

· 综 述 ·

膝关节僵硬实验动物模型的研究进展

陈科¹, 张鑫², 刘丽珠¹, 廖莹莹¹

(1. 成都体育学院运动医学与健康学院, 四川 成都 610041;

2. 四川省骨科医院, 四川 成都 610041)

摘 要 膝关节僵硬临床较为常见, 可严重影响患者的生活质量。深入研究膝关节僵硬的实验动物模型, 有助于明确膝关节僵硬的发生机制、探索膝关节僵硬的最佳治疗方式。本文对膝关节僵硬实验动物模型的种类、制备方法及检测指标的研究进展进行了综述。

关键词 膝关节; 关节强直; 模型; 动物; 综述

膝关节僵硬临床较为常见, 是膝关节骨折、膝部软组织损伤、膝骨关节炎或膝关节置换术的常见并发症^[1-2]。膝关节僵硬可严重影响患者的日常生活, 降低其生活质量。深入研究膝关节僵硬的实验动物模型, 有助于明确膝关节僵硬的发生机制、探索膝关节僵硬的最佳治疗方式^[3]。目前有关膝关节僵硬实验动物模型的研究较多, 但尚无该模型的统一制备方法及检测指标。为此, 本文对膝关节僵硬实验动物模型的研究进展进行了综述。

1 膝关节僵硬实验动物模型的种类

我们以“膝关节僵硬”“膝关节挛缩”“动物模型”和“traumatic knee contracture”“animal model”“knee stiff”“knee joint stiffness”等为关键词, 从中国知网、万方和 PubMed 数据库中检索了相关文献, 发现多数膝关节僵硬实验动物模型为大鼠(以 SD 大鼠居多)和兔(以新西兰白兔居多), 其次为山羊。

2 膝关节僵硬实验动物模型的制备方法

2.1 屈曲型膝关节僵硬 Salib 等^[4]选择新西兰白兔制备屈曲型膝关节僵硬实验动物模型: 采用吸入异氟醚对新西兰白兔进行全身麻醉; 取膝前正中入路, 由髌旁切开进入关节腔, 离断交叉韧带, 先用直径为 3 mm 的钻头在股骨髁非软骨处钻孔造成骨皮质缺损, 然后将小腿过度伸展破坏关节囊, 最后将膝关节屈曲至 150°, 并用克氏针固定 8 周; 术后采用丁丙诺啡镇痛、头孢唑林抗感染; 取出克氏针时, 清除关节周围的异位骨化组织; 但实验过程中是否出现骨折、感染等情况, 该研究未报道。Baranowski 等^[5]选择大鼠

制备屈曲型膝关节僵硬实验动物模型: 先过伸膝关节破坏关节囊, 然后于大腿外侧和胫骨前内侧切开, 在胫骨干上斜向上方钻一个直径为 1.2 mm 的孔、在股骨外侧髁非软骨处钻一个直径为 2 mm 的孔(这模拟了膝关节周围骨折), 注意避免损伤外侧副韧带, 最后用克氏针穿透胫骨和股骨, 将膝关节固定于屈曲 145°位; 术后 4 周膝关节明显僵硬, 术后 8 周取出内固定物后膝关节活动度未恢复正常; 该研究报道了 3 只大鼠由于麻醉意外或克氏针脱落而被剔除, 但未报道大鼠感染情况。

2.2 伸直型膝关节僵硬 伸直型膝关节僵硬实验动物模型的制备方法主要包括非手术方法和手术方法: 非手术方法操作简单, 对动物的创伤相对较小, 但固定肢体的时间较长; 手术方法的优点是能精准控制膝关节固定角度, 缺点是操作较为复杂、创伤较大、感染风险较高。无论选择何种膝关节僵硬实验动物模型制备方法, 关键在于保持动物模型的稳定性, 即关节功能不会因为时间延长而有较大变化。

2.2.1 非手术方法 张理平等^[6]采用非手术方法制备伸直型膝关节僵硬实验动物模型: 先对兔膝关节进行强力扭转、暴力按摩, 造成膝关节周围软组织损伤, 然后将膝关节固定于伸直位 4 周; 但该研究未报道膝关节骨折等情况。周云等^[7]先对兔进行全身麻醉, 然后将其膝关节置于完全伸直位、踝关节置于跖屈 60°位, 最后用石膏固定; 6 周后膝关节挛缩程度趋于稳定。

