

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

段文秀¹, 汪宗保¹, 张浩¹, 杨智为¹, 胡智伦¹, 许方军¹, 徐亚林², 刘丹³, 解彦¹(安徽中医药大学, ¹针灸骨伤临床学院, ³中西医结合临床学院, 安徽省合肥市 230038; ²广东医学院附属开平医院, 广东省开平市 529300)

文章亮点:

实验用4%木瓜蛋白酶混合液关节腔注射建立大鼠膝骨关节炎模型,利用透射电镜观察了早期骨关节炎不同时间节点的超微结构动态变化。结果显示木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎进程中透射电镜下软骨超微结构呈渐进性变化,提示以4周作为有关骨性关节炎动物实验模型干预时间节点较为确切。

关键词:

实验动物; 骨及关节损伤模型; 骨关节炎; 关节软骨; 木瓜蛋白酶; 透射电镜; 超微结构

主题词:

骨关节炎; 软骨; 木瓜蛋白酶; 显微镜检查, 电子, 透射

基金资助:

2013年安徽中医药大学国家级大学生创新创业训练计划(201310369035); 中国博士后科学基金(2011M501355)

摘要

背景:木瓜蛋白酶诱导大鼠膝骨性关节炎是常用造模方法,能获得稳定的骨关节炎模型。

目的:观察木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎进程中透射电镜下关节软骨细胞超微结构的变化规律。

方法:将18只SD大鼠随机分为3组,2只为正常对照组不做干预;16只大鼠右膝关节腔注射木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸混合液诱导骨关节炎模型(骨关节炎模型组),左侧注射生理盐水(生理盐水对照组)。注射后第1,2,4,6周后分别取材,使用透射电镜观察股骨内侧髌关节软骨超微结构变化。

结果与结论:正常对照组和生理盐水对照组胞质内有丰富的粗面内质网、线粒体。骨关节炎模型组注射1周后,线粒体空泡化,可见轻度扩张的粗面内质网;2周后,出现脂滴,线粒体变性明显,空泡化严重,数目减少,粗面内质网扩张明显;4周后,脂滴增多,线粒体数目明显减少,大部分粗面内质网高度扩张,部分粗面内质网溶解断裂;6周后,胞质内见数个脂滴,大部分线粒体消失,仅有少量线粒体存在,大部分粗面内质网断裂溶解。说明木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎进程中透射电镜下软骨超微结构呈渐进性变化。

段文秀,汪宗保,张浩,杨智为,胡智伦,许方军,徐亚林,刘丹,解彦.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.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.18.001

Dynamic changes of rat cartilage ultrastructure in the early process of papain-induced knee osteoarthritis

Duan Wen-xiu¹, Wang Zong-bao¹, Zhang Hao¹, Yang Zhi-wei¹, Hu Zhi-lun¹, Xu Fang-jun¹, Xu Ya-lin², Liu Dan³, Xie Yan¹ (¹Acupuncture Orthopedics Clinical School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui Province, China; ²Kaiping Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Kaiping 529300, Guangdong Province, China; ³Clinical School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Papain-induced rat knee osteoarthritis is a common modeling method, which can obtain a stable osteoarthritis model.

OBJECTIVE: To observe the change of ultrastructure of chondrocytes in the early process of papain-induced rat knee osteoarthritis under transmission electron microscope.

METHODS: A total of 18 Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups. Two rats were considered as a normal control group, without intervention. The mixture of papain and L-cysteine was injected in right knee joint cavity of 16 rats to induce osteoarthritis models (osteoarthritis model group). Physiological saline was injected in the left side (physiological saline control group). At 1, 2, 4 and 6 weeks after injection, samples were collected. Transmission electron microscope was used to observe the change of cartilage ultrastructure of the medial femoral condyle joint.

