

欧宝芳, 别亚男, 陈千晴, 等. 改良后 Hulth 法和 II 型胶原酶注射法建立兔膝关节炎模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 29-37.

Ou BF, Bie YN, Chen QQ, et al. Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 29-37.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.02.005

改良后 Hulth 法和 II 型胶原酶注射法建立兔膝关节炎模型的比较研究

欧宝芳¹, 别亚男², 陈千晴¹, 陈柏羽¹, 许佳欢¹, 谢水林^{3*}, 吴少瑜^{1*}

(1. 南方医科大学药学院, 广州 510515; 2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 5114362;
3. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 对比分析兔膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型两种常用造模方法的差异, 为不同类型膝关节炎动物模型的选择提供参考。**方法** 将 9 只健康新西兰大白兔随机分为 3 组: 空白组、改良后 Hulth 组、胶原酶组。改良后 Hulth 组和胶原酶组分别给予改良后 Hulth 法、关节腔内注射胶原酶干预, 1 周后每日促使其活动, 6 周后进行 Lequesne MG 评分、X-ray、Micro-CT、Pelletier 评分、Mankin 评分、ELISA 检测, 观察膝关节大体及病理改变。**结果** 与空白组相比, 两种造模方法的兔膝关节软骨表面均出现缺损; 病理结果显示软骨层出现裂隙, 番红 O 染色减退, 潮线扭曲并伴有血管通过; ELISA 结果显示空白组、改良后 Hulth 组和胶原酶组血清内 TNF- α 含量分别为 (624.99 $\pm$ 17.82), (1140.56 $\pm$ 129.81) 和 (1480.69 $\pm$ 492.08) pg/mL, 血清内 IL-1 β 含量分别为 (30.23 $\pm$ 0.25), (46.67 $\pm$ 0.71) 和 (46.82 $\pm$ 1.04) pg/mL, 改良后 Hulth 组和胶原酶组与空白组相比, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。另外, 改良后 Hulth 组膝关节伴有骨赘生成, 股骨内髁软骨损伤更为严重, 而胶原酶组损伤部位主要为胫骨内髁。**结论** 两种造模方法均能构建理想的 KOA 模型。改良后 Hulth 法的损伤程度更严重; 胶原酶诱导的模型损伤方式更接近人 KOA 进程与发病机制。

【关键词】 膝关节炎; 改良后 Hulth 法; 胶原酶法; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0029-09

Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis

OU Baofang¹, BIE Yanan², CHEN Qianqing¹, CHEN Boyu¹, XU Jiahuan¹, XIE Shuilin^{3*}, WU Shaoyu^{1*}

(1. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. 2. School of Life Science and Biopharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511436. 3. School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To compare and analyze the differences between two commonly used modeling method for rabbit knee osteoarthritis (KOA) and provide references for the selection and establishment of different types of animal models for knee osteoarthritis. **Methods** Nine healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups:

[基金项目] 广东省企业科技特派员项目 (GDKTP2020041900); 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2020449)。

[作者简介] 欧宝芳 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 骨与软组织再生与修复。E-mail: oubao623@163.com

[通信作者] 吴少瑜 (1980—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 具有抗肿瘤作用的新化合物筛选和机制研究。

E-mail: wushaoyu@smu.edu.cn

谢水林 (1980—), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: xsl@scut.edu.cn * 共同通信作者

blank group, modified Hulth group and collagenase group. The model groups were treated with a modified Hulth method or intra-articular injection of collagenase. After 1 week, the rabbits were encouraged to move daily. After 6 weeks, they were evaluated using Lequesne MG scores, X-rays, micro-computed tomography, Pelletier scores, Mankin scores and enzyme-linked immunosorbent assays, and then the gross and pathological changes in the knee were observed. **Results** Compared with that in the blank group, the cartilage surface of the rabbit knee joints in the two model groups displayed defects. The pathological result showed that the cartilage layer appeared to be cracked, safranin O staining was decreased, the tide line was distorted, and the blood vessels passed. The concentrations of TNF- α in serum from the blank group, modified Hulth group, and collagenase group were (624.99 ± 17.82), (1140.56 ± 129.81) and (1480.69 ± 492.08) pg/mL, and the IL-1 β concentrations in serum were (30.23 ± 0.25), (46.67 ± 0.71) and (46.82 ± 1.04) pg/mL, respectively. The modified Hulth and collagenase groups showed statistically significant differences compared with that in the blank group (all $P < 0.05$). In addition, the modified Hulth group was accompanied by osteophyte formation in the knee joint and more serious damage in the medial femoral condyle cartilage, while the medial tibial condyle was the main injury in the collagenase group. **Conclusions** Both modeling method can be used to construct an ideal KOA model. The degree of damage using the modified Hulth method was more serious, while the collagenase-induced model was closer to the process and pathogenesis of human KOA.

