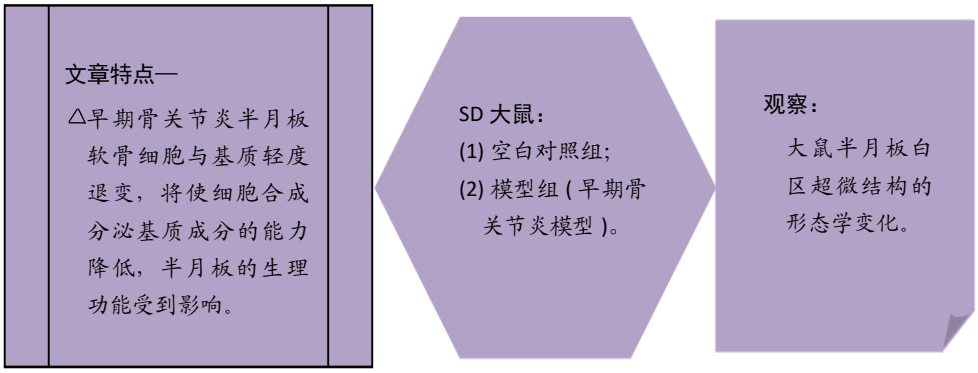
早期骨关节炎模型大鼠半月板白区细胞的超微结构变化

https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3042
投稿日期：2020-04-10
送审日期：2020-04-17
采用日期：2020-06-05
在线日期：2020-09-05
中图分类号：
R361+.2；R446；R318
文章编号：
2095-4344(2021)08-01237-06
文献标识码：B

刘翔翔[1, 2]，黄云梅[1, 3]，陈文列[1, 3]，林如辉[1, 4]，卢小冬[2]，李钻芳[1, 4]，许亚晔[5]，黄美雅[1, 4]，李西海[1, 3]

文章快速阅读：



文题释义：

早期骨关节炎：骨性关节炎是一种关节退行性病变，其中膝关节是最常见的，伴有关节疼痛、肿胀等表现。由于骨关节炎具有高度侵袭性、不可逆性特点，在更多组织发生不可逆性病变前(即早期)，早期诊治、预防是控制疾病、降低危害的有效办法。

半月板白区：半月板内缘区域组织，无血管分布，营养来源于关节滑液，损伤后难以愈合，易发生退变，是膝骨关节炎的重要诱因之一。

摘要

背景：目前膝骨关节炎的研究重点多在关节软骨、软骨下骨及滑膜，国内外对动物模型半月板超微结构的研究较少。

目的：在观察半月板白区软骨细胞超微结构及其类型基础上，观察早期骨关节炎动物模型半月板白区细胞超微结构变化，探讨半月板微观结构变化与生理功能改变的关系。

方法：SD大鼠分空白对照组、模型组。模型组通过膝关节腔注射木瓜蛋白酶制作早期骨关节炎动物模型；造模5周后取半月板，电镜制样、定位，观察白区细胞超微结构。实验方案经福建中医药大学动物实验伦理委员会批准。

结果与结论：①空白对照组大鼠半月板白区浅表层细胞多呈梭形，里层细胞多呈类三角形，含有丰富的粗面内质网、线粒体，并见高尔基体等细胞器；细胞周围胶原原纤维主要为有序密集的Ⅱ型胶原原纤维；半月板白区细胞为透明软骨细胞。模型组半月板组织表面粗糙；细胞肿胀，粗面内质网等细胞器减少且肿胀变性，糖原蓄积；细胞核多有变形，异染色质凝集；细胞周围胶原原纤维变得杂乱而稀疏；②结果提示，早期骨关节炎半月板软骨细胞与基质轻度退变，将使细胞合成分泌基质成分的能力降低，半月板生理功能将受到影响。

关键词：半月板；骨关节炎；早期；白区；软骨细胞；超微结构；电镜；鼠

Ultrastructural changes of the white zone cells of the meniscus in a rat model of early osteoarthritis

Liu Xiangxiang[1, 2], Huang Yunmei[1, 3], Chen Wenlie[1, 3], Lin Ruhui[1, 4], Lu Xiaodong[2], Li Zuanfang[1, 4], Xu Yaye[5], Huang Meiya[1, 4], Li Xihai[1, 3]

[1]Academy of Integrative Medicine, [2]College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; [3]National Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology (Cell Structure and Function), Fuzhou 350122, Fujian Province, China; [4]Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; [5]Department of Imaging, The People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Liu Xiangxiang, Master candidate, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China

Corresponding author: Chen Wenlie, Researcher, Master's supervisor, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; National Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology (Cell Structure and Function), Fuzhou 350122, Fujian Province, China

福建中医药大学，[1] 中西医结合研究院，[2] 药学院，福建省福州市 350122；[3] 国家中医药三级科研实验室－中药药理 (细胞结构与功能) 实验室，福建省福州市 350122；[4] 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室，福建省福州市 350122；[5] 福建中医药大学附属人民医院影像科，福建省福州市 350004

第一作者：刘翔翔，男，1997 年生，福建省政和县人，汉族，在读硕士，主要从事中药药理与毒理的研究。

通讯作者：陈文列，研究员，硕士生导师，福建中医药大学中西医结合研究院，福建省福州市 350122；国家中医药三级科研实验室 - 中药药理 (细胞结构与功能) 实验室，福建省福州市 350122

https://orcid.org/0000-0002-4934-6227 (刘翔翔)

基金资助：福建省科技厅科技平台建设项目 (2015Y2001-57)，项目负责人：李西海

引用本文：刘翔翔，黄云梅，陈文列，林如辉，卢小冬，李钻芳，许亚晔，黄美雅，李西海 . 早期骨关节炎模型大鼠半月板白区细胞的超微结构变化 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(8):1237-1242.

