

· 基础研究 ·

多光谱小动物活体成像技术在骨性关节炎模型评价中的应用

许世兵¹, 单乐天¹, 郭燕威¹, 肖鲁伟¹, 童培建²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的: 利用多光谱小动物活体成像技术动态观察和评价大鼠骨性关节炎模型的应用价值。方法: 取 3 月龄 SD 雄性大鼠 15 只(180±20) g, 利用碘乙酸关节腔注射法建立骨性关节炎模型: 左膝关节腔注射碘乙酸 50 μl 建立 OA 模型组, 右膝关节腔注射等量无菌生理盐水做为正常对照。分别于建模 2、4 周时进行 X-ray 活体成像观察, 测算骨密度。4 周后处死大鼠, 取双侧关节进行组织病理学观察, X 线和组织病理学参考 Kellgren-Lawrence 和 Collins 进行分级。结果: OA 模型造模成功, 活体成像观察发现与对照组相比, 模型组出现关节面不平整、骨赘形成、关节变形、软骨缺损等典型骨性关节炎表型, 并伴有股骨远端骨密度下降明显($P < 0.01$), 胫骨近端骨密度下降不明显($P > 0.05$), 病理学结果一致; 2 周后模型组膝关节接近 Collins 1 级、Kellgren-Lawrence 2 级, 4 周后模型组膝关节接近 Collins 4 级、Kellgren-Lawrence 3 级; 对照组关节面平整, 关节间隙正常, 软骨未见明显缺损, Collins 及 Kellgren-Lawrence 0 级, 股骨远段及胫骨近端骨密度正常。结论: 多光谱小动物成像技术可用于骨性关节炎模型的影像学活体动态观察及骨密度检测, 对骨性关节炎模型评价和相关研究具有重要意义。

【关键词】 骨关节炎, 膝; 动物实验; 模型, 动物; 骨密度

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.06.006

Application of multispectral animal living imaging technology in evaluating osteoarthritis model XU Shi-bing, SHAN Le-tian, GUO Yan-wei, XIAO Lu-wei, and TONG Pei-jian*. *Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To observe application value of multispectral animal living imaging technology in rats model of osteoarthritis. **Methods:** Fifteen male SD rats weighed (180±20) g (3 months old) were received intra-articular injection of iodoacetic acid for establishing osteoarthritis. Articular cavity of left knee of rats were injected into 50 μl iodoacetic acid. The same volume of sterile saline was injected into right knee articular cavity as control. X-ray living imaging and bone mineral density were observed at 2 and 4 weeks after establishment of model. After 4 weeks, rats were sacrificed and their bilateral joints were collected and determined histologically based on Collins classification and Kellgren-Lawrence classification. **Results:** Osteoarthritis model was successfully established, compared with control group, model group showed typical manifestation of osteoarthritis, including irregular cartilage surface, osteophyte formation, joint deformity and cartilage defect, and combined with significant decrease of bone density ($P < 0.01$), while the decrease was not obvious in proximal tibia ($P < 0.05$). After 2 weeks, knee joints in model group was classified as Collins grade 1 and Kellgren-Lawrence grade 2, then classified as Collins grade 4 and Kellgren-Lawrence grade 3 after 4 weeks, control group showed smooth articular surface, normal joint space and intact cartilage surface, knee joints was classified as Collins and Kellgren-Lawrence grade 0, and bone density of distal femur and proximal tibia were normal. **Conclusion:** Multispectral animal living imaging technology could be used in dynamic observation of living imaging and detection of bone density in the animal model of osteoarthritis, and it is significant for evaluation of osteoarthritis model, and its related research.

KEYWORDS Osteoarthritis, knee; Animal experimentation; Models, animal; Bone density

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(6): 466-470 www.zggssz.com

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)又称退行性骨关

基金项目: 2012 年浙江省自然科学基金(编号: LQ12H27003)

Fund program: Provided by National Sciences Foundation of Zhejiang Province(No. LQ12H27003)

通讯作者: 童培建 E-mail: tongpeijian@163.com

Corresponding author: TONG Pei-jian E-mail: tongpeijian@163.com

节病、膝关节增生性关节炎或膝关节骨性关节炎等, 是一种以膝关节疼痛、僵硬、活动受限甚至关节畸形为主要临床症状的常见疾病。中老年人发病率高, 是导致老年人下肢疼痛和伤残的主要原因, 严重危害中老年人的身体健康。目前, OA 的临床诊断主要依靠影像学观察, 而实验研究中只能以组织病理学指