RESULTS AND CONCLUSION: For the normal control group and physiological saline control group, their cytoplasm contained abundant rough endoplasmic reticulum and mitochondria. After 1 week of injection, mitochondria vacuoles and light expanded rough endoplasmic reticulum were visible. Two weeks later, lipid droplets appeared, mitochondria degeneration was distinct, vacuolization was serious and its number was reduced, and

段文秀,女,1992年生,安徽省阜阳市人,汉族,安徽中医药大学在读硕士。

通讯作者:汪宗保,博士,副教授,安徽中医药大学,针灸骨伤临床学院,安徽省合肥市 230038

并列通讯作者:徐亚林,教授,硕士生导师,广东医学院附属开平医院,广东省开平市 529300

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)18-02789-05

稿件接受:2015-02-09

http://www.crter.org

Duan Wen-xiu, Studying for master's degree, Acupuncture Orthopedics Clinical School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui Province, China

Corresponding author: Wang Zong-bao, M.D., Associate professor, Acupuncture Orthopedics Clinical School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui Province, China

Corresponding author: Xu Ya-lin, Professor, Master's supervisor, Kaiping Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Kaiping 529300, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-02-09

rough endoplasmic reticulum expansion was obvious. Four weeks later, lipid droplets became increased, and the number of mitochondria decreased significantly. Most of the rough endoplasmic reticula were highly expanded, and part of the rough endoplasmic reticula were dissolved and fractured. Six weeks later, a number of lipid droplets were visible in cytoplasm, most of the mitochondria disappeared, only a small number of mitochondria existed, and most of the rough endoplasmic reticula were dissolved and fractured. These results confirmed that cartilage ultrastructure changes gradually in the early process of papain-induced rat knee osteoarthritis under transmission electron microscope.

Subject headings: Osteoarthritis; Cartilage; Papain; Microscopy, Electron, Transmission

Funding: the National Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Anhui University of Chinese Medicine in 2013, No. 201310369035; the China Postdoctoral Science Foundation, No. 2011M501355

Duan WX, Wang ZB, Zhang H, Yang ZW, Hu ZL, Xu FJ, Xu YL, Liu D, Xie Y. Dynamic changes of rat cartilage ultrastructure in the early process of papain-induced knee osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015; 19(18):2789-2793.

0 引言 Introduction

骨关节炎是中老年最常见的一种慢性、进行性关节疾病,其病因、分子生物学、早期诊断和治疗均存在问题,需要进一步研究^[1]。临床以慢性关节疼痛、僵硬、肿大伴有有关节功能障碍为主要表现^[2],是机械性和生物学因素相互作用下,关节软骨细胞、细胞外基质和软骨下骨三者合成与降解过程失衡的结果^[3]。骨性关节炎最常累及膝关节,其主要症状是膝关节疼痛和行走功能障碍,为引起老年人疼痛及伤残的主要病症之一^[4]。随着社会人口的老龄化,该病发病率呈显著上升趋势^[5],因此开展如何早期发现膝骨关节炎以便进行早期干预的相关研究意义重大。

骨关节炎动物模型在研究骨性关节炎的发生、发展、有效防治药物及治疗方法方面具有重要作用^[6-7]。建立合理的骨关节炎动物模型可深入探讨其发病机制并寻找有效的诊疗手段。国内外学者建立动物模型的方式主要有:关节制动、关节腔药物注射、手术方法等^[8-21]。关节腔注射药物法成功率高、造模成型时间短、同时可保持关节囊的完整性,是一种重要的造模方法^[22],所用化学物质主要有木瓜蛋白酶、胶原蛋白酶、雌二醇等^[23-24]。其中关节内注射木瓜蛋白酶可诱导狗、兔、小鼠、大鼠等动物膝骨关节炎,其特点是发病速度快、重复性好,与人类骨关节炎类似^[25]。

尽管近年有些文献中有对骨关节炎关节软骨病理变化的研究^[26-28],但都是以病理染色组织学Mankin评分的时间节点来判断骨关节炎早、中、晚分期。也有关于木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的扫描电镜观察^[29]。而关于在注射木瓜蛋白酶诱发早期骨关节炎发展进程中的不同时间节点到底超微结构是如何详细变化并未见报道。

本实验旨在对4%浓度木瓜蛋白酶诱导大鼠骨关节炎过程中关节软骨超微结构的变化与时间的关系进行观察,以期在发现软骨明显破坏之前寻找骨关节炎早期状态的节点模型依据。以期发现时间节点与关节软骨细胞超微结构的变化关系,为早期骨性关节炎相关康复治疗的动物实验模型对照研究时间提供参考依据。

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2013年10月至2014年1月在安徽中医药大学针灸经络研究所动物实验室完成。大鼠膝关节软骨超微结构观察在安徽省立医院病理实验室完成。

材料:

实验动物: 健康8周龄雄性SD大鼠18只,体质量295-332 g,由安徽省动物实验中心提供。符合卫生部一级试验动物标准,动物许可证号SCXK(皖)2011-002。实验前大鼠饲养3 d,以便其适应新的环境并观察无明显疾患及其他异常后开始实验。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,饮水及进食符合实验动物标准。

