

• 实验研究 •

原发性高血压合并膝骨关节炎肝肾亏虚证大鼠模型建立与评价^{*}马兆臣¹ 张楚¹ 胥明珠¹ 刘毓东¹ 陈卫衡² 张彦琼^{1#} 林娜¹

(1 中国中医科学院中药研究所 北京 100700; 2 北京中医药大学第三附属医院)

摘要:目的 建立原发性高血压合并膝骨关节炎(KOA)肝肾亏虚证大鼠模型并评价其共病与证候表征。方法 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠 10 只为对照组,自发性高血压大鼠(SHR) 30 只按随机数字表法分为高血压合并 KOA 假手术组(假手术组)、高血压合并 KOA 组(模型组)、高血压合并 KOA 肝肾亏虚证组(肝肾亏虚组)。SHR 大鼠肌肉注射氢化可的松,制备肝肾亏虚证合并高血压大鼠模型;再行前交叉韧带切断术,制备高血压合并 KOA 的肝肾亏虚证大鼠模型。然后依次检测各组大鼠血清中促甲状腺激素(TSH)、睾酮(T)、皮质酮(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH) 的含量及谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)的活性;肝脏、肾脏、脾脏、胸腺与大脑的质量比;体质量、肛温、活动状态、情绪等肝肾亏虚证指标;收缩压、舒张压等血压指标;血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平、足底机械痛敏阈值、双后肢负重差、后肢关节肿胀度、四足步态参数等 KOA 指标,采用苏木精-伊红(HE)染色、番红-固绿染色和 Masson 染色观察大鼠膝关节组织病理变化、软骨退变和骨破坏情况;通过显微计算机断层成像技术检测胫骨微结构参数。结果 与模型组相比,肝肾亏虚组大鼠活动减少、躁动易怒,血清 TSH、ACTH、T、CORT 含量均降低($P<0.05$);肾脏、脾脏及胸腺与大脑的质量比降低($P<0.05$)。与对照组相比,其余 3 组大鼠的收缩压、舒张压均升高($P<0.05$)。与假手术组相比,模型组与肝肾亏虚组大鼠血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平均升高、足底机械痛敏阈值降低、双后肢负重差及患侧肢关节肿胀度均升高,患侧肢步幅及站立时间等步态参数异常($P<0.05$);膝关节软骨表面缺损严重,表层软骨细胞排列混乱,且软骨层变薄,软骨中肌纤维增多,软骨骨化严重,膝关节骨小梁相对体积、厚度减小及数量减少($P<0.05$)。结论 本研究所建立的大鼠模型符合高血压合并 KOA 肝肾亏虚证的中西医临床病证特点,能表征肝肾亏虚证的主要症状,具有膝关节软骨及软骨下骨典型的组织病理改变,能维持稳定的收缩压和舒张压高血压范围,希望为揭示中医药优势病种的病证本质、疗效机制及研发创新型中药新药提供有效的实验载体。

关键词: 肝肾亏虚证; 膝骨关节炎; 高血压; 病证结合; 共病大鼠模型

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2024.05.009

中图分类号: R-332

Establishment and evaluation of the comorbidity animal model of knee osteoarthritis and hypertension with pattern of liver and kidney deficiency^{*}MA Zhaochen¹, ZHANG Chu¹, XU Mingzhu¹, LIU Yudong¹, CHEN Weiheng², ZHANG Yanqiong^{1#}, LIN Na¹

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2 Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

马兆臣,男,博士

通信作者: 张彦琼,女,博士,教授,研究员,博士生导师,主要研究方向: 中药抗炎免疫药理学, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn

* 国家重点研发计划项目(No.2022YFC3502002); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(No.C1202A03808); 国家资助博士后研究人员计划(C 档)项目(No.GZC20233130)

Abstract: Objective To establish the animal model of comorbidity of knee osteoarthritis (KOA) and hypertension with pattern of liver and kidney deficiency and evaluate its characteristics of comorbidity and pattern. **Methods** Wistar-Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) were assigned to the WKY control group (control group), hypertension combined with KOA sham-operation group (sham-operation group), hypertension combined with KOA group (model group), hypertension combined with KOA and liver-kidney deficiency pattern group (LKD group). The animal model of KOA combined with hypertension was prepared by anterior cruciate ligament transection (ACLT) in spontaneously hypertensive rats. ACLT combined with intramuscular injection of hydrocortisone was performed to prepare an animal model of KOA with liver-kidney deficiency (LKD) pattern type, combined with hypertension. Then, the related indexes of LKD syndrome were detected in turn, including the contents of thyroid stimulating hormone (TSH), testosterone (T), corticosterone (CORT), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in serum, and enzyme activities of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) in serum, the mass ratio of liver, kidney, spleen, thymus to the brain, body weight, anal temperature, activity situation, and emotion. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and other blood pressure-related indices were also detected. The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β), plantar mechanical pain sensitivity threshold, weight difference score of both hind limbs, hind limb joint swelling, and quadruped gait parameters were also measured. Furthermore, hematoxylin-eosin, safranin-fast green, and Masson staining were performed to observe pathological changes, cartilage degeneration, and bone destruction of the knee joint, and the microstructure parameters of the tibia were detected by Micro-CT imaging. **Results** Compared to the model group, the contents of serum TSH, ACTH, T, CORT and the mass ratio of the kidney, spleen, and thymus to the brain in the LKD group decreased ($P < 0.05$). Compared to the control group, the systolic blood pressure and diastolic blood pressure of the other three groups increased significantly ($P < 0.05$). Compared to the sham-operation group, serum TNF- α and IL- 1β levels increased, plantar mechanical pain threshold decreased, weight difference score of both hind limbs and joint swelling of the affected limb increased ($P < 0.05$), and gait parameters (e.g., gait length and standing time of the affected limbs) became abnormal in the model and LKD groups. Simultaneously, the cartilage surface defect of the rat knee joint was severe, the arrangement of the surface chondrocytes was altered, the cartilage layer became thinner, the muscle fibers increased, and the cartilage ossification was severe. Furthermore, the relative volume, thickness, and number of trabeculae of the knee joint decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The rat model established in this study is consistent with the clinical characteristics of integrated traditional Chinese and Western medicine in patients with comorbidities of hypertension and KOA with liver and kidney deficiency pattern. This rat model can characterize the typical symptoms of liver and kidney deficiency pattern. It has typical pathological changes in knee cartilage and subchondral bone tissues and can maintain a stable range of high systolic and diastolic blood pressure. It also explore the scientific connotation of simultaneous treatment of different diseases in traditional Chinese medicine, revealing the therapeutic mechanism and developing new drugs.

