

网络出版时间: 2021-7-28 11:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1016.028.html>

◇技术与方法◇

胶原抗体联合 LPS 建立 C57BL/6 小鼠关节炎模型

韩大飞, 方亦龙, 檀学文, 蒋海峰, 许振, 涂佳杰, 魏伟

摘要 胶原抗体诱导性关节炎(CAIA)是一种新颖的关节炎小鼠模型,与胶原诱导性关节炎(CIA)模型相比,CAIA不需要7周以上才出现关节炎表型,对于CIA模型不敏感的品系也有较好的诱导效果。然而,使用的高剂量诱导剂,一方面给小鼠带来严重的不良反应,甚至出现死亡现象,另一方面也导致5-克隆胶原抗体混合物的不必要浪费。降低5-克隆胶原抗体混合物和脂多糖(LPS)的使用剂量,在避免模型小鼠死亡,节约5-克隆胶原抗体混合物的同时,成功高效诱发C57BL/6小鼠关节炎模型,为类风湿关节炎(RA)发病机制的研究提供了有效方法。

关键词 类风湿关节炎;胶原抗体诱导性关节炎;5-克隆胶原抗体混合物;脂多糖;C57BL/6小鼠;关节炎动物模型

中图分类号 R 593.22; R 965.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1324-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.031

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性关节炎,其发病机制仍不清楚,导致现有治疗方法有诸多缺陷^[1]。临床前研究的动物模型对于深入阐明RA的发病机制,并寻求潜在的治疗靶点显得尤为重要。CAIA模型具有发病速度快,严重程度高,发病率高,疾病均一性较好,可高效诱导包括C57BL/6为背景的基因工程小鼠等多品系的优势。诱导C57BL/6小鼠需要使用高剂量的5-克隆胶原抗体混合物(50 mg/只)并使用高剂量脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)加强(50 μg/只)。然而前期预实验显示,使用高剂量的诱导剂,一方面给小鼠带来严重的不良反应,甚至出现死亡现象,不但导致异常的病理生理学改变,影响了关节炎模型发

生与发展,而且影响了对候选药物治疗作用的准确判断。该实验降低了5-克隆胶原抗体混合物和LPS的剂量,在避免小鼠死亡,减轻不良反应的同时节约了试剂,而且能高效地诱导CAIA模型,这为RA发病机制的研究提供了合理的小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 所有实验均按照安徽医科大学动物实验伦理委员会批准的方案进行的。16只8周龄(22~24 g)雄性C57BL/6小鼠购于安徽医科大学实验动物中心,饲养在12 h的光/暗循环,恒温环境下的标准笼(4~5只/笼)中,并按照饲养要求提供食物及水的SPF环境。

1.2 试剂与仪器 小鼠单克隆2型胶原5-克隆胶原抗体混合物试剂盒(货号:53100)购自美国Chondrex公司;多聚甲醛固定液(中性)(货号:G1101)和新型脱钙液(快脱)(货号:G1107)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;苏木精(货号:C0107)和伊红染色液(货号:C0109)购自上海碧云天生物技术有限公司;中性树胶(货号:G8590)购自上海索桥生物科技有限公司;奥林巴斯BX53生物显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建立C57BL/6小鼠CAIA模型 C57BL/6小鼠分为模型组和对照组(每组8只),在第0天CAIA组腹腔注射4 mg的5-克隆胶原抗体混合物,第3天腹腔注射40 μg LPS,对照组腹腔给予同等量的生理盐水,注射后每天观察记录关节肿胀数和关节炎指数等指标。

1.3.2 CAIA关节炎模型评分 LPS注射后,每天观察小鼠足掌肿胀情况,待出现可见的肿胀后,由两名对实验设计不知情的独立观察者每天对CAIA关节严重程度评分。评分指标分为关节肿胀数和关节炎指数。每只小鼠的每个足爪有5个指关节和一个踝关节或腕关节,因此每只足爪的最大关节肿胀数是6,每只小鼠的最大关节肿胀数是24^[2]。关节炎指数是对足爪肿胀程度进行评分,共分为0~4分不

2020-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81973332)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥230032

作者简介:韩大飞,男,硕士研究生;

涂佳杰,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

同的程度。0分,未出现局部红肿现象;1分,出现指关节肿胀现象;2分,出现轻微的踝关节或者腕关节肿胀现象;3分,整个足爪出现严重肿胀现象;4分,足爪出现僵硬或变形现象^[3]。

1.3.3 HE染色 在CAIA造模后第16天,用过量麻醉剂处死小鼠,迅速剥离小鼠膝关节。膝关节经过固定和脱钙后,常规梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片(5 μm)。HE染色:切片经梯度乙醇脱蜡水化后,分别染苏木精和伊红染色,经梯度酒精脱水,用中性树胶封片,光学显微镜下观察组织病理变化。

