

SD大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评估

祁芳¹,李艳玲¹,艾坤^{1*},蔡雄¹,李鑫¹,刘梨²,张泓¹,杨茜芸¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 通过在不同组的SD大鼠尾部注射不同剂量的结核分枝杆菌 H37Ra(Mtb)溶液,探索最佳致炎剂量,为类风湿性关节炎大鼠的造模方法及基础研究提供理论依据。**方法** 采用灭活的Mtb与矿物油混匀,配制成浓度分别为0.625、1.25、2.5、5.0 mg/mL的佐剂,每组大鼠均给予相应浓度的MT悬浮液0.1 mL于尾根部皮下注射,诱导SD大鼠类风湿性关节炎。在实验周期内,定期测量大鼠体重,进行足爪容积测定、关节炎评分等,最后综合各项指标进行分析讨论,探讨得出最佳致炎剂量。**结果** 62.5 μg组不能充分诱导出关节炎,被剔除。125 μg组、250 μg组、500 μg组成功率均为100%,该3组关节肿胀程度、关节炎评分等无明显差异($P>0.05$),其中125 μg组大鼠关节受累范围和关节肿胀程度均轻于250 μg组和500 μg组。**结论** 由Mtb诱导的佐剂性关节炎大鼠模型造模成功率高,最佳致炎剂量可能为125 mg/mL,0.1 mL/只。

[关键词] SD大鼠;佐剂性关节炎;结核分枝杆菌 H37Ra;致炎剂量

[中图分类号]R684.3,R274 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.01.005

The Establishment and Evaluation of Adjuvant-Induced Arthritis in SD Rats

QI Fang¹, LI Yanling¹, AI Kun^{1*}, CAI Xiong¹, LI Xin¹, LIU Li², ZHANG Hong¹, YANG Qianyun¹

(1.Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha city of Hunan, 410208, 2. First Hospital

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the best dosage of establishing rheumatoid arthritis model (AIA) rats by caudal injection with different concentration of Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Mtb) solution of different groups' SD rats to provide the theory basis for establishing AIA rats methods and its fundamental research. **Methods** Adopt the Heat-killed Mtb mix with mineral oil, the mixture concentration were 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 mg/mL, respectively. the concentration of rats in each group are given the corresponding MT suspension 0.1 mL in the tail root subcutaneously to induce the rheumatoid arthritis. During the experimental period, the rats' body weight was measured at fixed period, the foot paw volume and arthritis were scored, etc, regularly. In the end, the most suitable dosage of inflammatory is selected based on the indexes being synthesized. **Results** The 62.5 μg can not induce the successful arthritis models and the group of 62.5 μg was removed. The 125 μg, 250 μg and 500 μg groups were all 100%, and there were no significant difference of degree of joint swelling, arthritis score, etc ($P>0.05$); and the arthritis size and joint swelling degree of rats in 125 μg group were lower than that in 250 μg and 500 μg groups. **Conclusion** The Mtb induced AIA rat models establishment has a high success rates, and the best inflammatory dosage is probably 1.25 mg/mL, 0.1 mL per rat.

[Keywords] SD rats; adjuvant arthritis; *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra; inflammatory dosage

类风湿性关节炎是一种病因未明的自身免疫性疾病,其发病主要累及小关节及其周围滑膜组织,病情缠绵,迁延难愈,最终可导致终生残疾^[1],是当今医

学界公认的难题,也是医学研究人员的研究热点。在类风湿性关节炎的基础研究领域,利用灭活的结核杆菌配制的完全弗氏佐剂所诱导的佐剂性关节炎大

[收稿日期]2015-11-14

[基金项目]国家自然科学基金青年基金(81303048);湖南省科技厅科技计划一般项目(2014SK3046);湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(15B176);湖南省教育厅科学研究项目(14C0854)。

[作者简介]祁芳,女,在读硕士研究生,研究方向:常见疾病的针灸康复机制。

[通讯作者]*艾坤,男,医学硕士,讲师,E-mail:aikun650@qq.com。

鼠作为经典的实验动物模型广泛用于类风湿性关节炎的病因探索、新药开发、新的治疗方法的筛选等方面。然而在国内文献报道中,造模时所用结核杆菌剂量参差不齐^[2-4],到目前为止,国内有关于采用灭活结核杆菌诱导 SD 大鼠的最佳致炎剂量的研究尚未有文献报道。在经过系列实验研究后,我们通过对实验数据的整理和分析,探讨得出最佳致炎剂量,为动物实验研究的模型复制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组方法

SD 大鼠 50 只, 雄性, SPF 级, 体质量 (120±10) g, 由湖南中医药大学实验动物研究中心提供, 动物合格证号: SYXK(湘)2013-0005。饲养温度 20~25 °C, 湿度 50%~70%, 大鼠适应性饲养 1 周后, 按照体质量分层原则随机分为正常组、62.5 μg 组、125 μg 组、250 μg 组、500 μg 组, 每组 10 只。

