

手术诱导大鼠中重度膝骨关节炎模型的建立与评价

孙效容^{1,2}, 苏丹¹, 贵文娟³, 陈玥^{1,2}

(1. 成都合拓创展生物科技有限公司, 成都 610041; 2. 四川大学生物治疗全国重点实验室, 成都 610041; 3. 宁夏医科大学总医院, 银川 750004)

[摘要] **目的** 建立大鼠中重度膝骨关节炎模型, 为中重度膝关节炎发病机制及其防治方法研究奠定基础。**方法** 选用30只雄性SD大鼠, 随机分为3组: 假手术组、模型8周组、模型20周组, 每组各10只。模型8周组和模型20周组大鼠通过手术切断右膝关节前后交叉韧带和内侧副韧带, 去除内外侧半月板, 术后大鼠可自由活动。假手术组大鼠仅切开皮肤, 暴露关节, 不进行手术处理。分别于术后8周和20周进行Micro-CT观察, 分析大鼠股骨骨质疏松情况; 大鼠安乐死后, 对膝关节面进行大体观察, 并采用Pelletier评分表对关节面软骨进行评分。膝关节取材, 进行HE染色和番红O-固绿染色, 观察软骨形态变化, 并使用改良Mankin's评分法对关节面组织病理情况进行评分。通过免疫组织化学染色法检测Ⅱ型胶原和基质金属蛋白酶13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13) 表达情况, 以此反映膝关节软骨的合成分解代谢情况。**结果** 模型8周组和模型20周组大鼠膝关节的关节面软骨破坏严重, Pelletier评分及改良Mankin's评分均明显高于假手术组 (均 $P < 0.01$)。模型20周组大鼠的Pelletier评分及改良Mankin's评分均明显高于模型8周组 ($P < 0.01$)。模型8周组和模型20周组大鼠经Micro-CT观察可见膝关节面不平整, 骨赘形成, 出现骨质疏松的表现; 且模型20周组大鼠的膝关节周围有较多游离体形成。免疫组织化学染色提示模型组大鼠的膝关节组织中MMP13表达量增多, Ⅱ型胶原表达量减少, 提示关节软骨合成分解代谢平衡被破坏。**结论** 通过手术切断大鼠膝关节前后交叉韧带和内侧副韧带并去除内外侧半月板的方法可成功构建中重度膝关节炎大鼠模型, 影像学检查发现膝关节骨赘、骨质疏松及游离体, 病理学观察发现关节软骨减少甚至消失, 而且软骨合成分解代谢平衡破坏。

[关键词] 动物模型; 膝骨关节炎; Micro-CT; 组织病理学; 大鼠

[中图分类号] R684.3; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)06-0597-08



Establishment and Evaluation of a Moderate-to-Severe Knee Osteoarthritis Model in Rats Induced by Surgery

SUN Xiaorong^{1,2}, SU Dan¹, GUI Wenjuan³, CHEN Yue^{1,2}

(1. Chengdu Bio-HT Co., Ltd., Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Correspondence to: CHEN Yue (ORCID: 0000-0002-7051-2365), E-mail: yue.chen@bio-ht.cn

[ABSTRACT] **Objective** To establish a rat model of moderate-to-severe knee osteoarthritis, laying the foundation for studying the pathogenesis of moderate-to-severe knee osteoarthritis and its prevention and treatment methods. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups: a sham surgery group, an 8-week model group, and a 20-week model group, with 10 rats in each group. Rats in the 8-week and 20-week model groups underwent surgery to cut the anterior and posterior cruciate ligaments and medial collateral ligament of the right knee joint, and remove the medial and lateral menisci. After surgery, the rats were allowed to move freely. The rats in the sham surgery group had only skin incisions to expose the joint without any surgical treatment. At 8 and 20 weeks post-surgery, Micro-CT scans were performed to analyze the femoral osteoporosis in the rats. After euthanizing the rats, gross observations of

[基金项目] 四川省科技计划项目“科技型企业高级管理人才”(2021JDRC0061)

[第一作者] 孙效容(1986—), 女, 博士研究生在读, 副研究员, 研究方向: 药物及医疗器械临床前有效性评价。E-mail: xiaorong.sun@bio-ht.cn. ORCID: 0000-0002-1470-854X

[通信作者] 陈玥(1984—), 女, 博士研究生在读, 高级工程师, 研究方向: 药物及医疗器械临床前有效性评价。E-mail: yue.chen@bio-ht.cn. ORCID: 0000-0002-7051-2365

