

阿司匹林抗小鼠 ACLT 骨性关节炎的作用研究

吴龙雨, 黄玉兰, 蔡雯云, 傅玉*

西南大学药学院 重庆

【摘要】骨性关节炎 (Osteoarthritis, OA) 是由衰老、肥胖、遗传等多因素引起的常见慢性退行性疾病。阿司匹林 (Aspirin) 是一种具有抗炎镇痛等作用的非甾体类水杨酸药物。为探究阿司匹林对骨性关节炎的治疗作用, 本研究通过切断小鼠右膝关节的前交叉韧带建立骨关节炎 ACLT 模型 (Anterior Cruciate Ligament Transection, 前交叉韧带切除术), 使用 25mg/kg、50mg/kg、100mg/kg 的低、中、高剂量阿司匹林治疗小鼠 28 天, 通过记录小鼠 28 天中的体重变化、行走距离和站立次数等评估骨性关节炎症状, 28 天后处死小鼠, 利用 HE、番红 O-固绿染色观察小鼠膝关节软骨组织的变化评估阿司匹林的疗效。利用 HE 染色法观察小鼠内脏组织 (心、肝、脾、肺和肾) 的病理形态变化评估阿司匹林的潜在毒副作用。结论: 小鼠骨关节炎 ACLT 模型造模成功, 中、高剂量阿司匹林对小鼠骨关节炎有良好的缓解作用, 但长时间使用过高剂量阿司匹林对小鼠的肝、肾有副作用。

【关键词】骨性关节炎; 阿司匹林; 前交叉韧带切断; 炎症

【收稿日期】2023 年 8 月 4 日 **【出刊日期】**2023 年 9 月 10 日 **【DOI】**10.12208/j.jmbr.20230004

Study on the effect of aspirin on ACLT osteoarthritis in mice

Longyu Wu, Yulan Huang, Wenyun Cai, Yu Fu*

Southwest University School of Pharmacy Chongqing

【Abstract】 Osteoarthritis (OA) is a common chronic degenerative disease caused by aging, obesity, genetics and other factors. Aspirin is a non-steroidal salicylic acid drug with anti-inflammatory and analgesic effects. In order to explore the therapeutic effect of aspirin on osteoarthritis, the ACLT (Anterior Cruciate Ligament Transection osteoarthritis model) was established on the right knee joint of mice. After that, the mice were treated with low, medium and high doses of aspirin (i.e., 25mg/kg, 50mg/kg and 100mg/kg) for 28 days, respectively. The osteoarthritis symptoms were evaluated by recording the changes of three indicators, including body weight, walking distance and standing times of mice. To evaluate the effect of aspirin on mouse knee cartilage, HE staining and safranin O-fast green staining were used to assess changes of the mice knee cartilage tissue. To evaluate the toxicity of aspirin on visceral tissue, HE staining was used to assess for pathological morphologic changes of mouse visceral tissue. **Conclusion:** The ACLT model of mouse osteoarthritis was successfully established. Moderate and high doses of aspirin have excellent therapeutic effects on mouse osteoarthritis, but long-term use of high dose of aspirin has side effects on mouse liver and kidney.

【Keywords】 Osteoarthritis; Aspirin; Anterior cruciate ligament transection; inflammation

骨性关节炎是一种退行性病变, 是由年龄增长、肥胖、过度劳累、关节先天性畸形等诸多因素引起的, 疼痛为其主要症状, 负重时加重, 休息后好转^[1]。其伴随的关节疼痛、软骨损害、滑膜炎等对患者

的身心健康造成严重不良影响^[2], 继而影响社会生产生活。骨关节炎的病理改变主要是由于关节软骨细胞的凋亡和软骨基质的破坏, 导致软骨退行性病变, 软骨下骨硬化, 滑膜产生炎症等。在研究药物

