

关节内注射药物建立骨性关节炎动物模型研究进展

马玉峰¹, 祁印泽¹, 王庆甫¹, 陈兆军¹, 于栋¹, 郑皓云², 吴忌², 殷岳杉¹, 戚晴雪²

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是临床常见的退行性关节疾病, 近年来该病发病率呈逐年上升趋势。动物实验则是研究骨性关节炎发病机制与治疗疗效的重要手段之一, 而诱导动物模型的建立始终是动物实验中最重要环节之一, 其中关节内注射药物是建立骨性关节炎动物模型的经典方法。实验动物的选择要遵循相关性、适当性、实用性三个原则; 注射药物的选择要根据实验目的、实验对象进行; 检测手段及评价方法应切合实验实际。OA 动物模型的金标准至今未建立, 关节内注射药物的操作规范尚未建立, 期待进一步的研究。

【关键词】 骨关节炎; 模型, 动物; 注射, 关节内; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.01.023

Progress on establishment of animal model of osteoarthritis by intra-articular injection MA Yu-feng, QI Yin-ze, WANG Qing-fu*, CHEN Zhao-jun, YU Dong, ZHENG Hao-yun, WU Ji, YIN Yue-shan, and QI Qing-xue. *The Third Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

ABSTRACT Osteoarthritis (Osteoarthritis, OA) is a common clinical degenerative joint disease with increased incidence rate in recent years. Animal experiment is one of the important ways to explore pathogenesis and treatment of OA, while induced animal model is the most important part in animal experiment. Intra-articular injection of drugs is a classical method for establishing animal model of OA. Choose of animal should follow the principle of correlation, appropriateness and practicability, injections should perform in accordance with experimental purposes and subject, detections means and evaluation methods also should corresponding to experimental reality. The gold standard of OA animal model and intra-articular injections has not build, need further study.

KEYWORDS Osteoarthritis; Models, animal; Injections, intra-articular; Review literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(1):91-96 www.zggszz.com

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)是临床常见病, 病程呈迁延性、反复性, 其治疗上目前尚缺乏特异性措施。探索骨性关节炎的动物模型的建立方法, 是研究其病理机制及防治方法的重要课题之一, 也是现代骨科学领域研究的热点问题之一。目前已从组织形态学、病理学、分子生物学及生物力学等方面进行不同角度、不同靶点对其研究, 为此建立了不同种类的骨性关节炎的动物模型, 包括机械制动、手术诱发(半月板切除、交叉韧带切断、关节划痕、切断部分臀大肌等)、自发性模型(豚鼠、C57 黑鼠)、转基因动物模型以及关节内药物注射等病理模型。而关节内注射药物建立骨性关节炎模型具有造模时间短、造模稳定、受其他因素干预少等优点, 被作为建立膝 OA

的经典方法。近年来许多学者对其开展了大量研究, 取得了引人瞩目的成就, 现将对其研究情况综述如下。

1 实验动物的选择

选择动物作为模型研究, 应遵循 Pritzker^[1]提出的 3 个原则: 相关性、适当性、实用性。相关性指所选动物能够模拟人类发病过程中的病理现象, 在这些模型中, 动物的特点以及类似人类疾病的特征可以较好地提供模型。适当性首先是应用动物而非简单地在寻找问题过程中调查研究; 其次是根据实验目的和要求选择更适合的动物品种。实用性是指根据动物来源是否充分、动物是否易于控制、维护条件以及费用等。

理论上讲, 哺乳动物与人类的关节解剖结构、生物力学相似, 而且下肢负重载荷较多, 无论是自然环境还是人工环境, 所有的哺乳动物都有可能患上退行性骨关节病^[2]。所以目前科研工作者主要是以哺乳动物制备动物模型开展研究工作。特别是啮齿目

基金项目:北京市中医药科技项目(编号:YNZJ2011-01)

Fund program: Beijing TCM Foundation for Science and Technology Programs (No. YNZJ2011-01)

