

网络出版时间:2025-11-13 11:48:43 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.1520.026>

自身抗原诱导的慢性间质肺损伤小鼠模型的建立

吴余玲¹,徐清²,王迪³,胡姗姗^{1,4}

[¹安徽医科大学药学科学学院临床药理研究所,合肥 230032;

²合肥综合性国家科学中心大健康研究院,合肥 230601;

中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)³麻醉科、⁴检验科,合肥 230036]

摘要 目的 建立小鼠自身抗原诱导的肺损伤模型并探索其病理机制为研究类风湿关节炎相关间质性肺病(RA-ILD)的病理机制提供可靠动物模型。方法 造模小鼠皮内注射由完全弗氏佐剂和肺组织蛋白制成的抗原乳剂,使用不完全弗氏佐剂制备的乳剂加强免疫。HE染色检测小鼠组织病理变化;Masson染色检测肺纤维化改变;qPCR检测肺组织中类风湿因子(RF)、涎液化糖链抗原-6(KL-6)及肺泡表面活性蛋白(SP-D)的mRNA水平;ELISA法检测ACPA、IgG1、IgG2a和IgG3抗体水平;免疫荧光染色检测肺组织中炎性细胞以及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的变化;Western blot检测Collagen I和 α -SMA蛋白表达水平;流式细胞术检测免疫细胞的变化。结果 使用小鼠自身肺组织抗原建立模型后,HE染色结果显示肺组织中炎性细胞浸润增多,组织结构改变明显;Masson染色显示模型小鼠肺组织中胶原沉积增多;qPCR检测显示模型小鼠RF、KL-6和SP-D mRNA水平升高;ELISA检测显示ACPA、IgG1和IgG3抗体水平升高;免疫荧光结果显示模型组单核细胞和T细胞增多且 α -SMA表达增多;Western blot结果显示Collagen I和 α -SMA蛋白表达增加;流式结果显示肺组织中T细胞和单核细胞增多。结论 小鼠自身抗原诱导肺损伤模型建立成功,T细胞和单核细胞可能参与了疾病的发生和进展。

关键词 自身抗原;动物模型;肺损伤;肺纤维化;T细胞;单核细胞

中图分类号 R 593.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)12-2255-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.008

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节病变为主的慢性系统性自身免疫病。间质性肺疾病(interstitial lung disease, ILD)是RA最常见的肺部表现和死亡原因,严重影响RA患者的生活质量和生存率^[1]。RA-ILD发病机制尚不明确,虽然已有实验动物模型用于RA-ILD的研究,但这些模型在反映人类RA-ILD的病理机制中存在各种局限和不足。胶原诱导的小鼠关节炎模型中抗瓜氨酸肽抗体(anti-citrullinated peptide antibody, ACPA)升高,肺泡灌洗液炎性细胞增多,但未见细胞间质浸润,由于模型自限性,小鼠未出现肺纤维化^[2]。SKG小鼠模型使用了高浓度的酵母聚糖作为诱导剂,虽

然对关节症状无明显影响,却加剧肺部疾病恶化,成为其研究肺部疾病的混淆因素^[3]。自身抗原诱导小鼠疾病模型已经在小鼠自身免疫性肝病和小鼠干燥综合征模型中应用^[4-5],其不仅能准确反映相关疾病的临床特征,还能清晰揭示自身免疫性疾病的免疫学本质与发病机制。该研究拟通过建立肺组织自身抗原诱导慢性间质性肺损伤小鼠模型并探究其病理进程,为RA-ILD机制研究及药物研发提供稳定可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 30只雄性C57BL/6小鼠购于北京斯贝福生物技术有限公司[合格证号:SCXK(京)2024-0001],饲养于安徽医科大学药学科学学院临床药理研究所SPF级动物房。环境温度(22 ± 2)℃,湿度(50 ± 10)%,每周更换2次垫料,保证饲料和水充足。本课题获得安徽医科大学临床药理研究所动物研究伦理委员会批准(批准号:PZ-2020-021)。

1.1.2 试剂 博来霉素(bleomycin, BLM)(货号:B649732)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

2025-08-17 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:2308085MC78);2020年度抗炎免疫药物教育部重点实验室开放课题(编号:KFJJ-2020-09)

作者简介:吴余玲,女,硕士研究生;

王迪,男,研究员,硕士生导师,通信作者,E-mail:di.wang@ustc.edu.cn;

