

金晓飞,杨郁鹏,赵季宇,等. 运用制动法建兔 KOA 分期模型的合理性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 78-82.
Jin XF, Yang YP, Zhao JY, et al. Analysis of the rabbit knee osteoarthritis staging model using the braking method [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 78-82.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.05.013

运用制动法建兔 KOA 分期模型的合理性分析

金晓飞*, 杨郁鹏, 赵季宇, 曹韵茗, 李佳茹, 郝重耀

(山西中医药大学第三临床学院, 山西 晋中 030619)

【摘要】 目的 石膏制动建立膝骨关节炎模型的不同分期, 以求为针灸和中医药的精准治疗提供适当的动物模型。方法 选用 40 只大耳白兔, 随机分为模型 1、2、3、4 组, 每组样本量均为 10 只。均采取左后肢伸直位制动, 制动分别为 10 d、20 d、30 d、40 d, 观察兔膝关节的行为、形态和病理表现。结果 模型各组间的 Lequesne MG 行为学评分、JessicaBadendick 大体形态评分变化显著 ($P < 0.05$), 病理检测结果各组阶段性、差异性明显。结论 在膝关节骨性关节炎的造模过程中, 各组间差别显著, 根据其各阶段的最显著表现, 可大致把疾病分为初期、早期、中期、晚期, 在准确辨期的基础上加以针灸或中医药的干预可能有效治疗该病。

【关键词】 膝关节炎; 分期; 行为; 形态; 病理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 05-0078-05

Analysis of the rabbit knee osteoarthritis staging model using the braking method

JIN Xiaofei*, YANG Yupeng, ZHAO Jiyu, CAO Yunming, LI Jiaru, HAO Chongyao

(the Third Clinical College of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619)

【Abstract】 Objective We used plaster immobilization to establish different stages of the knee osteoarthritis model to provide an appropriate animal model for precise treatment of acupuncture and traditional Chinese medicine. **Methods** A total of 40 large-eared white rabbits were selected and randomly divided into model groups (1, 2, 3, and 4), with a sample size of 10 in each group. The left hind limbs were immobilized in the extended position. Immobilization lasted for 10 days, 20 days, 30 days, and 40 days, respectively. The behavior, morphology, and pathological manifestations of the rabbits' knee joints were observed. **Results** Lequesne myasthenia gravis behavior scores and Jessica Badendick general morphology scores changed significantly in each model group ($P < 0.05$). The pathological test result showed a significant phase and difference among the groups. **Conclusions** In the process of modeling knee osteoarthritis, there are significant differences between the groups. According to the most significant manifestations of each stage, the disease can be roughly divided into an early stage, middle stage, and late stage. Intervention of acupuncture or traditional Chinese medicine may be effective in treating the disease.

【Keywords】 knee arthritis; staging; behavior; morphology; pathology

[基金项目] 山西省科学技术厅面上自然基金项目(201801D121353)。

[作者简介] 金晓飞(1974—)男, 博士, 主任医师, 副教授, 主要从事针灸基础研究。E-mail: 47355033@qq.com

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA), 临床常被称膝关节炎、膝骨病、膝骨关节炎等, 中医中也称作“膝痹”“鹤膝风”, 其临床发病原因多样, 且病情多严重。因体质、耐受等不同, 现代医学中尚未有一种方法可以准确诊断其分期^[1-2], 目前该病的临床诊断多采用 DR/CT/MRI 等, 这些技术的使用, 为疾病的诊断提供了一定的参考, 但对疾病的发展分期把握尚有不足, 医者在分期诊断时会存在一定的误诊风险, 进而可能会错失最佳的治疗, 使得病情延误。因此迫切需要一种方法来对膝关节炎进行分期的划分, 以便更好地指导临床应用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 月龄健康清洁级日本大耳白兔 40 只, 雌雄各半, 体重(2.25±0.1) kg, 实验动物由北京市昌扬西山养殖场提供[SCXK(京)2016-0007], 中国食品药品检定研究院检测, 饲养于山西中医药大学实验中心清洁级动物实验室[SYXK(京)2016-0034], 温度 20℃, 湿度 50%~55%, 单笼饲养 50 cm×40 cm×40 cm, 标准饲料喂养, 造模期间兔子自由饮水摄食, 动物实验研究的伦理审批单位为山西中医药大学医学伦理委员会(2020DW086), 实验研究过程做到了 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

