

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2020.05.005

• 实验研究 •

寒冷刺激引起关节损伤实验研究*

李靖^{1#} 董宇飞^{2#} 李斌¹ 张志强¹ 黄晓桃^{3△} 吴云霞^{2△}

¹武警湖北总队医院,武汉 430061

²华中科技大学同济医学院药学院,武汉 430030

³华中科技大学同济医学院附属湖北省妇幼保健院,武汉 430070

摘要 目的 观察间断性寒冷刺激引起小鼠关节炎病变的情况。方法 将 20 只 8 周龄昆明小鼠随机分为正常对照组和寒冷刺激组,每组 10 只。对照组小鼠自由饮食,无特殊处理。寒冷刺激组小鼠每天固定时间被放置于底层铺满冰袋的小鼠笼中 2 h,寒冷刺激共处理 12 周。每周测量小鼠体重和后踝关节以下体积,寒冷刺激处理结束后脱颈处死小鼠,取其左后腿趾间关节、跖趾关节、踝关节进行组织固定、包埋、切片,HE 染色观察各关节病理变化。剥去小鼠右后腿皮肤,提取踝关节组织匀浆,检测匀浆液类风湿因子(reumatoid factor, RF)、C-反应蛋白(C-reaction protein, CRP)的水平。结果 寒冷刺激对小鼠体重无明显影响($P>0.05$),寒冷刺激使小鼠后爪组织体积显著增加($P<0.05$)。趾间关节、跖趾关节、踝关节 HE 染色显示寒冷刺激后,小鼠关节组织水肿,轻度炎症浸润、滑膜增生,但未见明显血管翳、软骨和骨侵蚀等病理变化。寒冷刺激后,雌、雄性小鼠踝关节组织匀浆液 CRP 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.001$),RF 水平无明显变化($P>0.05$)。结论 间断性寒冷刺激可以引起小鼠趾间关节、跖趾关节、踝关节等关节炎性肿胀,但炎性细胞浸润少、浸润程度轻。此动物模型可作为一种以寒性为特征的不同于类风湿性关节炎等热性关节炎表现的新关节炎模型。

关键词 寒冷刺激;关节炎;类风湿因子;C-反应蛋白

中图分类号 R684.3 **文献标识码** A

Experimental Study on Joint Injury Caused by Cold Stimulation

LI Jing¹, DONG Yufei², LI Bin¹, ZHANG Zhiqiang¹, HUANG Xiaotao³, WU Yunxia²

¹Hubei Armed Police Force Hospital, Wuhan 430061, China

²School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 4300303, China

³Hubei Maternal and Child Health Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430070, China

Abstract **Objective** To observe the condition of arthritis in mice caused by intermittent cold stimulation. **Methods** Twenty Kunming mice aged 8 weeks were randomly divided into normal control group and cold stimulation group, with ten in each group. The control group were free to eat with no special treatment, while the cold-stimulated mice were placed in ice-packed cages for 2 h, per day at a fixed time. The cold stimulation was treated for 12 weeks. The weight of the mice and the volume below the posterior ankle were measured weekly. After the cold stimulation, the mice were removed from the neck and killed. The left hind leg interphalangeal joint, metatarsophalangeal joint and ankle joint were fixed, embedded and sliced. HE staining was used to observe the patho-

* 国家自然科学基金资助项目(No. 81373873)

共同第一作者

△共同通信作者, Corresponding author, E-mail: huang68xt@sina.com; wuyunxia@hust.edu.cn

logical changes of each joint. The skin of the right hind leg of the mice was stripped and the ankle tissue homogenate was extracted to detect the level of rheumatoid factor(RF)and C-reactive protein(CRP). **Results** Cold stimulation had no obvious effect on the body weight of mice($P>0.05$). And cold stimulation had significant increase in the volume of posterior paw tissue in mice($P<0.05$). HE staining of interphalangeal joint, metatarsophalangeal joint and ankle joint showed tissue edema, mild inflammatory infiltration, synovial hyperplasia. But no obvious pathological changes such as pannus, cartilage and bone invasion were found. The level of CRP in ankle tissue homogenate increased significantly by cold stimulation in both female and male mice($P<0.05$, $P<0.001$), with no obvious influence on the level of RF($P>0.05$). **Conclusion** Intermittent cold stimulation can cause inflammatory swelling of interphalangeal joint, metatarsophalangeal joint and ankle joint in mice. But the infiltration of inflammatory cells is less, and the degree of infiltration is light. It can be used as a new arthritis model characterized by cold, which is different from that of rheumatoid arthritis.