*通讯作者: 傅玉

对骨性关节炎的治疗作用时, 理想的小鼠骨性关节炎模型非常重要。目前人为诱发型动物模型主要包括前交叉韧带切除术即 ACLT 模型, 半月板失稳术即 DMM 模型(Destabilization of the medial meniscus, DMM), 及药物诱导模型^[3]。ACLT 模型(Anterior Cruciate Ligament Transection, 前交叉韧带切除术), 通过手术切断实验动物膝关节前交叉韧带, 造成实验动物膝关节腔内环境不稳定, 以此模拟临床骨性关节炎的发生^[4]。断裂后可以产生膝关节不稳、运动受限及关节疼痛等临床症状, 关节软骨表面摩擦增大, 软骨日益磨损而成膝关节骨性关节炎。

临床上 OA 治疗以基础治疗和药物治疗为主。其中人工关节置换术可达到临床治愈骨关节炎, 却又因价格昂贵及并发症风险等原因而限于有严重症状的晚期骨关节炎患者^[5], 因此研究骨性关节炎的相关药物治疗方法有非常宝贵的现实意义。药物治疗包括非甾体抗炎药、透明质酸钠、硫酸氨基葡萄糖等, 其中阿司匹林是一种经典的非甾体水杨酸类药物, 于 1899 年由德国拜耳公司研发, 至今已有百年的历史并被广泛应用于临床。阿司匹林通过抑制环氧化酶(cyclooxygenase, COX)的活性减少前列腺素(prostaglandin, PG)的生物合成, 起到抗炎镇痛的作用^[6], 运用于缓解炎症发热和各种中度疼痛的治疗, 也运用于心脑血管疾病中的抗血栓。阿司匹林通过抑制 COX 的合成, 对炎症因子的调节和炎性细胞起到抑制作用, 起到抗炎镇痛的作用, 可以减缓骨关节炎的病变过程。此外, 有研究表明 PGs 是骨组织代谢的调节剂, 可调节成骨细胞骨形成, 杜密等研究发现, 一定剂量的阿司匹林能够促进骨髓间质细胞生长, 补充坏死的软骨组织, 从而起到缓解骨关节炎的作用^[7]。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠, 7-8 周龄, 雄性, 重庆恩彼生物科技有限公司

1.2 实验试剂及仪器

2-乙酰基水杨酸(阿司匹林), 上海毕德医药公司; 0.9%生理盐水注射液, 山东辰欣药业公司; 10%水合氯醛溶液, 深圳希景生物公司; PBS 粉, 美国 Thermo Scientific 公司; EDTA 粉、氢氧化钠, 成都科龙化工试剂厂; 盐酸, 重庆川东化工集团; 4%多聚甲醛通用型组织固定液, 离心管, 安徽

Biosharp 白鲨生物公司; 一次性无菌注射器, 岳阳民康医用材料公司; 手术器械、解剖板, 中心实验室; 脱毛膏, 法国薇婷公司; 脱脂棉球, 重庆宏冠医疗设备公司; 带线缝合针, 上海金环医疗器械公司; 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义予华仪器公司; 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Ph 计, 德国 Sartorius 公司; 光学显微镜, 德国 Leica 公司

1.3 溶液配制

分别称取 50mg、100mg、200mg 阿司匹林溶于 40ml 0.9%生理盐水中制成低、中、高浓度剂量阿司匹林溶液, 浓度分别为 1.25mg/ml, 2.5mg/ml, 5mg/ml。

称取 EDTA30g, 加入 65℃温热的 0.1mol/LPBS 溶液 300ml, 加入 3gNaOH 颗粒, 搅拌至透明, 用 1mol/LHCL 调节 pH 值至 7.2, 配制成 10%EDTA 脱钙液常温保存备用。

1.4 实验分组

将 25 只健康状况相似的小鼠随机选出 5 只小鼠作为空白组, 余下 20 只小鼠以前交叉韧带切断术建立骨关节炎 ACLT 小鼠模型, 造模后均分为模型组和低剂量阿司匹林组、中剂量阿司匹林组、高剂量阿司匹林组, 每组 5 只小鼠。造模组和治疗组分别按以下给药方案给药, 持续 4 周。

