

单碘乙酸诱导 SD 大鼠膝骨性关节炎模型 在不同时间点与疾病进程的评价

肖昆林¹, 张蕊², 孙红³, 肖昆太¹, 马建兵²

(1. 广州市花都区人民医院, 广州 510800;

2. 西安交通大学附属红会医院, 西安 710054;

3. 厦门大学医学院, 厦门 361000)

[摘要] 目的 用单碘乙酸(MIA)诱导膝骨性关节炎(OA)大鼠模型, 于不同时间点进行检测和评估, 分析与临床 OA 发病进程的相似性。方法 24 只 2 月龄雄性 SD 大鼠, 随机分为 OA 模型组(18 只)和正常对照组(6 只)。适应性喂养 3 d 后, 模型组大鼠右膝关节腔内注射 2 mg MIA (溶于 50 μ L 生理盐水), 对照组大鼠右膝关节腔内注射等量的生理盐水, 注射后 1 周、2 周和 4 周分别处死模型组和对照组中的大鼠, 收集各组大鼠膝关节软骨组织标本, 分别进行形态学观察、组织学染色和 OA 软骨组织病理学评估系统(OOCHAS)评分。结果 模型组大鼠在造模 1 周、2 周和 4 周后出现关节软骨组织的损伤, 软骨细胞数量减少, 潮线模糊, 甲苯胺蓝和番红 O 染色变淡, 并呈进行性加重趋势; 模型组大鼠 OOCHAS 大体评分和组织学评分随时间的延长显著升高, 造模后 1 周和 2 周相当于疾病早中期, 4 周后相当于疾病晚期。结论 通过关节腔内注射 MIA 成功诱导了膝 OA 大鼠模型, 并将不同时间点的结果与临床疾病进程相联系, 为后期功能和机制研究奠定了基础。

[关键词] 骨性关节炎(OA);单碘乙酸(MIA); 动物模型; OA 软骨组织病理学评估系统(OOCHAS)

[中图分类号] 749.72 Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)01-0047-06

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种可导致患者出现严重残疾的退行性关节疾病, 以关节软骨进行性破坏为主要特点, 膝关节最常受累^[1]。OA 动物模型的建立是研究 OA 发病机制与治疗方法的前提^[2]。目前, OA 动物模型建立的方法主

要有外科手术、关节腔内注射药物和自发性 OA 3 种^[3]。外科手术构建 OA 模型的方法与临床 OA 较为接近, 但同时存在着创伤大、造模时间长等缺点。自发性 OA 模型与临床 OA 最为相似, 但其造模时间过长也不适合大力推广。关节腔内注射药物的建模方法所需时间较短, 在疾病的研究中应用广泛。常见的注射药物有 II 型胶原酶和碘乙酸盐, 碘乙酸盐诱导的大鼠 OA 模型表现为关节软骨破坏, 软骨下骨损伤, 以及炎症和关节疼痛等^[4]。关节腔注射不同剂量单碘乙酸(MIA)及在不同的时间点, SD 大鼠均呈现出 OA 病变, MIA 注射的剂量 1~10 mg/kg 不等, 注射的时间 1~8 周不等^[5,6]。然而目前为止, 尚无研究报道将 OA 疾病的进程和关节腔注射 MIA 的剂量和时间相联系。本研究通过关节腔内注射中等剂量的 MIA, 诱导膝

[收稿日期] 2019-07-25

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(2018JM7081), 陕西省自然科学基金资助项目(2018JM7039), 西安市卫生局科研项目(No.J2019020030)

[作者简介] 肖昆林(1989-), 外科医师, 从事骨科疾病的基础与临床研究。E-mail: 982357227@qq.com
共同第一作者: 孙红(1990-), 硕士研究生。
E-mail: 928617284@qq.com

