

# 尪痹片对骨性关节炎模型动物膝关节组织形态学的影响

贺蓉, 杨依靠, 徐启华, 彭博, 韩靖雅, 李建荣\*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**观察尪痹片对骨性关节炎模型动物膝关节组织病理损伤的影响。**方法:**家兔和大鼠模型动物均随机分为6组(假手术组,模型组,阳性药盐酸氨基葡萄糖组和尪痹片高、中、低剂量组)。除假手术组外,其余各组均造模,兔注射木瓜蛋白酶造模方式为尪痹片高、中、低剂量组( $10.0, 5.0, 2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和盐酸氨基葡萄糖组( $0.26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),给药体积均选择为 $4 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,造模40 d后连续灌胃给药33 d;大鼠切除前交叉韧带造模方式为尪痹片高、中、低剂量组( $14.0, 7.0, 3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和盐酸氨基葡萄糖组( $0.36 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),给药体积均为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,造模60 d后连续灌胃给药31 d。每天给药1次,假手术组和模型组给予等体积水。给药结束后,观察动物膝关节活动度和膝关节周长,分别取膝关节进行病理检查,按照半定量分级标准进行综合评分和统计。**结果:**与模型组比较,尪痹片不同剂量组均可明显改善模型家兔膝关节的活动度,显著减少膝关节周长;可明显改善模型大鼠的活动状态;均可明显抑制2种模型动物膝关节滑膜细胞增生和炎性细胞浸润的程度。**结论:**尪痹片对木瓜蛋白酶注射诱导家兔和前交叉韧带切除诱导大鼠骨关节炎动物膝关节的软骨、滑膜损伤均具有明显改善作用,提示该制剂对骨关节炎具有一定的治疗作用。

**[关键词]** 尪痹片; 骨性关节炎模型; 膝关节组织形态; 软骨; 滑膜; 盐酸氨基葡萄糖; 木瓜蛋白酶

**[中图分类号]** R24;R944.4;R945;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0142-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050142

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171212.1839.026.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-13 10:19

## Effect of Wangbipian on Morphological Changes of Knee-joint of Animal with Osteoarthritis

HE Rong, YANG Yi-fei, XU Qi-hua, PENG Bo, HAN Jing-ya, LI Jian-rong\*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Wangbipian on the histopathological lesion of knee-joint in experimental animal with osteoarthritis. **Method:** The therapeutical effect of Wangbipian on the osteoarthritis was detected in the rat osteoarthritis model induced by transection of anterior cruciate ligament on the knee-joint and the rabbit osteoarthritis model induced by injection of papain in knee-joint. SD rats and rabbits were divided into sham operation group, model group, glucosamine hydrochloride group and three Wangbipian-treated groups. For the rabbit osteoarthritis model, the rabbits were intragastric administrated with glucosamine hydrochloride (dose of  $0.26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and Wangbipian at doses of  $10.0, 5.0, 2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 33 days. For the rat osteoarthritis model, the rats were intragastric administrated with glucosamine hydrochloride ( $0.36 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and Wangbipian at doses of  $14.0, 7.0, 3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for 31 days. Animals in the sham operation group and model group were administrated with the same volume of water. Range of motion (ROM), circumference and histopathological changes in the knee-joint were observed after the administration. The lesions of cartilago articularis, synovium and the inflammation of soft tissue were comprehensive evaluated. **Result:** As compared with the model group,

**[收稿日期]** 20171012(012)

**[第一作者]** 贺蓉,助理研究员,从事中药药理和安全评价研究,Tel:010-64056575,E-mail:herong624@163.com

**[通信作者]** \*李建荣,博士,研究员,从事中药药理和安全评价研究,Tel:010-64056575,E-mail:jrongliem@sina.com

administration of Wangbipian could significantly improve the ROM and decrease the circumference of the knee-joint. Histopathological analyses demonstrated that Wangbipian could inhibit the hyperplasia of synovioocyte and reduce the infiltration of inflammatory cells in both rat and rabbit models. **Conclusion:** Wangbipian can alleviate the damage of cartilage and synovium of knee-joint in the experimental animal models of osteoarthritis, which suggests that Wangbipian has therapeutic effect on osteoarthritis.