胡姗姗,女,讲师,硕士生导师,通信作者,E-mail:shanshanhu@ustc.edu.cn

完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)、不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA) (货号:7023、7002) 购于北京博雷德生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒、逆转录试剂盒、TRIzol、IMDM 培养基 (货号: 23225、4366597、15596026、C12440500BT) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; cDNA 扩增试剂盒 (货号: Q111-02) 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 小鼠 CD4 FITC、CD19 FITC 荧光抗体 (货号: 100509、101505) 购于美国 Biolegend 公司; 小鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (货号: AF1032) 购于美国 Affinity Biosciences 公司; DNase I、Alexa Fluor 594 荧光二抗 (货号: 10611ES76、35107ES60) 购于上海翌圣生物科技有限公司; 生物素 CD11b 抗体、Alexa Fluor 488 荧光二抗 (货号: 333804、A-11008) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; CD19 PE、CD11b APC、CD3 eFluor 450、CD45 FITC、CD3 APC、CD45PE/Cy7、CD4 APC/Cy7、CD8 AF700、CD44 BV421、CD62L BV785 流式抗体 (货号: 115507、101212、124223、103107、100235、103113、100413、100729、103039、104440) 购于美国 Biolegend 公司; 一抗试剂 GAPDH、 α -SMA 和 Collagen I (货号: 60004-1-Ig、67735-1-Ig、66761-1-Ig) 购于武汉三鹰生物技术有限公司; 胶原酶 IV (货号: C5138-1G) 购于美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂 PMSF、细胞裂解液 RIPA (货号: ST506、P0013B) 购于上海碧云天生物技术有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (货号: PG112) 购于上海雅酶生物医药科技有限公司; IgG1、IgG2a、IgG3、ACPA 的 ELISA 试剂盒 (货号: ml058077、ml058075、ml058325、ml490375) 购于上海酶联生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 十色流式细胞 (型号: CytoFLEX) 购于美国贝克曼库尔特有限公司; 组织原位细胞扫描分析系统 (型号: Pannoramic MIDI II) 购于山东斯瑞缔医疗科技有限公司; 激光共聚焦显微镜 (型号: Leica sp8) 购于德国 Leica 公司; 酶标仪 (型号: Infinite M1000 PRO) 购于瑞士 Tecan 公司; PCR 扩增仪 (型号: T100 thermal cycler) 购于美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: QuantStudio 3) 购于美国 Applied Biosystems 公司; 化学发光仪 (型号: Image Quant LAS 4000 Mini) 购于美国 GE 公司; 电泳仪 (型号: DYY-7C) 购于北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠自身抗原诱导肺损伤模型的建立 无菌条件下取出小鼠的肺组织称重。将肺组织与无菌 PBS 以 1:2 (mg: μ L) 比例于匀浆器中置冰上混合、研磨至组织匀浆, 转移至 1.5 mL EP 管中离心, 收集上清液并使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。定量后使用无菌 PBS 将蛋白浓度调整至适宜浓度, 加等体积的 CFA 或 IFA 制成乳剂。模型组小鼠在第 0 天和第 7 天尾根部皮内注射 100 μ L 由 CFA (5 mg/mL) 与肺组织蛋白上清液 (5 mg/mL) 配置而成的乳剂, 在第 14 天, 用相同浓度的肺组织蛋白上清液与 IFA 混合成乳剂进行加强注射。正常对照组小鼠第 0、7、14 天尾根部皮内注射 100 μ L PBS。BLM 阳性对照组小鼠第 0 天单次气管内注射 100 μ L BLM (1 mg/kg)。

1.2.2 自身抗原诱导小鼠肺损伤的评分 小鼠肺组织 HE 和 Masson 染色切片使用 3D 扫描仪扫描得到全视野病理切片。HE 染色肺损伤评分标准由 4 个部分组成: 炎性细胞浸润、肺泡结构融合、间质增厚和淋巴滤泡形成。其中炎性细胞浸润、肺泡结构融合和间质增厚这 3 个指标根据损伤区域百分比分级, 肺损伤被分为 1~5 级: 1 级为无病变或极轻度病变 (0%~10%); 2 级为轻度病变 (>10%~40%); 3 级为中度病变 (>40%~60%); 4 级为严重病变 (>60%~80%); 5 级为极重度病变 (>80%~100%)。淋巴滤泡指标根据其在肺组织中的总数进行评估 (1 级: 0 个; 2 级: 1~3 个; 3 级: 4~6 个; 4 级: 7~9 个; 5 级: >9 个)。Masson 染色结果使用 ImageJ 软件进行分析评分。

1.2.3 流式细胞术 将肺组织浸没于配制的消化液 (1 mL IMDM 培养基 + 10 μ L 胶原酶 IV + 10 μ L DNase I) 中, 剪刀剪碎立即放 37 °C、200 r/min 恒温箱中消化, 55 min 后加 100 μ L EDTA (0.5 mol/L) 终止消化。消化液及剩余组织块使用 100 目筛网研磨转移至 50 mL 离心管中, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min。弃上清液, 加 1 mL 红细胞裂解液裂红 5 min。加 HBSS 至 20 mL, 4 °C、2 300 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 FACS Buffer 重悬计数后取 2×10^6 个细胞加入 50 μ L 抗体混合物 (CD3、CD45、CD19、CD11b) 重悬细胞, 冰上避光孵育 30 min。加入 1 mL FACS Buffer 重悬, 4 °C、2 300 r/min 离心 5 min, 弃上清液。用 300 μ L FACS Buffer 重悬细胞等待上机检测。

1.2.4 qPCR 检测相关基因的表达 取肺组织按 1:2 (mg: μ L) 的比例加 TRIzol 试剂提取 RNA, 在

研磨仪中对组织进行研磨。冰上放置 30 min, 随后 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。使用移液枪转移上清液至新的 EP 管中, 上下颠倒混匀 10 次后, 室温静置 5 min。加 200 μL 氯仿, 剧烈摇晃混匀使上清液与氯仿充分混匀, 室温静置 10 min 后离心吸取上清无色水相, 再加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀, 冰上放置 10 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃去 EP 管中上清液。用移液枪吸取 500 μL 75% 乙醇(无核酶水配制)加入到 EP 管中, 上下颠倒洗涤 RNA 沉淀, 离心后弃上清液, 重复此过程 3 次。超净台风干沉淀, 每个 EP 管中加入 10 μL 的无核酶水, 涡旋震荡仪上混匀, 用微量检测器检测 RNA 浓度。使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 设计特异性基因引物并进行扩增和 qPCR 相对定量, 检测类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、涎液化糖链抗原-6(krebs von den lungen-6, KL-6)及肺泡表面活性蛋白(surfactant protein D, SP-D)和 GAPDH 的 mRNA 水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Primer name	Sequence(5'-3')
RF	F: GTTCTCACGGACTTGTGCC
	R: ACCGTGCTTCCTTGAGCAC
KL-6	F: TCTTTCCAACCCAGGACACC
	R: TCCTCATAGGGGCTACGCTT
SP-D	F: CAGACAGTGCTGCTCTG
	R: TCAGAACTCACAGATAACAAG
GAPDH	F: CGTCCCGTAGACAAATGGT
	R: GAATTGCCGTGACTGGAGT

