

木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的电镜扫描

汪宗保^{1,2,3}, 徐亚林¹, 廖威明², 陆晴友⁴, 陈朝晖³, 吴向阳³, 孙旭³, 段文秀³, 鲍永军³, 代月兰³ (¹中山大学博士后流动站开平市中心医院科研基地, 广东省开平市 529300; ²中山大学附属第一医院骨科, 广东省广州市 510080; ³安徽中医药大学针灸骨伤临床学院, 安徽省合肥市 230038; ⁴同济大学附属东方医院创伤外科, 上海市 200120)

文章亮点:

1 实验创新性的利用环境扫描电镜观察了木瓜蛋白酶诱导大鼠膝关节早期骨关节炎不同时间节点的表面形态学变化。

2 大鼠麻醉后直接取材后即置于环境扫描电镜下观察软骨表面, 避免了以往多种药物处理固定后较长时间等待再观察对软骨表面形态的影响。结果显示扫描电镜比大体观察更能早期发现骨关节炎的变化。

关键词:

组织构建; 软骨组织工程; 骨关节炎; 关节软骨; 木瓜蛋白酶; 半胱氨酸; 电镜; 软骨表面

主题词:

骨关节炎; 木瓜蛋白酶; 半胱氨酸; 软骨, 关节

基金资助:

中国博士后科学基金(2011M501355)

摘要

背景: 木瓜蛋白酶注射建立骨性关节炎动物模型是用于骨关节炎防治研究的常用方法之一。

目的: 观察木瓜蛋白酶和 L-半胱氨酸混合注射诱导大鼠膝早期骨关节炎进程中扫描电镜下软骨表面形态学变化。

方法: 2%木瓜蛋白酶和 0.03 mol/L 左旋半胱氨酸按 2:1 比例混匀, 取 0.15 mL 注射至 SD 大鼠右膝关节腔诱导骨关节炎模型, 左膝注射等量生理盐水为对照组, 另取 2 只 4 周龄不做处理为正常对照组, 于注射后第 2, 4, 6 周后分别使用扫描电镜观察股骨内侧髌关节软骨表面形态学变化。

结果与结论: 正常和对照组可见表面分布较均匀的浅坑。木瓜蛋白酶和 L-半胱氨酸混合注射 2 周后大鼠软骨表面出现凹凸不平, 皱缩扭曲变形; 4 周表面变薄, 局部出现小裂纹; 6 周出现深大裂纹, 软骨缺损。提示 2%木瓜蛋白酶和 0.03 mol/L 左旋半胱氨酸混合注射诱导的早期骨关节炎模型的时间节点可以定在 4-6 周。

汪宗保, 徐亚林, 廖威明, 陆晴友, 陈朝晖, 吴向阳, 孙旭, 段文秀, 鲍永军, 代月兰. 木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的电镜扫描[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(2):177-182.

Cartilage surface of early osteoarthritis in rats induced by papain under scanning electron microscope

Wang Zong-bao^{1,2,3}, Xu Ya-lin¹, Liao Wei-ming², Lu Qing-you⁴, Chen Zhao-hui³, Wu Xiang-yang³, Sun Xu³, Duan Wen-xiu³, Bao Yong-jun³, Dai Yue-lan³ (¹Science Research Base of Kaiping City Central Hospital, Postdoctoral Mobile Station of Sun Yat-sen University, Kaiping 529300, Guangdong Province, China; ²Department of Orthopedics, the First Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; ³Clinical School of Acupuncture and Orthopaedics, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui Province, China; ⁴Department of Traumatic Surgery, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

Abstract

BACKGROUND: Osteoarthritis animal models induced by papain are commonly used for studying osteoarthritis.

OBJECTIVE: To observe the morphology of articular cartilage surface during early osteoarthritis process in rats induced by papain and L-cysteine under scanning electron microscope.

METHODS: The right knees of Sprague-Dawley rats were given 0.15 mL mixed solution of 2% papain and 0.03 mol/L L-cysteine in the ratio of 2:1. The left knees were given injections of 0.15 mL 0.9% NaCl, as the control group. Another two rats (four knees) maintained untreated, as the normal control group. All the rats were observed with scanning electron microscope at 2, 4, 6 weeks after injection, to explore the surface morphology of medial condyle of femur.