Abstract

BACKGROUND: The research focuses of knee osteoarthritis are on mainly articular cartilage, subchondral bone and synovium. There are few studies on the ultrastructure of the meniscus in animal models.

OBJECTIVE: On the basis of observing the ultrastructure and types of chondrocytes in the white zone of the meniscus, to observe the ultrastructural changes of the white zone cells of the meniscus in an animal model of early osteoarthritis, in order to explore the relationship between the microstructural changes and the physiological functional changes in the meniscus.

METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and a model group. Rats in the model group were made into the model of early knee osteoarthritis by intraarticular injection of papain. After 5 weeks, the meniscuses of three rat models in each group were taken, located and observed for the ultrastructure of the white zone cells through a transmission electron microscope. An ethics approval was obtained from the Animal Ethics Committee of Fujian University of Traditional Chinese Medicine.

RESULTS AND CONCLUSION: In the control group, most of cells were fusiform in the superficial layer of meniscus and were triangular-like in the deeper layer. They were rich in rough endoplasmic reticulum and mitochondria, with presence of Golgi and other organelles. Extracellular collagen fibrils were mainly type II collagen fibrils. The cells in the white zone of meniscus were chondrocytes. In the model group, the meniscal surface became rough, the cells were swollen, cytoplasmic organelles were reduced and swollen, glycogen was accumulated, and most of nuclei were abnormal with heterochromatin agglutination. Extracellular collagen fibrils became disordered and sparse. These findings indicate that the mild degeneration of chondrocytes and matrix in the meniscus can reduce the ability of cells to synthesize and secrete matrix components, which may lead to the physiological hypofunction.

Key words: meniscus; osteoarthritis; early; white zone; chondrocyte; ultrastructure; electron microscopy; rat

Funding: *Science and Technology Platform Construction Project of Fujian Science and Technology Department, No. 2015Y2001-57 (to LXH)*

How to cite this article: *LIU XX, HUANG YM, CHEN WL, LIN RH, LU XD, LI ZF, XU YY, HUANG MY, LI XH. Ultrastructural changes of the white zone cells of the meniscus in a rat model of early osteoarthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(8):1237-1242.*

0 引言 Introduction

膝骨关节炎是中老年常见关节疾病，早期对膝骨关节炎研究重点在关节软骨，后来是软骨下骨、滑膜[1-7]。而半月板是膝关节内的纤维软骨板，为半月形，外缘区域厚，内缘区域薄，呈凹窝状，由胶原纤维紧密编织构成，具有很好的弹性和抗压性，能够增强膝关节稳定性，是膝关节的重要组成部分[8]。半月板损伤与膝骨关节炎发生发展是一个紧密联系的过程。半月板损伤可分为退行性病变及撕裂，退变日久在外力作用下会导致撕裂，撕裂也会促进半月板组织发生退变，形成恶性循环，诱发膝骨关节炎发生；膝骨关节炎患者也常并发半月板损伤[9-10]。但目前国内外对半月板超微结构方面研究较少，且研究对象多为临床晚期膝骨关节炎患者或运动损伤导致破裂的半月板标本[11-13]，而相关动物模型研究甚少[14]，对其正常和病变的超微结构不明确。研究半月板超微结构有助于了解膝骨关节炎的病理，并进行针对性治疗，甚至可能对组织工程半月板的开发研究有所帮助。

半月板可依据是否有血管分布简单分为红区、红白区和白区[15]：半月板外缘区域有血管分布，被称为红区，愈合能力较好；红白区分布有少量血管，位于外缘区域与内缘区域之间，有一定的愈合能力；半月板内缘区域无血管分布，被称为白区，由于缺乏血液供给，营养来源于关节滑液[14]，因此损伤后难愈合，易发生退变[9]，是膝骨关节炎的重要诱因之一。因此，文章拟通过观察早期膝骨关节炎模型的半月板白区细胞超微结构变化，以探讨半月板微观结构变化及其与生理功能改变的关系，进而探讨半月板早期退变对早期膝骨关节炎发展的可能影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2018年9月至2019年5月在福建中医药大学中西医结合研究院完成。