动物分组: 18只大鼠分为2组:正常对照组2只不做任何干预;16只大鼠左膝为生理盐水对照组注射生理盐水,右膝注射药物(骨关节炎模型组)。

试剂和仪器: 木瓜蛋白酶和L-半胱氨酸为美国Sigma公司产品;透射电子显微镜为日本电子公司生产。

实验方法:

骨关节炎模型制备: 在无菌条件下将木瓜蛋白酶与生理盐水配成4%浓度,将L-半胱氨酸与生理盐水配成浓度0.03 mol/L,放于冰箱4℃冷藏室储存,于实验前4 h取出置于常温下。将4%木瓜蛋白酶与0.03 mol/L的L-半胱氨酸按2:1的比例混匀,静置30 min后对大鼠进行膝关节腔注射。在实验第1, 4天,16只大鼠行1%氯胺酮(0.05 mg/L)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定于木板上,剃去左右膝关节腔周边1 cm区域的腿毛,络合碘消毒,体积分数75%的乙醇脱碘后,屈曲45°以髌骨下缘髌腱外缘为进针点,向髌间窝方向进针,抵达股骨髌后回撤2 mm^[30],右侧膝关节腔注入0.15 mL混合液诱导骨关节炎模型(骨关节炎模型组),左侧膝关节腔注射0.15 mL生理盐水做对照(生理盐水对照组)。

取材方法: 于木瓜蛋白酶首次注射后1, 2, 4, 6周作为取材的时间节点,对SD大鼠行1%氯胺酮腹腔注射麻醉后断头处死,每个时间节点3只。大鼠处死后,膝关节周围2 cm区域剃毛,戴手套、口罩,消毒,铺洞巾,打开膝关节腔,取右膝关节股骨内侧髌关节软骨作为骨关节炎模型组,取左膝关节股骨内侧髌关节软骨作为生理盐水对照组。在第1周时同时切取正常对照组未干预大鼠的右膝关节股骨内侧髌正常软骨组织作为正常对照。见图1。

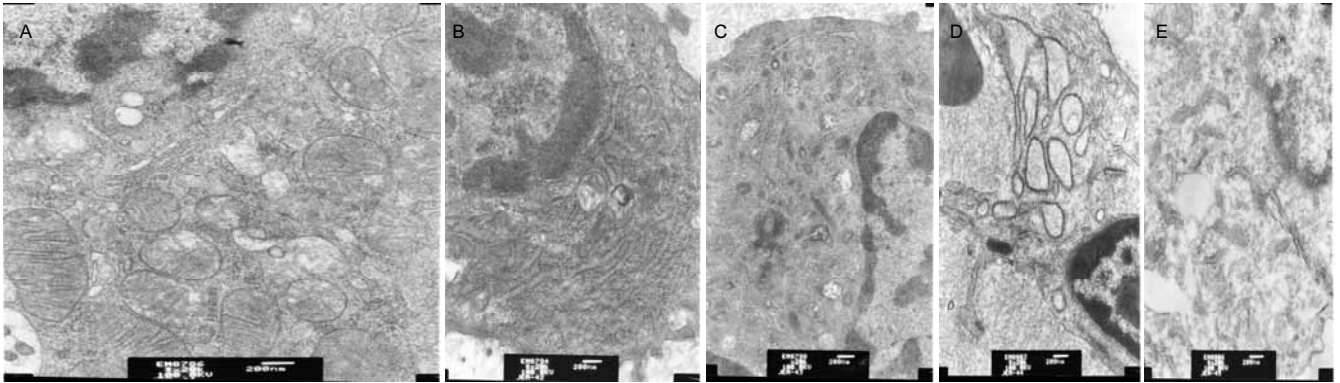


图2 大鼠膝关节软骨超微结构的变化(透射电镜, $\times 20\ 000$)

Figure 2 Changes in the ultrastructure of cartilage of rat knee joint (transmission electron microscope, $\times 20\ 000$)

