

文章编号: 1000-5862(2017)05-0516-05

# 口服牛 II 型胶原蛋白诱发类风湿关节炎 大鼠模型的建立及评价

关 丽<sup>1</sup>, 毋丹丹<sup>2</sup>, 胡东生<sup>2</sup>, 刘冬舟<sup>3</sup>, 刘志刚<sup>1, 2\*</sup>

(1. 深圳市罗湖区人民医院风湿免疫科 广东 深圳 518001; 2. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所 广东 深圳 518060;  
3. 深圳市人民医院风湿免疫科 广东 深圳 518020)

**摘要:** 按照动物建模方案分别给不同组大鼠灌胃一定剂量的阿司匹林,再给大鼠灌胃牛 II 型胶原蛋白诱导其产生类风湿关节炎;建模期间进行踝关节直径的测量及关节炎指数评分;然后 ELISA 实验检测大鼠血清中特异性抗体(IgE、IgG)和炎症因子(IL-6、TNF- $\alpha$ 和 IFN- $\gamma$ );再进一步观察大鼠踝关节组织病理改变。结果表明:经过不同剂量阿司匹林( $5$ 、 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )处理的大鼠,用牛 II 型胶原蛋白灌胃后,大鼠踝关节呈现不同程度的肿胀及关节炎症状; $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理的大鼠炎症更明显,其血清中特异性抗体(IgE、IgG)和炎症细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 也显著增加,而细胞因子 IFN- $\gamma$ 显著降低,同时踝关节组织也发生明显炎症病变。这表明  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  处理的大鼠要比  $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  处理大鼠更易用于口服食物抗原牛 II 型胶原蛋白类风湿关节炎的建成。

**关键词:** 类风湿关节炎;食物抗原;口服;II 型胶原蛋白;动物模型

**中图分类号:** R 593.22 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2017.05.13

## 0 引言

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、进行性、侵袭性多关节炎为主要临床表现的全身性自身免疫性疾病,具有高发病率和高致残性<sup>[1-2]</sup>。其特征是手、足小关节的多关节、对称性、侵袭性关节炎,经常伴有关节外器官受累及血清类风湿因子阳性,可以导致关节畸形及功能丧失<sup>[3]</sup>。RA 严重危害人类健康,给社会 and 患者家庭带来沉重经济负担。据统计中国类风湿关节炎的患病率约为  $0.32\%\sim 0.36\%$ ,大概有 500 万名患者<sup>[4]</sup>。在类风湿关节炎的患者中,女性患者居多,且 60 岁以上患类风湿关节炎的几率更高,而女性患病率更高的原因至今无法确定,可能与女性易发免疫性疾病有关<sup>[5]</sup>。目前,RA 的病因和发病机制尚未完全清楚,更无快速有效的预防和治疗办法。相关研究报道显示众多类风湿关节炎的发生和加重与食物抗原的摄取有关,RA 患者进食某些过敏性食品可导致其

类风湿关节炎症状加重<sup>[6-8]</sup>。RA 动物模型的建立主要是通过关节局部皮下注射 II 型胶原蛋白诱导产生关节炎<sup>[9]</sup>。该模型虽然比较常用,但是皮下注射的诱导方式并不符合人体摄食模式,且人体摄食过程中食物抗原大分子如何通过肠道屏障进入血液循环并使机体产生一系列的免疫反应仍未被阐明。因此本研究建立一种口服食物抗原牛 II 型胶原蛋白诱导的 RA 动物模型并评价,为 RA 疾病发病机制及防治研究提供动物模型基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 wistar 大鼠 32 只,雌性,SPF 级,4~6 周,体质量约( $100\pm 15$ )g,购于广东省医学实验动物中心。

1.1.2 实验试剂 阿司匹林肠溶片(美国, sigma 公司);脂多糖(LPS 美国, sigma 公司);抗牛 II 型胶原蛋白特异性 IgG 和 IgE ELISA 检测试剂盒(美国,

收稿日期: 2017-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(81271950)和深圳市科技计划基础研究(JCYJ20130402151227168)资助项目。