石膏绷带(15 cm×460 cm 浙江安吉华埠实业有限公司); 婴儿秤(上海花潮电器有限公司 ER70 型); 切片机(孝感市亚光医用电子技术有限公司 YGQ-III); 石蜡包埋机(孝感市亚光医用电子技术有限公司 YB-6LF); 显微镜(日本尼康株式会社 Nikon H550 L)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

40 只日本大耳白兔, 按照随机数字表进行分组为模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组、模型 4 组, 每组样本量 10 只。

1.3.2 模型制备

改良后的 Videman 法左后肢伸直位固定制动法制备 KOA 模型^[3-4]: 造模前动物禁食 10 h, 采用 3% 乌拉坦耳缘静脉麻醉 30 mg/kg, 剪去左后肢踝关节以上兔毛, 牵拉踝部使膝关节完全伸直位, 先用常规纱布缠绕, 外用棉棒辅助(因为兔膝关节力量较大, 伸直位时用两侧钝头的棉棒行辅助固定, 固定

膝前后), 后用石膏绷带经 20℃~30℃ 热水浸泡 5~10 s 软化后, 从腹股沟到趾头行制动术, 已膝关节髌骨为中心进行缠绕包裹, 足趾不予覆盖留以观察血供, 石膏硬化后, 外层以透明胶纸再次固定, 以防脱落。若绷带松动或脱落及时重新固定。如足趾充血严重或足趾发黑, 立刻拆除绷带, 待肿退后再行固定。如膝部撕咬损伤后一律剔除, 累积制动分别达 10 d、20 d、30 d、40 d, 造模结束 1 周后进行相关取材。

在造模期间各组兔子没有死亡, 膝关节无腐烂等损伤, 造模均达到相应的制动周期, 数据完整, 无脱落。

1.3.3 观察

(1) 行为学观察

分别于造模前 1 d 和各组造模结束后参考改良 Lequesne MG 的膝关节级别评估量表^[5], 对各组兔的膝关节活动情况、疼痛状态、关节肿胀程度等进行检验, 予以评分。

(2) 形态学观察

各组造模结束, 均予以空气栓塞法处死动物, 打开各组膝关节, 取膝周组织, 进行 JessicaBadendick 大体形态评分^[6], 对各组兔的软骨颜色、关节炎范围大小、软骨的质地和厚度等进行评估。

(3) 病理观察(HE 染色)

取下的软骨和韧带, 用 4% 组织固定液固定 24 h, 后常规石蜡包埋, 5 μm 厚度连续切片, HE 染色后显微镜下观察, 要求观察位置固定。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析, 计量资料结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 组内比较采用独立样本 *t* 检验。统计结果以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔膝关节 Lequesne MG 的膝关节级别评估

在膝关节骨性关节炎的发展过程中, 疾病随受损伤时间的延长而出现了明显的阶段变化, 其大致可分为四个阶段, 早期、初期、中期、晚期, 其中晚期的症状最为严重。

如图 1 所示随着造模时间的延长, 膝关节评分呈现上升趋势, 其中造模 1/2/3 组间的差距较为显

著,造模 3/4 组间差距较小。4 组造模后,模型组动物关节部位已经完全僵化,不可弯曲(I 级 0 分,II 级 1-4 分,III 级 5-8 分,IV 级 9-11 分)。

随着造模时间的延长,膝关节的评分呈现上升趋势,其中造模 1/2/3 组间的差异较为显著,造模 3/4 组间差距较小。第 4 组造模后,模型组动物关节部已经完全僵化,不可弯曲。(Lequesne MG 的膝关节评分可分为四级,I 级 0 分,II 级 1-4 分,III 级 5-8 分,IV 级 9-11 分)。本次实验结果可见(图 1A/1B)。

