

· 基础研究 ·

单纯前交叉韧带离断法建立兔膝关节炎模型

李顺利¹, 赵永红², 王新军³, 沈明球³

(1. 新疆医科大学研究生学院, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆老年病医院, 新疆 乌鲁木齐 830001; 3. 新疆医科大学第四临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830001)

【摘要】 目的: 采用单纯前交叉韧带离断法建立兔膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型。方法: 选取 40 只大白兔, 随机分为空白组 6 只和造模组 34 只, 造模组在局部麻醉下行右膝关节前交叉韧带离断术。在造模后 4、8、12 周时, 宏观及微观观察大白兔关节软骨、髌下脂肪垫及滑膜变化, 并进行大体观评分及组织病理学评分。结果: 造模 4、8、12 周时, 造模组关节软骨均有不同程度的退行性改变。在造模 8、12 周时, 髌下脂肪垫及滑膜分别呈现中期、晚期 KOA 典型病理表现。空白组在相同时间段内关节软骨、髌下脂肪垫及滑膜无变化。造模组与空白组大体观评分在 4 周 [(1.300±0.674)分 vs 0.000 分]、8 周 [(2.400±0.516)分 vs 0.000 分]、12 周 [(3.583±0.668)分 vs 0.000 分] 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 造模组与空白组在 4 周 [(2.900±0.567)分 vs 0.000 分]、8 周 [(7.500±1.178)分 vs (0.500±0.707)分]、12 周 [(11.833±1.337)分 vs (1.500±0.707)分] 相关组织病理学评分差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论: 单纯离断前交叉韧带建立兔 KOA 模型简单可行, 稳定性好, 成功率高, 创伤小, 造模周期短, 动物生理结构改变较少, 对不同分期、分级的 KOA 均有较好的造模效果, 术后感染和创伤可控, 能够满足实验需求。

【关键词】 膝骨关节炎; 动物模型; 前交叉韧带

中图分类号: R274.9

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.20230171

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Establishment of rabbit knee osteoarthritis model by simple anterior cruciate ligament disruption**

LI Shun-li¹, ZHAO Yong-hong², WANG Xing-jun³, SHEN Ming-qiu³ (1. Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang, China; 2. Xinjiang Aged Disease Hospital, Urumqi 830001, Xinjiang, China; 3. The Fourth Clinical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang, China)

ABSTRACT Objective The rabbit knee osteoarthritis (KOA) model was established by simple anterior cruciate ligament disruption. **Methods** The selected 40 adult white rabbits were randomly divided into two groups, blank group with 6 rabbits and model group with 34 rabbits. The rabbits in model group were given the disruption of anterior cruciate ligament of right knee joint. In the fourth, eighth and the twelfth weeks of modeling, different degrees of degenerative changes have been observed on the rabbits articular cartilages from both macroscopic and microscopic aspects. **Results** At 4, 8 and 12 weeks after modeling, the articular cartilage of the rabbits in the model group showed degenerative changes in different degrees. At 8 and 12 weeks, the typical pathological manifestations of KOA in the middle and late stages were found in the infrapatellar fat pad and synovium, respectively. There were no changes in articular cartilage, infrapatellar fat pad and synovial membrane in the blank group at the same time. There were significant differences in the gross score between the model group and the blank group at 4 weeks [(1.300±0.674) vs 0.000], 8 weeks [(2.400±0.516) vs 0.000] and 12 weeks [(3.583±0.668) vs 0.000] ($P<0.05$), the histopathological scores were significantly different, at 4 weeks [(2.900±0.567) vs 0.000], 8 weeks [(7.500±1.178) vs (0.500±0.707)], 12 weeks [(11.833±1.337) vs (1.500±0.707)], ($P<0.05$). **Conclusion** The establishment of rabbit knee arthritis model by simply cutting the anterior cruciate ligament is simple and feasible, with good stability, high success rate, small trauma, short modeling cycle and less changes in animal physiological structure. The rabbit knee arthritis model established by simply cutting the anterior cruciate ligament has good modeling effect on different stages and grades of knee osteoarthritis, and the postoperative infection and trauma can be controlled, which can meet the test requirements.

KEYWORDS Knee osteoarthritis; Animal model; Anterior cruciate ligament

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(编号: 2020D01C142)

Fund program: General Program of Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2020D01C142)

通讯作者: 沈明球 E-mail: 13999296153@163.com

Corresponding author: SHEN Ming-qiu E-mail: 13999296153@163.com

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种临床上常见的退行性疾病。目前并没有一种有效的保守治疗方案可以终止 KOA 的进展, 因此, 建立 KOA 动物模型, 探索其发病机制和寻求延缓其进展的防治方法一直是科研热点。KOA 动物模型包括自发模

