文章编号:1000-5404(2007)10-0919-03

论著

关节镜下半月板部分切除制备骨关节炎动物模型

李 忠[1],杨 柳[1],戴 刚[1],陈光兴[1],鲁晓波[2],阳运康[2],张卫东[1],张洪鑫[1],王晓宇[1] ([1]第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038;[2]泸州医学院附属医院骨科,泸州 646000)

提 要:目的 探讨经关节镜建立猪双膝骨关节炎动物模型及用磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)监测骨关节炎骨软骨损害的有效性和可行性。**方法** 4只小型猪经关节镜切除双膝外侧部分半月板,术后12周,行大体、组织学和MRI观察与切除半月板相对股骨髁的骨软骨变化。**结果** 大体观察结果显示,局限性软骨表面纤维化,股骨髁间切迹骨赘形成;组织学检测结果显示,软骨细胞数量和蛋白多糖含量减少、成簇排列细胞数量增加;MRI检查结果显示,软骨厚度变薄和骨软骨信号强度改变。**结论** 经关节镜半月板部分切除能有效建立猪双膝关节骨关节炎动物模型,MRI能灵敏地监测到骨关节炎动物模型的骨软骨变化。

关键词:关节镜;骨关节炎;动物模型;磁共振

中图法分类号:R-322;R684.3;R687.4 **文献标识码**:A

Establishment of animal models of bilateral knee joint osteoarthritis by arthroscopy

LI Zhong[1], YANG Liu[1], DAI Gang[1], CHEN Guang-xing[1], LU Xiao-bo[2], YANG Yun-kang[2], ZHANG Wei-dong[1], ZHANG Hong-xin[1], WANG Xiao-yu ([1]Centre for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Bone and Joint, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective To explore the effectiveness and the feasibility of establishment of osteoarthritis animal model by arthroscopy and monitor the osteoarthritis lesion of bone and cartilage by magnetic resonance imaging (MRI) in bilateral knee joints of mini-pigs. **Methods** Bilateral partial menisci resections were performed on four mini-pigs (8 joints) by arthroscopy. Changes of bone and cartilage contacted with the resected menisci were analyzed by gross observation, histology, and MRI at 12 weeks after surgery. **Results** Gross observation showed focal fibrillation on articular cartilage surfaces and significant osteophyte formation at lateral intercondylar notches of the distal femur. Histology revealed the loss of cellularity and proteoglycan and increase in the number of clustering-arrayed chondrocytes. MRI showed the cartilage thickness was decreased and signal intensity of bone and cartilage changed. **Conclusion** Osteoarthritis animal models in bilateral knee joints of mini-pigs can be established effectively by partial meniscectomy under arthroscope. Changes of bone and cartilage of osteoarthritis animal models can be monitored sensitively by MRI.

Key words: arthroscopy; osteoarthritis; animal model; magnetic resonance imaging

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是临床最常见的骨关节病患。目前常用的治疗方法都存在一定缺陷,如使用非类固醇类抗炎药物,关节内注射透明质酸钠等保守治疗,难以有效控制病变进展;而针对晚期患者的人工关节置换手术尚存在术后感染,远期假体松动等并发症[1]。OA动物模型在研究骨关节炎发生、发展、有效防治药物及治疗方法中具有重要作用[2,3]。开放性外科手术切除膝半月板是常用的诱发动物OA的方法,但开放手术创伤大,会对实验结果产生一定影响;此外,OA动物模型骨软骨病变的观察主要采用有创

基金项目:国家自然科学基金(30672200,);全军"十一五"医药科研攻关项目(06G079)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672200) and the Medical Research Foundation of the "Eleventh Five-year Plan" of PLA (06G079)

作者简介:李 忠(1972-),男,四川省叙永县人,博士研究生,副主任医师,主要从事关节外科及骨软骨组织工程学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68765293

通讯作者:杨 柳,电话:(023)68765280, E-mail: jointsurgery@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-07-13;修回日期:2007-01-29

的组织形态学及免疫组织化学的方法。本研究探讨采用微创手术方法建立猪双膝 OA 动物模型及用 MRI 无创检查监测 OA 模型骨软骨变化的有效性和可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

成年小型猪 4 只，雌性，体质量 22 ~ 33 kg，由本校实验动物中心提供；美国 Smith & Nephew 公司超三晶数字化关节镜系统，采用直径 2.7 mm 的 30° 关节镜及电动刨削系统，意大利 Arthrocare 低温等离子刀，意大利 ESAOTE 公司 0.2T 的 Artoscan 磁共振(MRI)；日本奥林巴斯 BX41 光学显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 麻醉方法 实验猪按序编为 1 ~ 4 号，术前 30 min 阿托品 0.02 mg/kg 肌注，氯胺胴 20 mg/kg 肌注诱导麻醉后，气管内插管。采用戊巴比妥钠(20 ~ 30 mg/kg)静脉复合麻醉，戊巴比妥钠首次用总量的 1/3 ~ 1/4，每次加量为首量的 1/3 ~ 1/4，缓慢推注。术毕自主呼吸、角膜反射恢复后拔除气管内导管。术中静滴抗生素(青霉素 960×10^4 U，链霉素 1.0 g)防止感染。