通信作者: 刘志刚(1959-)男,江西南昌人,教授,博士,博士生导师,主要从事过敏反应与免疫学研究。E-mail: lzg195910@

126.com

eBioscience 公司);大鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒(中国,四正柏公司);胃蛋白酶、CCl<sub>4</sub> (中国,上海生工);石蜡(美国,sigma 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 牛Ⅱ型胶原蛋白的提取及鉴定 取新鲜牛软骨洗净切成粒并在液氮下研磨成粉末称5.0 g用10倍体积的4 mol·L<sup>-1</sup>盐酸胍混匀,于4℃下搅拌24 h,于12 000 r·min<sup>-1</sup>转速下离心20 min弃上清;沉淀用5倍体积的胃蛋白酶消化液(用0.50 mol·L<sup>-1</sup>乙酸配成,内含胃蛋白酶1 g·L<sup>-1</sup>)混悬4℃下搅拌48 h,于转速20 000 r·min<sup>-1</sup>下离心20 min,收集上清液4℃盐析过夜,离心得到沉淀。取沉淀用0.10 mol·L<sup>-1</sup>乙酸溶解,调pH值为7.5,再用0.05 mol·L<sup>-1</sup> tris-HCl、0.20 mol·L<sup>-1</sup> NaCl(pH值为7.5)进行透析平衡后,即得胶原蛋白初提液。最后采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定初提的牛Ⅱ型胶原蛋白。

1.2.2 动物模型的建立及分组 将32只Wistar大鼠随机分成4组(8只/组):生理盐水处理组(正常组)、CCl<sub>4</sub>+LPS+牛Ⅱ型胶原蛋白组(M1组)、5 mg·kg<sup>-1</sup>阿司匹林预处理2周后用牛Ⅱ型胶原蛋白+CCl<sub>4</sub>+LPS灌胃组(M2组)、10 mg·kg<sup>-1</sup>阿司匹林预处理2周后用牛Ⅱ型胶原蛋白+CCl<sub>4</sub>+LPS灌胃组(M3组)。建模为2个阶段:阿司匹林破坏胃肠道阶段和牛Ⅱ型胶原蛋白诱发类风湿关节炎阶段。第1阶段2周:M2、M3组分别用5、10 mg·kg<sup>-1</sup>阿司匹林灌胃,每天1次,正常组和M1用生理盐水处理;第2阶段8周:第1阶段结束后,分别给M1、M2、M3组每只大鼠灌胃10 mg牛Ⅱ型胶原蛋白,1天1次,持续8周;期间第3周和第4周分别给M1、M2、M3组每只大鼠四肢内侧皮下注射0.1 mL CCl<sub>4</sub>,1周1次;在建模的最后2周,M1、M2、M3组大鼠分别尾静脉注射脂多糖(0.05 mg·只<sup>-1</sup>),1周1次;正常组不予处理。

## 1.2.3 大鼠踝关节直径的测量及关节炎指数评分

用游标卡尺测量并记录大鼠右后腿踝关节的直径2周1次,共5次,所有测量均由同一人完成,测量期间严格遵循盲法的原则。采用关节炎评分法(0~4级)分别对实验组大鼠打分。0分:关节无红肿;1分:关节有红色斑点并轻度肿胀;2分:关节有红色斑点并中度肿胀;3分:关节有红色斑点并严重肿胀;4分:关节有红色斑点并且严重肿胀不能负重。每组所有大鼠的关节炎总分除以该组大鼠的只

数,即为该组大鼠的平均关节炎指数。

1.2.4 血清中抗牛Ⅱ型胶原蛋白特异性IgG及IgE的检测 在建模完成后,于轻度乙醚麻醉下,用断尾尖取血的方法取大鼠全血,离心分离血清,采用ELISA间接法(按照试剂盒说明书进行操作)检测大鼠血清中抗牛Ⅱ型胶原蛋白特异性IgG及IgE。

1.2.5 血清中细胞因子IL-6、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的检测 用ELISA间接法(按照试剂盒说明书进行操作)检测大鼠血清中的IL-6、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ ,比较实验组和对照组之间的差异。