1.3 材料 16只健康的雄性成年(6周龄)SPF级SD大鼠，体质量(200±10) g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，动物许可证号：SCXK(沪)2012-0011，在福建中医药大学的SPF级医学实验动物环境设施下适应性喂养1周，许可证号SYXK(闽)2014-0005。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组、造模及鉴定 16只大鼠随机分为空白对照组、模型组，每组8只。空白对照组不做处理；模型组制备大鼠早期膝骨关节炎模型[3, 16-17]：麻醉大鼠，膝关节腔注射4%木瓜蛋白酶0.2 mL，于第1，4，7天分别注射，共3次；并于第2，6天驱赶大鼠使其运动。造模5周后，用小动物核磁成像仪检查大鼠膝关节，模型组关节局部肿胀和早期病变(**图1**)。每组选取3只用于电镜取材观察超微结构病理变化。其余膝关节标本石蜡包埋、石蜡切片4 μm，苏木精-伊红染色光镜观察[3]，关节软骨病理Mankin评分(评分越高说明软骨退变越严重)[18]，用于模型鉴定比较。

实验动物造模过程的相关问题	
造模目的：	观察早期骨关节炎动物模型半月板白区细胞超微结构变化
借鉴已有标准实施动物造模：	参考文献[3，16-17]制备大鼠早期膝骨关节炎模型
动物来源及品系：	雄性SPF级SD大鼠，由福建中医药大学的SPF级医学实验动物中心提供
模型与所研究疾病的关系：	大鼠半月板白区的细胞与人的半月板白区细胞相似[11-13]
造模技术描述：	麻醉大鼠，膝关节腔注射4%木瓜蛋白酶0.2 mL，于第1，4，7天分别注射，共3次；并于第2，6天驱赶大鼠使其运动
造模主要诱导用药：	4%木瓜蛋白酶
动物数量及分组方法：	16只大鼠随机分为空白对照组、模型组，每组8只
造模成功评价指标	造模5周后，用小动物核磁成像仪检查大鼠膝关节、苏木精-伊红染色光镜观察[3]、关节软骨病理Mankin评分[18]
造模后实验观察指标：	大鼠半月板白区超微结构的形态学变化
造模后动物处理：	造模5周后，麻醉大鼠，切取右膝关节半月板
伦理委员会批准：	实验方案经福建中医药大学动物实验伦理委员会批准

1.4.2 取材与制备包埋块 麻醉大鼠，切取右膝关节半月板；

浸入 3% 戊二醛 −15 g/L 多聚甲醛 −0.1 mol/L PBS(pH 7.4) 中，定向修切成长 × 宽 × 厚为 2.5 mm×1 mm×1 mm 的小块，4 ℃固定 4 d；加入等量 11%EDTA-0.1 mol/L PBS(pH 7.4)4 ℃脱钙同时固定 10 d，PBS 漂洗；1% 锇酸溶液中固定 2 h 后漂洗；体积分数 50% 乙醇脱水，体积分数 70% 乙醇 − 饱和醋酸铀 4 ℃过夜后，乙醇 − 丙酮梯度脱水，环氧树脂 618 包埋剂浸透 3 h，定向包埋，35，45，60 ℃分别聚合 24，12，72 h。

1.4.3 光学显微镜观察美蓝 − 天青Ⅱ染色的半薄切片 修整树脂包埋块，用徕卡 RM2265 型半薄切片机切 1.0 μm 半薄切片，美蓝 − 天青Ⅱ染色；光学显微镜 100−1 000 倍视野下观察、拍照半月板白区与红白区组织显微结构。结合苏木精 − 伊红染色通过 Image J 图像处理分析软件定量分析半月板软骨陷窝深染的老化细胞面积 [19]。

1.4.4 透射电镜观察铀 − 铅染色的超薄切片 准确定位半月板白区后，修去红白区，用徕卡 UC6 型超薄切片机切 90 nm 超薄切片；醋酸铀、柠檬酸铅染色；日立 H7650 型透射电镜，观察半月板白区细胞超微结构；用 Image J 图像处理分析软件“Uncalibrated OD”功能定量分析 2 μm×2 μm 面积的细胞外基质胶原原纤维吸收掉的平均吸光度 [19]，并测 1 μm 线段所穿透的胶原原纤维数量及其直径。

1.5 主要观察指标 大鼠半月板白区超微结构的形态学变化。

1.6 统计学分析 数据通过 SPSS 20.0 统计学软件分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较进行 *t* 检验。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠 16 只，分为 2 组，实验过程无脱失，全部进入结果分析。

2.2 早期膝骨关节炎模型鉴定 苏木精 − 伊红染色光镜观察 [3]，模型组可见胫骨与半月板的软骨组织早期病变，半月板深染软骨陷窝细胞增多；关节软骨病理 Mankin 评分，空白对照组为 0.33±0.52，模型组为 4.17±0.76[3]，两组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)，表明大鼠早期膝骨关节炎造模成功，见**图 2**。

2.3 半月板白区组织显微结构观察与软骨陷窝深染的老化细胞面积定量分析 见**表 1**，**图 2**，**3**。

表 1 | 大鼠半月板白区显微结构与软骨陷窝深染的老化细胞面积

Table 1 | **Microstructure of the white zone of the rat meniscus and area of aged cells in cartilage lacuna deeply stained**