1.2.2 手术方法 膝关节备皮、碘伏消毒后，铺无菌治疗巾。建立前外侧、前内侧关节镜入口：屈膝 60°，接近髌腱内缘、内侧半月板前角上方 2 mm 处，经髁间窝插入关节镜建立前内侧入口，进行关节腔检查、摄影。在前外侧局部皮肤光亮区插入穿刺针头，证实针头在关节腔内后，经髁间窝建立前外侧入口。经前内侧关节镜入口用低温等离子刀将前中 1/3 交界处的外侧半月板由游离缘汽化到滑膜缘，使外侧半月板完全切断，产生约 5 mm 半月板缺损，关节腔止血、灌洗，拔除关节镜器械，缝合伤口。另一侧膝关节采用相同的方法在相同部位产生同样大小的半月板缺损。术后肌注青霉素 320×10^4 U/只，链霉素 1.0 g/只，每日 2 次，共 5 d。动物肢体不固定，任其自由活动，常规饮食饲养。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 术后一般情况 术后动物肢体活动、饮食量及伤口愈合情况。

1.2.3.2 MRI 检查 术后 12 周，处死动物后立即行双膝关节 MRI 检查，选用矢状面 SE T1，TSE T2，GE-STIR，3D GE T1 序列。具体参数：T1-weighted：TR/TE(ms) = 560 - 600/18 ~ 26；T2-weighted：TR/TE(ms) = 2 600 - 3 000/80 - 100；GE-STIR：反转时间 75 ms，TR/TE(ms) = 1 500/16；3D GE T1 TR/TE(ms) = 50/16，翻转角度 65°。FOV = 180 × 180，Matrix = 256 × 192，激励次数 2，层厚 4 mm，层间距 0.4 mm，3D 序列层厚 0.8 mm。观察外侧半月板对应股骨外髁骨软骨形态和信号变化。

1.2.3.3 大体观察 显露膝关节，肉眼观察关节内有无黏连、滑膜有无充血水肿、外侧半月板对应股骨外髁骨软骨形态及骨赘形成情况。

1.2.3.4 组织学检查 截取外侧半月板对应病变区股骨外髁骨软骨组织，新配的 4% 多聚甲醛固定 48 h，0.5 μmol/L 的 EDTA 脱钙 3 周，每周更换脱钙液 2 次。常规乙醇逐级脱水，石蜡包埋，切片，行 HE 染色观察组织结构与细胞形态，甲苯胺蓝染色观察细胞外基质蛋白多糖的形成。

2 结果

2.1 一般情况

术后动物活动量及饮食较前减少，麻醉清醒后即可站立、行走，轻微跛行，双后肢均匀负重；术后 1 周缝合伤口均一期愈合，动物四肢活动和饮食恢复正常；到术后 12 周无实验动物死亡，也未再出现四肢活动受限及跛行。

2.2 MRI 检查

外侧半月板形态不规则，相应侧股骨髁前方及远端软骨形态、信号不规则改变；局部信号变薄，连续性中断，可见长 T1、T2 液性信号填充；梯度回波序列见局部软骨信号不规则降低，脂肪抑制像可见软骨下骨局部信号增高，提示充血、水肿可能；3D 梯度回波序列能较为清晰的识别软骨及软骨下骨的信号改变，包括局部软骨、软骨下骨信号不规则降低，近端可见低信号带环绕，提示硬化可能，并可对面积、深度进行较为准确的评估。

2.3 大体观察

关节内无积液及黏连，滑膜组织无明显充血水肿；外侧半月板对应股骨外髁软骨粗糙、不透明、失去光泽；股骨外髁靠近髁间切迹处骨赘形成。内侧股骨髁软骨光滑、透明，无骨赘形成(图 1)。

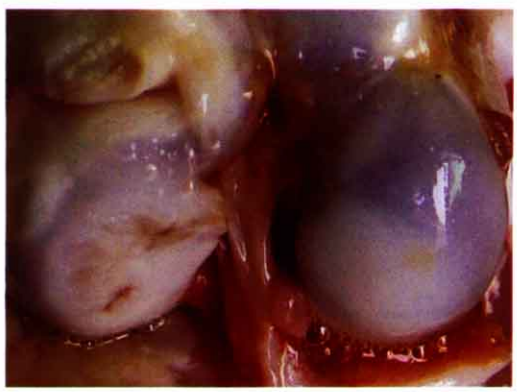


图 1 股骨外髁软骨的大体观察

HE 染色见局限性局部软骨变薄，表层纤维化，表层细胞数量明显减少甚至消失，中层细胞呈特征性簇状排列(图 2)；组织学上较难显示软骨下骨的变化。甲苯胺蓝(TB)染色见病变区细胞外基质染色较淡，尤以表层软骨明显，提示病变区细胞外基质蛋白多糖含量减少。

