

引用:裴鑫,刘梦姣,孙巧燕,陶子童,邓婧,王小军,钟欢.木瓜蛋白酶结合运动装置建立兔膝关节创伤性滑膜炎模型的实验研究[J].湖南中医杂志,2022,38(3):171-174.

## 木瓜蛋白酶结合运动装置 建立兔膝关节创伤性滑膜炎模型的实验研究

裴鑫<sup>1</sup>,刘梦姣<sup>1</sup>,孙巧燕<sup>1</sup>,陶子童<sup>1</sup>,邓婧<sup>1</sup>,王小军<sup>2</sup>,钟欢<sup>1,2</sup>

(1. 湖南中医药大学,湖南长沙,410208;

2. 湘西土家族苗族自治州民族中医院,湖南湘西自治州,416000)

**[摘要]** 目的:探讨木瓜蛋白酶联合运动装置建立膝关节创伤性滑膜炎动物模型的方法。方法:将10只新西兰兔随机分为空白组和模型组,每组各5只。从造模实验开始的第1、4、7天将0.1 ml 4%的木瓜蛋白酶水溶液注射于模型组兔的右后肢关节腔内,第8天开始,将模型组麻醉后,将其四肢固定于运动装置上继续造模,共造模7 d。测量兔造模肢膝关节周径变化,并观察其跛行情况。造模结束后,取右后肢膝关节腔积液、滑膜、软骨及周围肌肉,检测白细胞介素-1(IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的水平;观察滑膜、软骨、肌肉的病理组织情况。结果:2组关节周径及膝关节积液,滑膜,肌肉中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );滑膜、软骨、肌肉组织的病理结果显示炎性改变。结论:运动结合木瓜蛋白酶完善了单一使用木瓜蛋白酶建立膝关节创伤性滑膜炎模型的不足,造模成功且效果好。

**[关键词]** 创伤性滑膜炎;膝关节;运动;木瓜蛋白酶;动物模型

**[中图分类号]** R274.967 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.03.041

### Establishment of a rabbit model of traumatic knee synovitis by papain combined with an exercise device: An experimental study

PEI Xin<sup>1</sup>, LIU Mengjiao<sup>1</sup>, SUN Qiaoyan<sup>1</sup>, TAO Zitong<sup>1</sup>, DENG Jing<sup>1</sup>, WANG Xiaojun<sup>2</sup>, ZHONG Huan<sup>1,2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. National Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xiangxi Tujia and Miao Autonomous Prefecture,  
Xiangxi Autonomous Prefecture 416000, Hunan, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the method for establishing an animal model of traumatic knee synovitis by papain combined with an exercise device. Methods: A total of 10 New Zealand rabbits were randomly divided into blank group and model group, with 5 rabbits in each group. On days 1, 4, and 7 after the modeling experiment started, 0.1 ml 4% papain solution was injected into the articular cavity of the right hindlimb, and since day 8, the rabbits in the model group were anesthetized with the limbs fixed on the exercise device for modeling for another 7 days. The change in the circumference of the knee joint for modeling was measured, and the condition of claudication was observed. After modeling, effusion, synovial membrane, cartilage, and surrounding muscles of the knee joint of the right hindlimb were collected to measure the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and observe the pathological changes of synovial membrane, cartilage, and muscle. Results: There were significant differences between the two groups in the circumference of the knee joint and the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the effusion, synovial membrane, and muscle of the knee joint ( $P<0.05$ ). Pathological results of synovial membrane, cartilage, and muscle tissue showed inflammatory change. Conclusion: Exercise combined with papain improves the shortcoming of the model of traumatic

基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202010541024)

第一作者:裴鑫,女,2017级本科生,研究方向:中西医临床医学

通讯作者:钟欢,男,医学博士,讲师,研究方向:针灸推拿学,E-mail:359653775@qq.com

knee synovitis established by papain alone and can successfully establish the model.