RESULTS AND CONCLUSION: The condyles of normal and control groups revealed numerous shallow pits on the surface of articular cartilage. At 2 weeks after injection, the surfaces of condyles were unsmooth, presenting the shrinkage and distortion. The thinner articular cartilage and local tiny cracks were seen at 4 weeks. The deep and great cracks and cartilage defect were observed on the surface of cartilage at 6 weeks. The time of 4-6 weeks is a reference point for establishing early osteoarthritis model in rats through injections of 2% papain and

汪宗保, 男, 1973 年生, 安徽省枞阳县人, 汉族, 中山大学博士后, 主治医师, 主要从事关节软骨、骨科运动医学及康复医学的研究。

通讯作者: 徐亚林, 教授, 硕士生导师, 中山大学博士后流动站开平市中心医院科研基地, 广东省开平市 529300

并列通讯作者: 廖威明, 教授, 博士生导师, 中山大学附属第一医院骨科, 广东省广州市 510080

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.02.003
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)02-00177-06

稿件接受: 2013-10-30

Wang Zong-bao, M. D.,
Attending physician, Science
Research Base of Kaiping
Central Hospital, Postdoctoral
Mobile Station of Sun Yat-sen
University, Kaiping 529300,
Guangdong Province, China;
Department of Orthopedics, the
First Hospital Affiliated to Sun
Yat-sen University, Guangzhou
510080, Guangdong Province,
China; Clinical School of
Acupuncture and Orthopaedics,
Anhui University of Traditional
Chinese Medicine, Hefei
230086, Anhui Province, China

Corresponding author: Xu Ya-lin,
Professor, Master's supervisor,
Science Research Base of Kaiping
Central Hospital, Postdoctoral
Mobile Station of Sun Yat-sen
University, Kaiping 529300,
Guangdong Province, China

Corresponding author: Liao
Wei-ming, Professor, Doctoral
supervisor, Department of
Orthopedics, the First Hospital
Affiliated to Sun Yat-sen
University, Guangzhou 510080
Guangdong Province, China

Accepted: 2013-10-30

0.03 mol/L L-cysteine.

Subject headings: osteoarthritis; papain; L-cysteine; cartilage, articular

Funding: Postdoctorate Science Foundation in China, No. 2011M501355

Wang ZB, Xu YL, Liao WM, Lu QY, Chen ZH, Wu XY, Sun X, Duan WX, Bao YJ, Dai YL. Cartilage surface of early osteoarthritis in rats induced by papain under scanning electron microscope. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(2):177-182.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种退行性病变,是临床的一种常见疾病,主要由于年老、肥胖、劳损、创伤等诸多因素引起的关节软骨退变性损伤、关节边缘和软骨下骨反应性增生,又称骨关节炎、退行性关节炎、老年性关节炎等。临床表现为缓慢发展的关节疼痛、压痛、僵硬、关节肿胀、活动受限和关节畸形等。随着人口老龄化的上升,必然出现较多的该类疾患,开展如何控制和延缓骨关节炎发生发展的相关研究有着重大的价值。

事实证明,骨关节炎早期阶段是临床对于骨关节炎预后最寄予希望的治疗阶段。如果早期损坏的软骨可以修复逆转对根治和防止骨关节炎的进一步发展有着至关重要的意义。关节软骨表面形态的改变是骨关节炎的重要证据之一。建立哺乳动物骨关节炎模型是研究该疾病的关键步骤,木瓜蛋白酶注射建立骨性关节炎动物模型是常用的方法之一。

文章所描述的骨性关节炎模型为木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸混合注射诱导,该模型已有不少研究报道诱导成功后的干预性研究^[1-2],也有诱导进程中组织化学、组织病理学、光谱、透射电镜观察切片中的细胞特点的研究^[3-5]。但是利用扫描电镜观察软骨表面的变化文献报道极少^[6-8]。

目前这些研究尚未见到有关扫描电镜对骨性关节炎发展进程的表述。实验基于对软骨表面进行环境扫描电镜观察,探讨2%浓度的木瓜蛋白酶诱导大鼠早期骨关节炎过程中关节软骨表面形态的变化特点,以期在大体观察到软骨大量破坏之前寻找骨关节炎早期状态的节点模型依据,以期为骨关节炎的早期干预研究提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年8至12月在安徽中医药大学针灸经络研究所动物实验室完成。

材料

实验动物: 健康8周龄雄性Sprague Dawley(SD)大鼠8只,体质量330-350 g,由安徽医科大学动物实验中心提供。

动物分组: 8只大鼠分2组: 一组2只不干预,正常活动,左、右膝关节共4侧膝关节;另一组6只左膝注射生理盐水(对照组),右膝注射药物(实验组),各6侧膝关节。饲养环境: 分笼饲养于实验室大鼠专用自动送风系统鼠笼内,进食及饮水符合实验动物标准。

木瓜蛋白酶诱导大鼠膝骨关节炎软骨表面的电镜扫描实验所用试剂和仪器:

| 试剂和仪器 | 来源 |
|--------------------------|-------------|
| 木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸 | 美国Sigma公司生产 |
| 环境扫描电子显微镜(XL30 ESEM-TMP) | 荷兰飞利浦公司 |