型和人工诱导模型,自然发生的自发模型和产生骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的转基因模型是类似于 OA 病理过程的完美方法,但它需要较长的建模周期和高成本。与自发模型相比,人工诱导建模具有快速进展,包括生化或手术诱导。手术建模具有较高的诱导率和良好的建模稳定性,但由于手术创伤和关节不稳定,对生化影响很大,关节感染的风险很高。KOA 动物模型建立的关键点是对不同分期、分级病理改变的复制,对实验动物采取标准化造模方式是研究 KOA 发生、发展的基础,也是开展 KOA 防治研究的必要条件,目前关于 KOA 动物造模的方法尚无统一的标准规范^[1]。本项目组在前期的实验中采用石膏铁丝固定法及高分子绷带结合塑料杆固定建立兔 KOA 模型取得了较好的造模效果^[2-3],但仍存在固定器具被兔啃食、脱落、皮肤磨损、无法确定造模分级、造模时间长、固定物质量过重、MANKIN 等^[4]制定的 Mankin 评分低等缺点,所以此次实验采用单纯离断前交叉韧带建立兔 KOA 模型,比较前期两种造模法与交叉韧带离断造模的优缺点,为 KOA 基础实验提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

一次性清创包,动物解剖固定台,2%利多卡因注射液(浙江泰康药业集团有限公司,批号:国药准字 H33021533),5-0 缝合线、络合碘消毒液(山东消博士消毒科技有限股份公司,批号:210306)、75%乙醇(山东名德医疗科技有限公司,批号:221102)。手术刀及柄、齿镊、止血钳、1、2、5 ml EP 试剂管等。

1.2 动物的选择及饲养

由新疆医科大学动物实验中心提供 3 月龄健康清洁的雌雄不限的大白兔 40 只,动物许可证号:SYXK(新 2018-0003),体重 1.8~2 kg,前 2 周适应性喂养,后称重、编号并简单随机分为 2 组,即:空白组 6 只和造模组 34 只。所有动物单笼喂养,饲养房温度 22~25℃,湿度约 50%,自由进食,昼夜节律按照 10-10 进行。本研究于 2021 年 6 月至 2021 年 11 月在新疆医科大学医学院动物实验中心完成。动物伦理审批号为:IACUC-20210603-13。

1.3 造模方法及取材

1.3.1 模型制备 将大白兔仰卧位双后肢固定于解剖台上,一助手在头端固定双前肢并折叠兔耳蒙蔽双眼。先用络合碘将右膝关节备皮处消毒,再用 75%乙醇脱碘。按体重 3 mg·kg⁻¹ 抽取 2%利多卡因,1:1 比例生理盐水稀释。将配置好的局麻药缓慢注入右膝关节内侧处皮下,注射后约 2 min 活动大白兔右膝关节,在关节前侧找到可自由活动的凸起的

骨性标志,为髌骨。触摸到髌骨内侧关节间隙,沿髌骨内侧缘下极向远端做长 1.5~2 cm 纵向切口,逐层打开皮肤、皮下组织、内侧支持带和关节囊,将髌骨向外侧牵拉致髌骨脱位,暴露关节腔,观察关节腔内的组织并记录颜色、形态及光滑度。固定前肢助手进行上下推送大白兔配合屈伸膝关节,屈伸膝关节达最合适角度,充分暴露前交叉韧带前下端,直视下用小号尖嘴剪刀将其剪断,用特制的弯钩伸入关节腔内紧贴胫骨髁间嵴向前牵拉前交叉韧带,确认其完全断裂并反复做前抽屉试验。在切断前交叉韧带过程中要注意避免出血影响术野以及划伤关节软骨,其可作为观察造模手术成功的指标。用生理盐水冲洗关节腔,将髌骨复位,逐层缝合,关闭切口。用无菌纱布覆盖缝合处,胶布粘紧,避免脱落。术后不固定患肢,观察半小时,大白兔无异常,之后送入饲养室,置于标准动物饲养笼中允许其自由活动及进食,造模期间每天 3 次(10:00、15:00、19:00)观察并记录试验动物的精神状态、体重、活动及饮食变化与伤口愈合情况,防止意外情况发生。

1.3.2 造模后观察 术后 5 d 大白兔伤口愈合良好,进食正常,活动情况良好。造模 2 周后 2 只大白兔先后出现右膝关节肿胀,活动受限,局部无红热现象,按压无张力,弹性差,切开后有灰白色、黏稠、可成型的奶酪样分泌物,经清理分泌物、冲洗、加强局部消毒、换药及饮水中加用抗生素处置后依旧无法恢复。在第 4 周时处死,观察到关节软骨破坏严重,关节腔内污物与组织无法分离,造模失败。3 周后 2 只大白兔出现腹泻及消瘦情况予以抗生素及调换饲养笼后痊愈;6 周后 1 只大白兔面部及背部多处出现范围为 0.5~1 cm 大小不等的黑色痂块予以碘伏涂擦局部后痊愈;8 周后 1 只大白兔,右臀部和下颌部位出现包块,按之松软,有弹性,切开后引流出白色糊状液体恢复。其余大白兔至处死时均正常。

