

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.015 [http://www.crter.org]

刘振峰, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 洪汉刚, 邓迎杰, 孟庆才. 肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 270-274.

肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立*

刘振峰, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 洪汉刚, 邓迎杰, 孟庆才

新疆维吾尔自治区中医医院关节外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

文章亮点:

成功建立了肾虚血瘀型骨性关节炎大鼠模型, 验证了肾虚血瘀可以加重膝骨性关节炎关节内的组织退变。

关键词:

组织构建; 组织构建实验造模; 肾虚; 血瘀; 骨关节炎; 模型; 大鼠; 省级基金; 组织构建图片文章

摘要

背景: 建立骨性关节炎的中医证候模型, 有利于对其进行辨证施治研究。

目的: 采用病、证结合的方法建立肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型。

方法: 选择 2 月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 随机分为正常组、膝骨关节炎组和复合模型组, 每组 10 只。采用经典的 Hulth 造模法建立膝骨关节炎模型, 去卵巢法建立肾虚模型, 肾上腺皮质激素和肾上腺素法建立血瘀模型。复合模型由上述 3 种模型复合而成, 先建立肾虚模型, 8 周后同时进行血瘀模型与骨关节炎模型造模。

结果与结论: 复合模型组大鼠在肾虚模型建立后第 3 周时出现精神萎靡、活动不灵活、便溏等表现, 在血瘀模型建立后第 6 周时大鼠出现皮毛无光泽、喜背光、舌质瘀紫、尾色及爪甲瘀青, 体质量下降; 低切还原黏度增高, 血小板聚集性增强等血流缓慢、循环障碍特点; 组织学染色观察发现膝骨关节炎组关节软骨结构有一定破坏但轻于复合模型组。可见实验成功建立了大鼠肾虚血瘀型大鼠膝骨关节炎模型, 而肾虚血瘀加重了膝骨关节软骨的退变。

Establishment of a rat model of knee osteoarthritis with kidney deficiency and blood stagnation

Liu Zhen-feng, Fang Rui, Ailijiang·Asila, Hong Han-gang, Deng Ying-jie, Meng Qing-cai

Department of Joint Surgery, Xinjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: To establish a model of osteoarthritis with traditional Chinese medicine syndromes is conducive to the syndrome differentiation studies.

OBJECTIVE: To establish a rat model of knee osteoarthritis with kidney deficiency and blood stagnation.

METHODS: A total of 30 female Sprague-Dawley rats aged 2 months, SPF grade, were randomly divided into normal group, knee osteoarthritis group and knee osteoarthritis with kidney deficiency and bloods stagnation group (combined group), 10 rats in each group. Knee osteoarthritis models were established using Hulth method, kidney deficiency models were established using ovariectomized method, and blood stagnation models were established by injection of adrenal corticosteroids and epinephrine. Combined models were prepared based on the above-mentioned three models. Kidney deficiency models were prepared first followed by establishment of knee osteoarthritis and bloods stagnation models.

RESULTS AND CONCLUSION: Rats in the combined group presented listlessness, non-flexible activities

刘振峰, 男, 1982 年生, 新疆维吾尔自治区五家渠市人, 汉族, 2010 年上海中医药大学毕业, 主治医师, 主要从事骨与关节损伤的研究。
LLZF8689@163.com

并列第一作者: 方锐, 男, 1974 年生, 新疆维吾尔自治区塔城市人, 锡伯族, 2007 年上海中医药大学毕业, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事骨与关节损伤研究。
xifangrui@163.com

通讯作者: 孟庆才, 博士, 教授, 博士生导师, 主任医师, 副院长, 新疆维吾尔自治区中医医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000
mengqingcai@medmail.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)02-00270-05

收稿日期: 2012-05-02
修回日期: 2012-05-20
(20110620004/M·W)

Liu Zhen-feng, Attending physician, Department of Joint Surgery, Xinjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
LLZF8689@163.com

Fang Rui, Doctor, Associate chief physician, Associate professor, Department of Joint Surgery, Xinjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
xjfangrui@163.com

Liu Zhen-feng and Fang Rui contributed equally to this work.

