



小鼠胶原诱导性关节炎模型的建立 及其免疫学变化研究

肖智勇 张令令 张小锐 周文霞 张永祥

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

【摘要】 目的 胶原诱导性关节炎模型(collagen induced arthritis, CIA)是研究类风湿性关节炎发病机制和治疗药物筛选的理想模型,也是目前国际上公认的关节炎模型。但是,目前鲜见Ⅱ型胶原诱导CIA模型的系统免疫学变化的报道。因此,本研究采用DBA/1小鼠诱导了CIA模型,并对其免疫学改变进行了系统研究。方法 将牛Ⅱ型胶原与完全弗氏佐剂混和并充分乳化,于DBA/1小鼠尾根部皮内注射进行初次免疫,20 d后同样方法进行再次免疫。应用千分尺测量CIA模型小鼠的左右两侧足掌厚度,并进行关节炎评分。酶联免疫吸附试验测定小鼠血清Ⅱ型胶原特异性抗体, Luminex技术和 α LISA技术测定血清及培养上清中的细胞因子水平。结果 CIA小鼠于造模后23 d开始,陆续出现前肢、后肢的红肿、功能障碍,发病率高达100%,且随着时间的延长其关节肿胀程度呈进行性加重,关节炎评分增高。CIA小鼠脾脏指数较正常组明显升高,且Ⅱ型胶原刺激的特异性T细胞增殖明显增强。细胞因子检测结果表明,脾细胞培养上清中IFN- γ 和IL-4含量及IFN- γ /IL-4比值明显升高,TNF- α 和IL-1 β 水平亦显著升高。此外,CIA小鼠血清中存在高水平的Ⅱ型胶原特异性抗体。结论 Ⅱ型胶原诱导CIA模型发病率高,免疫学改变以Th1细胞因子升高为主,兼有细胞免疫功能及体液免疫功能损伤。

【关键词】 CIA; 细胞免疫; Th1/Th2; 细胞因子

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10、11-0136-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10、11.031

Establishment and Immunological Evaluation of Mouse Model of Collagen Induced Arthritis

XIAO Zhi-yong, ZHANG Ling-ling, ZHANG Xiao-rui, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang
(Institute of Pharmacology and Toxicology, AMMS, Beijing 100850, China)

【Abstract】 Objective Collagen induced arthritis (CIA) is an ideal model for studying the mechanism of rheumatoid arthritis (RA) and exploring the anti-RA drug candidates. However, there are few studies about the systemic immune abnormality of CIA mice as yet. Thus, we established CIA model using collagen II and evaluated it. **Methods** Blending collagen II and Complete Freund's adjuvant and emulsifying them completely, then injected them to male DBA/1 mice at root of the tail. After 20 days, repeated this process. The swelling of the claw were determined using micrometer. ELISA, Luminex and α LISA were employed to measure the collagen II-specific antibodies and multiple cytokines. **Results** Beginning from 23 days of injection, red swelling of the claw skin appeared in some mice. At the end of experiment, 100% mice developed arthritis symptoms. The spleen index of CIA mice increased significantly, accompanied by

[基金项目]国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-018, 2009ZX09103-361);国家自然科学基金项目(81001652)。

[作者简介]对此文贡献相等:肖智勇(1976-)女,助理研究员,博士,研究方向:免疫药理。E-mail: zy-xiao@163.com。张令令(1985-)女,硕士,研究方向:免疫药理学。E-mail: llzhang07@126.com。

[通讯作者]周文霞(1968-)女,研究员,博士,研究方向:中药和神经免疫药理。E-mail: zhouwx@bmi.ac.cn。

augmented spleen lymphocyte proliferation reaction to collagen II. At the same time, multiple cytokine levels in the supernatant of cultured spleen lymphocytes increased than control, such as IFN- γ , TNF- α and IL-1 β . In addition, there was high amount collagen II-specific antibodies in the serum of CIA mice. **Conclusions** CIA mice characterized by abnormal activation of T cell, especially Th1 cell, with a high incidence, is a suitable RA model.