the knee joints were made, and the cartilage of the joint surface was scored using the Pelletier scoring system. The knee joints were collected for hematoxylin and eosin (HE) staining and safranin O-fast green staining to observe changes in cartilage morphology. The modified Mankin's scoring system was used to assess the tissue pathology of the joint surface. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of type II collagen and matrix metalloproteinase 13 (MMP13), reflecting the anabolic and catabolic metabolism of the knee joint cartilage. **Results** The knee joint cartilage in the 8-week and 20-week model groups was severely damaged, with Pelletier and modified Mankin's scores significantly higher than those in the sham surgery group (both $P < 0.01$). The Pelletier and modified Mankin's scores in the 20-week model group were significantly higher than those in the 8-week model group ($P < 0.01$). Micro-CT observations revealed irregular joint surfaces, osteophyte formation, and signs of osteoporosis in both the 8-week and 20-week model groups, with the 20-week model group showing more loose bodies around the knee joints. Immunohistochemical staining showed increased expression of MMP13 and decreased expression of type II collagen in the knee joint tissues of the model groups, indicating that the balance of anabolic and catabolic metabolism in the joint cartilage was disrupted. MMP13 increased while type II collagen decreased. **Conclusion** The surgical method of cutting the anterior and posterior cruciate ligaments and medial collateral ligament and removing the medial and lateral menisci successfully creates a moderate-to-severe knee osteoarthritis model in rats. Imaging examinations reveal osteophytes, osteoporosis, and loose bodies in the knee joints, while pathological observations show a reduction or even disappearance of joint cartilage, with a disruption in the balance of cartilage anabolic and catabolic metabolism.

[Key words] Animal model; Knee osteoarthritis; Micro-CT; Histopathology; Rat

骨关节炎是临床常见的关节退行性疾病^[1],好发于膝、髋等负重关节,表现为关节疼痛、僵硬、活动度受限等^[2],常导致患者生活自理能力和生活质量下降,并造成社会及家庭负担加重^[3]。膝骨关节炎是最常见的一种骨关节炎^[4],多发于50岁以上人群,随着社会人口老龄化加剧和肥胖人群增加,其发病率和患病率均进一步上升^[5]。目前,临床上治疗早期骨关节炎^[6],可通过物理治疗等方式减轻疼痛,维持或增加关节活动度,或选用非甾体抗炎药等药物进行镇痛或抗炎^[7]。对于中重度骨关节炎、关节畸形、药物治疗效果不佳且关节症状严重影响生活质量的患者,符合手术指征的情况下可采取手术方式治疗^[8]。

目前,国内外建立膝骨关节炎动物模型的方法主要分为3种^[9]:外科手术或创伤、关节腔内注射药物、转基因动物自发形成。其中,手术诱导的膝骨关节炎模型病程发展快,关节软骨结构改变明显,常采用Hulth法^[10]、改良Hulth法^[11]、切断前交叉韧带法、半月板切除法等改变膝关节应力,构建膝骨关节炎模型。使用这些方法制作的动物模型可观察到软骨退化、骨减少,严重者可观察到骨赘形成^[12],但罕见文献报道动物模型形成关节游离体、异位骨化等晚期严重骨关节炎表现。

本研究采用切断前后交叉韧带和内侧副韧带、去

除内外侧半月板的方法,建立大鼠膝骨关节炎模型,通过Micro-CT影像学观察大鼠膝关节骨赘、关节游离体等进展,并通过对膝关节大体观察及组织病理学评估软骨磨损破坏情况,以期构建与人类中重度膝骨关节炎在影像学和组织病理学上相似的动物模型,为中重度膝骨关节炎发病机制、药物治疗、手术治疗方式等研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只SPF级雄性SD大鼠,6~8周龄,体重180~200g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。大鼠饲养于成都合拓创展生物科技有限公司[SYXK(J川)2021-0242],饲养环境为12h/12h明暗交替,相对湿度40%~60%,室温20~25℃。本实验方案经成都合拓创展生物科技有限公司伦理委员会批准(审批号2023HNT08R08),所有操作均符合实验动物福利伦理要求。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(批号20221201)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;EDTA脱钙液(慢脱)、多聚甲醛溶液、环保型脱蜡液、HE染色试剂盒、番红O-固绿(骨组织)染液套装、MMP13抗体、牛血清白蛋白、

苏木精染液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、Ⅱ型胶原抗体和DAB显色剂均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；无水乙醇、二甲苯和中性树胶均购自国药集团化学试剂有限公司；注射用青霉素钠（批号43230105）购自山东鲁抗医药股份有限公司；痛立定注射液（Tolfedine 4%，批号9H32860）购自法国Vetoquinol公司。

Quantum GX小动物活体Micro-CT影像系统为美国PerkinElmer公司产品；ABS型呼吸麻醉机购自上海玉研科学仪器有限公司；RM2016病理切片机购自上海徕卡仪器有限公司；PH100生物显微镜购自凤凰光学股份有限公司。

1.3 动物分组及模型制备

30只大鼠适应性饲养1周，随机分为3组：假手术组、模型8周组（造模后饲养8周安乐死）、模型20周组（造模后饲养20周安乐死），每组各10只。大鼠使用2%~4%异氟烷持续吸入麻醉，于右侧后肢膝关节周围进行备皮。对模型8周组和模型20周组大鼠进行韧带及半月板损伤造模操作：大鼠仰卧位置于动物手术台上，常规消毒铺巾，沿膝关节内侧纵向切开约3 cm长的1个切口，切断内侧副韧带；屈曲后肢，外翻髌骨，暴露并切断前后交叉韧带，切除内外侧半月板，通过抽屉试验验证韧带离断情况，然后逐层缝合。术后允许大鼠自由饮水、摄食、活动，不进行患肢固定或运动负荷等操作。假手术组大鼠仅切开皮肤，暴露关节，不损伤韧带及半月板。术前2 h及术后3 d，每只大鼠每天以0.1 mL/kg的剂量肌肉注射托芬那酸以镇痛。术后3 d，每天肌肉注射20万单位青霉素以预防感染。