Corresponding author: Meng Qing-cai, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Chief physician, Department of Joint Surgery, Xinjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
mengqingcai@medmail.com.cn

Supported by: the Scientific Tackle Key Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 200933126*

Received: 2012-05-02
Accepted: 2012-05-20

and loose stools at 3 weeks after establishment of kidney deficiency models, and coat lackluster, ptosis, obvious weight loss and blue tail at 6 weeks after establishment of bloods stagnation models. Rats in the combined group also showed that the reducing viscosity was significantly up-regulated and the platelet aggregation reinforced, with blood flow slow-moving, circulatory disorder and so on. Meanwhile, the articular cartilage of the knee osteoarthritis group showed cataplasia, but it was slighter compared with the combined group. The rat model of knee osteoarthritis with kidney deficiency and blood stagnation is established successfully, and kidney deficiency and blood stagnation can aggravate articular cartilage degeneration.

Key Words: tissue construction; experimental modeling of tissue construction; kidney deficiency; blood stagnation; knee osteoarthritis; models; rats; provincial grants-supported paper; tissue construction photographs-containing paper

Liu ZF, Fang R, Ailijiang•Asila, Hong HG, Deng YJ, Meng QC. Establishment of a rat model of knee osteoarthritis with kidney deficiency and blood stagnation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(2): 270-274.

0 引言

肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立对中医进行“膝痹”研究具有重要的研究意义及价值,模型的成功建立不仅有利于临床与基础研究相结合、辨病与辨证结合,而且能更加明确的阐述骨关节炎的病理、作用机制等。本实验选择疾病动物模型与证候模型结合的方法,采用经典的Hulth造模法结合肾上腺皮质激素、肾上腺素法以及去卵巢法建立肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型,并进一步对病、证之间的内在规律及特点进行深入研究。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010年12月至2011年2月在新疆医科大学实验室完成。

材料:

主要实验仪器:

Main experimental instruments:

仪器	来源
LBY2N6C 型全自动自清洗血流变仪	北京普利生仪器有限公司
LG-R-8 锥板自动血液流变仪、LG-B19 红细胞变形聚集测试仪	北京世帝科学仪器公司
低温高速离心机	美国 Sigma 公司
DU800/VIS 型紫外/可见分光光度计	美国 Beckman 公司
Rotor Gene 3000 型四通道荧光实时定量聚合酶链式反应仪	澳大利亚 Cobett 公司
Mastercycler Personal 型基因扩增仪	德国 Eppendorf 公司
SN2682 型 C 放免计数器	中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂
FACSCalibur 型流式细胞仪	美国 Becton Dickinson 公司

主要药物与试剂:

Main drugs and reagents:

药物与试剂	来源
氢化可的松琥珀酸钠注射液	天津市生物化学制药厂, 国药准字 H12020493, 规格 50 mg/支
盐酸肾上腺素注射液	上海禾丰制药有限公司, 国药准字 H31021062, 规格 1 mg/mL
雌二醇放射免疫分析药盒、雌二醇化学发光试剂盒、TXB 血栓素放射免疫试剂盒、酮前列素放射免疫试剂盒	北京北方生物技术研究所
I2 环磷酸腺苷、I2 环磷酸鸟苷放射免疫分析试剂盒	上海中医药大学核医学实验室

实验动物: 2月龄SPF级SD雌性大鼠30只, 体质量为(200±20) g, 由新疆医科大学实验中心提供。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

实验方法:

分组: 将30只大鼠按随机区组设计, 分为正常组、膝骨关节炎组和肾虚血瘀膝骨关节炎模型组(简称复合模型组), 每组10只。

动物模型建立方法: ①肾虚模型采用去卵巢法^[1]。氯胺酮(0.1 g/kg)腹腔注射麻醉, 无菌操作下经腰背侧正中入路进入, 分开腰部筋膜, 分离暴露卵巢, 结扎输卵管和周围血管后, 摘除双侧卵巢, 观察3个月。②血瘀模型采用肾上腺皮质激素加肾上腺素法^[2]。氢化可的松10 mg/kg肌肉注射, 1次/d, 用药13 d后肾上腺素0.36 mg/kg皮下注射1次。③骨关节炎模型采用经典的Hulth^[3]模型, 此为经典手术造模方式, 具体步骤为: 将动物麻醉后仰卧于手术台上, 无菌条件下取双膝关节内侧纵切口长约2 cm, 显露膝关节, 然后切断前后交叉韧带及内侧副韧带, 完整切除内侧半月板, 保留关节软骨面。术后不固定伤肢, 自由活动。可适当给予抗生素预防感染, 术后7 d驱赶动物, 30 min/d, 分2次驱赶, 4周后即得明显的骨关节炎模型。