图注: 图A为正常对照组及生理盐水对照组软骨细胞呈卵圆形, 胞质内有丰富的粗面内质网、线粒体及高尔基复合体; B为骨关节炎模型组第1周部分细胞肿胀, 线粒体异常, 表现在线粒体嵴模糊, 线粒体空泡化, 可见轻度扩张的粗面内质网; C为骨关节炎模型组第2周大部分细胞明显肿胀且形态异常, 胞浆空泡化, 出现脂滴, 线粒体变性明显, 空泡化严重, 数目减少, 粗面内质网扩张明显; D为骨关节炎模型组第4周胞质内脂滴增多, 线粒体数目明显减少, 大部分粗面内质网高度扩张, 部分粗面内质网溶解断裂; E为骨关节炎模型组第6周胞质内见数个脂滴, 脂滴体积大, 大部分线粒体消失, 仅有少量线粒体存在, 大部分粗面内质网断裂溶解。

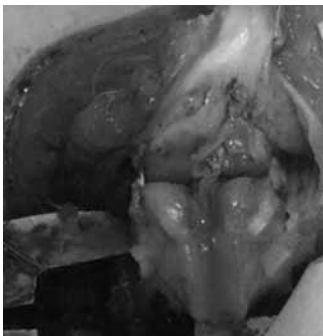


图1 拟取材膝关节股骨内侧髌的关节软骨

Figure 1 Articular cartilage of knee medial femoral condyle

透射电镜的超薄切片制作及观察: 取膝关节股骨内侧髌关节软骨组织 $1\ \text{mm}\times 1\ \text{mm}\times 1\ \text{mm}$ 大小, 固定于2.5%戊二醛($4\ ^\circ\text{C}$)6 h; PBS(pH 7.2)洗30 min, 将组织后固定于1%锇酸1 h, 梯度乙醇脱水开始体积分数30%、50%各15 min, 放入70%醋酸铀乙醇饱和液中浸泡12 h, 再以体积分数80%、95%乙醇脱水各15 min, 放入无水乙醇洗2次共40 min, 放入环氧丙烷30 min, 环氧丙烷:环氧树脂等量混合浸泡2 h, 环氧丙烷:环氧树脂 2:1比例混合浸泡1 h, 用纯环氧树脂包埋, 后入 $45\ ^\circ\text{C}$ 烤箱中12 h固化, 再放入 $65\ ^\circ\text{C}$ 烤箱中48 h固化, 最后取出包埋好的组织进行半薄切片定位, 后进行超薄切片(片厚70 nm, 切片机型号为LKB-NOVA型, 瑞典产)。将切好的片子用300目的铜网捞起, 蒸馏水冲洗后放入醋酸铀饱和水溶液中染色30 min, 双蒸水洗3次, 入枸橼酸铅染液染色20 min, 双蒸水洗3次, 干燥, 最后用日产JEM-1230型透射观察摄影。

主要观察指标: 大鼠膝关节软骨超微结构的形态学变化。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用SD大鼠18只, 造模时

由于麻醉过量死1只, 饲养过程中死1只, 最终16只进入结果分析。

2.2 大鼠膝关节软骨超微结构的变化 透射电镜观察正常对照组和生理盐水对照组软骨细胞呈卵圆形, 细胞及细胞膜完整, 细胞表面有较多突起的微绒毛。细胞核完整, 核膜清晰, 染色质均匀。胞质内有丰富的粗面内质网、线粒体及高尔基复合体。见图2A。

1周后: 部分细胞肿胀, 线粒体异常, 表现在线粒体嵴模糊, 线粒体空泡化, 可见轻度扩张的粗面内质网。细胞核基本正常。见图2B。

2周后: 大部分细胞明显肿胀且形态异常, 微绒毛断裂变短, 胞浆空泡化, 出现脂滴, 细胞核形态异常, 线粒体变性明显, 空泡化严重, 数目减少, 粗面内质网扩张明显。见图2C。

4周后: 细胞形态异常明显, 胞质内脂滴增多, 细胞核形态不规则, 核膜模糊, 线粒体数目明显减少, 大部分粗面内质网高度扩张, 部分粗面内质网溶解断裂。见图2D。

6周后: 细胞形态不规则, 胞质内见数个脂滴, 脂滴体积大, 细胞核固缩, 大部分线粒体消失, 仅有少量线粒体存在, 大部分粗面内质网断裂溶解, 游离核糖体减少。见图2E。

3 讨论 Discussion

骨性关节炎是临床常见疾病之一, 关节软骨是无血管、淋巴管高度特化的组织, 其主要成分为蛋白聚糖和胶原, 分布在软骨细胞陷凹中数量较少, 因此一旦损伤, 其自身修复能力极低。且随着年龄的增加, 修复能力逐年降低^[31]。由于骨关节炎的高度侵袭性、不可逆性特点, 早期诊断和预防是控制疾病、降低其危害性最有效的办法之一。而早期骨关节炎的时间节点确认更为康复治疗 and 预防疾病的发展有着重大的意义。