指标	空白对照组	模型组
浅表层结构	表面较光滑平整；细胞多为梭形，偶为类圆形，两三层，常单个散在、分布均匀	表面较光滑平整；细胞肿胀，呈扁长形或类圆形，1−3 层
里层结构	细胞比浅表层细胞大，多为近三角形；软骨囊内多为两三个半圆形的同源细胞，少数软骨囊内仅有单个细胞	细胞数量较多、肿胀变形，多为类圆形；软骨囊被极大充盈，多为 2−4 个同源细胞，少见单个细胞；大部分细胞内大面积被染为蓝色
老化细胞面积 ($\bar{x}\pm s$，n=8，μm^2)	43 061±8 403	58 292±6 446

表注：模型组与空白对照组相比，老化细胞面积显著增加，$P < 0.01$

2.4 半月板白区细胞超微结构观察 见**表 2**，**3**，**图 4**，**5**。

表 2 | 大鼠半月板白区浅表层及里层细胞超微结构比较

Table 2 | **Comparison of cellular ultrastructure in the superficial and deeper layers of the white zone of the rat meniscus**

分层	结构	空白对照组	模型组
浅表层	表面	平整，较为光滑	较不平整，多为粗糙
	细胞外形	多呈梭形，少为类圆形，7−11 μm，微绒毛样突起	梭形、类三角形或类圆形，6−14 μm，突起减少
	细胞结构	粗面内质网较丰富，多为扁条状，少扩张成囊状；高尔基体偶见；线粒体较多；糖原颗粒少、散在或少量聚集；细胞核近椭圆形，4−6 μm，核膜较平滑，常染色质为主、均匀	粗面内质网较少，病变肿胀成囊袋状或池状，部分内质网里密度极浅，甚至膜上轻微脱颗粒；线粒体较少，肿胀呈空泡样；糖原局部凝集；细胞核近椭圆形，3−7 μm，核膜较大起伏，异染色质为主、凝集
	胞外基质	胶原原纤维多数为Ⅱ型胶原原纤维，可见横纹，点状或线状而密集、成束排列；极少量直径为 75−85 nm 的Ⅰ型胶原原纤维，横纹明显	胶原原纤维多数为Ⅱ型胶原原纤维，可见横纹，点状或短线状而较稀疏、成束或杂乱排列；极少量直径为 75−85 nm 的Ⅰ型胶原原纤维，横纹明显
里层	细胞外形	类三角形、类圆形，6−15 μm，突起较多	类圆形、类三角形，8−18 μm，突起减少
	细胞结构	粗面内质网丰富，扁条状，部分扩张成囊状；高尔基体可见；线粒体多；糖原颗粒少、局部聚集；偶见脂滴；细胞核近椭圆形，4−7 μm，核膜有起伏，常染色质为主	粗面内质网较少，多为扩张成池状，部分轻微脱颗粒现象；高尔基体偶见；线粒体较少，肿胀呈空泡样；糖原大量，聚集、充盈细胞；可见脂滴；细胞核类多角形，4−7 μm，核膜有起伏，异染色质边集
	胞外基质	胶原原纤维多数为Ⅱ型，可见横纹，点状或短线状，密集；极少量直径为 75−85 nm 的Ⅰ型胶原原纤维，横纹明显	胶原原纤维直径多数为Ⅱ型，可见横纹，点状或短线状，较稀疏、杂乱；极少量直径为 75−85 nm 的Ⅰ型胶原原纤维，横纹明显

表 3 | 大鼠半月板白区浅表层及里层细胞胶原原纤维密度、单位长度分布数量及Ⅱ型胶原原纤维平均直径比较 ($\bar{x}\pm s$)

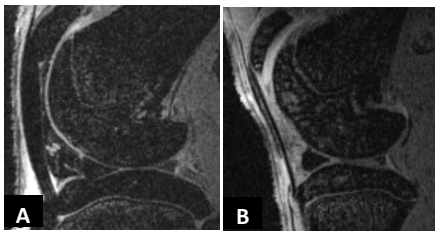
Table 3 | **Comparison of the density of collagen fibrils, the number of distribution per unit length and the average diameter of type II collagen fibrils in the superficial and deeper layers of the white zone of the rat meniscus**

分层结构	观察指标	空白对照组	模型组	P 值
浅表层胞外基质	胶原原纤维密度平均吸光度值 (n=8，%)	85.88±0.96	72.02±3.32	< 0.01
	1 μm 线段穿透胶原原纤维数量 (n=8)	20.63±2.26	17.50±1.60	> 0.05
	Ⅱ型胶原原纤维直径 (空白对照组 n=165；模型组 n=140，nm)	37.83±9.79	40.88±10.34	< 0.01
里层胞外基质	胶原原纤维密度平均吸光度值 (n=8，%)	84.29±1.21[a]	73.39±2.77	< 0.01
	1 μm 线段穿透胶原原纤维数量 (n=8)	16.00±0.93[b]	17.25±1.49	> 0.05
	Ⅱ型胶原原纤维直径 (空白对照组 n=128；模型组 n=138，nm)	47.58±8.96[b]	39.34±8.95	< 0.01

表注：组内与浅表层胞外基质比较，[a]$P < 0.05$；[b]$P < 0.01$

(1) **浅表层胞外基质组间比较**：与空白对照组相比，模型组胶原原纤维的单位面积密度显著下降 ($P < 0.01$)；单位长度分布数量无显著性变化 ($P > 0.05$)；Ⅱ型胶原原纤维平均直径增粗 ($P < 0.01$)。