1.3.3 取材 采用完全随机设计,造模组在造模 4、8、12 周节点后,随机选取 10、10、12 只大白兔(2 只造模后感染大白兔在 4 周时不计入随机选取),空白组在相同节点,随机选取 2、2、2 只大白兔,处死前均禁食水 12 h。固定大白兔右膝关节于 90°,用 1 ml 注射器由右膝关节髌骨下方髌韧带外缘斜向上股骨髁间窝方向刺入关节腔,进针后出现落空感为成功刺入关节腔,活动膝关节后抽取关节液,将关节液置入 1.5 ml EP 管内,储藏在-80℃低温冰箱待检。耳缘静脉注射空气栓塞处死大白兔,以胫股关节为中心完全离断膝关节,观察、剪取滑膜、脂肪垫置入 EP 管内并-80℃低温冰箱保存待检,剔除残留半月板,完全暴露胫骨平台和股骨髁,大体观察

关节软骨,以锋利刀片切取胫骨平台内侧髁处关节软骨避免切至软骨下骨,-80℃低温冰箱保存待检。

1.4 观察项目与方法

(1)对膝关节软骨组织进行改良 Mankin 评分^[4],光学显微镜下观察软骨的形态、数目、排列等情况,由 1 名观察者对两组切片进行镜下 Mankin 评分,该观察者对切片分组不知情(Mankin 评分表见表 1)。(2)关节软骨表面大体观察^[5]:主要观察内容包括膝关节表面光滑度、透明度及色泽,关节表面有无新生物,关节软骨表面是否有裂隙、软化或溃疡等,以及观察软骨的缺损程度,软骨下骨是否存在裸露情况。造模成功的标准:早期,大体观 ≥ 1 分为造模成功;中期,大体观 ≥ 2 分为造模成功;晚期,大体观 ≥ 3 分为造模成功(大体观评分标准见表 2)。

表 1 关节软骨组织病理 Mankin 评分表

Tab.1 Cartilago articularis histopathological Mankin scores

分类	分级	计分	
结构	正常	0	
	表面不规则	1	
	血管翳和表面不规则	2	
	到过渡带的裂隙	3	
	到放射带的裂隙	4	
	到钙化带的裂隙	5	
	细胞	正常	0
		弥漫性细胞过多	1
		局部细胞增多	2
细胞过少		3	
基质染色(异染性)	正常	0	
	轻度减少	1	
	中度减少	2	
	重度减少	3	
	未着色	4	
潮线完整性	完整	0	
	被血管破坏	1	
	软骨下骨血管入侵潮线	2	

表 2 关节软骨表面的大体观评分标准

Tab.2 General view scores criteria for the articular cartilage surface

分值	关节软骨退变程度
0	关节面完整,色泽如常
1	关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗
2	关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表中层
3	关节面溃疡形成,软骨缺损深达软骨深层
4	软骨剥脱,软骨下骨质暴露

1.5 统计学处理

采用 SAS9.2 软件的 GLM 过程进行实验数据的统计分析,定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用成组设计定量资料 t 检验。不同时间点两组间比较采用重复测量方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本大体观察结果比较

造模 4 周后,膝关节软骨颜色呈淡黄色改变,关节面粗糙,有明显凹陷,关节边缘依旧完整;软骨切片镜下显示染色不均匀,软骨细胞核浓缩,有空泡形成。肉眼观察滑膜组织光滑,未见明显增生。见图 1。

造模 8 周后,关节面软骨不透明、光泽差,有裂纹及部分缺损,软骨变薄,弹性较差,软骨缺损最深达软骨中层;软骨切片镜下可见染色不均匀,潮线界限不清,大量软骨细胞核消失,及大量空泡形成。肉眼观察滑膜组织少量增生,伴粘连。见图 1。

造模 12 周后,关节面溃疡形成,软骨剥脱,软骨缺损深达骨面全层,软骨下骨质暴露;软骨切片镜下可见,软骨基质染色不均一,细胞排列无序,细胞核浓缩消失,软骨细胞结构紊乱无序。肉眼观察滑膜组织大量增生、肥厚。见图 1。

造模组在 3 个时间段大体观察膝关节软骨、滑膜、脂肪垫和关节液,并镜下观察软骨细胞、滑膜组织情况,均符合造模成功标准,提示造模成功。

空白组兔膝关节软骨在不同时间段表面大体观察:关节面完整,外观呈浅蓝色,软骨无缺损及裂纹形成,光滑,半透明,有光泽,软骨弹性及硬度好。

2.2 大体观评分比较

模型组大体观评分在 4、8、12 周时与空白组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组兔关节软骨大体观得分,各时间点之间比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明本造模方法造模成功。见表 3。

2.3 病理学评分结果比较

造模组在 4、8、12 周时 Mankin 评分高于空白组($P<0.01$)。空白组在各时间点比较差异无统计学意义($P>0.05$),造模组各时间点差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 4。

3 讨论

3.1 离断前交叉韧带造模机制

目前,KOA 根据发生的部位分为髌股骨性关节炎,胫股骨性关节炎及全膝骨性关节炎 3 种类型。针对不同的病变程度采用不同的治疗方法,可以在很大程度上缓解临床症状,临床上常用的非甾体类药物不良反应多、患者耐受度差,在某些程度上阻碍了其临床应用^[6-7]。而近年来一些新兴的中医药保守治