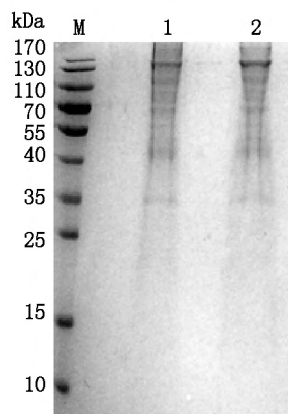
1.2.6 大鼠踝关节的组织病理学检测 将所取大鼠的踝关节组织用福尔马林硝酸脱钙固定后,再依次通过不同浓度酒精进行脱水。随后再将组织包埋于石蜡中并修切成长宽约8 mm的小蜡块。再用切片机将蜡块切片(4  $\mu$ m厚度)将切片展开于进行HE染色,然后封片,光学显微镜下观察其病理形态的变化。

1.2.7 统计分析 各组结果均用 $\pm s$ 表示,采用SPSS 16.0进行t检验进行差异性分析。

## 2 实验结果

### 2.1 牛Ⅱ型胶原蛋白的提取及鉴定

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法对牛Ⅱ型胶原蛋白初提蛋白进行鉴定,结果见图1,分子量在130 kDa左右,与购于sigma公司的牛Ⅱ型胶原蛋白分子量大小相一致,说明该方法能较好提取牛Ⅱ型胶原蛋白。



M: 蛋白分子量标记; 1: 实验提取的牛Ⅱ型胶原蛋白初提液; 2: sigma公司的牛Ⅱ型胶原蛋白。

图1 牛Ⅱ型胶原蛋白的初提

### 2.2 大鼠踝关节直径的测量及关节炎指数评分

于建模前、建模6周、建模8周、建模10周分别测量记录实验组和正常对照组大鼠的踝关节直径并

进行关节炎指数评分,结果见表1。从建模前一直到建模结束,各组大鼠的踝关节均有不同程度的增长,但是M2组和M3组大鼠踝关节直径均大于对照组和M1大鼠,其中M3组从第6周开始关节就明显肿

胀,显著大于对照( $p < 0.05$ ),关节炎指数评分也达到2.6;而M2组是从第8周开始关节略有肿大,关节炎指数评分为0.8;M1组关节直径及关节炎指数评分均与正常组无明显差异。

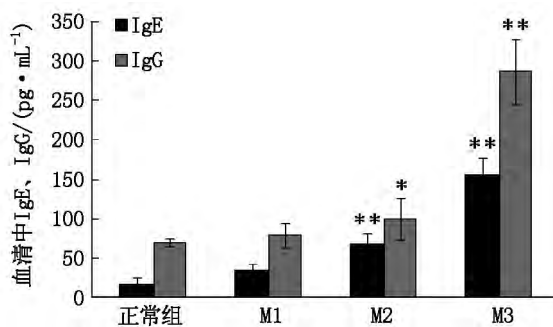
表1 大鼠踝关节直径及关节炎指数评分

组别	建模前	6周	8周	10周	指数评分
正常组	0.37 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0
M1	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0
M2	0.37 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.48 ± 0.01*	0.55 ± 0.04*	0.8*
M3	0.36 ± 0.03	0.44 ± 0.03*	0.50 ± 0.04*	0.59 ± 0.06**	2.6**

注:正常组:生理盐水处理组;M1组:CCl<sub>4</sub> + LPS + 牛II型胶原蛋白组;M2组:5 mg · kg<sup>-1</sup>阿司匹林预处理后牛II型胶原蛋白 + CCl<sub>4</sub> + LPS灌胃组;M3组:10 mg · kg<sup>-1</sup>阿司匹林预处理后牛II型胶原蛋白 + CCl<sub>4</sub> + LPS灌胃组。

### 2.3 血清中抗牛II型胶原蛋白特异性抗体IgE及IgG的检测

通过ELISA试剂盒检测血清中抗牛II型胶原蛋白特异性抗体IgE及IgG,结果见图2,与正常组相比,经阿司匹林预处理的M2和M3组大鼠血清中的抗牛II型胶原蛋白特异性IgE和IgG显著增加( $p < 0.05$ ),其中M3组大鼠血清中的IgE和IgG增加更明显;未经阿司匹林预处理的M1组血清中特异性抗体没有明显改变( $p > 0.05$ )。