【Key words】 Collagen induced arthritis; Cellular immunity; Th1/Th2; Cytokine

实验性类风湿性关节炎动物模型为研究类风湿性关节炎的病因、发病机制和治疗方法提供了有力的工具。理想的类风湿动物模型应该具备以下条件: (1) 临床症状、病理和影像学的特点与人类 RA 相似; (2) 尽可能少的具备非 RA 的特点; (3) 易感的动物品系容易得到且价格便宜; (4) 动物可以高效繁殖; (5) 可以缩短疾病的自然发生过程; (6) 容易检测疾病和免疫功能的变化; (7) 可以模拟类风湿性关节炎患者的治疗作用。目前类风湿性关节炎的动物模型有佐剂性关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AA)、链球菌细胞壁成分 (streptococcal cell wall fragments, SCW) 诱导的关节炎、卵蛋白诱导的关节炎、蛋白多糖诱导的关节炎、降植烷 (pristane) 诱导的关节炎、胶原诱导的关节炎 (collagen induced arthritis, CIA)、转基因动物模型等^[1]。其中 CIA 小鼠模型最为常用的模型。

CIA 模型是 Trentham 等 1977 首次建立的实验性关节炎动物模型, 是一种免疫性炎症模型, 以多发性的末端关节炎为主要临床表现^[2]。T 细胞激活、细胞因子分泌和 II 型胶原抗体等的产生是 CIA 发病的主要环节^[3]。但是, 目前鲜见 II 型胶原诱导 CIA 模型的系统免疫学变化的报道。因此, 本研究采用 DBA/1 小鼠诱导了 CIA 模型, 并对其免疫学改变进行了系统研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: DBA/1/J 小鼠, 三级, 雄性, 6~8 周, 华阜康生物技术有限公司提供 [SCXK(京) 2009-0004]。实验时饲养于温度 (20±2) °C 和湿度 (55±2) % 相对较为恒定的动物饲养室, 自由饮水, 每日光照/黑暗各 12h。

1.1.2 药品及试剂: 完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)、牛 II 型胶原 (C II), Chondrex 公司, 美国。刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) sigma 公司, 美国。Luminex 细胞因子试剂盒, Millipore 公司, 德国; α LISA 试剂盒, Perkin Elmer 公司, 美国。辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase,

HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG, Santacruz 公司, 美国。

1.1.3 II 型胶原诱导的关节炎模型小鼠的制备: 将 C II 溶于 0.02 mol/L 的醋酸中 2 mg/mL, 4°C 过夜, 将溶解的 C II 与 CFA 等体积混和充分乳化 (操作在冰上进行), 将乳化后的液体滴在水中后不扩散且成形, 视为乳化完全。于 DBA/1 小鼠尾根靠后 1-2 cm 处皮内注射 100 μ L C II 与 CFA 的混合乳剂 (含 C II 0.1 μ g) 进行初次免疫, 当天记为 1 d, 到 21 d 同样方法进行第二次免疫。

1.2 实验方法

1.2.1 CIA 小鼠足爪肿胀测量: 应用千分尺测量 CIA 模型小鼠的左右两侧足掌厚度, 每周测一次。

1.2.2 关节炎评分: 每 3 天一次评分, 评分标准: 0 = 无红斑或肿胀。1 = 轻微的红斑或一个趾的肿胀。2 = 红斑和超过一个趾的肿胀。3 = 红斑和踝部或腕部肿胀。4 = 全部红斑及脚趾和踝部或手指和腕部的肿胀, 踝或腕不能弯曲。

1.2.3 II 型胶原特异性抗体的测定: 将 2 mg/mL 的 C II 溶于 PPB 缓冲液中, 浓度为 5 μ g/mL, 100 μ L/孔包被酶标板, 4°C 过夜; 5% FCS 封闭酶联板 4°C 30 min; 将样品以 1:10000~50000 稀释后每孔 100 μ L 孵育 4°C 过夜, 洗板 3 次后加 100 μ L/孔二抗 (2 μ g/mL), 4°C 孵育至少 2 h, 洗板 6 次后加入 100 μ L TMB, 室温孵育 15 min, 用 50 μ L/孔的 2 mol/L 硫酸 (终止液) /孔终止反应。读取 OD_{450nm}。