**[Key words]** Wangbipian; osteoarthritis model; knee-joint tissue morphology; cartilage; synovium; glucosamine hydrochloride; papain

骨关节炎是一种以关节软骨变形、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病,临床表现为关节疼痛、肿胀、活动受限、行走能力下降,晚期常因关节变形、活动受限而导致生活质量下降。本病病程缓慢,目前尚无特效药物治疗,西药主要用非甾体类抗炎药物,虽然能明显缓解疼痛,但不良反应也非常明显。尪痹片由地黄、熟地黄、续断、附子等 17 味中药经提取制成,收载于 2015 年版《中国药典》(一部),具有补肝肾、强筋骨、祛风湿、通经络的功效,用于肝肾不足、风湿阻络所致的尪痹,症见肌肉、关节疼痛,局部肿大,僵硬畸形,屈伸不利,腰膝痠软,畏寒乏力,类风湿性关节炎见上述症候者。在多年临床应用中发现,尪痹片对骨性关节炎所导致的关节疼痛、局部肿大、屈伸不利和晨僵症状具有明显改善作用<sup>[1-2]</sup>。本实验拟在木瓜蛋白酶致骨性关节炎和前交叉韧带切除致骨性关节炎 2 种模型上,观察尪痹片对模型动物膝关节软骨及滑膜组织病理的影响,从药效学角度验证其对骨性关节炎的有效性,并与临床缓解症状的效果进行互补性研究。

## 1 材料

Excelsior ES 型全自动脱水机, Histocentre 3 型石蜡包埋机, Finesse 325 型轮转式切片机和 Varistain Gemini 型全自动染色机(英国 Shandon 公司); BX51 型生物照相显微镜(日本 Olympus 公司)。尪痹片提取物[由地黄、熟地黄、续断、附子(黑附片)等 17 味中药提取制成,每克提取物干粉含生药 7.250 g,由辽宁好护士药业集团提供,批号 151101], 盐酸氨基葡萄糖胶囊(葡立,山西中远威药业有限公司,批号 20151111,每粒规格 0.24 g), 木瓜蛋白酶(美国 Simga 公司,货号 SLBN2586V), 水为纯净水,试剂均为分析纯。

成年日本大耳白兔,雄性,体质量 2.0~2.5 kg,由北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司提供,合格证号 SCXK(京)2015-0005,普通级,经中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会批准,批准号 20163002;SD 大鼠,雌雄各半,体质量处于

180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,SPF 级,经中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会批准,批准号 20162002。

## 2 方法

### 2.1 模型的复制、给药及观察指标

**2.1.1 木瓜蛋白酶模型** 日本大耳白兔 60 只,按体质量随机选取 10 只作为假手术组,其余动物采取兔膝关节腔内注射木瓜蛋白酶造成骨关节炎模型<sup>[3]</sup>。首次注射后第 5 天再注射 1 次,共注射 2 次。假手术组左右两膝关节均注入相同剂量生理盐水。自造模日起,每日驱赶动物活动 2 次,每次 30 min。

造模后 40 d 按照动物膝关节肿胀程度随机分成模型组,盐酸氨基葡萄糖组( $0.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),尪痹片高、中、低剂量组(剂量  $10.0, 5.0, 2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),模型组和尪痹片高剂量组每组 10 只,盐酸氨基葡萄糖组和尪痹片中、低剂量组每组 9 只。各给药组连续灌胃给药 33 d,给药体积均为  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,假手术组和模型组兔灌胃给予等量水。于末次给药后 24 h,观察记录兔的行走状态,按照量表评分记录其关节活动度;处死动物后,以膝关节正面中点为界,以软尺围绕兔膝周进行测量,记录兔膝关节周长;肉眼观察解剖前后兔膝关节的外观形态;剖开兔膝关节局部皮肤,截取自膝关节上下约 2 cm 部位置于 10% 甲醛中固定,4 d 后用 30% 甲酸组织脱钙液脱钙 2 次,每次 2 d,脱钙后取材,分别在股骨和胫骨距离膝关节 5 mm 处横断,之后沿膝关节正中矢状面纵切,与正中矢状面平行,厚度为 3~5 mm 处纵切,取得的组织块流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,4  $\mu\text{m}$  厚切片,利用苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织形态,对膝关节发生的病理改变进行分级,按照病变程度的分级标准进行统计,比较组间差异,见表 1。

**2.1.2 前交叉韧带切除模型** SD 大鼠 90 只,雌雄各半,按体质量随机取 14 只大鼠(雌雄各 7 只)作为假手术组,其余大鼠均采用膝关节前交叉韧带切

表 1 木瓜蛋白酶模型家兔的膝关节病理变化等级评分标准及特征描述

Table 1 Grading standards and signalment of pathological changes of knee-joint in papain model rabbits