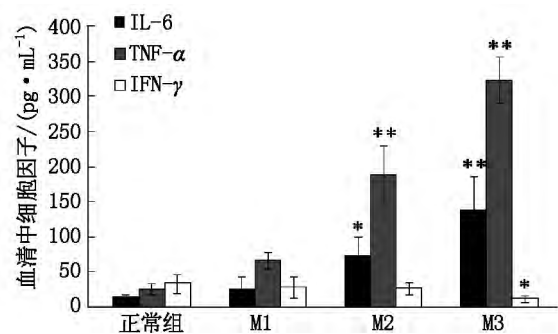
注:与正常组相比,\* $p < 0.05$ 存在显著差异,\*\* $p < 0.01$ 存在极显著差异。

图2 大鼠血清中牛II型胶原蛋白特异性抗体IgE及IgG水平

### 2.4 血清中细胞因子的检测

通过ELISA试剂盒检测血清中细胞因子IL-6、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 水平,结果见图3,与正常组相比,M1和M2组大鼠血清中的IFN- $\gamma$ 水平没有明显改变,而高剂量阿司匹林(10 mg · kg<sup>-1</sup>)预处理的M3组大鼠血清中的IFN- $\gamma$ 水平显著降低( $p < 0.05$ );M1组大鼠血清中的IL-6和TNF- $\alpha$ 水平没有明显变化( $p > 0.05$ ),经阿司匹林预处理M2和M3组大鼠血清中的IL-6、TNF- $\alpha$ 水平降低显著增加( $p < 0.05$ ),其中其中10 mg · kg<sup>-1</sup>阿司匹林处理的M3增加更显著( $p < 0.01$ ),说明高低剂量阿司匹林和牛II型

胶原蛋白均能使小鼠产生更强的炎症反应。

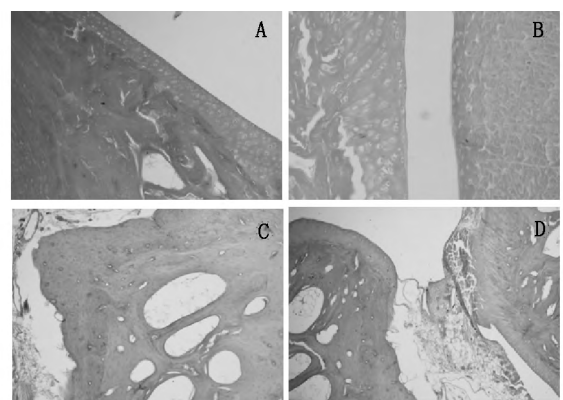


注:与正常组相比,\* $p < 0.05$ 存在显著差异,\*\* $p < 0.01$ 存在极显著差异。

图3 大鼠血清中血清中细胞因子IL-6、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 水平

### 2.5 大鼠踝关节的组织病理学检测

如图4所示,正常对照组大鼠和M1组大鼠的踝关节组织切片可见清晰的关节腔,滑膜由滑膜细胞组成并排列有序,滑膜组织无炎症细胞浸润,无



注:图4(A):正常对照组;图4(B):M1组(CCl<sub>4</sub> + LPS + 牛II型胶原蛋白组);图4(C):M2(5 mg · kg<sup>-1</sup>阿司匹林预处理后牛II型胶原蛋白 + CCl<sub>4</sub> + LPS灌胃组);图4(D):M3(10 mg · kg<sup>-1</sup>阿司匹林预处理后牛II型胶原蛋白 + CCl<sub>4</sub> + LPS灌胃组)。

图4 大鼠踝关节组织切片(HE染色)

纤维组织增生,关节软骨表面光滑;M2组大鼠的踝关节滑膜中有炎性细胞浸润,关节软骨表面凹凸不平;M3组大鼠可见软骨细胞增生,软骨破坏程度较严重,关节软骨表面凹凸不平,关节腔中可见大量的炎性细胞。

