

末端病动物模型研究进展

袁国庆¹ 刘 强^{2,3}

末端病是运动性疾病之一。14%的高水平运动员患有此病。早期用保守方法治疗,康复时间3—6个月^[1],影响运动员的比赛和职业生涯。保守治疗失败进行手术治疗,包括松解粘连,增加局部循环,治疗成功率不确定,文献研究总体在45%—100%^[2-3]。正常肌腱呈白色,具纤维弹性,张力大于骨,介于5.0—10kN/cm²,可承受较大负荷;而末端病肌腱呈灰色或棕色,柔软脆弱,纤维弹性和张力下降,组织细胞、蛋白多糖和毛细血管均增多^[4]。组织病理学研究表明,其病理过程是肌腱的组织变性,而非之前一度被认为的肌腱组织炎症^[5]。为提高末端病的临床疗效,基础研究正在机制和疗法上寻求突破。

本文采用关键词“tendinitis”或者“tendinosis”或者“tendinopathy”或者“enthesiopathy”^[6]检索Pubmed数据库外文文献7690篇,CNKI数据库中文文献128篇,对末端病动物模型进行概述,对每种模型使用的对象、原理方法、相关的研究结果及其优缺点进行了讨论。希望以此推动末端病动物模型的进一步研发,从而能对末端病的预防和治疗取得更加深入的了解和认识。

1 实验对象

末端病动物模型中,常用的实验对象会根据不同的实验要求,选择包括猴子、马、山羊、狗、兔子、大鼠和小鼠在内的不同动物^[7-14]。Singer DI等^[7]采用6只7—13kg的短尾猴作为实验对象,对屈肌腱2区的重建中血管化和非血管化肌腱移植进行了比较研究。Dahlgren LA等^[8]利用8只2—6周岁之间的正常成年马(雌雄各半),研究类胰岛素生长因子-I对胶原酶干预的马末端病前肢掌屈肌腱的细胞和分子方面愈合作用的影响。Shakibaei等^[9]采用10—11周幼年狗作为造模对象,使用缺乏镁的特种饮食喂养或者使用注射环丙沙星予以干预,研究其末端病跟腱内的相关生化改变。Grandis等^[10]利用6只2—6岁之间,体重约为55kg的成年母山羊作为研究对象,研究了末端病的超声检查与临床定量界定方法。Chang等^[11]利用14只体重平均为3.2kg的雄性新西兰白兔造成跟腱末端病模型,以此对超声造影中时间强度曲线分析应

用进行了研究。Dohnert等^[12]将60只体重为250—300g的雄性Wistar大鼠平均分为三组,研究了将金纳米粒子与双氯芬酸二乙胺由离子电渗疗法作用大鼠末端病跟腱,从而对炎性细胞因子的表达的影响。Palmer等^[13]利用114只体重在20—25g之间,年龄在8—10周之间的Balb-C雄性小鼠跟腱末端病模型,探讨了末端病跟腱的术后固定与动员两种治疗方式在生物力学特性方面的长期影响。以上所使用的实验动物中,猴子肌腱在解剖学和形态学上,都与人类最接近,但是它的高昂花费导致猴子不可能广泛地被应用到末端病动物实验研究中;而像马、山羊、狗这样的大型动物,自身就可以自然产生末端病,例如赛马^[14],但是因为这些实验动物较大的体型,实验的人力物力投入也会相应的加大。目前末端病动物实验研究中使用最广泛的动物是兔子、大鼠和小鼠,无论是在人力物力的投入上,还是实验的操作上,都较其他实验动物经济,简易方便。

2 造模原理方法与结果

2.1 化学物质干预

2.1.1 胶原酶干预:末端病是一种退行性疾病,涉及肌腱内胶原的破裂,因此研究人员将细菌胶原酶注射到实验对象肌腱内,从而诱导胶原恶化破裂,进而引起肌腱损伤,形成末端病。Foland^[15]是第一个利用此原理使用胶原酶影响马肌腱的研究人员,他先限制8匹实验马3周的活动,之后每天分别向每匹马的前肢掌屈肌腱的中间部位注射4000U的胶原酶,持续12周,生化检验结果均显示肌腱产生了退行性病变,包括肌腱内细胞数量的增多,细胞更圆润丰满,成纤维细胞的新陈代谢更活跃,胶原组织的分裂,以及血管组织的增加。Lui等^[16]进行了类似的实验,他们利用鼠的髌肌腱发现了相同的效果,然而他们用更长的时间观察肌腱,并确认肌腱在注射胶原酶32周之后痊愈。因此,胶原酶干预模型还需进一步研究,以明确其内在的破坏与修复机制和注射后最佳的末端病形成时间范围。

