

# 山羊颞下颌关节骨关节炎动物模型的建立

张志光, 田 慧, 何一青, 郑有华

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东 广州 510055)

**摘 要:** 【目的】建立颞下颌关节骨关节炎动物模型。【方法】10 只山羊随机分为 2 组, 实验组以手术去除左髁状突部分软骨, 术后 1、2、3、5 个月用内窥镜检查, 组织病理切片观察 2 组山羊双侧关节病理改变。【结果】对照组无病理改变。实验组术后 1 个月, 双侧关节出现轻度骨关节炎表现, 第 5 个月末, 双侧关节均表现为晚期骨关节炎改变, 5 只左侧, 3 只右侧关节盘穿孔。【结论】手术切除一侧关节髁状突部分软骨可导致双侧关节程度相似的骨关节炎病理改变。

**关键词:** 颞下颌关节; 骨关节炎; 疾病模型, 动物; 山羊

中图分类号: R78

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-0431-04

## Establishment of an Animal Model of Temporomandibular Joint Osteoarthritis

ZHANG Zhi-guang, TIAN Hui, HE Yi-qing, ZHENG You-hua

(Guanghua School of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

**Abstract:** 【Objective】To establish an animal model of temporomandibular joint osteoarthritis (TMJOA). 【Methods】Ten adult healthy female goats were randomly divided into two groups of 5 each. The condylar cartilages in the left side of the TMJ of the goats were removed in the experimental group. Arthroscopic and histological examination were carried out in both groups respectively in the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> month after operation. 【Results】An animal model of TMJOA was successfully established. It showed no significant pathologic change in the control group during every period. In the experimental group, both sides of the TMJ showed similar abnormal changes such as: synovial hyperplasia, vascularity and capillarectasia in the synovial membrane, denudation of the subchondral bone, and chronic inflammation in the marrow space. 5/5 (100%) goats were found disc perforation in the left TMJ and 3/5 (60%) in the right. 【Conclusion】The animal model of TMJOA established by operation in goat can reflect the development of TMJOA. The damage in one side of the temporomandibular joint may induce similar pathological change in both sides of the TMJs.

**Key words:** temporomandibular joint; osteoarthritis; disease model, animal; goat

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci) 2004, 25(5):431-434, 444]

颞下颌关节骨关节炎是口腔颌面部发病率较高的一组疾病, 该病发展缓慢, 病程迁延。受解剖结构及病程发展的限制, 病变早期对活体颞下颌关节进行取材困难, 组织标本不易获得, 限制了该病发病机制的研究。因此, 建立理想的动物模型对于颞

下颌关节疾病的研究尤为重要。目前国内外研究学者采用了多种方法试图建立颞下颌关节骨关节炎的动物模型, 但均存在不同的优缺点。为此, 本文试图通过手术切削关节面软骨, 建立病变典型、重复性好的颞下颌关节骨关节炎动物模型, 以便了解骨关

收稿日期: 2003-06-08

基金项目: 香港杨震基金资助项目(9706)

作者简介: 张志光(1955-), 男, 广东博罗人, 教授, 博士生导师. E-mail: drzhangzg@163.com

节病的发生、发展过程中的组织学动态改变,为进一步进行颞颌关节骨关节病的基础研究提供实验模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

雌性山羊 10 只(原中山医科大学动物中心提供),体质量 10~15 kg,平均 11.5 kg,年龄为 2 岁左右,健康,无口颌疾病,标准青饲料喂养,圈养 1 周后开始实验。

### 1.2 分 组

动物随机分为 2 组,每组 5 只。对照组双侧关节不做处理,第 3 月对照组死亡 1 只,未补充。实验组手术去除部分左髁状突软骨。

### 1.3 手术方法

30 g/L 戊巴比妥钠按 1.5 mL/kg 行腹腔注射麻醉,显露左颞下颌关节(temporomandibular joint, TMJ)区,剪毛,消毒铺巾。在颞弓下 0.5 cm 作 1.0 cm 平行切口,切开至肌层表面,钝性分离至髁状突颈部,紧贴其表面钝性分离关节囊附着进入关节下腔。磨去髁状突正中表面软骨约 0.6 cm×0.6 cm×0.1 cm,关节囊复位后缝合切口,术毕肌注庆大霉素 2 万 U,1 周后拆线。