Keywords: liver and kidney deficiency pattern; knee osteoarthritis; hypertension; combination of disease and pattern; rat comorbidity model

Corresponding author: Prof. ZHANG Yanqiong, Ph. D., Researcher, Doctoral Supervisor. Institute of

Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, No. 16, Nanxiaojie, Dongzhimen Inner Street, Dongcheng District, Beijing 100700. E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn

Funding: National Key Research and Development Project(No.2022YFC3502002)

Ethical review: Committee of Ethical Review on Experimental of the Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences (No. IBTCMCACMS21-2306-01)

Conflicts of interest: None of the authors have any conflicts of interest associated with this study, and all the authors have read and approved this manuscript.

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)作为一种慢性、退行性关节疾病,是导致患者活动受限、生活质量低下甚至身体残疾的主要原因之一。我国KOA发病率为18%,全世界发病率也已超过15%^[1]。高血压作为心脑血管疾病的独立危险因素,已被公认为人类致残的第三大诱因^[2]。KOA和高血压常合并发病,65岁以上KOA患者中,超过50%合并有高血压;高血压是KOA关节软骨稳态失调的重要诱因,造成影像学改变的KOA增加89%,症状性KOA增加39%^[3]。KOA和高血压均为中医学治疗优势病种。KOA属中医学“痹证”范畴,临床以肝肾亏虚证为多见,占总病例数的40.4%^[4-5];高血压属中医学“眩晕”和“头痛”范畴,老年人发病率达70%^[6]。值得注意的是,在相关的中医药诊疗指南中,KOA和高血压的临床核心证候均为肝肾亏虚证^[4-6]。以肝肾亏虚证为切入点,开展KOA和高血压共病的相关研究,对于KOA和高血压的共治具有重要意义。病证结合动物模型是连接中医基础研究和临床诊疗的桥梁,既具备中医学证候的特点,又有西医学疾病的病理改变,可一定程度模拟临床实际诊疗中的病证一体,对系统阐释疾病的科学内涵及揭示中医药防治疾病的作用机制具有重要意义。本研究选用自发性高血压大鼠(SHR),给予肌肉注射氢化可的松注射液并且行前交叉韧带切断术,制备高血压合并KOA肝肾亏虚证的病证结合大鼠模型,并从肝肾亏虚证症状、血压、膝关节功能、膝关节软骨和软骨下骨病理改变等多个维度,全面、客观地评价其共病与证候表征,为揭示中医异病同治KOA和高血压的科学内涵并解析中药的作用机制提供有效的实验载体,同时也有助于对创新性中药新药的研发和对上市品种的再评价。

1 材料

1.1 动物

雄性SPF级SHR 30只,8周龄,160~200 g;雄性SPF级Wistar-Kyoto(WKY)大鼠10只,8周龄,160~200 g。大鼠均购自北京维通利华实验动物有

限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。大鼠统一喂养在中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心,动物室干净明亮,通风情况良好,温度为18~22℃,湿度为45%~55%。

1.2 伦理审查

本实验经中国中医科学院基础理论研究所实验动物福利伦理委员会审批通过,批件编号:IBTCMCACMS21-2306-01。

1.3 药物与试剂

注射用氢化可的松琥珀酸钠(烟台东诚北方制药有限公司,国药准字H20084319,批号:202301,规格:2.4 g/支);注射用青霉素钠(合肥中龙神力动物药业有限公司,兽药字120152659,批号:20230316,规格:50 mg/支);PBS缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司,批号:202302);白凡士林(南昌白云药业有限公司,批号:20220123);0.9%氯化钠溶液(石家庄四药有限公司,批号:A2302175);促甲状腺激素(TSH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、睾酮(T)、皮质酮(CORT)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物有限公司,批号分别为ml003045、ml002875、ml002868、ml002893、ml002859、ml003057、ml059335、ml059334、ml003360)。

1.4 主要仪器与设备

CODA-M1型小动物无创血压仪(美国Kent公司);NC12775型Von Frey纤维丝测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司);BIO-SMALGO型爪压力测痛仪(法国Bioseb公司);YLS-11A通道式鼠足支撑力测量仪(济南益延科技发展有限责任公司);Catwalk步态分析仪(荷兰Noldus公司);BMJ-1B型生物组织包埋机(天津天利航空机电有限公司);BS224 S型电子天平(德国Sartorius公司);L500-A型低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);E-CLIPSE Ts2型倒置光学显微镜(日本Nikon公司);MK3型全自动酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific

公司);游标卡尺(桂林广陆数字测控有限公司);电子体温计(广东健奥科技有限公司);viva CT80型显微计算机断层成像(Micro-CT)扫描仪(瑞士Scanco Medical公司)。