1.2 主要试剂

灭活结核杆菌购自美国 Difco 实验室; 矿物油购自美国 Sigma 公司产品; 异氟烷吸入麻醉剂购自瑞沃德生命科技有限公司。

1.3 主要仪器

小动物纹身仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 赛极威 CDS9000 小动物呼吸麻醉机(上海库丰实业有限公司); 意大利 UGO 足肿测量仪(UGO Basile); 瑞士 Hamilton 微量注射器 (250 μL)、Terumo 27G 针头(北京博朗宁科技有限公司)。

1.4 佐剂配制

高温灭菌后的干燥研钵准确称取 Mtb 10 mg; 用移液枪精密吸取矿物油 2 mL 加入研钵中充分研磨, 直至矿物油清亮无明显悬浮杂质; 将研磨好的 MT 悬浮液移入 EP 管中, 经震荡仪混合均匀后, 稀释、分装, 分别配备成 0.625、1.25、2.5、5.0 mg/mL 的溶液。以上操作均在通风橱中进行。

1.5 模型制备

小动物呼吸麻醉机将大鼠浅麻醉, 酒精棉擦拭大鼠尾根部, 精密吸取 MT 悬浮液 0.1 mL 在大鼠尾根部皮下注射, 退出针后用棉签压进针口片刻。待大鼠清醒后放回笼内。

1.6 模型制备成功的标志

相较于正常组大鼠而言, 在造模后第 3 天, 大鼠皮温明显升高, 尾根部皮肤开始溃烂, 9~12 d 大鼠

皮毛松散, 精神萎靡, 体质量下降, 耳廓、足趾关节、踝关节不同程度的发红、肿胀, 活动受限, 提示造模成功。

1.7 大鼠体质量、足爪容积的测量与关节炎评分方法

造模后每 3 天称量 1 次体质量, 在大鼠出现关节红肿的第 9 天开始(包括第 9 天)每 3 天测量 1 次足爪容积、进行关节炎的评分。评分细则参照 5 级评分法评价^[5]。

1.8 统计学分析

所有数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理。多组数据比较采用多元方差分析(MANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在所有造模大鼠中, 62.5 μg 组仅 4 只后足爪有轻微红肿, 余 6 只在整个实验周期中均未出现任何体质量下降和关节红肿征象, 其生长发育也与正常组大鼠无异, 可能原因是结核杆菌剂量较少以及大鼠之间存在个体差异, 不能充分诱导出关节炎, 显然 62.5 μg 非最佳剂量, 因此剔除该组, 在以下的组间比较中不再予以讨论。此外 125 μg 组、250 μg 组、500 μg 组每组 10 只大鼠造模成功率均为 100%。

2.1 大鼠一般情况

模型复制前, 各模型组大鼠与正常组相比无差异。模型复制后第 3 天, 致炎大鼠与正常组相比, 体温有明显升高, 第 9 天开始致炎大鼠先后出现明显的少食, 皮毛松散, 精神萎靡, 炎症高峰期出现在造模后的第 19~22 天, 此时造模成功的大鼠活动严重受限, 尾部严重溃烂、流脓, 皮下结节多而明显。

2.2 各组大鼠体质量、足爪容积以及关节炎指数评分

相较于正常组, 造模后大鼠出现明显的体质量下降, 足爪肿胀, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 并在第 21 天达到高峰期。见表 1。

表 1 造模第 21 天各组大鼠体质量、足爪、关节炎评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	平均足趾肿胀(mL)	关节炎评分
正常组	10	277.72±21.48	1.03±0.65	0.00±0.00
125 μg	10	231.50±27.18 ^{▲▲}	2.00±0.85 ^{▲▲}	9.00±2.40 ^{▲▲}
250 μg	10	225.08±9.570 ^{▲▲}	2.20±0.35 ^{▲▲}	9.40±1.26 ^{▲▲}
500 μg	10	222.56±18.31 ^{▲▲}	2.56±0.60 ^{▲▲}	10.60±2.55 [▲]
F		7.035	1.920	11.675
P		0.001	0.144	0.000

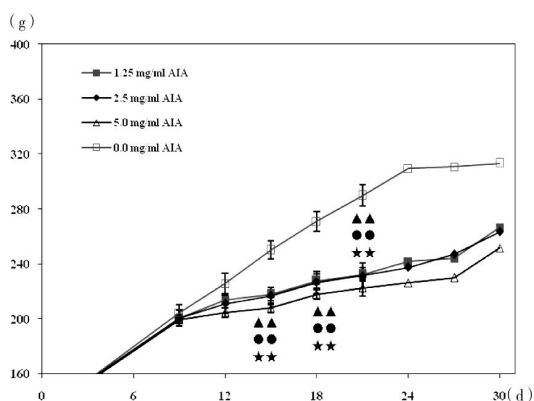
注: 与正常组比较 ▲▲ $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠体质量、足爪容积以及关节炎指数评分变化趋势