(1) 空白组(Control): 不做干预, 正常水、饲料圈养

(2) 模型组(OA): 造模后以 0.4ml/日生理盐水灌胃

(3) 低剂量阿司匹林组(Aspirin-low): 按照 25mg/kg·d 给药浓度灌胃

(4) 中剂量阿司匹林组(Aspirin-medium): 按照 50mg/kg·d 给药浓度灌胃

(5) 高剂量阿司匹林组(Aspirin-high): 按照 100mg/kg·d 给药浓度灌胃

1.5 骨关节炎 ACLT 模型的建立

取小鼠, 称重, 然后腹腔注射 5%水合氯醛溶液对其进行麻醉。将麻醉成功的小鼠固定于操作台, 将小鼠右腿膝关节周围 1cm 半径范围使用脱毛膏剃毛, 使其皮肤完全裸露, 轻轻擦拭干净脱毛膏, 使用碘伏消毒后, 以右膝关节中线稍偏外侧为手术入路, 做上下长约为 0.5cm 的纵行切口划开表面皮肤和筋膜, 沿膝关节韧带及连接髌骨的膝关节上方的股直肌用手术剪剥开皮下组织, 暴露膝关节, 手术用镊子剥去表面结缔组织, 露出膝关节腔后将膝关

节腔屈曲 90°, 即可见关节交叉韧带。用消毒针分离挑断前交叉韧带。生理盐水冲洗止血后依次缝合肌肉组织及膝关节表面皮肤, 确认无继续出血后将小鼠放入鼠笼观察, 等待麻醉苏醒, 待所有小鼠清醒后自由摄食, 正常饲养。

1.6 骨关节炎症状评估

1.6.1 小鼠体重监测

在造模前及造模后第 7、14、21、28 天对所有小鼠进行称重并记录, 持续观察小鼠的体重变化。

1.6.2 小鼠行走距离与站立次数监测

将小鼠置于透明的树脂盒子里, 盒子大小为 17cm×32cm×8cm, 底部有 1cm×1cm 大小的格子, 观察小鼠走过的小格子数, 以此测量小鼠的行走距离[8], 按上述方法记录小鼠 2 分钟内的行走距离, 每 7 天记录一次, 分别在造模前以及造模后的第 7、14、21、28 天对所有分组内小鼠的行走距离进行测量记录。将小鼠置于上述树脂盒子中, 记录小鼠 2 分钟内完全起身站立的次数, 每 7 天记录一次, 分别在造模前以及造模后的第 7、14、21、28 天对所有分组内小鼠的站立次数进行观察记录。

1.7 组织学病理学观察

于造模给药 28 天后处死小鼠, 解剖后取心、肝、脾、肺、肾并制成病理切片, 观察后评估阿司匹林

对内脏的毒副作用; 取小鼠骨关节, 经脱水、浸蜡, 石蜡包埋组织固定, 制成石蜡切片、染色、封片等操作制成病理切片, 然后进行 HE 病理染色分析和番红 O-固绿病理染色分析, 并进行显微镜下的观察并拍照。运用改良的 Mankin's 评分系统^[9]进行小鼠骨关节病理切片的评分^[10], 由三位不同实验人员各自进行观测评估, 将平均分作为各组的实际得分。

1.8 统计学分析

所有数值均以平均值±标准差 (s.d.) 的形式表示, 采用 GraphPad Prism 7 进行统计学分析, 两组比较采用双尾非配对 T 检验, 多组比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 差异具有统计学意义的阈值为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 骨关节炎 ACLT 模型的建立

骨关节炎 ACLT 模型的造模过程如图 1 所示, 脱毛完成后, 沿膝关节韧带及股直肌偏右侧切开, 将韧带和肌肉组织向左侧牵拉后能暴露膝关节腔, 进而能顺利找到交叉韧带结构并减少对膝关节韧带和其他肌肉组织的损伤。剪断前交叉韧带后进行抽屉实验, 出现胫骨前移, 表明前交叉韧带已断裂, 造模成功。