病理变化等级	评分 / 分	关节周围软组织	滑膜	软骨
-	0	关节周围软组织内未见炎性细胞浸润、水肿,胶原纤维增生等现象	滑膜细胞呈单层,未见炎性细胞浸润	软骨面光滑、平整,软骨细胞形态规则,未见软骨脱落
+	1	关节周围软组织内少量炎性细胞浸润,轻度水肿,极少量胶原纤维增生	滑膜细胞轻度增生,炎症反应不明显	软骨面局灶性凹凸不平,不光滑
++	2	关节周围软组织内局灶性炎性细胞浸润,中度水肿,胶原纤维增生	滑膜细胞增生,层数增多,少量炎性细胞浸润	软骨面大范围凹凸不平,表面有少量胶原纤维增生,个别软骨细胞变性,少量软骨细胞脱落至关节囊
+++	3	关节周围软组织内大面积炎性细胞浸润,出现脓细胞灶,重度水肿,大量胶原纤维增生	滑膜细胞增生严重,层数显著增多,偶见绒毛状,大量炎性细胞浸润	软骨面大范围严重凹凸不平,与滑膜及关节周围软组织粘连,软骨纤维化,大量软骨细胞变性、脱落至关节囊
	4	关节周围软组织基本结构消失、坏死,大面积纤维化	滑膜细胞坏死,基本结构消失,大面积纤维化	软骨细胞大面积坏死,脱落至关节囊

除法制备大鼠骨关节炎模型<sup>[4]</sup>。术后大鼠自由进食、活动,每日上、下午定时各 30 min 驱赶其活动。造模后 60 d,将模型大鼠按照体质量随机分成模型组,盐酸氨基葡萄糖组(0.36 g·kg<sup>-1</sup>),尪痹片高、中、低剂量组(剂量分别为 14.0,7.0,3.5 g·kg<sup>-1</sup>),各给药组连续灌胃给药 31 d,给药体积均为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,假手术组和模型组大鼠灌胃给予等量

水。于给药结束后观察大鼠的行走状态,处死动物后,肉眼观察解剖前后大鼠膝关节的外观形态;截取大鼠膝关节上下 1 cm 部位,置于 10% 甲醛中固定,脱钙,脱水,制片,HE 染色,于光镜下观察组织形态,操作步骤同 2.1.1 项,对膝关节发生的病理改变进行分级,按照病变程度的分级标准进行统计,比较组间差异,见表 2。

表 2 前交叉韧带切除模型大鼠的膝关节病理变化等级评分标准及特征描述

Table 2 Grading standards and signalment of pathological changes of knee-joint in rats with anterior cruciate ligament removal model

病理变化等级	评分 / 分	滑膜	软骨
-	0	关节囊的胶原纤维、滑膜未见增生	软骨面光滑、平整,组织结构完整,未见软骨脱落
±	1	关节囊偶见胶原纤维极轻度增生,偶见局灶性滑膜细胞由单层细胞增生生成多层	软骨面局灶性轻度不平整,软骨有脱落趋势
+	2	关节囊胶原纤维局灶性轻度增生,滑膜细胞局灶性增生生成多层	软骨面偶见节段性胶原纤维增生,胶原纤维轻度增生,少量软骨细胞脱落至关节囊
++	3	关节囊胶原纤维成片状显著增生,滑膜细胞大面积增生生成多层	软骨面大面积被增生的胶原纤维覆盖,胶原纤维中度增生,大量软骨细胞部分坏死,脱落至关节囊
+++	4	关节囊胶原纤维大面积显著增生,滑膜细胞由单层细胞增生生成多层细胞,并呈现出绒毛状,生长至关节囊中	软骨面凹凸不平并且完全被增生的胶原纤维覆盖,胶原纤维重度增生,软骨细胞大面积坏死,脱落至关节囊

2.2 统计学分析 计量数据采用组间 *T* 检验,以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数数据采用非参数检验,均采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,比较组间差异, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对木瓜蛋白酶模型家兔膝关节的影响

