片,厚度为 5 μ m,切片行甲苯胺蓝染色。每个标本随机选择 3 个切片,每个切片根据软骨结构完整性、细胞排列方式、软骨基质染色、潮线情况等进行 Mankin 法 OA 评分^[10]。

1.3 统计学方法

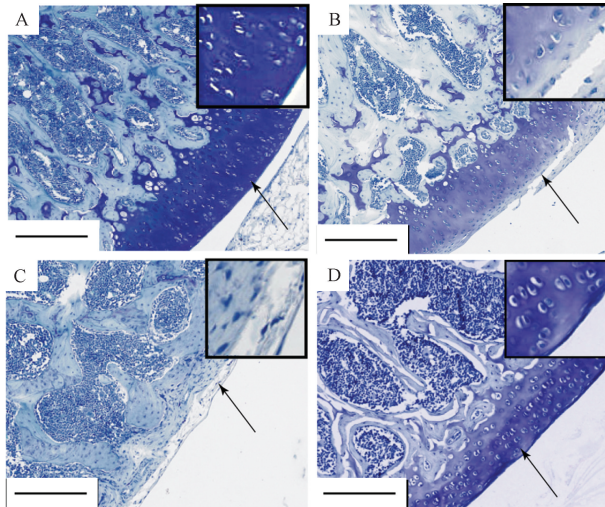
采用 SPSS 18 对 4 组间进行单因素方差分析,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差表示,检验值为 *P*,认为 *P*<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 关节软骨组织切片观察和 Mankin 评分结果

如图 1 所示,8 周后对照组软骨结构比较完整,细胞排列整齐,未见明显软骨缺损(图 1A)。ACLT 组软骨边缘出现结构破碎,表层出现毛糙,染色变浅。深层出现水平和垂直裂隙,染色缺失(图 1B)。木瓜蛋白酶组软骨整体结构破坏严重,软骨层变

薄,有些部位近乎消失,软骨细胞出现大范围缺失。软骨部位出现肉芽组织,并且与骨髓腔相通(图 1C)。OVX 组软骨大体结构完整,软骨表面出现少量多糖流失及少量毛糙,透明软骨表层稍有不平(图 1D)。



注:A. 假手术对照组;B. ACLT 手术组;C. 木瓜蛋白酶组;D. 卵巢切除组(bar=250 μ m)。

图 1 软骨甲苯胺蓝染色(箭头指示了软骨表面区域)
Note. A.Sham, B. ACLT, C. Papain, D. OVX(bar=250 μ m)。

Figure 1 Histological changes of articular cartilage in the rats(Toluidine blue staining)

根据 Mankin 法对手术后 8 周的各组软骨切片进行评分,各组的各分项评分如图表 1 所列,总分如图 2 所示。对于不同的 OA 模型,术后 8 周时,木瓜蛋白酶注射组 Mankin 评分最高,软骨破坏最为严重,OVX 组 Mankin 评分最低。各实验组除 OVX 组外,与 Sham 组相比较,均有显著性差异。

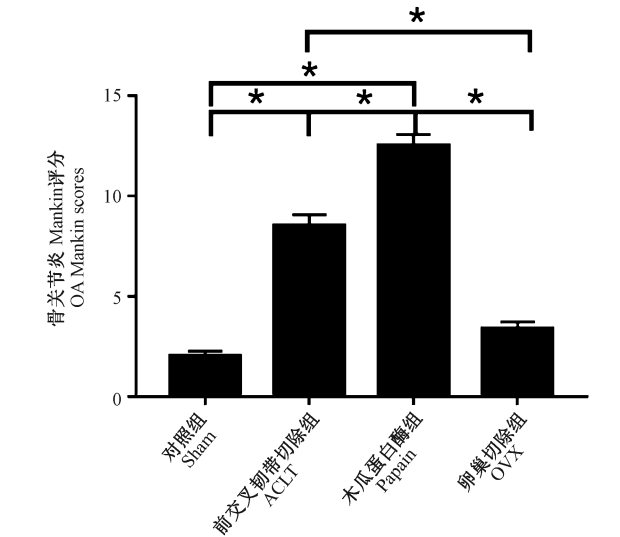
2.2 不同 OA 模型胫骨平台软骨下骨骨小梁参数

OVX 组与正常对照组相比 BV/TV 减低,较 ACLT 组也减低,且均有统计学差异。OVX 组与对照组和 ACLT 手术组相比骨小梁分离度增大,两者均有显著性差异。骨小梁厚度 ACLT 手术组较对照组稍高,OVX 组稍低,木瓜蛋白酶注射组与对照组基本相等,三组与对照组相比差异无显著性。OVX 组骨小梁数量与其他三组相比降低,且差异有显著性。ACLT 组骨小梁容积百分比、骨小梁数量显著高于 Papain 组,骨小梁分离度显著小于 Papain 组。三个实验组与对照组相比软骨下骨板厚度都减少,差异有显著性。(图 3,图 4)

