

兔膝关节关节炎模型的建立及评价^{*}

欧慧瑜 李瑞鹏 邵珍怡 郭秋平

(广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心, 广州 510240)

摘要:目的 通过兔软骨缺损制备兔膝关节关节炎模型并进行评价。方法 将动物按体质量和性别随机分成3组:假手术组,模型组和阳性对照氨基葡萄糖组,每组12只。造模4周后开始灌胃给药,每天1次,连续给药4周。末次给药后,将动物处死,ELISA试剂盒检测血清及关节液中IL-1 β 和TNF- α 水平,对关节软骨和滑膜进行HE染色,并对关节软骨进行Mankin's评分以评价其损伤情况。结果 与假手术组相比,模型组血清、关节液中IL-1 β 、TNF- α 水平明显升高,而给予氨基葡萄糖可降低血清、关节液中IL-1 β 、TNF- α 水平。HE染色见模型组软骨结构改变、缺损,滑膜有炎细胞浸润;软骨评分明显高于假手术组。给予氨基葡萄糖可以减轻软骨缺损,减少滑膜炎细胞浸润,降低软骨评分。结论 关节软骨钻孔可建立兔膝关节关节炎模型,反映其主要特征,并能通过给予阳性对照药减轻损伤和炎症反应。该模型可用于治疗关节炎药物的评价和筛选。

关键词:软骨缺损;关节软骨;软骨下骨;兔

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)04-0018-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.005

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是由机械和生物因素引起的以关节软骨退行性病变和滑膜炎性病变为主要特征的慢性疾病^[1-2],导致患者出现疼痛和功能障碍,严重影响其生活质量。建立一种能模拟OA发病过程的模型,对于筛选和评价治疗OA的药物非常重要。关节软骨的直接损伤可以引起骨关节炎病变或软骨再生,这主要取决于损伤的部位,损伤的大小和动物的年龄^[3]。本研究中使用6月龄新西兰兔,通过关节软骨钻孔致软骨缺损成功制备了兔OA模型。

1 材料与方法

1.1 试剂

盐酸氨基葡萄糖胶囊(浙江诚意药业股份有限公司);6%戊巴比妥钠;白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.2 实验动物

新西兰兔(雌雄各半,6月龄),由山东济南金丰

实验动物有限公司提供(许可证号SCXK(鲁)2014-0006)。动物饲养于普通级动物房,温度16~26℃,相对湿度40%~70%,12h照明/12h黑暗交替,动物自由摄食和饮水。本实验遵守广东省实验动物保护和指南,并经药物非临床评价研究中心的实验动物伦理委员会批准。

1.3 仪器与设备

电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);3-18k高速冷冻离心机(德国Sigma公司);Elx800酶标仪(美国Bio Tek公司);病理切片机(德国Leica公司),OLYMPUS BX41显微镜和DP71+IPP6.0图像采集系统。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组:将检疫合格的动物,根据体质量和性别随机分成3组:假手术组,模型组和阳性对照氨基葡萄糖(剂量为0.034 g/kg)组,每组12只,雌雄各半。每天观察各组动物的食量、大小便、精神状态等。

1.4.2 造模方法:取36只新西兰兔,用6%戊巴比妥钠(0.7 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉动物。左侧膝

收稿日期:2018-11-29

^{*} 基金项目:广州市科信局生物产业重大专项(No.201300000053)