对实验性动物膝关节软骨表面形态的描述已有很多报道^[32-34], 关于大鼠膝关节早期骨关节炎的软骨表面变化的特点, 作者也已经进行了探索。汪宗保等^[29]采用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注射至大鼠膝关节腔诱导骨关节炎模型, 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观察。结果显示: 2周后出现软骨表面凹凸不平, 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。得出结论2%木瓜蛋白酶诱导的早期骨关节炎模型的时间节点可以定在4-6周。

透射电子显微镜分辨率比扫描电镜高, 可以观察到软骨细胞细胞器的动态变化。在扫描电镜观察关节软骨表面形态的基础处上, 进一步进行透射电镜的观察。通过对4%浓度木瓜蛋白酶诱导大鼠骨关节炎过程中关节软骨超微结构的变化与时间的关系进行观察, 以期发现时间节点与关节软骨细胞超微结构的变化关系。

软骨的组织学改变的严重性与骨关节炎的蛋白溶解酶的活性有相互关系, 骨关节炎患者的血浆硫酸角蛋白水平是增高的, 一旦成人, 软骨细胞的单位数量变少, 关节软骨开始衰老^[35]。蛋白多糖的耗尽是所有自然发生和实验发生的骨关节炎的主要特征, 它与某些蛋白酶有关^[36]。

本实验采用木瓜蛋白酶关节腔内注射诱发骨关节炎是一种常用的造模方法^[37-42], 该方法的机制在于其对软骨基质中蛋白多糖的分解作用。蛋白多糖是保持关节软骨富有弹性和抗压性的重要软骨基质。蛋白多糖的丢失可减弱软骨基质对软骨细胞的保护作用, 导致软骨细胞退变以致破坏, 软骨降解, 其分解的碎屑释放进入滑液中, 刺激滑膜炎症反应, 导致大量炎性递质及自由基分泌^[43]。其中自由基可抑制基质蛋白多糖及胶原的合成, 同时引起软骨细胞膜性结构的损伤; 白细胞介素1抑制软骨糖蛋白的合成, 促进基质微分子降解; 肿瘤坏死因子诱导软骨细胞产生过氧化反应, 与白细胞介素1共同参与促进软骨的吸收, 从而介导骨关节炎的软骨破坏, 形成恶性循环^[44]。

对于骨性关节炎超微结构的研究, 国内已有报道^[45]。柴本甫等^[44]通过手术切断前交叉韧带及内侧副韧带, 造成兔膝骨关节炎, 透射电镜观察发现在骨关节炎发展过程中, 关节软骨的基质及软骨细胞发生变化。软骨细胞的变性突出表现在细胞质内的脂滴、糖原和微丝的增加。

唐旭升等^[45]通过结扎大鼠双侧股静脉造成双下肢瘀血, 骨内压增加, 膝关节软骨细胞缺乏营养而导致退变的方法制造动物模型。透射电镜观察发现膝关节骨关节炎时, 早期软骨细胞缩小, 胞突减少, 胞浆内脂滴增多, 细胞器减少, 胞核可肿胀, 继之, 胞核发生固缩, 整个细胞可凝聚, 最终细胞坏死崩解, 只见细胞碎片残留在软骨陷窝或基质中。戴七一^[46]通过改良 Hulth法进行膝骨关节炎造模, 5周后透射电镜观察软骨细胞发现细胞核可见固缩现象^[47], 线粒体异常, 表现为线粒体嵴模糊、消失, 空泡化现象较明显, 内质

网、高尔基体基本正常, 纤维组织紊乱现象较明显, 多个标本见凋亡小体。张红宇等^[48]通过4%木瓜蛋白酶注射诱导兔骨关节炎模型, 2周后透射电镜观察关节软骨发现: 大部分细胞明显肿胀且形态不规则, 细胞周晕消失(代表细胞退变), 微绒毛断裂变短, 粗面内质网明显扩张, 网膜溶解断裂, 胞浆内可见数个脂滴存在, 细胞核形态不规则。这些报道并没能对骨关节炎发展进程中超微结构的动态变化加以说明。