2%木瓜蛋白酶和0.03 mol/L L-半胱氨酸混合溶液: 称取适量木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸溶于生理盐水中,充分混匀后静置30 min。

实验方法:

骨关节炎模型制备方法: 预先在无菌条件下将木瓜蛋白酶、L-半胱氨酸粉剂与生理盐水分别配成2%、0.03 mol/L的浓度,储存于冰箱4℃冷藏室,实验时提前4 h取出常温下放置。实验前将2%的木瓜蛋白酶、0.03 mol/L的L-半胱氨酸按2:1的比例混匀,半小时后进行膝关节腔注射(图1),取大鼠的右后肢建立模型,对SD大鼠行1%氯胺酮腹腔注射(50 μg/g)麻醉后,仰卧位固定于木板上,剪去所要注射的膝关节腔周边1 cm区域的腿毛,络合碘消毒。将大鼠膝关节屈曲45°以髌骨下极白色髌腱外缘的膝眼为进针点,向髌间窝方向穿刺进针,抵达股骨髁后回撤2 mm,以1 mL注射器将混合液注射0.15 mL至右侧膝关节腔(实验组),左侧膝关节腔注射0.15 mL生理盐水(对照组)。4 d后再重复注射1次。

观察方法: 分别将注射药物后2, 4, 6周结束作为取材的时间节点,取材时按照注射药物时同样的麻醉方法,麻醉满意后剪毛,剪毛区域包括膝关节周围2 cm,消毒,铺洞巾。戴手套、口罩,将消毒好的器械在股骨远端上方0.8-1.0 cm处用咬骨钳将其咬断,将断端用刀切平以便作



图1 制备骨关节炎模型术中

Figure 1 Preparation of an osteoarthritis model

为底部置于扫描的小支架上处于稳定状态, 取材后用注射器以生理盐水反复冲洗软骨, 大体观察软骨表面无污物。即可置于环境扫描电镜下, 待放置标本的密闭暗室抽出一度空气后, 开始观察股骨内侧髁表面、摄片, 即刻观察避免了以往文献中使用多种药物(戊二醛、乙醇等氧化剂)处理后对软骨表面脱水的影响^[7-9]。

扫描场所: 中国科技大学力学实验室。

电镜工作方式: 环境方式 0.1-20 Torr。

主要观察指标: 扫描电镜观察大鼠软骨表面的变化。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用SD大鼠8只, 分为3组, 实验过程无脱失, 均进入结果分析。

2.2 大鼠软骨表面的变化 扫描电镜观察正常和对照组大鼠关节软骨表面可见表面分布较均匀、排列整齐的浅坑、

凹凸相间, 与高尔夫球的表面相似, 未见表面存在扭曲和皱缩纹理, 有一定的相对光滑曲面相间(图2A)。

第2周, 软骨表面明显不平整, 胶原纤维呈现相对不平整的垄沟排列, 存在扭曲和皱缩, 凹凸不平, 犹如不平整的坑洼路面, 垄部及沟部平行性较差, 相邻两个垄部之间的距离不相等。表面并出现散在小圆颗粒物质(图2B)。

第4周, 实验组扭曲和皱缩垄沟排列沟部变平, 消失, 部分软骨表面区域开始出现细小浅表裂缝或小凹陷, 裂纹排列交错, 无规则。存在小圆颗粒样物质, 不规则, 明显粗糙, 胶原纤维部分裸露、断裂。表面犹如皮疹样改变(图2C)。

第6周, 软骨表面存在小圆颗粒样物质, 胶原纤维裂隙增宽、加深, 胶原纤维完全裸露、断裂。不同大小的裂纹继续增多。裂隙周围表面不平整面积增大, 裂纹边缘胶原纤维有翻起。可有部分区域软骨缺损明显。此时大体观察并未能明显发现软骨裂纹(图2D, E)。

