

罗板鑫,朱文科,周中. 冻结肩动物模型的建立及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 121-128.

Luo BX, Zhu WK, Zhou Z. Establishment and research progress of a frozen shoulder animal model [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 121-128.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.03.021

冻结肩动物模型的建立及研究进展

罗板鑫¹, 朱文科¹, 周中^{1,2,3*}

(1.南京中医药大学,南京 210023; 2.南京中医药大学附属中西医结合医院,南京 210028;
3.江苏省中医药研究院,南京 210028)

【摘要】 冻结肩是一种肩关节的慢性、自限性疾病,其病因病机至今尚未完全明确。它的主要病理变化为肩关节囊挛缩、增厚、纤维化及慢性滑膜炎。近年来,动物模型在阐述冻结肩的发病机制、治疗、预防中有着重要作用。国内外学者基于大鼠、小鼠、犬类、兔子等不同动物,采用不同的造模方式建立模型用来开展冻结肩方面的研究。然而,出于不同研究目标,目前已发展出的多种冻结肩动物模型分别有自己的优势和局限性。本文将对若干种典型的冻结肩动物模型的造模方法进行详细的研究和讨论,并介绍基于这些方法取得的冻结肩病因病机方面的研究进展,期望能为基础研究和临床医学探索提供有益的思路。

【关键词】 冻结肩;动物模型;造模方式

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)03-0121-08

Establishment and research progress of a frozen shoulder animal model

LUO Banxin¹, ZHU Wenke¹, ZHOU Zhong^{1,2,*}

(1.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China. 2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028.
3. Jiangsu Province Academy of traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028)

【Abstract】 Frozen shoulder is a chronic, self-limited disease of shoulder joints. However, the etiology and pathogenesis are still unclear. Its main pathological changes are shoulder capsule contracture, thickening, fibrosis, and chronic synovitis. Recently, animal models have had an important role in investigating the pathogenesis, treatment, and prevention of frozen shoulder. Animal models using rats, mice, dogs, and rabbits with different modeling method have been widely used for frozen shoulder research by domestic and foreign scholars. However, each animal model of frozen shoulder has advantages and limitations based on specific research interests. In this paper, the modeling method of several typical frozen shoulder animal models are reviewed and discussed in detail. Research progress in the pathogenesis of frozen shoulder disease based on these method is also discussed. This review is expected to provide useful ideas for basic research and clinical medical exploration of frozen shoulder.

【Keywords】 Frozen shoulder; animal model; ways of modeling

冻结肩是一种常见的肩关节疾病,其特征是肩关节主动及被动活动度的逐渐丧失。冻结肩的发

病率为3%~5%^[1],常见于40~60岁的中老年人,多数患者为单侧发病,双侧受累较少^[2-3],并且

【作者简介】罗板鑫(1993—),男,硕士,专业:中医骨伤科学。E-mail: 729787877@qq.com

【通信作者】周中(1972—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:中医骨伤科学。E-mail: zhouzhong.007@163.com

女性发病率较高^[4-5]。临床医学研究发现,包括糖尿病、外伤、偏瘫、脑出血、甲状腺功能亢进、颈椎间盘突出症、高胆固醇血症、高脂蛋白血症等在内的许多系统性疾病均和冻结肩的发病有关^[6-7]。冻结肩的原发病理部位^[8]是盂肱关节囊组织,尤其以肩袖间隙为主,随着病程进展,局部的慢性炎症反应和纤维化增殖^[9-12]是导致肩关节疼痛、运动受限的主要原因。尽管对于冻结肩的临床症状已经研究的较为透彻且已经存在相应的治疗方法,然而,导致肩周炎发生的病因和病理生理机制尚不明确,因此,临床上并没有公认的最佳的治疗方案。近年来,通过建立有效的动物模型对冻结肩发病机理开展探索,取得了一系列重要的成果。随着研究的不断进展,国内外学者尝试了多种有效的造模方法并制定了相应的检测指标。本文在对主要实验动物进行分类的基础上,着重就当前冻结肩动物模型的多种主流造模方法进行归纳及综述,从方法论的角度对冻结肩的发病机制进行多维度的描述,为临床上发展真正有效的治疗方案提供思路。

1 实验动物

随着临床技术及实验研究的不断进展,动物模型在研究冻结肩的发病机制及治疗新方案中愈发不可缺少。动物模型可以动态地观察冻结肩的发病起始过程,通过对动物标本的分析,可以精确知悉发病部位,明确病理变化。目前已有啮齿类、犬类以及多种大型动物被用来制作冻结肩模型并开展针对性的研究。现就以下几种主要的实验动物进行简要描述。

1.1 啮齿类动物

小鼠是冻结肩动物模型中比较常用动物类目,小鼠饲养方便,易于获取,费用合理,造模周期短。但是由于体型较小,小鼠操作相对困难,目前用于人的冻结肩模型研究不多。现最常用的小鼠品系为 C57BL/6,该品系于 1921 年被培育出来,属于近交品系。该品系的最主要的两个特点就是品系稳定和易于繁殖。