[通信作者] 马建兵(1973-), 主任医师, 从事骨科疾病的基础与临床研究。E-mail: 13299028888@163.com

OA 大鼠模型, 分别于注射 MIA 后 1 周、2 周和 4 周处死大鼠进行观察、检测和关节软骨组织病理学(OOCHAS)评分, 并与临床 OA 的发病进程相联系, 为后期 OA 发病和治疗机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 2 月龄雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量(210 ± 18) g, 2 月龄购自西安交通大学医学部动物实验中心[SCXK(陕)-2018-001]。动物实验在西安市红会医院转化医学中心进行,[SYXK(陕)2015-002]动物实验通过西安市红会医院伦理委员会审查通过(编号 IACUC2017-0819)。

1.2 实验试剂及主要仪器设备

MIA、戊巴比妥均购自美国 Sigma 公司; 微量注射器购自上海高鸽公司; 乙二胺四乙酸(EDTA)购自科昊生物公司; 质量分数 4% 多聚甲醛溶液购自 Boster 公司; OCT 购自 Tissue-Tek 公司; HE 染色试剂盒、甲苯胺蓝染色试剂盒均购自 Solarbio 公司, 冰冻切片机、解剖显微镜均购自 Leica 公司等。

1.3 膝骨性关节炎动物模型的建立

将 SD 大鼠随机分成 2 组, 即模型组(18 只)和对照组(6 只)。2 组大鼠均用 3% 的戊巴比妥钠 1 mL/kg 腹腔注射麻醉后, 取右膝关节备皮, 模型组大鼠右膝关节腔内注射溶于 50 μ L 生理盐水的 2 mg MIA, 对照组大鼠右膝关节腔内注射等量的生理盐水, 随后将大鼠放回笼内饲养(每笼 3 只), 自由饮食。

1.4 形态学观察及膝关节 OOCHAS 大体评分

关节腔内注射 1 周、2 周和 4 周后, 模型组大鼠采用空气栓塞法处死每组各 6 只大鼠, 对照组采用同样的方法处死每组各 2 只大鼠, 解剖取膝关节股骨髁和胫骨平台软骨组织, 置于解剖显微镜下观察并拍照。根据关节色泽、平滑度、关节液性状以及关节面的磨损情况进行膝关节 OOCHAS 大体评分, 本研究采用双盲法进行评分。0 分: 关节面形态正常; 1 分: 关节面具有轻微的纤维化(磨损、龟裂或剥落)或关节面轻微黄染; 2 分: 关节软骨缺损累计软骨浅层和中层; 3 分: 关节面缺损达软骨深层; 4 分: 关

节面缺损累计软骨全层, 乃至软骨下骨。

1.5 标本处理及切片制作

将关节标本置于质量分数 4% 的多聚甲醛溶液中固定, 72 h 后取出, 置于质量分数 12.5% 的 EDTA 溶液中脱钙 2 周, 随后放入 30% 的高糖溶液进行沉糖, 48 h 后取出, 用冰冻切片包埋剂(OCT)进行包埋, 于冰冻切片机中制作 7 μ m 厚冰冻切片, 并放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.6 组织学染色及 OOCHAS 组织学评分

将组织切片分别进行伊红-苏木素(HE)及甲苯胺蓝染色, 并在光学显微镜下对染色结果进行拍照。根据关节软骨结构、蛋白多糖含量、软骨细胞聚集及数量、潮线完整度等方面, 采用双盲法进行 OOCHAS 组织学评分, 累计 0~12 分为轻度症状, 13~24 分为重度症状。

1.7 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间多重比较用 Newman-Keuls 检验, 用 SPSS18.0 软件对实验结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膝关节面形态学观察

