

实验研究

兔膝关节骨关节病模型的复制 及健骨汤的治疗作用

同济医科大学附属协和医院 (430022) 沈 霖 杨家玉 高兰 杨艳萍 刘保平

1990年1月以来,我们参考有关文献^[1-3],在反复实验的基础上,成功复制出兔膝关节骨关节病模型。并以我院骨科治疗本病的有效经验方健骨汤作为实验药物,进行了相关实验观察。报道如下。

材料、方法及结果

1. 实验材料

(1) 实验动物:健康家兔55只,雄雌兼用,体重2.5~3.0kg。本校动物实验中心提供。

(2) 健骨汤水煎酒沉液:由本院药剂科配制,每毫升含生药量2g(附方:黄芪、丹参各18g,杜仲、玄胡、鹿角片各15g,淫羊藿、骨碎补、川牛膝、鸡内金各10g,炮甲6g)。

2. 动物模型的复制

(1) 兔膝关节骨关节病的造模方法:其原理是通过手术处理,造成膝关节力学改变。动物常规消毒,在硫喷妥钠(40mg/kg)腹腔内麻醉下,通过正中旁切口进入右膝关节。探查关节内无原发病损后,切断前交叉韧带与内侧副韧带,完整切除内侧半月板,然后对合关节囊。皮肤用6/0无创伤尼龙线缝合。手术后动物均单独饲养,并每天定时二次强迫动物手术侧肢体活动。

(2) 造模动物的检测指标:所有动物在术后2月、4月均行X光摄片。并于术后2月处死5只动物,4月处死10只。分别在无菌条件下切开右膝关节,取关节液记量检查;肉眼观察关节内病理改变;取胫骨平台内侧关节面的软骨及骨组织,常规切片,H-E染色,在光学显微镜下观察病理学变化。

(3) 造模动物的检查结果

关节液检查结果:术后2、4月动物关节液细菌培养均为阴性。术后4月术侧关节液量增加呈淡黄色或棕黄色改变,粘滞度增高。白细胞计数增加,与健侧比较有显著性差异。

关节软骨各项观察结果:X光下,术后2月除见关节间隙较健侧狭窄外,未见其它病变;术后4月见关节骨端有明显的骨质囊性变,部分软骨下骨象牙质变及增厚,胫骨平台内侧边缘可见骨赘形成。肉眼观察健侧关节软骨面光滑,呈乳白色。术后2月肉眼未见软骨明显病变;术后4月手术侧见部分软骨面变为浅黄色,有散在虫蚀样破坏小点,有6只动物胫骨平台软骨面被增生的纤维组织复盖。光学显微镜下,见健侧关节软骨可清楚地分为表层、移行层、辐射层及软骨基质钙化层。在辐射层和钙化层之间可见波浪形潮标。术后2月,术侧异常所见为关节软骨表层变薄,少量软骨细胞固缩;术后4月,术侧软骨表面部分软骨细胞坏死,胶原纤维暴露,形成纤维,并有典型裂隙形成,裂隙深入至软骨基质,裂隙中心可见纤维结缔组织浸润。另有部分视野出现软骨细胞增殖现象,且多量血管侵入软骨细胞区,血管周围见类骨质形成。

3. 健骨汤对兔膝关节骨关节病模型的影响:

实验分组:将余下40只兔膝关节骨关节病模型随机分为健骨汤组及盐水组。分别用灌胃法给健骨汤水煎酒沉液或生理盐水。每天1次,每次10ml,连续8周。

观察方法及结果:分别于用药后4周及8周分二批处死动物,进行相关指标观察。

(1) X光片检查结果:健骨汤组治疗后4周

与治疗前X光征比较无明显改善;治疗后8周X光征显示,其病情好转,但盐水组呈加重征象。结果见表1。

表1 两组模兔治疗8周后X光征比较

| X光征 | 健骨汤组 | 盐水组 |
|--------|------|-----|
| 骨囊性变 | 减少 | 无改善 |
| 象牙质变 | 无改善 | 无改善 |
| 骨质萎缩疏松 | 明显改善 | 加重 |
| 关节间隙狭窄 | 明显改善 | 加重 |
| 骨赘形成 | 无改善 | 无改善 |

