

弗氏完全佐剂致大鼠急性膝关节炎动物模型制备

陈德森 李 莉 吴胜英 彭吉霞 李贤玉

摘 要 **目的** 复制符合临床急性膝关节炎病理生理特征的实验性大鼠急性膝关节炎动物模型。**方法** 30 只大鼠随机分为对照组、醋酸组、佐剂组,分别于第 1、3、7 天经右膝关节腔内注射生理盐水、醋酸及弗氏完全佐剂 0.5 ml/d,并于造模前、造模后 7、14 天分别采用 ELISA 法测定膝关节腔积液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、透明质酸(HA)含量;测量右膝关节及以下部位的体积,并计算各组动物膝关节肿胀百分率。于 14 天处死动物取膝关节滑膜组织做病理学镜检。**结果** 造模后对照组关节无肿胀现象,醋酸组大鼠右膝关节及其周围肿胀,舔足跛行,模型成功率为 80%;佐剂组僵硬肿胀等症状更加明显,模型成功率达 100%,肿胀百分率明显高于醋酸组,造模第 7、14 天关节积液检查显示 IL-1 β 明显升高,HA 含量降低,与造模前及对照组、醋酸组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。佐剂组膝关节病理切片镜检炎性反应明显,关节腔有大量渗液,软骨表面粗糙,滑膜增生、粘连、肥厚,与典型的膝关节炎临床病理学改变相符。**结论** 弗氏完全佐剂可成功建立大鼠急性膝关节炎动物模型且优于醋酸法,更符合临床急性膝关节炎病理生理特征。

关键词 大鼠 膝关节炎 白细胞介素-1 β 透明质酸 膝关节肿胀百分率

中图分类号 Q95-33

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.044

Animal Model Preparation of Rat's Acute Knee Arthritis Induced by Freund's Complete Adjuvant. Chen Desen, Li Li, Wu Shenyang, et al. Laboratory of Medical Functions, Hubei University of Medicine, Hubei 442000, China

Abstract **Objective** To copy the animal model of experimental rats in accordance with clinical acute knee arthritis pathophysiological characteristics. **Methods** Thirty rats were randomly divided into control group, acetic acid group, adjuvant group, respectively. On the first day (d), 3 d, 7 d after the right knee joint cavity injection of saline, acetic acid and Freund's completed adjuvant 0.5 mL/d. Interleukin-1 β (IL-1 β) in knee joint fluid was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and hyaluronic acid (HA) content was measured by biochemistry in 7 and 14 days of postoperation. The volume of right knee joint and below parts was measured and the percentage of swelling of knee joint in each group was calculated. At the 7 of 14th day, the animals were killed, synovial tissue of knee joint were taken and determined by pathology. **Results** After modeling, control group had no joint swelling, Rats in the acetic acid group licked foot and walked with a limp, and their right knee joint and surrounding were swelled. The success rate of the model was 80%. The stiff symptom of swelling in adjuvant group was more obvious and the percentage of swelling was significantly higher than that of acetate group. The success rate of the model was up to 100%. The content of IL-1 β was significantly increased and HA decreased of the model in joint effusion after seven and fourteen days. There were significant differences compared with control group ($P < 0.05$). There was obvious inflammation in the knee joint of the adjuvant group through pathological section microscopy. Articular cavity had a large effusion. Cartilage surface was rough. Synovitis had a phenomenon of proliferation, adhesion and hypertrophy. It was consistent with typical clinical pathology of knee arthritis. **Conclusion** It was better to induce acute knee arthritis rat animal model with Freund's complete adjuvant than acetic acid. It conformed more to the clinical pathophysiological characteristics of acute arthritis of the knee.

Key words Rat; Knee osteoarthritis; Interleukin-1 β ; Hyaluronic acid; Knee joint swelling percentage

急性膝关节炎动物模型是基础药理学及临床疼痛研究较常用的实验模型^[1]。以往常采用醋酸皮下注射法复制急性膝关节炎动物模型,本实验采用弗氏完全佐剂法复制膝关节炎动物模型,其病理形态及病

理生理学改变与临床膝关节炎甚为相似,具有相似度极高的临床及生化检验特点,现就该动物模型制作介绍如下^[2]。

材料与方法

1. 实验动物:SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,雌雄兼用,体质量 180~250 g,由湖北省实验动物研究中心提供[SCXK(鄂)2011-008],饲养于屏障设施[SYXK(鄂)2011-0031]。