2 方法

2.1 分组

10只WKY大鼠为对照组。30只SHR按照随机数字表法分为3组:高血压合并KOA假手术组(假手术组)、高血压合并KOA组(模型组)、高血压合并KOA肝肾亏虚证组(肝肾亏虚组),每组10只,适应性喂养1周后开始造模。

2.2 造模

肝肾亏虚证:肝肾亏虚组大鼠双后肢连续15d肌肉注射25 mg/kg氢化可的松注射液,其他组连续15d肌肉注射等体积的0.9%氯化钠溶液。

KOA:第1次肌肉注射氢化可的松当天,麻醉大鼠,剪去模型组和肝肾亏虚组大鼠右后肢(患侧肢)膝关节周围1 cm²区域的鼠毛,络合碘消毒,打开关节腔,剪断前交叉韧带,然后进行抽屉实验,确认前交叉韧带完全断离。对照组和假手术组仅打开关节腔,前交叉韧带保持完整。术后连续3d肌肉注射80万U/mL青霉素钠溶液预防感染。

2.3 肝肾亏虚证症状评价

注射氢化可的松后,每周对大鼠进行体质量和肛温测量,并观察大鼠是否出现体质量降低、精神倦怠、活动减少、反应迟钝、肢尾冷、蜷曲拱背、皮毛无光泽、倾向于聚集、阴囊收缩、躁动易怒等症状,观察8周。实验结束后,腹主动脉采血,4℃离心15 min(3 000 r/min、离心半径10 cm),取上层血清置于-80℃冰箱,备用。参照ELISA试剂盒的操作规程,检测血清中TSH、ACTH、T、CORT、TNF-α、IL-1β的含量,以及ALT、AST、ALP的酶活性。摘取大鼠肝脏、双肾、脾脏、胸腺、大脑,称量并记录,计算脏脑指数。脏脑指数(%) = 脏器质量(g) / 脑质量(g) × 100%。

2.4 血压检测

注射氢化可的松后,每周测量大鼠血压,连续测量8周。操作如下:大鼠固定后放入37℃恒温箱内,持续加热10~15 min,使其尾动脉完全扩张,随后将其尾部迅速插入加压脉套并使尾根部紧贴加压脉套,采用小动物无创血压仪血压单通道实时监测仪器测量每只大鼠的收缩压、舒张压、平均动脉压和心率,重复3次,取平均值。

2.5 膝关节功能评价

每周测量患侧肢足底机械痛敏阈值、患侧肢及

健侧肢负重差及患侧肢关节肿胀度,并在造模8周后进行四足步态检测,每只动物重复检测3次,每次间隔5 min。操作如下:采用Von frey纤维丝测痛仪检测大鼠足底机械痛敏阈值,使用通道式鼠足支撑力测量仪检测双后肢负重差(健侧肢负重-患侧肢负重),采用游标卡尺测量患侧肢关节肿胀度,采用步态分析仪检测四足步态变化,操作流程严格遵循使用说明。

2.6 膝关节骨组织病理学和骨微结构检测

大鼠经四足步态检测后,麻醉,利用剪刀及手术刀分离大鼠患侧腿骨,尽可能去除筋膜、肌肉和结缔组织,保留膝关节上下各1 cm部分,于4%多聚甲醛中固定3 d,10% EDTA中脱钙45 d,其间3 d换液1次。脱钙结束后截取膝关节部分,采用生物组织包埋机进行石蜡包埋并切片。严格按照试剂盒说明书进行HE染色、番红-固绿染色及Masson染色,并在光镜下观察和拍照。将剩余患侧肢膝关节固定,采用Micro-CT扫描仪(15.6 μm、70 kV、114 μA、8 W)扫描胫骨软骨下骨,使用内置软件计算骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨小梁数。

2.7 统计方法

本研究使用SPSS 20软件进行数据统计分析。数据符合正态分布时以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,进行方差齐性检验,若方差齐选取单因素方差分析,两两比较选择SNK法;若方差不齐采用校正单因素方差分析,多重比较选择Dunnett's T3法。不符合正态分布的数据采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SHR大鼠肝肾亏虚证表征

与模型组比较,肝肾亏虚组大鼠血清TSH、ACTH、CORT、T水平均降低($P < 0.01$);肾脑指数、脾脑指数及胸脑指数均降低($P < 0.01$),肝脑指数虽有降低趋势,但差异无统计学意义;ALT、AST、AST/ALT、ALP等肝胆相关酶的活性虽有所降低,但差异无统计学意义,结果见表1。肝肾亏虚组与模型组比较,体质量增长明显减缓($P < 0.01$),体温降低($P < 0.01$)。结果见表2。此外,模型组大鼠活动自如、反应灵敏、毛发润泽;肝肾亏虚组大鼠则表现出活动减少、精神倦怠、反应迟钝、皮毛无光泽、倾向于聚集、阴囊收缩、抓取困难、尖叫易怒等肝肾亏虚证典型症状。

表 1 各组大鼠肝肾亏虚证证候评价($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 1 Evaluation of liver and kidney deficiency pattern in rats of each group($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
TSH/(mU/L)	17.84±1.38	19.32±1.89	19.06±1.61	14.38±3.26**	19.850	<0.001
ACTH/(μg/L)	138.84±7.11	150.16±8.61	144.50±7.86	112.71±13.18**	58.520	<0.001
CORT/(μg/L)	10.87±1.90	10.98±1.71	11.07±1.95	8.87±1.26**	7.465	<0.001
T/(ng/L)	268.93±24.59	255.64±14.90	246.61±15.03	200.06±29.82**	31.780	<0.001
ALT/ (U/L)	17.84±1.38	19.32±1.89	19.06±1.61	14.38±3.26	1.526	0.242
AST/ (U/L)	138.84±7.11	150.16±8.61	144.50±7.86	112.71±13.18	0.297	0.827
AST/ALT	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.01±0.01	0.125	0.944
ALP/(U/L)	268.93±24.59	255.64±14.90	246.61±15.03	200.06±29.82	0.265	0.849
肝脑指数 Liver-brain index/%	3.54±0.40	4.44±0.40	4.83±0.55	4.23±0.32	6.689	0.030
肾脑指数 Kidney-brain index/%	0.97±0.12	1.15±0.09	1.20±0.11	0.90±0.16**	8.620	<0.001
脾脑指数 Spleen-brain index/%	0.23±0.05	0.33±0.05	0.32±0.05	0.24±0.03**	8.028	0.001
胸脑指数 Thymic-brain index/%	0.09±0.04	0.15±0.04	0.15±0.02	0.10±0.02**	5.442	0.006

注: 与模型组比较, ** $P<0.01$ 。
Note: ** $P<0.01$ compared with the model group.