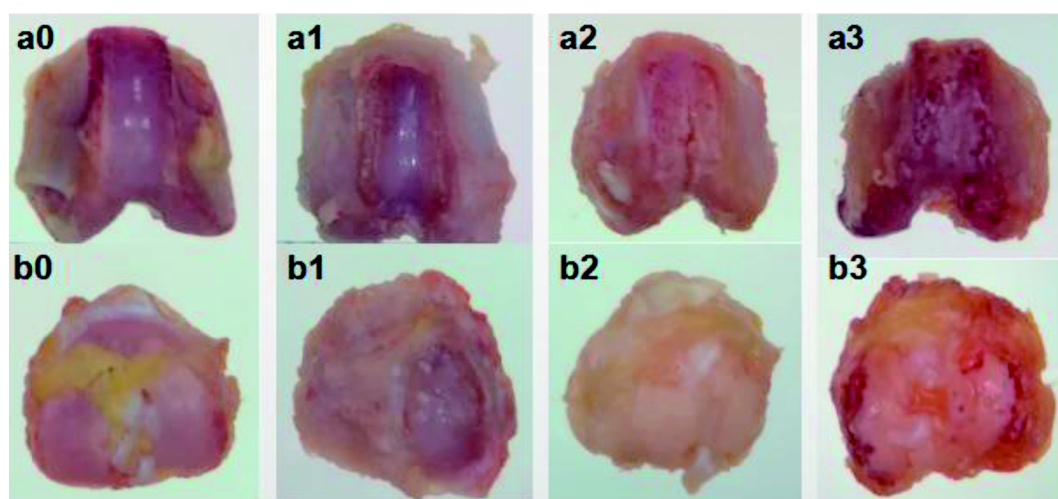
图 1 结果显示, 对照组大鼠膝关节软骨面光滑, 外观呈淡紫色, 软骨面无充血、裂纹等。模型组大鼠造模 1 周后关节软骨面略微粗糙, 有小的裂隙且色泽灰暗; 造模 2 周后关节软骨面粗糙, 光泽度消失, 软骨缺损深达软骨中下层; 造模 4 周后软骨缺损累及软骨全层, 并深达软骨下骨, 股骨髁和胫骨平台软骨剥脱。

2.2 膝关节软骨组织 OOCHAS 大体评分

对照组大鼠 OOCHAS 大体评分为 0, 造模 1 周和 2 周大鼠表现为关节软骨的轻度损伤, 4 周表现为轻重度。单因素方差分析结果显示, 造模后 3 个时间点大体评分分值差异具有统计学意义(图 2)。两组间多重比较结果显示, 造模 2 周和 4 周相对于 1 周, 4 周相对于 2 周, 分值均显著提高, 其中 4 周相对于 1 周, 差异最显著。