2. 药品与试剂:生理盐水、醋酸、弗氏完全佐剂(上海实生细胞生物技术有限公司)。

基金项目:湖北医药学院研究生启动基金资助项目(2008QDJ9)

作者单位:442000 十堰,湖北医药学院机能实验室(陈德森、李莉、彭吉霞),病理生理学教研室(吴胜英、李贤玉)

通讯作者:李贤玉,电子信箱:aboluo67@126.com

3. 急性膝关节炎模型制备:采用数字表法将大鼠随机分为 3 组($n=10$):对照组、醋酸组、佐剂组。碘伏浸泡大鼠右足趾消毒,采用日本鬼头康彦的造模方法,将弗氏完全佐剂 0.5ml 注入右膝关节腔内,于第 1、3、7 天各注射 1 次^[3]。根据临床上超疲劳容易提前出现骨关节炎的发病特点,每日强迫动物活动 30min,14 天后出现以下与临床急性膝关节炎表现一致的症状即可确定大鼠急性膝关节炎模型造模成功:①关节及其周围僵硬、活动受限;②关节出现红、肿、热、痛、同时软组织肿胀或积液;③发病的部位常见于膝、髌、踝等关节处;④关节积液检查出现 IL-1 β 降低,HA 含量明显升高;⑤关节病理切片镜检出现关节腔大量渗出液,软骨表面粗糙,滑膜增生、粘连、肥厚等膝关节炎临床病理学改变。对照组注射等量生理盐水作对照,醋酸组注射 97% 醋酸 0.5ml。注射后创口碘伏浸泡消毒 1 周(每日 1 次)以预防感染。参照文献^[4]于造模后 7、14 天分别抽取膝关节腔积液测定积液白细胞介素-1 β (IL-1 β)、透明质酸(HA)含量。

4. 动物一般状况观察:动物的一般状况观察(包括自洁情况、摄食、饮水量、活动等),存活情况。

5. 膝关节肿胀百分率的测定:于造模前及造模后 7、14 天用玻璃容器排水法测量:先取直径 2cm 的 30ml 量筒注入蒸馏水,液面与量筒最高处平齐,用 10ml 注射器吸取量筒内蒸馏水约 5ml。于每只大鼠右膝关节做一标记,然后把大鼠右足趾缓慢伸入量筒内,使标记与量筒最高处平齐。再用已吸入 5ml 水的注射器向量筒内缓慢注入蒸馏水并使液面再次与最高处及大鼠膝关节标记一致,读取注射器内剩余液体体积,即为大鼠的膝关节体积,重复 3 次取平均值。并计算膝关节肿胀百分率:膝关节肿胀百分率(%)=(造模后容积-造模前容积)/造模前容积 $\times 100\%$ 。

6. 组织形态学检查:14 天后处死大鼠,迅速取各组动物膝关节滑膜标本用 10% 中性甲醛固定,1 周后常规脱水,石蜡包埋,切片经 HE 染色,光镜下观察组织形态。

7. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,指标的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间差异则采用 Dunnett 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠一般情况的变化:对照组造模前及造模后 7、14 天观察,大鼠体毛有光泽,反应敏捷,饮食正常,无死亡。醋酸组大鼠 1 周后精神及自洁情况差,大鼠体毛无光泽,醋酸刺激性太强引起动物剧痛舔足,关节肿胀,卷缩,拒绝活动,摄食及饮水量减少,无死亡,8 只大鼠造模成功,模型成功率为 80%。佐剂组大鼠 1 周后精神及自洁情况较醋酸组稍好,部分大鼠体毛无光泽,关节及其周围僵硬、活动受限,舔足,摄食及饮水量与正常大鼠无明显差别,无死亡,10 只大鼠均造模成功,模型成功率为 100%。

2. 膝关节积液中 IL-1 β 、HA 含量:由表 1 可见,对照组 IL-1 β 、HA 无明显变化;醋酸组在造模后 7 天时测得 IL-1 β 小幅度升高、HA 含量有降低趋势,第 14 天 IL-1 β 明显高于、HA 含量低于对照组($P<0.05$);佐剂组在造模后 7 天时 IL-1 β 即开始明显升高,HA 含量明显降低,第 14 天测得 IL-1 β 升高达峰值、HA 含量大幅降低,与术前及醋酸组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),说明弗氏完全佐剂能在更短时间促使炎性介质 IL-1 β 大量分泌释放,抑制关节保护介质 HA 的分泌,破坏 HA 对关节面的保护屏障而造成膝关节炎性反应。弗氏完全佐剂组生化测定与临床相符度高,表明弗氏完全佐剂能更好的复制急性膝关节炎。