1.2.5 免疫荧光法 取小鼠肺组织切片 60 ℃ 烘箱中放置过夜, 经二甲苯脱蜡水化后用 0.5% Triton X-100 室温孵育 30 min, 置于枸橼酸钠抗原修复液中煮沸 15 min, 5% BSA 室温孵育 1 h, 分别用一抗 α-SMA(1:500)、生物素 CD11b(1:400)、CD19 FITC(1:400)或 CD4 FITC(1:500)在 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗去未结合抗体, 用相应的荧光二抗在室温避光孵育 2 h, 防荧光淬灭封片剂封片, 避光晾干, 用激光共聚焦显微镜拍摄。

1.2.6 Western blot 法检测蛋白水平 取肺组织, 按照比例加入裂解液和 PMSF 并于冰上研磨 30 min, 离心后取上清液并用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。随后配制浓缩胶和分离胶进行电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜后孵育一抗 4 ℃ 过夜。次日 TBST 洗膜, 常温孵育对应二抗 2 h, 洗膜, 利用

化学发光成像仪成像, ImageJ 软件分析灰度值。

1.2.7 ELISA 法检测抗体水平 取小鼠血清检测 ACPA 以及肺组织匀浆上清检测 IgG1、IgG2a 和 IgG3 抗体水平。设置标准品孔、空白孔和待测样品孔, 标准品孔各加不同浓度标准品 50 μL, 样本孔加待测样本 50 μL, 空白孔加入 50 μL 样本稀释液。除空白孔外, 标准品孔和样本孔加辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL, 37 ℃ 恒温箱孵育 1 h。弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液静置 1 min, 甩去洗涤液并拍干, 重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μL, 37 ℃ 避光孵育 15 min。每孔加终止液 50 μL, 在 450 nm 波长处测定各孔吸光度值。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据间比较采用 *t* 检验, 多组数据的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自身抗原诱导肺损伤模型小鼠的肺部炎性病变 HE 染色结果表明, 与正常对照组小鼠比较, 模型组小鼠在给予 5 mg/mL 抗原诱导后, 小鼠的肺组织中出现了明显的病理学改变。根据病理评分, 模型组小鼠肺组织炎性细浸润($F = 13.68$, $P < 0.01$)、淋巴滤泡($F = 7.00$, $P < 0.05$)、肺泡融合($F = 9.54$, $P < 0.01$)及间质增厚($F = 10.50$, $P < 0.01$)与正常对照组小鼠比较有明显差异, 且与 BLM 阳性对照组小鼠肺组织损伤相似。见图 1。

2.2 自身抗原诱导肺损伤模型小鼠的其他脏器病变 HE 染色结果显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠的脾脏出现了明显改变, 脾脏红髓增生, 白髓减少, 边缘区界限模糊; 与正常对照组比较, 模型组小鼠的心脏、肝脏和肾脏未出现病变: 心脏组织的心肌呈粉红色, 胞质胞核及组织结构清晰, 心肌纤维细长清晰; 肝脏中肝小叶结构完整, 肝细胞形态结构围绕中央静脉呈放射状排列; 肾脏组织结构正常, 肾小管上皮细胞完好, 肾小球数量以及体积未见明显变化。见图 2。

2.3 自身抗原诱导肺损伤模型小鼠的肺纤维化倾向 Masson 染色结果显示, 与正常对照组小鼠相比, 模型组小鼠气管、血管周围以及增厚的肺间质中观察到明显的蓝色胶原沉淀($F = 19.45$, $P < 0.01$), BLM 阳性对照组小鼠气管及肺间质都能观察到明显的蓝色胶原沉淀。免疫荧光结果显示, 与正常对照组小鼠相比, 模型组小鼠的肺组织中可见

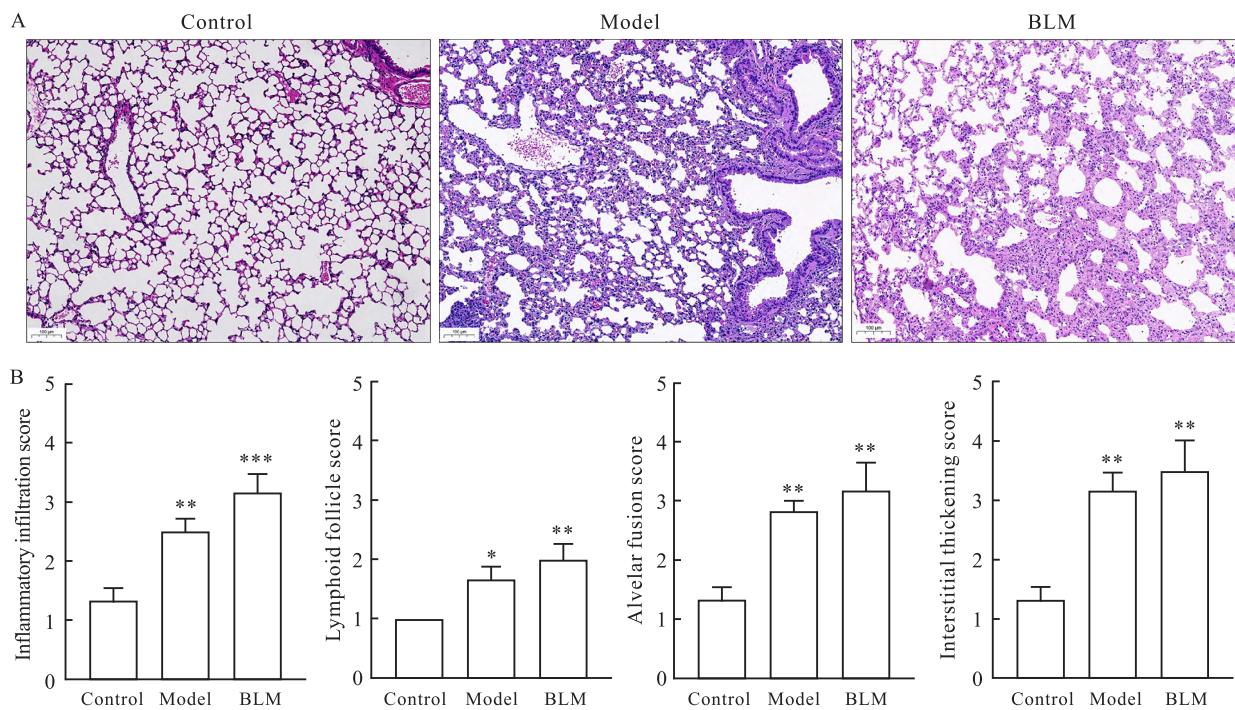


图1 各组小鼠肺损伤评分

Fig. 1 Lung injury scores of mice in each group

A: HE staining of lung tissue $\times 200$; B: Pathological index score; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