【Keywords】 knee osteoarthritis; modified Hulth method; collagenase method; animal models

膝骨关节炎 (KOA) 是一种常见的以关节软骨退变为特征的致残性疾病^[1], 2000 年 1 月至 2019 年 12 月我国 40 岁及以上人群膝骨关节炎患病率为 20.50%^[2]。炎症引起的软骨细胞紊乱、细胞外基质分解及关节不稳定是 KOA 发生的主要诱因^[3]。目前大部分治疗方法只能缓解疾病症状, 未能修复关节软骨组织, 因此建立 KOA 动物模型对其发病机制及治疗方式具有重要意义。

目前常用的 KOA 造模方法有 Hulth 法^[4]、改良后 Hulth 法^[5]、ACLT^[6]、关节腔内注射药物 (包括胶原酶^[7]、碘乙酸盐^[8]、木瓜蛋白酶^[9])、关节制动^[10]等。KOA 造模常用的动物载体有大鼠、小鼠、家兔、豚鼠、犬、猪等^[11]。改良后 Hulth 法和关节腔内注射 II 型胶原酶法两种方法都较为常用, 但尚未有研究报道比较两种造模方法之间的差异。本研究旨在分析比较两种造模方法之间的异同点, 为不同类型膝骨关节炎动物模型的选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级健康成年新西兰雄性大白兔 9 只, 6 月龄, 体重 2.5~2.7 kg, 由南方医科大学实验动物中心提供 [SCXK (粤) 2016-0041]。所有新西兰大白兔购入后饲养于广州华腾生物医药科技有限公司 [SYXK (粤) 2020-0237], 分笼独立饲养, 动物可自由进食及饮水, 环境温度维持在 20℃~25℃, 湿度维持在 40%~60%, 模拟自然光照 12 h/d。动物实验及研究过程遵循 3R 原则, 给予动物人道主义关怀,

并得到了广州华腾生物医药科技有限公司实验动物伦理委员会的批准 (HTSW201003)。

1.2 主要试剂与仪器

速眠新 II (敦化市圣达动物药品有限公司, 20210301); II 型胶原酶 (美国 Sigma 公司); EDTA 脱钙液 (北京索莱宝科技有限公司); 苏木素 (美国 Sigma 公司); 伊红染液 (天津光复精细化工有限公司); 番红 O-固绿染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 兔 TNF- α 酶联免疫分析试剂盒 (CUSABIO, 武汉华美生物工程有限公司); 兔 IL-1 β 酶联免疫分析试剂盒 (H002, 南京建成生物工程研究所有限公司)。C 型臂 X 射线仪 (GE9900, 美国通用电气公司); 微计算机断层扫描 (Micro-CT 80476, 荷兰 MILabs 公司); 组织切片仪 (RM2245, 上海徕卡 Leica 公司); 光学显微镜 (舜宇光学科技 (集团) 有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 兔膝骨关节炎模型分组及构建

9 只新西兰大白兔随机均分为以下 3 组: 空白组、改良后 Hulth 组、II 型胶原酶组。术后 1 周开始驱赶各组动物进行运动, 每天 30 min。

改良后 Hulth 组: 采用改良后 Hulth 法^[12]构建兔膝骨关节炎模型。固定家兔后, 0.1 mL/kg 速眠新 II (生理盐水 1:1 稀释) 臀部肌肉注射镇静, 再 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉。将兔仰卧位固定于无菌手术台上, 备皮消毒铺巾, 沿髌韧带内侧做长约 3 cm 纵行切口, 逐层切开皮肤、筋膜层和关节囊, 将髌骨外翻, 将兔右腿屈膝 45° 后切断内侧副韧带和前

交叉韧带,剔除内侧半月板,行抽屉试验确认前交叉韧带完全断裂。用生理盐水清洗关节腔后复位髌骨,可吸收缝线逐层缝合。术后予青霉素臀部肌肉注射预防感染,连续 3 d,每次 80 万单位。

II 型胶原酶组:于实验第 1、4 天按上述方法麻醉兔后进行备皮消毒,将兔膝关节屈曲 45°,于髌韧带内侧凹陷处进针,当出现落空感时,表明已进入关节腔内,注射 0.5 mL (4 mg/mL) II 型胶原酶溶液(经 0.22 μm 无菌过滤器过滤)。注射结束后用棉球压住注射针眼处并再次屈伸膝关节使 II 型胶原酶溶液充分浸润至整个关节腔内。注射过程严格按照无菌操作要求。

1.3.2 Lequesne MG 评分

术后 1 周开始用国际骨关节炎 Lequesne MG 指数^[13]作为模型评定标准之一,每周进行 2 次 Lequesne MG 评分,持续 6 周。包括疼痛刺激反应程度、步态、关节活动范围和关节肿胀程度 4 个方面,每部分分为 4 个等级,I 级为 0 分,II 级为 1 分,III 级为 2 分,IV 级为 3 分,总分大于等于 3 分为造模成功。

1.3.3 X-ray

使用 C 型臂 X 射线仪(GE9900)对术后 6 周的各组兔进行影像学评估,透视千伏电压和管电流分别设置为 54 kVp, 1.04 mA。兔麻醉后仰卧位放置于手术台上,右膝关节伸直位拍摄正位片,即腓骨小头横径 1/3~2/3 与胫骨重叠;屈膝 30°拍摄膝关节侧位片,即股骨内侧髁与外侧髁重叠,边缘间距小于 1.5 cm^[14]。

1.3.4 Micro-CT

使用 Micro-CT 对术后 6 周各组兔的膝关节进行断层扫描,通过重建三维图像来显示骨组织在空间的分布,扫描电压和电流分别设置为 100 kV 和 200 μA ,扫描后进行重建,重建的图像分辨率为 16 μm 。对兔实行安乐死后,在兔膝关节上下 3 cm 处用锐利器械切断,将股骨髁和胫骨平台取下,4%多聚甲醛内固定 48 h 后拍摄 Micro-CT。

1.3.5 兔膝关节大体观察及 Pelletier 评分

各组兔于术后 6 周安乐死后,按构模手术入路切开膝关节囊,肉眼大体观察右后膝关节软骨并采用 Pelletier 评分^[15]评估软骨损伤情况:(1)0 分:关节面完整,色泽如常;(2)1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;(3)2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表中层;(4)3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;(5)4 分:软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