表 1 各组 Mankin 方法 OA 评分($\bar{x}\pm s$)

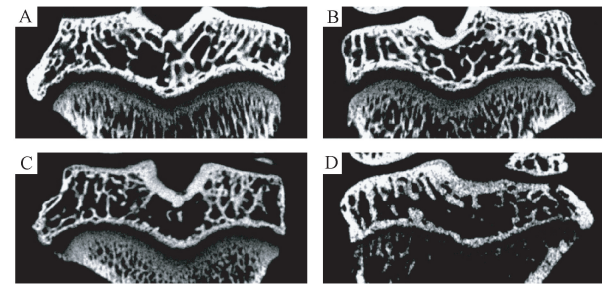
Table 1 OA scores of all groups by Mankin's histological grading system($\bar{x}\pm s$)

分组 Groups	结构 Structure	细胞形态 Cellularity	基质染色 Matrix staining	软骨缺损 Cartilage defect	潮线完整性 Tidemark integrity	其他缺损数量 Number of other defects
对照组 Sham	0.00±0.00	0.00±0.00	1.00±0.57	1.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
前交叉韧带切除组 ACLT	2.00±0.00	1.33±0.72	1.33±0.72	1.50±0.74	2.00±0.00	0.33±0.72
木瓜蛋白酶组 Papain	2.33±0.72	2.00±0.79	3.00±0.00	3.00±0.00	2.00±0.82	0.17±0.64
卵巢切除组 OVX	0.00±0.00	1.00±0.57	1.33±0.72	1.00±0.79	0.00±0.00	0.00±0.00



注: * $P < 0.05$ 。(下同)
图 2 各组关节 Mankin OA 评分
Note. * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Mankin OA scores of articular cartilages in all groups



注: A. 假手术对照组; B. ACLT 手术组; C. 木瓜蛋白酶组; D. 卵巢切除组。
图 3 胫骨平台软骨下骨 Micro-CT 图像
Note. A. Sham, B. ACLT, C. Papain, D. OVX.

Figure 3 Micro-CT images of subchondral bones of different rat groups

3 讨论

本研究关注软骨下骨在 OA 进展中的作用这一热点问题,通过选取不同大鼠 OA 模型来探讨不同病理因素导致 OA 情况下,软骨以及软骨下骨在 OA

进展中的变化特点。研究显示,代表不同病理的 OA 模型在造模 8 周时,软骨缺损和软骨下骨微结构变化程度不同,提示软骨下骨可能发挥不同作用。

软骨是 OA 中最被人们所关注的部位。我们的研究发现,同样造模 8 周,软骨缺损程度 OVX 组最弱,仅出现了类似蛋白聚糖流失的表面退变;ACLT 组软骨缺损相对比较严重,某些部位已经出现了表层以及深层的缺损与破坏;Papain 组最为严重,软骨已经近乎完全破坏,肉芽组织增生。这三种 OA 模型的软骨缺损结果与文献中观察基本一致^[8-12]。有一点值得注意,OVX 组的 OA 评分虽然均值高于 Sham 组,但没有统计性差异。这是因为 OVX-OA 表征 OA 的最初期变化,其软骨缺损主要表现为软骨表层蛋白多糖的流失,尚未造成结构的显著改变,对经典的 OA 评分系统不敏感。Hoegh-Andersen 等^[8]认为宜采用表面缺损评分系统来评价此类初期 OA。