表 1 改良的 Mankin's 评分表

评分	软骨结构	软骨细胞	软骨基质	潮线完整性
0 分	正常	正常	正常	完整
1 分	表面不完整	弥漫性细胞数量增多	轻度减少	不完整
2 分	表面不规则及血管翳	增生性细胞簇	中度减少	
3 分	裂隙达软骨移行层	细胞数量减少	重度减少	
4 分	裂隙达软骨方射层		消失	
5 分	裂隙达软骨钙化层			
6 分	结构完全破坏			

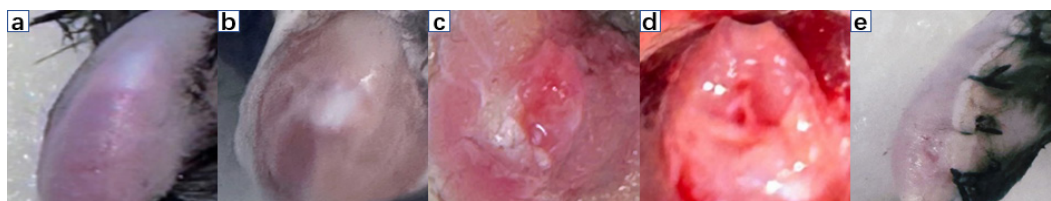


图 1 骨关节炎 ACLT 造模过程

a. 脱毛膏脱毛完成后的小鼠右膝, 白色部分即为小鼠膝关节韧带; b. 纵向切开小鼠表皮后暴露的膝关节韧带和与髌骨连接的股直肌; c. 小鼠膝关节腔暴露; d. 拨开膝关节腔中脂肪组织后可看到呈现“×”型、乳白色的交叉韧带, 剪断前交叉韧带; e. 抽屉实验后将小鼠的肌肉组织和表皮皮肤依次缝合。

2.2 骨关节炎病情评估

患有骨关节炎的小鼠会因关节疼痛导致食欲不振, 继而影响体重, 其 28 天体重监测情况如图 2a 所示。结果显示: 第 14 天高剂量治疗组平均体重显著高于模型组; 第 21 天中、高剂量治疗组平均体重显著高于模型组, 而模型组平均体重显著低于空白组; 第 28 天低、中、高剂量平均体重均显著高于模型组, 而高剂量治疗组平均体重与空白组不存在显著性差异。

骨关节炎小鼠因关节疼痛, 活动能力受损, 活动量可能减少。因此我们测量了各组小鼠两分钟内的站立起身次数和行走距离, 以此来评估小鼠关节的受损程度, 结果如图 2b-c 所示。结果显示: 第 14 天高剂量治疗组的起身次数显著高于模型组, 而低剂量治疗组与模型组的起身次数不存在显著性差异; 第 21 天高剂量治疗组的起身次数显著高于模型组、低剂量治疗组, 而与中剂量治疗组、空白组均不存在显著性差异; 第 28 天, 低、中、高剂量治疗组起身次数均明显高于模型组, 而高剂量治疗组与空白组不存在显著性差异。行走距离的测定结果与站立起身次数具有相似的变化趋势。结果表明, 第 14 天高剂量治疗组的平均步行距离显著高于中、低剂量治疗组和模型组; 第 21 天高剂量治疗组的平均步行距离与空白组不存在显著性差异; 第 28 天低剂量治疗组的平均步行距离与模型组不存在显著性差异, 中剂量治疗组的平均步行距离与高剂量治疗组不存在显著性差异, 高剂量治疗组的平均步行距离与模型组存在显著性差异, 而与中剂量治疗组不存在显著性差异。

上述结果表明, 低剂量阿司匹林对小鼠骨关节炎的治疗作用有限, 而中、高剂量阿司匹林对小鼠骨关节炎有较好的缓解作用。

2.3 组织学观察

2.3.1 关节病理情况分析

各组小鼠关节组织病理情况表征如图 3a 所示, HE 结果表明: 空白组小鼠软骨表面光滑完整有序, 由外向内的移行层、方射层、钙化层排列紧密连续, 细胞分层明显分布均匀; 模型组小鼠软骨表面损坏且结构疏松, 软骨细胞形态改变, 排列无序, 软骨基质基本消失; 低剂量治疗组表现出不同程度的软骨细胞减少、软骨基质部分弱化, 而中、高剂量治疗组关节软骨的病理变化较轻微, 基本与空白组一