标作为主要依据,无法进行活体诊断和动态分析,难以与临床相一致。多光谱小动物活体成像是基于可见光成像、X 线片等技术的动物影像技术,具有无创、安全、分辨率高等特点,可用于活体动物的动态观察和相关指标检测,其 X 线片和骨密度检测功能尤其适用于骨与关节疾病模型的观察分析。然而,目前国内外尚无有关小动物活体成像评价 OA 模型的相关报道。因此,本研究通过建立大鼠膝关节 OA 模型,首次采用多光谱小动物活体成像技术对该模型进行影像学评价,并通过模型分级分析该技术的准确性,最终为 OA 的实验研究与临床诊断建立新关联。

1 材料与方法

1.1 实验材料 碘乙酸盐(美国 Sigma 公司),微量注射器(江苏凌基仪器公司),小动物活体成像仪(美国 Kodak 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 实验动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠,3 月龄,体重(180±20)g,由浙江中医药大学实验动物中心提供(生产许可证 SCXK 沪 2008-0016)。所有动物提前购入,适应性饲养 7 d,每笼 5 只,室温 21~23℃,相对湿度维持在 30%~40%,标准饲料喂养,自由饮水。观察 1 周后无明显全身疾病及其他异常后开始实验。

1.3 OA 模型建立 SD 大鼠在无菌条件下,10%水合氯醛腹腔注射(0.3 ml/100 g)麻醉,麻醉后大鼠仰卧位固定于操作台,剃须刀剃除双侧膝关节周围绒毛,用酒精棉球擦拭 2 遍,术者微屈大鼠膝关节以微量注射器由髌骨内侧下方斜上刺入关节腔,左膝关节腔注射碘乙酸盐 50 μl 建立 OA 模型组,右膝关节腔注射等量无菌生理盐水作为对照。注射后置于标准动物饲养笼中自由活动及进食。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 小动物成像技术与标本的处置 分别在建模第 2、4 周用 10%水合氯醛按 0.3 ml/100 g 腹腔注射实验大鼠,每次 8 只;多光谱小动物活体成像型号 Multimodal pro Light source 400 W,拍摄参数:setting: gmdXRY -1.000 Min -60.00 mm -0.8 mm;Exposure Time: 2 min;Illumination source X-ray Kvp: 35;X-ray Filter 0.8 mm;f-stop: 2.50;Fov: 60.00;每组扫描结束后,将大鼠麻醉法处死后取双膝关节;在膝关节上下 1~1.5 cm 处用锐利器械切断,整块取下股骨髁部和胫骨平台,观察大体情况。

1.4.2 小动物活体成像观察和骨密度测定 使用 X 线片采集正常和 OA 模型关节的影像学图像,按照骨密度测定软件分别测定大鼠股骨远端和胫骨近端骨密度。各个 X 线片的拍摄设置,拍摄 Fov: 60~

100 mm,拍摄局部时视野设置要更小。拍摄位于视野中间,曝光时间至少 1 min,滤膜选择 0.8 mm。

1.4.3 病理组织学观察 矢状面切取软骨连同软骨下骨,在将左膝关节切成 0.5 cm 厚的组织块,标本固定后石蜡包埋切片,以 HE 染色观察组织病理学变化。

1.4.4 动物成像和病理组织图像的分级 采用 Kellgren-Lawrence^[1]和 Collins 分级法^[2]对小动物成像图及病理组织图像进行分级。小动物成像图参照 Kellgren-Lawrence 分级标准:0 级:正常;1 级:可疑的关节间隙变窄及关节边缘骨赘;2 级:有明确的骨赘,可能存在关节间隙变窄;3 级:骨赘较多,关节间隙变窄明确,硬化改变稍微及可能存在骨关节畸形改变;4 级:有大量骨赘,其关节间隙变窄明显,严重硬化改变及明显的畸形并膝内翻。病理组织学参照 Collins 分级标准:0 级:正常关节软骨;1 级:软骨表面可见切线裂隙形成,切线带表面有小凸凹;2 级:纵行裂隙形成,软骨细胞增生,并成簇状排列;3 级:深部裂隙形成,可达到钙化带;4 级:侵蚀软骨组织,软骨剥脱,暴露软骨下骨。