1.4 Micro-CT检测膝关节

造模后第8周，对假手术组和模型8周组大鼠进行Micro-CT检测；造模后第20周，对假手术组和模型20周组大鼠进行Micro-CT检测。将各组每只大鼠仰卧位放置于Micro-CT检测舱，整个检测过程中持续使用1%~3%异氟烷吸入麻醉以维持大鼠安静状态。Micro-CT参数设置：扫描电流100 μ A，扫描电压80 kV。Micro-CT断层扫描后进行三维图像重建，图像后处理阶段选择X-ray获取膝关节透射影像，通过膝关节CT扫描断层图像、X线透射影像、3D图像来观察膝关节损伤及股骨骨质疏松情况。扫描完成后，使用Calipers软件分析与股骨骨质疏松相关的形态学数据，选取股骨髌上端髌线以上区域100层为感兴趣区域。主要检

测参数包括股骨骨密度（bone mineral density, BMD）、骨体积分数（bone volume fraction, BV/TV）、骨小梁厚度（trabecular thickness, Tb.Th）、骨小梁数目（trabecular number, Tb.N）、骨小梁间隙（trabecular separation, Tb.Sp）。

1.5 解剖大体观察膝关节软骨变化

模型8周组大鼠在术后8周经异氟烷麻醉后安乐死；假手术组和模型20周组大鼠在术后20周经异氟烷麻醉后安乐死。大鼠安乐死后，切开右侧膝关节囊，肉眼大体观察膝关节面变化情况，并采用Pelletier评分法^[13]对膝关节软骨损伤情况进行评价：正常，0分；关节面粗糙，有小的裂隙，1分；关节面糜烂，2分；关节面溃疡形成，软骨缺损达到深层，3分；软骨剥脱，软骨下骨质暴露，4分。

1.6 组织病理学观察

对安乐死大鼠的膝关节进行大体观察后，取股骨髌进行固定，慢速脱钙，常规石蜡包埋，制备4 μ m厚度切片，然后分别进行HE染色以观察膝关节病变情况和组织结构细节，番红O-固绿染色观察膝关节软骨和软骨下的骨组织结构，并对膝关节组织中的Ⅱ型胶原和基质金属蛋白酶13（matrix metalloproteinase 13, MMP13）进行免疫组织化学染色。具体实验步骤均按照各试剂说明书进行；其中，免疫组化染色阳性细胞显示为棕黄色。使用光学显微镜对膝关节病变情况、膝关节软骨合成分解代谢情况进行观察和图像采集，根据HE染色和番红O-固绿染色结果，采用改良Mankin's评分法^[14]对膝关节软骨结构、软骨细胞、基质染色、潮线完整性进行组织病理学评分。

1.7 统计学分析

运用SPSS 26软件进行实验结果的统计学分析。各实验结果数据用平均值 $\pm$ 标准差表示。正态和方差齐的多组间数据比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