复合模型由上述3种模型复合而成, 在肾虚血瘀的基础上复合骨关节炎模型。先建立肾虚模型, 8周后同时进行血瘀模型与骨关节炎模型造模, 12周后进行取材验证。

主要观察指标:

动物行为和体征观察: 早晨喂食前观察实验大鼠的精神状态、活动、皮毛、尾色、大便、觅食等情况, 3 d记录1次。量化分级方法参照程志清等^[4]所拟定标准。

动物体质量变化: 分别在造肾虚动物模型之前以及造模3周后分别称取大鼠体质量; 随后在造血瘀模型之前和造模后1周分别称取大鼠体质量, 每次称取时间均在上午9时(喂食前)。

血液流变学指标检测: 上午9时(喂食前), 大鼠采用盐酸氯胺酮注射液麻醉后, 经腹主动脉采血5 mL, 肝素抗凝, 摇匀, 全自动自清洗血流变仪检测血液流变学变化, 包括全血低切黏度、血浆黏度、低切还原黏度和聚集指数。

大鼠膝关节病理学观察: 在大鼠取血成功后由同组实验人员进行大鼠膝关节取材, 然后多聚甲醛固定24 h, 乙二胺四乙酸脱钙, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡机包埋, 正中矢状面连续6 μm切片, 行番红O/固绿(Safranin-O/Fast Green)染色。方法如下: 常规脱蜡至

水, 苏木精染液2 min, 清水冲洗, 盐酸乙醇分化, 氨水返蓝。固绿染液5 min, 冰醋酸及清水先后快速漂洗, 藏红染液5 min, 常规脱水透明, 中性树胶封固, Olympus BH-20光学显微镜下观察形态学变化(放大倍数为100)。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 参加实验30只SD大鼠均进入结果分析, 中途无脱落。

2.2 大鼠行为及体征观察 正常组大鼠反应灵敏、喜动、动作灵活、皮毛光泽。膝骨关节炎模型组大鼠造模后1周内少动, 精神较正常组稍差, 其余和正常组没有差别; 复合模型组大鼠在造模去卵巢后, 形体逐渐肥胖, 少动, 同时大鼠出现明显精神萎靡、倦怠、少动、喜卧、皮毛蓬乱无光泽, 随着时间的延长上述症状逐渐加重; 在建立血瘀模型3周左右, 大鼠出现不同程度的舌质瘀紫, 舌下脉络增粗增长, 尾色瘀青。

2.3 大鼠体质量变化 见表1。

组别	建立肾虚模型后3周	建立血瘀模型后1周
正常组	328.0±16.3	345.0±17.3
膝骨关节炎组	320.0±16.9	350.0±17.1
复合模型组	351.0±28.9 ^b	386.0±30.3 ^a

复合模型组与其他两组比较, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01

复合模型组大鼠在去除卵巢3周后, 与正常组、膝骨关节炎组比较, 大鼠体质量明显增高, 差异有显著性意义(*P* < 0.01)。开始造血瘀模型后, 复合模型组体质量逐渐减轻, 进行血瘀造模1周后复合模型组与正常组和膝骨关节炎组比较, 体质量仍较高(*P* < 0.05), 此后复合模型组体质量继续下降, 在血瘀造模后第15天时复合模型组体质量与正常组和膝骨关节炎组比较差异无显著性意义。

从整个造模过程来看, 正常组和膝骨关节炎组体质量呈缓慢增高趋势, 而复合模型组则呈下降趋势,

2.4 大鼠血液流变学变化 检测结果显示, 与正常组相比, 膝骨关节炎组血液流变学指标变化不明显。与正常组、膝骨关节炎组相比, 复合模型组低切还原黏度增高较为明显($P < 0.05$), 见表2。