大鼠在实验研究中不仅具有小鼠的优势,还具有生存能力强、抗感染能力强、环境要求不高、易于获得和大量复制、实验成功率高的特点。其冈上肌很发达,并穿过喙突、锁骨、肩峰和连接这些骨性结构的韧带共同形成的拱形结构,这和人类相似^[13-14],且大鼠肩关节外展活动度大,可达到 50°,

它是目前较为广泛应用的冻结肩疾病研究模型动物。但较兔子、犬类、其他大型动物而言,大鼠的缺点与小鼠相似,其肌腱、关节囊、韧带等软组织细小,不适于观察疾病的病理变化,也难以承担修复损伤效果的观察研究。现最常用的动大鼠品系为 SD(Sprague-Dawley)大鼠,其性情温顺,造模时对肩部外固定物的刺激反应较小,易于固定制动。

另一类常用的啮齿类动物是家兔,其性格温顺,体型较大,便于冻结肩发生的局部操作。家兔肩胛下肌与人类有类似的解剖学和生物力学特性,实验兔价格相对不高、生长繁殖速度较快、便于饲养和管理,兔在笼养时,常用双下肢站立而以双上肢抱持他物,比其他实验动物上肢单独活动的机会更多,并且其上肢承担体质量行走的负荷较少,是广泛适用的冻结肩模型动物,不足为兔的肩峰是相对发育不全的结构^[15],其下通过的是冈下肌腱、小圆肌腱而非冈上肌腱。常用的品系为新西兰兔。

1.2 犬类

犬类不仅易于组织形态学观察,并且对于关节内容积、关节活动度的实时测量也非常方便,实验可重复性和准确性比较好,犬的解剖结构明显与人类更相似,但犬类生长发育周期较长,造模成本较高、饲养难度系数较大,不利于进行大样本的研究。常用的品系为比格犬(Beagle),属于猎犬中体型较小的一种,适用于长期的慢性疾病实验研究。

1.3 大型动物

牛、羊、马^[16-19]等大型动物可用于制作肩袖损伤及骨关节炎动物模型,现尚未有直接使用大型动物制作冻结肩模型的相关文献报道。但理论上,大型动物极其适宜来观察肌肉萎缩程度及韧带、关节囊等的病理变化,对于治疗后康复情况的观察也比较直观。

2 造模方法

从上世纪 90 年代开始,冻结肩的动物模型逐步建立并发展。根据 Zuckerman 等^[20]的分类方法,冻结肩可分为原发性冻结肩、继发性冻结肩。原发性冻结肩也可以称为特发性粘连性关节囊炎,发病与系统性疾病或外伤均无关。继发性冻结肩分为系统性、外源性和内源性。系统性冻肩关节患者更为常见,因为全身系统性疾病常常会有潜在的结缔组织方面的异常,如糖尿病、帕金森氏综合征。外源性冻结肩是指肩关节以外的疾病引发的冻结肩,如

肱骨骨折、颈椎病。内源性冻结肩是指由肩关节直接发生病理变化的,如肩袖损伤、肱二头肌炎。继发性冻结肩的具体诱因对其预后具有重要影响。比方说,与糖尿病相关的冻结肩,其病程更长,治愈困难。原发性冻结肩与继发性冻结肩,其病理过程都以炎症、纤维化为主,肩部的临床症状基本一致。由于继发性冻结肩造模的方便性,故现在都是从继发性冻结肩作为理论出发点,来制作冻结肩动物模型。本文根据现有的国内外相关文献,将冻结肩动物模型的制作方法归纳为模拟理化条件法、外固定制动法、外科手术法三大类。

2.1 模拟理化条件法

人为的制造利于冻结肩发病的内、外在环境,然后将动物放置于这种环境中,以此刺激动物的肩部从而诱发冻结肩。

2.1.1 模拟风寒湿刺激模型

王绪辉等^[21]从中医理论角度出发,结合实际临床经验,认为风寒湿邪对冻结肩的产生具有重要作用。以风寒湿为出发点,采用兔子作用动物模型造模。在家兔一侧肩部,脱毛后以室温 7℃、相对湿度 97%、风力 6 级进行间断性刺激造模。经造模 48 h 后发现肩部略有肿胀但活动受限不明显,造模 14 d 后出现明显的活动受限症状。病理结果显示了这一过程中肩部局部微血管呈收缩、扩张、收缩、再扩张的变化过程。局部组织厚度增加,周围组织炎性浸润,同时可见皮下、肌腱、关节周围组织粘连。实验阐述了寒冷、潮湿造成的刺激是局部微循环障碍、炎性反应是肩部疼痛及活动受限的主要因素。