1.3.6 HE 染色观察关节软骨组织形态变化

兔膝关节 4%多聚甲醛中固定 48 h,EDTA 脱钙液 37℃脱钙 3 周后,取股骨内髁、股骨外髁、胫骨内髁和胫骨外髁的软骨中央区继续脱钙 1 周,经脱水,石蜡纵向包埋后切成 2 μm 的切片,并用苏木素和伊红染液进行染色,光学显微镜下观察病变情况。

1.3.7 番红 O-固绿染色及 Mankin 评分

兔膝关节石蜡切片后经番红 O 和固绿染液染色,光学显微镜下观察病变情况,并对番红 O-固绿染色结果进行 Mankin 评分^[16],包括软骨结构、软骨细胞、基质染色、潮线完整性 4 个方面。

1.3.8 ELISA 检测兔血清炎症因子水平

各组兔于术后 6 周耳缘静脉采血,收集于促凝管中,4℃静置 30 min 后,3000 r/min 离心 10 min 收集上清。根据试剂盒说明书检测血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量。

1.4 统计学方法

实验数据应用 IBM SPSS 25.0 进行分析。正态或近似正态分布的计量资料使用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,偏态资料使用中位数(四分位间距)[M(IQR)]进行统计描述。采用单因素方差分析、重复测量方差分析和 Kruskal-Wallis H 检验进行组间差异分析,采用 LSD-*t* 检验、Dunn's 检验进行组间多重比较。结果均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

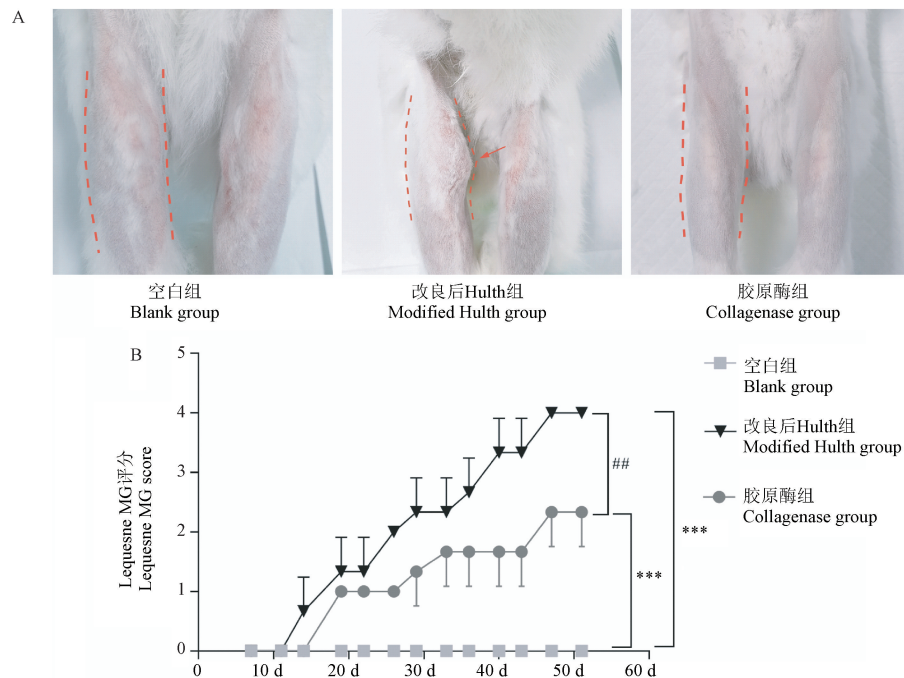
2 结果

2.1 3 组兔膝关节一般情况观察

改良后 Hulth 法模型组的右侧膝关节内侧伴有骨性突出,质地坚硬;胶原酶模型组右侧膝关节处未发现骨性变化,但伴有肌肉松弛的情况(图 1A)。两种造模方法患肢均出现奔跑时轻度跛行,膝关节轻度肿胀,骨性标记变浅,Lequesne MG 评分都显著高于空白组($P < 0.01$),改良后 Hulth 法模型组评分高于胶原酶模型组($P < 0.01$)(图 1B)。

2.2 3 组兔膝关节影像学情况观察

X-ray 显示改良后 Hulth 法模型组的膝关节间隙变窄,膝关节内侧有骨赘形成,未见游离体生成;胶原酶模型组 X-ray 征象则并不明显(图 2A)。Micro-CT 评估软骨下骨质的微小变化(图 2B),Micro-CT 平扫显示,相比于空白组,两组模型组均出现软骨下骨硬化,主要表现为骨小梁增粗增多,三维重建结果显示两组模型组均存在骨重建,骨畸



注:A:膝关节外观形态。膝关节外观线条用红色虚线标注,红色箭头所指为骨性突出部分。B:膝关节 Lequesne MG 评分。与空白组比较,*** $P < 0.001$;与改良后 Hulth 组比较,## $P < 0.01$ 。

图 1 3 组兔膝关节外观形态及 Lequesne MG 评分结果($n=3$)

Note. A, Appearance of the knee joint. Appearance line of the knee joint is marked with a red dotted line. Red arrow points to the bony protrusion. B, Lequesne MG score of the knee joint. Compared with the blank group, *** $P < 0.001$. Compared with modified Hulth group, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Appearance and Lequesne MG score results of the knee joint in three groups