2.2.2 手术方法 黄哲元等^[8]选择山羊制备伸直型膝关节僵硬实验动物模型: 先切断山羊髌韧带, 显露股骨远侧干骺端前侧, 然后屈曲膝关节, 显露关节面,

最后用直径为 2 mm 的克氏针将膝关节固定于伸直位,并加用石膏固定;术后 8 周去除石膏及内固定物后,膝关节僵硬程度与术后 4 周相比无明显变化,且术侧膝关节活动度明显小于健侧。

3 膝关节僵硬实验动物模型的检测指标

膝关节僵硬实验动物模型的检测指标大致分为两类:一类为膝关节僵硬的疗效指标,主要反映僵硬膝关节的功能等情况;另一类为膝关节僵硬的病理指标,主要反映僵硬膝关节的细胞等病理变化。

3.1 疗效指标

3.1.1 关节活动度 关节活动度是临床和科研评价关节功能的基本指标之一。临床常将膝关节及其周围肌肉和韧带组织视为一个整体进行活动度测量,动物实验可通过切断膝关节周围的肌肉和韧带组织来观察由关节囊挛缩引起的关节活动受限情况。Trudel 等^[9]对膝关节僵硬模型大鼠不同时间点的肌源性挛缩及关节源性挛缩情况进行了观察,发现关节源性挛缩程度随时间推移而加重、肌源性挛缩程度在膝关节固定 2 周后逐渐减轻。人体关节活动度的测量,多通过受试者的主观感受判定关节活动范围的起止点,而动物关节的活动度则多通过扭矩或力矩等指标反映。Fukui 等^[10]研究发现,新西兰白兔的膝关节最大扭矩为 $0.2 \text{ N} \cdot \text{m}$,当牵拉速度为 $0.4 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时可以将惯性的影响降至最低。Steplewski 等^[11]将角速度设定为 $40(^{\circ}) \cdot \text{min}^{-1}$ 来减小机械惯性对兔膝关节活动度的影响。Trudel 等^[12]研究发现,切断大鼠膝关节周围肌肉、破坏膝关节囊(伸膝超过 0°)后,膝关节的最小力矩为 $1649 \text{ g} \cdot \text{cm}$ 。

3.1.2 关节刚度 关节僵硬是对关节病理状态的主观描述,不能反映僵硬关节的生物力学特性。对关节的僵硬程度有一个定量的描述,有利于评价僵硬关节的生物力学特性。“刚度”是指物体在承受外力时抵抗形变的能力,可通过测量关节刚度定量评价关节的力学情况。根据膝关节屈伸僵硬的特点,可将膝关节视为一个力矩模型,膝关节刚度即膝关节最大活动度时膝关节力矩改变量与膝关节活动度改变量之比^[13]。Salib 等^[4]对新西兰白兔的膝关节刚度进行了测试,关节测试仪的扭矩范围为 $0 \sim 80 \text{ N} \cdot \text{cm}$,以恒定速率逐渐增加扭矩,并测量关节角度的变化,通过软件绘制成扭矩-关节角度线性图,其斜率表示关节刚度。Zhou 等^[3]分别在 $2.5 \text{ N} \cdot \text{cm}$ 、 $7.5 \text{ N} \cdot \text{cm}$ 、

$12.5 \text{ N} \cdot \text{cm}$ 及 $17.5 \text{ N} \cdot \text{cm}$ 的预定扭矩下牵伸大鼠膝关节,预定扭矩的范围根据正常大鼠的膝关节力学测试情况制定, $2.5 \text{ N} \cdot \text{cm}$ 是刚好高于可测量的阻力点的值、 $17.5 \text{ N} \cdot \text{cm}$ 是导致关节超过最大伸展角度(180°)和肌横断术后关节囊破裂的值;当达到预定扭矩时,测试仪停止 2.1 s ,记录关节角度,并制作扭矩-角位移图,最后根据扭矩-角位移回归线的斜率来计算关节刚度;该研究发现,大鼠膝关节制动 4 周时,其制动侧的膝关节刚度大于健侧和对照组大鼠的膝关节刚度。