### 1.4 关节镜检查

2 组同时于第 1、2、3、5 月行关节镜(Stryker 公司,美国)检查。选择关节腔前、中、后病变典型部位定格打印照片,观察过程录像,检查时保持乳酸林格氏液持续灌注。

### 1.5 观察指标

①临床观察 进食及牙齿磨损情况。②关节镜:病变分级参照 Kurita 标准<sup>[1]</sup>,滑膜炎分级参照 Dolwick 标准<sup>[2]</sup>。③组织病理:第 5 月处死动物,取关节标本做正中矢状切面常规 HE 染色切片。病变分级参照 Kurita 标准。

## 2 结 果

### 2.1 临床观察

对照组:关节镜检查后 2 d 咀嚼变缓,随即恢复正常。实验组:手术后咀嚼明显缓慢、无力,1 周后渐恢复;3 月后闻及关节区摩擦音,进行性加重,5 月时间闻及明显骨摩擦音。

### 2.2 关节镜观察结果

对照组:双侧关节上腔在各时段无明显变化。上腔清洁,关节结节、关节盘和滑膜平整、光滑,珍珠样光泽;滑膜表面有小血管网,关节盘、关节结节表面无血管(图 1)。

实验组:初时所见与对照片相似。1 月后见关节凹及关节盘表面少许白色絮状物,第 2、3 月渐多,悬浮关节腔内;滑膜血管增生、扩张,骨关节病及滑膜炎属 2 级。5 月末,大量絮状物悬浮腔内或粘于关节凹和关节盘表面,关节凹多处骨质裸露,滑膜血管扩张、增生明显。5 只(100%)左侧盘穿孔,有 3 只(60%)右侧盘穿孔,关节腔变窄,关节盘与关节凹粘连。两侧病变程度基本相同。骨关节病及滑膜炎均达 3 级(图 2)。

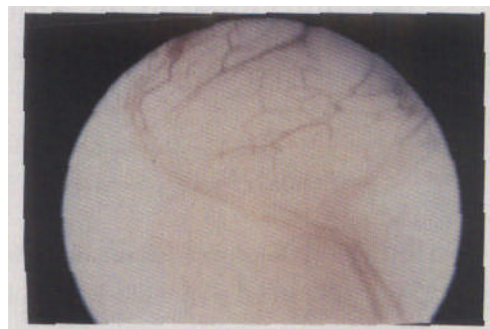


图 1 正常关节滑膜血管

Fig. 1 Blood vessel of synovium of TMJ

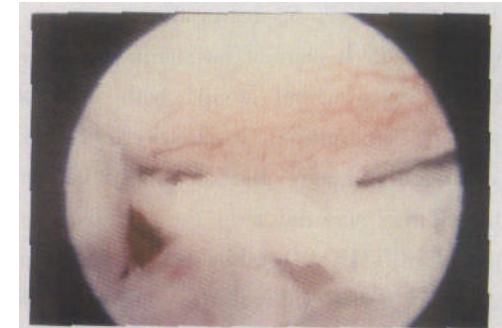


图 2 病变滑膜血管增生、扩张,关节软骨剥脱呈絮状

Fig. 2 The blood vessels on synovium were hyperplasia and dilatational. The TMJ cartilage exfoliated

### 2.3 大体病理

①对照组:关节上腔宽大松弛,关节盘半透明双凹形,髁状突椭圆形,与人类相似;滑膜表面光滑,关节结节及关节凹平整,淡黄色,关节凹较人类者平坦。②实验组:关节镜下所见盘穿孔均证实,均位于关节盘后部正中稍偏外侧方,穿孔处相应关节凹表面变黄、粗糙,光泽差,未穿孔关节盘的后带及双板区之间凹陷变薄。