3.1.1 膝关节活动度 假手术组兔活动正常。与假手术组比较,模型兔在造模后第 2 天即出现行走困难,无外力推动基本不自主行走,行走时明显跛

行。右下肢不着地、翘起,右膝关节肿胀、活动度明显减小,用手触摸时动物喊叫或挣扎,自主活动量明显减少。造模 2 周后多数动物的自主活动度和跛行稍有好转,但个别动物仍在无外力推动下基本不自主行走。分组给药结束后,与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖组及尪痹片高、中、低剂量组兔的行走状态均有明显改善,膝关节活动度明显增加( $P < 0.01$ )。见表 3。分级标准为 0 级,兔行走正常,膝关节活动正常;1 级,行走基本正常,膝关节活动轻度受限;

2 级,行走稍有跛行,膝关节活动明显受限;3 级,行走明显跛行,膝关节活动严重受限;4 级,不能正常行走,右后足不能落地,膝关节活动严重受限。

表 3 尪痹片对兔膝关节活动度的影响

Table 3 Effect of Wangbipian on range of motion of knee-joint of rabbits

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	动物数量/只			
			0 级	2 级	3 级	4 级
假手术	-	10	10	0	0	0
模型	-	10	0	1	6	3
盐酸氨基葡萄糖	0.26	7	6	1	0	0
尪痹片	10.0	9	5	4	0	0
	5.0	9	7	2	0	0
	2.5	8	4	4	0	0

注:1 级的动物数量均为 0。

**3.1.2 膝关节周长** 与假手术组比较,模型组兔膝关节周长明显增加( $P < 0.01$ ),提示兔膝关节明显肿胀。与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖组及尪痹片高、中、低剂量组兔膝关节周长均明显减小( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 尪痹片对兔膝关节周长的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of Wangbipian on perimeter of knee-joint of rabbits ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	周长/cm
假手术	-	10	15.0 ± 0.6
模型	-	10	18.1 ± 0.8 <sup>1)</sup>
盐酸氨基葡萄糖	0.26	7	16.0 ± 1.1 <sup>2)</sup>
尪痹片	10.0	9	15.3 ± 0.8 <sup>2)</sup>
	5.0	9	15.4 ± 0.7 <sup>2)</sup>
	2.5	8	15.9 ± 0.7 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.1.3 膝关节组织形态** 假手术组兔膝关节表面的薄层透明软骨表面光滑,未见破坏,关节囊的滑膜细胞呈单层,未见增生,间质未见炎性细胞浸润,无渗出液,周围未见胶原纤维增生,组织结构未见显著异常。模型组兔膝关节的主要病变为滑膜细胞增生、增厚成多层,关节周围软组织发生炎症反应,大量中性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞浸润,水肿,大量胶原纤维增生,关节囊纤维化;严重的滑膜组织结构消失,大量胶原纤维增生,软骨纤维化,关节囊内大量胶原纤维增生;软骨细胞变性、坏死,脱落至关节腔内形成软骨赘,软骨中大量嗜中性粒细胞堆积;与假手术组比较表现出显著的骨性关节炎病理改

变<sup>[5-8]</sup>。盐酸氨基葡萄糖组主要病变为软骨面不光滑,凹凸不平,软骨细胞轻度纤维化,滑膜细胞轻度增生,见少量炎性细胞局灶性浸润,关节囊纤维化程度减轻;滑膜细胞呈单层,周围胶原纤维轻度增生;膝关节改变较模型组有显著改善,尤其在缓解关节囊胶原纤维增生、滑膜细胞增生及减轻炎症反应,修复软骨细胞方面有较好的效果。