[**Keywords**] traumatic synovitis; knee joint; exercise; papain; animal model

膝关节创伤性滑膜炎是由急性创伤性损伤和慢性劳损所致的疾病<sup>[1-2]</sup>,在各个年龄段均可发病,若不及时处理,易发展为慢性滑膜炎,治疗难度更大,患者更加痛苦。本病发病原因主要与膝关节过度使用有关,超负荷使用也会导致关节的退行性改变及关节的损伤。并且在此过程中,除了膝关节本身的病变以外,膝关节周围软组织均有不同程度的损伤<sup>[3-4]</sup>。但是在单一的木瓜蛋白酶建立创伤性滑膜炎模型的文献研究中,并未见对肌肉和软骨相关指标的检测,肌肉和软骨的炎症反应不明确。因此,为了更好地模拟该疾病的发病过程,本研究对常用的单一木瓜蛋白酶建立的膝关节创伤性滑膜炎模型进行了改良。因为骨骼肌的被动牵拉有一定的限度,过度的牵拉会导致肌肉损伤,从而引起软组织的变性、坏死<sup>[5]</sup>,故本研究采用木瓜蛋白酶联合运动装置建立兔膝关节创伤性滑膜炎模型,现将造模结果及评价报告如下。

## 1 实验材料

1.1 动物 选取 SPF 级新西兰雄性大白兔 10 只,体质量 2.2~2.5 kg,由湖南中医药大学动物中心提供,动物许可证编号:SCXK(湘)2020-0005。予普通全价颗粒饲料饲养。本次实验方案已通过湖南中医药大学动物实验福利伦理审查(No. 2020105410)。

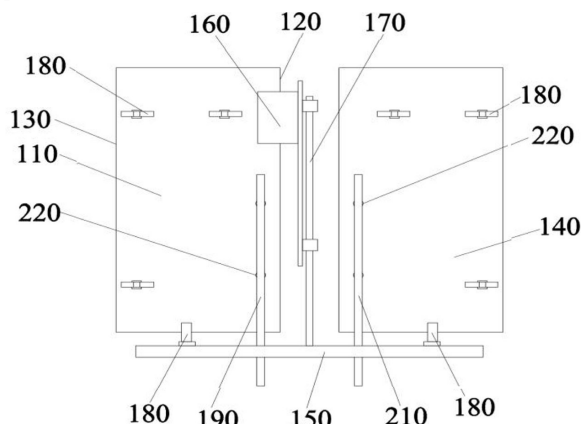
1.2 主要试剂及仪器 木瓜蛋白酶(购自北京索莱宝科技有限公司,批号:9001-73-4);兔白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒(购自江苏菲亚生物科技有限公司,规格:96T,批号:210218007);兔肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒(购自江苏菲亚生物科技有限公司,规格:96T,批号:210218015);大龙 D3024R 全自动生化分析仪(由深圳雷杜生命科技股份有限公司提供);往复机(由东莞寮步圣祥电子科技厂提供)。

## 2 实验方法

2.1 动物分组 将 10 只新西兰大白兔随机分为空白组和模型组,每组各 5 只。

2.2 运动装置 自制膝关节创伤性滑膜炎运动装置,主要由第一承载板(兔台)、锁定组件、驱动元件(往复机)和移动板等构成。(见图 1)

2.3 模型制备 根据孙鲁宁等<sup>[6]</sup>建立的膝关节炎动物模型并加以改良进行造模。在造模开始的第



注:110 为第一承载板,120 为第一侧边,130 为第二侧边,140 为第二承载板,150 为移动板,160 为驱动元件,170 为直线滑台模组的伸缩杆,180 为锁定组件,190 为第一导向杆,210 为第二导向杆,220 为立柱。

图 1 运动装置示意图

1、4、7 天将模型组 5 只新西兰兔右后肢关节备皮、消毒后,以髌骨下端髌韧带外缘为进针点,向关节腔内注入 0.1 ml 4% 的木瓜蛋白酶水溶液。第 8 天开始,使用自制的运动装置继续造模。具体方法如下:1) 采用体积分数为 20% 的乌拉坦水溶液,按照 4 ml/kg 用量<sup>[7]</sup>,通过耳缘静脉缓慢注射对模型组进行麻醉。2) 麻醉完成后,使兔呈仰卧位,将其固定于兔台上(承载板),将右后肢的足部垂直固定于移动板(150)上的锁定组件(180),剩余四肢用锁定组件(180)固定;每台机器固定 2 只实验兔,使移动板保持平衡。3) 固定完成后,调节驱动元件(160)频率为转速 120 次/min,伸缩杆(170)行程为 15 cm,连接电源启动装置,使其连续地被动屈伸 2 h,2 h/次,1 次/d,共造模 7 d。