### 3 讨论

类风湿关节炎的发病机制十分复杂,至今尚未明确。大量研究发现,RA患者进食某些过敏性食品可导致其类风湿关节炎症状加重<sup>[10]</sup>。国外报道,RA患者的病情与食物有着密切联系<sup>[11-12]</sup>。大量非自身性抗原的持续通过肠道粘膜屏障渗入血液和刺激,可诱导机体产生口服食物抗原特异性抗体和炎症细胞因子,如增加TH2细胞因子IL-6、IL-4和TNF- $\alpha$ 等炎症因子,导致RA、过敏及IgA肾炎等自身免疫性疾病的发生<sup>[13-14]</sup>。自20世纪60年代成功建立佐剂性关节炎动物模型以来,人们已建立了许多关节炎动物模型,并在RA的病因、发病机制、药物筛选机疗效评价等方面得到广泛的应用,为认识RA、寻找新的治疗方法提供了极大的帮助<sup>[15]</sup>。但迄今尚没有任何一种动物模型能完美地模拟RA的发病特征和免疫学改变。

本文主要通过模拟现实生活中人体摄食模式,建立一种口服食物抗原牛Ⅱ型胶原蛋白诱导的RA动物模型。从研究结果可以看出,经过高剂量阿司匹林破坏胃肠道处理后的大鼠,用牛Ⅱ型胶原蛋白能很好地诱发类风湿关节炎;其比低剂量(5 mg·kg<sup>-1</sup>)阿司匹林处理建模成功率显著增高。用高剂量阿司匹林处理后的大鼠建成RA模型后,出现明显关节肿大血清中特异性抗体(IgE、IgG)和炎性细胞因子IL-6、TNF- $\alpha$ 也显著增加,而细胞因子IFN- $\gamma$ 显著降低,同时踝关节组织病理观察显示可见软骨细胞增生,软骨破坏程度较严重,关节软骨表面凹凸不平,关节腔中可见大量的炎性细胞。高剂量阿司匹林破坏胃肠道处理后的大鼠,能用牛Ⅱ型胶原蛋白成功诱发类风湿关节炎。研究成果将为在RA疾病发病机制及防治研究提供动物模型基础和理论依据。

### 4 参考文献

[1] 魏蕾. 类风湿关节炎病因和发病机制研究进展[J]. 医学综述 2015 21(9): 1548-1551.

- [2] 龚爱迪, 欧阳亚琳, 张学英, 等. 国内外类风湿性关节炎动物实验模型研究进展分析[J]. 世界最新医学信息文摘 2015(19): 25-27.
- [3] 王朴. 实验性类风湿性关节炎动物模型研究进展[J]. 云南中医中药杂志 2015 36(2): 75-78.
- [4] 于水莲, 陶怡, 王羿升, 等. 炎症因素与早期类风湿关节炎心血管病变相关性研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2016 20(11): 739-745.
- [5] Zhangpeng, Hu Yiping, Li Jinchao, et al. Study in treatment of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice model by genistein [J]. Curr Pharm Des 2016; 22(46): 6975-6981.
- [6] 谭宁, 贺守第, 倪慧婕, 等. 类风湿关节炎血清植物性食物过敏原特异性IgG和IgE检测[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志 2016 10(2): 97-100.
- [7] 袁谢芳, 李建杰, 李国平, 等. 口服益生菌对食物过敏大鼠肠道粘膜免疫及病理变化的实验研究[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2015 39(3): 253-256.
- [8] 刘玲, 闫浩, 李兵, 等. 重组花生过敏原Ara h2复合疫苗治疗食物过敏的疗效和作用机理研究[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2015 39(3): 249-252, 285.
- [9] 姬洁莹, 李晋奇, 郭阿霞, 等. 类风湿性关节炎动物模型复制与评价[J]. 山西中医学院学报 2013 14(3): 73-76.
- [10] Wu Dandan, Liu Xiaoyu, Su Hong, et al. Oral antigens induce rheumatoid arthritis-like inflammation in a rat model [J]. Inflamm Res 2013 62(3): 291-297.
- [11] Vaghef-Mehrabany E, Vaghef-Mehrabany L, Asghari-Jafarabadi M, et al. Effects of probiotic supplementation on lipid profile of women with rheumatoid arthritis: A randomized placebo-controlled clinical trial [J]. Health Promot Perspect 2017 7(2): 95-101.
- [12] Marietta E V, Murray J A, Luckey D H, et al. Suppression of inflammatory arthritis by human gut-derived prevotella histicola in humanized mice [J]. Arthritis Rheumatol, 2016 68(12): 2878-2888.
- [13] 齐晖, 田玉, 孙超, 等. NF- $\kappa$ B信号通路的阻断对类风湿关节炎滑膜细胞凋亡与炎症的影响[J]. 中国老年学杂志 2015(24): 7022-7024.
- [14] 余黄合, 魏艳霞, 林也, 等. IL-23/IL-17炎症轴在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2016 13(31): 37-41.
- [15] 姜旭淦, 陈盛霞, 吴亮, 等. 消化酶在口服Ⅱ型胶原蛋白治疗类风湿性关节炎中的作用[J]. 江苏大学学报: 医学版 2011 21(2): 108-112, 116.