肩周炎属中医痹症范畴,《黄帝内经·素问》言“风、寒、湿三气杂至合而为痹,其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为着痹”。该模型揭示了风寒湿对肩周炎的病因学意义,其优点是造模方法简单,条件单一便于控制,但同时所复制出来的证并不能完全反映临床疾病的所有特点,因此模型较为片面,比较模糊;操作上具体如何维持风寒湿刺激,以及对肩部有何具体的处理需进一步研究,本模型适宜于兔子等较大体型的实验动物。

2.1.2 模拟劳损及寒湿刺激模型

熊昌源等^[22-23]详细说明了模拟寒湿的方法,并加用持续机械性劳损进行造模。这种造模方法分为两个阶段,先将兔子一侧前肢连接于水平摇床上,以一定的频率与振幅摇动肩关节,以此持续数天。之后,将冰块外敷于其肩部持续刺激数天。这

种将内因和外因相结合的造模方式,与临床冻结肩病因学更为接近。也有人使用大鼠^[24]作为造模动物。研究从微循环、病理组织学及相关生化指标测定等多方面验证了此模型的科学性和可行性。模型动物肩微循环血流速度缓慢,软组织肿胀明显,肌纤维退变,结缔组织增生,滑膜粘连,肱二头肌腱中羟脯氨酸、DNA 和蛋白质明显增高,超氧化物歧化酶下降明显,脂质过氧化物升高显著。此方法优点是复合因素造模,比单一因素造模更接近中医临床表现,有利于探讨中医药的疗效和机理,这种造模方法操作简单、价格低廉、比较容易推广,适应大鼠、兔等多种模式动物,也是我国应用最为广泛的,尤其在中医研究中^[25]。缺点是这种模型在束缚动物时,动物依从性较差,有一定概率造成动物受伤、死亡、造模失败,模型稳定性需进一步研究;造模完成后,缺乏客观的测量指标,只能凭借经验来判断造模是否成功。基于这一方法,目前不少研究者正在努力尝试利用主观判断和客观指标相结合的方法,来判定造模效果。例如,王晨瑶等^[26]通过大致观察步态、肩部活动情况、测量血清 PGE-2 含量,评判造模效果。康佳珺等^[27]则采用步态 Coderre 分级、测量肩关节周长进一步量化了造模效果,并测量造模前后血清中 IL-1 量、TNF-量、COX-2 等炎性指标的变化。

2.1.3 内分泌紊乱模型

糖尿病是冻结肩的重要发病因素之一。相关研究称 T2DM 大鼠模型其盂肱关节活动度低于正常水平^[28],T2DM 可导致大鼠肩关节软骨、滑膜及周围肌肉等软组织出现炎性改变及纤维化^[29],与肩周炎肩周软组织自然退变病理特点一致。T2DM 大鼠肩部滑膜组织内 VEGF 表达增多,微循环障碍^[30],可能是糖尿病诱导冻结肩发病的机制之一。糖尿病动物模型可以在研究糖尿病易发冻结肩的因素方面发挥重要作用。肾上腺功能异常、甲状腺功能异常等其他内分泌疾病也与冻结肩发病相关,但目前缺乏该方面的动物实验研究。

2.2 外固定制动法

运用石膏、绷带等体外固定方法将动物的一侧上肢固定,限制肢体的自主活动,达到使肩关节逐渐粘连、关节活动度逐渐丧失的目的。

Schollmeier 等^[31]报道了采用犬类制造外固定制动冻结肩模型的一种有效方法。将犬的一侧前肢用人字形石膏同肩部以 30° 向后屈曲位固定。这

种造模方法,发现关节囊的组织形态变化出现在孟肱关节的功能变化之前。在造模 4 周后,关节活动度变化不明显。但是,此时组织学上已经发现滑膜细胞及滑膜下毛细血管增加,滑膜表面有局灶性起伏和绒毛结构。这表明,毛细血管在整个滑膜结缔组织中明显增生,且有部分呈充血状态。另外,在滑膜下组织的某些区域,脂肪成分被致密的纤维胶原组织所取代。造模 8 周后,发现肩部的前后屈伸活动度均明显降低,组织学表现粘连灶开始出现在邻近的滑膜表面,包括肩峰下滑囊、关节囊与关节软骨之间。第 12 周后的关节活动度变化较第 8 周并没有明显改变。造模 4 周后关节腔内压力变化不明显,但是在第 8 周有显著变化并逐步上升。同时,在第 12 周时关节囊容积急剧减少,实验上仅仅注射 6~8 mL 液体,关节囊就会破裂,而正常情况下可以注射 13~15 mL。造模 12 周时,发现了冻结肩最显著性的特征——关节囊挛缩,这时的关节活动度、关节腔内压力变化明显,且组织学改变与冻结肩较为相似,故认为造模 12 周为最佳时段。在随后进一步的研究中,Schollmeier 等^[32]对该模型是否可逆转进行了研究。在功能重塑期 4 周时,犬的肩部肌肉基本恢复了正常的轮廓。除了内旋外,关节被动活动度无明显改善。运动时关节内压力显著减低,但关节内容积无明显改善。重塑 8 周时,功能、结构变化均开始逆转,关节被动活动度恢复到了正常值的 80%。重塑 12 周后肩部功能、组织学基本恢复到造模前的情况。此外,该方法还发现关节囊挛缩似乎与关节囊中的胶原蛋白成分无关,功能和运动减少的部分原因是关节囊结构的改变。