通讯作者:王庆甫 E-mail: qingpu-wang@sohu.com

Corresponding author: WANG Qing-fu E-mail: qingpu-wang@sohu.com

动物,如小鼠、大鼠、豚鼠等;还有家畜类:羊、狗等;灵长类:恒河猴等。

1.1 小鼠

由于体积小,操作方便,饲养管理方便、生产繁殖快,对其研究较深入,国内外已有严格的质量控制标准,并拥有大量的近交系、突变系和封闭群,近几十年来一直作为生物医学动物模型的主要动物品种。考虑到骨性关节炎发病机制与关节生物力学因素有关,与人类关节相比,小鼠体积较小,应用小鼠的关节制备骨性关节炎动物模型产生了以下疑问:关节软骨异常薄,缺乏可视化影像学检查、超显微结构研究;而且手术干预空间较小,可取的组织材料有限;术后功能评估、训练方法、外固定等较难实现;更重要的是关节软骨中不含硫酸角质素,这就造成了小鼠在科研制备模型中难以广泛应用。对小鼠采用关节内注射药物的方法制备骨性关节炎模型文献记载不多。Daans 等^[3]采用 Gdf5 Bp-J/+小鼠观察基因 GDF5 致 OA 的敏感性,利用以下 4 种模型评价了 OA 的病理进程:①关节内注射胶原酶;②关节内注射木瓜蛋白酶;③半月板不稳;④运动过度。通过观察骨及软骨下骨参数、软骨代谢情况、步态和胶原蛋白特征,结果发现在胶原酶组模型中,与野生型相比,Gdf5 Bp-J/+小鼠的对侧膝关节更易发生 OA。近年来,小鼠基因及可标记基因已得到很好地注释、翻译,可用于骨关节炎基因表达、基因转染、基因敲除等研究。

1.2 大鼠

和小鼠同属啮齿目、鼠科,与小鼠具有相似的优缺点。而大鼠体积较小鼠大,生存能力强,抗感染强,能耐受关节手术,有利于广泛应用于 OA 疼痛反应、评估治疗等方面研究。如大鼠有较厚的关节软骨可制备部分或全部关节软骨缺损模型,在大鼠关节内注射药物,文献记载较多。关节内注射碘醋酸盐常用于观察大鼠模型的疼痛反应,评估组织胺 H₃ 受体^[4]、内源性大麻素水解抑制剂^[5]、蛋白酶水解酶^[6]等作用机制。Salo 等^[7]采用关节内注射免疫毒素的方法使 16 只 2 月龄大鼠膝关节失去传入神经支配,结果发现随着年龄增长,大鼠出现 OA 症状;失去传入神经支配的大鼠与对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.0016$)。结果表明随着年龄增长,大鼠的神经元将会减少,这是引起自发性关节炎进程的重要因素。

1.3 豚鼠

豚鼠的骨生长在 4 月龄停止,骨骺闭合在几个月之后。豚鼠有膝内翻畸形,胫骨内侧间室负荷增大,容易发作内侧间室的 OA。与大鼠、小鼠相比,应用豚鼠的研究 OA 较少,主要通过化学药物、关节手

术和自发性 OA 来制备 OA 模型,如 OA 生物标记物的测定。然而,应用豚鼠作为 OA 动物模型主要有两个优点^[8-9]:一是关节组织病理学与人类极其相似;二是自发性 OA 动物模型是有效的。

1.4 兔

兔体型适中,性情温和,四肢爬行,和人类下肢行走不同,但兔的关节组织结构与人类接近,是常用的 OA 模型。然而,兔的髌骨较小,屈膝活动度较大,步态不同于人类和其他动物,因此,膝关节的生物力学、组织结构亦与此不同。与人类相比,兔的半月板有较多的细胞结构和较少的血管供应;关节面的关节软骨缺少胶原蛋白覆盖。最主要的问题是兔长到 8 月龄时,股骨远端、胫骨近端经常出现关节的退行性变。尽管如此,兔 OA 模型广泛应用于评价药物治疗、防治方法等,避免了人类接受临床实验的弊端。关节内手术诱发、关节内注射药物的研究文献更是枚不胜数。

1.5 大型动物

羊、狗、猪、马等动物体型较大,饲养管理不便,价格昂贵,一般不被研究者重视,也不是常用的 OA 模型。但这些动物下肢负重多,与人类的 OA 发病机制相似,与小型动物相比,更适应于软骨的力学研究及细胞生物学研究。Murphy 等^[10]通过关节内注射自体骨髓间充质干细胞治疗由前交叉韧带切断及内侧半月板切除诱导的羊 OA 模型,治疗 9 周后,其关节表面光滑程度、组织病理情况均优于对照组。