1.5 统计学分析 数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,所得实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用两样本均数的 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小动物活体成像分析 影像学结果显示 2 周后正常组右膝关节间隙正常,无骨质增生和骨硬化形成(见图 1a)。2 周模型组可见膝关节股骨下端和胫骨平台有明显病变,出现关节面不平整、关节变形、软骨缺损等症状(见图 1b)。4 周后正常组关节无异常病变(见图 2a);模型组可见膝关节间隙狭窄明显,关节面磨损以及关节变形更为严重,似有骨赘形成(见图 2b)。

2.2 组织病理观察 造模 2 周后,正常组膝关节 HE 染色显示股骨下端和胫骨平台软骨完整、表面无缺损或裂隙,软骨细胞排列正常有序,软骨下骨骨小梁完整无异常,骨髓腔内细胞正常(见图 3a);2 周模型组显示,股骨下端软骨面出现不规则凹陷,软骨细胞排列紊乱,并趋于肥大性末端分化,胫骨平台软骨出现缺损、凹陷和增生,缺损处软骨细胞丢失,股骨和胫骨端骨小梁面积明显减少,骨髓腔细胞增生、排列紊乱(见图 3b)。

造模 4 周后,正常组膝关节 HE 染色显示股骨下端和胫骨平台软骨完整、表面无缺损或裂隙,软骨细胞排列正常有序,软骨下骨骨小梁完整,骨髓腔内细胞正常(见图 4a);4 周模型组显示,胫骨平台软骨

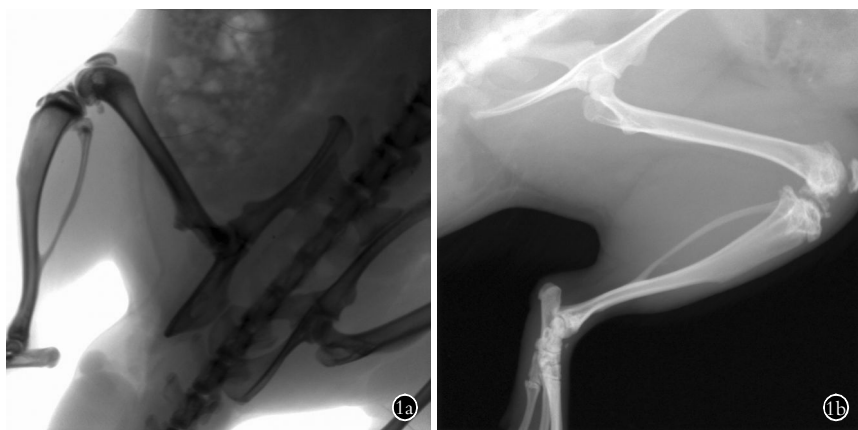


图 1 多光谱小动物活体成像系统 X 线片观察造模 2 周后正常大鼠膝关节与 OA 模型大鼠膝关节影像学表征 1a. 正常组膝关节间隙正常, Kellgren-Lawrence 分级 0 级 1b. 模型组关节面不平整、关节变形、软骨缺损等症状, Kellgren-Lawrence 分级 2 级

Fig. 1 Imaging manifestation of knee joint in normal and OA model group at 2 weeks after modeling by multispectral animal living imaging technology 1a. Normal group showed normal joint space, and Kellgren-Lawrence classification grade 0 1b. Model group showed irregular cartilage surface, osteophyte formation, loss of cartilage and Kellgren-Lawrence classification grade 2



图 2 多光谱小动物活体成像系统 X 线片观察造模 4 周后正常大鼠膝关节与 OA 模型大鼠膝关节影像学表征 2a. 正常组关节无异常病变, Kellgren-Lawrence 分级 0 级 2b. 模型组可见膝关节间隙狭窄明显, 关节面磨损较严重, Kellgren-Lawrence 分级 3 级

Fig. 2 Imaging manifestation of knee joint in normal and OA model group at 4 weeks after modeling by multispectral animal living imaging technology 2a. Kellgren-Lawrence in normal group classification grade 0 2b. Model group showed obvious narrow of joint space, serious wear of joint surface and Kellgren-Lawrence classification grade 3

被严重破坏, 出现软骨缺失、软骨细胞坏死、类骨赘形成、软骨下骨暴露, 并可见软骨下骨硬化、囊肿、骨小梁面积减少等现象(见图 4b)。

2.3 骨密度检测结果 如表 1 所示, 与正常组比较, 造模 2 周和 4 周后的模型组股骨远端骨密度明显下降($P < 0.01$), 而胫骨近端骨密度在正常组和模型组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究是通过多光谱小动物成像技术在骨性关节炎动物模型评价中的运用, 评价多光谱小动物成像技术在骨性关节炎中的应用价值。目前 OA 动物