Key words cold stimulation; arthritis; rheumatoid factor; C-reactive protein

关节炎属于中医“痹症”范畴,可分为寒热两端。关节炎反复发作,关节红肿、僵痛,钻心蚀骨,关节屈伸障碍,日久畸形、功能受限。其中,寒性关节炎是人体感受风、寒、湿邪后引起的以肌肉、关节疼痛为主要表现的疾病,其特点是寒冷或天气变化时病情加重,临床表现大多以疼痛为主,受累关节局部无红、肿、热的炎症表现,实验室检查显示大多数患者血沉正常、抗链“O”阴性、类风湿因子阴性。中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会主任、著名风湿病专家王兆铭研究员于 1974 年将本病命名为“风湿寒性关节炎”。经过多年的临床观察与实践,多数学者认为这个命名比较确切,在临床上便于与风湿热性关节炎如类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等进行鉴别,有实用价值^[1]。风湿热性关节炎患者受累关节局部有红、肿、热、痛的炎症表现,实验室检查血沉升高、抗链“O”阳性、类风湿因子阳性。目前实验研究中常用的各种关节炎模型包括鸡蛋清模型、角叉菜胶模型、佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)模型、胶原诱导关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型等病理过程中均有大量的炎症浸润,应归属于风湿热性关节炎^[2];基于此,本研究探索一种不同于风湿热性关节炎的寒性关节炎病理模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明小鼠 20 只,8 周龄,雌雄各半,体重 18~22 g,清洁级,由华中科技大学同济医学院动物中心提供,动物合格证号:No. 1140150005182。

1.2 动物分组及处理方法

适应性饲养一周后,随机分成正常对照组和寒冷刺激组,每组 10 只,雌、雄各半。对照组小鼠自由饮

食,无特殊处理。寒冷刺激组:每天下午 5~7 点,将小鼠置于底层铺满冰袋的笼中 2 h。每周测量小鼠体重和后腿踝关节以下体积,12 周后,脱颈处死小鼠。取左后腿趾间关节、跖趾关节、踝关节组织进行固定、包埋、切片,HE 染色观察各关节病理变化。提取右后腿踝关节组织匀浆,检测匀浆液类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、C 型反应蛋白(C-reaction protein, CRP)水平。

1.3 主要试剂及仪器

水合氯醛(上海化学试剂公司生产,批号:20110315),电子天平(METTLER TOLEDO AG285 型),游标卡尺(江苏数显卡尺公司),足趾容积测量仪(YLS-7 B 型)。

1.4 统计学方法

运用 SPSS 20.0 统计学软件处理实验数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的一般情况

正常对照组小鼠行动自如,毛色光滑,饮食与排泄正常,精神状态好。寒冷刺激组小鼠刚被放入铺满冰袋的笼子时,在笼内四处窜走,四肢爪子试图抓住笼盖上的铁丝,然后安静下来,最后以后足站立,用嘴舔爪子,笼内可见较多大小便排泄物;每日冰冻结束后小鼠运动功能恢复,其余未见明显异常。经寒冷刺激处理 4 周后,小鼠精神差,畏寒明显,蜷缩于笼具角落,成堆挤在一起,行动迟缓,后爪苍白、肿胀,部分小鼠前足亦出现肿胀。与正常对照组比较,寒冷刺激组小鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

2.2 小鼠足跖肿胀情况和体积变化

正常对照组小鼠后足跖体积无肿胀,且雌、雄间无明显差异。寒冷刺激组小鼠后足跖逐渐肿胀,12 周后肿胀青紫明显;雄性小鼠在 2 周末即开始出现后爪

体积明显增加($P<0.05$),5 周末达高峰($P<0.001$),后又下降,体积波动较大;雌性小鼠在 5 周末开始出现后爪体积明显增加($P<0.05$),体积增加平稳。见图 2。