1.6 灵长类

如恒河猴。在进化史中,与其他动物相比,非人类灵长类动物与人类在解剖、生理、病理方面最为相近。恒河猴等灵长类动物身体保持直立状态,骨骼的生物力学特性与人类极为相似。实验证实,恒河猴从 5 岁开始出现骨性关节炎,15 年后可发展为临床骨性关节炎,这种关节炎在结构、化学、生物力学上与人类极为相似^[1]。但由于价格昂贵,属于国家二级保护动物,较难进行 OA 动物模型实验。

2 注射药物的选择

2.1 木瓜蛋白酶(Papain)

众所周知,木瓜蛋白酶是一种蛋白水解酶,能除去软骨细胞膜上有丝分裂抑制因子,并能使软骨内蛋白多糖降解从而使水结合功能受破坏^[11]。木瓜蛋白酶关节内注射可诱导狗、兔、豚鼠等动物髌关节或膝关节骨关节炎,其特点是发病速度快、重复性好、与人类骨关节炎类似^[12-14]。具有造模成功率高、造模成型时间短、造模方法适合于外用药物治疗等优点^[15]。1971 年 Bentley^[16]将 4%的木瓜蛋白酶生理盐水溶液 0.3 ml 分别于第 1、4、7 天注入兔髌关节,通

过 X 线片、组织切片的观察,建立了稳定的退行性关节炎的动物模型。自最后一次注射 6 h 后,X 线片未见股骨头及髌关节异常;股骨头软骨较对侧变软,光镜下观察软骨浅层有轻度的纤维变形、划痕,异染物质减少,细胞核浓缩。24 h 后肉眼下即可观察到股骨头软骨表面轻度的纤维变形;光镜下,在 I-III 层可见软骨细胞基质染色变白,细胞坏死;伴有滑膜炎性细胞浸润、增多。1 周后肉眼可见广泛的股骨头软骨表面原纤维变形,髌臼亦有轻度改变;光镜下软骨基质变少,髌臼亦可见广泛的原纤维形成,细胞坏死扩散到第 III 层。6 周后 X 线片可见明显的关节间隙变窄,并可见股骨头及髌臼软骨剥脱、糜烂,软骨下骨硬化,对侧也出现了相同的病理改变。这均符合 OA 的病理进程,被认为是经典的关节内注射药物制备 OA 的动物模型。国内学者韩冠英等^[17]将不同浓度的木瓜蛋白酶(2%、5%、10%)分别于第 1、3、5 天注射入右膝关节腔内,首次注射后第 2、4、6 周分批处死动物,行关节软骨、滑膜的大体及组织病理学观察评分。结果证实关节软骨破坏、滑膜增生等退行性改变程度随浓度增高而增高,随时间延长而发展。表明关节内注射不同浓度的木瓜蛋白酶完全可以制备不同程度的骨关节炎模型,周期相对较短,可重复且成功率高。

2.2 胶原酶(Collagenase)

胶原酶是一种金属蛋白酶,能分解细胞间基质的胶原蛋白。Kikuchi 等^[18]将不同剂量的胶原酶(0.5、1.0、2.0 mg)注射入成年兔膝关节腔内,6 周后组织学观察发现关节软骨和滑膜的变性程度与胶原酶的剂量呈正相关,股骨髁和胫骨平台外侧的关节软骨退变程度大于内侧。随着时间推移软骨退变逐渐进展,滑膜变性则有逐渐缓解趋势。该实验证实,关节腔内注射胶原酶可在较短时间内诱导关节组织的炎症反应,促进软骨进行性退变,且所需胶原酶剂量比木瓜蛋白酶用量要低,不失为一种方便简捷的造模方法。

2.3 雌二醇(Estradiol)

在实验研究中发现雌二醇可导致关节软骨受损,在家兔和狗的关节软骨细胞内存在 17- β 雌二醇受体,这些提示雌激素与 OA 发生有密切关系。在临床中发现,膝关节关节炎好发于雌激素过多的绝经后肥胖妇女,这也提示了雌激素与 OA 有密切关系。Tsai 等^[19]将不同剂量的雌二醇(0.3、0.6 mg·kg⁻¹·g⁻¹)注入卵巢摘除后的兔膝关节腔内,9 周后光镜发现高剂量组兔股骨髁表面关节软骨变薄,软骨面龟裂、纤维化;12 周后关节软骨侵蚀破坏扩展到钙化层,软骨下骨暴露,电镜扫描进一步发现:软骨细胞核深