1.2.4 脾细胞培养上清中 IL-17 的测定: α LISA 技术是基于增强化学发光的均相免疫检测技术, 是在传统的 ELISA 技术基础上进行的改进, 借助微珠进行生物分子检测, 无需洗涤。参照说明书进行操作 5 μ L/孔标准品或空白对照或 CIA 模型小鼠培养上清加入 384 微孔板 5 μ L/孔新鲜配制的 2.5 \times 抗 IL-17 受体磁珠和生物素化抗 IL-17 抗体混合物 (终浓度分别为 10 μ g/mL、1 nM); 23°C, 孵育, 60 min 40 μ L/孔 2 \times SA-Donor 磁珠 (终浓度为 40 μ g/mL) 23°C, 避光孵育 30 min; EnVison-Alpha Reader 2103 上机检测, 激发波长 680 nm, 发射波长 615 nm。

1.2.5 脾细胞培养上清 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 IL-

4 含量的测定^[4]:应用 Luminex 技术检测 CIA 小鼠血清、脾细胞培养上清中 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 IL-4 含量。检测方法:细胞培养上清经 10000 rpm 离心 5 min 进一步去除脂质、杂质等有形成分,暂置 4 $^{\circ}$ C 保存待测。血清混匀,离心后 4 $^{\circ}$ C 保存待测;参照说明书配置标准品和质控品;每孔 200 μ L Wash buffer 润湿微量滴定过滤板,密封后在摇板机上室温(20~25 $^{\circ}$ C)振荡 10 min;真空抽除清洗液,使用吸水垫或纸巾吸干板底的水分;在对应的孔中加入 25 μ L 标准物或质控液,Assy buffer 作为 0 pg/mL 标准物(背景)加入;在样品孔中加入 25 μ L assay buffer;在背景、标准物和质控孔中加入 25 μ L 合适的血清基质;在对应的孔中加入 25 μ L 血清或培养上清样品;充分混合分别能与 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 IL-4 结合的 4 种微球,在每孔中加 25 μ L 抗体珠(注意:添加抗体珠时需不时摇动以避免沉淀);96 孔板盖上盖子 4 $^{\circ}$ C 摇动过夜;小心地真空抽除液体;每孔使用 200 μ L 清洗液洗板 2 次,真空抽除清洗液,使用吸水垫或纸巾吸干板底的水分;每孔加入 25 μ L 检测抗体;盖上盖子,在室温(20~25 $^{\circ}$ C)摇动孵育 1 h

(孵育后不要真空抽除);加入 25 μ L 抗生物素蛋白链菌素-藻红素;盖上盖子,在室温(20~25 $^{\circ}$ C)摇动孵育 30 min;小心地真空抽除全部液体,每孔使用 200 μ L 清洗液洗板 2 次,真空抽除清洗液;在所有孔中加入 150 μ L 鞘液。在摇板机上摇板 5 min 以充分重悬抗体珠;使用 LuminexTM200 读板。采集样品数据后,经 MasterPlexTMQT 软件分析生成标准曲线,并计算出每个样品中所含 4 种细胞因子的浓度。

1.3 数据处理和统计学分析

实验结果数据以“均数 \pm 标准差”表示,关节炎肿胀度的比较采用 SPSS v18.0 软件进行具有一个重复测量的方差分析。两组间均数显著性检验采用成组 *t* 检验。