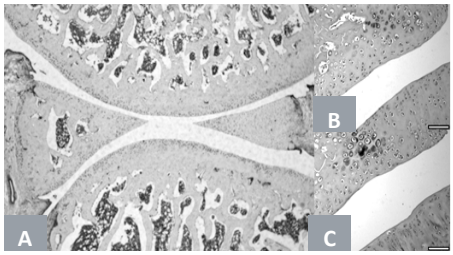
(2) **里层胞外基质组间比较**：与空白对照组相比，模型组胶原原纤维的单位面积密度显著下降 ($P < 0.01$)，单位长度分布数量无显著性变化 ($P > 0.05$)，Ⅱ型胶原原纤维平均直径



图注：图 A 为空白对照组，上为股骨、下为胫骨，中间为半月板前后角；B 为模型组，可见软骨、半月板受损，关节液增多

图 1 | 大鼠膝关节小动物核磁成像

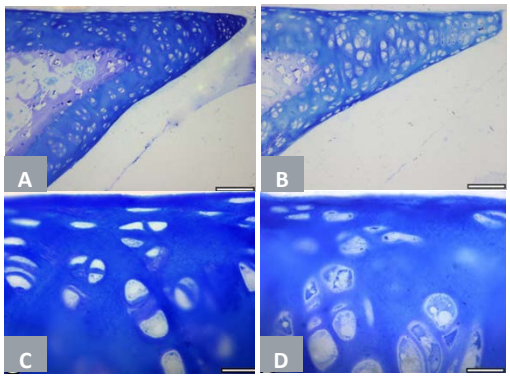
Figure 1 | MRI observation of the knee joint in rats



图注：图 A 为正常大鼠膝关节软骨组织 (×50)，上为股骨、下为胫骨，中间为半月板前后角；B 为空白对照组，左上方为半月板软骨组织，右下方为胫骨平台软骨组织 (×200，标尺 =100 μm)；C 为模型组，可见胫骨与半月板的软骨组织早期病变，如半月板深染软骨陷窝细胞增多 (×200，标尺 =100 μm)

图 2 | 光镜观察大鼠关节软骨显微结构 (苏木精 - 伊红染色)

Figure 2 | Microstructure of the rat articular cartilage under light microscope (hematoxylin-eosin staining)



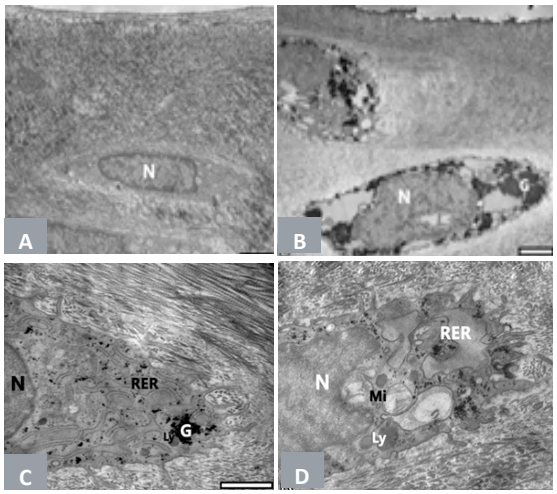
图注：图 A，C 为空白对照组，浅表层细胞多呈梭形，分布均匀；里层细胞为近三角形或半圆形，多为同源细胞群；B，D 为模型组，细胞肿胀明显，且大部分里层细胞内部大面积蓝染

图 3 | 大鼠半月板白区组织显微结构 (美蓝 - 天青 II 染色，A，B：×200，标尺 =100 μm；C，D：×1 000，标尺 =20 μm)

Figure 3 | Microstructure of the white zone of the rat meniscus (methylene blue-azure II staining, A, B: ×200, scale bar=100 μm; C, D: ×1 000, scale bar=20 μm)

变细 ($P < 0.01$)。

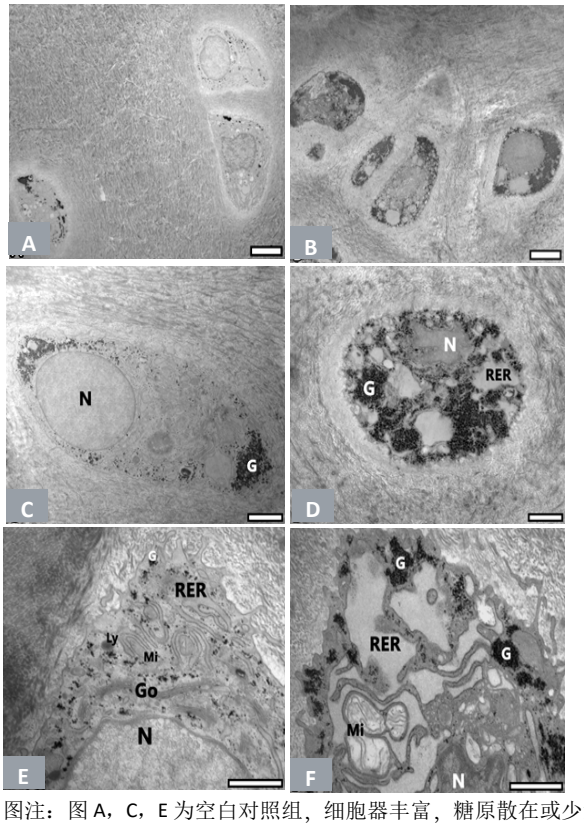
(3) **里层与浅表层组内相比**：空白对照组里层与浅表层相比，胶原原纤维的单位面积密度下降 ($P < 0.05$)，单位长度分布数量减少 ($P < 0.01$)，II 型胶原原纤维的平均直径增粗 ($P < 0.01$)；模型组里层与浅表层相比，胶原原纤维的单位面积密度无显著性变化 ($P > 0.05$)，单位长度分布数量无显著性变化 ($P > 0.05$)，II 型胶原原纤维的平均直径无显著性变化 ($P > 0.05$)。