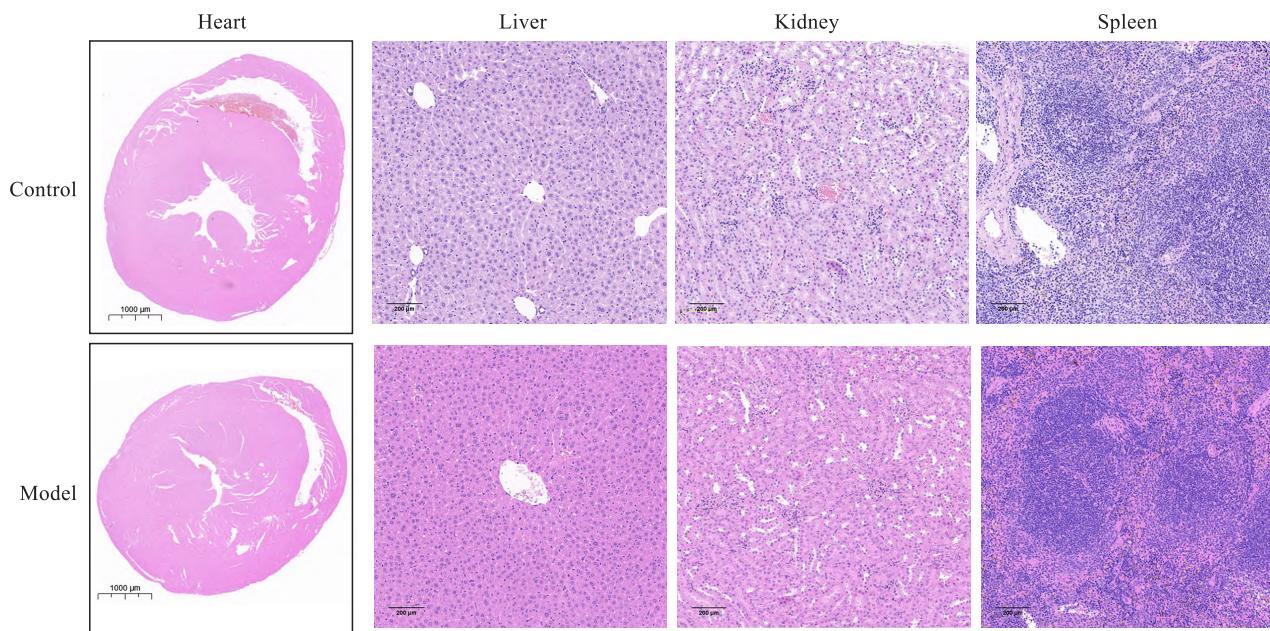


图2 正常对照组和模型组小鼠心、肝、肾、脾的组织病理变化

Fig. 2 Histopathological changes in the heart, liver, kidney, and spleen of mice in the control group and the model group

HE staining of spleen, kidney, liver ($\times 100$) and heart ($\times 20$).

明显气道以及支气管周围 α -SMA 表达增多 ($t = 9.649, P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与正常对照组比较, 模型组 Collagen I ($F = 29.06, P <$

0.05) 和 α -SMA ($F = 29.11, P < 0.05$) 蛋白表达增加, BLM 阳性对照组小鼠 Collagen I 和 α -SMA 表达显著增加。以上结果提示, 模型组小鼠肺损伤有纤

维化倾向。见图3。

2.4 自身抗原诱导肺损伤模型小鼠生物学指标的变化 qPCR 检测模型组小鼠肺组织中 RF、KL-6 与 SP-D 的 mRNA 水平发现,随着造模天数的增加,RF mRNA 水平逐渐升高 ($F = 28.98, P < 0.01$) ; KL-6 mRNA 水平逐渐升高 ($F = 54.65, P < 0.01$) ; SP-D mRNA 水平先升高后降低 ($F = 44.81, P < 0.05$) 。见图4。

2.5 小鼠肺组织中相关抗体水平的变化 与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织匀浆中 IgG1 ($t =$

3.008, $P < 0.05$) 和 IgG3 ($t = 2.664, P < 0.05$) 抗体水平升高,IgG2a ($t = 2.053, P > 0.05$) 变化无显著差异,模型组小鼠血清中 ACPA 抗体 ($t = 4.252, P < 0.01$) 水平升高。见图5。

2.6 肺组织中淋巴细胞和单核细胞变化 免疫荧光结果显示,与正常对照组小鼠比较,模型组小鼠浸润的炎性细胞主要位于肺间质中,且以单核细胞 ($t = 4.308, P < 0.01$) 和 T 细胞 ($t = 3.220, P < 0.01$) 为主。单核细胞在肺间质中浸润显著增多,细胞数量变化相对明显。流式结果显示,与正常对