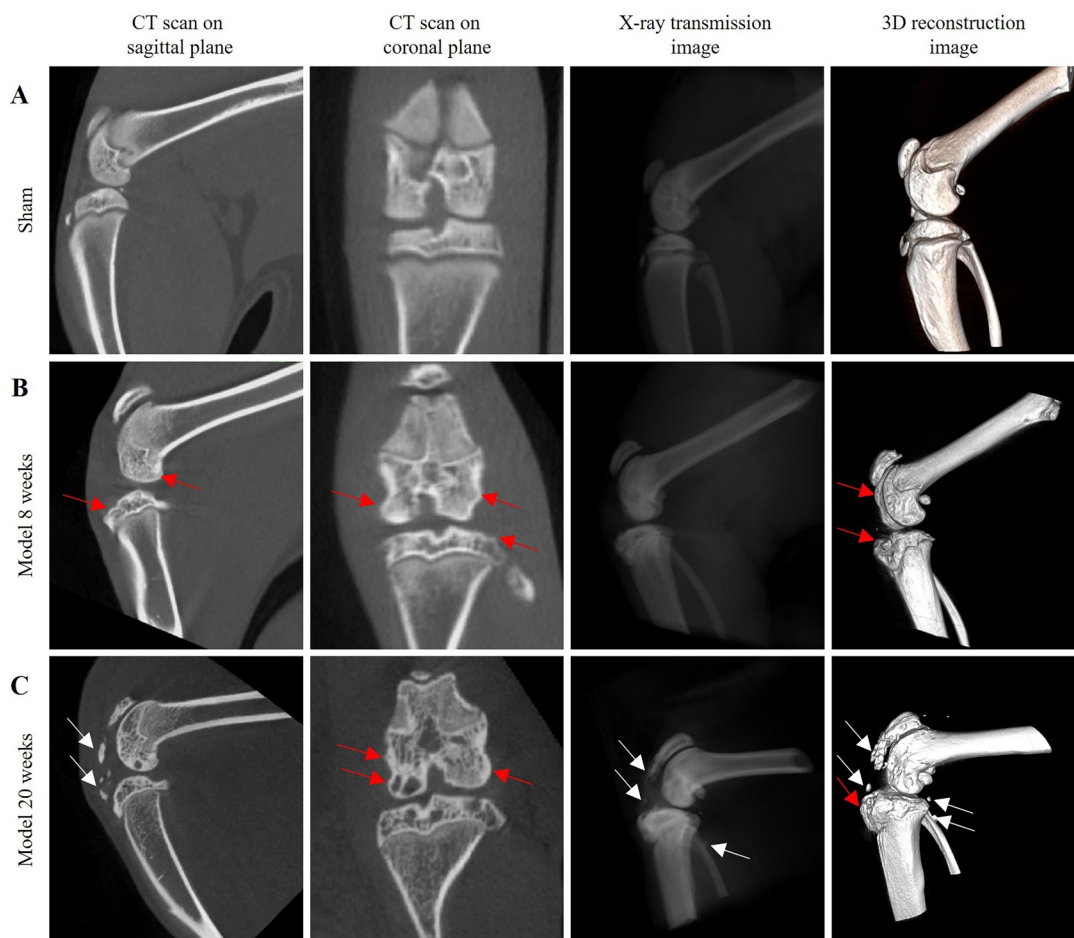
2 结果

2.1 造模术后大鼠出现中重度骨关节炎

各组大鼠膝关节的Micro-CT图像见图1。假手术组大鼠的Micro-CT图像显示膝关节关节面平整，未见骨赘或骨刺等（图1A）；模型8周组大鼠的Micro-CT图像显示膝关节关节面不平整，软骨下骨硬化，多处骨赘形成，并可见骨质疏松情况，表现为骨小梁间隙

变大 (图 1B); 模型 20 周组的 Micro-CT 图像与模型 8 周组相似, 显示大鼠膝关节关节面不平整, 软骨下骨

硬化, 关节间隙变窄, 多处骨赘形成, 且多角度均可见膝关节多处游离体生成 (图 1C)。



注: A, 假手术组膝关节 Micro-CT; B, 模型 8 周组膝关节 Micro-CT; C, 模型 20 周组膝关节 Micro-CT。每一组图像按照从左到右的顺序依次为矢状面 CT 扫描、冠状面 CT 扫描、X 线透射影像、三维重建图像。红色箭头指示骨赘; 白色箭头指示关节游离体。

Note: A, Micro-CT of knee joint in sham surgery group; B, Micro-CT of knee joint in 8-week model group; C, Micro-CT of knee joint in 20-week model group. The sequence of images in each group, from left to right, is as follows: CT scan on sagittal plane, CT scan on coronal plane, X-ray transmission image, and 3D reconstruction image. Red arrows show the osteophytes; White arrows show the joint loose bodies.

图1 各组大鼠膝关节的 Micro-CT 图像

Figure 1 Micro-CT images of knee joint in different groups of rats

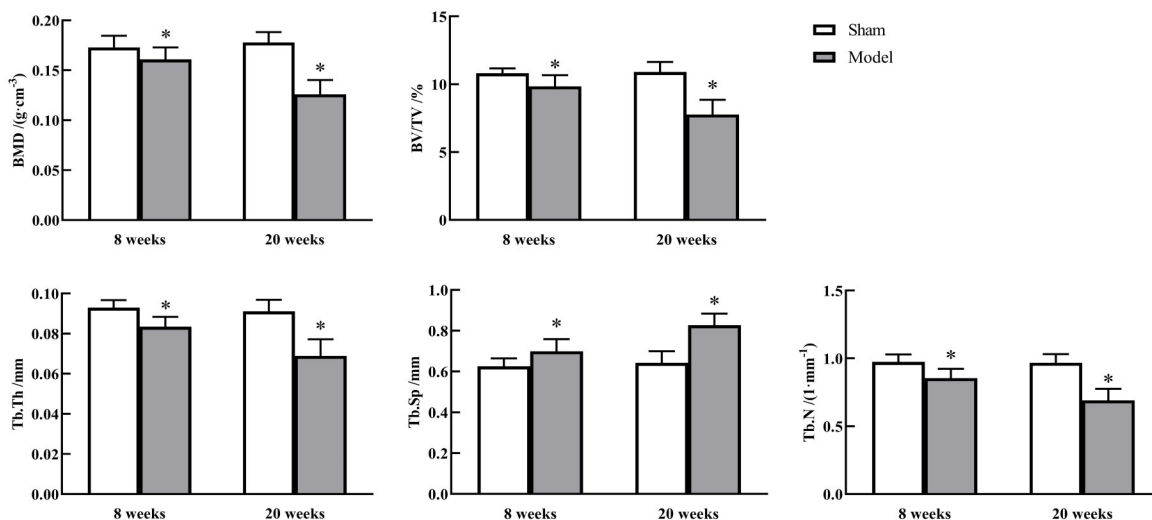
进一步的股骨形态学数据显示: 模型 8 周组大鼠已有明显骨质疏松; 模型 20 周组大鼠的骨质疏松进一步加重 (图 2)。综合 Micro-CT 结果可知, 模型 8 周组和 20 周组大鼠的膝关节均出现了骨重建、骨赘形成和骨质疏松, 模型 20 周组大鼠多处关节还发现游离体形成, 这些都是中重度骨关节炎的表现。