由于大鼠肩部解剖结构与人类相似,而且大鼠模型易于获得和大量复制,所以 Kim 等人^[33]选择大鼠作为冻结肩的造模动物。保持大鼠一侧肩部完全内收、内旋位,同侧肘关节屈曲、旋前,通过在整个前肢及胸部涂上成型石膏,将一侧前肢以上述体位制动固定于胸部。大鼠另一侧肢体作为对照组。Kim 等人观察了造模后 3 d、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周外展角及组织学情况。在造模 1 周后,外展角开始显著减少。在 2~3 周时,达到最低点,这时健侧及空白组大鼠的外展角为 150~160°左右,而实验组只有 100°左右。造模 4 周、5 周、6 周后,外展角较第 2 周、第 3 周变化不大。组织学发现腋窝的滑膜及滑膜下结构发生了改变。此外,滑膜皱襞的减少、滑膜下脂肪组织减少、滑膜下组织毛细血管

增生、关节囊增厚等现象在石膏外固定 3 d 后就已经出现。1 周后,滑膜下脂肪组织几乎消失,关节囊明显增厚。2 周后,肱骨侧的滑膜及滑膜下组织紧贴于骨皮质,这时可以开始观察到滑膜组织中有炎性细胞浸润。但是,3 周后,滑膜及滑膜下组织的炎性细胞减少,主要以纤维化表现为主。此后,外固定 4 周、5 周、6 周时的组合学表现与第 3 周相似。相应的,Masson 三色染色发现外固定 3 d 后开始有纤维化的表现,在第 3 周时最大化。因为关节活动度在第 2~3 周达到最低,组织学表现也在第 3 周时趋于稳定,所以 Kim 等人认为,使用石膏外固定 3 周可以取得最佳的造模效果。需要指出的是,炎症反应最终导致纤维化的病理生理过程与冻结肩极其相似,Kim 等人首次在动物模型中阐述了这种机制。根据时间段划分,造模 3 d 到 2 周的时候主要以炎症反应为主,与人类冻结肩的疼痛期病理生理相似。造模 3 周以后主要以纤维化为主,与冻结肩的冻结期病理生理相似。这个过程也侧面反应了原发性冻结肩和继发性冻结肩的临床差别性。与 Schollmeier 等人的研究工作相比,Kim 等人的造模方法更加完善,他们充分考虑到了石膏的相关并发症,并进行了相应地处理。

Liu 等^[34]将大鼠的一侧肩关节分别固定 1、2、3、4 周。在每个时间点准备肩部进行一系列的孟肱关节组织学观察、免疫组化观察,探讨固定对肩胛下囊和关节囊内容物的影响,包括 I 型和 III 型胶原在固定化大鼠肩内的分布,结果表明,大鼠肩关节固定术引起关节囊滑膜增生、肩胛下囊粘连、关节囊内 I 型和 III 型胶原内容物增加。

长期的制动是继发性冻结肩发病的重要因素。因此,大多数学者都采用各种各样的制动手段进行诱导,使动物的肩关节粘连、关节囊挛缩,从而完成冻结肩动物模型的建立。外固定制动法直接在关节外操作,无手术创伤影响,有效的避免了手术带来的相关并发症及缺点。该方法操作简单,经济实用,材料易于获取,适合于外界因素导致的冻结肩的研究;缺点是固定过程中动物感觉不适、撕咬,破坏固定材料,以及固定不牢等,影响实验进程,造成实验失败。而且固定的技术、材料和模型动物的个体差异会影响实验结果。采用犬类等较大的动物作为造模对象,不仅易于组织形态学观察,并且对于关节内容积、关节活动度的实时测量也非常便利,Schollmeier 等人的实验首次对模型造模时间、造

模后所维持的时间进行了详细研究,对动物实验的定量研究和时机把握具有重要的指导意义。使用小型动物进行外固定制动虽然观察、测量及操作稍有不便,但易于获得和大量复制,造模时间更短,因此是一种值得推广的造模方式。

2.3 外科手术法

通过手术的方式,制作冻结肩模型,根据原理可以归纳为大致三种方法。第一种,以手术的方式加快肩部慢性劳损。第二种,破坏肩关节周围肌肉,使肩部主动活动受限。第三种,在肩部及同侧上肢做内固定,限制肩部活动。这种方法通过破坏、刺激相关组织、造成关节内环境因素的变化,模拟相关生理条件诱导产生动物模型。这种方法的优点在于手术造模方法稳定性好,易成功,可短期内完成造模,因此目前应用也日益广泛;然而,这一方法的缺点是手术造成的创伤及易出现感染可能会对实验结果造成影响,对操作人员、设备及技术要求较高,不易大批量造模,不适应观察炎症介质等表达。