形,改良后 Hulth 法模型组有明显的骨赘增生和骨刺形成。

2.3 3 组兔膝关节软骨大体观察

空白组的软骨表层光滑平整,呈透亮有光泽的蓝白色,无裂纹及缺损。改良后 Hulth 法模型组显示在软骨的中央区,关节软骨面异常粗糙,软骨表面缺损并伴有骨赘形成,关节腔可见淡黄色积液。胶原酶模型组软骨表面缺损粗糙,无光泽,磨损严重,但未见骨赘生成(图 3A)。与空白组相比,两种方法建立的模型组的 Pelletier 评分显著升高($P < 0.05$),但两组模型组相比 Pelletier 评分无统计学差异($P > 0.05$)(图 3B)。

2.4 3 组兔膝关节病理切片观察软骨组织形态

HE 染色结果显示,空白组关节软骨表面平整光滑,表面区、移行区、辐射区和矿化区四层结构清晰,排列规律,细胞分布及染色均匀,潮线完整,无血管通过。改良后 Hulth 法模型组关节软骨表面损毁严重,软骨层脱落,各结构层次紊乱。股骨内外髌裂隙深达辐射区,可见大量软骨细胞克隆,细胞分布及排列不规律,总数减少,潮线扭曲前移并且

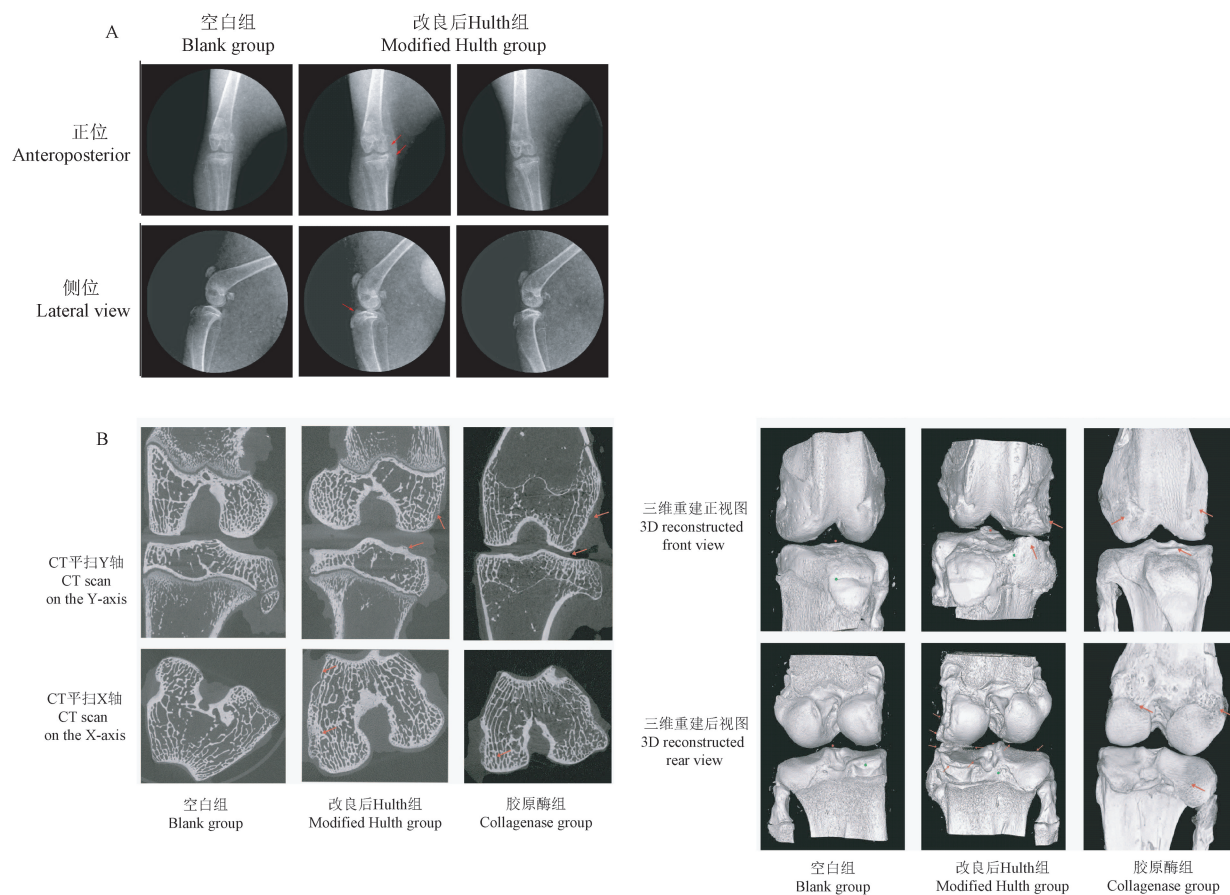
伴有血管长入。胶原酶模型组软骨表面较平整少裂隙,软骨细胞排列紊乱,数量减少,大量炎性细胞浸润,并伴随大量血管通过(图 4)。

番红 O-固绿染色结果与 HE 染色结果一致,空白组关节软骨基质呈红色,细胞核和胶原纤维呈绿色,潮线清晰规律,软骨和软骨下骨界限清晰,红绿色对比明显。两组模型组软骨基质区均出现番红 O 染色减退甚至染色丢失,固绿染色明显,局部出现细胞成簇现象(图 5)。

与空白组相比,两组模型组软骨 Mankin 评分较高($P < 0.01$)。改良后 Hulth 法模型组 Mankin 评分从胫骨到股骨,外侧到内侧逐渐升高,显示股骨区软骨退变更严重。胶原酶模型组则胫骨区软骨退变更严重(图 6)。

2.5 3 组兔血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平比较

ELISA 检测结果显示,两组模型组的 TNF- α 和 IL-1 β 水平均高于空白组(图 7 和表 1, $P < 0.05$),胶原酶模型组的 TNF- α 水平高于改良后 Hulth 法模型组(图 7A)。