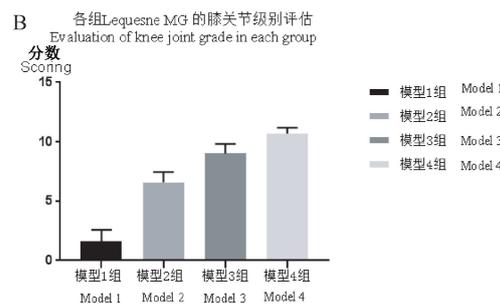
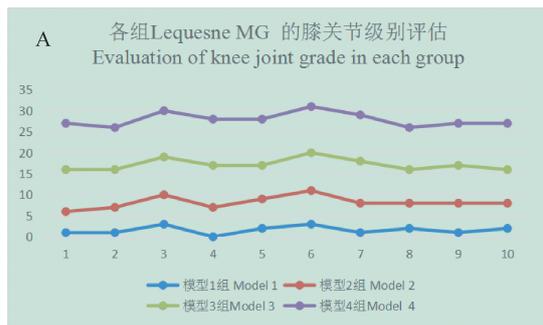
2.2 各组兔膝关节 JessicaBadendick 大体形态评分

图 2 和图 3 为各组结束造模之后的各组关节评分情况和各组软组织取材情况,可见各组差异明显:模型 1 组,在软组织表面出现部分的黄染,光泽减退,组织紧密程度略有改变,但整体致密。模型 2 组组织出现了血色分布,且组织颜色进一步加深,黄染严重,但仍有光泽尚存,组织的紧密度进一步

下降,在组织与关节的连接处已经出现了少量的粘连。模型 3 组组织的软组织血色分布已经沾满了组织的 1/2 以上,组织颜色暗淡无华,组织的紧密度已经出现了部分的降解,关节粘连严重,软组织已经粘连与关节骨面之上。模型 4 组关节的软组织表面已经完全布满血丝,组织变得松软粘稠,不易取出,软组织体积已经达到了最大,与周围的关节粘严重,有的已经完全粘连不易松解。

2.3 关节病理切片观察

图 4 为各组髌韧带 HE 染色结果展示:模型 1 组,染色整体完整,部分出现脱落,血管翳出现较少,细胞核的排列稍微出现不齐,与空白组相比差距较小。模型 2 组,染色脱落严重,血管翳增多,细胞核的排列出现了严重的混乱。模型 3 组,染色脱落严重,血管翳持续增加且血管翳混乱,细胞核着色困难,只有少数可见,排列混乱严重。模型 4 组,染色脱落完全,视野中已经没有细胞核可见,血管翳持续增加,视野中随处可见。

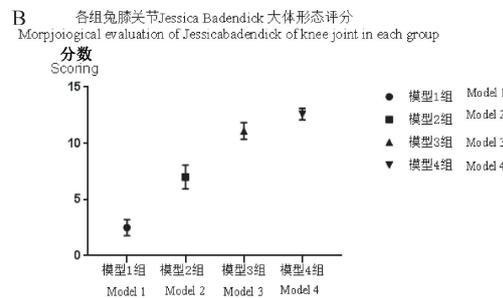
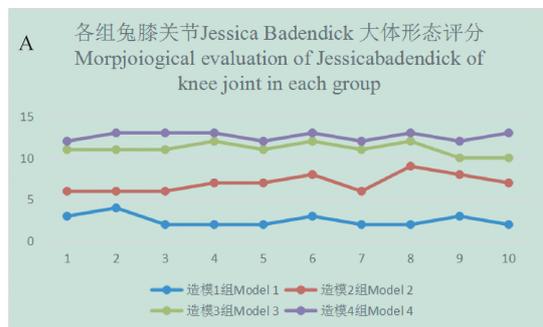


注:图 1B 示,模型各组 Lequesne MG 的膝关节行为学差异显著, $P < 0.05$ 。

图 1 各组 Lequesne MG 的膝关节级别评估

Note. As shown in figure 1B, there were significant differences in the knee behavior of each model group, $P < 0.05$.

Figure 1 Evaluation of knee joint grade in each group



注:B:模型各组组织间兔膝关节 JessicaBadendick 大体形态评分差异显著, $P < 0.05$ 。

图 2 各组兔膝关节 JessicaBadendick 大体形态评分

Note.B, There were significant differences in the gross morphological scores of JessicaBadendick among different tissues of rabbit knee, $P < 0.05$.