2.3 膝关节组织学染色结果

对照组大鼠(图 3a、图 4a)软骨表层无裂隙, 表层细胞呈梭形, 近似水平排列; 中间层细胞为



a 为股骨髁, b 为胫骨平台, 0、1、2、3 分别为对照组及模型组 1 周、2 周和 4 周

图 1 大鼠膝关节组织形态学观察

Figure 1 Morphological observation of rat knee joint

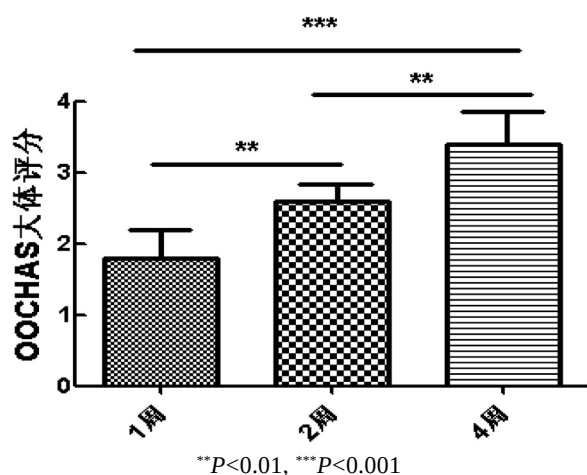


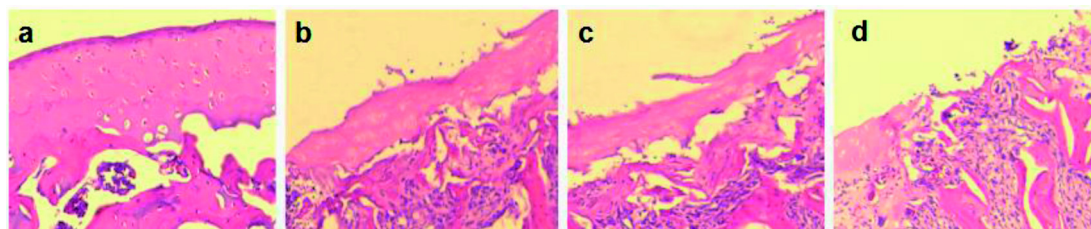
图 2 大鼠膝关节软骨组织 OOOHAS 大体评分

Figure 2 Rat knee joint OOOHAS gross score

圆形, 散在分布; 深层细胞呈柱状排列; 潮线清晰; 钙化层细胞较大, 呈散在分布, 软骨基质着色基本均匀。造模 1 周后见大鼠软骨面出现小的裂隙, 软骨细胞数量轻度减少, 潮线模糊, 甲苯胺蓝染色轻度变淡(图 3b、图 4b)。造模 2 周后大鼠关节软骨组织破坏明显, 软骨细胞数目明显减少, 潮线消失, 甲苯胺蓝染色明显变淡(图 3c、图 4c)。造模 4 周后大鼠关节面缺损深达软骨下骨, 潮线周围有新生血管出现, 甲苯胺蓝染色显著变淡(图 3d、图 4d)。

2.4 OOOHAS 组织学评分结果

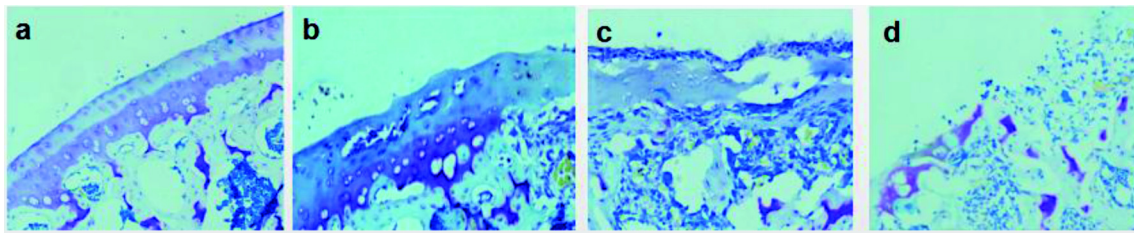
对照组大鼠 OOOHAS 组织学评分为 0, 模型



a 为对照组, b、c、d 分别为模型组 1 周、2 周和 4 周

图 3 大鼠膝关节组织 HE 染色结果

Figure 3 Representative histological images of HE staining after MIA intraarticular injection



a 为对照组, b、c、d 分别为模型组 1 周、2 周和 4 周

图 4 大鼠膝关节组织甲苯胺蓝染色结果

Figure 4 Representative histological images of toluidine blue staining after MIA intraarticular injection

组大鼠 1 周和 2 周表现为轻中度 OA, 4 周后表为轻重度。单因素方差分析结果显示, 造模后 3 个时间点大鼠 OOCAS 组织学评分分值差异具有统计学意义。两组间多重比较结果显示, 造模 2 周和 4 周相对于 1 周, 4 周相对于 2 周, 分值均显著性提高, 其中 4 周相对于 1 周, 差异最显著, 与 OOCAS 大体评分结果一致。

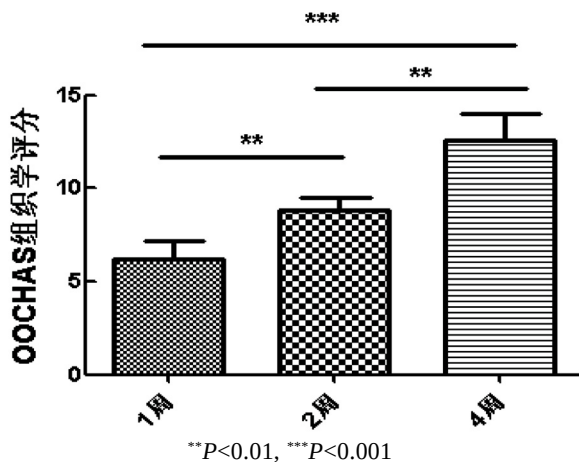


图 5 造模后大鼠膝关节 OOCAS 组织学评分

Figure 5 The result of OOCAS histological score of rat model after MIA intraarticular injection