3.1.3 步态分析 对于膝关节僵硬实验动物模型,可通过步态分析了解其关节僵硬情况。目前,Catwalk 步态分析仪在大鼠的步态分析中较为常用;该仪器主要由玻璃通道、摄像头、压力传感器等组成,大鼠走过玻璃通道时其足印会被通道下方的摄像头拍摄并传送到计算机进行分析;为提高正式实验时采集的数据的有效性,可在正式实验前增加大鼠走过玻璃通道的次数。Catwalk 步态分析仪的分析指标包括静态指标(足印的面积、长度、宽度等)和动态指标(步速、双足站立相的持续时间等),常用步态参数包括步幅、摆动速度、最大接触面积、平均压力、支撑相时长等。田海源^[14]对膝关节僵硬大鼠进行不同时间的静态渐进性牵伸,并通过 Catwalk 步态分析仪对其步态进行分析,结果发现牵伸干预后大鼠的足印面积、足平均压力、步幅、摆动速度等均较牵伸前增加,其中牵伸时间为 30 min 组的足平均压力、步幅和摆动速度优于牵伸时间为 20 min 组和 40 min 组;认为适度牵伸可改善膝关节僵硬大鼠的步态,但过长的牵伸时间、过大的牵伸强度,可能造成二次损伤,反而会影响正常步态。

3.2 病理指标

3.2.1 肌成纤维细胞数量 肌成纤维细胞是一种特殊的成纤维细胞,关节僵硬被认为与肌成纤维细胞的过度增殖有关。庄泽等^[15]研究发现,僵硬关节的肌成纤维细胞中磷酸酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)基因转录水平下降,可引起 PTEN 蛋白表达下降,从而激活了下游磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路,促进了肌成纤维细胞增殖,最终导致关节纤维化。 α -平滑肌肌动蛋白是肌成纤维细胞的特异性标记蛋白,可以通过免疫组织化学法对该蛋白进行染色从而观察肌成纤维细胞的数量。Hildebrand 等^[16]在研究兔膝关节僵硬模型时发

现,与正常膝关节相比,创伤、固定 4 周后的膝关节内肌成纤维细胞数量和肌成纤维细胞占细胞总数的百分比显著增加。

3.2.2 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 表达水平 TGF- β 是一种多功能细胞因子,可调节多种组织的分化、增殖和细胞外基质的生成。哺乳动物的 TGF- β 有 3 种亚型,即 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3,其中 TGF- β 1 是一种普遍存在的纤维化因子,可于组织修复的早期阶段大量释放,在炎症、创伤修复及纤维化过程中起关键作用,被认为是与关节僵硬最相关的因子^[17]。周云等^[7]研究发现,随着兔膝关节固定时间的延长,其关节液及关节囊中 TGF- β 1 水平逐渐增高。Monument 等^[18]研究发现,膝关节僵硬兔的关节囊内 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达水平均高于对照组。

3.2.3 I 型和 III 型胶原含量 I 型和 III 型胶原是形成胶原纤维的主要成分,胶原纤维虽然可以促进伤口愈合,但若过度沉积,则可引起关节纤维化,造成关节僵硬。Sasabe 等^[19]研究发现,与空白对照组相比,观察组大鼠的膝关节在固定 1 周后 I 型胶原含量增加、固定 2 周后 I 型胶原密度增加。Li 等^[20]研究发现,关节僵硬大鼠的滑膜组织中 III 型胶原 mRNA 水平明显高于正常对照组,据此推测滑膜组织胶原代谢异常与骨折后关节僵硬的发生有关。Steplewski 等^[21]采用 IgG 重组抗体变体治疗兔膝关节僵硬,结果发现在治疗 2 周后,与对照组相比,关节僵硬组兔膝关节内 III 型胶原与 I 型胶原含量的比值降低,认为抑制胶原纤维的形成可以缓解关节挛缩程度。

3.2.4 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 表达水平 MMP 主要由巨噬细胞、中性粒细胞及内皮细胞等产生,是一类结构中含有 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的蛋白水解酶^[22]。目前发现的 MMP 根据其作用底物可分为 6 类,即胶原酶、明胶酶、间质溶解素、基质溶解因子、膜型基质金属蛋白酶、其他,其中胶原酶的主要作用底物是纤维类胶原蛋白(即 I 型和 III 型胶原蛋白)、明胶酶的主要作用底物是 IX 型胶原蛋白(参与结缔组织代谢)^[23]。Sun 等^[24]研究发现,与采用慢病毒介导细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 2 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 治疗的关节僵硬治疗组大鼠相比,关节僵硬组大鼠的 MMP-1 和 MMP-13 表达显著增加,