图注：图 A，C 为空白对照组，组织表面较为光滑，细胞散在，细胞器丰富，粗面内质网多为扁条状；图 B，D 为模型组，可见表面破损，细胞器多有肿胀 (内质网扩张、线粒体肿胀)，细胞核形变。N：细胞核；RER：粗面内质网；Mi：线粒体；Ly：溶酶体；G：糖原

图 4 | 半月板白区浅表层细胞超微结构 (铀 - 铅染色，A，B：×10 000，标尺 =2 μm；C，D：×30 000，标尺 =1 μm)

Figure 4 | Ultrastructure of cells in the superficial layer of the white zone of the rat meniscus (uranium-lead staining, A, B: ×10 000, scale bar=2 μm; C, D: ×30 000, scale bar=1 μm)



图注：图 A，C，E 为空白对照组，细胞器丰富，糖原散在或少量聚集，细胞核以常染色质为主；B，D，F 为模型组，细胞器均发生肿胀，糖原大量聚集充盈细胞，细胞核形变。N：细胞核；RER：粗面内质网；Go：高尔基复合体；Mi：线粒体；Ly：溶酶体；G：糖原

图 5 | 半月板白区里层细胞超微结构 (A，B：×3 000，标尺 =5 μm；C，D：×10 000，标尺 =2 μm；E，F：×30 000，标尺 =1 μm)

Figure 5 | Ultrastructure of cells in the deep layer of the white zone of the rat meniscus (A, B: ×3 000, scale bar=5 μm; C, D: x10 000, scale bar=2 μm; E, F: ×30 000, scale bar=1 μm)

3 讨论 Discussion

3.1 正常大鼠半月板白区的细胞为透明软骨细胞 半月板主要含有这几种细胞，位于白区的软骨样细胞、红区的成纤维细胞与肥大细胞以及红白区的中间型细胞 (难以区分为成纤维细胞或软骨样细胞)[12-13]。由于半月板白区具有软骨样细胞，且胞外基质含Ⅰ型胶原成分 [20]，因此诸多学者对于半月板白区的软骨样细胞有着两种看法，一方认为其为软骨细胞 [12-13]，具有软骨细胞的形态且能合成分泌软骨基质；而另一方认为其为纤维软骨细胞或半月板细胞 [11, 20]，位于半月板上，具有成纤维细胞表型与软骨细胞表型。值得注意的是半月板不同区域取材与定位的准确性，关系到细胞类型判断，如人半月板撕裂手术所取标本，其定位准确与否，将影响细胞类型的判断，故需进一步考证。

大鼠半月板白区的细胞与人的半月板白区细胞相似 [11-13]，但有研究临床标本发现人半月板白区的细胞间胶原原纤维直径 70−80 nm[11]，而大鼠胶原原纤维直径 (37.83±9.79) nm(浅表层)、(47.58±8.96) nm(里层)，在与红白区交界处有见到极少量直径 75−85 nm 的Ⅰ型胶原原纤维。浅表层细胞其细胞质较少，所含有具有合成、分泌蛋白功能的细胞器 (粗面内质网、高尔基体) 总量较少，因而合成细胞外基质成分的能力不强；而里层细胞的细胞质丰富，含有大量细胞器，能合成较多细胞外基质成分。在半月板浅表层常见胶原原纤维呈线状成束排列，即构成半月板的上下表面径向 (俯面观) 排列的胶原纤维；里层胶原原纤维多为短线状、点状聚集，显得粗壮，即构成半月板内环形 (俯面观) 排列的胶原纤维，在机体负重过程中消除半月板上的环向应力，是主要功能纤维 [21]，这些结构均是半月板能够分担膝关节压力、发挥生理功能的重要基础。而胶原原纤维的间隙，可能是作为关节滑液流通的渠道，使得半月板白区组织能够得到营养 [14]。