术后 12 周，4 只猪双后肢 8 个膝关节的 MRI 表现、大体及组织学观察均出现类似改变。



图 2　股骨外髁软骨的病理观察　（HE × 100）

3　讨论

骨关节炎动物模型主要分为两类：一类是通过基因改造或人工筛选获得的自发性骨关节炎动物模型；另一类是通过关节固定、关节腔注射致软骨降解物质或人工造成关节负荷异常等方法诱导关节退性变。半月板部分或完全切除是建立骨关节炎动物模型的常用方法，半月板切除后，相应胫股关节负荷传导紊乱，压应力集中于极小的区域，导致关节软骨发生退行性变，软骨表面粗糙、纤维化、甚至完全缺失。在上述半月板切除建模时，大多采用开放手术切除一侧后肢的半月板组织，诱导一侧肢体出现骨关节炎[4]。开放手术具有视野清楚、操作方便的优点，但手术创伤大、出血多，关节内积血及创伤性滑膜炎可影响软骨、滑膜的生化代谢，从而影响实验结果。本实验经关节镜切除部分半月板组织，成功诱导了双膝骨关节炎损害的特征性表现，包括：①局限的股骨髁和胫骨平台关节软骨磨损。②关节周围骨赘形成。③软骨下骨松质结构的改变。我们选用股骨髁用于组织学和磁共振成像监测。关节镜下微创手术建立双膝骨关节炎模型有以下优点：①手术创伤小，出血少，大大降低了关节内积血和创伤性滑膜炎对实验结果的影响，有助于减少实验本身造成的误差。②关节镜辅助下，可在不同时间点对病变骨软骨组织细针穿刺活检，无需处死动物，即可实现对同一动物病变组织的动态监测。③双膝关节同时建立骨关节炎模型，一侧膝关节用于实验性操作，另一侧膝关节用于对照，允许每一个动物用作自身对照，避免单膝骨关节模型不同动物间变异对实验结果的影响。此外，步态分析显示，单膝骨关节炎模型伤肢跛行，负荷减少，而双膝骨关节炎模型双侧肢体负荷均衡，从而可排除单肢骨关节炎模型负荷不均衡对实验结果的影响。

骨关节炎是生物学和力学因素相互作用下，使关节软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨合成与降解的正常进行失去平衡的结果。近来研究表明，骨关节炎的软骨下骨转换（turnover）速度加快及骨矿化密度增加与骨关节发生及严重程度相关，提示软骨下骨密度和结构的改变会对关节软骨退变产生重要影响。动物实验也证实，骨吸收抑制剂可有效抑制软骨下骨硬化和骨赘形成，且具有一定的软骨保护作用[5]。目前，软骨下骨改变在骨关节炎发生、发展中的作用尚不清楚[6]。用无创检测方法动态监测骨关炎发生、发展过程中骨软骨变化，特别是软骨下骨变化，对判断软骨下骨改变在骨关节炎发病过程中的作用及筛选合适的改变病程的药物具有重要作用。本研究应用 0.5T 的磁共振，选用梯度回波序列、脂肪抑制回波序列和 3D 梯度回波序列，清楚显示了骨关节炎软骨和软骨下骨损伤的特征性表现，具有灵敏度高、显示清楚和无创的优点。应用 3D 梯度回波序列甚至可对骨软骨损害面积、深度进行较为准确的评估，以用于损害严重程度的判断。磁共振成像显示的软骨损害与大体及组织形态学观察到的结果较一致，而磁共振成像还能清楚显示组织学难以显示的软骨下骨损害。

综上所述，经关节镜微创手段能有效建立猪双膝关节骨关节炎动物模型，并具有创伤小、模型制备可靠、重复性好的优点，有利于减少实验误差；磁共振成像能灵敏、无创监测骨关节炎动物模型骨和软骨的特征性损害，尤其对软骨下骨损害的显示具有明显的优势。

参考文献：

[1] Schurman D J, Smith R L. Osteoarthritis: current treatment and future prospects for surgical, medical, and biologic intervention[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, 427 (Suppl): S183 - S189.

[2] Bendele A M. Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002, 2(6): 501 - 503.

[3] Young M F. Mouse models of osteoarthritis provide new research tools [J]. Trends Pharmacol Sci, 2005, 26(7): 333 - 335.

[4] Pastoureau P, Leduc S, Chomel A, *et al*. Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guinea pig model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(6): 412 - 423.

[5] Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, *et al*. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis [J]. Bone, 2006, 38(2): 234 - 243.

[6] Felson D T, Neogi T. Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone? [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(2): 341 - 344.

（编辑　郭建秀）