关于注射木瓜蛋白酶诱发早期骨关节炎发展进程中的不同时间节点到底超微结构是如何详细变化并未见报道。作者选用4%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, 4 d后再重复注射1次。首次注射后第1, 2, 4, 6周后分别使用透射电镜观察股骨内侧髌关节软骨超微结构变化。结果观察到: 正常对照组和生理盐水对照组, 软骨细胞呈卵圆形, 细胞及细胞膜完整, 细胞表面有较多突起的微绒毛。细胞核完整, 核膜清晰, 染色质均匀。胞质内有丰富的粗面内质网、线粒体及高尔基复合体。注射1周后, 部分细胞肿胀, 线粒体异常, 表现在线粒体嵴模糊, 线粒体空泡化, 可见轻度扩张的粗面内质网。细胞核基本正常。2周后: 大部分细胞明显肿胀且形态异常, 微绒毛断裂变短, 胞浆空泡化, 出现脂滴, 细胞核形态异常, 线粒体变性明显, 空泡化严重, 数目减少, 粗面内质网扩张明显。4周后: 细胞形态异常明显, 胞质内脂滴增多, 细胞核形态不规则, 核膜模糊, 线粒体数目明显减少, 大部分粗面内质网高度扩张, 部分粗面内质网溶解断裂。6周后: 细胞形态不规则, 胞质内见数个脂滴, 脂滴体积大, 细胞核固缩, 大部分线粒体消失, 仅有少量线粒体存在, 大部分粗面内质网断裂溶解, 游离核糖体减少。本实验用4%木瓜蛋白酶和0.03 mol/L的L-半胱氨酸混合液注射后2周, 用透射电镜在20 000倍镜下进行观察可见, 木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎进程中透射电镜下软骨超微结构呈渐进性变化, 于4周时明显, 实验认为以4周作为有关骨性关节炎动物实验模型干预时间节点较为确切。

作者贡献: 第一作者和通讯作者进行实验设计, 实施为第一、五、六、七、八作者, 评估为通讯作者, 资料收集为第一、三、四、五、六作者, 第一、二作者成文, 第一作者及通讯作者审校并对文章负责。