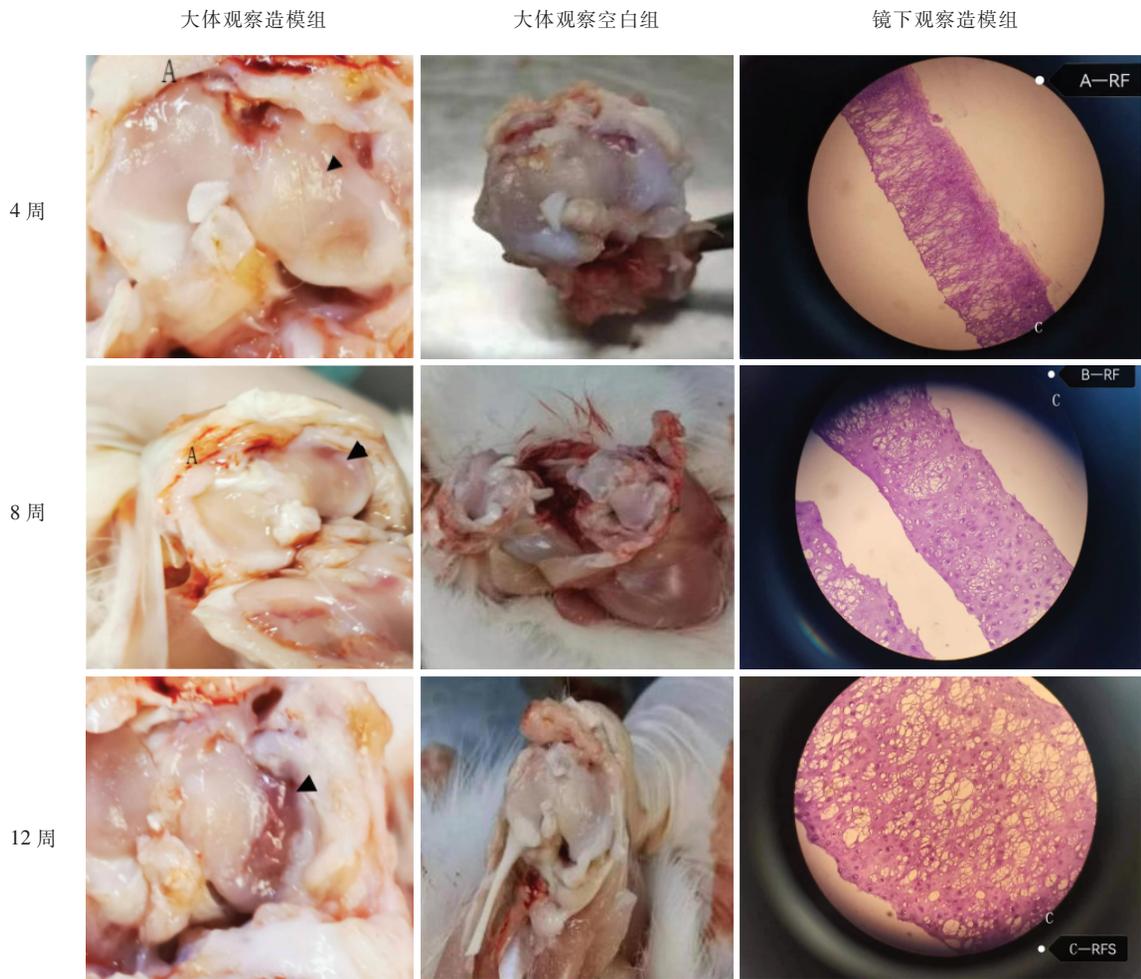


图 1 不同造模时期模型组与空白组关节软骨大体观及模型组镜下观察(HE×40)

Fig.1 Articular cartilage gross observation of model group and blank group in different modeling periods and model group under microscope(HE ×40)

表 3 两组关节软骨表面不同时间大体观评分比较
Tab.3 Comparison of gross score of articular cartilage surface between two groups at different times

组别	兔数	大体观评分($\bar{x} \pm s$)/分		
		4 周	8 周	12 周
空白组	2	0.000	0.000	0.000
造模组	10	1.300±0.674	2.400±0.516 ^{a1}	3.583±0.668 ^{a2}
<i>t</i> 值		2.810	5.187	7.855
<i>P</i> 值		0.008 4	<0.000 1	<0.000 1

注：与 4 周比较，^{a1}*t*=4.118, *P*=0.000 3; ^{a2}*t*=8.928, *P*<0.000 1。与 8 周比较，^{a2}*t*=4.627, *P*<0.000 1。 *F*_{时间}=6.18, *P*=0.005 4; *F*_{组间}=83.38, *P*<0.000 1; *F*_{交互}=6.18, *P*=0.005 4