2 结果

2.1 CIA 模型小鼠关节炎症状

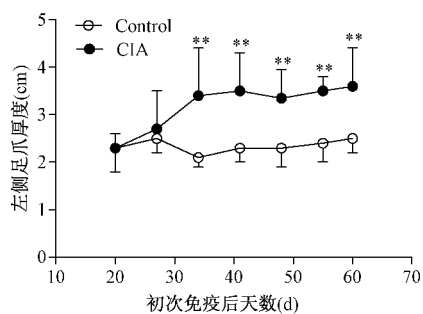
CIA 小鼠于造模后 23 d 开始,陆续出现前肢、后肢的红肿、功能障碍,体重也有明显下降,但鼻、耳部肿胀不明显;发病率高达 100%,且随着时间的延长其关节肿胀程度呈进行性加重(图 1)。



图 1 CIA 小鼠的足爪关节炎症状。

2.1.1 CIA 模型小鼠足爪肿胀度

CIA 模型小鼠在免疫后 27 d,左、右两侧足爪厚



度开始出现不同程度的增加,并且随着造模时间呈进行性加重(图 2)。

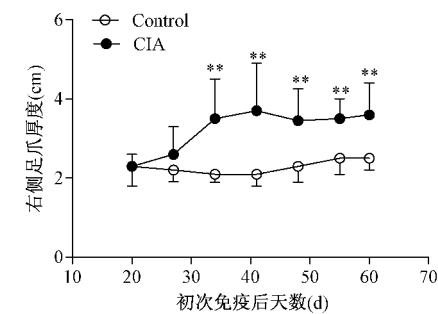


图 2 CIA 模型小鼠足爪肿胀度。(A) 左侧、(B) 右侧。**P* < 0.01, *n* = 8

2.1.2 CIA 模型小鼠关节炎评分

由于足爪厚度的测量仅方便于小鼠后肢的测

量,我们采用关节炎评分从整体上观察 CIA 小鼠四肢的发病情况及严重程度。结果表明,自免疫后 30

d 开始,模型小鼠关节炎评分达 8 ± 1 ,较对照组明显升高。实验后期,多数模型小鼠出现踝部腕部肿胀、变形,不能弯曲,关节炎评分更为升高(图 3)。

2.2 CIA 模型小鼠脏器指数的变化

实验结束后取小鼠胸腺、脾脏称重,实验结果显示模型组小鼠脾脏指数较对照组明显升高,胸腺指数则无明显变化(表 1)。

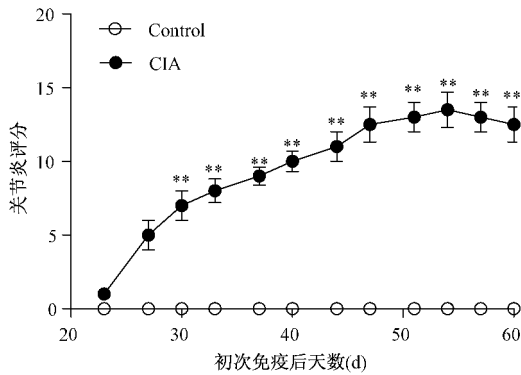


图 3 CIA 模型小鼠关节炎评分。
** $P < 0.01$, $n = 8$

表 1 CIA 模型小鼠脏器指数的变化

| 组别 | 脏器指数 | |
|---------|-----------------|----------------------|
| | 胸腺指数 | 脾脏指数 |
| Control | 1.31 ± 0.29 | 2.88 ± 0.1 |
| CIA | 1.63 ± 0.52 | $6.46 \pm 1.86^{**}$ |

注: ** $P < 0.01$, $n = 3$

2.3 CIA 模型小鼠 T 细胞功能的变化

2.3.1 CIA 模型小鼠 T 细胞增殖能力的变化

采用 [^3H]-TdR 掺入法观察 CIA 小鼠脾细胞增

殖反应的变化。结果表明,模型组脾细胞自发增殖的 cpm 值与正常对照组相比明显降低,但 CII 刺激的特异性 T 细胞增殖的 cpm 值有所升高(表 2)。

表 2 CIA 模型小鼠 T 细胞增殖能力的变化

| 组别 | [^3H]-TdR 掺入值(cpm) | |
|---------|-------------------------------|---------------------|
| | CII(-) | CII(+) |
| Control | 350.2 ± 55.2 | 24078.5 ± 186.3 |
| CIA | $278.5 \pm 15.1^{**}$ | 27356.46 ± 91.7 |