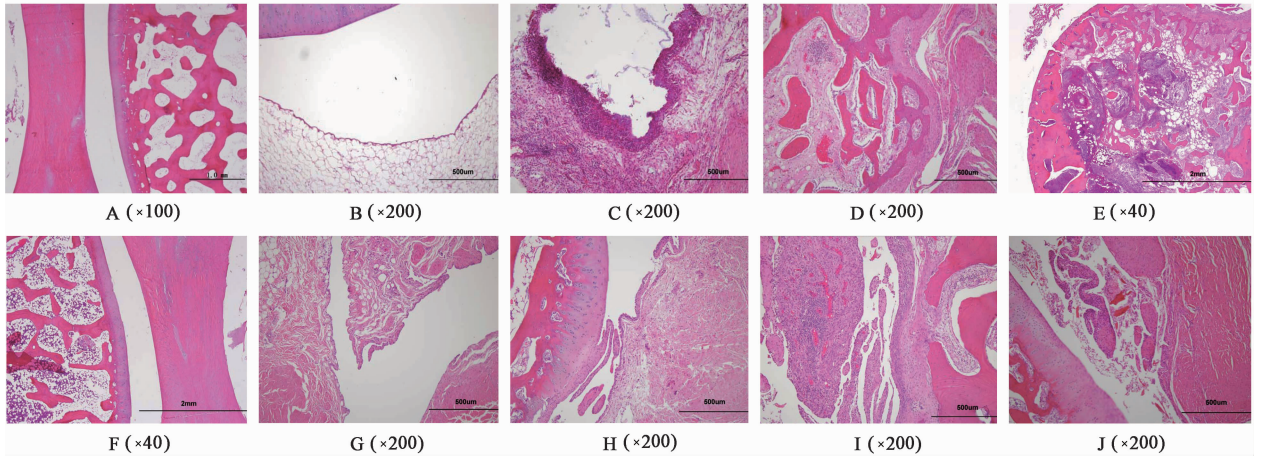
尪痹片高剂量组主要病变为兔膝关节周围软组织内局灶性炎细胞浸润,胶原纤维少量增生,滑膜增生,层数增多,软骨面局灶性凹凸不平,未见到模型组中膝关节大面积纤维化或关节融合现象。尪痹片中剂量组主要病变为兔膝关节软骨面胶原纤维增生,软骨面不光滑,关节周围软组织内炎性细胞浸润,水肿,胶原纤维增生,滑膜细胞增生,滑膜结构依然存在。尪痹片低剂量组主要病变为膝关节周围软组织内炎性细胞浸润,水肿,胶原纤维增生,滑膜细胞增生,个别成绒毛状增生,局灶性或大面积炎性细胞浸润。见图 1。

按照病变程度的分级标准,以非参数检验进行两独立样本的比较,与模型组比较,盐酸氨基葡萄糖和尪痹片高、中、低剂量组在缓解兔膝关节囊胶原纤维增生、滑膜细胞增生,减轻炎性浸润方面表现出较明显的改善作用,且差异显著。在改善软骨病变方面的作用,尪痹片中剂量组作用较显著,尪痹片高、低剂量组也呈现了不同程度的改善作用,但未见显著性差异。见表 5。

### 3.2 对前交叉韧带模型大鼠膝关节的影响

**3.2.1 活动状态** 结果显示假手术组大鼠自主活动和行走正常,模型组大鼠均可正常行走、活动,但自主活动量明显较少,个别大鼠可见行手术部位的右后肢在行走时稍有跛脚。与模型组比较,尪痹片高、中、低剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠的活动状态明显好转。

**3.2.2 膝关节外观形态** 剖开局部皮肤暴露关节后肉眼观察可见,假手术组大鼠膝关节未见有肿胀,切开后的软骨光滑,色泽光亮,边缘规整,无充血,与周围组织未粘连,软骨无缺损,结构正常。与假手术组大鼠膝关节比较,模型组大鼠右膝关节均有不同程度肿胀,切开后的部分膝关节与周围组织及韧带粘连,有少部分膝关节间可以触及到骨刺,关节软骨表面灰暗,骨关节内侧明显增生、增厚。与模型组大鼠比较,尪痹片高、中、低剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠膝关节及软骨肿胀、粘连等病变均有不同程度的改善。



A, B. 假手术组; C, D, E. 模型组; F, G. 盐酸氨基葡萄糖组; H. 尪痹片高剂量组; I. 尪痹片中剂量组; J. 尪痹片低剂量组  
图 1 各组家兔骨关节组织的形态(HE)

Fig.1 Histopathological changes of knee-joint in rabbits from experimental groups(HE)

表 5 尪痹片对木瓜蛋白酶模型兔膝关节组织形态的影响

Table 5 Effect of Wangbipian on histology of knee-joint in papain model rabbits

只

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	动物数量 (关节周围软组织)					动物数量 (滑膜)					动物数量 (软骨)				
			0分	1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分
假手术	-	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
模型	-	10	0	0	0	2	8	0	0	0	2	8	0	0	0	0	10
盐酸氨基葡萄糖	0.26	7	0	1	2	2	2	0	2	1	2	2	0	2	0	2	3
尪痹片	10.0	9	0	0	2	7	0	0	0	2	7	0	0	0	1	2	6
	5.0	9	0	0	3	6	0	0	0	1	8	0	0	1	1	3	4
	2.5	8	0	0	1	7	0	0	0	1	7	0	0	1	0	1	6