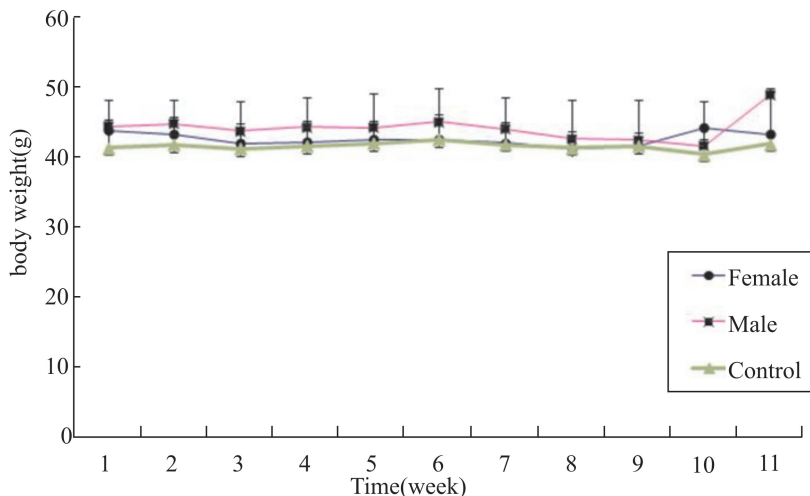
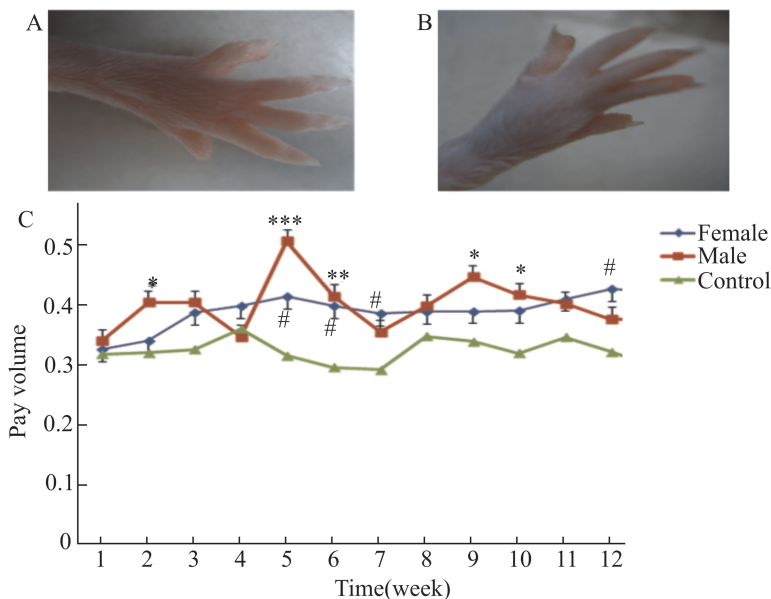


图 1 寒冷刺激对小鼠体重的影响



A: 正常对照组小鼠后爪;B: 12 周寒冷刺激后小鼠后爪;C: 各组小鼠后爪体积随时间变化情况。与正常雄性对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与正常雌性对照组比较 # $P<0.05$ 。

图 2 寒冷刺激对小鼠足跖关节体积的影响

2.3 小鼠趾间关节病理变化

HE 染色结果显示:正常对照组小鼠趾间关节滑膜光滑,滑膜下脂肪组织排列整齐,无炎性细胞浸润,关节软骨完整,软骨表面光滑,关节腔内未见游离物;寒冷刺激组雌、雄性小鼠趾间关节滑膜增生,滑膜内可见少量炎症细胞浸润,滑膜不光滑,呈现乳头状,关节腔增大、水肿,关节软骨完整,软骨表面光滑,未见明显骨侵蚀。见图 3。

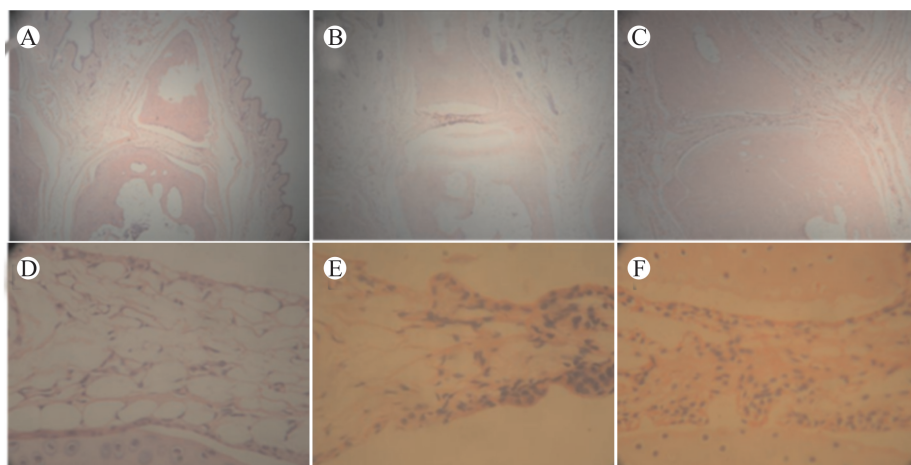
2.4 小鼠跖趾关节病理变化

HE 染色结果显示:正常对照组小鼠跖趾关节滑膜光滑,细胞稀疏,组织均匀,无炎性细胞浸润,关节软骨完整,软骨表面光滑;寒冷刺激组小鼠跖趾关节滑膜细胞增生,滑膜增厚,滑膜内可见少量炎症细胞浸润,关节腔肿胀增大。见图 4。