## 2.4 组织病理切片

对照组:髁状突软骨层次清楚,由表及里依次为纤维、增殖、肥大和钙化层。滑膜表面覆一层连续的类上皮细胞样结构,绒毛突起向关节腔,滑膜层可见血管。实验组:双侧关节病理表现均达3级。①滑膜:绒毛增生、破坏,血管显著增生、扩张,慢性炎症细胞浸润,滑膜腔见渗出物(图3、4)。②关节凹:软骨萎缩变薄,甚至消失,下方骨质暴露;部分软骨增厚、水肿,出现横裂、纵裂,软骨剥脱,可见原纤维形成及软骨细胞丛(图5)。③关节盘:多处与关节凹、髁状突粘连。胶原纤维排列紊乱,前

带和中带无定向排列,玻璃样变性、坏死,形成裂隙或穿孔。中带及后带见大量软骨细胞及基质,细胞体积增大,说明有软骨化现象(图6)。④髁状突:手术部位软骨反应性增生变厚或萎缩,可见横裂、纵裂,层次紊乱,下方骨质破骨细胞增生活跃,慢性炎症细胞浸润。其余部位胶原纤维间水肿、松解,形成纵裂及横裂,软骨顺横裂剥脱,胶原纤维变性,呈弥漫无结构均质样;软骨基质变性溶解,呈紫染颗粒状;或表面纤维层松解,软骨层出现裂隙,细胞成分减少,丛状排列,局部见软骨层增厚,肥大层骨化明显,改建与破坏同时存在(图7、8)。

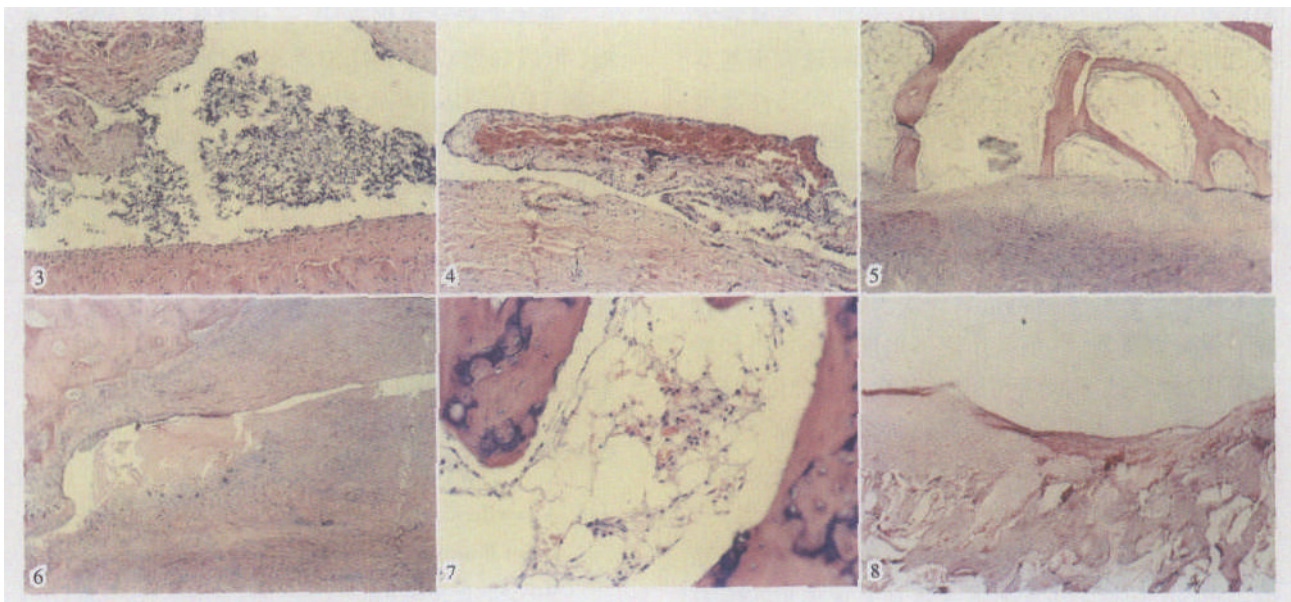


图3 病变滑膜腔内可见大量渗出物

图4 病变滑膜毛细血管扩张

图5 关节盘与关节凹骨质粘连

图6 病变关节盘变性、坏死、部分脱落,关节软骨水肿增生

图7 关节骨髓腔内慢性炎症

图8 髁状突表面软骨萎缩、骨质裸露

Fig. 3 There were lots of exudation in the chamber of synovium

Fig. 4 The capillaries on the synovium were expanded

Fig. 5 The TMJ disc adhered to the bone matrix of the articular fovea

Fig. 6 The TMJ disc was degenerated and necrosis and the cartilage of TMJ was edema and hyperplasia