致。

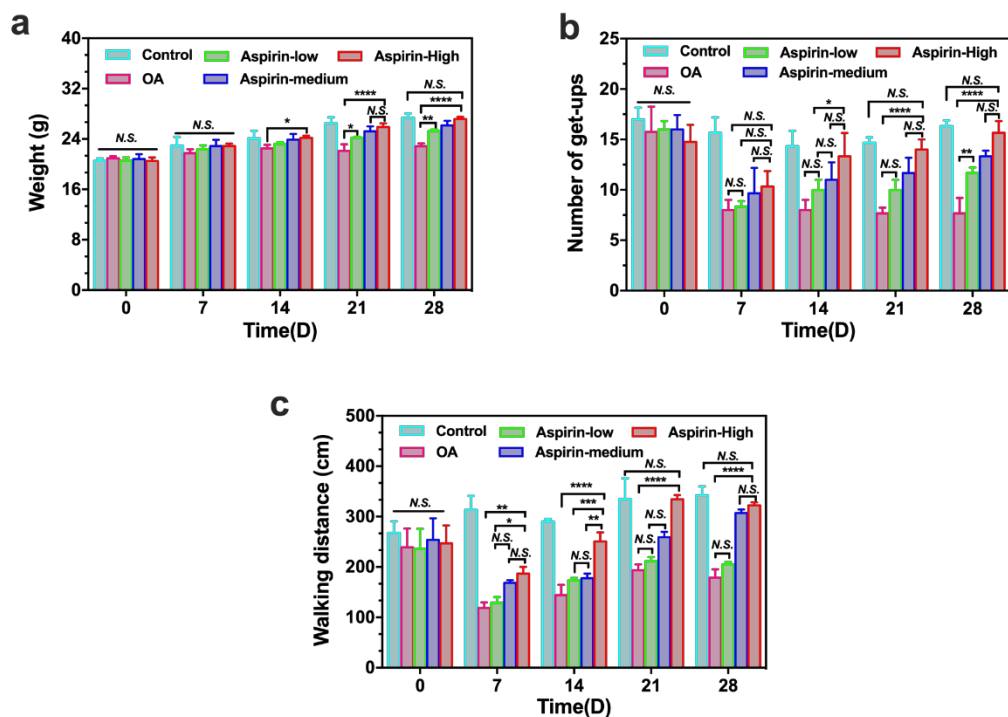
番红 O-固绿染色结果表明: 空白组小鼠软骨层结构正常, 番红染色红色软骨多, 潮线完整, 软骨细胞排列整齐有序; 模型组显示红色软骨区域大面积缺损消失, 表层软骨细胞明显肿胀、减少, 细胞簇集, 排列紊乱; 与模型组相比, 低、中、高剂量治疗组的软骨细胞逐渐增多, 潮线逐渐趋于完整, 表明软骨受损情况不同程度得到缓解。为更直观描述组织学变化, 采用改良的 Mankin's 评分法计算各组组织切片的得分, 结果显示中、高剂量阿司匹林治疗组的评分显著低于模型组, 具有统计学意义。

2.3.2 内脏组织病理观察

HE 病理分析的结果如图 4 所示, 结果显示各组小鼠心脏、脾脏和肺部均未见明显的炎性改变和病变: 各组小鼠心肌细胞形态饱满完整, 分界清晰, 细胞排列紧凑, 结构清晰, 细胞核分布均匀, 细胞质染色均匀; 脾脏组织白髓区和红髓区细胞核较为饱满; 肺组织及肺泡结构完整, 肺泡壁薄, 肺泡腔内少见红细胞和炎性浸润, 肺泡间隔纤维纤细呈网状, 肺泡间质无明显充血肿胀。结果表明阿司匹林对心脏、脾脏、肺脏并无明确的毒副作用。