2.3.1 手术模拟肩部劳损模型

褚立希等^[35]认为慢性劳损是肩关节周围炎的重要致病因素,他们通过外科手术模拟了肩部慢性劳损的生理条件。收缩牵拉兔子一侧肩部的冈上肌、三角肌,对冈上肌、三角肌下滑囊对应的深浅面,并对关节囊外壁做轻微、持续性的钝性摩擦。造模完成后,在不同时间段,对三角肌、冈上肌、斜方肌、滑囊及关节囊组织进行 HE 染色观察。发现炎性细胞浸润、组织变性坏死以及浆液性纤维素渗出等现象。炎性细胞浸润在造模 7 d 达到高峰,12~14 d 开始逐渐减少。组织变性坏死在 3 d 达到高峰,之后逐渐减少。造模 3 d,开始出现有少量纤维母细胞出现,随后纤维化程度不断增加,在 8 周后出现肌腱钙化。该实验造模后经过 8 周的病理学观察,发现控制炎症对改善功能、缓解肩部疼痛有重要意义。对兔子肩部肌肉进行牵拉、摩擦,这与人体肩关节日常活动劳损相似,符合生理解剖学及生物力学。

褚立希等^[35]的慢性劳损模型,对肌肉、软组织的刺激是以肉眼观察轻度组织反应为度,不同手术者评价的指标不一,不同造模动物的反应耐受也不一,对于不同模型,缺乏刺激时间、刺激范围等因素的定量性刻画,因而缺乏相对客观的评价指标。

2.3.2 肩袖损伤模型

肩袖损伤造成肩关节活动受限,并且创伤加剧炎症刺激,这种长期活动受限及炎性刺激,是冻结肩的临床发病因素之一。所以肩袖损伤的动物模型也可以来诱导冻结肩动物模型的产生。肩袖组织分为冈上肌、冈下肌、肩胛下肌、小圆肌四部分,可以通过破坏其中一部分或多个部分来达到建立模型的目的。大鼠肩峰处有一拱形结构,冈上肌在其下方穿行,与人类冈上肌结构类似。兔子的肩峰为相对发育不全的结构,但其肩胛下肌与人类的解剖结构类似。大型动物,如猪、羊等,其冈下肌在肩关节活动中为优势肌群。根据上述内容,在肩袖损伤模型中,大鼠常常是破坏其冈上肌,兔子破坏其肩胛下肌,猪、羊等大型动物破坏其冈下肌。这种方式直接破坏了部分肩袖肌纤维组织,人为的破坏了肩关节外展、外旋等主动活动功能,其短期造模为单纯的肩袖损伤模型,长期造模(12 周以上)为诱导的继发性冻结肩模型。有王盼盼^[36]通过实验发现这种大鼠模型肩关节滑膜组织中 TGF- β 1、MMP-14、vegf 等相关基因表达是增多的。

2.3.3 塑料板内固定模型

随着对造模探索的深入,有研究者认为 Schollmeier 等人提出的造模方法的主要缺陷在于每个动物的肢体位置不同从而导致固定方法、固定位置不一,并且石膏外固定后随着时间的推移,原本固定的位置也或多或少的会发生改变。最近, Kanno 等人^[37]发明了一种新的内固定方式进行造模。他们在大鼠肱骨处和肩胛骨处分别做 2 个切口。在肩胛骨切口处,将一块特制的塑料板的上端放置在肩胛骨下端腹侧,另一块塑料板的上端放在肩胛骨下端背侧。用 1 根双股柔性导线,背侧连接钢板的上端。在肩胛冈上使用针头进行钻孔,从孔内穿过背侧的导线,用该双股线穿过肩胛骨上端,连接腹侧钢板的上端,然后将其扭转并牢固固定。在肱骨切口处,2 块钢板的下端使用螺钉进行刚性固定。在大鼠肩部,由于结构的特殊性,外展 60° 相当于人类的 0°。以此位置,肩关节被固定在外展 60° 的位置。内固定 8 周后造模完成。

为了定量每一种组织对关节运动的限制,在取下内固定后,移除了肩袖组织以外的肌肉、移除了关节囊外的肩袖组织、切除前下方关节囊、切除前上方关节囊、切除后下方关节囊后,分别测量了大鼠肩部的外展角和总旋转角进行了测量。取下内固定后,实验组外展角大约为 66° 左右,假手术

组的外展角大约在 79° 。实验组旋转角大约是 17° ，假手术组大约在 43° 。这个实验发现，切除前上方关节囊和前下方关节囊后，关节活动度均有明显提升。所以，关节挛缩的主要表现在前上方关节囊和前下方关节囊。