Fig. 7 There was chronic inflammation in the medullary cavity of TMJ

Fig. 8 The cartilage on the condyle surface was atrophic and the bone matrix was exposed

## 3 讨论

### 3.1 山羊颞下颌关节骨关节病模型评价

由于取材限制,人类颞下颌关节骨关节病

(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA) 研究主要通过尸解及手术切除的关节盘,难以观察其发病过程。建立 TMJOA 动物模型能加深对 TMJOA 的认识。常用的动物有小白鼠、兔、狗、绵羊、山羊及恒河猴等。山羊 TMJ 形态及功能与人类相似<sup>[3]</sup>,关

节上腔宽大松弛,便于关节镜检查。此外,山羊性情温顺,生活能力及抗病能力强,价格适宜,伦理上易接受;同时 TMJOA 发病率存在明显性别差异,女性多见,故本实验选用雌性山羊。

本模型以手术法建立,术中切开皮肤、皮下后,钝性分离关节囊在髁状突颈部的附着,直接进入关节下腔,保持了上腔的完整性,避免了切开关节囊,直接切除部分关节盘造成实验性穿孔<sup>[4,5]</sup>;关节盘全切除以及切开关节盘不同附着部位后关节盘前移固定,使上、下腔均暴露,造成滑液的流失;也避免了关节腔内注射诱导方法对滑液的影响。处理组手术后 5 月,双侧 TMJ 在临床体征、关节镜、组织病理检查均出现相似的晚期 TMJOA 病变,与其它方法诱导的动物 TMJOA<sup>[6]</sup>及实际临床病理表现基本相同,说明本模型具有良好的一致性、可比性及可重复性。

### 3.2 一侧髁状突软骨部分去除导致 TMJOA 的机制

关节软骨小部分去除引发 TMJOA 的确切机制尚不甚明了<sup>[7,8]</sup>。Ishimaru 等<sup>[8]</sup>认为软骨缺损后,软骨下骨失去覆盖,在负荷作用下出现微小骨折和滑液渗透,骨质破坏,继而引起关节盘及关节凹损耗,形成 TMJOA。本实验中,一侧髁状突软骨部分去除后,喂养条件不变,保持关节负荷不变,受损关节在正常负荷下继续行使功能。由于软骨表面损伤,软骨渗透性改变<sup>[9]</sup>,使关节在承受负荷时软骨内水分流出增多、加快,软骨细胞及软骨下骨承受的压力增加,导致软骨缓冲负荷、分散压力的能力下降。本实验所见软骨修复不完全,修复组织无明显的结构层次,这是因为软骨细胞修复能力有限,损伤后不能完全再生。表面软骨损伤后,软骨细胞承受的压力增加,持续增加的负荷使其合成细胞外基质的能力下降,蛋白酶分泌增多,蛋白酶抑制物分泌减少。细胞外基质的合成与分解代谢失衡,分解代谢增强,蛋白多糖及胶原降解增加,含量减少,使基质结合水的能力下降,软骨渗透性增加,承受负荷时,分散应力的能力进一步下降。Axelsson 等<sup>[10]</sup>发现兔实验性 TMJOA 时,大分子蛋白多糖减少,小分子蛋白多糖增加,证实蛋白多糖降解增加,软骨细胞合成蛋白多糖能力下降。