(2) 关节液检查结果:治疗后4周,健骨汤组术侧关节液量明显少于盐水组($P < 0.05$),治疗后8周,其白细胞计数亦明显低于盐水组($P < 0.05$)。结果见表2。

(3) 病理学分析结果:治疗后4周,健骨汤组见原软骨病灶区有大量幼稚软骨细胞再生,细胞密集,排列不规则;深部细胞逐渐增大变圆,细胞周围有典型的软骨陷窝形成。盐水组则仍见坏死软骨细胞及少量纤维组织。

治疗后8周,健骨汤组见病灶原裂缝紧密

表2 两组模兔治疗后关节液比较 ($\bar{x} \pm SD$)

| 项目 | 治疗后4周 | | 治疗后8周 | |
|-------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 健骨汤组 (n=10) | 盐水组 (n=10) | 健骨汤组 (n=10) | 盐水组 (n=10) |
| 量(ml) | 1.31 ± 0.32* | 2.17 ± 0.51 | 1.26 ± 0.46* | 2.14 ± 0.43 |
| WBC(个/mm ³) | 530.67 ± 66.21 | 548.39 ± 51.93 | 476.16 ± 58.72* | 551.42 ± 61.37 |
| Glucose(mg/ml) | 22.13 ± 6.17 | 21.87 ± 5.46 | 23.15 ± 5.83 | 22.64 ± 3.75 |

注: *与盐水组比较 $P < 0.05$

连接,新生的软骨厚度接近正常关节软骨,细胞间质均匀,表层软骨细胞为扁长形,随关节面平行排裂,深层细胞大部分为圆形,呈垂直串珠状密集排列,从表到里,细胞体积逐渐变大。盐水组裂缝区仍明显存在,裂缝周边见坏死之外,还可见幼稚软骨细胞少量增生及纤维结缔组织稀疏地充填于裂缝之间。部分软骨区尚可见软骨内成骨现象。

讨 论

1. 本实验通过手术将兔膝关节应力轴线由正常10°外翻角变为内翻,使关节最大压应力由正常的外侧胫骨平台转为内侧胫骨平台承担。由于关节的负重面减少,局部关节软骨承受的压应力相应增加,从而形成了关节软骨变性的始动环节。本实验观察到,在病变的早期,软骨细胞因脱水而固缩,软骨面变薄。继之,软骨部分坏死,软骨面破裂,出现纤颤;但同时病灶区亦可见部分软骨细胞增生肥大,并发生软骨内成骨现象。这说明骨关节炎虽然是一种退行性疾病,但它同时也伴有再生修复的过程。而这种再生现象,又成为关节骨端增生形成骨赘或发生蘑菇状变形的基本病理过程。

为了缩短动物模型制作期,根据临床上过

多关节活动,特别是超疲劳活动容易提前出现骨关节炎的发病特点^[4],我们对模兔采用单笼喂养,使之有一定活动范围,并定时强迫术侧肢体运动,以增加患肢关节的磨擦及负重机会。

2. 运用中药健骨汤治疗4周后,患侧关节液明显减少并趋于正常。骨关节炎关节液量增多,系因关节软骨面破裂,剥脱的软骨片附着于滑膜上,刺激滑液大量分泌而成。本实验观察到,在健骨汤治疗的早期阶段,软骨破坏区出现大量的幼稚软骨细胞,表明损害的软骨已在修复,这显然可减少或阻断因软骨片丢失,刺激滑膜分泌的途径。再者,关节液减少,可降低关节内压力,又有利于促进软骨的修复。从治疗后8周各项结果表明该方确有促进骨关节炎软骨修复之功。然而,本实验证实,该方对已形成的骨赘无治疗作用。