模型造模方法有: 关节制动、关节内、外手术, 关节腔注射药物及通过人工筛选或基因改造获得自发性 OA 模型等^[3]。其中, 关节腔药物注射法具有成功率高、造模时间短、造模方法适合于药物治疗等优点^[4]。有研究表明^[5-7], 碘乙酸盐在大鼠膝关节腔注射可引起典型的 OA, 其发展迅速、重复性好, 可较好模拟人的 OA 表型膝关节。

本实验通过碘已酸关节腔注射诱导大鼠骨性关节炎模型, 在第 2、4 周分别通过多光谱小动物成像和组织病理学对大鼠关节进行分析研究。多光谱小动物成像结果显示: 与对照组比较, 2 周时模型组膝关节有明显的骨赘, 可能存在关节间隙变窄, 符合 Kellgren-Lawrence 2 级。4 周时模型组膝关节骨赘较多, 关节间隙变窄明确, 硬化改变稍微及可能存在骨关节畸形改变, 符合 Kellgren-Lawrence 3 级。结果表明动物造模成功, 多光谱小动物成像能明确反应大鼠膝关节退变的动态过程。相对于传统动物实验技术, 可以避免由于宰杀动物而造成的组间差异以节省动物成本, 可以动态观察骨性关节炎在体内发生退变的过程, 与临床骨性关节炎的发生及发展更相似。由于具有操作简单、结果直观可靠且特异性强等特点, 多光谱小动物成像技术具有其独特的优势。组织病理学结果

显示: 2 周时模型组大鼠膝关节软骨表面可见缺损、凹陷和增生, 切线裂隙形成, 切线带表面有小凸凹, 接近 Collins 1 级。4 周时模型组大鼠膝关节见局部软骨丢失, 暴露软骨下骨, 接近 Collins 4 级。说明碘乙酸盐关节腔注射后, 导致膝关节内软骨基质的丧失和胶原纤维的减少, 这使得软骨容易遭受侵蚀, 出现软骨变薄、缺损、糜烂或溃疡以及软骨下骨外露等改变。组织病理改变与多光谱动物成像相符, 结果表明碘乙酸盐模型从 2~4 周的发展进程符合临床 OA 分期, 进一步证明该模型适用于 OA 的实验研究, 能较

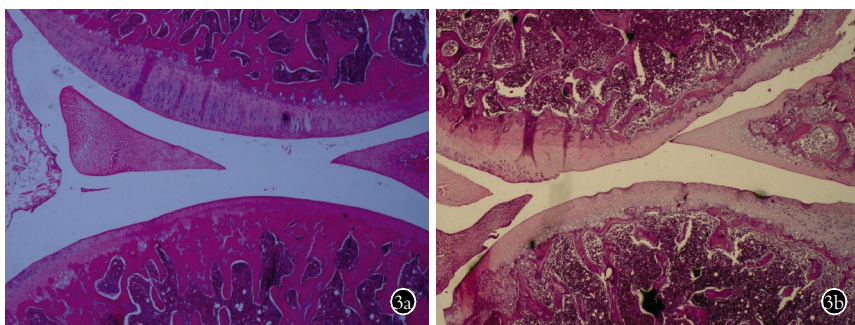


图 3 造模 2 周后正常大鼠膝关节与 OA 模型大鼠膝关节组织病理 HE 染色观察 (HE×40)
 3a. 正常组股骨下端和胫骨平台软骨完整, Collins 分级 0 级 3b. 模型组股骨下端软骨面出现不规则凹陷, 胫骨平台软骨出现缺损、凹陷和增生, Collins 分级 1 级

Fig. 3 Histopathological observation of knee joint in normal and OA group by HE staining (HE×40) at 2 weeks after molding 3a. Normal group showed cartilage integrity of distal femur and tibial plateau, Collins classification grade 0 3b. Model group showed irregular concave of cartilage in terminal femur, defect, sunken and hyperplasia of tibial cartilage, Collins classification grade 1