度凹陷、变形,腔隙陷窝甚至出现囊泡,而低剂量组没有这些病理表现。这说明关节炎病变程度与雌二醇的剂量相关。

2.4 聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine)

软骨组织中的蛋白聚糖含量随 OA 病变加重和年龄增加而减少。蛋白聚糖的新陈代谢对 OA 的发生发展起关键作用。因此,Sakano 等^[20]将阳离子 PEI (分子量 2 000 或 70 000) 注射到鼠膝关节腔内,用以阻挡膝关节软骨阴离子区域,分别在 2、4、6 个月后观察发现,膝关节明显跛行、肿胀,蛋白多糖退变和功能减退,且逐渐加重,晚期发展成为典型的 OA 模型。但 IL-1 β 含量处于正常水准。这种 OA 模型病变程度与聚乙烯亚胺分子量呈正相关。

2.5 尿激酶型纤溶酶原激活物 (Urinary plasminogen activator, uPA)

uPA 是一种丝氨酸蛋白水解酶,广泛存在于人和动物体内。uPA 可以通过多种途径来调节滑膜炎症和软骨破坏;并且可直接引起炎症细胞分化增殖、迁移和黏附^[21]。石辉等^[22]分别将 0.4 μ g/0.2 ml uPA 和生理盐水注入兔右膝关节腔内,在 4、8、12 周后分批行滑膜、软骨组织观察及电镜观察;结果显示实验组的 Mankin 评分与对照组比较差异有统计学意义,而且光镜及电镜下观察实验组软骨、滑膜呈明显退行性变。结果表明关节内注射 uPA 12 周即可制备 OA 模型,可作为研究 OA 病理改变、发病机制及治疗方法的实验工具。

2.6 碘乙酸盐(Iodoacetate, IA)

在大鼠模型中,关节内注射 IA 用于诱导 OA 模型。Pomonis 等^[23]分别将不同剂量(0.3、1、3 mg)的 IA 和木瓜蛋白酶(0.5%、1%、2%、3%)分别注射入大鼠左膝关节腔内,观察影像学表现,应用后肢负重情况评估疼痛行为,结果发现注射 IA 组显示的退行性关节炎的表现:骨矿物质密度含量降低;关节软骨坏死变形、骨赘形成;而注射木瓜蛋白酶的大鼠未发现类似表现。这些病理变化与疼痛反应与 IA 的时间和剂量呈依赖性改变。该实验表明关节退变是渐进性的,其程度与 IA 的剂量相关,此种造模方法是研究 OA 疼痛、检测治疗方法的经典模型。

另外,菲律宾菌素(Filipin)、单体碘乙酸、肾上腺皮质激素、透明质酸酶、乙烯亚胺多聚物、软骨碎片或微粒、异物等注入动物膝关节内也可导致关节软骨的退行性改变^[24-26]。

3 检测手段及评价方法

3.1 影像学评估

3.1.1 X 线片

早在 1971 年 Bentley^[16]应用常规 X 线机在末次关节内注射 Papain 后 6、24 h、1、6 周及

4、8 个月后拍摄双髋正位 X 线片,发现注射 Papain 6 周后退行性关节炎的表现最明显:关节间隙变窄,关节面硬化;4 个月后关节间隙更狭窄,关节半脱位,股骨头边缘明显骨赘生成。此后的研究者纷纷应用 X 线摄像技术研究关节炎的病理变化。应用 X 线摄像技术观察骨性关节炎的关节变化是经济实惠、行之有效的办法;但是它的病理变化与组织学的病理变化相比往往是滞后的。总之,X 线片是早期研究者证实关节炎表现的最直接、最有效的工具。

3.1.2 核磁共振成像 (MRI) 鉴于 MRI 具有良好的组织对比敏感性和无创性,可在活体动物实现即时成像,在关节软骨研究方面具有较大潜能。如可早期观察关节软骨胶原的崩解、蛋白聚糖的减少等退变情况,并评估关节软骨缺损的大小、位置、生长情况,以及术后组织恢复质量和进程;还可定量检测到关节软骨厚度、体积变化、生物物理学属性;软骨下骨异常情况、骨髓异常情况、半月板病理表现、滑膜炎及关节渗出、肌腱功能不全等等。