大鼠半月板白区的细胞 (浅表层、里层) 与关节软骨细胞 (切线层、移行层及放射层) 形态极其相似 [16]，那么其细胞类型是否即为透明软骨细胞呢？有学者发现牛半月板白区胶原约由 60% 的Ⅱ型胶原和 40% 的Ⅰ型胶原组成 [22]。此次实验中在电镜下所见白区细胞外基质胶原原纤维，虽然比关节软骨基质中的Ⅱ型胶原原纤维略粗 [16]，且有看到极少数量Ⅰ型胶原原纤维，但主要还是由Ⅱ型胶原原纤维构成，且细胞形态与软骨细胞相似。而且，HYDE 等 [23] 发现小鼠的半月板白区细胞与关节软骨细胞均能表达Ⅱ型胶原纤维α1基因、合成Ⅱ型胶原。因此， 作者认为大鼠半月板白区的细胞主要为透明软骨细胞，主要能合成Ⅱ型胶原原纤维。

3.2 半月板早期退变与早期膝骨关节炎 膝骨关节炎是一种常见膝关节退变病，其重要特征是蛋白多糖含量减少、软骨组织结构被破坏等 [16, 24]。因此，此次实验通过膝关节腔内注射木瓜蛋白酶降解膝关节软骨基质中的蛋白多糖，模拟早期膝骨关节炎条件下蛋白多糖成分丢失，致使组织发生退变 [16]。

与空白对照组相比，模型组的半月板组织表面被破坏，这可能是由于水解酶及异常增多的炎性因子对组织表面的软骨基质产生破坏；此外，膝骨关节炎关节软骨表面不平整 [16]，也可能导致半月板被异常磨损。模型组大部分细胞突起减少，说明细胞处于较为不利的微环境中；老化细胞所占半月板面积显著增加，这将使软骨细胞老化退变甚至钙化，导致半月板白区发生硬化，致使其柔性与弹性下降，易在应力作用下受损。此外，光镜下可见细胞均有发生肿胀，浅表层细胞分布不均匀，里层细胞内大面积染蓝，电镜观察发现细胞内糖原蓄积，细胞器病理性肿胀、变性、数量减少，细胞核变性等现象，影响细胞的氧化代谢、能量供给与蛋白合成，且细胞外胶原原纤维呈现变疏的趋势，不同区域松散的程度不一，排列略显杂乱 [11]。浅表层胶原原纤维变粗、间隙增多，这可能是软骨表面处于不利环境、异常负荷情况下的一种反应机制 [25-26]，会使软骨表面硬化得以分担更多应力以及具有更多的滑液通道易于营养组织；里层胶原原纤维承受异常外力、受到损伤，胶原原纤维变细、变得疏松，承受力降低 [11, 27]，表明半月板软骨细胞及细胞器发生退变 [15]，合成分泌包括胶原在内基质蛋白的功能受到影响。这与在光镜中见到兔退变半月板胶原纤维粗细不一的现象相吻合 [10]，说明半月板组织结构已经发生退变，胶原承担的微观力学发生变化，脆性将增加，易于发生半月板撕裂 [27]。而半月板是减轻关节软骨磨损、分担膝关节压力的重要结构，一旦半月板的组织结构遭到破坏、生理功能受到影响，会使得半月板进一步磨损、撕裂，甚至撕裂组织碎片的脱落，反而会加重关节内软骨组织的相互磨损 [8-10]，进而加速早期膝骨关节炎发生发展。

此外，可见半月板软骨细胞有增生现象 [16]，并偶见少数初生细胞的状态较为良好，这可能是软骨组织早期损伤时自我修复的一种细胞代偿性现象。与此同时，退变组织细胞内与退变相关基因会异常表达、基质中水解酶及炎症因子增多 [28]，促使退变加重。一旦半月板组织的代偿增生处于弱势，可能导致半月板损伤进一步恶化，使得半月板软骨细胞如同膝骨关节炎关节软骨细胞一样退变加重 [2, 24]。

总之，研究提示半月板软骨细胞与基质的早期损伤，虽发生在微观层面，但因将会与关节软骨相互产生不良影响，若不加以重视预防、干预，可能使膝骨关节炎进一步发展。该实验可为进行中药干预的研究奠定微观结构基础 [29]。

致谢：感谢福建中西医结合研究院骨病研究所刘献祥教授和吴广文副研究员对课题的大力支持！

作者贡献：文章设计为第一作者和通讯作者，全体作者参与实验实施，第一作者撰写文章，通讯作者审校。

经费支持：该文章接受了“福建省科技厅科技平台建设项目(2015Y2001-57)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经福建中医药大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

[1] CHEN SN, HUANG YM, CHEN WL, et al. Protective effects of the Tougu Xiaotong capsule on morphology and osteoprotegerin / nuclear factor-κB ligand expression in rabbits with knee osteoarthritis.Mol Med Rep. 2016;13(1): 419-425.

[2] 冯芳芳 , 林如辉 , 陈文列 , 等 . 透骨消痛颗粒对兔骨关节炎模型作用的超微结构研究 [J]. 中国骨与关节杂志 , 2016,5(2):129-133.

[3] TAN CJ, ZHANG JH, CHEN WL, et al. Inflammatory cytokines via up-regulation of aquaporins deteriorated the pathogenesis of early osteoarthritis. PLoS One.2019;14(8):e0220846.

[4] 黄云梅 , 陈文列 , 刘献祥 , 等 . 透骨消痛颗粒对骨性关节炎影响的组织化学研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志 ,2011,19(1):1-3.