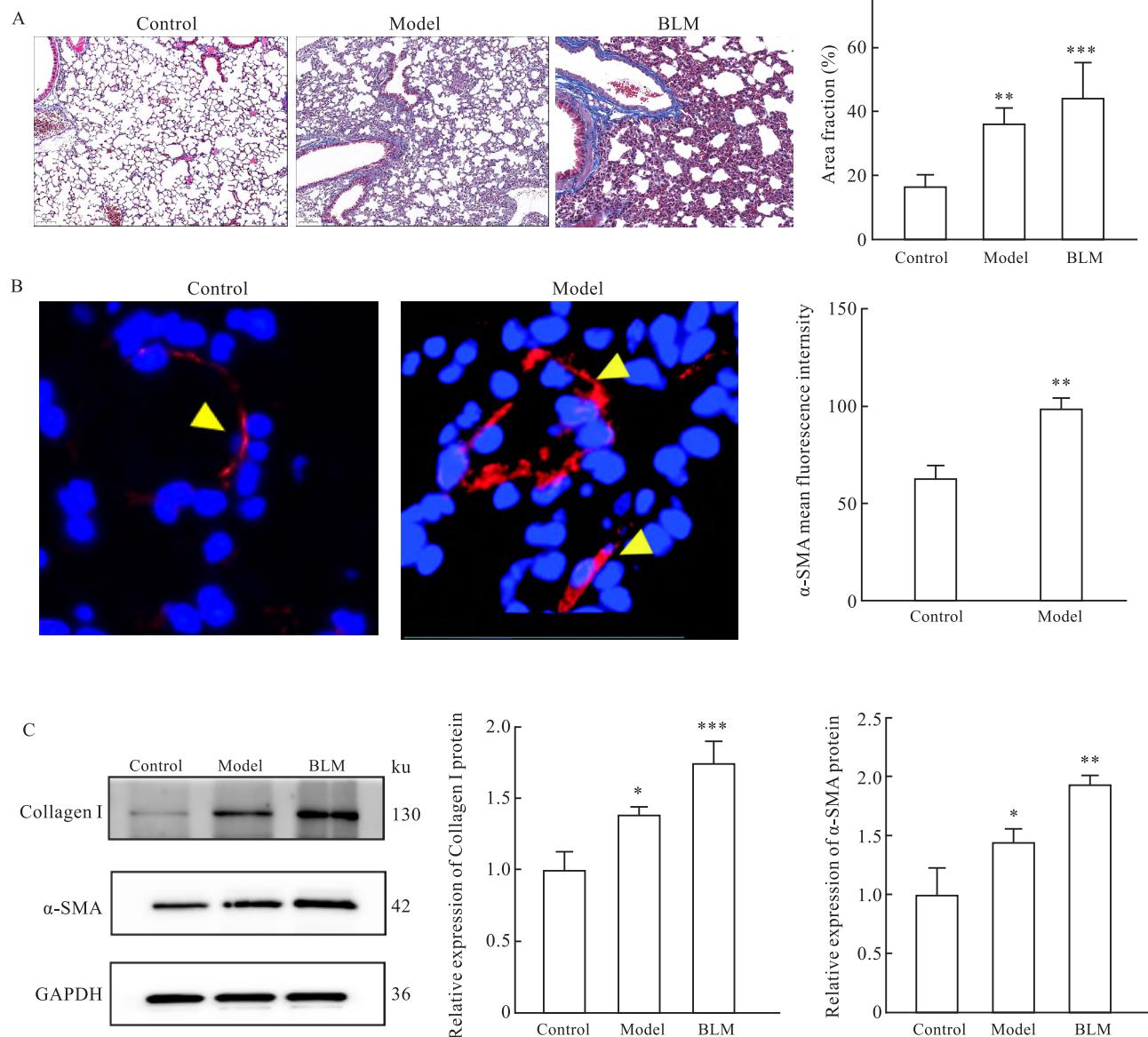


图3 自身抗原诱导肺损伤模型小鼠的肺纤维化倾向

Fig.3 The pulmonary fibrosis tendency of self-antigen-induced lung injury model mice

A: Masson staining and analysis of lung tissue $\times 200$; B: Immunofluorescence images of α -SMA $\times 400$, the yellow arrows indicate the fluorescent expression of α -SMA; C: The protein expression levels of Collagen I and α -SMA, and corresponding analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

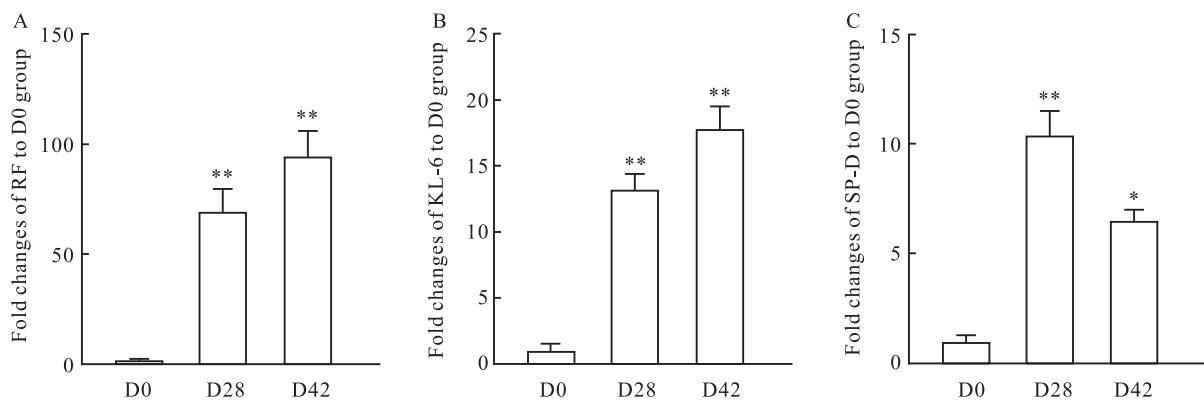


图4 自身抗原诱导肺损伤模型小鼠生物学指标的变化

Fig.4 Changes in biological indicators of self-antigen-induced lung injury model mice

A: The mRNA level of RF in lung tissue; B: The mRNA level of KL-6 in lung tissue; C: The mRNA level of SP-D in lung tissue; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs D0 group.