造模后第 15 天,致炎大鼠与正常组比较,体质量下降有明显差异($P<0.01$)。第 24 天后致炎大鼠体质量恢复增长。见图 1。

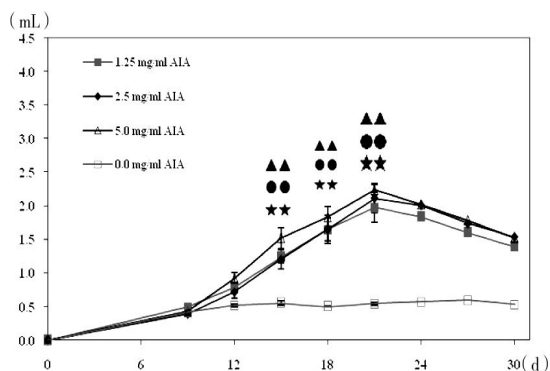
与正常组比较,3 组致炎的大鼠在造模后的第 15 天开始足爪容积有显著性差异($P<0.01$),500 μg 组最先出现关节的红肿迹象,并且肿胀迅速,而 125 μg 和 250 μg 组发病迹象相对稍迟(第 10 天),最终在水肿高峰期 3 组大鼠肿胀程度与剂量呈正相关,但组间差异不明显($P>0.05$)。见图 2。

造模后第 9 天,500 μg 组大鼠最早出现小关节的红肿,125 μg 组和 250 μg 组大鼠在第 10 天和第 11 天相继出现小关节红肿,造模后的第 21 天,3 组致炎大鼠的关节炎评分相较于正常组有显著性差异($P<0.01$),而 125 μg 组大鼠关节受累范围和关节肿胀程度均轻于 250 μg 组和 500 μg 组,且该 3 组组大鼠关节炎累计评分与剂量呈正相关,但组间差异不明显($P>0.05$)。见图 3。



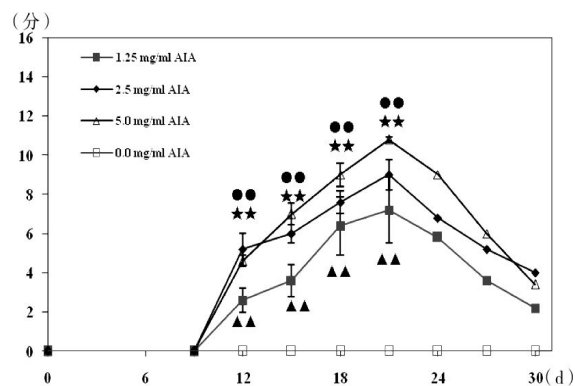
注: 125 μg 组与正常组比较, ▲▲ $P<0.01$; 250 μg 组与正常组比较, ●● $P<0.01$; 500 μg 组与正常组比较, ★★ $P<0.01$ 。

图 1 体质量变化趋势图



注: 125 μg 组与正常组比较, ▲▲ $P<0.01$; 250 μg 组与正常组比较, ●● $P<0.01$; 500 μg 组与正常组比较, ★★ $P<0.01$ 。

图 2 足爪肿胀趋势图

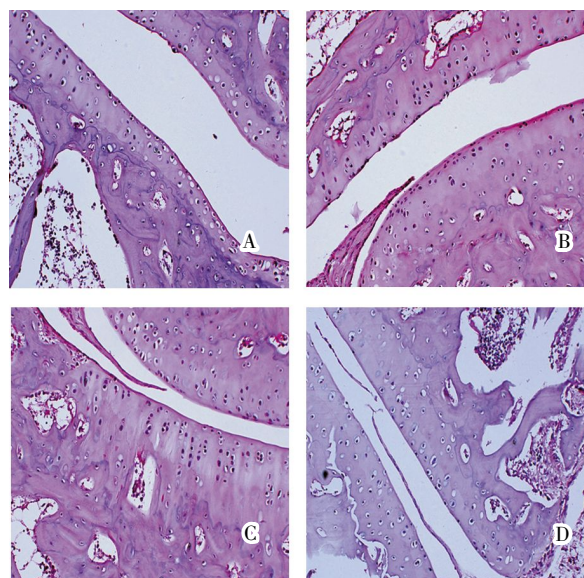


注: 125 μg 组与正常组比较, ▲▲ $P<0.01$; 250 μg 组与正常组比较, ●● $P<0.01$; 500 μg 组与正常组比较, ★★ $P<0.01$ 。