Figure 2 Morphological evaluation of jessicabadendick of knee joint in each group

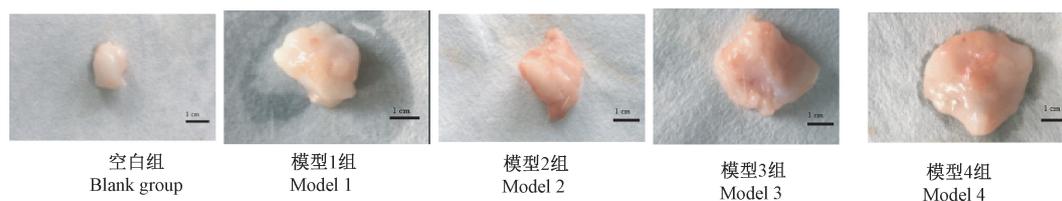


图 3 空白组与模型各组关节软组织取材

Figure 3 The joint soft tissue samples were collected from the blank group and the model group

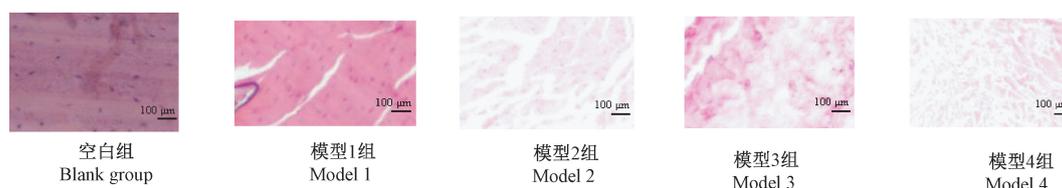


图 4 空白组与模型各组髌韧带 HE 染色结果

Figure 4 HE Staining results of patellar ligament in blank group and model group

3 讨论

膝关节骨性关节炎,作为一种慢性组织损伤性疾病,西医学认为该病的发生是由于局部的损伤,导致的关节软骨的病理性退变使得局部的组织分解、粘连所导致。中医把该病归属于“痹症”^[7],有记载“风寒湿三气杂至,合而为痹”,认为该病的发生是由于多种原因使得膝关节局部气滞血瘀,膝部的经脉、经筋等组织病变,进而产生萎缩、痉挛从而不能发挥其正常的生理功能。目前针对该病的治疗方法多样^[8],(1)非药物治疗:如功能锻炼^[9]、物理疗法和健康教育等^[10]多适用关节炎的早期。(2)西医疗法:非甾体抗炎药、软骨保护剂、关节腔药物注射、手术疗法等^[11]。(3)中医疗法:中医方剂、外用贴敷药、中医针灸等^[12]。(4)其他疗法:基因疗法。由于膝关节炎的发病机制尚未完全清楚,以上的治疗方法均为对现存主要症状的治疗活或改变致病因素,但疾病的发展过程中疾病的外在表现往往略迟于病情的发展。所以合理把握疾病发展的内在分期,继而采取相对应的治疗显得尤为重要。

本课题组采用石膏制动制备模型,经行为学观察和病理检测,成功制造了膝关节炎模型。目前,西医学中对膝关节骨性关节炎尚未进一步划分,中医学中关于膝关节骨性关节炎的分型也尚未有完全统一的认识,其致病因素多为感受风、寒、湿、热等外在致病因素所致以及内在的痰、瘀等病理产物所致,其分型大致分为:气滞血瘀证、湿热痹阻证、寒湿痹阻证、肝肾亏虚证、气血虚弱证^[13],本次实验

是通过石膏制动,使得膝关节局部气血运行受阻,产物代谢失常,膝关节充血,最终制造瘀血型膝关节炎模型。对上述数组实验动物的行为学评分和病理检测进行数据统计与分析,提示组间差距显著。因此我们推测膝关节骨性关节炎的发展进程可大致分为初期、早期、中期、晚期四个阶段。且由于外在的石膏制动持续存在,使得病情的发展呈持续加重的趋势。在制动的早期阶段,关节部组织已经发生了损伤,在组织表面的光泽度已经下降,血管翳虽然尚未出现,但已经有部分的黄染,可能是制动使得局部缺氧导致。中医认为该病的初期阶段外在或者内部的损伤作用,使得膝部的经筋、韧带以及软骨等组织血供出现障碍,因此组织出现了最初的病变,此时只会表现出局部感觉的略微不适,尚不会对日常的生活生产造成影响,因此最容易被忽视,导致疾病的进一步发展。在制动的 20 d 左右,膝部关节的不适感会增强,实验中动物表现出撕咬等状况,且解剖发现组织的光泽度下降,黄染严重,颜色如烟熏,该阶段病情呈加重,不适感进一步加强。在制动的 30 d 左右,膝部的不适感持续增加,解剖可见软组织黏性增强,出现了部分分解,组织分解粘连在关节的活动处,造成了关节活动的障碍,外在表现多为关节的屈伸不利,解除制动,关节活动也有明显的障碍,对生活影响较大。在制动的 40 d 左右,膝部关节已经完全粘连,解除制动屈伸严重受限,解剖可见骨关节已经完全被分解的组织粘连,关节腔严重狭窄。