2.1.2 细胞因子干预:由于末端病可能引起肌腱组织的恶化,产生炎症,因此有学者通过注射细胞因子白细胞介素

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.02.024

1 沈阳体育学院研究生部,沈阳,110102; 2 沈阳体育学院运动人体科学学院; 3 通讯作者
作者简介:袁国庆,男,硕士研究生; 收稿日期:2013-10-07

(IL)、转化因子- β (TGF- β)、生长因子(GF)等诱发炎症反应,从而造成末端病。Stone等^[17]将40只新西兰白兔随机分为4周注射组和16周注射组,在超声引导下穿刺,将自制备特异性细胞因子注射到白兔左侧髌腱的中间部位,同时在右侧髌腱内注射0.025ml的生理盐水作为对照,注射后将白兔放回笼内活动。4周时,组织学检查显示细胞内容丰富,16周时又下降到正常,但力学分析发现,肌腱的极限负荷显著降低。然而细胞因子注射未造成胶原基质损害与降低,仅引起了可逆的轻微腱损伤。因此细胞因子注射造模不具有较高严谨性,最为主要的是没有观察到明显的肌腱组织病理学变化。

2.1.3 前列腺素干预:基础研究表明训练等持续负荷会导致肌腱周围的前列腺素水平升高。Khan等^[18]将体重为4.3—5.7kg的10只骨骼发育成熟新西兰白兔随机分成两组,向两组白兔的髌腱中间部位注射不同剂量的前列腺素E-2(PGE-2),每周1次,持续4周,剂量分别为50ng与500ng。每只兔子的对侧髌腱则采用三种不同对照控制方案,即不进行任何处理,注射生理盐水以及仅仅进行针刺处理。结果发现两种剂量(50ng/500ng)均引起肌腱细胞密度增加,胶原基质的混乱与恶化,胶原纤维直径减小,同时500ng高剂量注射组引起的恶化程度较50ng低剂量组的要大。因此,反复地注射PGE-2会导致肌腱的退行性改变。Ferry等^[19]将40只体重为350—500g的SD雌性大鼠随机分为4组,即仅作针刺处理的对照组,生理盐水注射组,4周800ng PGE-2注射组,8周800ng PGE-2注射组,每周注射1次,均注射大鼠双后肢髌腱中间部位。结果显示,4周和8周PGE-2注射组的大鼠髌腱极限荷载都优于控制组和生理盐水注射组,并且动物的活动表现评分方面,胶原含量、平均胶原纤维直径均无显著性差异。以往一直认为PGE-2注射是动物末端病造模的一种较好诱导剂,但是这一研究发现PGE-2对于末端病髌腱具有一定的康复作用。对比以上两种截然不同的研究结果,可能的原因或许在于造模动物不同、PGE-2剂量不同、注射周期不同等等原因,这些因素还需进一步的研究明确。

2.1.4 喹诺酮类抗菌剂干预:Kato等^[20]将150只平均体重为97.5g的四周龄SD雄性大鼠随机分为两大组,对照组与两周的重复喂药组。实验组再被随机分为15组,其中喂药情况如下:低剂量(300mg/kg)氧氟沙星(OFLX),增加环孢菌素A(CsA)的OFLX,增加氢化可的松(HC)的培氟沙星(PFLX),高剂量(900mg/kg)OFLX,增加CsA或者HC的PFLX,其他6组如同以上喂养OFLX一样,分别喂养不同剂量和组合的PFLX,最后3组则分别单独口服CsA,HC以及赋形剂。每日1次,持续2周,最后处死所有大鼠,取大鼠跟腱组织进行组织病理学检查分析。结果发现口服OFLX与PFLX组的大鼠均出现炎性细胞侵入跟腱内鞘,引起胶原纤维束的混乱,成