2.2 造模术后大鼠膝关节软骨损伤随时间延长逐渐严重

大鼠的膝关节大体观察显示, 假手术组大鼠膝关节活动度好, 取材后软骨表面光滑无磨损; 模型 8 周

组大鼠膝关节活动度良好; 模型 20 周组大鼠膝关节活动度差, 关节僵硬, 无法维持正常屈伸活动度, 多为屈曲畸形。模型组膝关节取材时, 大鼠肌腱缝合处瘢痕愈合, 膝关节股骨内外髁关节面均异常粗糙, 关节软骨磨损严重, 有骨赘形成。尤其是模型 20 周组的大鼠, 还可触摸到膝关节处骨化硬物。

Pelletier 评分见图 3: 与假手术组相比, 模型 8 周组和模型 20 周组的 Pelletier 评分均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型 8 周组相比, 模型 20 周组的软骨磨损更加严重, 两组间 Pelletier 评分差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

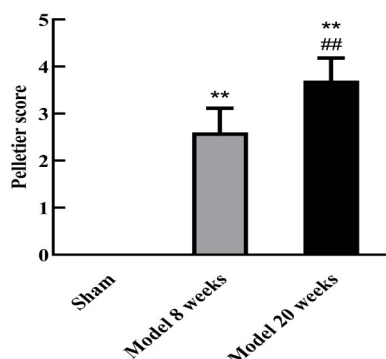


注: BMD, 股骨骨密度; BV/TV, 骨体积分数; Tb.Th, 骨小梁厚度; Tb.Sp, 骨小梁间隙; Tb.N, 骨小梁数目。每组10只大鼠; 与假手术组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: BMD, Bone mineral density; BV/TV, Bone volume fraction; Tb.Th, Trabecular thickness; Tb.Sp, Trabecular separation; Tb.N, Trabecular number. Compared with sham surgery group, * $P < 0.05$; $n = 10$.

图2 各组大鼠股骨 Micro-CT 骨形态学分析

Figure 2 Micro-CT femur morphological analysis in different groups of rats



注: 每组10只大鼠; 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型8周组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham surgery group, ** $P < 0.01$; Compared with 8-week model group, ** $P < 0.01$; $n = 10$.

图3 各组大鼠的膝关节 Pelletier 评分

Figure 3 Pelletier score of the knee joint in different groups of rats

2.3 造模术后大鼠膝关节组织病理学变化加剧

各组大鼠膝关节的 HE 染色结果见图 4A。假手术组大鼠膝关节面光滑平整, 软骨各层结构排列规则, 染色均匀, 可见明显软骨细胞, 潮线完整, 无血管侵入; 模型 8 周组大鼠的膝关节面及软骨层出现破坏, 软骨各层结构紊乱, 软骨细胞数量减少, 基质染色减弱, 软骨下血管入侵潮线, 骨质骨小梁间隙增加; 模型 20 周组大鼠的膝关节进一步破坏, 关节面磨损严重, 软骨细胞进一步减少甚至消失, 软骨正常结构