作者简介:欧慧瑜(1976—),女,高级工程师,研究方向:药理毒理.E-mail:ohy_76@126.com

通信作者:郭秋平(1978—),女,高级工程师,研究方向:新药安全性评价.E-mail:vipvivenguoguo@126.com

部内侧纵向切口,长约 2 cm,将髌骨翻向外侧,显露髌骨关节面。检查膝关节腔有无积液或粘连,关节软骨平坦,色泽正常后,先用直径 2 mm 钻头在膝关节屈曲 90°时髌骨所对应股骨内、外侧髁间关节面中部初步定位,钻出小凹陷,然后换 4.2 mm 的钻头在此基础上钻出直径 4.2 mm、深 3 mm 的关节软骨缺损区。将髌骨复位,逐层缝合关节囊和皮肤切口。术后立即肌肉注射青霉素钠以防止感染。假手术组的动物仅暴露髌骨不钻孔,其余操作方法与上述描述相同。造模 4 周后,各组动物开始灌胃给药,每天 1 次,连续给药 4 周。各组动物的给药体积均为 10 mL/kg。假手术组和模型组给予相同体积的 CMC-Na 溶液。

1.5 检测指标

1.5.1 血清和关节液中 IL-1β 和 TNF-α 检测:末次给药后,动物静脉采血,静置 2 h 后,分离血清,置于 -20 ℃ 冰箱保存待测。用注射器抽取 1 mL 生理盐水注入关节腔冲洗,抽出冲洗液,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,置于 -20 ℃ 冰箱保存。按照 ELISA 试剂盒说明书,检测血清和关节液 IL-1β 和

TNF-α 水平。

1.5.2 组织病理学观察:采血结束后,处死动物,将各组动物造模侧的关节软骨和滑膜组织用 4% 甲醛溶液固定,脱水,包埋,切片后进行 HE 染色。参照 Mankin's 评分标准对关节软骨进行评分^[4],验证 OA 模型是否复制成功。

1.6 统计方法

结果以平均值±标准差表示,采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。用单因素方差分析(ANOVA)进行总体比较,发现差异再用 Dunnett 法进行多个剂量组与阴性对照组间的两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清、关节液中 IL-1β 和 TNF-α 水平

造模 8 周后,模型组动物血清、关节液中 IL-1β、TNF-α 水平明显高于假手术组($P<0.05$);而连续 4 周给予氨基葡萄糖后,动物血清、关节液中 IL-1β、TNF-α 水平明显下降($P<0.05$),结果见表 1。

表 1 动物血清、关节液中 IL-1β 和 TNF-α 水平 ($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 1 L-1βbeta and TNF-α in the serum and joint fluid($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量 /(g/kg)	血清		关节液	
		IL-1β/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
假手术组	—	87.8±17.3	124.7±45.4	16.9±1.1	45.6±3.5
模型组	—	133.8±31.7 [#]	242.8±102.4 [#]	25.4±7.7 [#]	77.4±32.2 [#]
阳性对照组	0.034	95.7±21.3 [*]	151.6±41.1 [*]	17.7±3.0 [*]	47.0±4.8 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$
Note: compared with model,[#] $P<0.05$; compared with sham,^{*} $P<0.05$

2.2 关节软骨 HE 染色

造模 8 周后,假手术组动物关节软骨及周围组织正常,关节面完整,无炎细胞浸润;模型组动物软骨表面不连续,交界处有裂隙,两端整合不良,潮线

模糊不清;氨基葡萄糖组动物损伤部位以纤维组织增生为主,内有多量软骨细胞,软骨表面连续,交界处无裂隙,两端整合良好,结果见图 1。

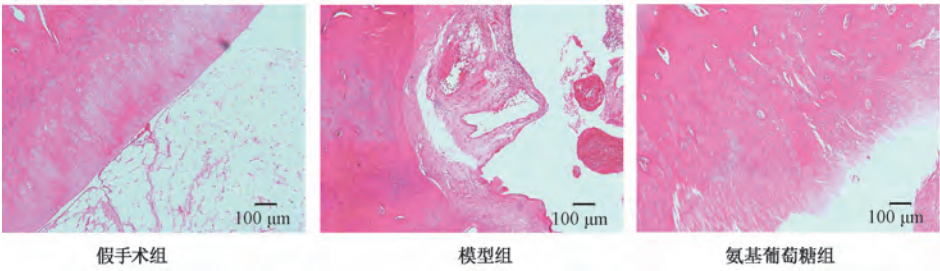


图 1 兔膝关节软骨病理图(HE 染色)
Fig.1 Pathology of articular cartilage of Rabbit Knee Joint

2.3 关节软骨 Mankin's 评分

造模 8 周后,模型组动物软骨组织评分为 7.3 分,与假手术组相比明显升高($P<0.05$)。连续 4 周给予氨基葡萄糖后,动物软骨组织评分为 5.1 分,与模型组相比明显降低($P<0.05$),结果见表 2。