2.5 小鼠踝关节病理变化

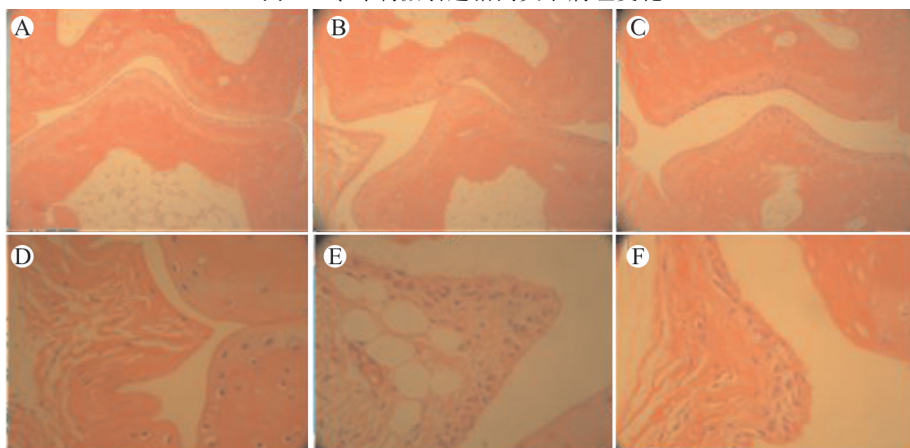
正常对照组小鼠踝关节滑膜光滑,滑膜下脂肪组

织排列整齐,无炎性细胞浸润,关节软骨完整,软骨表面光滑;寒冷刺激组小鼠踝关节滑膜细胞增生,滑膜增厚,见不规则突起。见图 5。



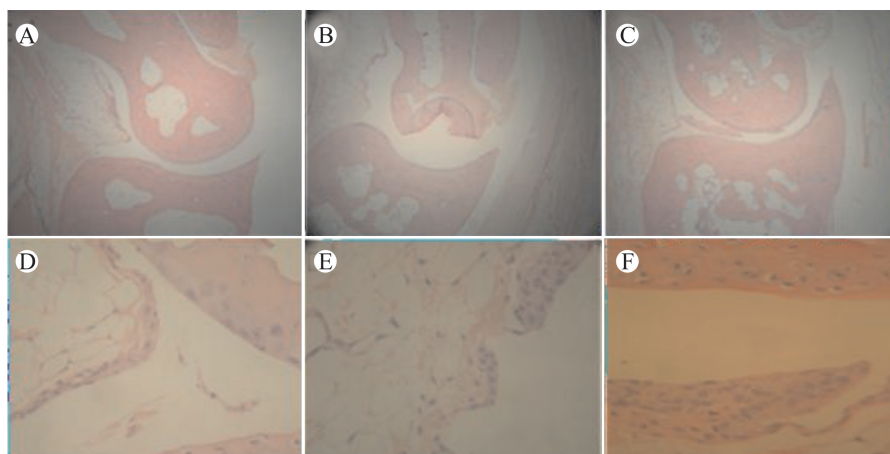
A、D 为正常对照组小鼠后爪趾间关节;B、E 为 12 周寒冷刺激后雌性小鼠后爪趾间关节;C、F 为 12 周寒冷刺激后雄性小鼠后爪趾间关节。A、B、C(HE×40);D、E、F(HE×400)。

图 3 寒冷刺激引起指间关节病理变化



A、D 为正常对照组小鼠后爪趾间关节;B、E 为 12 周寒冷刺激后雌性小鼠后爪趾间关节;C、F 为 12 周寒冷刺激后雄性小鼠后爪趾间关节。A、B、C(HE×40);D、E、F(HE×400)。

图 4 12 周寒冷刺激引起趾间关节病理变化



A、D 为正常对照组小鼠后爪踝关节;B、E 为 12 周寒冷刺激后雌性小鼠后爪踝关节;C、F 为 12 周寒冷刺激后雄性小鼠后爪踝关节。A、B、C(HE×40);D、E、F(HE×400)。