疗方法逐渐增多,针对早、中期 KOA 患者具有一定的临床效果,但这些新兴的保守治疗方法需要取得相关实验数据支撑,而以人为研究对象多有不便,甚至违背伦理道德,因此选取合适的动物及造模方式对新兴疗法的评估是非常重要的^[8]。相同动物的模

表 4 两组关节软骨组织不同时间病理学 Mankin 评分比较
Tab.4 Comparison of Mankin scores in different weekly pathology of articular cartilage tissue between the two groups

组别	兔数	Mankin 评分($\bar{x} \pm s$)/分		
		4 周	8 周	12 周
空白组	2	0.000	0.500±0.707 ^{c1}	1.500±0.707 ^{c2}
造模组	10	2.900±0.567	7.500±1.178 ^{c3}	11.833±1.337 ^{c4}
<i>t</i> 值		3.527	8.512	12.744
<i>P</i> 值		<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注：与 4 周比较，^{c1}*t*=0.471, *P*=0.640 9; ^{c2}*t*=1.413, *P*=0.167 3; ^{c3}*t*=9.689, *P*<0.000 1; ^{c4}*t*=19.652, *P*<0.000 1。与 8 周比较，^{a1}*t*=0.942, *P*=0.353 3; ^{a2}*t*=9.533, *P*<0.000 1。 *F*_{组间}=203.68, *P*<0.000 1; *F*_{时间}=40.83, *P*<0.000 1; *F*_{交互}=20.77, *P*<0.000 1

型具有同质性,可随着疾病病程的进展,从多角度来分析研究疾病进程不同时间点的分子生物学变化,以了解其发病机制和观察干预治疗措施^[9-10]。而动物

实验的关键是建立理想的动物模型,结合动物的特点和疾病的特征、实验目的与具体实施干预手段来选择动物模型是实验成功的重要保证^[11]。在理想的动物模型中,疾病必须被可靠地诱导,具有 100% 的外显率,并在合适的时间范围内,仍存在与人类状况相当的疾病特征。造模方法有侵入式与非侵入式两大类,侵入式造模方法能够快速准确地进行造模,是比较理想的造模方法,但其操作不仅对术者的操作技术、无菌技术及术后护理等要求严格,同时增加了手术本身对关节软骨损伤的可能性,术者操作不规范也会增加动物感染和动物死亡的概率^[12-13]。选择具有易于获取、可重复性好、饲养方便、生存能力强、便于操作等优点的动物对试验具有重要意义。

大白兔具有性情温顺,价格适宜,体型适中等优势,且在膝关节大体外观上除髌骨外基本与人类相同,在形态学方面其关节软骨损伤后的修复亦与人软骨修复相似,已成为制备 KOA 模型最常使用的动物^[14]。离断前交叉韧带制备兔 KOA 模型的优势已得到肯定,有研究表明^[15-16]使用离断前交叉韧带法建立的 KOA 模型在术后 4 周与人类的早期 KOA 在病理、病生以及形态学改变等方面极为相似,这与本实验成功获得 KOA 模型所需时间一致。

膝关节生物力学的改变导致软骨和软骨下骨受力不均出现不同程度损伤,而关节软骨的退行性改变是导致 KOA 发病的基本机制^[17-18]。前交叉韧带通过限制胫骨前移和胫股关节旋转力,在膝关节稳定中起重要作用,断裂后膝关节生物力学结构发生改变,膝关节出现向前不稳,产生的机械性和生物化学性刺激,导致继发膝关节滑膜和脂肪垫炎症、软骨退变,以及关节大量积液等病理改变,进而形成 KOA^[19-20]。本实验采用离断前交叉韧带制备兔 KOA,在造模第 4 周后成功建立了具有典型病理学特征的 KOA 模型,Mankin 评分显示造模组膝关节呈早期骨关节炎病理改变,观察胫骨平台外侧髌首先出现关节软骨的退变,滑膜及脂肪垫未出现明显形态变化及病理改变;第 8、12 周观察到胫骨平台外侧髌关节软骨随时间推移有溃疡、剥脱及软骨下骨暴露明显较内侧髌严重,符合兔类 KOA 膝关节外侧髌的应力高于内侧髌的应力的研究报道^[21];此时随时间的延长滑膜病理改变进行性加重,脂肪垫滑膜逐渐布满关节腔,分别呈现中期、晚期 KOA 典型病理表现。本研究结果造模组与空白组 Mankin 评分差异有统计学意义($P<0.05$);造模组在不同时期 Mankin 评分差异有统计学意义($P<0.05$)。本实验建立的 KOA 模型动态而全面地反映了关节软骨退变的病理变化过程,从实验早期到晚期,随着造模时间延长,