1.4 统计学处理 本实验中所有的数据通过 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用GraphPad Prism 8.2.1软件进行作图。

2 结果

2.1 5-克隆胶原抗体混合物联合LPS诱导C57BL/6小鼠严重的足爪肿胀 本实验适当降低了诱导C57BL/6小鼠CAIA模型的5-克隆胶原抗体混合物和LPS使用剂量。如图1A所示,建立CAIA模型。在第0天,每只CAIA模型组小鼠腹腔给予4 mg 5-克隆胶原抗体混合物。在第3天,每只CAIA模型组小鼠腹腔给予40 μg LPS。降低LPS的使用剂量后,小鼠的胃肠道反应明显降低,小鼠腹泻现象有所缓解,没有出现小鼠死亡现象。另外,如图1B、C所示,降低5-克隆胶原抗体混合物和LPS的使用剂量后,第3天小鼠足爪开始关节肿胀现象,前后足爪依次出现红肿现象并逐渐加重,同时关节肿胀数和关节炎指数随病情发展不断增加,10~12 d肿胀达到高峰,第13天后足爪肿胀逐渐消退。在本优化

的CAIA模型中,与对照组相比,CAIA小鼠前后足爪可见明显的红肿现象(图1D)。结果表明,降低5-克隆胶原抗体混合物和LPS使用剂量,在节省了抗体使用量和降低不良反应外的同时,可以成功诱导C57BL/6小鼠严重的足爪肿胀。

2.2 5-克隆胶原抗体混合物联合LPS诱导C57BL/6小鼠严重的关节病理改变 为验证本实验诱导的C57BL/6小鼠膝关节病理变化严重程度,在CAIA模型的第16天,使用过量麻醉剂处死小鼠,迅速剥离膝关节。组织经常规的固定,脱钙、脱水、切片,HE染色后于显微镜下观察,采集图片。如图2所示,与对照组相比,CAIA模型组小鼠关节内滑膜异常增生,血管翳形成,大量的炎性细胞的浸润,骨和软骨的破坏,并伴随着关节间隙狭窄等病理特征。结果表明,降低5-克隆胶原抗体和LPS的使用剂量,同样可成功诱导C57BL/6小鼠严重的膝关节病理改变。

3 讨论

RA是一种长期慢性的自身免疫性疾病,其主要特点是长期的滑膜炎,滑膜异常增生,自身抗体产生,骨和软骨破坏^[4]。目前关于RA的具体发病机制仍然不清楚。CIA模型是由皮内注射由完全弗氏佐剂乳化的2型胶原引起的,该模型被广泛用于评估治疗RA候选药物最常见的模型,因为该模型具有与人类RA相似的免疫学和病理学特点,如滑膜异常增生,外周免疫细胞的浸润,骨和软骨的破坏