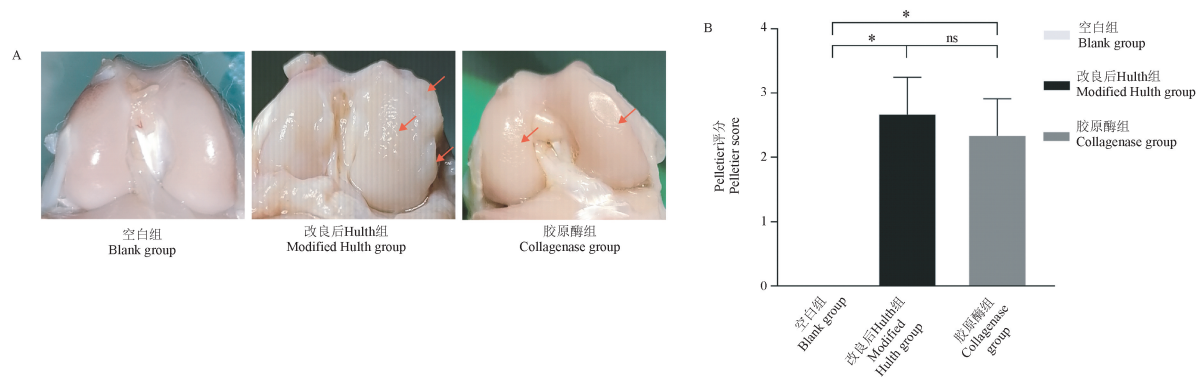


注:A;X-ray 正侧位片;B;Micro-CT 平扫和三维重建。红色箭头:新生骨赘及骨刺。

图 2 3 组兔膝关节 X-ray 和 Micro-CT 结果

Note. A, Anteroposterior and lateral X-ray images. B, Micro-CT scan and 3D reconstruction. Red arrow, New osteophytes and bone spurs.

Figure 2 X-ray and Micro-CT results of the knee joint in three groups

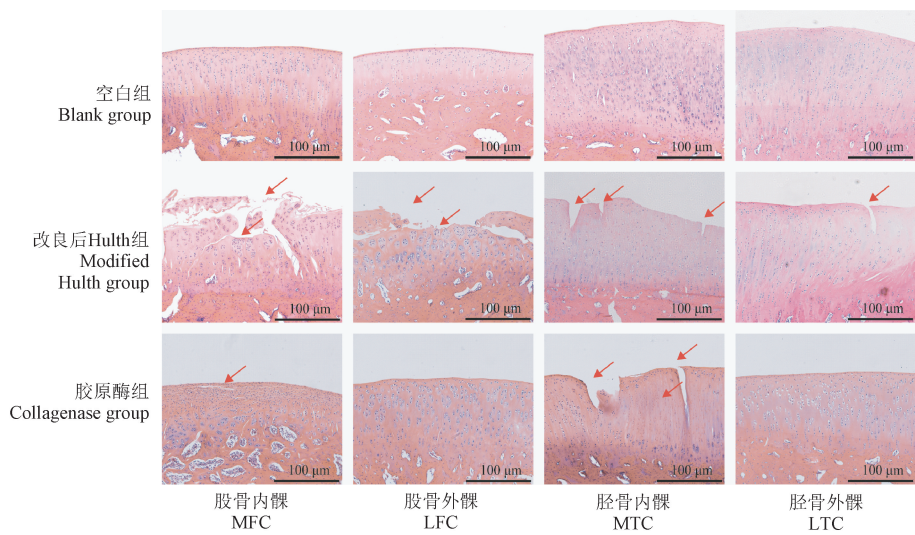


注:A:解剖后膝关节大体观察结果。红色箭头:新生骨赘及软骨磨损部位。B:膝关节软骨 Pelletier 评分。与空白组比较, $*P < 0.05$;与改良后 Hulth 组比较, $^{ns}P > 0.05$ 。

图 3 3 组兔膝关节软骨大体观察及 Pelletier 评分结果 (n=3)

Note. A, General observation results of the knee joint after anatomy. Red arrow, New osteophytes and cartilage wear. B, Pelletier score of knee cartilage. Compared with the blank group, $*P < 0.05$. Compared with modified Hulth group, $^{ns}P > 0.05$.

Figure 3 General observation and Pelletier score results of knee cartilage in three groups

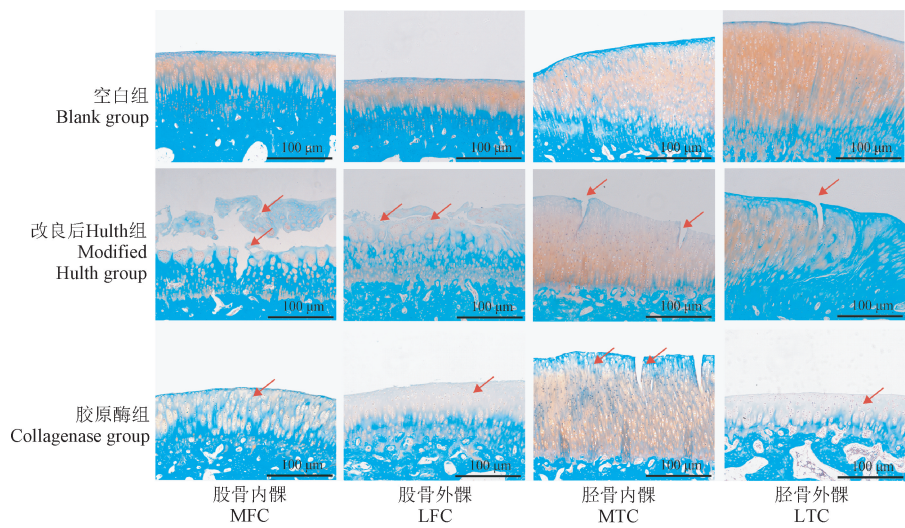


注:红色箭头所指为病变部位。

图 4 三组兔膝关节软骨 HE 染色

Note. Red arrow points to the lesion.