2.4 标本采集和指标检测 测量 2 组兔的膝关节周径。用记号笔在右后肢膝关节内外髌标记出固定的两点,并每天用游标卡尺进行测量<sup>[8]</sup>。记录 2 组兔的跛行情况。采用积分法表示,共分为 4 个级别:0 分,行为正常;1 分,轻微跛行(跳跃无异常,跳跃时造模肢仅有轻微离地现象);2 分,明显跛行(跳跃缓慢,跳跃时造模肢有较明显离地);3 分,严重跛行(跳跃缓慢,跳跃时造模肢明显离地且身体明显向左侧非造模肢倾斜)。

造模周期结束后第 15 天,使用空气栓塞法处死所有实验兔,于造模肢的膝关节腔内注射

1 ml 0.9%氯化钠注射液,活动关节,使 0.9%氯化钠注射液与关节腔积液(滑液)充分混合后,回抽关节腔积液,立即放入冷冻管保存。提前做好 EP 管和固定液,无菌操作切开发关节腔,取出滑膜组织、软骨及膝关节周围肌肉,均分成两份,一份放入装有多聚甲醛溶液的 EP 管中固定,并于-80℃冰箱内保存,经脱水、包埋等常规操作后,使用自动切片机切片,再染色和封片。处理完成后用光学显微镜观察滑膜组织、软骨、肌肉病理学改变;另一份组织放入空的 EP 管于液氮中固定,然后转移至-80℃冰箱保存,各取相同质量的滑膜组织、软骨及膝关节周围肌肉,分别加入等量的 0.9%氯化钠注射液后匀浆,放入离心机离心,取上清液按照 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  试剂盒检验步骤,采用酶免疫吸附法检测,在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度(A)值。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 统计学软件处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用  $t$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 实验结果

**3.1 关节肉眼观察结果** 造模第 14 天后造模肢关节肿胀明显。关节腔内有大量的关节腔积液,滑膜组织大量增生变厚,滑膜上的毛细血管充血明显。

**3.2 2 组兔膝关节周径、跛行情况比较** 造模后的模型组右后肢膝关节周径明显增大,于造模第 11 天达到峰值。空白组关节周径小于模型组,从造模周期第 8 天开始,2 组周径比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(见图 2)

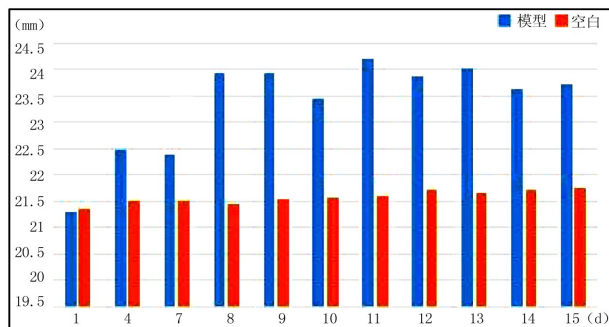


图 2 2 组兔右后肢膝关节周径图

在造模过程中,自第 7 天开始可以观察到模型组的行为学异常。兔跳跃时,造模肢与正常肢相比有跛行现象,造模肢膝关节不能完全伸直。随着造模时间的增加,该现象越明显;空白组无异常。模型组跛行情况:自造模开始的第 7 天,5 只轻微跛行;第 10 天,3 只明显跛行,2 只严重跛行;第 14 天,

1 只明显跛行,4 只严重跛行。

**3.3 2 组膝关节滑膜、软骨、肌肉病理组织比较** 空白组滑膜表面完整,形态结构正常,下层血管无充血(见图 3-1);软骨表面平整,细胞数量、形态正常,辐射区细胞群形态正常(见图 3-2);肌肉肌细胞境界清晰,肌纤维形态结构正常,排列较紧密(见图 3-3)。模型组滑膜细胞增生,细胞层数增多,毛细血管增生,大量炎细胞浸润(见图 3-4);软骨的软骨纤维组织增多,移行区及辐射区细胞减少(见图 3-5);肌肉肌细胞灶性坏死,纤维组织增生,有炎细胞浸润(见图 3-6)。

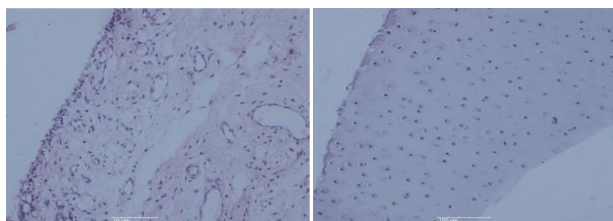


图 3-1 空白组关节滑膜( $\times 100$ ) 图 3-2 空白组关节软骨( $\times 100$ )