Mankin 评分逐渐增加,关节软骨大体观退变程度也呈现出从正常、轻度、加重的趋势。

手术诱发模型为开放性外科手术造模,容易破坏关节内环境影响实验结果。基于此有学者^[22]建议运用精细操作器械减少破坏关节内组织,但此方法对操作熟练程度及操作器械要求较高,不经过训练很难掌握。采取非侵入式造模方法虽然能够不破坏关节内组织但需要较长造模时间,其严重程度取决于所使用的负荷方案^[23-24]。传统 Hulth 法及改良 Hulth 法^[25-26]均为开放性外科手术造模方法,以破坏膝关节交叉韧带、半月板及侧副韧带为主要干预手段,造成下肢力线失衡而诱发 OA,其创伤大,感染风险较高,对关节内环境影响较大,炎性介质对实验数据可能产生影响,对术者的操作、无菌技术及术后护理更加严格。相较于本实验单纯离断前交叉韧带,切除组织较少,关节破坏小,在造模过程中仅有小部分动物有少量关节内出血,造模 4 周即可形成早期 KOA 模型而言不具有优势。另有学者认为^[27-28]离断前交叉韧带造模成功率高,但对膝关节应力破坏小,建议搭配半月板切除术,根据本实验结果证实仅离断前交叉韧带可获得较为理想的 KOA 模型,对术者操作技能要求不高,重复性好、造模成功率高。

课题组前期^[3-4]在不破坏关节本身结构基础上通过用石膏铁丝固定法和高分子绷带固定法制动关节从而改变关节应力,建立兔 KOA 模型,实验过程简单易行,固定牢固,避免了常用的管型石膏制动笨重、可能出现固定松动、脱落影响造模质量以及手术造模出现的感染等现象,但因造模周期长、早期因环形固定引起肢体肿胀而容易出现肢体远端缺血性坏死可能,也会导致大白兔焦躁不安对造模部位啃食现象。本实验采用手术造模方法可以直观观察到关节结构破坏,诱导成功率高,周期短,在造模第 4 周观察到软骨退行性改变,相较于课题组前期的固定方法在第 8 周观察到典型的 KOA 病理学改变,周期明显缩短,本次实验与钱洁等^[29]的部分研究结果略有差异,可能与造模动物有关。

本次造模方法与关节腔内注射药物造模相比都具有创伤小、出血少、部位可控等优势,但制备 KOA 模型的病理机制不尽相同。本实验通过关节失稳使软骨发生退行性改变,此方法随时间的推移能模拟大部分人膝关节不同时期、不同级别的软骨变化,而关节腔内注射诱导 OA 可适用于软骨病理及关节炎药物预防和治疗的研究,造模时间短,但造模成功后软骨退变程度不随时间变化而加重^[30-31]。

3.2 该造模方法的优点

相较于传统 Hulth 法、改良 Hulth 法、石膏外固

定法及关节腔内注射药物诱导骨关节炎法,本造模方法具有造模时间较短、稳定性好、成功率高、创伤小、损伤过程可模拟创伤型 KOA 的形成。本造模方法在造模后的饲养过程中大白兔体重不断增加,并允许每天自由活动不进行驱赶增加活动量,不额外增加关节负担,模拟人自然生长和负重过程,避免人为因素刻意施加负重,通过该方法诱导的 KOA 模型更接近其发病机制。目前 KOA 的分期、分级多以影像学表现为准,动物诱导模型明确分期、分级鲜见报道^[26,32]。该造模方法随时间的推移能模拟大部分人膝关节不同时期、不同级别的软骨变化,并通过大体观评分标准和 Mankin 评分明确 KOA 模型的早中晚期的分期,对以后 KOA 各个不同时期、不同分级的研究提供了实验数据。

3.3 问题和展望

(1)离断前交叉韧带属于侵入性手术造模,如果无菌意识不强或操作环境不达标不可避免会引起感染、积血及创伤性滑膜炎,从而影响 KOA 的病理进程、组织病理特征或软骨生化代谢的变化等,导致实验结果出现偏移^[33]。有研究^[34]认为可在术后 3 d 肌注抗生素预防感染,本实验在未预防使用抗生素的前提下仅有 2 只大白兔出现关节内感染,整体感染率可控,因此造模组是否全部使用抗生素,需要进一步讨论。(2)兔膝关节长期保持屈曲,具有独特的生物力学结构,其步态模式呈多样化,使兔类膝关节软骨损伤集中于股骨外侧髁,与人类膝关节内侧室的应力高于外侧室的应力正好相反^[21,35]。本次实验观察到胫骨平台外侧髁关节软骨退变程度较内侧髁严重,所以不能将兔 KOA 模型研究情况完全等同于对 KOA 患者的研究,而且该模型在研究不同生物力学对膝关节的影响方面同样具有局限性。(3)有学者^[36]发现当脂肪垫出现炎性浸润、血管化、纤维化时,会与邻近组织产生相互作用,尤其是与滑膜关系密切,临床上很难将两者明确区分开来,目前支持髌下脂肪垫病变与 KOA 发生发展相关性的数据等级较低,需更大的样本数据来支持髌下脂肪垫病变与疼痛的关系。本实验初步发现脂肪垫增厚、变形、纤维化程度可随着 KOA 进展而加重,但考虑到课题经费及实验目的等因素,并未对其产生原因深入研究,有待课题组进一步研究证实脂肪垫与 KOA 之间的相关性。

参考文献

[1] 张君涛,吴超超,张栋林,等. 膝关节骨性关节炎动物模型研究进展[J]. 重庆医学,2018,47(15):2061-2063,2067.
ZHANG J T, WU C C, ZHANG D L, et al. Research progress of animal models of knee osteoarthritis[J]. Chongqing Med, 2018, 47(15):2061-2063, 2067. Chinese.