组织学观察结果显示，造模后引起的最明显的变化在于腋窝袋被厚的滑膜下组织所遮挡。假手术组滑膜表面有滑膜皱褶，而实验组滑膜皱褶消失。结果表明，与假手术组相比，实验组滑膜内膜长度明显缩短。此外，6 只造模动物中有 4 只的滑膜下组织附着在软骨上。在实验组中，观察到 1 只大鼠的肩关节窝前下段可见明显的滑膜粘连。2 只大鼠的肩部关节窝的下方 $1/4$ 有粘连。其他标本，只发现在关节窝中心有粘粘。实验组和假手术组均未见炎症细胞浸润、滑膜衬里细胞增生等滑膜炎改变。除滑膜外，两组间肌腱、肌腱插入及肩峰下区无明显变化。免疫组化结果显示，实验组滑膜组织的Ⅲ型胶原染色阳性，尤其是深部滑膜内膜下区的染色强于滑膜内膜，而假手术组的滑膜组织染色没这么明显。

这是一种以内固定方式而诱导继发性肩关节挛缩的动物模型。它与人类冻结肩 Frozen 期的病理生理更为接近，即炎症反应不明显，滑膜皱襞消失。人类患有冻结肩时，常常以外旋受限为第一症状，继而是外展等其他方向的活动。但该大鼠模型中，以外展更为明显，这可能与造模的方式及大鼠的生理结构有关。

2.3.4 线结内固定模型

Ochiai 等^[38]同样采用内固定的方案进行造模，但是他们的术式化繁为简，没有使用螺钉、塑料板等刚性固定物，单纯的使用一根不可吸收线将肩胛骨与肱骨干下端固定制动。制动 8 周后，Ochiai 等人将内固定及肩部周围肌肉摘除后，测量了关节活动度，发现假手术组平均外展角为 139° 、总旋转角为 97.3° ，实验组的平均外展角为 36.3° 、总旋转角为 73.3° 。同时，Ochiai 等人还发现降钙素相关基因肽在肩部游离神经末梢阳性表达可能与肩部疼痛有关。

Villa 等^[39]对该模型取下内固定直至 8 周后的功能恢复情况进行了动态观察。在造模完成后，取下内固定时大鼠关节活动度仅为原来的 37% 左右。到 5 周后后，关节活动度逐渐恢复至原有的 81% 左右。第 5~8 周，关节活动度的改善并不明显。8 周

观察结束后，关节活动度恢复到原先的 82% 左右。而大鼠的关节僵硬程度在取下内固定 3 周后，改善就不是很明显。Villa 等人的实验验证了他自己的猜想，这种固定所诱导的关节活动度降低、关节僵硬至少可持续 8 周。

冻结肩常常与糖尿病、甲状腺功能异常、帕金森氏综合征等疾病共存，内分泌、遗传因素与冻结肩的发病密切相关。现在的研究从冻结肩的病理和潜在靶基因为治疗提供了新的方向。在分子生物学水平上了解病因，对冻结肩的预防及治疗至关重要。小鼠的基因标记及转基因技术相对成熟，且各种动物中，小鼠与人类的基因最为接近，因此 Satoshi 等人认为，最佳的造模动物为小鼠。Oki 等^[40]最近采用了与前者相同的术式，利用小鼠造模，获得了一系列有意义的实验数据。

3 总结

模拟理化条件法造模操作简单，成模率高，易操作，贴近临床致病因子，这种将内外因相结合的造模方式，与临床冻结肩病因学更为接近，但造模因素相对有限，动物束缚效果影响造模成效；外固定制动法操作简便，经济实用，不受手术创伤影响，缺点是固定过程中动物感觉不适、破坏固定材料，固定不牢以及固定的技术、材料等影响造模效果；手术方法稳定性好，可短期内完成造模，易成功，但手术造成创伤大，易出现术后感染或其他并发症，造模技术和设备要求较高，不适应观察炎症介质表达。基于这些方法，近年来大鼠、小鼠、犬类、兔子等动物被用来制作冻结肩模型，并开展针对性的研究。我国学者在传统中医学领域对冻结肩有着独到的见解，模拟劳损加寒湿刺激模型与中医冻结肩病因病机相似，所以许多国内学者多采用模拟劳损加寒湿刺激模型。另一方面，一些学者常使用针灸、针刀、穴位等传统疗法，兔子的肩部利于实施这些操作，他们常使用兔子为动物模型。国际上，大多数学者采用固定制动的方式进行造模，研究发现大鼠的肩部大体解剖与人类相似，而且大鼠无论是采用外固定还是手术内固定都较为方便，所以他们大多采用大鼠作为造模动物，他们对动物模型的可逆性、组织学、测量关节活动度的方式等有着更定量化和更深层次的研究。由于原发性冻结肩动物模型的建立现在还存在着技术难题，因此固定制动所诱导的继发性冻结肩动物模型在研究上应用

日益普遍。动物实验中,良好的疾病模型是研究的基础,更是实验结论可靠性的保证,在实际科学研究中,应根据各种冻结肩动物模型的特点、造模机制及研究目的来综合考虑,以选择和建立理想的冻结肩动物模型。