表2 各组大鼠低切还原血黏度变化

Table 2 Low shear reduced blood viscosity changes in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	低切还原血黏度 (mPa·s)
正常组	22.56±3.35
膝骨关节炎组	23.22±2.65
复合模型组	28.29±3.32 ^a

复合模型组与其他两组比较, ^a $P < 0.05$

2.5 大鼠红细胞压积、聚集指数和变形指数比较 复合模型组红细胞压积、聚集指数较正常组及膝骨关节炎组升高, 变形指数较其他两组降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表3。

表3 各组大鼠红细胞压积、聚集指数等变化

Table 3 Hematocrit and aggregation index changes in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	红细胞压积(%)	聚集指数	变形指数
正常组	42.56±3.03	1.34±0.16	0.49±0.06
膝骨关节炎组	43.56±3.55	2.44±0.55	0.42±0.06
复合模型组	46.56±2.06 ^a	3.52±0.28 ^a	0.39±0.06 ^a

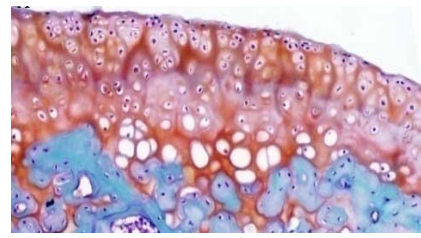
复合模型组与其他两组比较, ^a $P < 0.05$

2.6 大鼠膝关节形态学变化

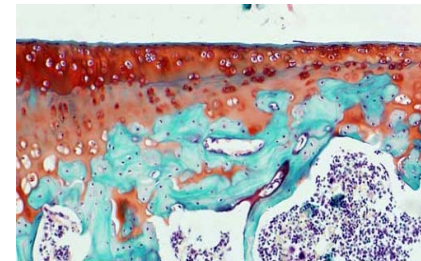
正常组: 大鼠关节软骨表层光滑、平整, 软骨细胞分布均匀, 排列整齐, 各层次清晰, 无明显细胞簇集现象, 潮线完整, 局部染色均匀, 见图1a。

膝骨关节炎组: 大鼠胫骨关节面软骨细胞排列紊乱, Safranin-O染色不均, 局部出现失染现象。关节各层出现簇集软骨细胞, 深层出现肥大软骨细胞, 见图1b。

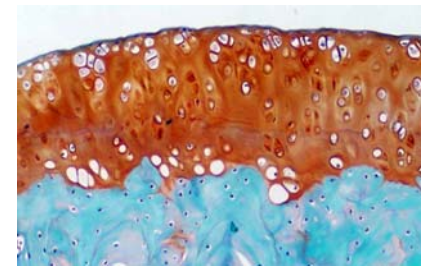
复合模型组: 大鼠软骨层变薄, 细胞数量明显减少, 结构破坏较其他两组严重, 见图1c。



a: 正常组



b: 膝骨关节炎组



c: 复合模型组

图1 各组大鼠膝关节在造模第12周时形态学改变(番红O/固绿染色, ×100)

Figure 1 Morphological changes of the rat knee in each group at 12 wk of modeling (Safranin O/Fast Green staining, ×100)

3 讨论

骨关节炎是世界上最常见的一类关节疾病, 严重影响人们的工作和生活质量。骨关节炎是在力学因素和生物因素的共同作用下软骨细胞、软骨外基质、软骨下骨三者间分解和合成代谢失衡的结果。中医药治疗骨关节炎有独特的优势, 但是, 关于骨性关节炎的中医证候模型的研究并不多, 从而影响了对于骨关节炎辨证施治的系统深入研究, 因此建立病证结合大鼠模型有着非常重要的意义^[5]。临床上肾虚血瘀型骨性关节炎比较常见, 故本研究同时采用多模型复合的方法建立肾虚血瘀型膝骨性关节炎病证结合模型。