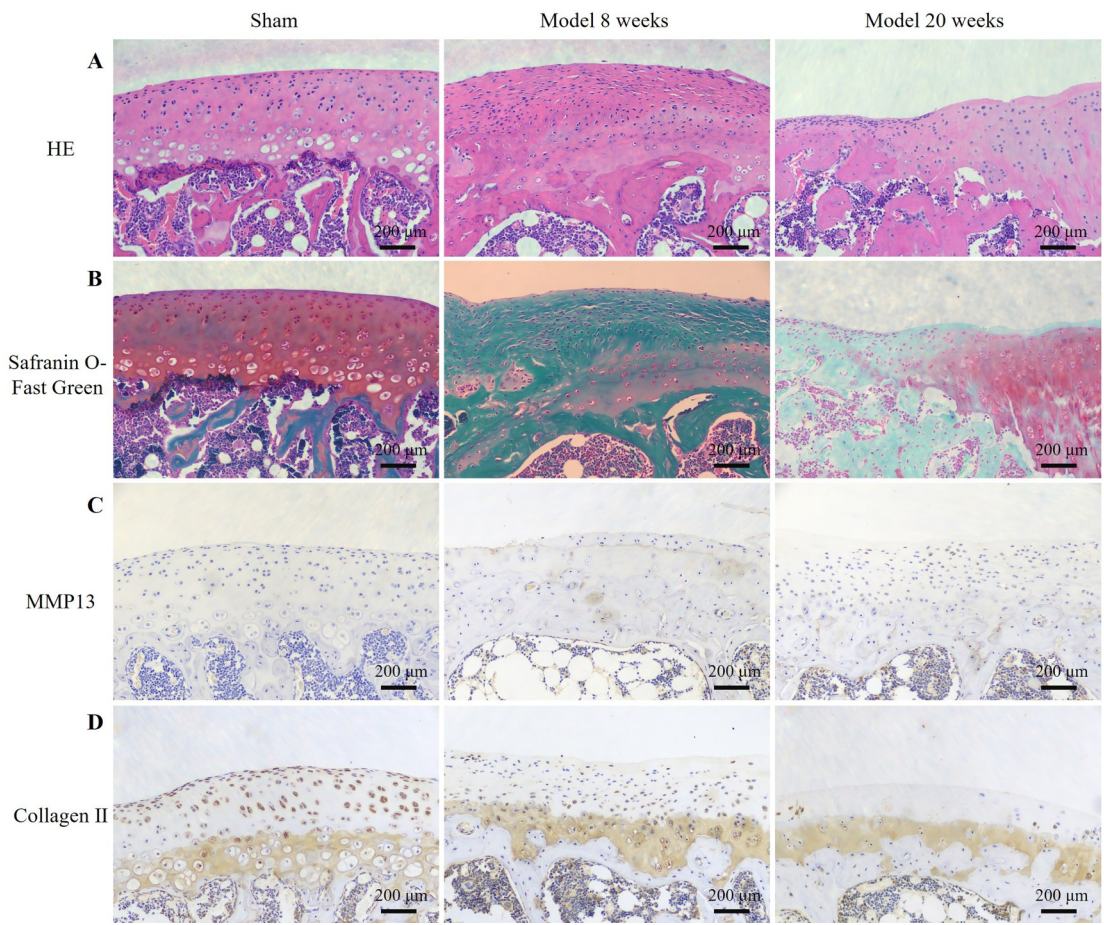
消失。

各组大鼠膝关节的番红 O-固绿染色结果见图 4B, 与 HE 染色结果基本一致。假手术组大鼠软骨基质呈红色, 胶原纤维呈绿色, 潮线清晰规律, 各层结构清晰且染色对比明显; 模型 8 周组大鼠的番红 O 染色减弱, 固绿染色明显且面积增加; 模型 20 周组大鼠的番红 O 和固绿染色均减弱, 软骨细胞进一步减少甚至消失, 各层正常结构消失或严重破坏。

2.4 造模术后大鼠膝关节软骨合成分解代谢失衡

各组大鼠膝关节的免疫组织化学染色结果见图 4C 和图 4D。假手术组大鼠膝关节软骨及软骨下骨中 MMP13 表达水平较低, 偶见细胞表达 MMP13 且染色较浅; 模型 8 周组 MMP13 阳性细胞明显增多, 关节软骨及软骨下骨均可见阳性细胞聚集, 且着色较为明显; 模型 20 周组 MMP13 阳性细胞较多, 着色较重。这提示正常大鼠膝关节中 MMP13 表达水平较低, 制作膝关节炎模型后, 大鼠膝关节软骨及软骨下骨 MMP13 表达水平升高。

假手术组大鼠膝关节中 II 型胶原阳性细胞较多, 着色深, 且在关节软骨和软骨下骨中均大量表达; 模型 8 周组 II 型胶原阳性细胞数量减少, 主要分布于软骨下骨, 关节软骨层可见少量细胞呈阳性且着色浅; 模型 20 周组 II 型胶原表达进一步下降, 阳性细胞主要分布于软骨下骨, 关节软骨层偶见阳性细胞。



注：A，HE 染色（×100）；B，番红 O-固绿染色（×100）；C~D，免疫组织化学染色（×100）。MMP13，基质金属蛋白酶 13；Collagen II，II 型胶原。

Note: A, HE staining (×100); B, Safranin O-Fast Green staining (×100); C-D, Immunohistochemical staining (×100). MMP13, matrix metalloproteinase 13; Collagen II, type II collagen.

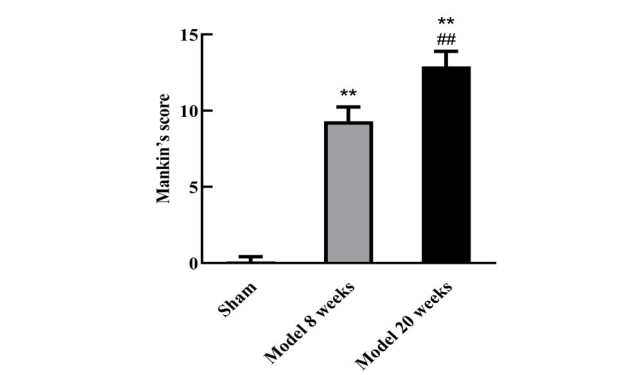
图4 各组大鼠膝关节组织病理学变化
Figure 4 Histopathological changes of the knee joint in different groups of rats

2.5 造模术后大鼠的膝关节病理分期评分

各组大鼠膝关节的改良 Mankin's 评分见图 5。假手术组大鼠膝关节 Mankin's 评分较低，表明关节组织结构保持完整。与假手术组相比，模型 8 周组和模型 20 周组大鼠的 Mankin's 评分均明显升高 ($P < 0.01$)；模型 20 周组与模型 8 周组相比，Mankin's 评分进一步升高 ($P < 0.01$)，提示大鼠膝关节病变更为严重。综上，根据骨关节炎分期标准^[15]，模型 8 周组大鼠为中重度骨关节炎表现，模型 20 周组大鼠为重度骨关节炎表现。

3 讨论

膝关节是人体重要的承重关节，在行走、跑步、弹跳、负重等活动中，膝关节承载的负荷均较大^[16]。临床上，膝关节韧带或半月板损伤的患者，发生膝关



注：每组 10 只大鼠；与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；与模型 8 周组比较，## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham surgery group, ** $P < 0.01$; Compared with 8-week model group, ## $P < 0.01$; $n = 10$.