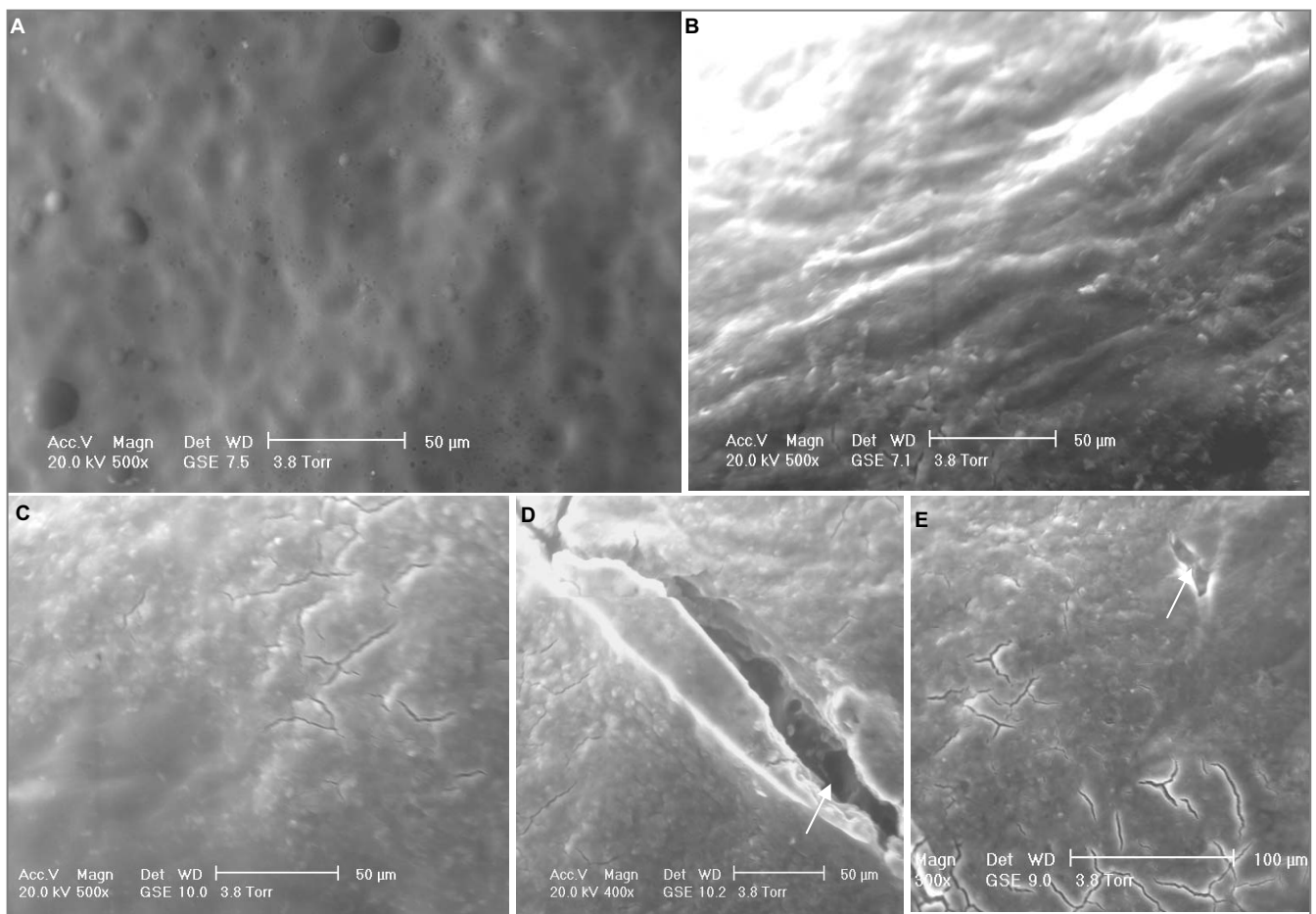


图2 大鼠关节软骨表面变化

Figure 2 The cartilage surface of rats

图注:

- (1) 图A为正常大鼠软骨表面变化(环境扫描电镜, $\times 500$), 软骨表面可见分布较均匀、排列整齐的浅坑, 有一定的相对光滑曲面相间。
- (2) 图B为关节腔注射木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸第2周大鼠软骨表面的变化(环境扫描电镜, $\times 500$), 软骨表面明显不平整, 胶原纤维呈现相对不平整的垄沟排列, 存在扭曲和皱缩, 表面并出现散在小圆颗粒物质。
- (3) 图C为关节腔注射木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸第4周大鼠软骨表面的变化(环境扫描电镜, $\times 500$), 软骨表面扭曲和皱缩垄沟排列沟部变平, 消失, 部分软骨表面区域开始出现细小浅表裂缝或小凹陷, 裂纹排列交错, 无规则。存在小圆颗粒样物质, 胶原纤维部分裸露、断裂。
- (4) 图D为关节腔注射木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸第6周大鼠软骨表面变化(箭头提示裂纹加深, 扫描电镜, $\times 400$), 软骨表面存在小圆颗粒样物质, 胶原纤维裂隙增宽、加深, 胶原纤维完全裸露、断裂。
- (5) 图E为关节腔注射木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸第6周大鼠软骨表面变化(箭头提示软骨缺损, 扫描电镜, $\times 400$), 软骨表面可见部分区域软骨缺损明显。