表 1 大鼠造模前及术后膝关节腔内 IL-1 β 及 HA 含量的变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-1 β (ng/ml)			HA (mg/L)		
	造模前	术后 7 天	术后 14 天	造模前	术后 7 天	术后 14 天
对照组	18.32 $\pm$ 0.24	17.91 $\pm$ 0.24	18.23 $\pm$ 0.23	2.01 $\pm$ 0.05	2.07 $\pm$ 0.04	2.07 $\pm$ 0.03
醋酸组	19.19 $\pm$ 0.25	24.94 $\pm$ 0.27	25.54 $\pm$ 0.37 [*]	1.91 $\pm$ 0.01	1.77 $\pm$ 0.05	1.04 $\pm$ 0.02 [*]
佐剂组	20.04 $\pm$ 0.31	34.57 $\pm$ 0.41 ^{*#Δ}	41.47 $\pm$ 0.48 ^{*#Δ}	1.97 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.02 ^{*#Δ}	0.73 $\pm$ 0.01 ^{*#Δ}

与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与造模前比较,[#] $P<0.05$;与醋酸组比较,^Δ $P<0.05$

3. 膝关节肿胀百分率对比情况:对照组在造模后第 7、14 天后关节无肿胀现象;醋酸组及佐剂组膝关节均出现不同程度的肿胀,醋酸组第 7、14 天后关节肿胀百分率分别为 22.07% $\pm$ 0.05%、21.97% $\pm$ 0.24%;佐剂组分别为 36.21% $\pm$ 4.71%、39.34% $\pm$ 3.98%;数据显示佐剂组关节肿胀百分率高于醋酸组,其炎性反应更加明显($P<0.05$),说明弗氏完全佐剂复制急性膝关节炎动物模型更为成功(表 2)。

表 2 大鼠造模前及术后膝关节肿胀百分率(%)对比 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

项目	造模前	术后	
		7 天	14 天
对照组	0.02 $\pm$ 0.00	-0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.01
醋酸组	-0.01 $\pm$ 0.01	22.07 $\pm$ 0.05 [*]	21.97 $\pm$ 0.24 [*]
佐剂组	0.01 $\pm$ 0.00	36.21 $\pm$ 4.71 ^{*#Δ}	39.34 $\pm$ 3.98 ^{*#Δ}

与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与造模前比较,[#] $P<0.05$;与醋酸组比较,^Δ $P<0.05$

4. 膝关节滑膜病理切片组织形态学检查:对照组(图 1A)组织结构正常,无充血、水肿和中性粒细胞浸润。醋酸组(图 1B)滑膜呈现充血、水肿和中性粒细胞浸润。而佐剂组(图 1C)关节软骨表面粗糙,变暗呈灰黄色,并有裂纹、糜烂及溃疡形成;滑膜存在不

同程度增生、粘连;关节液量增多,且呈泡沫状,滑膜血管扩张,血浆和细胞外渗,产生大量渗出液,滑膜肥厚、关节内粘连和淋巴细胞和浆细胞浸润;软骨细胞排列不规则,基质分布不均,表明弗氏完全佐剂致膝关节炎性反应更为明显。

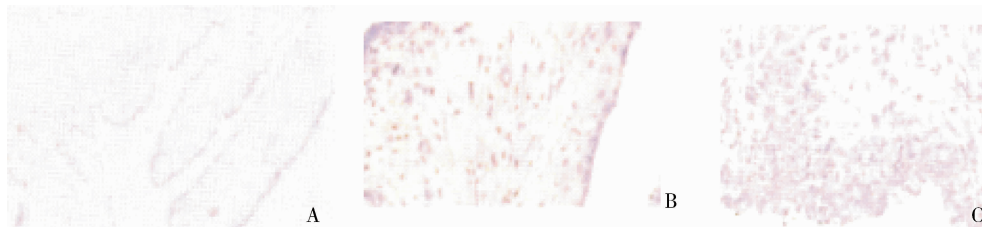


图 1 14 天大鼠膝关节滑膜组织病理形态观察 (HE, $\times 40$)

A. 对照组;B. 醋酸组;C. 佐剂组

讨 论

膝盖滑膜炎又称膝关节滑膜炎,是一种多发性疾病^[5,6]。当膝盖滑膜损伤后,关节腔滑膜血管扩张、充血、水肿及大量中性粒细胞浸润,造成关节肿胀及活动受限^[7]。如不及时处理,会导致滑膜绒毛水肿、结缔组织纤维增生老化,造成滑膜组织再生及修复能力降低,严重者出现滑膜肥厚、关节粘连和软骨变性等病理改变,严重影响患者活动。故对膝关节滑膜炎的早期诊治显得尤为重要。本研究的目的就是为寻找一种病理形态及病理生理学改变与临床膝关节炎高度相似的动物模型用于研究膝关节滑膜炎。