骨关节炎患者易出现血瘀的表现, 故实验用肾上腺

皮质激素和肾上腺素法建立大鼠血瘀模型。骨关节炎患者中以中老年人罹患者居多,女性患者45岁以后,卵巢功能低下所致的雌激素水平下降是肾虚的主要特征之一^[6],故利用切除卵巢的方法作为肾虚模型。骨性关节炎的根本病理改变是关节软骨、软骨细胞、软骨外基质、软骨下骨的分解和合成代谢失衡的结果,实验采用经典的Hulth方法,同时参考了谢希、胡阿威等^[7-8]骨性关节炎的造模方法进行大鼠膝骨性关节炎模型的建立。综上所述本研究病证结合模型的建立符合中医多因素致病理论。

判定血瘀证动物模型是否建立成功应包括血瘀证的相关脉证的重现,如舌质青紫、瘀斑、出血等,同时还应具备血瘀证所共有的病理生理学指标的改变,血瘀证本质的微循环障碍及血液流变性异常已从大量临床与动物实验得到证明^[9-10]。本研究中复合模型组动物出现舌质瘀紫,尾色瘀青,血黏度增高,符合血瘀证的病理改变。组织切片染色结果显示,膝骨关节炎组大鼠胫骨关节面软骨细胞排序紊乱,Safranin-O染色不均,局部出现失染现象。关节各层出现簇集软骨细胞,深层出现肥大软骨细胞;复合模型组大鼠软骨层变薄,细胞数量明显减少,结构破坏较其他两组严重,符合骨性关节炎的表现。

综上所述,实验成功建立了肾虚血瘀型骨性关节炎大鼠模型。作者还发现肾虚血瘀可以加重膝骨性关节炎关节内组织的退变,进而验证了中医病因病机的理论,所以该模型不仅为骨性关节炎的中医证候研究及辨证施治研究提供了理论依据和参考,更为今后在新疆开展肾虚血瘀型膝骨性关节炎的深入研究提供了方便、可靠的工具及途径。

基金资助: 新疆维吾尔自治区科技攻关项目(200933126)。

作者贡献: 实验设计为孟庆才,实验实施为刘振峰,实验评估为邓迎杰,资料收集为艾力江·阿斯拉。刘振峰成文,方锐审校,刘振峰对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Shi XQ.Beijing:People's Military Medical Press.2000:380-381. 施新猷. 卵巢摘除术//施新猷主编. 现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社,2000:380-381.
- [2] Chen Q.Beijing:People's Medical Publishing House. 1994: 1004, 1007, 1011, 1018. 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版,1994: 1004, 1007, 1011, 1018.
- [3] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report.Acta Orthop Scand. 1970;41(5): 522-530.
- [4] Cheng ZQ,Wu YF,Tang YX,et al.Shiyan Dongwu Kexue yu Guanli. 2003;20(3):126. 程志清,吴玉芙,唐烨霞,等. SD 大鼠心气虚证动物模型的建立与评价[J]. 实验动物科学与管理, 2003,20(3):126.
- [5] He X,Wei CS,Cai ZG,et al.Shandong Zhongyi Zazhi. 2005; 24(2):73-75. 贺宪,魏春山,蔡智刚,等. 膝骨性关节炎的病机和防治机制探讨 [J].山东中医杂志,2005,24(2):73-75.
- [6] Ai JL,Lv AP,Xu SJ,et al.Zhongguo Zhiyi Jichu Yixue Zazhi. 1995;1(1):42-44. 艾景录,吕爱平,徐世杰,等.性腺功能异常型肾虚痹证发生机理的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1995,1(1):42-44.
- [7] Xie X,Gao JS.Yixue Zongshu. 2005;11(1): 67-69. 谢希,高洁生.骨关节炎动物模型研究进展[J].医学综述,2005, 11(1): 67-69.
- [8] Hu AW,Zhang L,Zhang GL,et al.Linchuang Luntan. 2003;3(9): 5-6. 胡阿威,张磊,张功礼,等. 改良Hulth法骨关节炎动物模型的建立 [J].临床论坛,2003,3(9):5-6.
- [9] Liu JL,Song JN.Liaoning Zhongyi Zazhi. 2006;33(9):1091- 1093. 刘军莲, 宋剑南. 中医血瘀证本质研究概况[J]. 辽宁中医杂志, 2006,33(9): 1091-1093.
- [10] Fang ZQ.Shanghai:Science Press.2006. 方肇勤. 辨证论治实验方法学—实验小鼠诊法和辨证[M].上海: 科学出版社,2006.