图 3 关节炎评分变化趋势图

2.4 大鼠踝关节切片结果

实验结束后,取除 62.5 μg 组外的所有大鼠踝关节进行 HE 染色、包埋、切片。正常组、125 μg 组、250 μg 组、500 μg 组切片结果分别如图 4(A-D)。与正常组(图 4A)比较,余 3 组不同剂量的致炎大鼠关节切片显示了剂量依赖性的不同程度的骨关节损害。125 μg 组、250 μg 组切片可见较明显的骨膜细胞水肿、关节间隙变窄以及关节滑膜的增生(图 4B、4C);而 500 μg 组切片可见严重的关节间隙狭窄、关节滑膜的增生和骨的破坏(图 4D)。



A 正常组;B 125 μg 组;C 250 μg 组;D 500 μg 组

图 4 各组大鼠踝关节病理切片图(HE $\times 40$)

3 讨论

佐剂性关节炎动物模型是细菌学家 Freund 于 20 世纪 50 年代创立,又称弗氏佐剂关节炎,是研究免疫性动物模型的基本方法,不同的佐剂剂量影

响造模的成功率、实验的进程及实验结果的可靠性^[5-6]。本实验分别从造模成功率、局部病变、关节肿胀程度、病理切片等方面探讨了 RA 模型复制中不同佐剂剂量对模型复制的影响,得出以下结果。

造模后第 15 天,各模型组大鼠与正常组比较,体重下降有明显差异($P<0.01$),这可能是由于一方面大鼠因食欲减退而进食减少,另一方面致炎的大鼠体温升高,基础代谢增高,从而体重明显下降,符合临床上类风湿关节炎患者急性发病期的病情特点;第 24 天开始,致炎的大鼠均恢复体重的增长,此时大鼠体温恢复正常,足爪肿胀程度均有相应减轻,表明炎症高峰期后,致炎的大鼠有自愈倾向。

500 μg 组大鼠与 125 μg 组、250 μg 组比较,关节肿胀程度与关节炎指数虽无明显差异($P>0.05$),但病理切片仍显示出了明显较为严重的关节破坏,这说明关节的肿胀程度,外观炎症症状并不能直接体现关节与骨组织的真实受累程度。

综上所述,125、250 和 500 μg 组,3 组 SD 大鼠模型复制成功率高而且均匀,125、250 μg 组关节炎症状、关节破坏严重程度相近,较为符合临床类风湿性关节炎症状;而 500 μg 组关节切片显示了十分严重的关节炎症状与骨关节的破坏,并非理想的动物模型。因此浓度为 1.25 mg/mL 的 MT 佐剂悬浮液,0.1 mL/只可能是最理想的佐剂性关

节炎大鼠模型复制剂量;鉴于佐剂性关节炎大鼠在炎症高峰期后病情往往有自愈倾向,建议在动物实验基础研究中,预防性的治疗周期应在造模后的 21~24 d 之内,如此所获得的实验结果可信度更高。

参考文献:

- [1] Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Budd RC, Harris ED Jr, McInnes IB, Ruddy S, Harris JED, Sargent JS, editors. Kelley's Textbook of Rheumatology. Vol. 2. Saunders Elsevier; Philadelphia: 2009;1 035-1 086.
- [2] Cai X, Zhou H, Wong Y F, et al. Suppressive effects of QFGJS, a preparation from an anti-arthritic herbal formula, on rat experimental adjuvant-induced arthritis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 337: 586-594.
- [3] 佟丽,辛增辉,陈育尧,等. Mtb 诱导的 SD 大鼠佐剂性关节炎模型的建立及评价[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 259-263.
- [4] 尹明,向黎黎,熊辉,等. 痛风性关节炎湿热蕴结证大鼠模型建立的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(2): 6-10.
- [5] Jacobson PB, Borgan SJ, Wilcox DM, et al. A new spin on an old model: In vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat [J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(10): 2 060-2 073.
- [6] 林红,贺永怀,黎燕,等. II 型胶原蛋白与弗氏完全佐剂大鼠关节炎模型的建立和比较[J]. 中国实验动物学报, 1999, 7(1): 1-6.

(本文编辑 匡静之)

《实用中医内科杂志》(ISSN 1671-7813, CN 21-1187/R)

中华中医药学会系列杂志《实用中医内科杂志》已实现数字优先出版,网络版先于纸质版,论文**出版速度更快**,出版时滞更短。中医内科乃整体观理念之**全科(通科)**。

“投稿指南-作者自检指南”更具有**通用性与指向性**。

所有通联信息均以中国知网 <http://syzy.cbpt.cnki.net>、辽宁省中医药学会《实用中医内科杂志》官网 <http://www.lnatcm.org> 为准。

所收费用均在录用通知上明确。未委托授权任何代理机构或个人。

友情提示

1. 正确标注参考文献是规避学术不端的有效措施。
2. 关键在于选择适合自己需求的杂志投稿。