注: ** $P < 0.01$, $n = 8$

2.3.2 CIA 模型小鼠脾细胞培养上清细胞因子的变化

CD4⁺ T 细胞(T helper, Th0) 根据分泌细胞因子的不同可分为 Th1、Th2 和 Th17 等细胞亚群。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 等,介导与细胞毒和局部炎症有关的免疫应答,参与细胞免疫应答;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 等,可辅助 B 细胞分化和产生抗体,与体液免疫相关。Th0 在 IL-6、TGF- β 作用下分化为 Th17, Th17 主要分泌 IL-17, 等介导慢性炎症、器官移植免疫排斥、自身免疫疾病和肿瘤发生等。Th1/Th2 细胞的平衡紊乱、Th17 细胞活化被公认为 RA 发病的重要机制之一^[5]。

应用 Luminex 液相芯片技术检测了 CIA 模型小鼠脾细胞培养上清 Th1/Th2 细胞因子分泌水平的变化。结果表明,Con A 诱导的 CIA 模型小鼠脾细胞培养上清中 IFN- γ 和 IL-4 含量及 IFN- γ /IL-4 比值均较正常对照组明显升高。 α LISA 技术检测脾细胞培养上清 IL-17 含量,发现 CIA 模型小鼠脾细胞培养上清中 IL-17 含量与正常对照组比较无明显变化(表 3)。

表 3 CIA 模型小鼠 T 细胞细胞因子分泌的改变

| 组别 | IFN- γ (pg/ml) | IL-4(pg/ml) | IFN- γ /IL-4 | IL-17(pg/ml) |
|---------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Control | 960.2 ± 125.2 | 8.5 ± 1.8 | 112.3 ± 17.4 | 286.3 ± 18.2 |
| CIA | $2128.4 \pm 87.1^{**}$ | $17.1 \pm 1.5^{**}$ | $125.1 \pm 20.3^*$ | 315.2 ± 20.1 |

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$

2.4 CIA 模型小鼠巨噬细胞功能的变化

RA 患者滑膜细胞、单核巨噬细胞和淋巴细胞可产生大量致炎性细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 等,参与骨、关节损伤。本研究采用 LPS 诱导的小鼠脾细胞, Luminex 技术检测脾细胞培养上清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平,实验结果显示模型组 TNF- α 和 IL-1 β 水平较正常对照组明显升高(表 4)。

2.5 CIA 模型小鼠抗体生成的动态变化

初次免疫后 5、7、9 周采血,检测小鼠血清总 IgG 分泌水平变化情况。结果表明,正常对照组小鼠血清中未检测到 CII 特异性 IgG,而 CIA 模型小鼠

表 4 CIA 模型小鼠巨噬细胞细胞因子分泌的改变

| 组别 | TNF- α (pg/ml) | IL-1 β (pg/ml) |
|---------|------------------------|-----------------------|
| Control | 110.2 ± 36.2 | 100.6 ± 14.9 |
| CIA | $331.4 \pm 24.1^{**}$ | $362.3 \pm 36.8^{**}$ |

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$

血清中 CII 特异性 IgG 明显升高(表 5)。

表 5 CIA 模型小鼠血清 CII 特异性 IgG 的变化

| 组别 | IgG (OD450nm) | | |
|---------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | 5 w | 7 w | 9 w |
| Control | 0.21 ± 0.011 | 0.098 ± 0.015 | 0.178 ± 0.015 |
| CIA | $0.695 \pm 0.049^{**}$ | $0.787 \pm 0.13^{**}$ | $0.866 \pm 0.056^{**}$ |