纤维细胞核破碎并开始死亡的情况。Kashida^[21]与Kato采用同样的实验方法进一步比较研究了10种不同的喹诺酮类药物对肌腱的影响,并发现100mg/kg剂量的PFLX或OFLX表现为较大毒性,其他喹诺酮类药物却只有低毒性,并且只在300mg/kg或者900mg/kg时引起毒性反应,同时诺氟沙星、环丙沙星以及多氟啉酸甚至到900mg/kg时都不产生毒性反应。因此,选择喹诺酮类抗菌剂干预产生末端病模型试验中,对喹诺酮类药物的选择至关重要,同时对药物的量效关系需要进一步优化和筛选。

2.2 物理干预

2.2.1 被动牵拉干预:Backham等^[22]将13只新西兰白兔的一只腿的踝关节固定于踢机上,使得其踝关节在机器带动下做150°/min的屈曲和伸展运动,持续运动2h,每周3次,共持续5—6周,对侧腿作为对照,以此刺激白兔的跟腱。3周后,光镜检查显示肌腱退行性变化,毛细血管数目增多,炎性细胞浸润,水肿和纤维化,6周后的变化更明显。然而,无刺激腿也发生了同样的变化。于长隆等^[23]将33只成年兔,体重在2kg以上,性别不论,随机分为对照组(5只)和实验组(28只)。其中实验组28只兔的左下肢作为单纯捆绑组,右下肢用作牵拉加捆绑组。每日捆绑1.5h,按连续捆绑天数的不同,分为捆绑2周和4周组,每组14只。其中捆绑天数一到立即宰杀取材各5只,休息4周后取材各5只,休息8周后取材各4只。牵拉加捆绑组的28只兔右下肢被捆绑后仰卧台上,右下肢在足跖骨前部绑一绳索,向前与自制特殊装置相连接,向后经滑轮坠一沙袋。沙袋重量为兔子体重1/3,马达运转使兔足反复从趾屈突然背伸,从而使跟腱末端区受到急剧的被动牵拉。每分钟牵拉72次,每日牵拉1.5h,每日牵拉6480次。按连续牵拉天数不同,分为牵拉2周和4周组,每组14只。结果显示,被动牵拉捆绑组的跟腱病变显著,腱内大片透明软骨形成、腱前方异位化骨、结缔组织和血管长入,跟腱微断裂并形成腱内血肿,纤维软骨区内出现透明软骨岛,软骨细胞增多,经休息后取材病变均无明显好转。以上两种实验方法对动物固定时存在一定困难,会为造模的准确性带来不确定的影响因素,尚不能排除捆绑后的动物腿部是否存在血液循环障碍的干预因素。但是此方法的优点是可以精确的控制加载负荷。

2.2.2 电击刺激干预:扈盛等^[24]将24只体重约为100g的SD雄性大鼠随机分为两组,对照组不做处理,将实验组大鼠置于自制电刺激装置中,每15s通电一次,使大鼠为了躲避电刺激而做蹦跳运动,共持续20min,休息10min,再持续20min。每天造模1次,每周6次,持续4周。电压控制在50V左右,造模期间给予充足的水和纯鼠料喂养。最终进行组织检查发现,实验组大鼠跟腱末端区发生的适应性反应有:潮线涨潮、纤维软骨区、钙化软骨区和腱骨软骨面的增厚,骨髓腔呈

明显增生、跟腱腹侧部软骨细胞的增多;病理变化有:跟腱纤维排列紊乱、断裂,跟腱玻璃样变和纤维样变,腱围增厚和纤维化。刘伟等^[25]与扈盛等做了相同的造模实验,期间增加了电子计数器,以记录大鼠在造模期间,蹦跳的高度和次数变化情况。刘波等^[26]将23只10月龄,雌雄各半的日本大白耳成年兔随机分为对照组、单纯训练组、电针治疗组,均置笼内饲养,面积为0.2m²/只,造模的方式为:对照组不做处理,正常饲养,造模组每天用高压电,低电流刺激笼训练白兔。电刺激笼每分钟向兔子足底通6次1.5kV的脉冲电压,白兔为了逃避高压刺激而产生剧烈跑跳,半小时后休息10min;每天跑跳360次,周日休息。3周刺激后的结果显示,跟腱止点部位即可出现明显的末端病病理改变,这些改变包括键止点的钙化软骨带的“涨潮”、“潮线”、模糊、中断、消失、脂肪垫变性坏死,键围增厚,小血管增多,血管壁增厚、闭锁,血栓形成,腿内钙化及软骨岛形成,但是跟腱—跟骨系统的力学强度并未因此而降低,反而部分力学指标有所增强。扈盛,刘伟的电击刺激跳跃法与刘波的高压电击刺激跳跃法,都是间接的促使实验动物自主的做蹦跳动作,这更接近于绝大多数人类末端病形成的特点,但是以蹦跳次数和高度定义负荷的强度,没有涉及腱组织力的准确负荷,因此期待深入研究。