3. 建骨汤修复关节软骨病变的机理尚待探讨。但就该方主要由补肾中药配伍组成这一点分析,说明祖国医学“肾主骨”理论是信而有征的。

参 考 文 献

[1] Mcdevilt CA, et al. Biochemical Changes in

急性脊髓损伤后局部亚细胞与膜结构 改变及654-2治疗的实验观察

廊坊市人民医院 (102800) 陈 光 郝树萍 刘士林 张兰莉* 谢中光*

脊髓损伤后,在细胞和亚细胞研究中,已知有不少的改变。近年来,有关亚分子—自由基理论的研究,引起了不少学者的兴趣。本研究主要观察654-2使用时对亚细胞及其膜结构的影响,以及超微结构的破坏与自由基(FR)的关系。

材料与方 法

中国杂种家犬20只,在硫贲妥钠 25mg/kg 腹腔麻醉下分成两组。

对照组:8只,以545gcf致伤T₁₃L₁段脊髓,伤后未给任何治疗,按2、6、12、24小时和3天、1、3、6周分别观察神经学改变及届时取出脊髓作电镜及自由基检测。

治疗组:8只,致伤后1小时用654-2 0.5mg/kg,肌肉注射共三天,按照对照组同样时间作电镜及FR观察。另4只犬未致伤,作为正常脊髓,其检测同上。

结 果

1. 正常犬髓鞘完整,线粒体内结构分布均匀,各细胞器及膜结构完整,未见溶酶体、微体等。

2. 伤后实验组

(1) 髓鞘及轴索变化:对照组伤后2小时髓鞘板层溶合或披裂,轴索膜间隙加宽或部分缺如,微丝数量略有增加,其他细胞器不多见。伤后6小时髓鞘披裂,轴索溶解,线粒体密集,膜有破损。伤后24小时髓鞘严重披裂或呈残片游离,轴索残存或呈束状,轴索内有破

碎髓鞘片。伤后3天可见裸露残存之轴索或无髓鞘神经纤维,轴索多见极度损伤,微丝残存而紊乱。伤后1周,少见完整髓鞘,多呈变性状或为少突胶质细胞及格氏细胞所替代。伤后2周,格氏细胞大量分布,伤后3周、4周同上,有肥大星状细胞,胞内亚细胞活跃。伤后治疗组基本上同对照组,但在1周后完整髓鞘多,间可见完整轴索者及不少亚细胞。

(2) 线粒体变化:对照组伤后2小时线粒体即有轻度变性,嵴模糊不清,伤后6小时在轴索内密集堆积的线粒体间为固缩状,但有少数线粒体水肿,嵴消失、不成形。伤后24小时变化明显,线粒体膜破损多见。伤后3天线粒体内结构紊乱,嵴更不成形或集结紧缩,或呈颗粒样变性或残存。1周后变性线粒体多散在于组织间,但胶质细胞内的线粒体极旺盛而膜等完整。治疗组线粒体基本同对照组,但随着时间进程,在数量上比同期对照组要多,治疗后3天者膜多完整,变性轻而少。

(3) 溶酶体变化:偶于组织间内见到,多呈分泌颗粒型,大吞噬型少见,但在胶质细胞内数目即增,可见多种类型。

(4) 微体改变:在治疗组内,24小时见到微体分布均匀,对照组和正常犬未曾见到。

(5) 自由基改变:采用ESR法直接检测受伤脊髓组织中的自由基,对照组损伤后2小时自由基有升高,呈梯度增加,六周后趋于下

*北京军区总医院

the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in dog. J Bone Joint Surg (Br) 1976; 58:94

[2] Minns RJ. The role of the meniscus in an instability model for osteoarthritis in the rabbits knee. J Exp Pathol 1982; 63:18

[3] Colombo E, et al. A new model of osteoarthritis in rabbits. Arthritis and Rheumatism 1983; 26:25

[4] Michael DE, et al. Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model. J Bone and Joint Surg 1975; 57-A:392