3 讨论 Discussion

从关节软骨形态结构的变化可以发现更多疾病所处的状态, 了解关节软骨的结构对于理解骨关节炎中的一些问题。哺乳动物的关节软骨表面形态已有文献说明^[10-39], 以往有许多方法被用来评价透明软骨的形态学^[40-42]。20世纪60年代随着扫描电子显微镜诞生, 人们开始用来观察关节软骨表面形态学变化。

实验应用了环境扫描电镜, 与常规扫描电镜有所不同, 常规电镜需要对本进行固定处理, 环境扫描电镜其中的一个优势就是可以直接检测样本, 而不需要物理化学固定技术, 它提供了更理想的形态学图像^[43-47]。而且, 放置标本的空间无需绝对的真空, 因此, 可以用来观察潮湿的标本, 保存了湿度而无扭曲其本来面目, 而还原标本的较真实状态^[48-50]。

环境方式下最适宜观察的生物样品应是那些表面有角质层覆盖的样品和含水量很低的样品, 比如植物的叶片、动物中的昆虫、作物的籽粒等, 这类样品易于保持新鲜度; 环境方式下对样品的观察和图像的记录等操作应尽快完成, 这样可减少样品内水分蒸发而使样品变形降至最低。

在环境扫描电镜的软骨观察历史发展中, 有研究者对其进行了初步探索。Jurvelin 等^[51]使用新西兰兔的髌骨借助环境扫描电镜描述了一个评估关节表面的形态学标准。但是, 由于他们不能定量反应观察者之间和之外的差异性, 后来被认为不具有有效性。而且, 他们通过扫描电镜观察的评价标准并没有设计用来评价因不同样本保存手段所产生的表面变化, 也没有包括由于样本固定方法可能产生有关假象的任何特征或符合条件的特征。

Hong 和 Henderson 等^[52]改良了 Jurvelin 等^[51]的提出的评价标准目的是为了研究大鼠膝关节制动后髌骨软骨表面的变化, 但是, 他们也不能有效评价观察者之间或之内的差异性。

O'Connor 等^[53]使用常规扫描电镜技术在低温下描述了狗的前交叉韧带切断后股骨髁的变化, 尽管这些研究描述了可能暗示早期退变的变化情况, 但是, 他们没有使用一个有效的分类系统, 所以, 该表述也被认为是主观上的。曾经确实很少报道使用环境扫描电镜研究软骨组织^[54]。

目前实验动物中的骨性关节炎模型主要依赖手术、力学、化学反应等方式进行。木瓜蛋白酶或 monosodium iodoacetat(MIA)用来改变关节的组织形态学^[55-57], 关节不稳定是部分半月板切除结合侧副韧带和交叉韧带交互切断的手术造模方法^[58-60], 挤压技术和制动技术也是用来在实验动物中让其关节长时间的固定于一种体位而造成退变性的骨性关节炎^[61], 等等, 但是, 这种方法所花的时间较长。而木瓜蛋白酶造成骨关节炎模型可以根据浓度对关节软骨的作用进行造模的时间控制, 高浓度最短可以在数十小时内完成。

本实验是利用环境扫描电镜通过人们常用的骨关节炎木瓜蛋白酶诱导模型的建立方法从不同连续时间的发展节点探索早期骨关节炎的软骨表面变化依据, 这一点较以往的研究存在一定的不同之处。

研究显示木瓜蛋白酶在动物关节腔内注射可引起迅速进展的骨性关节炎发生, 时间短, 重复性好, 与人类骨性关节炎类似。

木瓜蛋白酶是一种蛋白水解酶, 其引起骨性关节炎的机制被认为是分解软骨基质中蛋白多糖, 去除软骨细胞膜上有丝分裂抑制因子, 使蛋白多糖从软骨基质中丢失。而研究者认为人类骨关节炎软骨最早发生的显著变化之一是水分的增加和蛋白多糖的减少。

研究表明木瓜蛋白酶在兔、豚鼠的颞颌关节、髌关节或膝关节腔内注射时可引起迅速进展的骨性关节炎。

国外 Havdrup 等^[10]研究了高浓度 20%木瓜蛋白酶溶液注射 0.2 mL 至兔膝关节 2 周后即可见关节软骨退变、成骨细胞活动、骨赘形成, 另研究注射浓缩液后 2 d 见关节软骨退变, 1 周见骨赘形成。

国内韩冠英等^[5]研究了不同浓度组织病理、大体标本等比较观察, 软骨退变程度具有浓度高低成正比关系。

鉴于以往文献中提及浓度和考虑骨性关节炎是一个慢性发病过程^[10-39], 作者选择了 2%木瓜蛋白酶和 0.03 mol/L 的 L-半胱氨酸混合液作为关节腔注射液。