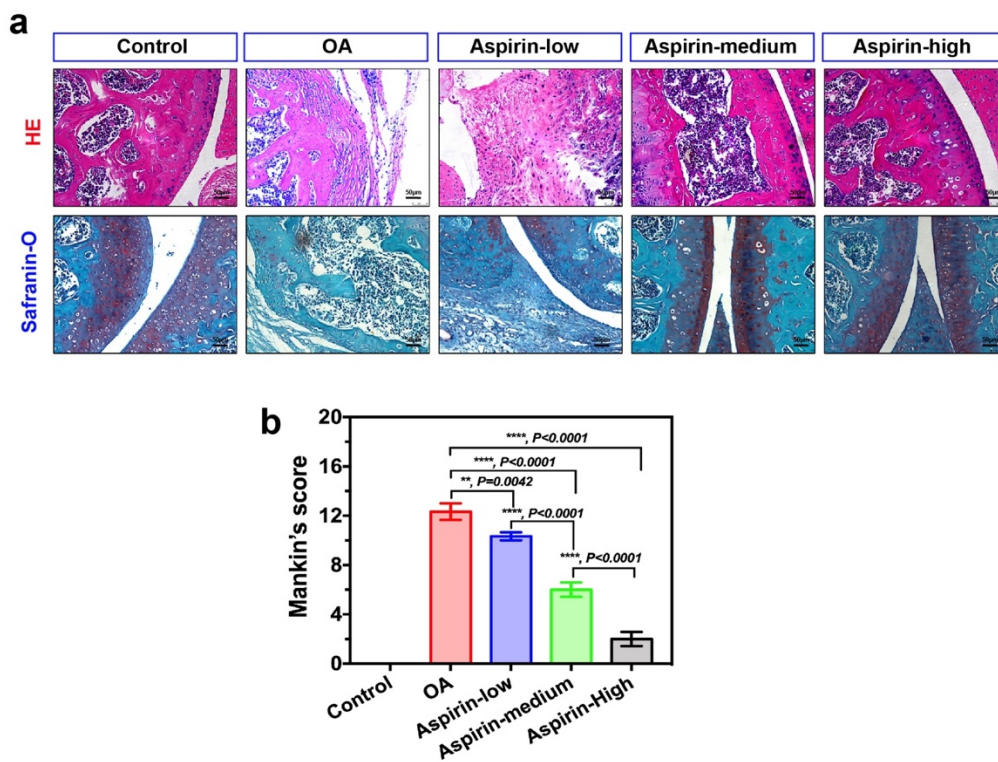
肾脏 HE 病理分析结果显示: 空白组和模型组小鼠肾组织及肾小管结构清晰完整, 未出现水肿充血; 低剂量治疗组小鼠肾组织结构较为清晰, 细胞排列整齐, 偶见淤血和肾小管上皮细胞水肿; 中剂量治疗组小鼠肾组织结构较为完整, 肾实质密度降低, 可见炎性细胞浸润, 毛细血管管腔受增殖细胞压迫, 肾小管上皮细胞水肿; 高剂量治疗组小鼠肾组织损伤较为严重, 肾实质密度明显降低, 肾小球体积增大且细胞数量增多, 排列紊乱, 伴随着中性粒细胞和单核细胞的浸润, 毛细血管管腔被增殖细胞阻塞或变得狭窄, 肾间质充血, 提示长时间服用高剂量的阿司匹林对肾脏有一定的毒副作用。