**3.2.3 膝关节组织病理形态** 假手术组表现为大鼠膝关节表面的薄层透明软骨表面光滑,未见破坏,关节囊的滑膜未见增生,间质未见炎症细胞浸润,无渗出液,组织结构正常。模型组表现为大鼠膝关节关节囊胶原纤维明显增生,滑膜细胞明显增生,关节软骨面胶原纤维增生,软骨面胶原纤维增生,软骨面不光滑,个别动物关节囊内可见脱落的软骨,关节囊内轻度炎性细胞浸润;该模型大鼠膝关节的主要病变体现在软骨和滑膜纤维增生<sup>[5-8]</sup>。按照病变程度的分级标准进行统计,以非参数检验进行两独立样本的比较。与假手术组比较,模型组大鼠右膝关节病变显著,提示造模成功。盐酸氨基葡萄糖组表现为大鼠膝关节关节囊胶原纤维片状增生,滑膜细胞轻度增生。软骨面胶原纤维轻度增生,软骨面不光滑。尪痹片高、中、低剂量组表现为大鼠膝关节关节囊胶原纤维不同程度片状增生,滑膜细胞轻度增生;软骨面胶原纤维轻度增生,软骨面不光滑。按照病变程度的分级标准,与模型组比较,尪痹片高、中、低

剂量组和盐酸氨基葡萄糖组大鼠膝关节软骨和滑膜病变均呈不同程度的明显减轻。见表 6 和图 2。

表 6 尪痹片对前交叉韧带切除模型大鼠膝关节组织形态的影响

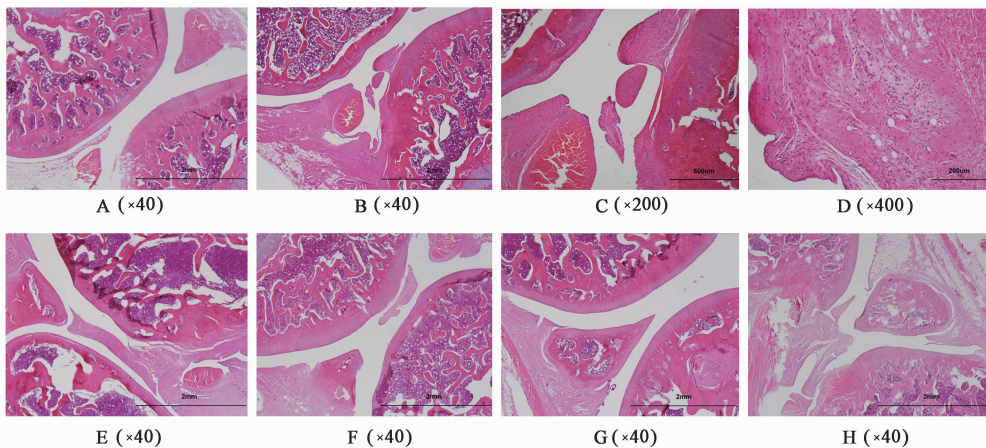
Table 6 Effect of Wangbipian on histology of knee-joint in rats with anterior cruciate ligament removal model

只

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	动物数量 (滑膜)					动物数量 (软骨)				
			0分	1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	
假手术	-	14	14	0	0	0	0	14	0	0	0	
模型	-	14	0	0	4	8	2	0	0	9	5	
盐酸氨基葡萄糖	0.36	14	0	5	9	0	0	0	6	6	2	
尪痹片	14.0	14	0	4	8	2	0	0	5	6	3	
	7.0	12	0	5	7	0	0	0	4	6	2	
	3.5	14	0	3	10	1	0	0	4	8	2	

## 4 讨论

**4.1 模型、周期、给药剂量及阳性药的选择依据** 骨关节炎是一种以关节软骨退变、骨质增生及骨赘



A. 假手术组; B, C, D. 模型组; E. 盐酸氨基葡萄糖组; F. 尪痹片高剂量组; G. 尪痹片中剂量组; H. 尪痹片低剂量组

图 2 各组大鼠骨关节组织的形态(HE)

Fig. 2 Histopathological changes of knee-joint in rats from experimental groups(HE)

形成等为主要特征的慢性关节病,临床以关节肿痛、骨质增生及活动受限为主要特征<sup>[9]</sup>。手术诱导骨关节炎模型以前交叉韧带切除模型较为流行<sup>[10]</sup>。造模 60 d 可见软骨糜烂缺损、表面纤维化、细胞减少,说明已进入软骨细胞的退行性变阶段,类似于骨关节炎的早、中期<sup>[3-4]</sup>。本实验选择该造模方法,并于造模 60 d 后给药。