表 2 各组大鼠体质量、肛温比较($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 2 Comparison of body weight and rectal temperature in rats of each group($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	周次 Week	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
体质量 Body mass/g	1	166.70±20.84	185.93±7.44	184.46±10.67	186.05±14.24	3.108	0.060
	8	203.25±41.61	289.93±19.40	303.69±16.03	283.79±21.39**	16.820	<0.001
肛温 Rectal temperature/℃	1	34.11±1.25	33.29±1.14	33.69±1.00	33.94±1.22	0.794	0.506
	8	34.58±0.34	36.50±0.69	36.72±0.72	35.61±0.48**	13.100	<0.001

注: 与模型组比较, ** $P<0.01$ 。
Note: ** $P<0.01$ compared with the model group.

3.2 SHR 大鼠血压变化

对照组大鼠的收缩压、舒张压、平均动脉压、心率分别为 130~150 mmHg(1 mmHg $\approx$ 0.133 kPa) 、80~100 mmHg、100~120 mmHg、330~350 次/min,

SHR 各组大鼠的收缩压、舒张压、平均动脉压高于同时段对照组($P<0.01$); SHR 各组大鼠的心率 1 周时高于对照组($P<0.01$), 8 周时差异无统计学意义。结果见表 3。

表 3 各组大鼠血压及心率分析结果($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 3 Analysis results of blood pressure and heart rate in rats of each group($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	周次 Week	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
收缩压 Systolic pressure/mmHg	1	136.73±23.68	173.97±25.87**	183.53±22.22**	166.97±16.89**	8.942	<0.001
	8	138.17±14.64	166.8±35.94**	169.33±16.05**	171.40±18.15**	4.538	0.002
舒张压 Diastolic pressure/mmHg	1	81.27±17.09	117.57±21.78**	134.40±21.99**	119.77±17.66**	17.800	<0.001
	8	85.58±16.19	121.03±22.80**	115.37±16.16**	122.43±16.86**	9.758	<0.001
平均动脉压 Blood pressure/mmHg	1	105.63±22.16	136.90±21.87**	150.57±21.71**	135.17±16.30**	13.110	<0.001
	8	101.08±15.37	138.07±22.10**	133.40±15.42**	138.50±16.55**	10.570	<0.001
心率/(次/min)	1	368.55±29.59	424.96±55.08**	441.30±45.90**	410.07±36.72**	6.155	<0.001
Heart rate/(beats/min)	8	356.00±58.95	388.43±44.78	379.57±40.64	387.00±38.06	0.939	0.445

注: 与对照组比较, ** $P<0.01$ 。
Note: ** $P<0.01$ compared with the control group.

3.3 SHR 大鼠肌注氢化可的松并行前交叉韧带切断术后膝关节功能异常变化

与假手术组相比,模型组与肝肾亏虚组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P<0.05, P<0.01$); 足底机械痛敏阈值降低 ($P<0.01$); 双后肢负重差增加 ($P<0.01$); 患侧肢关节肿胀度升高 ($P<0.01$), 以上结果表明患侧后肢存在明显炎症、疼痛, 并且承重能力减弱。结果见表 4、表 5。

表 4 各组大鼠膝关节 TNF- α 、IL-1 β 含量比较 (ng/L; $\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 4 Content comparison of TNF- α and IL-1 β of knee joint in rats of each group (ng/L; $\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
TNF- α	220.43 $\pm$ 39.77	226.16 $\pm$ 31.38	260.88 $\pm$ 26.08**	266.63 $\pm$ 27.84**	9.608	<0.001
IL-1 β	26.70 $\pm$ 7.47	27.67 $\pm$ 6.65	31.95 $\pm$ 1.96*	33.45 $\pm$ 2.09**	7.573	<0.001

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the sham-operation group.

表 5 各组大鼠膝关节功能分析结果 ($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 5 Analysis results of knee joint function in rats of each group ($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	周次 Week	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
足底机械痛敏阈值 Mechanical allodynia/g	1	38.18 $\pm$ 9.81	44.84 $\pm$ 9.39	42.38 $\pm$ 10.29	42.86 $\pm$ 10.48	1.636	0.171
	8	18.3 $\pm$ 2.11	41.56 $\pm$ 5.35	22.99 $\pm$ 3.48**	21.00 $\pm$ 3.38**	100.900	<0.001
双后肢负重差 Weight difference score of both hind limbs/g	1	0.81 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.25	-1.81 $\pm$ 0.33**	-1.59 $\pm$ 0.47**	19.700	<0.001
	8	8.29 $\pm$ 1.78	4.41 $\pm$ 0.53	59.42 $\pm$ 5.68**	63.19 $\pm$ 7.32**	410.500	<0.001
关节肿胀度 Swelling degree/mm	1	8.66 $\pm$ 0.52	8.48 $\pm$ 0.44	8.98 $\pm$ 0.51	8.48 $\pm$ 0.64	1.958	0.141
	8	8.24 $\pm$ 0.14	8.73 $\pm$ 0.33	10.06 $\pm$ 0.27**	9.58 $\pm$ 0.35**	36.420	<0.001

注: 与假手术组比较, ** $P<0.01$ 。
Note: ** $P<0.01$ compared with the sham-operation group.