图5 各组大鼠膝关节 Mankin's 评分
Figure 5 Mankin's score of the knee joint in different groups of rats

关节炎的概率明显增加^[17]。半月板损伤时,股骨髁与胫骨平台直接接触,在行走或运动过程中磨损严重,使生物应力急剧增加^[18]。在膝骨关节炎动物模型研究中,常用Hulth法和改良Hulth法联合卵巢切除、强迫运动或使用老年动物等进行模型制作,以模拟不同状态下膝关节炎的情况。传统Hulth法是通过手术方法完全切断膝关节的前交叉韧带、后交叉韧带及内侧副韧带,并完整切除内侧半月板;改良Hulth法是在传统Hulth法的基础上保留后交叉韧带或内侧副韧带及后交叉韧带,这种方法适于中早期骨关节炎研究。本实验是在传统Hulth法基础上,额外切除内外侧半月板,即手术切断大鼠右膝关节前后交叉韧带和内侧副韧带,并且去除内外侧半月板。术后大鼠自由活动,即通过手术改变膝关节生物应力,破坏关节稳态,从而诱发膝关节退行性变。用这种方法构建的大鼠中重度膝关节炎模型,可以重点关注膝关节中重度损伤情况。

模型8周组大鼠的Micro-CT检测可见关节面不平整,骨赘形成,大体观察关节面粗糙,软骨破坏;组织病理学观察证实软骨破坏明显。模型20周组大鼠的Micro-CT检测除可见骨赘形成、关节间隙变窄、软骨下骨硬化,还观察到大量游离体形成;大体观察其膝关节较模型8周组大鼠的关节面进一步破坏,且可触摸到膝关节内硬化骨物;组织病理学观察可见部分关节面软骨消失。本研究通过手术方法在大鼠中成功建立中重度膝骨关节炎模型,影像学可见骨赘形成及游离体形成,Peletier评分及改良Mankin's评分均可见严重软骨破坏,且膝骨关节炎的严重程度随时间推移进一步加重。

MMP13是MMP家族的重要一员,参与成骨细胞/骨细胞分化、骨形成、骨吸收期间类骨的溶解、破骨细胞的募集和迁移等过程,在生理条件下是骨重塑的耦合因子^[19]。相反,一些导致骨溶解-骨形成不平衡的骨重塑相关的病理改变,主要是由MMP过度表达和细胞外基质异常引起的^[20]。MMP13是一种胶原酶,该家族蛋白参与胚胎发育、组织重塑等正常生理过程,还参与疾病过程中的细胞外基质分解^[21]。MMP13的主要功能除了降解骨关节中的Ⅱ型胶原外,还可以降解软骨中其他类型的胶原如Ⅳ型、Ⅸ型和软骨基质成分蛋白多糖等^[22]。MMP13及其抑制剂(matrix metalloproteinase inhibitors, MMPIS)的失衡是导致Ⅱ型胶原减少的起始因素^[23-24]。本实验中免疫组织化学染色结果显示,假手术组大鼠膝关节的MMP13表达较少,模型组大鼠的MMP13阳性细胞明显增多;假手术

组大鼠的Ⅱ型胶原阳性细胞较多且着色深,而模型组大鼠的Ⅱ型胶原阳性细胞减少。这提示膝骨关节炎造模后,软骨的合成分解代谢平衡被打破。

本实验通过手术损伤韧带及半月板后,除观察到关节活动度减少,骨赘形成、骨质疏松及软骨破坏等膝关节炎表现外,还观察到大鼠膝关节中游离体形成。这与临床膝关节炎患者除影像学改变外,常伴有活动受限的情况一致。后续实验将对动物疼痛程度进行量化测试,使用游泳行为学、转棒行为学等方法测试动物运动能力;同时,进一步检测与疾病发生、发展相关的各类通路或因子,如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、C-X-C型趋化因子受体(C-X-C chemokine receptor, CXCR)等表达情况。后续研究中,还将对该疾病模型进行非甾体抗炎药治疗或物理治疗,以观察现有治疗手段对膝关节炎的作用。

综上所述,本实验通过手术切断前后交叉韧带和内侧副韧带并去除内外侧半月板的方法,成功建立了大鼠中重度膝骨关节炎模型,且发现随时间推移,动物模型的膝关节炎症状明显加重,出现关节游离体等,提示该模型可为中重度膝骨关节炎机制、药物治疗、手术治疗等研究提供一种新的模型思路。

【医学伦理声明 Medical Ethics Statement】

本研究涉及的动物实验均已通过成都拓创展生物科技有限公司动物福利伦理委员会(IACUC)审查批准[审批号:2023IINH08R08]。所有实验过程遵照中国实验动物相关法律条例要求进行,包括《实验动物管理条例》(2017年3月1日)、《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等。All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Chengdu Co., Ltd. (Approval Letter No. 2023IINH08R08). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal—Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

【作者贡献 Author Contribution】

孙效容负责实验方案设计、组织实施、软件处理、论文撰写及修改;

苏丹负责提供资源、实验方案设计、动物实验;

贵文娟负责论文图片整理和制作;