据文献报道, 有些观察表面形态结果存在一定的差别: 垄、沟或圆形浅坑)及隆突^[6-8, 40]。实验中, 电镜所观察到的软骨表面: 生理盐水对照组与正常未干预组未见有明显的区别, 软骨表面分布了大小、形态相似的浅坑, 这与 Clarke^[41]、Ghadially^[8]和戴国钢等^[40]所描述的结果类似, 他们认为浅坑是位于其下的软骨细胞及其陷窝形成的, 陷窝即是细胞存在的空腔及其周围的纤维, 并认为未成年的动物会出现平行的沟垄出现, 成年后被浅坑代替, 本实验所用的是成年大龄大鼠。

实验结果观察到: 从第 1 次注射 2%木瓜蛋白酶和 0.03 mol/L 的 L-半胱氨酸混合液 2 周后出现软骨表面皱缩扭曲沟, 呈现出犹如坑洼凹凸不平的路面。并出现散在较多的微小圆颗粒样物质, 这与药物的分解作用效应有关。当然, 也不排除垄沟的存在, 可能与所用环境扫描电镜未经多种药物处理而直接观察软骨表面的方法有关, 与以往的某些研究有些争议, 需要进一步比较。

实验中软骨表面随着时间的延长, 到第 4 周后木瓜蛋白酶和 L-半胱氨酸混合液的作用持续, 使得软骨表面扭曲和皱缩垄沟消失, 变平, 软骨表面开始出现小的裂纹, 撕裂代表着关节软骨的早期变性, 即关节软骨的结构和力学特征的改变, 并释放软骨分子引起免疫和炎症反应^[42]。到第 6 周后裂纹加深较大, 增多, 裂纹边缘胶原纤维有翻起, 并出现了部分区域软骨缺损。而据此大体观察仍未能明显看出, 给早期骨关节炎的定性提供了参照。

从实验结果看来, 使用 2% 的木瓜蛋白酶和 0.03 mol/L 的 L-半胱氨酸混合液 4 周后通过 500 倍的环境扫描电镜观察发现裂纹开始出现, 也就是早期变性。到 6 周后扫描电镜下软骨裂纹较为明显, 说明退变加重。据此, 作者认为 2% 浓度的木瓜蛋白酶溶液造成早期软骨变性的时间节点在 4 周左右, 6 周较为明显, 在 4-6 周的时间节点均可以作为早期骨关节炎的模型。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实施为第一、五、六、七、八作者, 评估为第二、三作者, 资料收集为第二、三作者, 第一、二作者成文, 第一作者审核并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