MRI 早已应用于观察动物 OA 的关节软骨研究,如小鼠^[27]、大鼠^[28]、豚鼠^[29-30]、兔^[31-32]、山羊^[33]、犬^[34]。Wang 等^[35]通过大鼠关节内注射碘乙酸盐制备 OA 模型,应用 MRI 观察关节内各组织变化。实验证实造模 3 d 关节内组织出现炎症反应并启动退行性变进程;14 d 后软骨出现退变;21 d 后达到高潮;35 d 后关节软骨开始出现修复迹象。同时,患肢疼痛反应开始、结束的时间分别是 3 d 和 21 d。

总而言之,MRI 在 OA 早期到晚期的关节变化中均能发挥重要作用,随着硬件的不断发展、成像序列、图像处理的不完善,MRI 仍会在 OA 的研究中发挥重要作用。如近几年兴起的 MRI 动态增强扫描 (DCE-MRI)^[36]。Lee 等^[36]应用 DCE-MRI 观察不同阶段 (6、9、12、15 个月) 的 OA Dunkin-Hartley 豚鼠血流动力学变化,结果显示骨髓水肿病理变化要先于软骨组织形态学及软骨缺损等病理变化。

3.1.3 增强纳米聚焦 X 射线计算机断层成像 (Contrast-enhanced nanofocus X-ray computed tomography, CE-nanoCT) Kerckhofs 等^[37]设计了无创的 CE-nanoCT,并应用它实现了小动物关节软骨和骨组织结构和生物化学等 3D 可视化同步成像和评价,而且具有较强的对比度和空间分辨率。

3.1.4 超声生物显微镜 (Ultrasound biomicroscopy, UBM) 近年来,UBM 作为价廉易学的科研设施,在 OA 早期诊断的研究中备受重视。Niu 等^[38]应用 UBM 观察了兔的关节软骨,探索组织学分级和超声定量参数之间的关系,结果显示正常软骨的关节软骨平整指数显著低于 OA 的平整指数;软骨表面反

射系数随着 OA 进展显著减低 ($P < 0.05$),软骨-骨结合反射系数随 OA 分级增加而增加,并认为 UBM 完全可以反映不同 OA 分级的软骨平整指数、反射系数等的变化,为定量评判关节炎的严重程度提供了新的思路。

3.2 关节软骨组织学评分

科研工作者一直以关节软骨组织学评分作为 OA 诊断、评价预后的标准,从最初的 Mankin 评分到近年来 OOCAS 系统,一直在不断完善评分系统以求更贴近临床实际,更好地反应人类 OA 的病理进程。

3.2.1 传统经典的 Mankin 评分 1971 年,Mankin 等^[39]首次提出 OA 关节软骨评分系统 (Histologic/histochemical grading system, HHGS),被应用于人类 OA 的分级诊治,并广泛用于人类 OA 的研究,后经修改完善,被广泛应用于动物模型的 OA 分级。它从整体结构、细胞结构、番红染色、潮线完整性等 4 个方面分不同等级进行评分,最高分 14 分,最低分 0 分。但该系统评分存在以下缺陷:(1)该系统建立于晚期 OA 病理模型,对早期或轻微的 OA 是否适宜存在疑问;(2)等级系统缺乏 OA 分期组成,会导致在对同一部位的关节软骨细微差异进行评定时出现困难;(3)组内以及组间差异经过重复分析较大^[40-41]。

3.2.2 OARSI 推荐的关节软骨组织病理学评分系统 (Cartilage histopathology assessment system, OOCAS)^[42] 是国际骨关节炎研究会推荐的关节软骨组织病理学评分系统,它将 OA 分为以下 6 级:0 级,软骨表面平整,软骨完整;1 级,软骨表面浅层纤维形成,且不均匀;2 级,软骨表面不连续,伴有细胞增殖,在 II-III 层异染物质增加或减少;3 级,软骨皴裂扩散至 III 层或出现侵蚀;4 级,软骨侵蚀加重,关节软骨出现了损害;5 级,关节软骨剥脱;6 级,关节变形。根据该评分将 OA 分为 0~4 期,并给出了半定量评分方法。