由此认为慢病毒介导 ERK2-siRNA 可在一定程度上减轻创伤后关节囊过度纤维化。

3.2.5 组织形态变化 Chen 等^[25-26]研究发现,僵硬关节的主要病理改变为纤维及滑膜组织增生或局部退变,部分纤维组织可出现增生伴玻璃样变性,滑膜下纤维组织中可见血管增生。Watanabe 等^[27]用石膏将大鼠膝关节固定制备膝关节僵硬模型,并对不同固定时间的膝关节组织形态变化进行了观察:固定 2 周时,可见膝关节周围脂肪组织萎缩;固定 4 周时,可见膝关节软骨与邻近组织粘连;固定 16 周时,可见胫骨和股骨与其临近组织粘连;固定 32 周时,可见膝关节囊纤维化、关节腔变窄、关节及其周围组织僵硬。Salib 等^[4]研究发现,与膝关节腔注射安慰剂组相比,膝关节腔注射塞来昔布可以改善关节僵硬组新西兰白兔膝关节囊内致密纤维结缔组织。

4 小 结

制备一种有效且稳定的膝关节僵硬实验动物模型,对人类认识和防治膝关节僵硬具有重要价值。在所有膝关节僵硬类型中,以伸直型膝关节僵硬最为常见,因此应积极探索该类型动物模型的制备方法及相关检测指标。可用于评价膝关节僵硬的指标较多,除了肌成纤维细胞数量、TGF- β 表达水平、I 型和 III 型胶原含量、MMP 表达水平及组织形态变化外,还包括结缔组织生长因子、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 及纤维连接蛋白表达水平等。

参考文献

- [1] 王金亮. 中药熏洗联合功能锻炼治疗髌骨骨折术后膝关节僵硬的临床疗效[J]. 中国医药指南, 2016, 14(4): 183-184.
- [2] 王强, 宋益民. 几丁糖在骨折手术后膝关节粘连预防中的应用价值研究[J]. 中国医学创新, 2013, 10(33): 44-46.
- [3] ZHOU H, TRUDEL G, GOUDREAU L, et al. Knee joint stiffness following immobilization and remobilization: a study in the rat model[J/OL]. J Biomech, 2020, 99[2021-03-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31718819/>.
- [4] SALIB C G, REINA N, TROUSDALE W H, et al. Inhibition of COX-2 pathway as a potential prophylaxis against arthrofibrogenesis in a rabbit model of joint contracture[J]. J Orthop Res, 2019, 37(12): 2609-2620.
- [5] BARANOWSKI A, SCHLEMMER L, FÖRSTER K, et al. A novel rat model of stable posttraumatic joint stiffness of the knee[J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1): 185.