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

学术术语: 半胱氨酸—一种生物体内常见的氨基酸。分子式: cysteine HSCH₂CH(NH₂)COOH, 为含硫 α-氨基酸之一, 遇硝普盐呈紫色(因 SH 而显色), 存在于许多蛋白质、谷胱甘肽中, 与 Ag⁺, Hg⁺, Cu⁺ 等金属离子可形成不溶性的硫醇盐。即 R-S-M', R-S-M"-S-R(M', M" 各为 1 价、2 价金属)。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Li X, Lang W, Ye H, et al. Tougu Xiaotong capsule inhibits the tidemark replication and cartilage degradation of papain-induced osteoarthritis by the regulation of chondrocyte autophagy. *Int J Mol Med*. 2013;31(6):1349-1356.
- [2] Phitak T, Pothacharoen P, Settakorn J, et al. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry*. 2012;80:77-88.
- [3] Kopp S, Meijersjo C, Clemensson E. Induction of osteoarthritis in the guinea pig knee by papain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983;55(3):259-266.
- [4] Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*. 2005;114(3):339-346.
- [5] 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炎模型比较研究[J]. *中国骨伤*, 2012, 5(25):424-429.
- [6] Stein H, Levanon D. Articular cartilage of the rabbit knee after synovectomy: a scanning electron microscopy study. *J Anat*. 1998;192(Pt 3): 343-349.
- [7] 张昊, 杜宁, 任峰, 等. 手法治疗实验性膝骨关节炎扫描电镜研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2000, 8(2): 1-6.
- [8] Ghadially FN, Ghadially JA, Oryschak AF, et al. Experimental production of ridges on rabbit articular cartilage: a scanning electron microscope study. *J Anat*. 1976;121(Pt 1): 119-132.
- [9] 姚合梅, 王政, 崔瑾, 等. 苗药验方皮部熏洗对骨关节炎大鼠软骨细胞凋亡与增殖的影响[J]. *浙江中医药大学学报*, 2013, (7): 893-896.
- [10] Havdrup T, Telhag H. Papain-induced changes in the knee joints of adult rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1977;48(2): 143-149.
- [11] 方斌, 刘文刚, 赵自明, 等. 参麦注射液关节内注射治疗兔膝骨关节炎的实验研究[J]. *风湿病与关节炎*, 2013, 2(8): 27-30.
- [12] 帅明, 林荔军, 林昭伟, 等. IL-1β、HIF-1α 和 VEGF 在兔膝骨性关节炎模型滑膜中的表达[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(10): 2311-2313.
- [13] 高润成, 王志文, 袁强, 等. 麝香乌龙丸对兔膝骨关节炎软骨组织形态及 p38MAPK、Caspase-3 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11): 228-231.
- [14] 李成, 赵硕, 张振宇. 软骨源性形态发生蛋白缓释系统对兔膝骨关节炎的影响[J]. *山东医药*, 2013, 53(12): 18-20.
- [15] 王庆甫, 马玉峰, 殷岳衫, 等. 低频超声促透中药对兔膝骨关节炎细胞因子的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(2): 108-112.
- [16] 汪福东, 郭义娟, 董立新, 等. 抗骨增生片对兔膝骨关节炎组织病理形态影响研究[J]. *实用中医药杂志*, 2013, 29(3): 159-161.
- [17] 程园园, 刘健, 冯云霞, 等. 骨关节炎大鼠心、肺功能变化与 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 的相关性分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(3): 227-231, 235.
- [18] 侯小丽, 赵林涛, 宋延平. 金天胶胶囊对骨关节炎大鼠病理形态的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 287-290.
- [19] 孙鲁宁, 黄桂成, 赵燕华, 等. 木瓜蛋白酶诱导兔膝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.
- [20] 孙鲁宁, 黄桂成, 赵燕华, 等. 伤科消炎膏对木瓜蛋白酶诱导兔膝骨关节炎模型滑膜中白介素-1、白三烯、金属蛋白酶-3 的影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, 14(9): 143-145.
- [21] 周建中, 王长峰, 马勇, 等. 骨关节炎模型兔膝关节腔注射丹皮酚联合针刺足三里血清白细胞介素 1β、肿瘤坏死因子 α 的变化[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(22): 4096-4099.
- [22] 戚晶敏, 吴启富, 王繁盛, 等. 风湿康治疗大鼠膝骨关节炎的实验研究[J]. *热带医学杂志*, 2012, 12(4): 386-389.
- [23] 季卫锋, 施伟峰, 陈林, 等. 补肾活血法防治大鼠膝骨性关节炎的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(3): 246-250.
- [24] 孙鲁宁, 赵燕华, 黄桂成, 等. 木瓜蛋白酶诱导膝骨关节炎模型兔滑膜病理变化与药物注射时间的关系[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(50): 9311-9313.
- [25] 李石胜, 吴耀持, 张峻峰, 等. 长针透刺膝骨关节炎模型大鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶 3 的变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(50): 9415-9418.
- [26] 谭庆远, 王黎明, 曲洪雪, 等. 中药萃取超透入治疗兔膝骨关节炎疗效的实验研究[J]. *中医临床研究*, 2011, 3(3): 11-13.
- [27] 韩冠英, 凌沛学, 王凤山, 等. 黄原胶注射液对兔膝骨关节炎治疗作用的实验研究[J]. *食品与药品*, 2011, 13(11): 381-384.
- [28] 尹学永, 王志文, 赵鑫. 抗骨增生片对兔膝骨关节炎软骨组织病理形态及 MMP-1、TIMP-1 的影响[J]. *河北中医药学报*, 2011, 26(2): 3-4.
- [29] 许放, 师咏梅, 柳占彪, 等. 痹祺胶囊对实验性骨关节炎大鼠 NO、HYP 的影响[J]. *天津中医药*, 2011, 28(3): 237-239.
- [30] 钟鼎文, 郭长青, 嵇波, 等. 膝骨关节炎大鼠丘脑及下丘脑 β-EP 受体含量变化及针刀松解法的影响研究[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(2): 276-278.
- [31] 郭长青, 嵇波, 陈幼楠, 等. 针刀松解法对膝骨关节炎大鼠中枢不同部位亮氨酸-脑啡肽的影响[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(8): 656-658.
- [32] 庄超, 刘瑞平, 徐南伟, 等. 兔骨关节炎模型血清炎症指标的动态观察[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(3): 369-373.
- [33] 尹学永, 王志文, 赵鑫. 抗骨增生片对兔骨关节炎软骨细胞凋亡的影响[J]. *陕西中医*, 2011, 32(8): 1083-1085.