3 讨论

本研究通过关节腔内注射 MIA 的方法诱导 OA 大鼠模型, 结果显示造模 1 周和 2 周后, 大鼠活动量逐渐减少, 关节软骨面出现了大小不一的缺损, 股骨和胫骨平台软骨变薄, OOCAS 大体评分和组

织学评分显示轻中度 OA 症状, 与临床 OA 早中期软骨退变的表现相似; 造模 4 周后, 大鼠活动量明显减少, 并逐渐出现跛行, 关节软骨面破坏加重, 呈糜烂状, 软骨缺损深达软骨下骨层, OOCAS 大体评分和组织学评分显示轻重度 OA 症状, 与临床晚期的软骨退行性变的表现较为接近。

在以往的研究^[7]报道中, 软骨的病理损伤被作为评估 OA 各项指标的“金标准”。Morais 等^[8]通过关节腔内注射 MIA 的方法建立 OA 大鼠模型, 发现该 OA 模型表现出软骨细胞的变性和凋亡, 即出现了软骨损伤, 最终膝关节间隙变窄, 疼痛加重, 与人的骨关节炎症状相似。进一步证实了关节腔内注射 MIA 建立 OA 大鼠模型是一个良好的方法, 可以在相关研究中推广使用。

OOCAS 评分体系由国际骨关节炎学会 (OARSI) 在 1998 年根据不同种类动物的 OA 软骨组织退变特征和病理学特点所构建, 是一套专门用于 OA 的评分体系, 该评分系统从关节软骨整体结构、蛋白多糖含量、软骨细胞特性、潮线完整度、骨赘形成等五个方面分不同等级对软骨损伤的程度进行评分, 能够实现对 OA 各个时期的病理损伤进行评价^[9]。本研究对膝关节软骨从宏观形态学观察, 组织学染色, OOCAS 评分系统采用双盲法进行评分, 发现 MIA 诱导的膝 OA 大鼠模型, 随着时间的延长, 膝关节软骨呈进行性退变, 软骨细胞外基质蛋白聚糖成分含量逐渐降低, 类似于临床膝 OA 的发病进程。

关节软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型, 通过合成和分解细胞外基质维持软骨细胞外

环境的稳定^[10,11]。细胞外基质成分主要包括 II 型胶原和蛋白多糖^[12]。Roberto 等^[5]通过向大鼠胫股关节腔内注射 MIA, 发现 MIA 对软骨细胞中甘油醛-3 磷酸脱氢酶的活性具有抑制作用, 导致糖酵解中断, 细胞外基质蛋白聚糖合成的数量和质量下降, 从而引起软骨细胞凋亡。软骨细胞的逐渐减少导致关节软骨的组织学和形态学特征改变, 最终产生与人 OA 症状相似的变化^[13,14]。另外, 用关节腔注射 MIA 的方法诱导 OA 动物模型, 还具有创伤小、时间短、可重复性强以及相对容易操作等优点, 已被应用于许多动物实验^[15-17]。虽然 MIA 诱导 OA 大鼠模型的方法已被广泛应用, 但也存在着一些不足之处, 它没有在多个时间点与人 OA 的发病进程相联系和比较, 而本文恰恰弥补了这个不足。