注: ** $P < 0.01$, $n = 8$

3 讨论

本研究采用 II 型胶原和弗氏完全佐剂免疫 DBA/1 小鼠,成功诱导了小鼠类风湿性关节炎动物模型。该模型的特点是初次免疫约 30 天后,小鼠双侧足爪明显肿胀,关节炎评分升高,且随造模时间延长疾病呈进行性加重趋势。免疫学参数研究表明,模型小鼠脾脏指数增加,抗原特异性 T 细胞活化,分泌大量炎症细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-1 β 等。同时,还存在 B 细胞的过度活化,血清 CII 抗体表达水平显著升高。CIA 小鼠的临床特征和免疫学参数的变化和人类具有较高的一致性,是 RA 作用机制研究和药物研发的理想模型。

CIA 的建立要用异源性(牛或鸡) II 胶原(CII)分两次免疫易感动物如 DBA/1 小鼠,其机制主要包括以下方面:首先,与发病相关的 CII 抗原肽必须有核心肽段。CII 是由三条 1018 个氨基酸的 α 链组成的同源三聚体,其中的 CII 260~270 段含有能结合 MHC II 分子和被 TCR 识别的功能氨基酸,被称为 RA 或 CIA 发生的核心抗原肽段。该核心肽段在常温下容易降解,这也是在乳化胶原时为什么要求在 4 $^{\circ}$ C 环境下进行操作的原因。近交系 DBA/1 是 H-2^q 单倍型小鼠,H-2^q 对 CII 核心肽段有较强的易感性,能产生较强的 T 细胞扩增,继而诱导 CIA 产生。

其次,具备与 CIA 易感相关的 MHC II 类分子。RA 的易患性与 HLA-DR 和 HLA-DQ 的一些等位基因亚型密切相关,它们所表达的 DR 及 DQ 分子可以提呈 CII 260~270 等自身抗原肽,并识别特异性 TCR,从而激活 T 细胞。鼠类对 CIA 的易患性同样与 MHC II 类分子关系密切。小鼠 IA 基因与 HLA-DQ 同源,IE 基因与 HLA-DR 基因同源。研究发现,IA 分子 β 1 链的多态性决定了 CIA 的易患性,IE 分子也参与 CIA 病理过程的调节,与 CIA 的发生率和严重性有关。对 IA、IE 及 DQ、DR 的序列分析表明,

无论人或小鼠,RA/CIA 易患的等位基因亚型表达的 MHC II 类分子 β 1 链在 70~74 位氨基酸序列上多具有(QK/RRAA)的保守序列即所谓的共同表位(shared epitope)^[6]。这些相邻氨基酸残基的侧链分子组成的空间结构,是抗原肽的关键结合部位。H-2^q 小鼠表达的 MHC-II 类分子为 IA^q 和 IE^q,其中识别提呈 CII 抗原的 MHC II 类分子为 IA^q,所以 IA^q 小鼠(如:DBA/1、B10.Q)常被用来制作 CIA 动物模型^[7]。

参考文献:

- [1] Hegen M, Keith Jr JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*. 2008, 67: 1505-1515.
- [2] Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, et al. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity [J]. *Life Science*. 1997, 61: 1861-1878.
- [3] Van den berg WB. Animal models of arthritis. What have we learned? [J]. *J Rheumatol Suppl*. 2005, 72(1): 7-9.
- [4] Lu LD, Stump KL, Seavey MM. Novel Method of Monitoring Trace Cytokines and Activated STAT Molecules in the Paws of Arthritic Mice using Multiplex Bead Technology [J]. *BMC Immunology*. 2010, 11: 55.
- [5] Koshy PJ, Henderson N, Logan C, et al. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines [J]. *Ann Rheum Dis*. 2002, 61: 704-713.
- [6] Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis, an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*. 1987, 30: 1205-1213.
- [7] Rosloniec EF, Whiffington KB, Brand DD, et al. Identification of MHC class II and TCR binding residues in the type II collagen immunodominant determinant mediating collagen-induced arthritis [J]. *Cell Immunol*. 1996, 172: 21-22.

(修回日期)2011-09-15