## The Establishment and Accessing of Rheumatoid Arthritis Model in Rat by Oral Bovine Collagen Type II

GUAN Li<sup>1</sup>, WU Dandan<sup>2</sup>, HU Dongsheng<sup>2</sup>, LIU Dongzhou<sup>3</sup>, LIU Zhigang<sup>1, 2\*</sup>

(1. Department of Rheumatology, Luohu People's Hospital, Shenzhen Guangdong 518001, China;

2. Institute of Allergy and Immunology, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China;

3. Department of Rheumatology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen Guangdong 518020, China)

**Abstract:** An RA animal model was developed by gavage feeding with bovine collagen type II and aspirin and tail vein injection with lipopolysaccharide. The diameter of ankle were measured and the score of the arthritis. The concentration of IgE, IgG, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in serum by ELISA test. The inflammation in the ankle joints was evaluated by light microscopy and the ankle histopathological changes. The results show that Rats treated with high doses of aspirin(10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) can be successfully induced by oral bovine collagen type II. The ankle of rat presents obvious swelling and arthritis symptoms. High levels of proinflammatory cytokines and specific antibodies were detected in the sera. The histology showed an inflammatory feature in the ankle joints. Rats treated with high doses of aspirin(10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) can be successfully induced by oral bovine collagen type II.

**Key words:** rheumatoid arthritis; food antigen; oral; bovine collagen type II; animal model

(责任编辑: 刘显亮)

(上接第 515 页)

## The Analysis on Ecological Habits of Common Birds in Electric Transmission Lines from Jiangxi Province

LI Yanglin<sup>1</sup>, XU Ning<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, ZHI Yijin<sup>2</sup>, SHAO Mingqin<sup>2\*</sup>

(1. Jiangxi Electric Power Research Institute of China Power Grid, Nanchang Jiangxi 330096, China;

2. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China.)

**Abstract:** The species quantity and ecological habits of birds on the earth wire and iron towers of electric transmission lines in Jiangxi province are investigated using line transects and point counts methods combined with a random survey from November 2011 to May 2017. Forty-nine species of birds are recorded on the earth wire or iron towers, including two Chinese first key protected animals and three Chinese second key protected animals. There are 20 species of mainly medium and small-sized birds with higher frequency in the earth wire and iron towers. Birds have diverse ecological habits and similar habitats such as hills, forests and agricultural land. The results show that *Sturnus nigricollis*, *Sturnus sericeus* and *Ciconia boyciana* have more probability of causing transmission lines breakdown. Resident is the main element of birds during this study, as for the fauna, the birds of Oriental realm has the highest proportion. Birds with low population size and high endangered rank always have higher diffusion capacity. Several suggestions on how to reduce electric transmission line breakdown are discussed.

**Key words:** Jiangxi Province; electric transmission line; birds; habit

(责任编辑: 刘显亮)