3.3 细胞因子水平的检测

研究表明,由关节滑膜和软骨细胞合成、释放的细胞因子广泛参与并深刻影响着 OA 的病理变化^[43],并且一直认为细胞因子在 OA 的发生发展过程中起着重要作用。目前研究较多的有促分解性细胞因子:白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-17, IL-18;其次是促合成性细胞因子:胰岛素样生长因子 (IGF) 和转化生长因子 (TGF- β);还有抑制性细胞因子:IL-4, IL-10, IL-13 和 IL-1Ra;调节性细胞因子:IL-6 等。

目前在细胞因子与 OA 滑膜、关节软骨等的关

系方面,取得了较大的研究进展。IL-1 β 可以通过诱导能影响软骨细胞的炎性介质(如 NO、PGE2)来促进软骨退变及抑制软骨修复,最终引导软骨自动降解并最终发展成 OA^[44]。Lubbets 等^[45]通过实验证实阻断内源性 IL-17 可以抑制自身免疫性胶原诱导的关节炎模型的炎症反应,高表达的 IL-17 能增强模型的炎症反应。但 IL-17 并不依赖 IL-1 来增加软骨蛋白聚糖退变,或抑制蛋白聚糖合成。

国内实验研究,证实中医补肾法能延缓关节软骨的退行性变,促进软骨的有效修复;还能抑制滑膜炎炎症反应,阻断软骨的进一步破坏^[46]。季卫峰等^[47]将 4%木瓜蛋白酶注射入左膝关节内制作大鼠膝骨性关节炎模型,运用免疫组化、RT-PCR 观察滑膜 IL-1 β 、TNF- α 及软骨组织中 MMP-13、ADAMTS-5 mRNA 含量的表达,结果发现补肾法与活血法对 OA 大鼠 IL-1 β 、TNF- α 及 MMP-13、ADAMTS-5 mRNA 的影响在不同时期具有不同的作用,早期时活血法作用显著于补肾法,晚期补肾法显著于活血法。

4 问题与展望

综上所述,国内外众多学者借助 OA 动物模型来研究 OA 的病因病机、防治方法做了大量的研究工作,但仍存在一些问题:(1)OA 动物模型的金标准至今未建立。人类的 OA 病理机制复杂,医学界至今没有达成统一意见,故完全模拟人类 OA 结构和功能的动物模型仍需努力^[48]。另外,在选用造模方法上,各家意见差别很大;对建立不同阶段、不同病理机制的 OA 动物模型的标准仍旧缺乏。(2)尚未建立关节内注射药物的操作规范。目前为止,尚未出现相关涉及关节内注射药物的操作规范的文献。例如,关节内注射法具有造模时间短、造模比较稳定、受其它因素干预少等优点;沈彦等^[49]认为经由关节外途径制作的模型具有易于操作、成功率、无手术创伤性滑膜炎的干扰等优势,更接近人类 OA 的病理过程。但动物的膝关节较人体有一定的差异,不同的操作技术及流程,所建立的 OA 模型也会出现差异。所以建立不同种类动物的关节注射操作规范势在必行。

参考文献

[1] Pritzker KP. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects[J]. An Rheum Dis, 1994, 53 (6): 406-420.
 [2] Lascelles BD. Feline degenerative joint disease[J]. Vet Surg, 2010, 39(1): 2-13.
 [3] Daans M, Luyten FP, Lories RJ. GDF5 deficiency in mice is associated with instability driven joint damage, gait and subchondral bone changes[J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(1): 208-213.
 [4] Cowart M, Hsieh G, Black LA, et al. Pharmacological characterization of A-960656, a histamine H₃ receptor antagonist with efficacy in animal models of osteoarthritis and neuropathic pain[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 684(1-3): 87-94.