大鼠四足步态分析结果表明,与假手术组比较,模型组与肝肾亏虚组大鼠患侧肢的摆动时间增加 ($P<0.05, P<0.01$), 摆动速度、步幅均降低 ($P<0.05, P<0.01$), 表明 KOA 造模后大鼠患侧肢运动能力明显降低; 患侧肢的站立时间、最大接触面积、足印面积、患侧肢与健侧肢足印面积比、最大强度均降低 ($P<0.01$), 表明 KOA 造模后大鼠患侧肢承重能力明显降低。结果

见表 6。此外, KOA 造模后大鼠患侧肢(右后肢)的支撑时相比略低于假手术组, 但差异无统计学意义, 为进一步观察该指标, 对大鼠剩余 3 肢的支撑时相比进行整体分析, 结果显示 KOA 模型大鼠的其余 3 肢的支撑时相比高于假手术组, 其中, 模型组左后肢和肝肾亏虚组其余 3 肢差异均有统计学意义, 提示 KOA 模型大鼠的患侧后肢承重受限。结果见表 7。

表 6 各组大鼠四足步态分析结果 ($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 6 Analysis results of quadruped gait in rats of each group ($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
摆动时间 Swing time/s	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01*	0.13 $\pm$ 0.01**	9.261	<0.001
摆动速度 Swing speed/(cm/s)	102.64 $\pm$ 2.59	94.03 $\pm$ 9.42	77.00 $\pm$ 4.85**	77.00 $\pm$ 4.85**	34.460	<0.001
步幅 Stride length/cm	12.53 $\pm$ 1.76	12.97 $\pm$ 2.03	9.23 $\pm$ 1.34*	9.56 $\pm$ 1.14*	6.925	0.004
站立时间 Stand/s	0.59 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.05**	0.38 $\pm$ 0.01**	42.520	<0.001
最大接触面积 Max contact area/cm ²	1.41 $\pm$ 0.04	1.44 $\pm$ 0.07	1.14 $\pm$ 0.08**	1.12 $\pm$ 0.03**	40.590	<0.001
足印面积 Print area/cm ²	1.87 $\pm$ 0.04	1.87 $\pm$ 0.06	1.52 $\pm$ 0.05**	1.39 $\pm$ 0.07**	71.140	<0.001
足印面积比 Print area ratio/%	1.03 $\pm$ 0.12	0.87 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.05**	0.65 $\pm$ 0.10**	30.390	<0.001
最大强度 Max intensity	183.88 $\pm$ 2.95	180.15 $\pm$ 3.75	162.44 $\pm$ 5.04**	160.50 $\pm$ 1.04**	42.650	<0.001

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the sham-operation group.

表 7 各组大鼠四肢支撑时相比 (%; $\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 7 Comparison of four limbs duty cycle in rats of each group(%; $\bar{x}\pm s$; $n=8$)

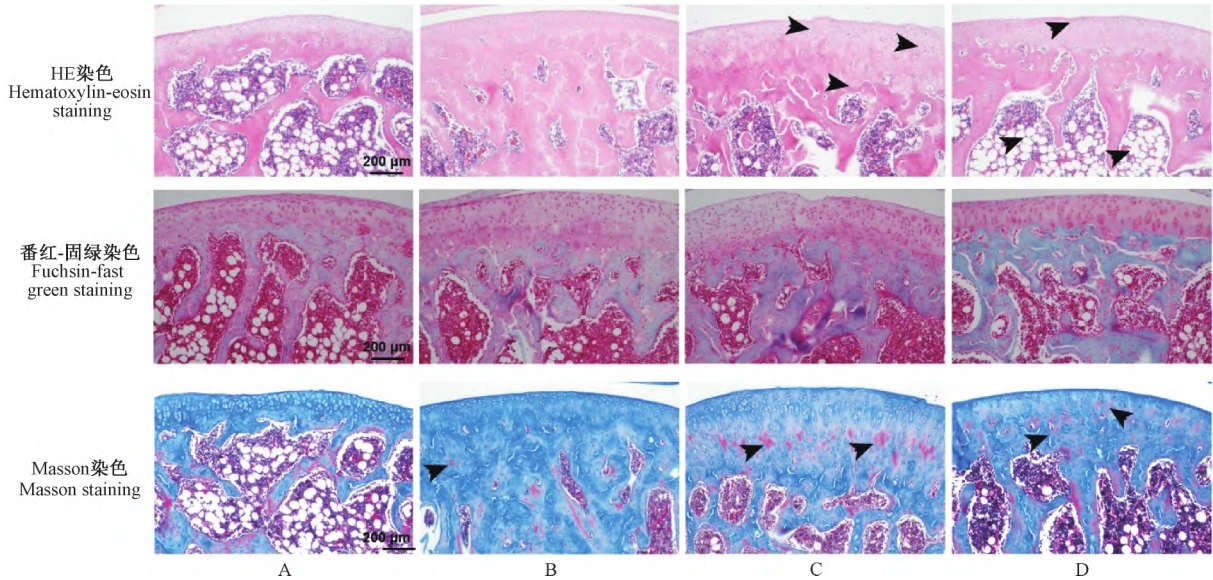
项目 Item	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
右后肢支撑时相比 Duty cycle of right hindleg	73.68±11.28	74.79±3.24	69.15±6.45	65.43±3.90	1.192	0.362
右前肢支撑时相比 Duty cycle of right forelimb	69.44±7.25	67.82±3.03	69.60±3.19	76.88±2.71*	4.146	0.024
左后肢支撑时相比 Duty cycle of left hindleg	65.88±8.32	73.97±3.23	88.54±2.97*	89.93±5.28*	16.680	<0.001
左前肢支撑时相比 Duty cycle of left forelimb	65.96±4.54	67.13±4.03	72.69±2.39	79.52±6.12**	8.749	<0.001

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the sham-operation group.