参考文献:

- [1] Manske RC, Prohaska D. Diagnosis and management of adhesive capsulitis [J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2008, 1(3-4): 180-189.
- [2] Harris G, Bou-Haidar P, Harris C. Adhesive capsulitis: review of imaging and treatment [J]. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 2013, 57(6): 633-643.
- [3] Chamblor AFW, Carr AJ. The role of surgery in frozen shoulder [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, 85(6): 789-795.
- [4] Dias R, Cutts S, Massoud S. Frozen shoulder [J]. *BMJ (online)*, 2006, 331(7530): 1453-1456.
- [5] Kwaees TA, Charalambous CP. Rates of surgery for frozen shoulder: an experience in England [J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2016, 5(4): 276-279.
- [6] Milgrom C, Novack V, Weil Y, et al. Risk factors for idiopathic frozen shoulder [J]. *Isr Med Assoc J*, 2008, 10(5): 361-364.
- [7] Sung CM, Jung TS, Park HB. Are serum lipids involved in primary frozen shoulder?: A case-control study [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2014, 96(21): 1828-1833.
- [8] Neviasser JS. Adhesive capsulitis of the shoulder (the frozen shoulder) [J]. *Medical times*, 1962, 90: 783-807.
- [9] Hand GC, Athanasou NA, Matthews T, et al. The pathology of frozen shoulder [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2007, 89(7): 928-932.
- [10] Mullett H, Byrne D, Colville J. Adhesive capsulitis: human fibroblast response to shoulder joint aspirate from patients with stage II disease [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2007, 16(3): 290-294.
- [11] Bunker TD, Reilly J, Baird KS, et al. Expression of growth factors, cytokines and matrix metalloproteinases in frozen shoulder [J]. *J Bone Joint Surg (Br)*, 2000, 82(5): 768-773.
- [12] Nago M, Mitsui Y, Gotoh M, et al. Hyaluronan modulates cell proliferation and mRNA expression of adhesion-related procollagens and cytokines in glenohumeral synovial/capsular fibroblasts in adhesive capsulitis [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(6): 726-731.
- [13] Norlin R, Hoe-Hansen C, Quist G, et al. Shoulder region of the rat: Anatomy and fiber composition of some suprascapular nerve branches [J]. *Anat Rec*, 1994, 239(3): 332-342.
- [14] Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, et al. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 1996, 5(5): 383-392.
- [15] Grumet RC, Hadley S, Diltz MV, et al. Development of a new model for rotator cuff pathology: the rabbit subscapularis muscle [J]. *Acta Orthop*, 2009, 80(1): 97-103.
- [16] Turner AS. Experiences with sheep as an animal model for shoulder surgery: Strengths and shortcomings [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2007, 16(5 suppl): 158-163.
- [17] Macgillivray JD, Fealy S, Terry MA, et al. Biomechanical evaluation of a rotator cuff defect model augmented with a bioresorbable scaffold in goats [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2006, 15(5): 639-644.
- [18] Bisson LJ, Manohar LM, Wilkins RD, et al. Influence of suture material on the biomechanical behavior of suture-tendon specimens: a controlled study in bovine rotator cuff [J]. *Am J Sports Med*, 2008, 36(5): 907-912.
- [19] 吴强,郑倩华,蒋一璐,等. 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(5): 125-130.
- [20] Zuckerman JD, Rokito A. Frozen shoulder: a consensus definition [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2011, 20(2): 322-325.
- [21] 王绪辉. 肩关节周围炎的实验病理学研究 [J]. *中国医药学报*, 1988, 3(5): 14-16.
- [22] 熊昌源,毕学薇,沈霖,等. 兔肩周炎的模型复制及相关生物化学指标测定 [J]. *中国骨伤*, 1996, 9(4): 11-13.
- [23] 沈霖,朱闽,熊昌源,等. 兔实验性肩关节周围炎局部病变组织中的氧自由基代谢变化 [J]. *中国中医骨伤科*, 1994, 2(6): 7-9.
- [24] 李茂昌. 刃针结合毫针治疗肩周炎大鼠模型抗炎镇痛效应的实验研究 [D]. 长春中医药大学, 2014.
- [25] 周鑫,王平. 肩周炎的中医药实验研究进展 [J]. *中医研究*, 2015, 28(11): 73-76.
- [26] 王晨瑶,方剑乔,邵晓梅,等. 肩髃穴电针对肩关节周围炎家兔模型的干预作用 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2007, 31(4): 478-480,482.
- [27] 康佳珺. 舒筋止痛水治疗肩周炎模型兔对血清中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 的影响研究 [J]. *按摩与康复医学*, 2018, 9(17): 38-40.
- [28] 刘玉雷,敖英芳,崔国庆,等. 糖尿病大鼠盂肱关节活动度变化的测量研究 [J]. *中国运动医学杂志*, 2009, 28(3): 292-296.
- [29] 郝永壮,张宇明,高刚,等. 糖尿病大鼠肩关节病理改变及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(12): 2811-2813.
- [30] 张宇明,郝永壮,高刚,等. 糖尿病大鼠盂肱关节血管内皮生长因子表达与血管生成的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(5): 1130-1132.
- [31] Schollmeier G, Uthoff HK, Sarkar K, et al. Effects of immobilization on the capsule of the canine glenohumeral joint. A structural functional study [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1994(304): 37-42.
- [32] Schollmeier G, Sarkar K, Fukuhara K, et al. Structural and functional changes in the canine shoulder after cessation of immobilization [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1996, (323): 310-315.
- [33] Kim DH, Lee KH, Lho YM, et al. Characterization of a frozen shoulder model using immobilization in rats [J]. *J Orthop Surg Res*, 2016, 11(1): 160.