该次实验模型的制备制备采用了石膏制动法,造模过程中兔左后肢出现了肿胀、充血黑青等外在

表现,肉眼清晰可见,且通过对患者的解剖学观察可见膝关节腔各组织出现了血管翳的错杂分布以及黄染,因此可以充分证明该模型可以对应临床的血瘀型关节炎。中医学中认为瘀血的出现是多种致病因素作用的结果,如:气滞血瘀、痰凝血瘀等。可见瘀血是多种疾病后期的必要表现,在关节炎发生中瘀血几乎可以伴随疾病的发生全过程,且在治疗过程中也常常出现。所以在关节炎的研究中应该予以重视。另外本次实验中我们对制动造模后的 KOA 关节炎进行了分期,这可以说是本文的创新点之一,目前尚未发现此类的研究,本次实验在中医认为的淤血型关节炎基础上,再次结合西医学的病理评分划分分期,有效结合了中西医学关于该病的认识,进而把握该型关节炎,可能为精准医学的发展提供必要的参考,针对不同的分期采取相应的治疗也可能更加有利于关节炎的治疗。

综上所述,损伤是导致关节炎产生的一种重要原因,在膝关节炎的防治中,及早解除外在的损伤性因素可能是最为关键的一环。上述实验可见,关节炎的发展进程中,会有明显的几个阶段,可以大致分为初期、早期、中期、晚期。但是当前的多种技术如 x 线,多通过骨刺的形成来鉴别,我们通过解剖观察认为骨刺的形成可能是多种病理产物堆积的结果,多出现在关节炎的后期,骨刺一旦形成,常规的中药疗法和运动疗法疗效较差。因此合理地尽早地把握各个阶段的病理特征,对症治疗才能更好地防治病情。我们希望对关节炎模型的合理性分期做一种尝试并加以论述,为之后的实验做一定的参考。

参考文献:

- [1] 赵辉. DR、CT 与 MRI 对老年膝关节骨性关节炎的诊断价值分析 [J]. 中外医学研究, 2018, 16(20): 55-57.
- [2] 杨传俊, 邓进. 膝关节骨性关节炎早期诊断研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(6): 140.
- [3] Videman T. Experimental osteoarthritis in the rabbit: Comparison of different periods of repeated immobilization [J]. Acta Orthop Scand, 1982, 53(3): 339-347.
- [4] 金晓飞, 郭长青, 蒋昭霞, 等. 膝骨关节炎模型内侧副韧带的生物力学特性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(43): 8046-8049.
- [5] 金晓飞. 兔膝骨关节炎膝关节韧带生物力学改变及针刀松解法干预的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [6] 张伟. 针刀疗法对 KOA 兔软骨基质降解及 AKT-GSK3 β 、CyclinD1-CDK4/6 通路的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [7] 马影蕊, 张玉倩. 中医对膝关节骨性关节炎的认识与研究 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(25): 146-148.
- [8] 张冰, 王洋, 王建民. 膝关节骨性关节炎的诊断与治疗进展 [J]. 甘肃医药, 2018, 37(3): 204-208.
- [9] 王乙稀, 涂小华. 运动疗法改善膝骨性关节炎疼痛及膝关节功能的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2020, 36(6): 881-884.
- [10] 史爱萍. 运动疗法与健康教育在膝关节骨性关节炎护理中的应用分析 [J]. 中外女性健康研究, 2019, (3): 131, 164.
- [11] 席立成, 李宏宇. 膝关节骨性关节炎治疗方法的研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2015, 8(9): 884-887.
- [12] 王晶, 向福胜, 刘丽, 等. 膝关节骨性关节炎的中西医结合治疗进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(6): 35-38, 48.
- [13] 陈卫衡. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版) [J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.

[收稿日期] 2020-07-22