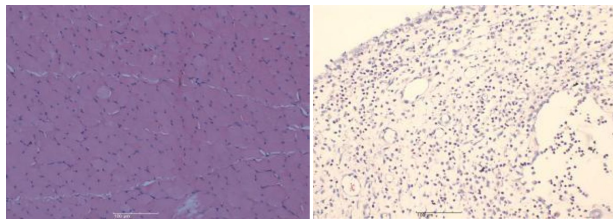


图 3-3 空白组关节周围肌肉( $\times 100$ ) 图 3-4 模型组关节滑膜( $\times 100$ )

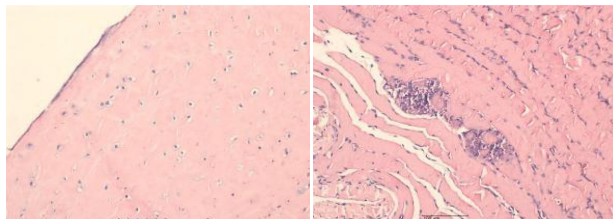


图 3-5 模型组关节软骨( $\times 100$ ) 图 3-6 模型组关节周围肌肉( $\times 100$ )

### 图 3 2 组膝关节滑膜、软骨、肌肉的病理图

**3.4 2 组兔右后肢膝关节积液、滑膜、肌肉中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量比较** 空白组滑膜肉眼观察呈白色,表面光滑有光泽,形态正常;关节腔内有少量滑液,质地较黏稠;软骨表面光滑,为半透明白色,边缘仅有少量的结缔组织附着;肌肉为淡粉色。模型组滑膜大量增生变厚,并与周围组织粘连;关节腔积液明显增多,较正常滑液浑浊;软骨表面有轻微出血点,有糜烂现象,边缘被大量增生的滑膜包围;肌肉颜色变深,偏红。模型组关节腔积液、滑膜、肌肉、软骨组织中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  均较空白组高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。(见表 1)

表 1 2 组兔右后肢膝关节积液、滑膜、肌肉中 TIL-1β、TNF-α 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

| 组别  | 只数 | IL-1β                   |                         |                         |                         | TNF-α                     |                           |                           |                           |
|-----|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|     |    | 积液                      | 滑膜                      | 肌肉                      | 软骨                      | 积液                        | 滑膜                        | 肌肉                        | 软骨                        |
| 空白组 | 5  | 75.03±3.97              | 59.40±4.06              | 30.36±3.42              | 27.37±4.69              | 244.38±11.29              | 199.03±9.78               | 120.63±9.55               | 109.00±12.77              |
| 模型组 | 5  | 97.41±6.05 <sup>a</sup> | 77.32±7.87 <sup>a</sup> | 46.75±7.98 <sup>a</sup> | 49.68±5.36 <sup>a</sup> | 309.62±21.01 <sup>a</sup> | 251.98±24.39 <sup>a</sup> | 167.82±23.37 <sup>a</sup> | 174.82±17.06 <sup>a</sup> |

注:与空白组相比,<sup>a</sup>*P*<0.05。

4 讨 论

对于膝关节创伤性滑膜炎的发病机制尚不完全明确。大多数研究认为急性损伤或慢性劳损是发病的主要因素。损伤的发生发展被认为有 2 种途径:1) 直接对滑膜和膝关节造成损伤,导致滑膜的增生、粘连,引起膝关节腔内积液、积血;2) 可发生级联反应,首先是对关节软骨造成损伤,软骨的降解产物会激活滑膜细胞,促使其释放大炎症因子,进而对软骨造成损伤,形成“滑膜-关节软骨”炎症级联反应,导致持续的滑膜非感染性炎症反应<sup>[9]</sup>。