[5] Schueler N, Johnson MP, Oskins JL, et al. Local application of the endocannabinoid hydrolysis inhibitor URB597 reduces nociception in spontaneous and chemically induced models of osteoarthritis[J]. Pain, 2011, 152(5): 975-981.
 [6] Ahmed AS, Erlandsson-Harris H, Stark A, et al. Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis[J]. Pain, 2012, 153(1): 18-26.
 [7] Salo PT, Hogervorst T, Seerattan RA, et al. Selective joint denervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat[J]. J Orthop Res, 2002, 20(6): 1256-1264.
 [8] Kraus VB, Huebner JL, DeGroot J, et al. The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(3): 35-52.
 [9] Jimenez PA, Glasson SS, Trubetskov OV, et al. Spontaneous osteoarthritis in Dunkin Hartley guinea pigs: histologic, radiologic, and biochemical changes[J]. Lab Anim Sci, 1997, 47: 598-601.
 [10] Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12): 3464-3474.
 [11] 杨峰, 史宗道. 用木瓜蛋白酶建立兔颞颌关节骨关节炎模型的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5): 330-332.
 Yang F, Shi ZD. A study on papain-induced osteoarthritis in rabbit temporomandibular joint[J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2002, 20(5): 330-332. Chinese.
 [12] Havdrup T, Telhag H. Papain-induced changes in the knee joints of adult rabbits[J]. Acta Orthop Scand, 1977, 48(2): 143-149.
 [13] Kopp S, Meijersjo C, Clemensson E. Induction of osteoarthrosis in the guinea pig knee by papain[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1983, 55(3): 259-266.
 [14] Marcelon G, Cros J, Guiraud R. Activity of anti-inflammatory drugs on an experimental model of osteoarthritis[J]. Agents Actions, 1976, 6(1-3): 191-194.
 [15] Aigner T, Cook JL, Gerwin N, et al. Histopathology atlas of animal model systems-overview of guiding principles[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(Suppl 3): 2-6.
 [16] Bentley G. Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits[J]. J Bone Joint Surg Br, 1971, 53(2): 324-337.
 [17] 韩冠英, 凌沛学, 王凤山, 等. 不同浓度木瓜蛋白酶建立兔膝关节骨关节炎模型比较研究[J]. 中国骨伤, 2012, 25(5): 424-429.
 Han GY, Ling PX, Wang FS, et al. Comparison study on knee osteoarthritis in rabbits induced by different concentrations of papain [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(5): 424-429. Chinese with abstract in English.
 [18] Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1998, 6(3): 177-186.
 [19] Tsai CL, Liu TK. Estradiol-induced knee osteoarthrosis in ovariectomized rabbits[J]. Clin Orthop Relat Res, 1993, 291: 295-302.
 [20] Sakano Y, Terada N, Ueda H, et al. Histological study of articular cartilage in experimental rat knee arthritis induced by intracapsular injection of cationic polyethyleneimine[J]. Med Electron Microsc, 2000, 33(4): 246-257.
 [21] Waltz DA, Chapman HA. Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy[J]. J Biol Chem, 1994, 269(20): 14746-14750.