关节炎的病理变化主要为软骨的破坏与变性,以及继发的滑膜与滑液炎性改变,是软骨分解与合成代谢失衡的结果。正常的关节滑液中仅含有微量的 IL-1 β ,但在膝关节炎关节液中 IL-1 β 的含量则异常增高^[8]。IL-1 β 作为重要的炎性介质,具有细胞破坏能力。王庆甫等^[9]证明关节软骨的破坏主要是由 IL-1 β 激发的。HA 是由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖二糖单位有规律重复构成的大分子链状多糖,化学本质为糖胺多糖,广泛分布于人及动物的结缔组织、眼玻璃体和滑液中,是关节滑液和软骨基质的重要组成部分,黏附于关节软骨表面,形成保护屏障,调整滑膜通透性,减低摩擦系数润滑关节腔,营养关节软骨,利于关节软骨修复^[10]。

本研究发现,醋酸组在造模后第 14 天测得 IL-1 β 明显升高、HA 含量降低,说明炎性介质分泌较晚;而弗氏完全佐剂组在造模后 7 天即开始明显升高,HA 含量明显降低,第 14 天测得 IL-1 β 升高达峰值、

HA 含量显著降低,与醋酸组比较差异有统计学意义,说明弗氏完全佐剂能在更短时间内促使炎性介质 IL-1 β 大量分泌,抑制关节保护介质 HA 的分泌,破坏 HA 对关节面的保护屏障而造成膝关节炎性反应。在造模后第 7、14 天时观察发现,醋酸组及弗氏完全佐剂均发生关节肿胀,但弗氏完全佐剂组膝关节炎性反应更明显,第 7、14 天两次测得膝关节肿胀百分率明显大于醋酸组,其模型成功率达 100%,明显优于醋酸组的 80%。

在膝关节滑膜病理切片组织形态学检查中发现,弗氏完全佐剂组病理学改变较醋酸组更为严重,出现典型的膝关节炎临床病理学改变,如关节软骨细胞排列不规则,基质分布不均;关节表面粗糙,伴有裂纹、糜烂及溃疡形成;滑膜存在不同程度增生、粘连;关节腔大量渗出积液并呈泡沫状,滑膜肥厚、关节内粘连和淋巴细胞和浆细胞浸润等病理改变。目前急性膝关节炎动物模型大多采用关节腔注射醋酸法,但其缺点是醋酸刺激性太强,会引起动物剧痛,不太符合实验动物伦理及动物福利规范,且其 IL-1 β 、HA 分泌释放改变比弗氏完全佐剂法出现的晚,病理改变亦不如弗氏完全佐剂典型^[11]。本实验研究证实,大鼠膝关节腔内注射弗氏完全佐剂第 7 天后 IL-1 β 释放即明显升高、HA 显著降低,具有典型的膝关节炎临床病理学改变,且这种病理改变较醋酸组更为明显,模型成功率高,IL-1 β 、HA 分泌改变出现早,动物疼痛幅度低,更符合实验动物伦理及动物福利规范要求,不失为一种较理想可靠的急性膝关节炎动物模型造模方法^[12]。