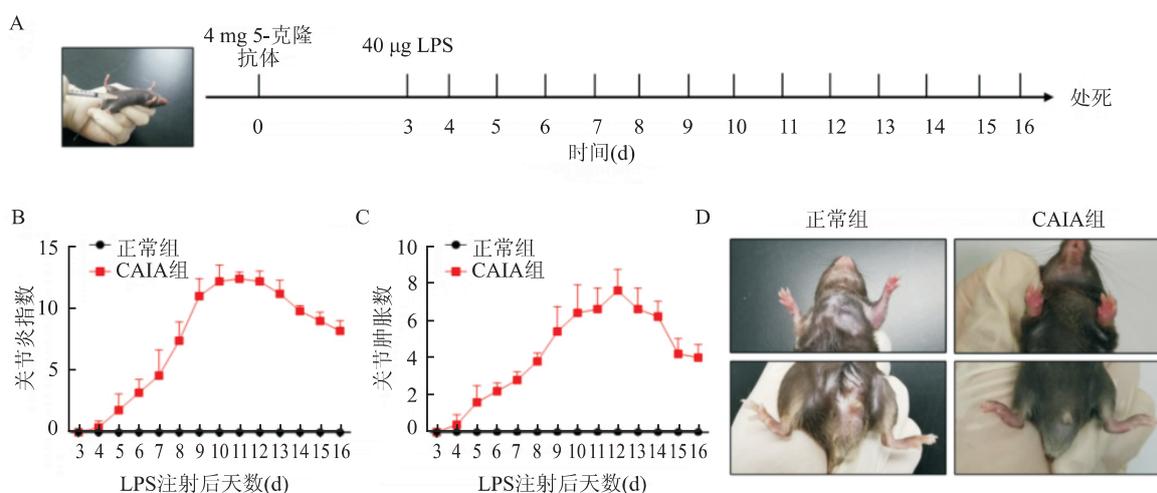


图1 5-克隆胶原抗体联合LPS成功建立C57BL/6小鼠关节炎模型

A: CAIA模型建立的示意图; B: 关节肿胀数; C: 关节炎指数; D: 5-克隆胶原抗体注射11 d CAIA小鼠足爪肿胀照片

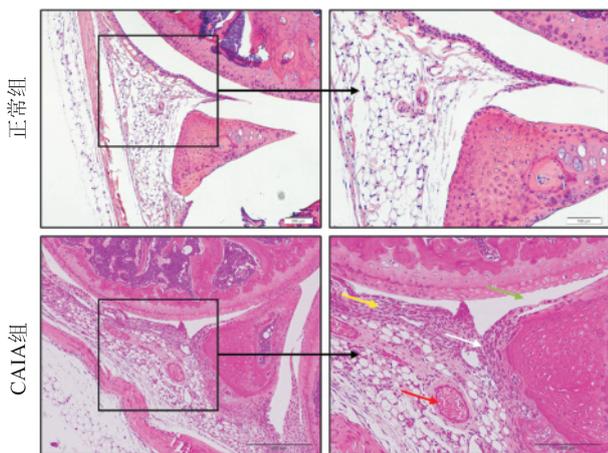


图2 5-克隆胶原抗体混合物联合 LPS 诱导 C57BL/6 小鼠严重的关节病理改变 HE × 100、200

白色: 炎性细胞浸润; 黄色: 滑膜增生; 红色: 血管翳形成; 绿色: 关节间隙变窄

等^[5-6]。然而,该模型在研究 RA 发病机制中却存在一些局限性: ① C57BL/6 或者 C57BL/6 为背景的基因修饰小鼠对 CIA 模型敏感性较低,这限制了 CIA 模型在转基因或者基因敲除小鼠中的使用; ② 发病过程的非同步性, CIA 动物以不同的比率表现出疾病表现,这使得治疗计划复杂化; ③ 诱导 CIA 模型耗时较长。初次致敏后 3~4 周不会出现关节炎的表现,需要在第 21 天后二次加强致敏。一般在初次诱导后 35~42 d 或者更久达到炎症的高峰期,之后炎症才会慢慢消退; ④ 制作完全弗氏佐剂乳化的 2 型胶原过程较长且质量不稳定,直接影响 CIA 的发病率和严重程度。而 CAIA 模型是一种快速的 CIA 的替代模型,该关节炎模型使用针对 2 型胶原中保守的自身抗原表位的一组单克隆抗体,联合 LPS 刺激,可诱导所有小鼠品系严重的关节炎模型。与 CIA 模型相比, CAIA 模型的优势在于,发病速度快,发病率高,疾病一致性强,不受弗氏佐剂对宿主免疫系统的影响。另外, CAIA 模型最突出的优势是几乎可以诱导所有的小鼠品系,包括 CIA 抵抗,缺乏 T 细胞,基因敲除和转基因的小鼠。因此,该模型是研究个体基因产物、细胞因子,以及抗炎免疫药物筛选和评价的理想模型^[7]。然而,根据文献报道,使用该模型诱导 CIA 低反应的小鼠时,往往使用高剂量的诱导剂。课题组前期预实验结果显示,使用高剂量的 5-克隆胶原抗体混合物和 LPS 会引起小鼠严重的不良反应,甚至出现死亡现象。这不仅引起小鼠病理生理学的改变,从而影响了关节炎模型发生发展的过程,更影响了对候选药物治疗作

用的准确判断。本实验降低了 5-克隆胶原抗体混合物和 LPS 的剂量,在避免小鼠死亡,减轻不良反应的同时节约了试剂,而且能高效地诱导 CAIA 模型,这为 RA 发病机制的研究提供了合理的小鼠模型。

本实验中使用的 5-克隆胶原抗体混合物包括 A2-40 (IgG2a), F10-21 (IgG2a), D8-6 (IgG2a), D1-2G (IgG2b) 和 D2-412 (IgG2b), 这些单克隆抗体可以识别不同种类 2 型胶原保守的抗原表位。其中的 3 个单克隆抗体 (A2-40, D1-2G 和 D2-412) 识别聚集于 2 型胶原 CB11 片段内被称为 LyC1 (124-290) 的 167 个氨基酸肽段内的单个抗原表位。另外 2 个单克隆抗体 (F10-21 和 D8-6) 可以识别 2 型胶原 CB11 片段内被称为 LyC2 (291-374) 的 83 个氨基酸肽段内的抗原表位。与之前的 4 克隆抗体混合物相比,新的 5-克隆胶原抗体多出一个结合 LyC1 片段的 D2-412 单克隆抗体,该单克隆抗体能显著提高关节炎在不同品系小鼠的发病率和严重程度^[8]。关节炎基因的单克隆抗体混合物可诱导与 CIA 类似的关节炎模型,但是需要联合使用细菌内毒素,如 LPS 等。2 型胶原的自身抗体联合 LPS 可协同诱导小鼠严重的关节炎,被广泛用于包括评价治疗作用等各种目的研究中。改良的 5-克隆胶原抗体联合 LPS 诱导的关节炎模型,为 CAIA 低应答的和对 CAIA 易感性未知的基因敲除和转基因小鼠诱发关节炎提供了一种新的有用工具。