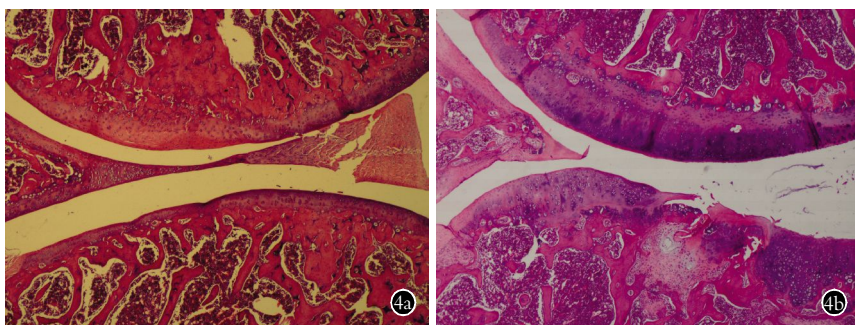


图 4 造模 4 周后正常大鼠膝关节与 OA 模型大鼠膝关节组织病理 HE 染色观察 (HE×40)
 4a. 正常组股骨下端和胫骨平台软骨完整, Collins 分级 0 级 4b. 模型组胫骨平台软骨被严重破坏, 出现软骨缺损、软骨细胞丢失, Collins 分级 4 级

Fig. 4 Histopathological observation of knee joint in normal and OA group by HE staining (HE×40) at 4 weeks after molding 4a. Normal group showed cartilage integrity of distal femur and tibial plateau, Collins classification grade 0 4b. Model group showed serious cartilage broken of tibial plateau, defect of cartilage, and loss of chondrocyte, Collins classification grade 4

表 1 两组大鼠 2、4 周股骨远端和胫骨近端骨密度值
 ($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

Tab.1 Bone density of distal femur and proximal tibia at 2 and 4 weeks between two groups ($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

组别	数量 (只)	股骨远端		胫骨近端	
		2 周	4 周	2 周	4 周
对照组	8	5.99±0.10	6.48±0.14	2.02±0.43	2.02±0.43
模型组	8	2.20±0.15	4.69±0.02	1.42±0.94	2.35±0.05
检验值	-	22.50	36.78	1.00	1.23
P 值	-	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05

全面地反映 OA 的病变过程。

通过小动物活体成像技术对 OA 模型大鼠的骨密度进行测量分析发现, OA 组 2 周及 4 周模型大鼠股骨下端骨密度较正常组明显下降。说明在骨性关节炎形成的过程中, 伴有骨密度的下降。OA 与骨质

疏松 (osteoporosis, OP) 之间存在密切的联系。目前认为 OP 是 OA 的病因之一, 由于软骨下骨发生骨质疏松, 关节塌陷导致关节软骨受力不均, 从而继发软骨损害和骨赘增生^[8]。周乙雄等^[9]对 OA 患者的腰椎和髌部的骨密度进行测量, 发现中老年女性 OA 患者中患有骨质疏松的比例较高。骨密度下降可能与 OA 环境下大量促合成细胞因子有关, 促合成的细胞因子能降低胰岛素等生长因子水平, 后者与骨质疏松骨量减少密切相关^[10]。此外, OA 刺激分泌的大量炎症因子如白介素 1、白介素 6 等对骨的过度吸收和加快代谢起到促进作用^[11]。本实验研究发现 OA 模型关节骨密度的减少, 进一步论证了骨性关节炎与骨质疏松之间的关系, 进一步提示小动物活体成像技术应用于骨关节疾病的合理性和科学性。

本研究是小动物活体成像技术应用用于 OA 模型研究的首次报道, 也从动物模型的角度揭示 OA 与 OP 之间的内在关联, 为 OA 及 OA 防治的进一步研究奠定科学基础。小动物活体成像技术类似于临床影像学诊断, 能在不损伤动物的前提下对其进行可见光成像或 X 线片观察, 可以快速获取活体动物的影像学资料, 并进行动态跟踪, 适用于早、中、晚各期模型评价、动态模型观察以及活体药效评价。骨关节病动物模型多以处死后的组织病理学观察为评价标准, 无法避免实验过程中的动物损耗与浪费, 更无法对同一个体进行疾病的动态观察。应用小动物活体成像技术不仅能解决上述问题, 还能更紧密的结合临床, 掌握疾病发展进程, 从而促进疾病模型分期, 为临床的治疗提供新的实验依据。

参考文献

[1] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 1957, 16(4):494~501.
 [2] 雷新玮, 尹建忠, 倪红艳, 等. 膝关节软骨退变的 MRI 与病理对照研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 2003, 14(6):424~427.
 Lei XW, Yi JZ, Ni HY, et al. MRI of articular cartilage degeneration and correlation with pathology[J]. Zhongguo Lin Chuang Yi Xue

Ying Xiang Za Zhi, 2003, 14(6):424-427. Chinese.