2.2.3 上下坡跑干预:下坡跑与上坡跑的方法使得鼠在跑步过程中重心转移,负荷再分配,对相关肌腱造成重复过度使用,从而造成末端病。Soslowsky等^[27]将36只雄性SD大鼠随机分为实验组和对照组,实验组包括4周运动组、8周运动组和16周运动组。下坡跑方式诱发大鼠产生冈上肌腱末端病。实验组大鼠需要在倾斜角度为10°,速度为17m/s的特制跑步机上每天连续跑1h,每周5天,持续不同的周数。结果显示,4到16周实验组大鼠冈上肌腱内细胞密度增加,形状改变,胶原纤维错位,肌腱横截面积增大,这些改变不随训练周数改变而有所改变。但是相对于其他两组,16周组的持续训练则使得大鼠冈上肌腱最大应力显著减小。Perry等^[28]重复此方法,以研究大鼠冈上肌腱的炎症与血管基因情况,发现5-脂氧合酶激活蛋白与环氧酶-2在第8周时基因表达最大化,但到16周时又减小到正常水平。同时,环氧酶-2在所有训练周数内均稍偏低。血管内皮生长因子则随着训练周数增加而增加,并在16周后仍保持持续增长趋势。上坡跑可以造成跟腱末端病,下坡跑可以造成冈上肌腱末端病,这种干预方式通过距离明确实验动物的总运动负荷。但是有研究表明,大鼠在滚轮模型中每天最多可以奔跑15km^[29],而上、下坡跑干预的每天负荷量为6.12km。因此除了运动距离造成肌腱损伤之外,肌腱的离心和向心收缩也是引起肌腱末端病的一个重要因素。

2.2.4 废用性干预:对实验对象采用相应废用性措施,也是引起相关肌腱产生末端病的方法。Nakagawa等^[30]通过将大

鼠的尾巴拴住并吊起,持续5周时间,从而得到一个废用性末端病模型。结果发现,肌腱内胶原纤维表面积与厚度均减小。然而,尾吊大鼠导致生长时期的大鼠生长也全面不足,这可能也是引起肌腱胶原纤维生长不足的原因。所以,此方法还需要进一步进行研究。

3 小结

末端病作为较为常见的运动损伤疾病,对人类的生产生活造成了不可避免的消极影响。对末端病的进一步研究,获知其产生的机制,对末端病的治疗是非常重要的。因此,为了研究其产生的机制,建立起有效的末端病模型是非常关键的。随着对末端病造模研究的进一步深入,能够用于研究末端病涉及各方面问题的完美模型显然还没被发现。现有的动物模型中,化学物质干预模型可以帮助研究者对末端病肌腱内部的生化改变情况进行深入研究,帮助研究末端病发病机制中的一些过程提供一定的参考价值;物理干预模型,则更适合研究者对末端病的治疗进行研究。现有的造模方法各有其优缺点。随着研究者对各类方法的有效筛选和进一步完善,这些造模方法得出的一些结论必定会对末端病治疗方法的完善带来积极的作用。

参考文献

- [1] Lian OB, Engebretsen L, Bahr R. Prevalence of jumper's knee among elite athletes from different sports: a cross-sectional study[J]. *Am J Sports Med*, 2005, 33(4):561—567.
- [2] Bains S, Porter K. Lower limb tendinopathy in athletes[J]. *Trauma*, 2006, (8):213—224.
- [3] Kader D, Saxena A, Movin T, et al. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management[J]. *Br J Sports Med*, 2002, 36(4):239—249.
- [4] Jozsa L, Kannus P. Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology[M]. *Human Kinetics*, Champaign, Illinois, 1997.
- [5] Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology[J]. *Arthroscopy*, 1998, 14(8):840—843.
- [6] Maffulli N, Kahn KM. Clinical nomenclature for tendon injuries[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 1999, 31(2):352—353.
- [7] Singer DI, Morrison WA, Gumley GJ, et al. Comparative study of vascularized and nonvascularized tendon grafts for reconstruction of flexor tendons in zone 2: an experimental study in primates[J]. *J Hand Surg Am*, 1989, 14(1):55—63.
- [8] Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, et al. Insulin-like growth factor- I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis[J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(5):910—919.