肝脏 HE 病理分析结果显示: 空白组和模型组小鼠肝细胞以中央静脉为中心排列整齐, 形态规则饱满, 细胞界限清晰, 肝窦未见扩张和挤压^[11]; 低剂量治疗组肝细胞排列整齐, 结构完整; 中剂量治疗组肝细胞结构较完整, 少量肝细胞水肿, 存在少量肝细胞坏死灶; 高剂治疗量组小鼠肝细胞减少, 中央静脉旁肝细胞排列紊乱, 可见炎性浸润、肝细胞透明样变性, 提示长时间服用高剂量的阿司匹林对肝脏有一定的毒副作用。



a.不同时间点各组小鼠体重变化；b. 不同时间点各组小鼠两分钟内站立次数变化；c. 不同时间点各组小鼠两分钟内行走距离变化；

图2 各组小鼠骨关节炎症状评估



a.各组小鼠骨关节组织 HE 染色和番红 O-固绿染色结果；b.各组小鼠骨关节组织改良的 Mankin's 评分结果

图3 各组小鼠骨关节病理分析及 Mankin's 评分结果

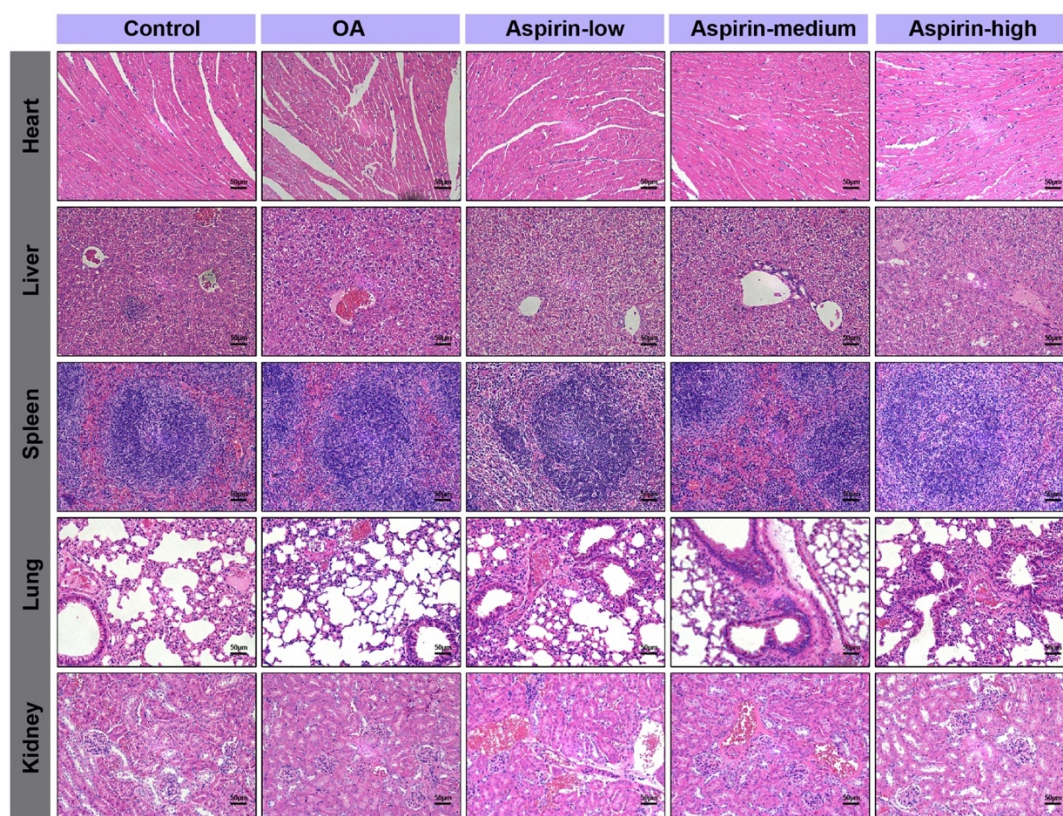


图4 各组小鼠内脏组织(心、肝、脾、肺和肾)HE染色观察

3 结论

骨性关节炎是一种常见的慢性退行性疾病,影响全球数百万人。构建骨关节炎常用方法包括关节注射药物法和手术法,本研究采用手术法中创伤较小的前交叉韧带切除法构建骨关节炎 ACLT 模型,通过抽屉实验确定造模成功。阿司匹林作为一种经典的非甾体抗炎药,通过减少前列腺素的产生,起到抗炎镇痛的作用^[12]。本研究的行为学部分实验表明,采用中、高剂量阿司匹林治疗 28 天均能起到缓解骨关节炎小鼠关节疼痛的作用,高剂量起效最快,作用做强。而其中低剂量阿司匹林治疗的骨关节炎小鼠,虽然疼痛状况在 28 天后有缓解,但仍与健康状态的空白组有显著差异。