[2] 田育魁,郝洋,刘俊昌,等. 高分子绷带结合塑料杆建立的兔膝

骨关节炎模型[J]. 中国组织工程研究,2020,24(23):3690-3695.
TIAN Y K, HAO Y, LIU J C, et al. Rabbit knee osteoarthritis model established using polymer bandage and plastic rod[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(23):3690-3695. Chinese.

[3] 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.
BAI X, ZHANG H P, LIU J C, et al. Establishing a rabbit model of knee paralysis by the knee fixation with plaster casts and wire[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2016, 20(18):2603-2608. Chinese.

[4] MANKIN H J, LIPPIELLO L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips[J]. J Bone Joint Surg Am, 1970, 52(3):424-434.

[5] 黄际河,陈蔚东,秦泗通,等. 生物学因子 p-p38、MMP-3、MMP-13 对大鼠关节软骨的破坏作用[J]. 江苏医药,2010,36(2):183-185,120.
HUANG J H, CHEN W D, QIN S T, et al. The damage effect of biological factors on rat osteoarthritis[J]. Jiangsu Med J, 2010, 36(2):183-185, 120. Chinese.

[6] COOPER C, CHAPURLAT R, AL-DAGHRI N, et al. Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: what does the literature say[J]. Drugs Aging, 2019, 36(Suppl 1):15-24.

[7] 谢勇涛. 非甾体抗炎药对老年服用者胃肠功能的影响[J]. 临床医学,2021,41(8):87-89.
XIE Y T. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on gastrointestinal function in elderly users[J]. Clin Med, 2021, 41(8):87-89. Chinese.

[8] 李书博,陈赫,孙云,等. 膝骨关节炎实验动物模型现状研究进展[J]. 长春中医药大学学报,2022,38(8):936-940.
LI S B, CHEN H, SUN Y, et al. Current situation and research progress of experimental animal models of knee osteoarthritis[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2022, 38(8):936-940. Chinese.

[9] LITTLE C, SMITH M. Animal models of osteoarthritis[J]. Curr Rheumatol Rev, 2008, 4(3):175-182.

[10] GARNER B C, STOKER A M, KUROKI K, et al. Using animal models in osteoarthritis biomarker research[J]. J Knee Surg, 2011, 24(4):251-264.

[11] 廖莹莹,张鑫,温呈洪,等. 膝关节僵硬动物模型的造模方法及特点[J]. 中国组织工程研究,2022,26(15):2439-2445.
LIAO Y Y, ZHANG X, WEN C H, et al. Animal models of knee joint stiffness: modeling methods and characteristics[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(15):2439-2445. Chinese.

[12] HULTH A, LINDBERG L, TELHAG H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report[J]. Acta Orthop Scand, 1970, 41(5):522-530.

[13] ZHOU X, ZHANG L, GUO X G, et al. A Macaca fascicularis knee osteoarthritis model developed by modified hulth combined with joint scratches[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:3393-3404.

[14] 武晏屹,白明,田硕,等. 基于中西医临床病症特点的膝骨关节炎动物模型分析[J]. 中国中药杂志,2020,45(11):2481-2485.
WU Y Y, BAI M, TIAN S, et al. Animal model analysis of knee osteoarthritis based on clinical characteristics of Chinese and Western medicine[J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(11):2481-2485. Chinese.