综上所述, 本研究通过关节腔内注射单碘乙酸成功诱导了膝 OA 模型, 并将不同时间点的结果与临床疾病进程相联系, 为后期功能和机制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Flemming DJ, Gustas-French CN. Rapidly progressive osteoarthritis: a review of the clinical and radiologic presentation[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(7):42-47.
- [2] Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes[J]. *J Orthop Surg Res*, 2016, 11(1):19-45.
- [3] 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.
- [4] Hou W, Meng L, Tian L, et al. A systematic comparison between collagen-induced arthritis and pristane-induced arthritis in Dark Agouti rats[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28(4):532-538.
- [5] Guzman RE, Evans MG, Bove S, et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis[J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31(6):619-624.
- [6] Vasudevaraj NS, Elina AR, Jia HW, et al. Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(1):97-105.
- [7] Yamada EF, Salgueiro AF, Goulart ADS, et al. Evaluation of monosodium iodoacetate dosage to induce knee osteoarthritis: relation with oxidative stress and pain[J]. *Int J Rheum Dis*, 2019, 22(3):399-410.
- [8] Morais SV, Czeckzo NG, Malafaia O, et al. Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee[J]. *Acta Cir Bras*, 2016, 31(11):765-773.
- [9] Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(1):13-29.
- [10] Taniguchi Y, Kawata M, Song HC, et al. Regulation of chondrocyte survival in mouse articular cartilage by p63[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(3):598-609.
- [11] Kraan PVD, Matta C, Mobasheril A. Age-related alterations in signaling pathways in articular chondrocytes: implications for the pathogenesis and progression of osteoarthritis-a mini-review[J]. *Gerontology*, 2017, 63(1):29-35.
- [12] Li A, Wei Y, Hung C, et al. Chondrogenic properties of collagen type XI, a component of cartilage extracellular matrix[J]. *Biomaterials*, 2018, 173:47-57.
- [13] Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee[J]. *Pain*, 2004, 112(1-2):83-93.
- [14] Koh YH, Hong SH, Kang HS, et al. The effects of bone turnover rate on subchondral trabecular bone structure and cartilage damage in the osteoarthritis rat model[J]. *Rheumatol Int*, 2009, 30(9):1165-1171.
- [15] 胡培培, 黄芳. 云南白药通过抗炎作用缓解碘乙酸钠诱导的大鼠膝骨关节炎疼痛[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(3):254-259.
- [16] 王菲. 碘乙酸钠诱发膝骨关节炎轴浆运输障碍性神经痛发病机制的研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2016.
- [17] 王宝娟, 郑曙光, 周玉平, 等. 探讨不同浓度碘乙酸钠对家兔早期膝关节骨性关节炎模型的诱导及病理改变[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(3):316-319.

Evaluation of Monoiodoacetic Acid-induced Knee Osteoarthritis SD Rats with Disease Progression at Different Time Points

XIAO Kunlin¹, ZHANG Rui², Sun Hong³, XIAO Kuntai¹, MA Jianbing²

(1. Huadu District People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510800, China;

2. Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710054, China;

3. Xiamen University School of Medicine, Xiamen 361000, China)

[Abstract] Objective To evaluate disease progression of monoiodoacetic acid-induced knee osteoarthritis (OA) rat model at different time points. **Methods** Twenty-four male SD rats at the age of two month were randomly divided into model group (18 rats) and control group (6 rats). In the model group, 2 mg monoiodoacetic acid (MIA) dissolve in 50 μ L saline was injected into the right knee joint of the mice, and the control group mice were injected with the same amount of saline. After 1 week, 2 weeks and 4 weeks respectively, 6 rats in each group were sacrificed, and the joint specimens were collected for morphological observation and histological analysis (HE, toluidine blue, and Safranin O staining). OA cartilage histopathology assessment system (OOCHAS) scoring and histological scoring were performed to evaluate the disease progression. **Results** The model group showed defects in articular cartilage, reduced number of chondrocytes, blurred tide line and lightened toluidine blue and safranin O staining. The severity was aggravated after 1 weeks, 2 weeks and 4 weeks. The OOCAS gross score and histological score was significantly increased with time extended. **Conclusion** The rat model of knee OA was successfully induced by intra-articular injection of monoiodoacetic acid, and the results at different time points were correlated with the clinical disease process, which laid a fundament for later functional and mechanism experiments.

[Key words] Osteoarthritis (OA); Monoiodoacetic acid (MIA); Rat model;

OA cartilage histopathology assessment system (OOCHAS) score