骨性关节炎通常伴有关节软骨磨损、缺失和侵蚀,本研究组织病理学研究结果表明,骨关节炎模型小鼠的关节软骨细胞排列分散紊乱,软骨基质被破坏。通过 Mankin's 改良评分表的量化实验数据表明:中、高剂量组小鼠的组织学评分更低,关节软骨缺损程度较模型组显著减轻,表明中、高剂量的

阿司匹林能缓解软骨受损。为评估不同剂量阿司匹林长时间使用存在的潜在毒副作用,本研究进行了内脏组织(心、肝、脾、肺、肾)的 HE 病理分析,结果提示采用高剂量阿司匹林治疗 28 天后,小鼠的肾、肝组织出现受损情况,表明存在潜在的肝毒性和肾毒性。

综上所述,一定剂量的阿司匹林对骨关节炎有良好的镇痛、缓解和治疗作用,且剂量越高,起效越快。文献数据表明:临床上急性关节炎发病时阿司匹林的推荐使用剂量为 $40\text{mg/kg}\cdot\text{d}$ ^[9],与本研究采用的中剂量($50\text{mg/kg}\cdot\text{d}$)接近。结合内脏病理分析结果,长时间大量使用阿司匹林会对肝、肾造成损伤,所以在应用阿司匹林治疗骨关节炎时,要注意使用合理的剂量,且不宜长时间使用。

参考文献

- [1] 牛振东,刘恒,曹瑞治.骨关节炎病理进程相关机制的研究进展[J].华西医学,2012,27(11):1741-1744.

- [2] 纪帅帅,闫洁,王子吟,杨梦婷,胡嫚,霍强,程秀.硫酸氨基葡萄糖脂质体的制备及其对骨关节炎的治疗作用[J].江苏大学学报(医学版),2022,32(03):1671-7783.
- [3] 吴强,郑倩华,蒋一璐,任润媛,李瑛.膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较[J].中国比较医学杂志, 2019, 29(05): 125-130.
- [4] 夏梦熊,韩海慧,梁倩倩,翟伟韬,徐浩.骨性关节炎动物模型研究进展[J].实验动物与比较医学, 2020, 40(02): 159-165.
- [5] 劳山,赵劲民,肖增明.老年膝骨关节炎人工关节置换术中所见与临床表现的关系[J].中国微创外科杂志,2006(10):780-782.
- [6] 关影,李姝颀.解热镇痛药物的临床应用[J].中国社区医师(医学专业半月刊),2009,11(11):3.
- [7] 韩慧,吕亚林.阿司匹林等非甾体类抗炎药物对植入物骨结合的影响[J].口腔颌面修复学杂志,2017,18(04): 237-240.
- [8] 王伟峰.雷公藤红素在骨关节炎中的作用及其机制研究[D].山东大学,2019.
- [9] 茅华杰.槲皮素对骨性关节炎的作用及其机制研究[D].浙江大学,2019.
- [10] D. A. Walsh, A. Yousef, D. F. McWilliams, R. Hill, E. Hargin, D. Wilson. Evaluation of a Photographic Chondropathy Score (PCS) for pathological samples in a study of inflammation in tibiofemoral osteoarthritis[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2008, 17(3).
- [11] 朱乐玫,周梦颖,周科谕,张远,刘娟.川芎嗪对 TFA 致大鼠肝脏损伤的保护作用[J].湖南师范大学学报(医学版), 2021, 18(04):1-4.
- [12] Araganji Ramesh, Somannavar Manjunath S, Vernekar Sunil S, Kavi Avinash, Hoffman Matthew K, Goudar Shivaprasad S. The impact of low-dose aspirin on markers of inflammation and placental function: an ancillary study of the ASPIRIN trial.[J]. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, 2021, 35 (25).