Figure 4 HE staining of knee cartilage in three groups



注:红色箭头所指为病变部位。

图 5 三组兔膝关节软骨番红 O-固绿染色

Note. Red arrow points to the lesion.

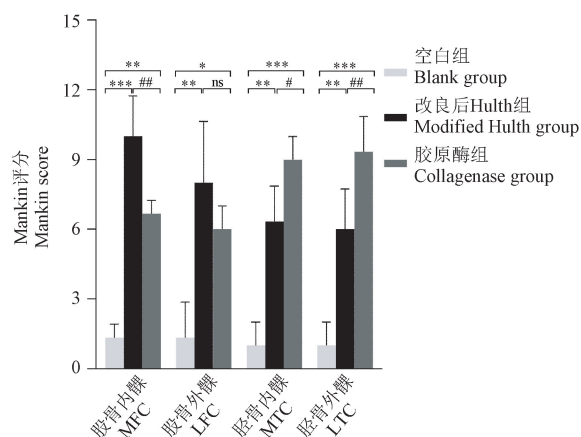
Figure 5 Safranin O-Fast Green staining of knee cartilage in three groups

3 讨论

疾病动物模型是重大疾病机制研究、新型治疗方式开发、药物筛选与评价不可或缺的支撑条件^[17]。理想的疾病动物模型至少需满足与人类疾病相似的 3 个一致性特征:疾病发病机理同源性、行为表象一致性、药物治疗反应性^[18]。目前用作 KOA 模型的动物载体有大小鼠、兔、猪和非人灵长类动物。其中家兔的关节结构与人类类似,关节腔体积较小鼠更大,关节和组织更易提取^[19],是早期骨关节炎模型的适宜

载体。构建兔 KOA 模型的方法也多种多样,主要有:(1)手术造模法;(2)自发性骨关节炎模型;(3)关节腔药物诱导法;(4)关节制动法。

改良后的 Hulth 法^[20]是最常用的关节内手术造模法之一,通过将膝关节韧带等维持稳定的组织切断或切除,使关节出现不同程度的稳态失衡,其在传统的 Hulth 法的基础上进行改良,即切断前交叉韧带、内侧副韧带和切除内侧半月板,减小对动物的损伤,能较好地观察 KOA 周围组织早中期的病理表现,是 KOA 研究中最常用到的手术类模型。

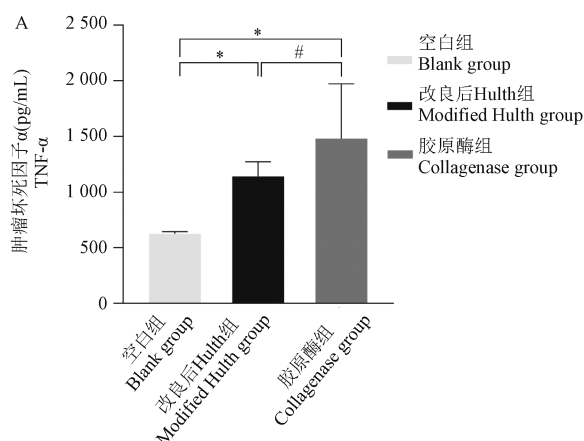


注: Mankin 评分。与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与改良后 Hulth 组比较, ^{ns} $P > 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 Mankin 评分结果 ($n = 3$)

Note. Mankin scores. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with modified Hulth group, ^{ns} $P > 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Mankin score results of knee cartilage in three groups



注: A: 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达水平。B: 白介素 1 β (IL-1 β) 表达水平。与空白组比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$; 与改良后 Hulth 组比较, ^{ns} $P > 0.05$, # $P < 0.05$ 。

图 7 三组兔血清中 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平结果 ($n = 3$)

Note. A, Tumor necrosis factor α (TNF- α) expression level. B, Interleukin 1 β (IL-1 β) expression level. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. Compared with modified Hulth group, ^{ns} $P > 0.05$, # $P < 0.05$.

Figure 7 Results of TNF- α and IL-1 β expression level in serum of three groups of rabbits

关节腔药物诱导法是直接在关节腔内注射能诱导炎症的化合物或药物,造成关节软骨、半月板或韧带的局部损伤。这种 KOA 模型具有实验周期短、重复性好、创伤性小、便于操作的优点,能避免手术法易造成的感染问题^[21]。

本研究成功构建了使用改良后的 Hulth 法或关节腔注射胶原酶诱导的兔 KOA 模型,并通过多种实验检测方法比较两种造模方法的异同点。两种造模方法的动物体重在术后均出现降低,1 周后体重

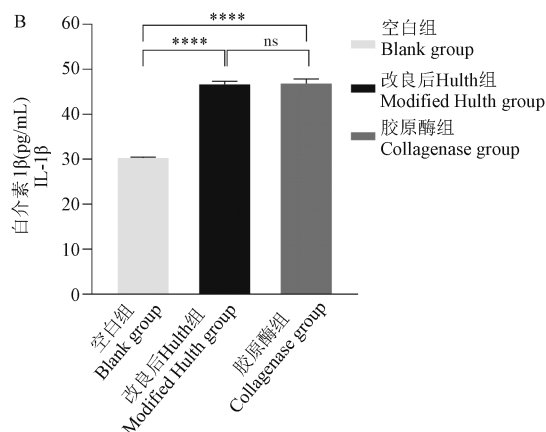
表 1 三组兔血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平比较