参考文献

- 1 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社,2000: 464-465

- 2 Gomes RP, Bressan E, Silva TM, *et al.* Effects of one minute and ten minutes of walking activity in rats with arthritis induced by complete Freund's adjuvant on pain and edema symptoms[J]. *Rev Bras Reumatol*, 2014, 54(2): 83-89
- 3 张晓轶, 节晓光, 张雅丽, 等. “CHK”术式对兔膝 OA 中 SOD、MDA 及 NO 水平的影响[J]. *贵州医药*, 2008 32(8): 680-684
- 4 Wang Z, Qiu Y, Lu Ji, *et al.* Connective tissue growth factor promotes interleukin-1 β -mediated synovial inflammation in knee osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(3): 877-882
- 5 赵志华, 李晓杰, 胡书海, 等. 不同表面处理方法对纤维桩与牙本质之间粘接强度的影响[J]. *大连医科大学学报*, 2010, 2(2): 125-129
- 6 黄蔚霞. 药物对痛性关节炎模型 IL-1、IL-6 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2002, 3(6): 124
- 7 钱伯初, 史红, 郑晓亮, 等. 尿酸钠结晶诱导痛风性关节炎动物模型研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(6): 65-67
- 8 国延军, 牟成林. 祛瘀通痹汤对原发性膝骨关节炎白细胞介素-1 β 亚型及前列腺素 E2 含量的影响[J]. *河北中医*, 2010, 32(2): 257-258
- 9 王庆甫, 马玉峰, 殷岳衫, 等. 低频超声促透中药对兔膝关节炎细胞因子的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(2): 108-109
- 10 Bruyere SS. Glucosamine sulphate in the treatment of knee osteoarthritis: cost-effectiveness comparison with paracetamol[J]. *Int J Clin Pract*, 2010, 64(6): 756-762
- 11 张建红, 刘田福, 武东梅, 等. 生物医学研究中的实验动物福利问题[J]. *中国实验动物学杂志*, 2001, 11(1): 62-64
- 12 杨国斌. 生物医学研究中实验动物伦理学问题的思考[J]. *中国医学伦理学*, 2010, 23(3): 10-13

(收稿日期: 2014-11-28)

(修回日期: 2014-12-17)

子宫内膜增生及早期子宫内膜腺癌行孕激素治疗的临床分析

何翊姣 彭俊 彭尔清 周涛

摘要 **目的** 探讨孕激素治疗早期子宫内膜腺癌(endometrial carcinoma, EC)及子宫内膜增生(endometrial hyperplasia, EH)的临床疗效。**方法** 回顾性分析 2009 年 10 月~2013 年 10 月期间于笔者医院确诊的 96 例早期 EC 和 EH 患者的临床资料, 全部患者均口服孕激素治疗, 观察患者在治疗前后月经周期、经期持续时间及子宫内膜厚度等指标的变化; 同时, 对于有生育要求的 51 例患者, 分析服药后患者妊娠率、生育率、药物不良反应以及疾病复发情况。**结果** 与治疗前相比, 口服孕激素能够明显延长月经周期(29.1 ± 2.1 vs 23.4 ± 4.9 d)、缩短经期持续时间(7.2 ± 2.3 vs 15.7 ± 4.1 d)、减少子宫内膜厚度(17.2 ± 1.9 vs 23.7 ± 3.2 mm) ($P < 0.05$); 口服孕激素治疗后 1、2、3 个月患者血浆血红蛋白含量与治疗前相比显著提高(100.4 ± 16.1 、 115.8 ± 18.4 、 129.3 ± 21.2 vs 83.2 ± 14.9 g/L) ($P < 0.05$); 51 例有生育要求的患者治疗后妊娠率为 54.90%, 生育率为 39.22%; 服药后出现肝肾功能异常等毒性不良反应, 复发率为 11.5%。**结论** 治疗早期子宫内膜腺癌或子宫内膜增生, 口服孕激素具有较好的临床疗效、纠正患者贫血状态, 同时能够保持部分患者的生育能力, 但其仍然存在一定的毒性不良反应及复发性, 临床应谨慎使用。

关键词 孕激素 子宫内膜腺癌 子宫内膜增生 保守治疗

中图分类号 R571

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.045

Clinical Analysis of Effect of Progestin on Early Endometrial Carcinoma and Endometrial Hyperplasia. He Yijiao, Peng Jun, Peng Erqing, *et al.* First People's Hospital of Liangshan Prefecture in Sichuan Province, Sichuan 615000, China

Abstract **Objective** To explore the clinical effect of progestin on early endometrial carcinoma (EC) and endometrial hyperplasia (EH). **Methods** Respective analysis of 96 patients who were diagnosed with early EC or EH in our hospital from October 2009 to October 2013 were made. The menstrual cycle, menstrual duration and endometrial thickness between untreated and treated with progestin were compared. The ratio of fertility for 51 patients who were desired to have babies were studied, and side effects and the rate of recurrence of all patients who were treated with progestin were analyzed. **Results** After treated with progestin, the menstrual cycle prolonged (29.1 ± 2.1 vs 23.4 ± 4.9 d), the menstrual duration shortened (7.2 ± 2.3 vs 15.7 ± 4.1 d) and the endometrial thickness decreased significantly (17.2 ± 1.9 vs 23.7 ± 3.2 mm) ($P < 0.05$). After treated with progestin, the content of hemoglobin in the first, second and third month increased significantly compared with control (100.4 ± 16.1 , 115.8 ± 18.4 , 129.3 ± 21.2 vs 83.2 ± 14.9 g/L) ($P < 0.05$),