- [9] Shakibaei M, de Souza P, van Sickle D, et al. Biochemical changes in Achilles tendon from juvenile dogs after treatment with ciprofloxacin or feeding a magnesium-deficient diet[J]. Arch Toxicol, 2001, 75(6):369—374.
- [10] Kavaguchi De Grandis A, Boulocher C, Viguier E, et al. Ultrasonograph and clinical quantitative characterization of tendinopathy by modified splitting in a goat model[J]. Scientific World Journal, 2012, (2012):1—7.
- [11] Chang KV, Wu CH, Ding YH, et al. Application of contrast-enhanced sonography with time-intensity curve analysis to explore hypervascularity in Achilles tendinopathy by using a rabbit model[J]. J Ultrasound Med, 2012, 31(5):737—746.
- [12] Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, et al. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis[J]. Int J Nanomedicine, 2012, (7):1651—1657.
- [13] Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, et al. Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model [J]. J Orthop Res, 2002, 20(5):939—946.
- [14] Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, et al. Superficial digital flexor tendonitis in the horse[J]. Equine Vet J, 2000, 32(5):369—378.
- [15] Foland JW, Trotter GW, Powers BE, et al. Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses[J]. Am J Vet Res, 1992, 53(12):2371—2376.
- [16] Lui PP, Fu SC, Chan LS, et al. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration[J]. J Histochem Cytochem, 2009, 57(2):91—100.
- [17] Stone D, Green C, Rao U, et al. Cytokine-induced tendinitis: a preliminary study in rabbits[J]. J Orthop Res, 1999, 17(2):168—177.
- [18] Khan MH, Li Z, Wang JH. Repeated exposure of tendon to prostaglandin-E2 leads to localized tendon degeneration [J]. Clin J Sport Med, 2005, 15(1):27—33.
- [19] Ferry ST, Afshari HM, Lee JA, et al. Effect of prostaglandin E2 injection on the structural properties of the rat patellar tendon[J]. Sports Med, 2012, 4(1):2.
- [20] Kato M, Takada S, Kashida Y, et al. Histological examination on Achilles tendon lesions induced by quinolone antibacterial agents in juvenile rats[J]. Toxicol Pathol, 1995, 23(3):385—392.
- [21] Kashida Y, Kato M. Characterization of fluoroquinolone-induced Achilles tendon toxicity in rats: comparison of toxicities of 10 fluoroquinolones and effects of anti-inflammatory compounds[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(11):2389—2393.
- [22] Backman C, Boquist L, Fridén J, et al. Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit[J]. J Orthop Res, 1990, 8(4):541—547.
- [23] 于长隆,曲绵域,田小明,等.兔跟腱末端病的实验病理研究[J].中国运动医学杂志,1983,2(3):8—12.
- [24] 扈盛,欧高志,滕宇,等.末端病造模方法的研究[J].武汉体育学院学报,2006,4(40):79—81.
- [25] 刘伟,徐西东,陈世荣.电击跳跃法建立大鼠跟腱病动物模型[J].现代医药卫生,2011,20(27):3041—3044.
- [26] 刘波.电针治疗腱末端病的生物力学研究- I 电针对末端结构断裂特性的影响[J].中国中医骨伤科杂志,1995,5(3):9—13.
- [27] Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, et al. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2000, 9(2):79—84.
- [28] Perry SM, McIlhenny SE, Hoffman MC, et al. Inflammatory and angiogenic mRNA levels are altered in a supraspinatus tendon overuse animal model[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2005, 14(1 Suppl S):79S—83S.
- [29] Carlson KM, Wagner GC. Voluntary exercise and tail shock have differential effects on amphetamine-induced dopaminergic toxicity in adult BALB/c mice[J]. Behav Pharmacol, 2006, 17(5—6):475—484.
- [30] Nakagawa Y, Totsuka M, Sato T, et al. Effect of disuse on the ultrastructure of the achilles tendon in rats[J]. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1989, 59(3):239—242.