2.4 滑膜组织 HE 染色

造模 8 周后,假手术组动物滑膜衬层细胞未见增生、肥大、炎细胞浸润;模型组动物滑膜衬层细胞增生、肥大,全层均有显著炎细胞浸润;氨基葡萄糖

组动物滑膜衬层细胞增生、肥大,伴有少量炎细胞浸润。结果见图 2。

表 2 关节软骨 Mankin's 评分($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Mankin's score of articular cartilage($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(g/kg)	软骨组织评分
假手术组	—	0
模型组	—	7.3±1.2 [#]
阳性对照组	0.034	5.1±1.0 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$
Note: compared with model,[#] $P<0.05$; compared with sham,^{*} $P<0.05$

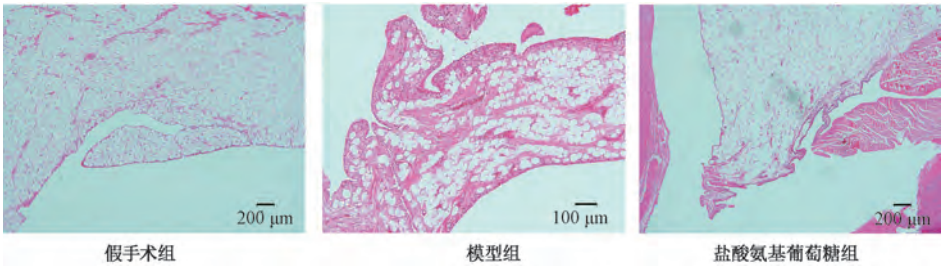


图 2 兔膝关节滑膜组织病理图(HE 染色)
Fig.2 Synovial Histopathology of Rabbit Knee Joint

3 讨论

骨关节炎(OA)是慢性、退变性的关节疾病,多发于中老年人群,导致患者的生活能力丧失甚至残疾。随着社会人口老龄化,每年的 OA 患者人数都在增加,给社会造成了沉重的经济负担^[5]。目前临床上常用的药物如盐酸氨基葡萄糖、非甾体类抗炎药,仅能缓解症状,而且长期服用还会出现胃肠道不适等不良反应^[6]。因此,迫切需要研究 OA 的发病机制,开发新的治疗药物。

理想的 OA 动物模型应该有大小、结构、软骨损伤、疾病进程等都与人类相似的关节,采用相同的诱导方法可成功复制模型,而且动物的年龄能模拟 OA 患者^[7]。目前常用的 OA 模型制备方法有手术法和非手术法,非手术法有化学法、自发性、转基因模型等^[8]。近年采用较多的方法是手术法,如 Hulth 模型^[9]、改良的前交叉韧带切断模型^[10]等,通过手术可迅速造成关节不稳而诱导 OA,损伤严重,不能模拟 OA 慢性疾病的发病进程,不利于表现药物的干预作用。化学法是在关节腔内注射木瓜蛋白酶、胶原酶等^[11-12],但是造模程度难以确定。自发性 OA 模型动物更接近 OA 的发病进程,但是耗费