[3] Bendele AM. Animal models of osteoarthritis[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001, 1(4):363-376.

[4] 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):S2-S6.

[5] Dunham J, Hoedt - Schmidts, Kalbhen DA. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug[J]. Int J Exp Pathol, 1993, 74(3):283-289.

[6] Guzman RE, Evans MG, Boves S. Mono-iodoacetate induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints; an animal model of osteoarthritis[J]. Toxicol Pathol, 2003, 31(6):619-624.

[7] 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.

[8] 伦学刚, 谈志龙, 白人骁. 骨质疏松与骨性关节炎关系的研究进展[J]. 中国骨伤, 2007, 20(12):876-878.

Lun XG, Tan ZL, Bai RX. Advance in association of osteoporosis and osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2007, 20(12):876-878. Chinese.

[9] 周乙雄, 姚力, 薛延, 等. 中老年女性骨关节炎患者骨密度的特点[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3):219-221.

Zhou YX, Yao L, Xue Y, et al. Bone mineral density in elderly women with knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2002, 8(3):219-221. Chinese.

[10] 邵俊. 细胞因子与骨关节炎[J]. 国外医学:骨科学分册, 2001, 22(3):143-146.

Shao J. Cytokines and bone arthritis[J]. Guo Wai Yi Xue; Gu Ke Xue Fen Ce, 2001, 22(3):143-146. Chinese.

[11] 程云英. 细胞因子与骨质疏松的实验研究[J]. 江苏医药杂志, 2001, 27(5):341-342.

Chen YY. The experimental study on the relationship between Cytokines and osteoporosis[J]. Jiang Su Yi Yao Za Zhi, 2001, 27(5):341-342. Chinese.

(收稿日期:2013-09-10 本文编辑:李宜)

颈复康颗粒和腰痛宁胶囊临床研究与应用征文通知

山庄牌“颈复康颗粒”、“腰痛宁胶囊”系颈复康药业集团有限公司生产的治疗颈椎病、腰腿痛的常用药品,临床应用近 30 年,深受患者与医生的好评。为了总结“颈复康颗粒”、“腰痛宁胶囊”多年来的临床应用经验,更好地指导临床用药,中医杂志社与颈复康药业集团有限公司联合举办此次征文活动,现将有关事项通知如下。

1 征文内容:(1)“颈复康颗粒”治疗各种类型颈椎病(神经根型、椎动脉型、交感神经型、颈型、混合型等)的临床应用经验、体会与分析;“腰痛宁胶囊”治疗腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、腰肌劳损、腰肌纤维炎、风湿性关节炎,症见腰腿痛、关节痛及肢体活动受限等病症的临床经验、体会与分析;(2)“颈复康颗粒”、“腰痛宁胶囊”临床用量、用法的研究与经验总结;(3)“颈复康颗粒”、“腰痛宁胶囊”组方研究、药理研究与探讨;(4)“颈复康颗粒”、“腰痛宁胶囊”临床扩大应用范围的研究与探讨。

2 征文要求:(1)来稿应未公开发表,字数在 4 000 字以内,请加盖单位公章,不退稿;(2)请采用法定计量单位;(3)文题下署作者姓名、单位、通讯地址、邮编和联系电话等。请用电子邮件形式投稿(Word 文件格式)。

3 奖励办法:由全国中医药界知名专家组成评审委员会,将评选出:一等奖 2 篇(每篇奖励 5000 元);二等奖 8 篇(每篇奖励 3000 元);三等奖 15 篇(每篇奖励 1500 元);优秀奖 25 篇(每篇奖励价值 500 元礼品)获奖者将由主办单位颁发获奖论文证书、奖金或礼品,获奖论文达到刊用标准者将在《中医杂志》等期刊发表,其他获奖论文将在《中医杂志》2015 年增刊发表,并赠送样刊 1 册。此次征文活动不收任何费用。评选结果将在《中医杂志》、《健康报》上予以公布。主办单位将邀请部分获奖论文作者免费参加在河北省承德市召开的颁奖大会并考察承德颈复康药业集团有限公司。

论文请于 2015 年 3 月 30 日前发至邮箱:jtcm@163.com。联系地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,联系人:22 号编辑,邮编:100700。电话:(010)64035632。