Table 1 Comparison of the expression levels of TNF- α and IL-1 β in three groups of rabbit serum

组别 Groups	肿瘤坏死因子 α TNF- α (pg/mL)	白介素 1 β IL-1 β (pg/mL)
空白组 Blank group	624.99 $\pm$ 17.82	30.23 $\pm$ 0.25
改良后 Hulth 组 Modified Hulth group	1140.56 $\pm$ 129.81 *	46.67 $\pm$ 0.71 ****
胶原酶组 Collagenase group	1480.69 $\pm$ 492.08 **	46.82 $\pm$ 1.04 **** ns

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$; 与改良后 Hulth 组比较, # $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. Compared with modified Hulth group, # $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$.



CT 未见明显变化。

软骨组织病理学是评价 KOA 模型是否成功的主要指标^[23]。在组织形态学方面多使用光学显微镜进行观察, HE 为常规的染色手段, 另外还有针对软骨基质的特殊染色^[24]。本研究利用番红 O-固绿染色结合 Mankin 软骨组织形态学评分对关节软骨进行病理学评估, 结果显示改良后 Hulth 法的病理损伤主要在股骨髁部, 表现为严重的软骨脱落和软骨基质丢失, 其原因应与手术造成的关节内侧联合不稳定有关^[25]; 胶原酶法的病理损伤主要在胫骨平台, 主要表现为软骨细胞凋亡和软骨基质丢失, 这与关节腔内注射时的进针位点有关^[26]。

在 KOA 发展中, 炎症因子参与破坏关节内微环境的稳态^[27]。TNF- α 是一种多功能炎症因子, 是诱导 KOA 软骨细胞凋亡的主要细胞因子^[28], 能刺激细胞生成 PGE2 和 IL-1 β , 引起关节疼痛和抑制软骨蛋白多糖合成^[29]。

综上, 改良后 Hulth 法构建的 KOA 模型主要表现为骨赘生成、股骨髁部软骨脱落和大量软骨细胞克隆形成, 软骨损伤程度更为严重; 关节腔注射胶原酶诱导的 KOA 模型主要表现为软骨表面缺损, 胫骨平台软骨基质丢失和炎症因子升高, 相比于改良后的 Hulth 法更为简便, 创伤性小, 更接近人的 KOA 进程与发病机制, 研究者可根据实验的具体要求, 采用最合适的造模方法。

参考文献:

- [1] Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, et al. Osteoarthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16072.
- [2] 张莹莹, 李旭东, 杨佳娟, 等. 中国 40 岁及以上人群骨关节炎患病率的 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(4): 407-414.
- [3] 黄磊, 罗超, 宋嘉琪, 等. 间充质干细胞来源外泌体在骨关节炎治疗中的作用 [J]. 生理科学进展, 2020, 51(5): 362-366.
- [4] 刘晓辰, 付维力. 骨关节炎动物模型的选择 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(11): 1769-1776.
- [5] Liang Y, Chen S, Yang Y, et al. Vasoactive intestinal peptide alleviates osteoarthritis effectively via inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 25.
- [6] He Z, Li H, Han X, et al. Irisin inhibits osteocyte apoptosis by activating the Erk signaling pathway *in vitro* and attenuates ALCT-induced osteoarthritis in mice [J]. Bone, 2020, 141: 115573.
- [7] Van DSCM, Blom AB, Walgreen B, et al. IL-1 β -mediated activation of adipose-derived mesenchymal stromal cells results in PMN reallocation and enhanced phagocytosis: a possible

- mechanism for the reduction of osteoarthritis pathology [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1075.
- [8] Li H, Guo H, Lei C, et al. Nanotherapy in joints: Increasing endogenous hyaluronan production by delivering hyaluronan synthase 2 [J]. Adv Mater, 2019, 31(46): e1904535.
- [9] 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.
- [10] 摆雪, 张洪平, 刘俊昌, 等. 石膏铁丝固定法建立兔膝痹模型 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(18): 2603-2608.
- [11] 吴强, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 125-130.
- [12] Gu W, Shi Z, Song G, et al. MicroRNA-199-3p up-regulation enhances chondrocyte proliferation and inhibits apoptosis in knee osteoarthritis via DNMT3A repression [J]. Inflamm Res, 2021, 70(2): 171-182.
- [13] Pas HI, Winters M, Haisma HJ, et al. Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature [J]. Br J Sports Med, 2017, 51(15): 1125-1133.
- [14] 刘健. 膝骨关节炎软骨下骨 X 光片图像分析 [D]. 青岛: 青岛大学, 2015.
- [15] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1275-1286.
- [16] Aso K, Shahtaheri SM, Hill R, et al. Associations of symptomatic knee osteoarthritis with histopathologic features in subchondral bone [J]. Arthritis Rheumatol, 2019, 71(6): 916-924.
- [17] 苏先芝, 刘一斐, 孔文娟, 等. 三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 725-732.
- [18] 臧凝子, 庞立健, 李品, 等. 特发性肺间质纤维化急性加重大鼠模型造模方法研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 3064-3070.
- [19] Huang K, Cai HL, Zhang PL, et al. Comparison between two rabbit models of posttraumatic osteoarthritis: a longitudinal tear in the medial meniscus and anterior cruciate ligament transection [J]. J Orthop Res, 2020, 38(12): 2721-2730.
- [20] Li X, Zhang Z, Liang W, et al. Tougu Xiaotong capsules may inhibit p38 MAPK pathway-mediated inflammation: *in vivo* and *in vitro* verification [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112390.
- [21] Resende VAC, Neto AC, Nunes C, et al. Higher age, female gender, osteoarthritis and blood transfusion protect against periprosthetic joint infection in total hip or knee arthroplasties: a systematic review and meta-analysis [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2021, 29(1): 8-43.
- [22] Ge C, Mohamed F, Binrayes A, et al. Selective role of discoidin domain receptor 2 in murine temporomandibular joint development and aging [J]. J Dent Res, 2018, 97(3): 321-328.