### 3.3 一侧髁状突软骨去除对对侧关节的影响

一侧关节手术是否影响对侧关节存在不同看法。以往在 TMJOA 的动物实验中多采用一侧 TMJ

作实验侧,对侧作对照,结果对照侧未发生病理改变<sup>[5,6]</sup>。马萧等<sup>[11]</sup>在大白鼠实验性偏侧咀嚼对 TMJ 影响的研究中发现:双侧髁状突软骨增殖区的前软骨细胞固缩、数量减少,增殖区变薄,关节盘表面沟回排列不规则。另有报道一侧髁状突手术后,对侧关节发生了骨关节病改变<sup>[12]</sup>。Lefkoe 等<sup>[13]</sup>通过去除兔股骨头的软骨发现,去除 0.2 cm 直径范围,20 周后同一部位发生骨化,但没有完全修复;去除 0.5 cm 直径范围,20 周后发现 0.3 cm 直径范围缺损。Ishimaru 等<sup>[8]</sup>发现绵羊一侧髁状突软骨去除后 1 周恢复正常饮食,3 月后对侧关节未见病理改变。

而本实验结果则表明,一侧髁状突部分软骨缺损,可以导致双侧 TMJ 出现相似的病理改变,支持一侧 TMJ 结构破坏可影响对侧 TMJ 的观点。可能是由于 TMJ 作为一个左右联动的关节,在关节总负荷不变的情况下,一侧关节损伤,使双侧关节的负荷分配改变,正常侧负荷增加,以减轻损伤侧负荷;在损伤侧关节,降低的负荷仍可能超过其代偿能力。如此长期的关节负荷绝对或相对增加,超过了关节修复改建能力,导致关节发生退行性改变,形成病理性 TMJOA。

### 参考文献:

- [1] Alexander C, Caughey D, Withy S, *et al.* Relation between flexion angle and intraarticular pressure during active and passive movement of the normal knee [J]. *J Rheumatoid*, 1996, 23(5): 889-95.
- [2] Inokuchi W, Sanderhoff O B, Sojbjerg J O, *et al.* The relation between the position of the glenohumeral joint and the intraarticular pressure: an experimental study [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 1997, 6(2): 144-9.
- [3] 于端,王大章. 山羊——一种进行颞颌关节研究良好的动物 [J]. *华西口腔医学杂志*, 1993, 11(4): 299-301.
- [4] Axelsson S, Holmlund A, Hjerpe A. An experimental model of osteoarthritis in the temporomandibular joint of the rabbit [J]. *Acta Odontol Scand*, 1992, 50(5): 273-80.
- [5] Lang T C, Zimry M L, Vijayagopal P. Experimental temporomandibular joint disc perforation in the rabbit: a gross morphologic, biochemical and ultrastructural analysis [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 1993, 51(10): 115-28.
- [6] Ali A M, Sharawy M M. Histopathological changes in

(下转第 444 页 to page 444)

质的交联 [3], 我们应用 SPDP 作为交联剂, 将抗 CD4 单抗与 PAP 联接成抗 CD4-PAP 免疫毒素, 并不影响结合物中抗 CD4 单抗本身的特异性和亲和力, 抗 CD4 单抗和抗 CD4-PAP 结合物均能和 CEM 细胞结合, 表明抗 CD4 单抗有导向作用, 它能携带荧光或细胞毒素与 T 源性细胞 CEM 特异性结合, 而与对照的 Raji 细胞仅有轻度结合。为此推断在器官移植中抗 CD4 单抗可能替代抗 CD3 单抗, 以增强抑制或杀伤效应, 避免发生全 T 细胞 (包括 CD3 和 CD8 等细胞) 缺失, 而造成器官移植受者感染的危险; CD4 T 细胞虽然是分泌 IL-2 的重要细胞, 但是抗 CD4 单抗 -PAP 仅杀伤 CD4 细胞, 而不杀伤其他产生 IL-2 的 T 淋巴细胞, 因此不至于造成重要的细胞 IL-2 的缺失。