- [22] 石辉,何斌,史晨辉,等.用尿酸酶型纤溶酶原激活物建立兔骨关节炎模型的研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2006,24(1):66-69.
Shi H, He B, Shi CH, et al. A study on uPA-induced osteoarthritis in rabbit kneejoint[J]. Shi He Zi Da Xue Xue Bao (Zi Ran Ke Xue Ban), 2006, 24(1):66-69. Chinese.
- [23] Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain[J]. Pain, 2005, 114(3):339-346.
- [24] 聂林.骨关节炎的动物模型[J].中华实验外科杂志,1990,7(2):96-97.
Nie L. Animal model of osteoarthritis[J]. Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 1990, 7(2):96-97. Chinese.
- [25] 汪青春,沈培芝,王海彬.骨关节炎动物模型的建立及选择[J].中医正骨,1998,10(3):39-40.
Wang QC, Shen PZ, Wang HB. Establishment and choice of the osteoarthritic animal model[J]. Zhong Yi Zheng Gu, 1998, 10(3):39-40. Chinese.
- [26] Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(2):169-180.
- [27] Munasinghe JP, Tyler JA, Carpenter TA, et al. High resolution MR imaging of joint degeneration in the knee of the STR/ORT mouse [J]. Magn Reson Imaging, 1995, 13(3):412-418.
- [28] Wang YX, Westwood FR. Fluid collection within the synovial sheath of the tendon of the flexor hallucis longus muscle in the tarsal joint of rats; an anatomic variant detectable with magnetic resonance imaging[J]. Lab Anim, 2006, 40(1):58-62.
- [29] Watson PJ, Hall LD, Malcolm A, et al. Degenerative joint disease in the guinea pig. Use of magnetic resonance imaging to monitor progression of bone pathology[J]. Arthritis and Rheumatism, 1996(8):1327-1337.
- [30] Tessier JJ, Bowyer J, Brownrigg NJ, et al. Characterization of the guinea pig model of osteoarthritis by in vivo three-dimensional magnetic resonance imaging[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(12):845-853.
- [31] Calvo E, Palacios I, Delgado E, et al. High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2001, 9:463-472.
- [32] Laurent D, Wasvary J, O'Byrne E, et al. In vivo qualitative assessments of articular cartilage in the rabbit knee with high-resolution MRI at 3 T[J]. Magn Reson Med, 2003, 50(3):541-549.
- [33] Laurent D, O'Byrne E, Wasvary J, et al. In vivo MRI of cartilage pathogenesis in surgical models of osteoarthritis[J]. Skeletal Radiol, 2006, 35(8):555-564.
- [34] Libicher M, Ivancic M, Hoffmann M, et al. Early changes in experimental osteoarthritis using the Pond-Nuki dog model: technical procedure and initial results of in vivo MR imaging[J]. Eur Radiol, 2005, 15(2):390-394.
- [35] Wang YX, Heapy C, Pickford R, et al. MRI structural changes and joint discomfort; an investigation in the mono-iodoacetate induced arthritis model in rats. Proceedings of the European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology[J]. Basel, 2005, 283.
- [36] Lee JH, Dyke JP, Ballon D, et al. Assessment of bone perfusion with contrast-enhanced magnetic resonance imaging[J]. Orthop Clin North Am, 2009, 40(2):249-257.
- [37] Kerckhofs G, Sainz J, Wevers M, et al. Contrast-enhanced nanofocus computed tomography images the cartilage subtissue architecture in three dimensions[J]. Eur Cells Mater, 2013, 25:179-189.
- [38] Niu HJ, Wang Q. Ultrasonic reflection coefficient and surface roughness index of OA articular cartilage; relation to pathological assessment[J]. BMC Musculoskeletal Disorders, 2012, 13:1-7.
- [39] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3):523-537.
- [40] Ostergaard K, Anderson CB, Peterson J, et al. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints[J]. Ann Rheum Dis, 1999, 58(4):208-213.
- [41] Van der Sluijs JA, Geesink RG, Van der Linden AJ, et al. The reliability of Mankin score for osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 1992, 10:58-61.
- [42] Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(1):13-29.
- [43] Melchiotri C, Melieoni R, Frizziero L, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(12):2165-2174.
- [44] Attur MG, Patel IR, Patel RN, et al. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8[J]. Proc Assoc Am Physicians, 1998, 110(1):65-72.
- [45] Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, et al. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis[J]. J Immunol, 2001, 167(12):1004-1013.
- [46] 王和鸣,李楠.膝骨性关节炎的中医药实验研究进展[J].福建中医学院学报,2004,14(6):52-53.
Wang HM, Li N. Progress on TCM experimental study of osteoarthritis[J]. Fu Jian Zhong Yi Xue Yuan Xue Bao, 2004, 14(6):52-53. Chinese.
- [47] 季卫峰,童培建,袁小凤,等.补肾法与活血法对SD大鼠膝骨性关节炎滑膜IL-1 β 、TNF- α 及软骨MMP-13、ADAMTS-5 mRNA的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(2):1-5.
Ji WF, Tong PJ, Yuan XF. Tonifying kidney and activating blood on synovial IL-1 beta, TNF alpha and cartilage MMP-13, ADAMTS-5 mRNA in rats with knee osseous arthritis[J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2012, 20(2):1-5. Chinese.
- [48] Sokoloff L. Animal models of osteoarthritis[J]. Rheumatol, 1990, 17:5-6.
- [49] 沈彦,金红婷,童培建,等.骨性关节炎诱导性动物模型研究进展[J].中国骨伤,2008,21(9):716-718.
Shen Y, Jin HT, Tong PJ, et al. Research development of the induced animal model of osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2008, 21(9):716-718. Chinese with abstract in English.

(收稿日期:2014-06-17 本文编辑:李宜)