陈玥提供研究经费,负责项目管理、计划审核,以及论文修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] BRUYÈRE O, HONVO G, VERONESE N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2019, 49(3): 337-350. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2019.04.008.
- [2] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRA S. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2019, 393(10182): 1745-1759. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
- [3] DAINESI P, WYNGAERT K V, DE MITS S, et al. Association between knee inflammation and knee pain in patients with knee osteoarthritis: a systematic review[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(4):516-534. DOI: 10.1016/j.joca.2021.12.003.
- [4] WOOLF A D, PFLEGER B. Burden of major musculoskeletal conditions[J]. *Bull World Health Organ*, 2003, 81(9): 646-656. DOI: 10.1590/S0042-96862003000900007.
- [5] SHARMA L. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(1): 51-59. DOI: 10.1056/NEJMc1903768.
- [6] NÜESCH E, DIEPPE P, REICHENBACH S, et al. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study[J]. *BMJ*, 2011, 342: d1165. DOI: 10.1136/bmj.d1165.
- [7] MINTARJO J A, POERWANTO E, TEDYANTO E H. Current non-surgical management of knee osteoarthritis[J]. *Cureus*, 2023, 15(6): e40966. DOI: 10.7759/cureus.40966.
- [8] TSOKANOS A, LIVIERATOU E, BILLIS E, et al. The efficacy of manual therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(7):696. DOI: 10.3390/medicina57070696.
- [9] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(6): 568-578. DOI: 10.1001/jama.2020.22171.
- [10] SELLAM J, COURTIES A, EYMARD F, et al. Recommendations of the French Society of Rheumatology on pharmacological treatment of knee osteoarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2020, 87(6):548-555. DOI: 10.1016/j.jbspin.2020.09.004.
- [11] ATIK O Ş, HANGODY L R, TURAN S. Total versus unicompartmental knee arthroplasty[J]. *Jt Dis Relat Surg*, 2023, 34(2):235-236. DOI: 10.52312/jdrs.2023.57913.
- [12] DOSSETT H G, ARTHUR J R, MAKOVICKA J L, et al. A randomized controlled trial of kinematically and mechanically aligned total knee arthroplasties: long-term follow-up[J]. *J Arthroplasty*, 2023, 38(6S): S209-S214. DOI: 10.1016/j.arth.2023.03.065.
- [13] DREVET S, FAVIER B, BRUN E, et al. Mouse models of osteoarthritis: a summary of models and outcomes assessment[J]. *Comp Med*, 2022, 72(1): 3-13. DOI: 10.30802/AALAS-CM-21-000043.
- [14] ALVES-SIMÕES M. Rodent models of knee osteoarthritis for pain research[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(6):802-814. DOI: 10.1016/j.joca.2022.01.010.
- [15] HULTH A. Does osteoarthrosis depend on growth of the mineralized layer of cartilage?[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1993(287):19-24. DOI: 10.1097/00003086-199302000-00004.
- [16] ZEIGHAMI A, DUMAS R, AISSAOUI R. Knee loading in OA subjects is correlated to flexion and adduction moments and to contact point locations[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8594. DOI: 10.1038/s41598-021-87978-2.
- [17] VAN TUNEN J A, DELL'ISOLA A, JUHL C, et al. Biomechanical factors associated with the development of tibiofemoral knee osteoarthritis: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(6): e011066. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-011066.
- [18] ZHANG K J, LI L, YANG L F, et al. Effect of degenerative and radial tears of the *Meniscus* and resultant meniscectomy on the knee joint: a finite element analysis[J]. *J Orthop Translat*, 2019, 18:20-31. DOI: 10.1016/j.jot.2018.12.004.
- [19] LEEMAN M F, CURRAN S, MURRAY G I. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002, 37(3): 149-166. DOI: 10.1080/10409230290771483.
- [20] FAN A Y, WU G B, WANG J F, et al. Inhibition of fibroblast activation protein ameliorates cartilage matrix degradation and osteoarthritis progression[J]. *Bone Res*, 2023, 11(1):3. DOI: 10.1038/s41413-022-00243-8.
- [21] CHELLINI F, TANI A, PARIGI M, et al. HIF-1 α /MMP-9 axis is required in the early phases of skeletal myoblast differentiation under normoxia condition *in vitro*[J]. *Cells*, 2023, 12(24):2851. DOI: 10.3390/cells12242851.
- [22] GROEN S S, SINKEVICIUTE D, BAY-JENSEN A C, et al. A serological type II collagen neoepitope biomarker reflects cartilage breakdown in patients with osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartil Open*, 2021, 3(4): 100207. DOI: 10.1016/j.oarto.2021.100207.
- [23] HU Q C, ECKER M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1742. DOI: 10.3390/ijms22041742.
- [24] YAO X D, SUN K, YU S N, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*, 2021, 27:33-43. DOI: 10.1016/j.jot.2020.09.006.

(收稿日期: 2024-05-09 修回日期: 2024-10-10)

(本文编辑: 张俊彦, 丁宇菁, 富群华, 周晓铎)

[引用本文]

孙效容, 苏丹, 贵文娟, 等. 手术诱导大鼠中重度膝关节关节炎模型的建立与评价[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(6): 597-604. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.066.

SUN X R, SU D, GUI W J, et al. Establishment and evaluation of a moderate-to-severe knee osteoarthritis model in rats induced by surgery[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(6): 597-604. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.066.