用于构建 IT 的毒素多为植物毒素或细菌毒素, 如蓖麻毒素 A 链 (ricin A) 商陆抗病毒蛋白 (PAP)、白喉毒素 (DT) [4]、绿脓杆菌外毒素 A (PEA) 等, 它们分别以酶样作用方式使真核细胞核糖体 60 s 亚基和肽链延长因子 EF-2 失活, 从而抑制蛋白合成, 导致细胞死亡。目前研究较多的是蓖麻毒素 (ricin)。用完整的 ricin 毒素 (含有 A 与 B 链) 制备的 IT, 毒性强烈, 但 B 链具有结合细胞的非特异性 [5, 6]。PAP 是一种天然的、无 B 链的植物单链毒素, 不仅其杀伤力可与 ricin A 相比美 [7], 而且有易于提取、稳定性好、非特异性小等优点。

本研究构建了抗 CD4-PAP 免疫毒素, 并测定了抗 CD4-PAP 对骨髓祖细胞的抑制效应, 结果表明在有效浓度范围内, 抗 CD4-PAP 对骨髓祖细胞 CFU 的增殖无明显影响。

#### 参考文献:

- [1] 张玲, 李官成, 朱兆玲, 等. 抗 CD3、CD7 单抗 -PAPs 免疫毒素的构建及其联合杀伤效应的研究 [J]. 中山大学学报 (医学科学版) 2003, 24 (1) : 39-41.
- [2] 张玲, 朱兆玲, 林学颜. 抗人 B159- 表阿霉素与 <sup>125</sup>I 标志物对人 B 淋巴瘤细胞的体内外效应研究 [J]. 中国免疫学杂志 2002, 18 (10) : 703, 707.
- [3] Rosenblum M G, Marks J W, Cheung L H. Comparative cytotoxicity and pharmacokinetics of antimelanoma immunotoxins containing either natural or recombinant gelonin [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 44(4) : 343-8.
- [4] Liu Y Y, Gordienko I, Mathias A, et al. Express of an anti-CD3 single-chain immuneotoxin with a truncated diphtheria toxin in a mutant CHO cell line [J]. Protein Expr Purif, 2000, 19(2) : 304-11.
- [5] Vallera D A, Burns L J, Frankel A E, et al. Laboratory preparation of a deglycosylated ricin toxin A chain containing immunotoxin directed against a CD7 T lineage differentiation antigen for phase I human clinical studies involving T cell malignancies [J]. J Immunol Methods, 1996, 197(1-2) : 69-83.
- [6] Woo B H, Lee J T, Na D H, et al. Sepharose-unbinding ricin E as a source for ricin A chain immunotoxin [J]. J Immunol Methods, 2001, 249(1-2) : 91-8.
- [7] Schlick J L, Dulieu P, Desvoves B, et al. Cytotoxic activity of a recombinant GnRH-PAP fusion toxin on human tumor cell lines [J]. FEBS Letters, 2000, 472 (2-3) : 241-6.

(编辑 黄小延)

(上接第 434 页 from page 434)

rabbit craniomandibular joint associated with experimentally induced anterior disk displacement (ADD) [J]. J Oral Pathol Med, 1994, 23(8) : 364-74.

- [7] Phillips TW, Gurr K. A Preconditioned arthritic hip model [J]. J Arthroplasty, 1989, 4(2) : 193-6.
- [8] Ishimaru J, Goss A N. A model for osteoarthritis of the temporomandibular joint [J]. J Oral Maxillofac Surg, 1992, (50) : 1191-5.
- [9] 孟和, 顾志华, 主编. 骨伤科生物力学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 188-90.
- [10] Axelsson S, Bjornsson S, Homlund A, et al. Metabolic turnover of sulfated glycosaminoglycans and proteoglycans

in rabbit temporomandibular joint cartilages with experimentally induced osteoarthritis [J]. Acta Odontol Scand, 1994, 52(2) : 65-71.

- [11] 马萧, 皮昕. 偏侧咀嚼对下颌关节形态影响的实验研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 1993, 28(3) : 151-3.
- [12] 韩传火, 李金荣, 胡传真, 等. 一侧颞下颌关节手术对非手术侧关节的影响 [J]. 中华口腔医学杂志, 1995, 30(5) : 271-3.
- [13] Lefkoe T P, Walsh W R, Anastasatos J, et al. Remodeling of articular step-off. Is osteoarthritis dependent on defect size [J]. Clin Orthop, 1995, 314(5) : 253-65.

(编辑 刘清海)