3.4 SHR 大鼠肌肉注射氢化可的松并行前交叉韧带切断术后膝关节软骨及软骨下骨病理改变

HE 染色结果显示,假手术组软骨组织边界清晰圆润,软骨细胞排列整齐,潮线完整且清晰;模型组和肝肾亏虚组大鼠软骨组织边界模糊且凹凸不平,边缘碎片化,软骨细胞排列混乱,发生软骨丢失,

潮线残缺并呈放射状。番红-固绿染色结果显示,假手术组软骨厚度均匀;而模型组和肝肾亏虚组大鼠软骨厚度不均匀,软骨边缘破碎,软骨层变薄。Masson 染色结果显示,假手术组软骨中未见阳性信号;而模型组和肝肾亏虚组大鼠软骨中阳性信号较强,提示肌纤维增多,软骨骨化。结果见图 1。



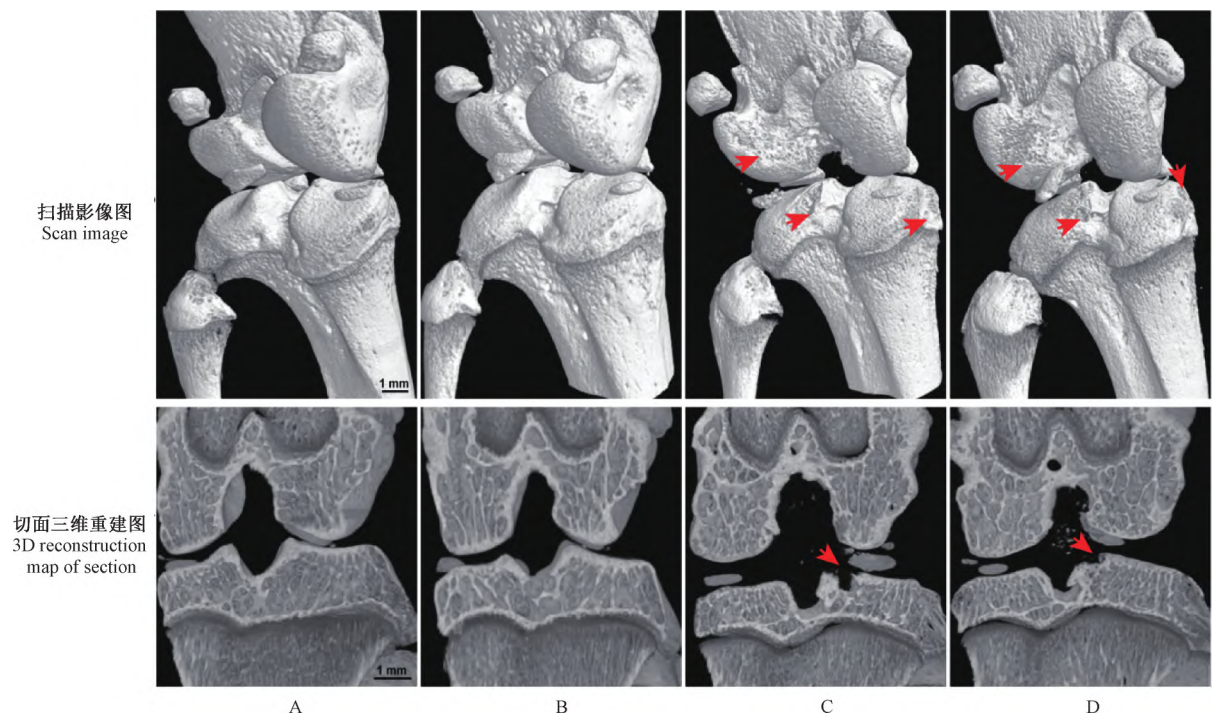
A: 对照组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 肝肾亏虚组。标尺=200 μm。
A: Control group; B: Sham-operation group; C: Model group; D: LKD group. Scale=200 μm.

图 1 膝关节组织病理观察结果 (×100)

Fig.1 Pathological sections of knee joint tissue (×100)

Micro-CT 成像结果显示,假手术组大鼠关节表面光滑,骨小梁排列规律;模型组和肝肾亏虚组大鼠膝关节面凹凸不平,皮质骨连续性中断,骨小梁排列紊乱。骨体积分数能够反映骨小梁的骨量,该值降低说明骨分解代谢大于合成代谢,骨量减少。骨小梁厚度、骨小梁数、骨小梁分离度是衡量骨组织中骨小梁结构的完整性和连通性的指标,在骨

分解代谢大于骨合成代谢的情况下,骨小梁数和骨小梁厚度数值减少,骨小梁分离度数值增加^[7-9]。结果见图 2。与假手术组相比,模型组和肝肾亏虚组大鼠骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数降低($P<0.05$, $P<0.01$),骨小梁分离度增加($P<0.05$, $P<0.01$),表明 KOA 造模后骨分解代谢大于骨合成代谢。结果见表 8。



A: 对照组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 肝肾亏虚组。标尺=1 mm。
A: Control group; B: Sham-operation group; C: Model group; D: LKD group. Scale=1 mm.