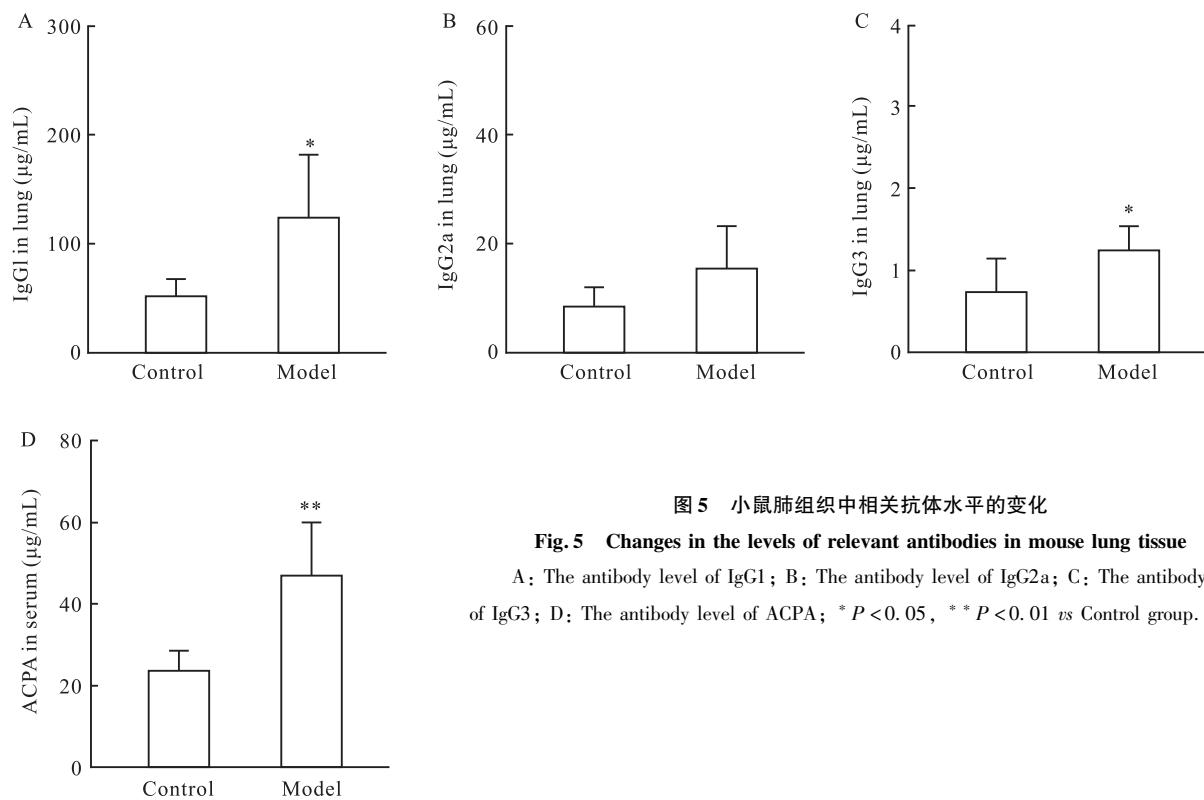


图5 小鼠肺组织中相关抗体水平的变化

Fig.5 Changes in the levels of relevant antibodies in mouse lung tissue

A: The antibody level of IgG1; B: The antibody level of IgG2a; C: The antibody level of IgG3; D: The antibody level of ACPA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group.

照组小鼠比较,模型组小鼠肺组织单核细胞($t = 3.749, P < 0.01$)和T细胞($t = 4.542, P < 0.01$)显著增加,而B细胞变化无统计学差异。此外,与正常对照组比较,模型组小鼠CD4⁺T($t = 4.512, P < 0.01$)和CD8⁺T($t = 4.082, P < 0.01$)细胞比例显著增加。进一步对CD4⁺T细胞分析发现,初始T细胞比例降低($t = 4.520, P < 0.01$),而中央记忆T细胞($t = 3.835, P < 0.01$)和效应T细胞($t = 2.794, P < 0.05$)比例升高且差异有统计学意义。

对CD8⁺T细胞分析发现,初始T细胞比例降低($t = 4.908, P < 0.01$),而中央记忆T细胞($t = 2.325, P < 0.05$)和效应T细胞($t = 2.996, P < 0.05$)比例升高且差异有统计学意义。结果表明,胶原诱导小鼠发生的肺损伤与单核细胞和T细胞相关。见图6。