关节腔内注射药物诱发骨关节炎模型以关节腔内注射木瓜蛋白酶模型应用较多。其特点是发病速度快、重复性好、可模拟人类骨关节炎软骨破坏的终末环节,较适用于研究软骨病理及评价药物的治疗作用<sup>[11]</sup>。木瓜蛋白酶诱发骨关节炎模型的病变程度不仅与造模周期密切相关,还与造模药物的纯度、浓度和剂量密切相关<sup>[12]</sup>。经预试验及病理取材检查,在本文研究条件下选择 5% 木瓜蛋白酶按剂量 0.4 mL/只造模,间隔 4 d 注射 1 次,连续造模 2 次,在造模 40 d 后模型家兔膝关节的组织形态与骨关节炎中、重度患者相似。

预实验以病理检查为指标,尪痹片提取物大鼠有效剂量为 14.0, 7.0, 3.5 g·kg<sup>-1</sup>,相当于临床剂量的 20, 10, 5 倍,家兔剂量为大鼠的等效剂量。以观察到模型组动物行走状态改善或膝关节周长明显减小判断为适宜的给药周期。

**4.2 模型的膝关节组织病理学特征** 骨关节炎是以关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性退行性病变,因此膝关节组织病理诊断是其有效性评价的主要指标。骨性关节炎病理形态学进程主要表现为软骨基质失去均质性,软骨细胞肿胀、崩解,软骨细胞排列紊乱,进而软骨糜烂剥脱,软骨表面骨质致密,而深部骨质萎缩疏松,软骨边缘部的软骨膜

因运动时受刺激过度增生形成软骨性骨赘,进一步骨化形成骨性骨赘,骨赘可部分脱落到关节腔内形成游离体。早期病变主要在软骨,滑膜基本正常,无明显炎症病变,随着病程加重滑膜呈现不同程度增生。

目前,尽管骨关节炎模型的造模方法或造模周期不尽相同,但其关节软骨形态病理形态学的报道多集中在膝关节软骨的病变程度<sup>[13-15]</sup>,并以软骨组织结构变化及软骨细胞的增生程度来判定骨关节炎的分期及受试物干预后的有效性。在组织形态学检查方面多采用光镜观察,使用较多的为 HE 染色,也有针对胶原纤维采用甲苯胺蓝染色<sup>[16]</sup>和针对软骨采用番红花红 O-固绿染色<sup>[17]</sup>。还有文献采用电镜对木瓜蛋白酶造模致大鼠膝关节软骨的组织形态进行了超微结构的观察,补充了软骨病变发展过程线粒体细胞渐进性变化的描述<sup>[18]</sup>。由于不管是对软骨的增生程度还是纤维化程度,HE 染色下的光镜观察都可以较清晰地进行判断,因此,是否进行特染和电镜观察并不影响结果的判断。

研究发现在组织形态学描述方面主要存在以下两方面的问题:①对骨关节炎模型动物关节滑膜细胞损伤的病理形态报道很少;鉴于骨关节炎滑膜炎反应是关节软骨破损崩溃的继发反应,在骨关节炎的疾病发展过程中,滑膜炎扮演着重要角色,而该指标在临床不宜采用影像学仪器进行观察,因此有必要通过动物实验观察膝关节骨关节炎模型的滑膜组织病理变化,与临床有效性评价形成互补。②鲜有文献对病理形态学的主要特点进行详细描述、建立半定量的分级标准并进行统计。这样的结果难以作为受试物的有效性和模型成立的可靠性提供支撑。