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-Mⁿ, R-S-Mⁿ-S-R(Mⁿ, Mⁿ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. Tougou 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] 梁彦勤, 廖荣臻, 刘超, 等. 骨性关节炎动物模型研究概况[J]. 广西中医药大学学报, 2012, 15(3):64-66.
- [3] 邓宇, 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, 2009, 3(3):332-338.
- [4] 王庆蓉, 官颖鹏, 邵卫. 软骨细胞在膝骨性关节炎中的超微结构改变[J]. 电子显微学报, 2000, 19(6):819-823.
- [5] 曾庆徐, 黄少弼, 肖征宇. 症状性骨关节炎临床和流行病学探讨[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(2):88-90.
- [6] Bendele AM. Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002; 2(6):501-503.
- [7] Young MF. Mouse models of osteoarthritis provide new research tools. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26(7):333-335.
- [8] 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(10):330.
- [9] Okazaki R, Sakai A, Ootsuyama A, et al. Apoptosis and p53 Expression in Chondrocytes Relate to Degeneration in Articular Cartilage of Immobilized Knee Joints. *Rheumatol*. 2003; 30(3):559-566.
- [10] Wancket LM, Baragi V, Bove S. Anatomical localization of cartilage degradation markers in a surgically induced rat osteoarthritis model. *Toxicologic pathology*. 2005; 33(4):484.
- [11] Mosikowitz RW. Experimental models of osteoarthritis. *In: Osteoarthritis Saunders*. Philadelphia. 1984; 109-115.
- [12] Bungert C, Hjerminnd J, Harving S, et al. Relationship between intraosseous pressures and intra-articular pressures in arthritis of the knee. *Acta Orthop Scand*. 1983; 54(2):188-193.
- [13] Lozoya KA, Flores JB. A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Res Pract*. 2000; 196(11):729-745.
- [14] 吴宏斌, 杜靖远, 胡勇, 等. 兔前交叉韧带切断骨关节炎模型中 MMP-1、MMP-13 及 TIMP-1 的 mRNA 表达研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2002, 6(3):169.
- [15] 王健, 敖英芳. 后交叉韧带断裂继发关节软骨退行性变的实验研究[J]. 中国运动医学杂志, 2004, 23(5):476.
- [16] 顾廷, 戴克戎, 裘世静, 等. 应力降低导致关节软骨退变机理的形态学研究[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(9):631-633.
- [17] 毛宾尧. 膝关节痛与膝关节骨内压[J]. 中华骨科杂志, 1993, 13(20):137-139.
- [18] 陈宝兴, 丁继华. 双后肢大白鼠的骨关节炎实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1986, 7(2):96.
- [19] 沈培芝, 石印玉. 强筋方治疗试验性膝骨关节炎的组织病理学观察研究[J]. 中国中医骨伤科, 1995, 3(1):10-13.
- [20] 路磊, 王竞. 关节不稳定诱发家兔膝骨关节炎的实验研究[J]. 局解手术学杂志, 1995, 4(1):23-24.
- [21] 陈宏贤, 王太平, 牛琼, 等. 骨关节炎动物模型的建立及选择[J]. 深圳中西医结合杂志, 2008, 18(4):209-212.
- [22] Aigner T, Cook JL, Gerin N, et al. Histopathology atlas of animal model systems—overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18(3):2-6.
- [23] Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998; 6(3):177-186.
- [24] Tsai CL, Liu TK. Estradiol-induced knee osteoarthrosis in ovariectomized rabbits. *Clin Orthop*. 1993; (291):295-302.
- [25] 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, 2009, 3(3):332-339.
- [26] Han GY, Ling PX, Wang FS, et al. Comparison study on knee osteoarthritis in rabbits induced by different concentrations of papain. *Zhongguo Gu Shang*. 2012; 25(5):424-429.
- [27] 孙鲁宁, 赵燕华, 黄桂成. 木瓜蛋白酶诱导兔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):9311-9316.
- [28] 华英汇, 顾湘杰, 陈世益, 等. 威灵仙注射液对骨关节炎影响的实验研究[J]. 中国运动医学杂志, 2003, 22(4):420-422.
- [29] 汪宗保, 廖威明, 陈朝晖, 等. 木瓜蛋白酶诱导大鼠膝早期骨关节炎软骨表面的扫描电镜观察[J]. 中国组织工程研究杂志, 2014, 18(2):177-182.
- [30] Havdrup T, Telhag H. Papain-induced changes in the knee joints of adult rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1977, 48(2):143-149.
- [31] 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.
- [32] 谭庆远, 王黎明, 曲洪雪, 等. 中药萃取超导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.
- [33] 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, 2011, 31(3):369-373.
- [34] Vignon E, Arlot M, Vignon G. Etude de la densité cellulaire du cartilage de la tête fémorale en fonction du délai. *Rev Rhum Mal Osteoarthritique*. 1976; 13(4):365.
- [35] 姜思权. 骨关节炎的病理与发病因素[J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(1):56-59.
- [36] 石辉, 何斌, 史晨辉, 等. 用尿激酶型纤溶酶原激活物建立兔骨关节炎模型的研究[J]. 石河子大学学报, 2009, 24(1):66-69.
- [37] Muehleman C, Green J, Williams JM, et al. The effect of bone remodeling inhibition by the oledronic acid in an animal model of cartilage matrix damage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10(3):226-233.
- [38] Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998; 6(3):177-186.
- [39] 杨峰, 史宗道. 用木瓜蛋白酶建立兔颞颌关节骨关节炎模型[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 12(5):330-333.
- [40] Kopp S, Meijersjo C, Clemensson E. Induction of osteoarthrosis in the guinea pig knee by papain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983; 55(3):259-266.
- [41] 江捍平, 王太平. 骨关节炎动物模型[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(6):153-156.
- [42] 陈百成, 张静. 骨关节炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 199-202.
- [43] 张文贤, 张晓刚. 骨性关节炎的实验研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2003, 11(6):51-53.
- [44] 柴本甫, 汤雪明. 实验性骨关节炎超微结构研究[J]. 上海第二医科大学学报, 1988, 8(3):193-198.
- [45] 唐旭升, 杜宁. 手法治疗大鼠膝骨关节炎的超微结构研究[J]. 中医骨伤科杂志, 2001, 9(2):7-10.
- [46] 戴七一, 文宗振. 逍遥散对雌性兔膝关节软骨细胞超微结构的影响[J]. 中医正骨, 2012, 24(9):8-10.
- [47] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12):1104-1108.
- [48] 张红宇, 赵卫东, 高岩峰. O3 对骨性关节炎关节软骨作用的 MR 与电镜观察[J]. 当代医学, 2009, 15(35):759-761.