软骨下骨在 OA 进程中发挥的作用越来越受到人们重视,不过目前还没有研究对不同病理 OA 情况下软骨下骨的作用进行比较。研究结果显示,OVX 组相对于 Sham 对照组,软骨下骨微结构显著疏松,而 ACLT 组与 Papain 组相对于 Sham 对照组,软骨下骨微结构没有显著差异,但相对于 OVX 组,有统计性差异。在我们研究的三种 OA 模型中,ACLT 组通过手术手段令软骨所处的力学环境失稳,从而造成软骨磨损加剧,快速缺损。Papain 组通过关节腔直接注射木瓜蛋白酶,通过化学刺激,直接令软骨降解,极速缺损。ACLT 和 Papain 这两种模型直接针对软骨组织,因此软骨缺损快。两者相比较,ACLT 是力学作用,相对较慢;Papain 是化学作用,相对更快。这两种模型中软骨下骨处于相对被动地位,在第 8 周时,并未发生显著变化,因此可能没有对软骨的退变起到关键作用。而 OVX-OA 模型的主要手段是降低雌激素水平,而雌激素缺乏直接导致骨量流失和骨质疏松^[13],因此研究发现软骨下骨微观结构的改变显著高于其他两个模型,而

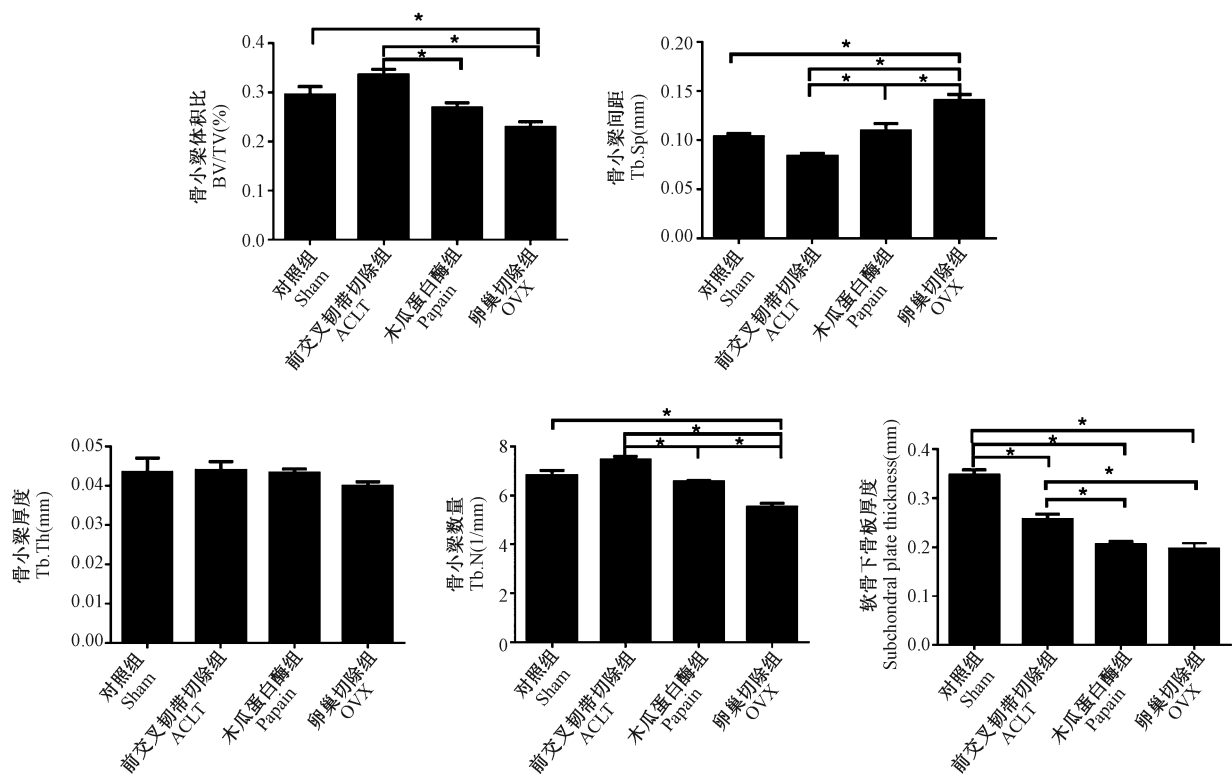


图 4 胫骨平台软骨下骨骨小梁结构分析结果

Figure 4 Trabecular analysis of subchondral bone by Micro-CT imaging

软骨缺损轻微。OVX-OA 中,软骨下骨的改变可能对软骨造成力学与生物学环境的改变,从而对软骨的缺损起到更重要的作用。在大多数 OA 人群中, Papain 和 ACLT 类似的 OA 只占少数,因此在临床实践中,软骨下骨对 OA 中的作用不容忽视。