本实验对2种不同造模方法的骨关节炎模型动物的膝关节组织病理进行了检查,并针对骨关节炎模型膝关节病理形态学的三大主要特点(周围组织炎性浸润、滑膜炎性及增生、软骨纤维化及变性程度),制定了详尽的评分标准,以此作为评价尪痹片治疗骨关节炎有效性的主要依据。同时,也对以往研究文献在组织形态学方面描述的不完善之处给予了补充。在本研究条件下,前交叉韧带切除诱导大鼠骨关节炎模型的主要病理学特点体现在滑膜和软骨的纤维化,炎性浸润不明显,主要表现为关节囊胶原纤维增生,滑膜细胞增生,软骨表面胶原纤维增生,软骨面不光滑,伴有轻度炎性细胞浸润。木瓜蛋白酶诱导家兔骨关节炎模型的主要病理学特点体现在滑膜和软骨的纤维化、软骨损伤变性、周围组织炎性浸润明显,主要表现为关节周围软组织大量炎性细胞浸润,以中性粒细胞为主,还有大量浆细胞和淋巴细胞浸润,大量胶原纤维增生,关节囊纤维化,滑膜细胞消失,大量胶原纤维增生,软骨面凹凸不平,胶原纤维增生,发展为软骨纤维化,关节发生融合,软骨细胞变性、坏死,脱落至关节囊内。前交叉韧带切除模型的病理形态学特点相当于骨关节炎模型的早、中期,木瓜蛋白酶模型的病理形态学特点相当于骨关节炎模型的中、晚期<sup>[19-20]</sup>。结果显示尪痹片对关节滑膜、软骨纤维化和周围组织的炎性浸润均具有治疗作用,但对软骨的后期损伤作用不显著。提示尪痹片对骨关节炎早、中期所致关节滑膜和软骨纤维化等损伤的治疗作用较好,对骨关节炎中、晚期所致关节软骨糜烂缺损等退行性损伤的治疗作用较弱。

#### [参考文献]

[1] 康信忠,吴启富,接红宇,等. 尪痹片治疗膝关节炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(9):1205-1208.

[2] 刘冬梅,杨丽丽,薛红霞. 尪痹片治疗膝骨关节炎的疗效[J]. 实用药物与临床,2012,15(6):380-381.

[3] 王婧,张忠辉,孙梦娇,等. 大鼠骨关节炎三种动物模型的建立及比较[J]. 中国细胞生物学报,2010,32(3):456-460.

[4] 刘建湘,杜靖远,杨述华. 大鼠实验性骨关节炎模型的建立及病理特征[J]. 华中科技大学学报:医学版,2009,38(1):98-102.

[5] 刘彤华. 诊断病理学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2013:953-958.

[6] Greaves P. *Histopathology of Preclinical Toxicology Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*[M]. 4<sup>th</sup> editon. Manhattan: Academic Press,

2012:173-180.

[7] Sahota P S. *Toxicology Pathology: Nonclinical Safety Assessment*[M]. Boca Raton: CRC Press,2013:562-574.

[8] Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig C G, et al. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicology Pathology*[M]. 3<sup>rd</sup> editon. Manhattan: Academic Press, 2013:2805-2817.

[9] Yorimitsu M, Nishida K, Shimizu A, et al. Intra articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability induced osteoarthritis in rat knee joints [J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2008,16(7):764-771.

[10] 李文雄,孙赫,沈玮,等. SD大鼠骨关节炎造模方法的筛选及优化探究[J]. 畜牧与兽医,2014,46(10):70-73.

[11] 孙鲁宁,黄桂成,赵燕华,等. 木瓜蛋白酶诱导兔膝关节骨关节炎模型滑膜中白细胞介素1、白细胞介素6、白三烯浓度变化与药物注射时间的关系[J]. 中国组织工程研究,2012,16(33):6184-6188.

[12] 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的比较研究[J]. 中国骨伤,2012,25(5):424-429.

[13] 姜铃霞,姚伟武,赵海南,等. 实验性软骨损伤的生物学表达与病理分期对照研究[J]. 诊断学理论与实践,2013,12(1):80-85.

[14] 陈德生,张志刚,曹靖,等. 盐酸氨基葡萄糖对兔膝骨性关节炎的影响[J]. 中国修复重建外科杂志,2010,24(3):287-291.

[15] 邓宇,伍筱梅,任医民,等. 关节腔内注射不同蛋白酶建立兔膝关节骨关节炎模型的对比研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2009,3(3):38-41.

[16] 葛广勇,赵建宁,刘刚. 膝骨性关节炎模型的分期特征[J]. 中国组织工程研究,2006,10(4):47-49.

[17] 刘建湘,杜靖远,杨述华. 大鼠实验性骨关节炎模型的建立及病理特征[J]. 华中科技大学学报:医学版,2009,38(1):98-102.

[18] 段文秀,汪宗保,张浩,等. 木瓜蛋白酶诱导早期膝骨关节炎模型大鼠软骨超微结构的动态变化[J]. 中国组织工程研究,2015,19(18):2789-2793.

[19] 王景红,夏坤,张志千,等. 骨关节炎相关细胞因子及生物标志物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):225-230.

[20] 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,2010,14(7):1218-1222.

[责任编辑 刘德文]