图 2 膝关节组织 Micro-CT 扫描图

Fig.2 Micro-CT scan images of knee joint tissue

表 8 各组大鼠膝关节组织 Micro-CT 定量分析结果($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

Table 8 Quantitative analysis of Micro-CT in knee joint tissue in rats of each group($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

项目 Item	对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	模型组 Model group	肝肾亏虚组 LKD group	<i>F</i>	<i>P</i>
骨体积分数 BV/TV	0.63±0.01	0.63±0.03	0.50±0.03**	0.51±0.04**	22.310	<0.001
骨小梁厚度 Tb.Th/mm	0.13±0.01	0.13±0.01	0.09±0.02**	0.09±0.02**	8.767	<0.001
骨小梁数 Tb.N/mm ⁻¹	3.72±0.07	4.14±0.34	3.38±0.20*	3.24±0.30**	7.722	0.010
骨小梁分离度 Tb.Sp/mm	0.07±0.01	0.07±0.01	0.09±0.01**	0.09±0.01*	10.140	<0.001

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the sham-operation group.

4 讨论

高血压是 KOA 最常见的临床并发症之一,且两者在老年患者群中均以肝肾亏虚证为核心证候。本研究选用 SHR 肌肉注射氢化可的松注射液并施行前交叉韧带切断术,观察到模型大鼠典型的肝肾亏虚证症状、膝关节软骨及软骨下骨典型病理改变的临床 KOA 特点,以及 160~180 mmHg 血管收缩压、120~140 mmHg 舒张压的稳定高血压范围,说明本实验复制出符合中西医临床病证特点的高血压合并 KOA 肝肾亏虚证的共病动物模型。

肾阳虚的发生与下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的紊乱有关,采用药物破坏该轴的正常功能,即可诱导肾阳虚的发生^[9]。代表性药物氢化可的松可以抑制 ACTH、CORT 等激素的合成,诱导典型的肾阳虚症状,氢化可的松注射法是使用最早也是使用率最高的肾阳虚造模方法。由于肝肾同源,肾虚导致肝阴不足,肝阴耗伤累及肾阴,两者相互影响最终形成肝肾亏虚,因此肾阳虚模型与临床肝肾亏虚证的典型症状基本一致,常被用来诱导肝肾亏虚证症状^[10]。本研究利用 SHR,连续 15 d 肌内注射

25 mg/kg 氯化可的松注射液,成功诱导肝肾亏虚证候。相比于模型组,肝肾亏虚组大鼠精神倦怠、活动减少、反应迟钝、阴囊收缩、抓取困难、尖叫易怒,符合肝肾亏虚证患者的临床表现^[11-12]。此外,肝肾亏虚组大鼠 TSH、ACTH、T、CORT 等多种激素水平均受到抑制,体质量和肛温下降,脾脏指数、胸腺指数和肾脏指数均降低($P<0.01$),肝脏相关指标 ALT、AST、AST/ALT、ALP 等虽差异无统计学意义,但也略有提高,与文献报道^[13-14]一致。以上结果表明,高血压肝肾亏虚证大鼠模型被成功诱导。

目前制备高血压动物模型的方法包括 SHR 遗传法、两肾一夹手术或腹主动脉缩窄手术法、高盐高脂及高嘌呤诱导或醋酸去氧皮质酮诱导法等^[15-19]。其中 SHR 由 Wistar 大鼠同系近系多代繁殖培育而成,血压平稳上升,上升后可稳定地维持在高血压状态,与人类原发性高血压模型最接近,西医学临床吻合度达到 90%,是目前最成熟、应用最多的模型^[13]。其他方法存在手术难度大、停药后血压难以维持等缺点。本研究采用 SHR 遗传法制备高血压动物模型,结果发现,实验过程中,SHR 收缩压稳定在 160~180 mmHg 范围内,舒张压稳定在 120~140 mmHg 范围内,始终保持高血压状态,与文献报道^[20]一致。值得注意的是,肝肾亏虚组大鼠血压略高于模型组及假手术组,但差异无统计学意义,提示肝肾亏虚证的发生可能进一步加重了高血压。

KOA 造模方法中以手术法最为经典,关节内手术包括 Hulth 法、改良 Hulth 法、前交叉韧带切断术等。其中 Hulth 法和改良 Hulth 法由于要切断内侧副韧带并摘除内侧半月板,因此对膝关节的损伤最为严重,手术后 6 周即为 KOA 中晚期,不利于观察不同时期 KOA 滑膜、软骨及软骨下骨的病理表现;而前交叉韧带切断术仅切断膝关节前交叉韧带,手术创伤小,造模重复性好,方便观察不同时期的 KOA 病理表现,是国际公认的 KOA 造模方法^[21-23]。因此,本研究利用 SHR,采用前交叉韧带切断术法制备 KOA 模型,结果发现,模型组及肝肾亏虚组大鼠出现炎症、关节肿胀及疼痛、承重及运动能力下降、关节软骨缺损及软骨下骨的骨代谢异常等病理表现,以上表现与临床 KOA 患者病理特征相似^[23]。值得注意的是,相较于模型组,肝肾亏虚组大鼠上述各项病理指标均更为严重,与血压相关指标结果一致。可见,肝肾亏虚证的发生也可能加重了 KOA 的症状。

既往研究中也有关 KOA 与高血压共病的相关研

究^[24],内容主要探讨在高血压加剧 KOA 进展过程中自主神经系统的作用,并未对 KOA 和高血压共病动物模型制备、成模各个阶段的病理生理指标进行持续的监测,无法了解共病对两种疾病本身病理、生理指标的叠加影响,同时也未考虑中医证候在共病进展中的作用。本研究同样利用 SHR 模型,但改用了成模较慢、重复性较好的前交叉韧带切断术制备 KOA 动物模型,以便于监测成模的过程;采用无创血压检测、机械痛敏检测、四足步态分析等方法,对成模的过程进行持续监测;此外,也成功制备了肝肾亏虚证共病模型,并将其与单纯的共病模型进行了比较,明确了中医证候对共病状态下大鼠病理、生理指标的叠加影响。