有趣的是,软骨下骨骨板厚度这一指标在不同 OA 动物模型中均相对于 Sham 组显著减少。这个结果与 Femke 等的研究结果相似,他发现在 ACLT 和软骨破坏 OA 模型早期软骨下骨板厚度即可出现减少。有研究已经发现软骨下骨板厚度改变和软骨破坏有关系,软骨下骨骨板在 OA 中变薄可能是面对软骨持续缺损的调节改变^[14-16]。我们研究发现 OVX-OA 软骨下骨板同样变薄。因为 OVX-OA 软骨缺损并不显著,因此骨板变薄的机理可能与其他两个模型不一样,具体机制还有待进一步探讨。我们的研究发现软骨下骨板在不同模型中变化趋势一致,而骨小梁结构变化趋势不一致,可能也说明软骨下骨板在 OA 进程中可能会起一个更重要的作用。

综合文献中的研究和本研究的结果看,不同的 OA 造模方法可以造成软骨损伤与软骨下骨结构变化的差异,这可能是由于不同的 OA 模型代表了不

同的 OA 发病机制。其中,关节腔注射胶原蛋白降解酶类的 OA 模型造模速度快,但与临床常见 OA 情况有所差异;ACLT 与 OVX 模型在临床上有对应的患者人群,尤其是 OVX-OA 对应的绝经后妇女的 OA 的患者人群相对较大。我们在实验研究中要根据研究目的选择合适的 OA 模型;在临床 OA 诊断治疗中,要具体问题具体分析,找准靶点,在合理的时间点进行合理的治疗干预。

参 考 文 献(References)

[1] Sun BH, Wu CW, Kalunian KC. New developments in osteoarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2007, 33(1): 135-148.

[2] Li GY, Yin JM, Gao JJ, et al. Subchondral bone in osteoarthritis; insight into risk factors and microstructural changes [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(6):223-235.

[3] Stewart HL, Kawcak CE. The importance of subchondral bone in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. Front Vet Sci, 2018, 5: 178.

[4] Coughlin TR, Kennedy OD. The role of subchondral bone damage in post-traumatic osteoarthritis [J]. Ann Ny Acad Sci, 2016, 1383(1): 58-66.

[5] Zhu S, Chen K, Lan Y, et al. Alendronate protects against articular cartilage erosion by inhibiting subchondral bone loss in ovariectomized rats [J]. Bone, 2013, 53(2): 340-349.

- [6] Boileau C, Martel-Pelletier J, Fahmi H, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone reduces the development of cartilage lesions in an experimental dog model of osteoarthritis; in vivo protective effects mediated through the inhibition of key signaling and catabolic pathways [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(7): 2288–2298.
- [7] 杨峰, 史宗道. 用木瓜蛋白酶建立兔颞颌关节骨关节炎模型的研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(5): 330–332
Yang F, Shi ZD. A study on Appain-induced osteoarthritis in rabbit temporomandibular joint[J]. *West China J Stomatol*, 2002, 20(5): 330–332.
- [8] Hoegh-Andersen P, Tanko LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis; validation and application [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(2): R169-R180.
- [9] 余国荣, 查振刚, 汪飞, 等. 软骨下骨量变化与软骨退变的相关性[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(20): 3134–3140.
She GR, Zha ZG, Wang F, et al. Correlation between subchondral bone mass and cartilage degeneration [J]. *Chin J Tissue Engin Res*, 2015, 19(20): 3134–3140.
- [10] Salo PT, Hogervorst T, Seerattan RA, et al. Selective joint denervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(6): 1256–1264.
- [11] Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 1998, 6(3): 177–186.
- [12] Coughlin TR, Kennedy OD. The role of subchondral bone damage in post-traumatic osteoarthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1383: 58–66.
- [13] Wang Y, Liu Z, Wang Q, et al. Early detection of tibial cartilage degradation and cancellous bone loss in an ovariectomized rat model [J]. *Biomed Res Int*, 2017: 9654056.
- [14] Sniekers YH, Intema F, Lafeber FP, et al. A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models [J]. *BMC Musculoskel Dis*, 2008, 9(20): 11.
- [15] McCann MR, Yeung C, Pest MA, et al. Whole-body vibration of mice induces articular cartilage degeneration with minimal changes in subchondral bone [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25: 770–778.
- [16] Zhen GH, Wen CY, Jia XF, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(6): 704–712.

[收稿日期] 2019-01-17