3 讨论

本研究使用了小鼠肺组织抗原诱导小鼠免疫性

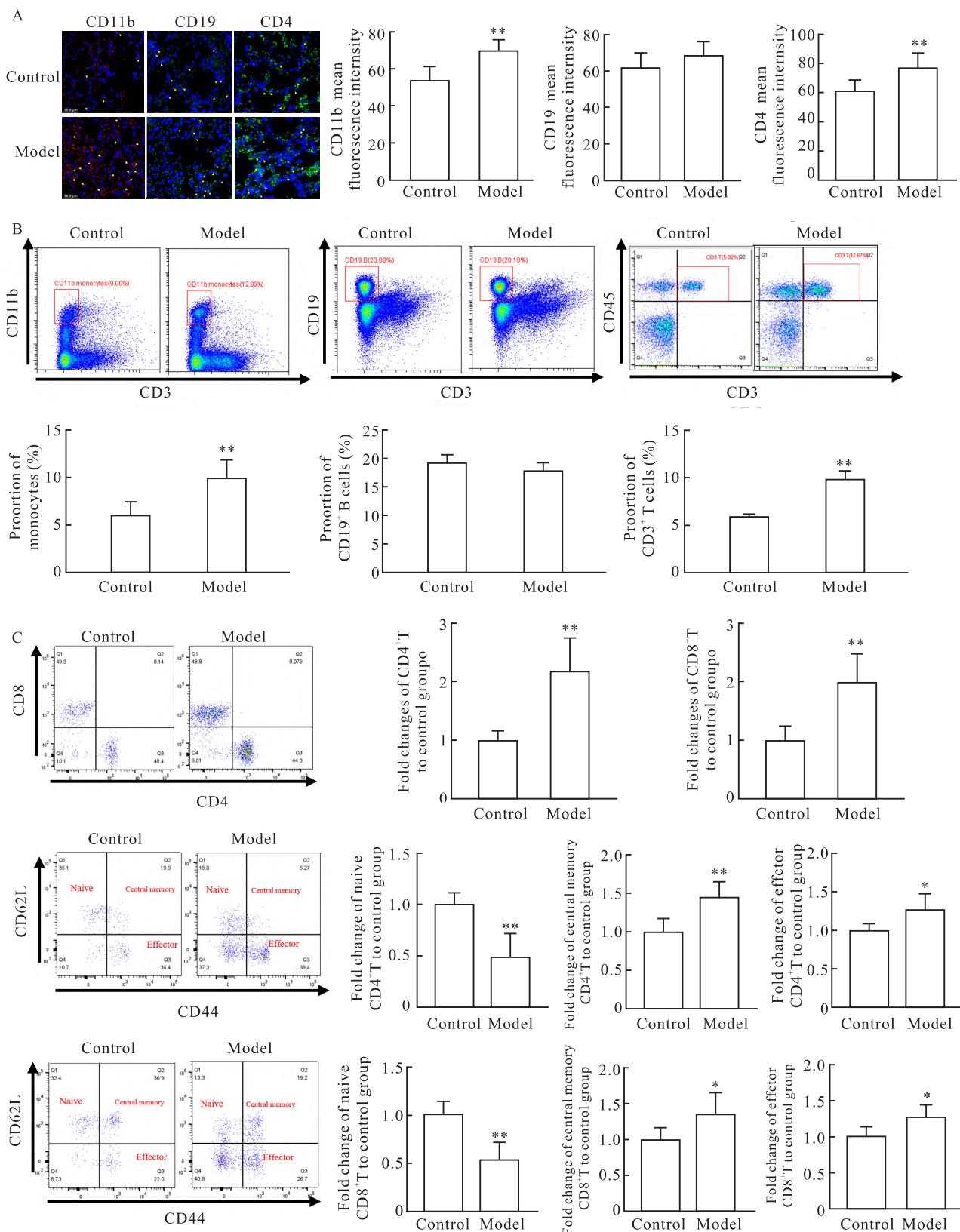


图 6 免疫细胞的变化

Fig. 6 Changes in immune cells

A: Immunofluorescence of immune cells and analysis $\times 400$, and the yellow arrows indicate the target cells; B: Flow cytometry and statistical analysis of monocytes, B cells and T cells; C: Analysis of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and their subsets including naive T cells, central memory T cells and effector T cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group.

的肺损伤,模型组小鼠肺部出现大量炎症细胞浸润,并散在多发出现在肺组织外周,靠近胸膜层,而且炎症较重的区域肺泡腔结构破坏显著,这与 RA-ILD 患者非特异性间质性肺炎的表现较为相似。模型组小鼠肺组织中还形成了淋巴滤泡,淋巴滤泡的形成常在 RA-ILD 患者常见性间质性肺炎中被发现,是重要病理特征之一^[6]。除此之外,通过 Masson 染色发现模型组小鼠的肺部出现了明显的蓝色胶原沉淀,Western blot 结果显示 α -SMA 和 Collagen I 表达增多,提示了肺部的纤维化发展倾向,这也是符合临床常见间质性肺炎的一个重要特征。

RF 和 ACPA 是临幊上诊断及评价 RA 和 RA-ILD 常用的生化指标。RF 是一类自身抗体,主要针对 IgG 的 Fc 片段,对 RA 的诊断有一定的敏感性和特异性,但是 RF 并非 RA 特有的标志物,其水平升高也可能出现在其他自身免疫性疾病和健康人群中^[7]。在干燥综合征和自身免疫性肝炎小鼠模型中,研究发现 RF 水平升高^[8]。本研究模型组小鼠肺部受累时 RF mRNA 水平的升高,可能与自身抗原所诱导的免疫反应相关。ACPA 是 RA 的重要生物标志物,并且 ACPA 水平升高与 RA-ILD 的发病风险、肺部受累程度以及肺功能损害密切相关^[9]。IgG1、IgG2a、IgG3 等亚型通过与 Fc γ 受体结合,激活免疫细胞,释放促炎细胞因子,从而参与 RA 等自身免疫疾病的病理过程^[10]。本研究结果显示,模型组小鼠 ACPA、IgG1 和 IgG3 抗体水平升高,提示模型小鼠可能经历了与 RA 及 RA-ILD 类似的免疫病理过程。肺损伤标志物 KL-6 和 SP-D 是诊断 ILD 的重要生物标志物。有报道^[11-12]发现 KL-6 与磨玻璃影的肺野面积占比相关,与肺纤维化病灶也紧密相关,SP-D 则与肺泡炎的程度相关。本研究中小鼠造模后,肺组织中 KL-6 和 SP-D 的基因表达水平升高。这些结果提示小鼠自身肺组织抗原诱导的肺损伤与人普通型间质性肺炎模式一定程度上的相似,是能够成为 RA-ILD 研究的潜在模型。

单核/巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞是机体重要的免疫细胞,在自身免疫性疾病中也发挥了重要的作用。T 细胞和单核细胞的浸润增加,特别是 Th17 细胞和 M1 型单核/巨噬细胞的比例上升,表明炎症反应的加剧^[13]。这些细胞的活化和增殖导致炎症因子的释放,进一步加重组织损伤。在自身免疫疾病中,总 T 细胞以及 T 细胞亚群的变化和单核/巨噬细胞增多都与疾病的活动性和严重程度密切相关的作用。本研究发现,随着造模时间的延长,造模小鼠