目前传统的建立创伤性膝关节滑膜炎模型的方法有 Hulth 法<sup>[10]</sup>、针刺建立法<sup>[11]</sup>、注射木瓜蛋白酶建立法<sup>[12]</sup>等。这类方法在实验研究中仍具有一定的局限性:手术方法的造模周期较长;针刺方法造模效果难以把握;单一注射木瓜蛋白酶对于建立滑膜炎模型的效果较好,但该模型缺少了该病主要的始发因素——急、慢性损伤。所以,相较于传统的造模方法,Toshitaka Muto 等<sup>[13]</sup>被动地使大鼠颞下颌关节超负荷运动建立的创伤性滑膜炎模型更符合该病的发展过程。因此,基于 Toshitaka Muto 的研究及创伤性滑膜炎的发病机制,笔者在木瓜蛋白酶的作用下增加了运动装置,使兔膝关节被动地超负荷运动,从而造成膝关节损伤,以此建立膝关节创伤性滑膜炎模型。本实验研究增加的运动装置,通过对膝关节的被动牵拉,模拟了急、慢性劳损的发病原因,完善了该模型的发病过程。

通过将木瓜蛋白酶及运动装置的优势充分结合所建立的膝关节创伤性滑膜炎模型具有造模周期短、创伤小的优势。并且除了常规检测膝关节滑膜组织和关节腔积液的炎症因子外,本实验对软骨和肌肉的各项指标进行了检测,结果显示有明显的炎症反应,说明造模效果好。

从本次实验各检测指标来看,随着模型组兔右后肢膝关节周径的增加、跛行程度的加重,兔右后肢膝关节各层次组织的病理改变,兔右后肢膝关节积液、滑膜、软骨、肌肉组织中炎症因子 IL-1β、TNF-α 均明显增高,均说明模型组炎症反应明显。

因此,木瓜蛋白酶结合运动装置完善了单一使用木瓜蛋白酶建立膝关节创伤性滑膜炎模型的不足,明确了该病损伤的病因,该造模方法成功且效果好。

综上所述,本研究对膝关节创伤性滑膜炎模型的建立方法进行了改良,同时多组织的多检测指标证明该实验所研究的造模方法成功且效果好。

参考文献

[1] 陈百成,王飞,孙然,等. 滑膜炎颗粒治疗急、慢性膝关节滑膜炎的临床疗效观察[J]. 中国骨与关节外科,2014,7(3):226-230.

[2] 何小华,郑晓霞,黄艳妮,等. 兔膝骨性关节炎模型建立的现状[J]. 医学综述,2020,26(3):525-529.

[3] 郎世中. 浅析腕周软组织损伤综合治疗[C]//中国康复医学会疗养康复专业委员会. 中国康复医学会疗养康复专业委员会第二十四届学术会议论文汇编. 广州:中国康复医学会疗养康复专业委员会;中国康复医学会,2014.

[4] 江炜,梁嘉欣,陈艳芬. 软组织损伤动物模型及其评价方法研究进展[J]. 广东药科大学学报,2019,35(6):844-848.

[5] 于长隆,曲绵城,姜泽伟,等. 兔骨骼肌被动牵拉伤的实验病理研究[J]. 中国运动医学杂志,1985(1):1-10,62.

[6] 孙鲁宁,赵燕华,黄桂成,等. 木瓜蛋白酶诱导膝关节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.

[7] 计红,李林林,马莉,等. 3 种麻醉药对家兔麻醉效果的观察[J]. 畜牧与饲料科学,2014,35(5):16-18.

[8] 李慧英,孟东方,苏建光. 四妙散干预兔膝关节创伤性滑膜炎白细胞介素-1β 和肿瘤坏死因子-α 水平的研究[J]. 中华中医药杂志,2013,28(10):3043-3045.

[9] 朱纪阳,吴锦泽,李彬彬,等. 膝关节滑膜炎治疗研究现状[J]. 老年医学与保健,2019,25(6):874-876.

[10] J. N. ROGART, H. J. BARRACH, C. O. CHICHESTER. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 1999, 7(6):539-547.

[11] 易世宏,吴启富,肖长虹,等. 膝关节创伤性滑膜炎模型的建立及评价[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(6):414-416,481.

[12] 张康乐,郭珈宜,刘源,等. 低浓度木瓜蛋白酶诱导兔早期膝关节滑膜炎炎症的时间曲线[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(36):5787-5792.

[13] TOSHITAKA MUTO, JOHJI KAWAKAMI, MASA-AKI KANAZAWA, et al. Development and histologic characteristics of synovitis induced by trauma in the rat temporomandibular joint[J]. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, 1998, 27(6):470-475.

(收稿日期:2021-05-07)