- [34] 张延娇,李绍新,郭周义,等. 低强度激光联合照射口咽部和犊鼻穴对实验性膝骨关节炎兔氧自由基代谢的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(28):5208-5211.
- [35] 嵇波,郭长青,金燕,等. 针刀和电针对膝骨关节炎大鼠痛阈和中枢单胺类神经递质的影响[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(6):1091-1095.
- [36] 路明珠,陆文铨,伊佳,等. 不同分子量构成的玻璃酸钠对骨关节炎治疗作用的实验研究[J]. 药学实践杂志,2010,28(1):19-22.
- [37] 王志文,赵鑫,鲍际鹏,等. 麝香乌龙丸对兔骨关节炎软骨细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(11):2893-2894.
- [38] 王翠民,尹学永,谷宁飞,等. MMP-1、TIMP-1在兔实验性膝骨关节炎中的表达[J]. 中国现代医学杂志,2009,19(18):2754-2756.
- [39] 邓宇,伍筱梅,任医民,等. 关节腔内注射不同蛋白酶建立兔膝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): 332-339.
- [40] 戴国钢,刘波,罗小兵等.正常兔膝关节表面结构的扫描电镜观察[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(32):6391-6393.
- [41] Clarke IC. Articular cartilage:a review and scanning electron microscope s tudy. II. The territorial fibrillar architecture. J Ana.1974;118(2): 261-280.
- [42] Buckwalter JA,Mankin HJ.Articular cartilage. J Bone Joint Surg.1997;79-A(4): 600-633.
- [43] Weakley BS. A Beginner's handbook in biological transmission Electron Microscopy. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone;1981:49.
- [44] Soeder S, Kuhlmann A, Aigner T. Analysis of protein distribution in cartilage using immunofluorescence and laser confocal scanning microscopy. Methods Mol Med. 2004; 101:107-125.
- [45] Kubo T, Arai Y, Namie K, et al.Time-sequential changes in biomechanical and morphological properties of articular cartilage in cryopreserved osteochondral allografting. J Orthop Sci. 2001; 6:276-281.
- [46] Paulsen HU, Thomsen JS, Hougen HP, et al.A histomorphometric and scanning electron microscopy study of human condylar cartilage and bone tissue changes in relation to age. Clin Orthod Res. 1999;2:67-78.
- [47] Clark JM, Simonian PT. Scanning electron microscopy of "fibrillated" and "malacic" human articular cartilage: technical considerations.Microsc ResTech. 1997;37:299-313.
- [48] Li B, Marshall D, Roe M, et al. The electron microscope appearance of the subchondral bone plate in the human femoral head in osteoarthritis and osteoporosis. J Anat. 1999;195(1):101-210.
- [49] Goodwin DW, Zhu H, Dunn JF. In vitro MR imaging of hyaline cartilage: correlation with scanning electron microscopy. AJR Am J Roentgenol. 2000;174:405-409.
- [50] Stein H, Levanon D. Articular cartilage of the rabbit knee after synovectomy: a scanning electron microscopy study. J Anat.1998;192(3):343-349.
- [51] Jurvelin J, Kuusela T, Heikkila R, et al. Investigation of articular cartilage surface morphology with a semiquantitative scanning electron microscopic method.Acta Anat (Basel). 1983; 116:302-311.
- [52] Hong SP, Henderson CN. Articular cartilage surface changes following immobilization of the rat knee joint. A semiquantitative scanning electron-microscopic study. Acta Anat (Basel).1996;157:27-40.
- [53] O'Connor P, Oates K, Gardner DL, et al. Low temperature and conventional scanning electron microscopic observations of dog femoral condylar cartilage surface after anterior cruciate ligament division. Ann Rheum Dis. 1985;44:321-327.
- [54] Suso S, Carbonell JA, Segur JM, et al. Cartilage appearance using an environmental scanning electron microscope. Cell Preserv Technol.2004;2:51-54.
- [55] 史宗道, 杨峰,何志秀,等.透明质酸钠与强的松龙治疗兔实验性颞颌关节骨关节炎的研究[J].中国修复重建外科杂志,2002, 16(1):5-10.
- [56] 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.
- [57] Guzman RE, Evans MG, Bove S, et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis.Toxicol Pathol. 2003;31: 619-624.
- [58] Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. J.Muscu Neur Inte. 2001;1: 363-376.
- [59] Fernihough JC, Gentry M, MalcangioA, et al.Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee.Pain, 2004;112: 83-93.
- [60] Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL,et al. Walker. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. Pain. 2005;114: 339-346.
- [61] Palmoski MJ, Bean JS. Cartilage atrophy induced by limb immobilization.\\Greenwal RA,Diamond HS, eds. Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases II. Bocha Raton, Florida:CRC Press. 1988:83-87.