本研究也存在局限性。比如,临床上共病患者存在高血压和 KOA 发病先后顺序不确定的复杂情况,也就是说高血压可能是原发性的,也可能是继发性的,但本研究所建立的大鼠模型是以 SHR 为基础的,因此和继发性高血压共病患者存在不同的病理背景。此外,由于目前临床上尚无治疗 KOA 合并高血压的针对性药物,故本研究所建立模型没法开展对症(症)药物的反佐验证。最新研究显示,高血压可导致全身血管病变,在 KOA 中能通过增加骨内压力引起组织缺氧,导致软骨下骨血管新生紊乱,进而触发软骨下骨和骨-软骨交界处的“骨-血”重塑,从而加重 KOA 病情发展^[25]。有鉴于此,未来研究将更加重视高血压合并 KOA 的病理机制研究。

综上,本研究成功制备了高血压合并 KOA 肝肾亏虚证的病证结合大鼠模型,其共病典型特点和主要证候表征均较接近临床,相关研究结果将能为揭示中医异病同治科学内涵、解析中药优势品种作用原理、创新型中药新药研发提供有效工具和研究参考。

参考文献:

- [1] GOFF AJ, ELKINS MR. Knee osteoarthritis [J]. J Physiother, 2021, 67(4): 240-241.
- [2] MILLS KT, STEFANESCU A, HE J. The global epidemiology of hypertension [J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(4): 223-237.
- [3] GAO QQ, HU KY, YAN CJ, et al. Associated factors of sarcopenia in community-dwelling older adults: a systematic review and meta-analysis [J]. Nutrients, 2021, 13(12): 4291.
- [4] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝关节炎中医诊疗指南(2020 年版) [J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.

- [5] 许曼珊, 姜婷, 秦盈盈, 等. 膝骨关节炎中西医现状调查研究 [J]. 河北中医, 2022, 44(1): 33-38.
- [6] KOVARI E, KAPOS I A, BEKES G, et al. Comorbidity clusters in generalized osteoarthritis among female patients: a cross-sectional study [J]. Semin Arthritis Rheum, 2020, 50(2): 183-191.
- [7] 黎少聪, 何琪, 潘兆丰, 等. Micro-CT 评价铁超载影响膝骨关节炎模型小鼠软骨类组织的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(29): 4658-4663.
- [8] 张文凯, 党晓谦. 创伤性膝骨关节炎模型兔软骨下骨的影像学结构改变 [J]. 重庆医学, 2022, 51(8): 1285-1289.
- [9] 孔梦, 王平, 谢光璟, 等. 金匱肾气丸对肾虚大鼠空间学习记忆和 Tau 蛋白磷酸化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(10): 4882-4886.
- [10] 陈君洁. 重骨颗粒对肝肾亏虚型膝骨关节炎的临床疗效及软骨基质代谢的影响 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [11] 段颖. 基于“肾虚邪伏”理论探讨补肾清肝汤对 SHR 大鼠血压及炎症因子的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [12] 马小娟, 马文礼, 王丽新. 不同造模周期对羟基脲致肾虚动物模型的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 64-74.
- [13] 王小春. 骨代谢、肾功能指标在中医骨代谢疾病中的应用 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2017.
- [14] 吴晓飞. 肝肾亏虚型腰椎间盘突出症的影像学、生化指标的中医证候要素研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- [15] 刘长召, 王玲, 卢新林, 等. SHR 大鼠发病机制及与血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子关系的实验研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(15): 2417-2422.
- [16] 李立强, 王聪, 谷涌泉, 等. 彩色多普勒超声技术对两肾一夹型肾血管性高血压大鼠模型的评价 [J]. 新医学, 2018, 49(11): 803-806.
- [17] 鲁成, 刘永明, 陈启松. 心脏彩色多普勒评价腹主动脉狭窄大鼠心脏功能及潜阳合剂的干预作用 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(18): 12-15.
- [18] 路曼曼, 朱文芳, 陈梅红, 等. 高盐饮食对大鼠血压及心室重塑的影响 [J]. 江西医药, 2023, 58(3): 265-268.
- [19] 陈后稚, 陈静, 吴永杰, 等. 醋酸去氧皮质酮高血压大鼠动脉结构与功能的变化 [J]. 心血管康复医学杂志, 2011, 20(5): 424-428.
- [20] 张传成, 沈美花, 陈利锋, 等. 手术诱导膝骨关节炎兔模型的制备方法 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(23): 3646-3652.
- [21] 叶劲松, 梁子聪. 3 种不同膝骨关节炎造模方法比较 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(16): 3948-3954.
- [22] 王璐, 徐颖, 徐盼瑜, 等. 基于 Wnt/Ca²⁺ 信号通路探究盘龙七片干预大鼠实验性膝骨关节炎疼痛的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2044-2052.
- [23] GUO HL, YIN WF, ZOU ZL, et al. Quercitrin alleviates cartilage extracellular matrix degradation and delays ACLT rat osteoarthritis development: an *in vivo* and *in vitro* study [J]. J Adv Res, 2021, 28: 255-267.
- [24] YEATER TD, GRIFFITH JL, CRUZ CJ, et al. Hypertension contributes to exacerbated osteoarthritis pathophysiology in rats in a sex-dependent manner [J]. Arthritis Res Ther, 2023, 25(1): 7.
- [25] CHING K, HOUARD X, BERENBAUM F, et al. Hypertension meets osteoarthritis-revisiting the vascular aetiology hypothesis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(9): 533-549.
- (收稿日期: 2024-01-01; 网络出版日期: 2024-03-11)
- 责任编辑: 尤海燕