- [34] Liu YL, Ao YF, Cui GQ, et al. Changes of histology and capsular collagen in a rat shoulder immobilization model [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(23): 3939-3944.
- [35] 褚立希, 郑效文, 冯逸松. 慢性损伤性肩关节周围炎的实验病理研究 [J]. *上海中医药杂志*, 1994(9): 45-46.
- [36] 王盼盼. 转化生长因子 (TGF- β 1)、膜型金属基质蛋白酶 (MMP-14)、P38 MAPK 对继发性冻结肩的影响及作用机制研究 [D]. 苏州大学, 2017.
- [37] Kanno A, Sano H, Itoi E. Development of a shoulder contracture model in rats [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2010, 19(5): 700-708.
- [38] Ochiai N, Ohtori S, Kenmoku T, et al. Sensory innervation of rat contracture shoulder model [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2013, 22(2): 158-164.
- [39] Villa-Camacho JC, Okajima S, Perez-Viloria ME, et al. *In vivo* kinetic evaluation of an adhesive capsulitis model in rats [J]. *J Shoulder Elbow Surg*. 2015, 24(11): 1809-1816.
- [40] Oki S, Shirasawa H, Yoda M, et al. Generation and characterization of a novel shoulder contracture mouse model [J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(11): 1732-1738.

[收稿日期]2019-10-12

(上接第 102 页)

- [28] 黄小庆, 刘纯. IL-21 调节外周血中 Treg 细胞的表达在 Graves 病发病机制中的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(6): 853-857, 862.
- [29] 杨静, 潘天荣, 杜益君等. Grave 病 131I 或抗甲状腺药物治疗前后外周血 CD4+CD25+CD127low 调节性 T 细胞的变化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(5): 691-695.
- [30] Qin J, Zhou J, Fan C, et al. Increased circulating Th17 but decreased CD4⁺Foxp3⁺Treg and CD19⁺CD1dhiCD5⁺Breg subsets in new-Onset Graves' disease [J]. *Biomed Res Int* 2017, 2017; 8431838.
- [31] 王建国, 史春云, 丑广程, 等. Graves 病患者血清 TLR4、NF- κ B 和 Treg/Th17 相关细胞因子表达变化及意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(24): 58-61.
- [32] Zhang D, Qiu X, Li J, et al. MiR-23a-3p-regulated abnormal acetylation of FoxP3 induces regulatory T cell function defect in Graves' disease [J]. *Biol Chem* 2019, 400(5): 639-650.
- [33] Bossowski A, Moniuszko M, Idkowska E, et al. Decreased proportions of CD4+IL17+/CD4+CD25+CD127- and CD4+IL17+/CD4+CD25+CD127-FoxP3+ T cells in children with autoimmune thyroid diseases [J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(5): 320-328.
- [34] Chen J, Tian J, Tang X, et al. MiR-346 regulates CD4+CXCR5+ T cells in the pathogenesis of Graves' disease [J]. *Endocrine* 2015, 49(3): 752-760.
- [35] Wang B, Jia X, Yao Q, et al. CEP128 is a crucial risk locus for autoimmune thyroid diseases [J]. *Mol Cell Endocrinol* 2019, 480: 97-106.
- [36] Zhang J, Ren M, Zeng H, et al. Elevated follicular helper T cells and expression of IL-21 in thyroid tissues are involved in the pathogenesis of Graves' disease [J]. *Immunol Res*, 2015, 62(2): 163-174.
- [37] 周军. MiR-346 对 Graves 病小鼠 Tfh 细胞影响的初步研究 [D]. 江苏: 江苏大学, 2016.
- [38] Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function [J]. *Immunity* 2015, 42(4): 607-612.
- [39] Ryzdewska M, Jaromin M, Pasierowska IE, et al. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases [J]. *Thyroid Res* 2018, 11(1).
- [40] Zha B, Wang L, Liu X, et al. Decrease in proportion of CD19⁺CD24hiCD27⁺ B Cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49835.
- [41] 毕美, 周瑾, 范晨玲, 等. Graves 病小鼠模型发病中调节性 B 细胞的表达变化 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(3): 246-250.

[收稿日期]2019-09-29