[15] 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.
- [16] KARAHAN S, KINCAID S A, KAMMERMANN J R, et al. Evaluation of the rat stifle joint after transection of the cranial cruciate ligament and partial medial meniscectomy[J]. *Comp Med*, 2001, 51(6): 504-512.
- [17] NAQVI S K B, MURTAZA I, JAVED Q. Role of resistin genetic variations in knee osteoarthritis pathogenesis, a cross sectional study[J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(3): 2657-2663.
- [18] 张妹江, 王瑛, 陈艺, 等. 生物力学在关节软骨修复中的作用[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2018, 12(6): 842-848.
ZHANG S J, WANG Y, CHEN Y, et al. Effects of mechanics in repair of articular cartilage[J]. *Chin J Joint Surg Electron Ed*, 2018, 12(6): 842-848. Chinese.
- [19] 张伟, 刘云鹏, 王星亮, 等. 膝关节前交叉韧带损伤危险因素的影响学分析[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(15): 2361-2366.
ZHANG W, LIU Y P, WANG X L, et al. Imaging analysis of risk factors for knee anterior cruciate ligament injury[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(15): 2361-2366. Chinese.
- [20] LUC B, GRIBBLE P A, PIETROSIMONE B G. Osteoarthritis prevalence following anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review and numbers-needed-to-treat analysis[J]. *J Athl Train*, 2014, 49(6): 806-819.
- [21] GUSHUE D L, HOUCK J, LERNER A L. Rabbit knee joint biomechanics: motion analysis and modeling of forces during hopping[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23(4): 735-742.
- [22] 谢靖, 杨冠. 一种新的半月板切断导致小鼠骨关节炎方法的建立[J]. *军事医学*, 2013, 37(9): 708-711.
XIE J, YANG G. A novel model of osteoarthritis in mice induced by transection of medial meniscus[J]. *Mil Med Sci*, 2013, 37(9): 708-711. Chinese.
- [23] POULET B, HAMILTON R W, SHEFELBINE S, et al. Characterizing a novel and adjustable noninvasive murine joint loading model[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(1): 137-147.
- [24] RAMOS-MUCCI L, ELSHEIKH A, KEENAN C, et al. The anterior cruciate ligament in murine post-traumatic osteoarthritis: markers and mechanics[J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 128.
- [25] 彭旭, 熊华章, 杨继滨, 等. 不同膝骨关节炎模型兔的构建方法: 合理选择及特点[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(28): 4550-4556.
PENG X, XIONG H Z, YANG J B, et al. Different methods for establishing rabbit models of knee osteoarthritis: rational option and characters[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(28): 4550-4556. Chinese.
- [26] 方锐, 艾力江·阿斯拉, 卢勇, 等. 兔骨性关节炎模型构建及早中晚期的特点[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(7): 1218-1222.
FANG R, AILIJIAN A, LU Y, et al. Construction and pathological features of a rabbit osteoarthritis model in early, middle, and later phases[J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2010, 14(7): 1218-1222. Chinese.
- [27] 李忠, 杨柳, 戴刚, 等. 关节镜下半月板部分切除制备骨关节炎动物模型[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(10): 919-921.
LI Z, YANG L, DAI G, et al. Establishment of animal models of bi-lateral knee joint osteoarthritis by arthroscopy[J]. *Acta Acad Med Mil Tertiae*, 2007, 29(10): 919-921. Chinese.
- [28] 喻珮, 刘璐, 李志娟, 等. 膝骨关节炎实验动物模型现状研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(27): 41-44.
YU P, LIU L, LI Z J, et al. Research progress of experimental animal models of knee osteoarthritis[J]. *China Med Her*, 2019, 16(27): 41-44. Chinese.
- [29] 钱洁, 邢雪松, 梁军. 大鼠膝关节骨性关节炎动物模型的两种实验方案[J]. *实验室研究与探索*, 2014, 33(11): 23-27.
QIAN J, XING X S, LIANG J. Two methods to establish rat model of osteoarthritis of the knee[J]. *Res Explor Lab*, 2014, 33(11): 23-27. Chinese.
- [30] 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骨关节炎模型的研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(2): 29-37.
OU B F, BIE Y N, CHEN Q Q, 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. Chinese.
- [31] 张斌, 代凤雷, 尹宏, 等. 地黄醇干预期大鼠膝骨关节炎大鼠膝滑膜组织中炎症相关因子的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(29): 4656-4661.
ZHANG B, DAI F L, YIN H, et al. Effect of catalpol from the root of *Rehmannia glutinosa* on the expression of inflammatory proteins in synovium of the knee joint in rats with early osteoarthritis[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(29): 4656-4661. Chinese.
- [32] 许学猛, 刘文刚, 许树柴, 等. 膝骨关节炎(膝痹)中西医结合临床实践指南[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(22): 2827-2833.
XU X M, LIU W G, XU S C, et al. Clinical practice guidelines for knee osteoarthritis in integrated traditional Chinese and western medicine[J]. *J Pract Med*, 2021, 37(22): 2827-2833. Chinese.
- [33] APPLETON C T, PITELKA V, HENRY J, et al. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(6): 1854-1868.
- [34] 陈光耀, 徐行, 李姝蒙, 等. 旷场实验对 Hulth 法建立的骨关节炎模型大鼠运动功能探究[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(51): 8-9.
CHEN G Y, XU X, LI S M, et al. Research on open-field test in exploring the motor function of osteoarthritis model rats established by hulth method[J]. *World Latest Med Inf*, 2018, 18(51): 8-9. Chinese.
- [35] 王俊雁, 孟庆阳, 龚熹, 等. 多间室和内侧单间室严重骨关节炎内侧半月板突出及后根撕裂的特点分析[J]. *中国运动医学杂志*, 2022, 41(5): 350-354.
WANG J Y, MENG Q Y, GONG X, et al. Characteristics of medial Meniscus extrusion and posterior root tear of patients with severe multicompartiment or medial unicompartimental osteoarthritis[J]. *Chin J Phys Med*, 2022, 41(5): 350-354. Chinese.
- [36] 李健雄, 张程, 辛鹏飞, 等. 膝骨关节炎疼痛机制研究进展[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2021, 15(5): 596-600.
LI J X, ZHANG C, XIN P F, et al. Research progress on pain mechanism of knee osteoarthritis[J]. *Chin J Joint Surg Electron Ed*, 2021, 15(5): 596-600. Chinese.