图 5 12 周寒冷刺激引起踝关节病理变化

2.6 小鼠踝关节组织匀浆液 RF、CRP 检测结果

12 周寒冷刺激后,雌性小鼠踝关节组织匀浆液 CRP 水平明显升高($P<0.05$),雄性小鼠踝关节组织

匀浆液 CRP 水平极明显升高($P<0.001$)。12 周寒冷刺激对雌、雄性小鼠踝关节组织匀浆液 RF 水平无明显影响($P>0.05$)。见表 1。

表 1 寒冷刺激对小鼠踝关节组织匀浆液 RF、CRP 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	RF(IU/mL)		CRP(mg/mL)	
	雄性($n=5$)	雌性($n=5$)	雄性($n=5$)	雌性($n=5$)
正常对照组	17.00 $\pm$ 1.00	15.67 $\pm$ 1.15	0.15 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.03
寒冷刺激组	17.02 $\pm$ 1.18	18.33 $\pm$ 2.04	1.05 $\pm$ 0.63***	0.18 $\pm$ 0.04 [#]

与正常雄性对照组比较*** $P<0.001$;与正常雌性对照组比较[#] $P<0.05$ 。

3 讨论

目前类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的致病原因尚未完全明确,但 RA 典型病理表现是随着血管增生,滑膜细胞增生,炎性细胞包括中性粒细胞, T、B 淋巴细胞,单核细胞等在关节组织内浸润,并释放多种炎性细胞因子,炎性细胞因子释放增加形成级联式放大效应,最终引起软骨或骨组织的侵蚀、破坏^[3]。RA 被认为是一种自身免疫功能障碍性疾病,以全身多关节病变为主并伴有多系统受累,主要表现为滑膜增生,关节破坏,功能丧失等。RA 的早期病理改变即为滑膜增生,滑膜为细胞及血管翳的增殖提供养分、氧气^[4]。目前对于 RA 的诊断主要是通过关节不适症状如晨僵、关节疼痛等和血清 RF、CRP 及 X 线片、CT、MRI 等辅助检查并结合遗传等情况进行综合判断。关节炎属于中医“痹症”范畴,其病因病机为“虚、邪、瘀”三个方面。“虚”即先天禀赋不足,或劳逸过度、病后、产后等因素导致正虚,正气不能抗邪;“邪”即外邪入侵,指外感风、寒、暑、湿、燥、火六淫之邪;虚邪互生,致瘀血痹阻,经脉凝滞,由“瘀”生“痹”。

本实验研究通过长期间断性冰块刺激模拟寒邪刺激以引起关节炎病变,结果显示,连续 12 周寒冷刺激可以引起雌、雄性小鼠后爪组织肿胀,趾间关节、跖趾关节、踝关节组织水肿,滑膜轻度炎症细胞浸润和增生,但未见软骨和骨侵蚀等严重关节损伤的病理变化,且 RF 未见明显升高,表明单独寒邪可以引起关节病变,其病理表现不同于 AA、CIA 关节炎,即炎细胞浸润少、浸润程度轻,提示寒冷刺激通过一种不同于

AA、CIA 关节炎机制引起轻度关节病变,并非引起 RA 等热性关节炎病变。另外本研究还发现,雄性小鼠对寒冷刺激反应较快,2 周即出现关节体积明显增加,但弹性较大,后期甚至可以恢复;雌性小鼠反应较平稳,5 周末关节体积明显增加,后期持续存在。表明雌、雄性小鼠关节损伤反应模式存在差异。

总之,本实验研究通过探索寒性关节炎病理模型,建立了一种不同于传统鸡蛋清、角叉菜胶、AA 及 CIA 等风湿热性关节炎模型,充实了关节炎的实验动物模型研究,且单独运用寒邪诱导的关节炎模型病理改变较轻,后期筛选药物尚可以联合其他损伤方法建立联合模型。

参 考 文 献

[1] 应森林. 王兆铭治疗类风湿性关节炎和强直性脊柱炎的学术思想[J]. 天津中医药, 2003, 20(1): 7-9.

[2] 徐叔云, 卞如镰, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 919-921.

[3] Anderson AE, Maney NJ, Nair N, et al. Expression of STAT 3-regulated genes in circulating CD4+ T cells discriminates rheumatoid arthritis independently of clinical parameters in early arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58(7): 1250-1258.

[4] de Bandt M, Grossin M, Weber AJ, et al. Suppression of arthritis and protection from bone destruction by treatment with TNP-470/AGM-1470 in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(9): 2056-2063.

(收稿日期: 2020-07-31)