- [23] 贺蓉, 杨依靠, 徐启华, 等. 疝痹片对骨性关节炎模型动物膝关节组织形态学的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 142-148.
- [24] 于斐, 雷鸣, 曾晖, 等. 特殊染色技术在骨关节炎关节软骨形态学研究中的比较 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(19): 1801-1807.
- [25] Gougoulas N, Sakellariou A. When is a simple fracture of the lateral malleolus not so simple? How to assess stability, which ones to fix and the role of the deltoid ligament [J]. Bone Joint J, 2017, 99(7): 851-855.
- [26] 罗裕强, 史占军, 唐元, 等. 给药位点差异对透明质酸在膝关节软骨表面覆盖范围的影响 [J]. 中华骨科杂志, 2015, 35(11): 1159-1167.
- [27] Zhou QF, Cai YZ, Lin XJ. The dual character of exosomes in osteoarthritis: antagonists and therapeutic agents [J]. Acta Biomater, 2020, 105: 15-25.
- [28] 陈后煌, 邵翔, 李俐, 等. 肿瘤坏死因子 α 诱导大鼠软骨细胞凋亡模型的建立及鉴定 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(4): 527-531.
- [29] Wu Y, Wang Z, Fu X, et al. Geraniol-mediated osteoarthritis improvement by down-regulating PI3K/Akt/NF- κ B and MAPK signals: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 86: 106713.

[收稿日期]2021-08-19

Animal Models and Experimental Medicine, AMEM 专栏文章推介

Animal Models and Experimental Medicine 简称 AMEM, 从 2021 年 12 月 (第四期) 起, 陆续刊出系列文章, 发表在专栏文章版块, 旨在为杰出的基础医学科学成果提供国际交流共享平台, 并及时对学术热点问题进行报道, 增加期刊国际学术影响力。

本期热点问题聚焦于 2019 年度诺贝尔生理学或医学奖。威廉·凯林、彼得·拉特克利夫和格雷格·塞门扎因为发现“细胞如何感知和适应供氧环境变化”而获得了 2019 年度的诺奖。当细胞由于通气不足等因素导致氧气需求超过氧气供应时, 就会低氧。一些慢性疾病如: 慢性阻塞性肺病、心血管疾病、肿瘤等都能造成低氧的细胞内环境。动脉粥样硬化和肺动脉高压和心力衰竭等心脑血管疾病是造成我国成人致死率最高的疾病, 常诱发组织缺氧。我国成人中预计近 1 亿人患有慢阻肺, 慢阻肺引起的肺部气流限制也会造成组织低氧, 进而影响病人的日常生活, 甚至导致劳动力丧失, 最终还可能发展为呼吸衰竭或肺源性心脏病。此外我国有近千万人口居住在高原之上。每年还有着大量的游客去往高原旅游, 由于高原低氧而诱发的高原病也严重危害国人的健康。因此研究低氧适应的分子机制对这些疾病的预防和治疗有重大的意义。

AMEM 在 2021 年的第四期推出了低氧适应的专栏, 从器官缺氧条件下的病理变化及缺氧适应机制, 到高原和穴居地下生活动物低氧适应, 再到低氧激活的信号通路, 从不同角度, 不同水平对有机体的低氧反应及其低氧适应这一热点领域进行了深入探讨。其中的封面文章是哈佛医学院, Schepens 眼科研究所的杨梦璐等系统阐述了角膜在缺氧条件下的病理变化及缺氧适应机制, 并对该领域目前使用的动物模型及未来的研究方向进行了讨论^[1]。以色列海法大学的 Eviatar 教授等综述了不同缺氧环境下的哺乳动物通过调节生理活动、基因表达和基因突变的方式来维持机体的代谢水平, 重点对高原哺乳动物及以色列地下啮齿动物科进行介绍, 有助于我们了解哺乳动物对低氧环境的适应的方式, 以此作为人类缺氧适应研究的借鉴^[2]。郑州大学的王振龙等综述了小型哺乳动物在长期缺氧环境的耐受方式, 重点介绍了生物体通过生理生化改变、活性氧 ROS 的激活、HIF-1 调控、血管内皮生长因子 (VEGF) 和促红细胞生成素 (EPO) 的表达等方式应对缺氧环境, 并且对低氧适应动物的组学现状以及抗癌机制进行深入探讨, 为人类缺氧疾病的研究提供了合适的实验动物模型^[3]。

参考文献:

- [1] Pang K, Lennikov A, Yang M. Hypoxia adaptation in the cornea: Current animal models and underlying mechanisms [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 300-310.
- [2] Li F, Qiao Z, Duan Q, et al. Adaptation of mammals to hypoxia [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 311-318.
- [3] Li M, Pan D, Sun H, et al. The hypoxia adaptation of small mammals to plateau and underground burrow conditions [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 319-328.