- [6] 张理平, 刘晓颖, 林绍彬, 等. 创伤性膝关节僵直动物模型的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16(5): 25-27.
- [7] 周云, 王锋, 张全兵, 等. 兔膝关节伸直挛缩模型的建立[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(7): 488-493.
- [8] 黄哲元, 袁志, 卫磊, 等. 山羊膝关节僵直动物模型的建立[J]. 创伤外科杂志, 2010, 12(2): 159-162.
- [9] TRUDEL G, UHTHOFF H K. Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular? An experimental longitudinal study in the rat knee [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2000, 81(1): 6-13.
- [10] FUKUI N, NAKAJIMA K, TASHIRO T, et al. Neutralization of fibroblast growth factor - 2 reduces intraarticular adhesions[J]. Clin Orthop Relat Res, 2001(383): 250-258.
- [11] STEPLEWSKI A, FERTALA J, BEREDJIKLIAN P K, et al. Auxiliary proteins that facilitate formation of collagen - rich deposits in the posterior knee capsule in a rabbit - based joint contracture model [J]. J Orthop Res, 2016, 34(3): 489-501.
- [12] TRUDEL G, ONEILL P A, GOUDREAU L A. A mechanical arthrometer to measure knee joint contracture in rats [J]. IEEE Trans Rehabil Eng, 2000, 8(1): 149-155.
- [13] 鲜龙. 影响僵硬膝关节屈伸刚度的高相关性因素研究[D]. 成都: 成都体育学院, 2018.
- [14] 田海源. 不同时间的静态渐进牵伸对大鼠创伤性膝关节挛缩的影响[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2017.
- [15] 庄泽, 余东杰, 易小友, 等. 同源性能磷酸酶 - 张力蛋白经 PI3K/AKT 通路调控关节纤维化肌成纤维细胞增殖[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(5): 767-772.
- [16] HILDEBRAND K A, ZHANG M, GERMSCHIED N M, et al. Cellular, matrix, and growth factor components of the joint capsule are modified early in the process of posttraumatic contracture formation in a rabbit model [J]. Acta Orthop, 2008, 79(1): 116-125.
- [17] 张全兵. 牵伸联合超短波治疗对兔膝关节挛缩模型中关节功能恢复以及关节囊纤维化影响的初步研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [18] MONUMENT M J, HART D A, BEFUS A D, et al. The mast cell stabilizer ketotifen fumarate lessens contracture severity and myofibroblast hyperplasia: a study of a rabbit model of posttraumatic joint contractures [J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(6): 1468-1477.
- [19] SASABE R, SAKAMOTO J, GOTO K, et al. Effects of joint immobilization on changes in myofibroblasts and collagen in the rat knee contracture model [J]. J Orthop Res, 2017, 35(9): 1998-2006.
- [20] LI F, LIU S, FAN C. Lentivirus-mediated ERK2 siRNA reduces joint capsule fibrosis in a rat model of post-traumatic joint contracture [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 20833-20844.
- [21] STEPLEWSKI A, FERTALA J, BEREDJIKLIAN P K, et al. Blocking collagen fibril formation in injured knees reduces flexion contracture in a rabbit model [J]. J Orthop Res, 2017, 35(5): 1038-1046.
- [22] ZENG G Q, CHEN A B, LI W, et al. High MMP - 1, MMP - 2, and MMP - 9 protein levels in osteoarthritis [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 14811-14822.
- [23] 杨雪娜, 熊咏民. 基质金属蛋白酶在骨关节疾病中的研究进展[J]. 国外医学(医学地理分册), 2019, 40(4): 470-474.
- [24] SUN Y, LI F, FAN C. Effect of pERK2 on extracellular matrix turnover of the fibrotic joint capsule in a post - traumatic joint contracture model [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(2): 547-552.
- [25] CHEN A F, LEE Y S, SEIDL A J, et al. Arthrofibrosis and large joint scarring [J]. Connect Tissue Res, 2019, 60(1): 21-28.
- [26] 王璐, 张立宁, 何家乐, 等. 不同时间的静态进展性牵伸对大鼠创伤性膝关节挛缩的治疗效果及其机制研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(2): 185-192.
- [27] WATANABE M, HOSO M, KOJIMA S, et al. Histopathological changes in joint components in a rat knee joint contracture model following mobilization [J]. Journal of Physical Therapy Science, 2012, 24(11): 1199-1203.

(收稿日期: 2021-04-09 本文编辑: 郭毅曼)

(上接第 33 页)

- [18] SHAHCHERAGHI G H, JAVID M. The natural history of the development of Trevor disease of the hip and subsequent arthroplasty: a case report [J]. JBJS Case Connect, 2017, 7(3): e67.
- [19] VASHISHT S, AGGARWAL P, BHAGAT P, et al. Dysplasia epiphysealis hemimelica (trevor disease) of the patella: a case report [J]. JBJS Case Connect, 2020, 10(3): e2003.
- [20] FETIH T N, OYOUN N A, HASHAD R M. Combined anterior and posterior ankle arthroscopy for dysplasia epiphysealis hemimelica of the ankle in a child: a case report [J]. J Orthop Case Rep, 2019, 9(1): 90-93.
- [21] 胥晓明, 于爱红, 程晓光. 半肢骨骺发育异常的 MRI 诊断价值[J]. 中国临床医学影像杂志, 2016, 27(11): 815-822.

(收稿日期: 2021-02-03 本文编辑: 杨雅)