以往文献^[9]报道,使用 5-克隆胶原抗体混合物诱导 CIA 低反应的小鼠,如 C57BL/6 或者 C57BL/6 为背景的基因修饰小鼠,使用的 5-克隆抗体混合物为每只 5 mg, LPS 的剂量为每只 50 μg。另外,由于小鼠供应商和饲养环境的区别会引起小鼠对各种试剂的反应性不同^[10]。尽管给予 LPS 可以与单克隆抗体协同诱导严重的关节炎^[11],但前期实验结果表明,给予最大剂量的 LPS (每只 50 μg) 会导致小鼠出现严重的不良反应,甚至出现死亡现象,具体表现为:出现严重腹泻现象,排泄物堆积并在小鼠肛门处结块,使小鼠不能正常排便,最终导致小鼠死亡。另外, 5-克隆胶原抗体混合物价格昂贵,一定程度上限制了其在探究 RA 发病机制中的研究。结合前期预实验的结果和 5-克隆胶原抗体混合物成本两个问题,本实验适当降低了 5-克隆胶原抗体混合物和 LPS 的使用剂量 (5-克隆胶原抗体混合物: 每只 4 mg, LPS: 每只 40 μg), 并成功诱导低反应的 C57BL/6 小鼠 CAIA 模型。

综上所述,CAIA模型是一种快速的严重程度高的CIA模型的替代模型,该模型弥补了CIA模型诱导时间长,无法有效诱导CIA抵抗的品系,如C57BL/6或C57BL/6为背景的转基因或基因敲除小鼠品系的缺点。本实验在以往报道的基础上,降低了抗体混合物和LPS的使用剂量,在避免模型小鼠死亡,减轻不良反应的同时节约5-克隆胶原抗体混合物,并成功诱导CIA低反应的C57BL/6小鼠CAIA模型,为以后利用C57BL/6为遗传背景的小鼠研究单个基因或者细胞因子在RA发病机制中的作用提供了方法。

参考文献

- [1] 胡晓曦,张爱君,张静,等. 类风湿关节炎中IgD通过T细胞刺激B细胞活化[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 572-8.
- [2] Chen J, Wang Y, Wu H, et al. A modified compound from paeoniflorin, CP-25, suppressed immune responses and synovium inflammation in collagen-induced arthritis mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 563.
- [3] Chang Y, Wu Y, Wang D, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(5): 862-70.
- [4] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-19.
- [5] Miyoshi M, Liu S. Collagen-induced arthritis models [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1868: 3-7.
- [6] 张玲玲,刘云洁,童彤,等. DBA/1小鼠胶原性关节炎模型建立方法及评价指标[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(8): 1108-11.
- [7] Khachigian L M. Collagen antibody-induced arthritis [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2512-6.
- [8] Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, et al. Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies [J]. *J Immunol Methods*, 2009, 343(1): 49-55.
- [9] Bas D B, Su J, Sandor K, et al. Collagen antibody-induced arthritis evokes persistent pain with spinal glial involvement and transient prostaglandin dependency [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(12): 3886-96.
- [10] Ivanov I I, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria [J]. *Cell*, 2009, 139(3): 485-98.
- [11] Terato K, Harper D S, Griffiths M M, et al. Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of *E. coli* lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen [J]. *Autoimmunity*, 1995, 22(3): 137-47.

Exploration of 5-clonal antibody combined with LPS to induce C57BL/6 mice arthritis model

Han Dafei, Fang Yilong, Tan Xuewen, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine Hefei 230032*)

Abstract Collagen antibody-induced arthritis (CAIA) is a novel mouse model of arthritis. Compared with collagen-induced arthritis (CIA) model, CAIA does not require more than 7 weeks to develop arthritis phenotype, and has a better induction effect for CIA model insensitive strains. However, the high dose inducers reported in previous literatures, on the one hand, caused serious adverse reactions and even death in mice, and on the other hand, resulted in unnecessary waste of 5-clone collagen antibodies cocktail. Reducing the dosage of 5-clone antibody cocktail and lipopolysaccharide (LPS) effectively induced the arthritis model of C57BL/6 mice while avoiding the death of the model mice and saving the cocktail of 5-clone antibody, thus providing an improved method for the future research on the pathogenesis of RA.

Key words rheumatoid arthritis; collagen antibody-induced arthritis; 5-clone collagen antibodies cocktail; lipopolysaccharide; C57BL/6 mice; arthritis animal model