肺组织中单核细胞和 T 细胞浸润明显增多,而 B 细胞的变化无显著性。因此,课题组认为小鼠自身抗原诱导肺损伤模型的发病中 T 细胞和单核细胞发挥重要作用,符合自身免疫性疾病的发病特点。

综上所述,本研究建立了小鼠自身抗原诱导慢性间质性肺损伤模型,通过临幊评分和组织病理学改变等多维度评价体系探讨建立自身抗原诱导慢性间质肺损伤小鼠模型的可能性,为免疫性肺损伤疾病的研究提供了潜在的新的动物模型。

参考文献

- [1] Huang S, Kronzer V L, Dellaripa P F, et al. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: current update on prevalence, risk factors, and pharmacologic treatment[J]. *Curr Treatm Opt Rheumatol*, 2020, 6(4): 337-53. doi: 10.1007/s40674-020-00160-z.
- [2] Sato T, Satooka H, Ichioka S, et al. Citrullinated fibrinogen is a target of auto-antibodies in interstitial lung disease in mice with collagen-induced arthritis[J]. *Int Immunol*, 2020, 32(8): 533-45. doi: 10.1093/intimm/dxa021.
- [3] Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice[J]. *Nature*, 2003, 426(6965): 454-60. doi: 10.1038/nature02119.
- [4] ELnahas E M, Abou Zeid M S, Abdel Kawy H S, et al. Celecoxib attenuates depressive-like behavior associated with immunological liver injury in C57BL/6 mice through TNF- α and NF- κ B dependent mechanisms[J]. *Life Sci*, 2016, 163: 23-37. doi: 10.1016/j.lfs.2016.08.027.
- [5] Lin X, Rui K, Deng J, et al. Th17 cells play a critical role in the development of experimental sjögren's syndrome[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6): 1302-10. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204584.
- [6] Zhao L, Jin S, Wang S, et al. Tertiary lymphoid structures in diseases: immune mechanisms and therapeutic advances[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 225. doi: 10.1038/s41392-024-01947-5.
- [7] Shapiro S C. Biomarkers in rheumatoid arthritis[J]. *Cureus*, 2021, 13(5): e15063. doi: 10.7759/cureus.15063
- [8] Meliauskaite D, Kontenis V, Siaurys A. Lessons from animal models in sjögren's syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12995. doi: 10.3390/ijms241612995.
- [9] Xie S, Li S, Chen B, et al. Serum anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor increase the risk of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: a meta-analysis[J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(11): 4533-43. doi: 10.1007/s10067-021-05808-2.
- [10] Bournazos S, Ravetch J V. Fc γ receptor function and the design of vaccination strategies[J]. *Immunity*, 2017, 47(2): 224-33. doi: 10.1016/j.immuni.2017.07.009.

- [11] Sakamoto K, Taniguchi H, Kondoh Y, et al. Serum KL-6 in fibrotic NSIP: correlations with physiologic and radiologic parameters [J]. *Respir Med*, 2010, 104(1): 127–33. doi: 10.1016/j.rmed.2009.08.011.
- [12] Międlikowska E, Miłkowska-Dymanowska J, Białas A J, et al. Serum KL-6 and SP-D: markers of lung function in autoimmune-related interstitial lung diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1091. doi: 10.3390/ijms26031091.
- [13] Shi Y, Zhang H, Miao C. Metabolic reprogram and T cell differentiation in inflammation: current evidence and future perspectives [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 123. doi: 10.1038/s41420-025-02403-1.

The establishment of a mouse model of self-antigen-induced chronic interstitial lung injury

Wu Yuling¹, Xu Qing², Wang Di³, Hu Shanshan^{1,4}

[¹Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center, Hefei 230601;

³Dept of Anesthesiology, ⁴Dept of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230036]

Abstract **Objective** To establish a mouse model of lung injury induced by self-antigens and explore its pathological mechanisms to provide a reliable animal model for studying the pathogenesis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease (RA-ILD). **Methods** The mice were injected intradermal with antigenemulsion made of complete freund's adjuvant (CFA) and lung tissue protein, and the emulsion prepared with incomplete Freund's adjuvant (IFA) was used to enhance immunity. HE staining was used to observe the histopathological changes in the mice. Masson staining was used to detect pulmonary fibrosis. The mRNA levels of rheumatoid factor (RF), krebs von den lungen-6 (KL-6) and surfactant protein D (SP-D) were detected by qPCR. The levels of ACPA, IgG1, IgG2a and IgG3 antibodies were detected by ELISA. The changes of inflammatory cells and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression in lung tissue were detected by immunofluorescence staining. The protein expression levels of Collagen I and α -SMA were detected by Western blot. The changes of immune cells were detected by flow cytometry. **Results** HE staining showed that inflammatory cell infiltration increased and tissue structure changed significantly in lung tissue after the model was established by self-lung tissue antigen. Masson staining showed increased collagen deposition in lung tissue of model mice. qPCR tests revealed elevated mRNA levels of RF, KL-6 and SP-D. ELISA tests revealed elevated levels of ACPA, IgG1 and IgG3 antibodies. Immunofluorescence results showed that monocytes and T cells increased, and α -SMA expression increased in the model group. Western blot results showed increased protein expressions of Collagen I and α -SMA. The flow cytometry results showed an increase in T cells and monocytes in the lung tissue. **Conclusion** The mouse model of lung injury induced by self-antigens is successfully established, and T cells and monocytes may be involved in the occurrence and progression of the disease.

Key words self-antigens; animal model; lung injury; pulmonary fibrosis; T cells; monocytes

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085MC78); Open Project of Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicines, Ministry of Education in 2020 (No. KFJJ-2020-09)

Corresponding authors Wang Di, E-mail: di.wang@ustc.edu.cn; Hu Shanshan, E-mail: shanshanhu@ustc.edu.cn