时间较长,成本较高^[13]。转基因模型通过编辑基因获得基因缺陷的动物,可用于研究特定基因在 OA 发病中的作用,但成本较高。

OA 最初是以关节软骨损伤为主,研究表明狗关节软骨缺陷(1.5 mm 直径,0.5 mm 深度)3 周后可形成温和的 OA 病变^[14]。这种模型接近 OA 发病过程,损伤较轻,造模程度可以控制,也可用于其他种属动物,如啮齿类动物,兔,马等^[3]。本研究采用兔关节软骨钻孔造成软骨缺陷(4.2 mm 直径,3 mm 深度),造模 8 周后,模型组出现软骨结构改变,缺损和滑膜炎细胞浸润等 OA 的特征,而且阳性药物可以改善模型的这些症状。因此,该模型可为治疗 OA 药物的评价提供参考。

参考文献

[1] Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of osteoarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2013, 39(1) :1-19.
[2] Neogi T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(9) :1145-1153.
[3] Ahern B J, Parvizi J, Boston R, et al. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(6) :705-713.
[4] Rutgers M, van Pelt M J, Dhert W J, et al. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and

- osteoarthritic cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, **18**(1):12-23.
- [5] Litwic A, Edwards M H, Dennison E M. *et al.* Epidemiology and burden of osteoarthritis [J]. Br Med Bull, 2013, **105**:185-199.
- [6] Taruc-Uy R L, Lynch S A. Diagnosis and treatment of osteoarthritis [J]. Prim Care, 2013, **40**(4):821-836.
- [7] Abramson S B, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2009, **11**(3):227.
- [8] Kuyinu E L, Narayanan G, Nair L S, *et al.* Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes [J]. J Orthop Surg Res, 2016, **11**:19.
- [9] Mapp P I, Avery P S, McWilliams D F, *et al.* Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, **16**(1):61-69.
- [10] Elsaid K A, Zhang L, Shaman Z, *et al.* The impact of early intra-articular administration of interleukin-1 receptor antagonist on lubricin metabolism and cartilage degeneration in an anterior cruciate ligament transection model [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, **23**(1):114-121.
- [11] Patel D V, Sawant M G, Kaur G. Evaluation of anti-osteoarthritic activity of Vigna mungo in papain induced osteoarthritis model [J]. Indian J Pharmacol, 2015, **47**(1):59-64.
- [12] Adães S, Mendonça M, Santos T N, *et al.* Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2014, **16**(1): R10.
- [13] Liu W, Burton-Wurster N, Glant T T, *et al.* Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels [J]. J Orthop Res, 2003, **21**(4):730-737.
- [14] 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.

Establishment and evaluation of a model of osteoarthritis in the rabbit knee

OU Huiyu, LI Ruipeng, SHAO Zhenyi, GUO Qiuping

(Drug nonclinical evaluation and research center of Guangzhou pharmaceutical research institute, Guangzhou 510240, China)

Abstract: Objective To establish and evaluate a rabbit model of knee osteoarthritis induced by articular cartilage defect. **Method** The animals were randomly divided into 3 group, the sham group, the model group and the positive control glucosamine group, each group of 12 animals. After 4 weeks, the drugs were administrated intragastrically once daily for 4 weeks. After the last administration, the animals were executed. ELISA kits were used to detect the level of IL-1 β and TNF- α in the serum and joint fluid. The articular cartilage and synovial membrane were stained by HE staining. Mankin's score was used to assess articular cartilage damage. **Result** Compared with the sham group, the level of IL-1 β and TNF- α in the serum and joint fluid of the model group was significantly increased, while that of glucosamine decreased the level of these inflammatory cytokines. HE staining showed the structural changes and defects of cartilage, and the synovial membrane was infiltrated by inflammatory cells in the model group. The score of cartilage was significantly higher than that of the sham group. Glucosamine can reduce cartilage defects, reduce the infiltration of synovitis cells and reduce the score of cartilage. **Conclusion**

Articular cartilage drilling is able to establish the rabbit model of knee osteoarthritis, reflect the main features of osteoarthritis. The injury and inflammation induced by the model can be reduced by administrating with positive drug. Therefore, this model can be used for the evaluation and screening of arthritis drugs.

Key words: Osteochondral defect; Articular cartilage; Subchondral bone; Rabbit