[5] ZHANG JH, CHEN SN, CHEN WL, et al. Ultrastructural change of the subchondral bone increases the severity of cartilage damage in osteoporotic osteoarthritis of the knee in rabbits.Pathol Res Pract. 2018;214(1): 38-43.

[6] WU GW, ZHANG JH, CHEN WL, et al. Tougu Xiaotong capsule exerts a therapeutic effect on knee osteoarthritis by regulating subchondral bone remodeling.Mol Med Rep.2019;19(3):1858-1866.

[7] 吴广文 , 陈俊 , 叶锦霞 , 等 . 透骨消痛胶囊含药血清对膝骨关节炎关节滑膜细胞 uPA 系统及炎性因子的影响 [J]. 中国组织工程研究 , 2015, 19(37):6005-6009.

[8] MICKIEWICZ P, BINKOWSKI M, BURSIG H, et al. Preservation and sterilization methods of the meniscal allografts:literature review.Cell Tissue Bank.2014;15(3):307-317.

[9] WEBER J, KOCH M, ANGELE P, et al. The role of meniscal repair for prevention of early onset of osteoarthritis.J Exp Orthop.2018;5(1): 10.

[10] 李国军 , 李康华 , 朱勇 , 等 . 兔前交叉韧带断裂后外侧半月板的组织学退变 [J]. 中国组织工程研究与临床康复 , 2009,13(20): 3873-3876.

[11] BATTISTELLI M, FAVERO M, BURINI D, et al. Morphological and ultrastructural analysis of normal, injured and osteoarthritic human knee menisci.Eur J Histochem.2019;63(1): 17-23.

[12] GHADIALLY FN, LALONDE JM, WEDGE JH. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. J Anat.1983;136(4):773-791.

[13] 柴本甫 , 汤雪明 . 早期半月板破裂的超微结构变化 [J]. 中华创伤杂志 ,1992,8(2): 89-92,127.

[14] 王松 , 张孟丽 , 沈霖 , 等 . 墨汁注射到不同月龄兔膝关节腔后半月板的电镜及光镜研究 [J]. 四川解剖学杂志 , 2007,15(3): 17-20.

[15] VAQUERO J, FORRIOL F. Meniscus tear surgery and meniscus replacement.Muscles Ligaments Tendons J.2016;6(1):71-89.

[16] 卢小冬 , 林如辉 , 陈文列 , 等 . 透骨消痛胶囊对早期骨关节炎软骨细胞超微结构与软骨基质的影响 [J]. 康复学报 ,2017,27(2): 33-39.

[17] 付长龙 , 林洁 , 赵忠胜 , 等 . 电针抑制 Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 信号通路介导骨关节炎软骨超微结构退变 [J]. 中国组织工程研究 , 2017,21(32): 5134-5139.

[18] MANKIN HJ, DORFMAN H, LIPPIELLO L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.J Bone Joint Surg Am.1971;53(3):523-537.

[19] LONG DE, VILLASANTE TAG, WISE JN, et al. A guide for using NIH Image J for single slice cross-sectional area and composition analysis of the thigh from computed tomography.PloS one.2019;14(2):e0211629

[20] TAN GK, COOPER-WHITE JJ. Interactions of meniscal cells with extracellular matrix molecules: towards the generation of tissue engineered menisci.Cell Adh Migr.2011;5(3): 220-226.

[21] ATAY OA, PEKMEZCI M, DORAL MN, et al. Discoid meniscus: an ultrastructural study with transmission electron microscopy.Am J Sports Med.2007;35(3): 475-478.

[22] SWEIGART MA, ATHANASIOU KA. Toward tissue engineering of the knee meniscus.Tissue Eng.2001;7(2):111-129.

[23] HYDE G, BOOT-HANDFORD RP, WALLIS GA. Col2a1 lineage tracing reveals that the meniscus of the knee joint has a complex cellular origin. J Anat.2008;213(5):531-538.

[24] 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.

[25] 马睿 . 兔胫骨延长对膝关节软骨超微结构的影响 [D]. 天津：天津医科大学 , 2012.

[26] JOSEPH G B, BAUM T, ALIZAI H, et al. Baseline mean and heterogeneity of MR cartilage T2 are associated with morphologic degeneration of cartilage, meniscus, and bone marrow over 3 years-data from the Osteoarthritis Initiative.Osteoarthritis cartilage.2012;20(7):727-735.

[27] PUJOL N, TARDY N, BOISRENOULT P, et al. Magnetic Resonance Imaging is not suitable for interpretation of meniscal status ten years after arthroscopic repair.Int Orthop.2013;37(12):2371-2376.

[28] STONE AV, LOESER RF, VANDERMAN KS, et al. Pro-inflammatory stimulation of meniscus cells increases production of matrix metalloproteinases and additional catabolic factors involved in osteoarthritis pathogenesis. Osteoarthritis Cartilage.2014;22(2): 264-274.

[29] WU GW,HUANG YM,CHEN WL,et al.Tougu Xiaotong capsule exerts a therapeutic effect by improving knee meniscus in the early osteoarthritis rat model.Exp Ther Med.2020;19(6):3641-3649.