

孙文婷, 万盈盈, 杨家熙, 等. 性别差异对牛 II 型胶原诱导的类风湿关节炎模型的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 25-34.

Sun WT, Wan YY, Yang JX, et al. Effect of gender difference on the model of rheumatoid arthritis induced by bovine type II collagen [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 25-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.02.004

性别差异对牛 II 型胶原诱导的类风湿关节炎模型的影响

孙文婷¹, 万盈盈¹, 杨家熙², 王文乾², 王皓男¹, 叶婉婷², 寇秋爱^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的 构建雌性及雄性牛 II 型胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型, 比较性别差异对 CIA 模型关节及关节外表现的影响。**方法** 选用雌性及雄性 SD 大鼠并注射牛 II 型胶原和弗氏完全佐剂诱导 CIA 模型, 评估各组大鼠的一般情况、关节炎指数、足肿胀度、血清炎症因子及纤溶酶原激活物抑制剂水平、脾指数、膝关节及踝关节病理、右后足爪骨破坏情况、肺间质病变情况。**结果** 雌性 CIA 大鼠的关节炎指数在初次免疫后第 21 天较雄性 CIA 大鼠显著升高 ($P < 0.05$), 但两组足肿胀度在观察的任一时间点均无显著差异 ($P > 0.05$); 雌性 CIA 大鼠血清肿瘤坏死因子 α 、白介素 1 β 和脾指数均较雄性 CIA 大鼠显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 纤溶酶原激活物抑制剂水平无显著差异 ($P > 0.05$); 雌性 CIA 大鼠膝关节和踝关节病理的炎症细胞浸润及滑膜增生评分较雄性 CIA 大鼠显著升高 ($P < 0.05$), 雌性 CIA 大鼠膝关节软骨损伤及右后足爪骨破坏程度均较雄性显著升高 ($P < 0.05$); 雌性和雄性 CIA 大鼠均出现了肺间质炎症细胞浸润及轻度纤维化, 但雌性比雄性的肺间质病变更重。**结论** 使用 SD 大鼠构建的雌性及雄性 CIA 模型均能兼具关节炎及肺间质病变, 但雌性 CIA 大鼠的病变程度更重, 在使用 CIA 模型进行 RA 相关研究时应关注性别差异带来的影响。

【关键词】 类风湿关节炎; 性别差异; 牛 II 型胶原诱导的关节炎模型; 间质性肺病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 02-0025-10

Effect of gender difference on the model of rheumatoid arthritis induced by bovine type II collagen

SUN Wenting¹, WAN Yingying¹, YANG Jiayi², WANG Wenqian², WANG Haonan¹, YE Wanting², KOU Qiulai^{1*}

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China.

2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective To establish female and male bovine collagen-induced arthritis (CIA) models and compare the effects of gender differences on joint and extra-articular manifestations of the CIA model. **Methods** The CIA model was induced by injection of bovine type II collagen and Freund's complete adjuvant into female and male SD rats. The general condition, arthritis index, foot swelling, serum proinflammatory factors and plasminogen activator inhibitor levels, spleen index, knee and ankle joint pathologies, right rear paw bone destruction, and pulmonary interstitial lesions were

【基金项目】 中国中医科学院优势病种医院制剂新药研发专项 (ZZ15-XY-PT-07)。

【作者简介】 孙文婷 (1996—), 女, 博士研究生, 研究方向: 中医风湿病的临床与基础研究。E-mail: cherrysunwt@163.com

【通信作者】 寇秋爱 (1964—), 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中医风湿病的临床与基础研究。E-mail: kouqiulai@126.com

evaluated. **Results** The arthritis index of female CIA rats was significantly higher than that of male CIA rats on day 21 after initial immunization ($P<0.05$), but no significant difference was found in the degree of foot swelling between the two groups at any time point ($P>0.05$). Serum tumor necrosis factor α , interleukin- 1β , and the spleen index of female CIA rats were significantly higher than those of male CIA rats ($P<0.05$, $P<0.001$). No significant difference was found in plasminogen activator inhibitor levels ($P>0.05$). The scores of inflammatory cell infiltration and synovial hyperplasia in the knee and ankle pathologies of female CIA rats were significantly higher than those of male CIA rats ($P<0.05$), and cartilage damage of the knee joint and bone damage of the right rear paw of female CIA rats were significantly higher than that of male rats ($P<0.05$). Both male and female CIA rats showed pulmonary interstitial inflammatory cell infiltration and mild fibrosis, but the pulmonary interstitial lesions in females were more severe than those in males. **Conclusions** Female and male CIA models established in SD rats have arthritis and pulmonary interstitial lesions, but the lesion degree in female CIA rats is more serious. When using CIA models for RA-related research, attention should be focused on the effect of gender differences.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; gender difference; arthritis induced by bovine type II collagen; interstitial lung disease

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性、对称性关节炎为主要临床表现的自身免疫性疾病^[1]。RA 的病理特征复杂,常表现为滑膜的增殖、炎症细胞浸润、血管翳形成、软骨和骨侵蚀等。作为多系统损伤性疾病,RA 还会出现多种关节外病变,包括肺间质炎症、肺纤维化、心血管损伤等,严重影响患者的生活质量^[2]。该病在不同性别之间存在显著的不平衡,女性与男性发病比例为 3 : 1 左右,且女性患者疾病活动度更高、关节破坏更严重,这提示性别因素与 RA 的发生及预后密切相关^[3]。

胶原诱导的关节炎模型(collagen-induced arthritis, CIA)与人类 RA 具有相似的病理和免疫学特征,是目前公认的 RA 动物模型^[4-5]。其中 II 型胶原诱导的 CIA 模型使用最为广泛,II 型胶原的诱导会引起 T 细胞和 B 细胞与胶原发生免疫反应,抗 II 型胶原抗体沉积在关节中,激活补体途径并引发炎症反应,出现关节炎、骨骼破坏等表现^[6]。尽管 CIA 大鼠广泛应用于 RA 的病理生理及药物治疗的研究中,但目前 CIA 大鼠的症状是否存在性别差异以及该模型是否兼具肺间质病变尚不清楚。因此,本研究选用雄性和雌性 SD 大鼠构建牛 II 胶原诱导的 CIA 大鼠模型,探索性别差异对 CIA 大鼠关节及关节外病变的影响,为 RA 动物实验中大鼠性别的选择以及 RA 性别差异的相关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4~5 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只、雌性 SD

大鼠 20 只,体重(200±20)g,由中国中医科学院西苑医院实验动物中心购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SYXK(京)2019-0010],饲养于中国中医科学院西苑医院实验动物中心 SPF 级小动物饲养室[SYXK(京)2023-0053]。本实验已通过中国中医科学院西苑医院动物伦理审查委员会审查(2021XLA014-4),并遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号:210571);完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司,批号:2003150981);冰醋酸溶液(上海麦克林生化科技有限公司,批号:01295);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号:020402);快速脱钙液(北京中邦万科生物科技有限公司,批号:20220701);苏木素-伊红(HE)染色液(北京中科万邦生物科技有限公司,批号:RY-0002);Masson 染色试剂盒(北京中科万邦生物科技有限公司,批号:RY-0003)。动物体质量秤(上海奥豪斯仪器有限公司);足容积测量仪(上海欣软信息科技有限公司);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);切片机(上海徕卡仪器有限公司);酶标仪(美国 Beckman);光学显微镜(德国 Leica);X 线机(荷兰 PHILIPS)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及牛 II 型胶原溶液的配制

适应性喂养 7 d 后,分别将雌、雄性 SD 大鼠随机分为雌性对照组、雌性 CIA 组、雄性对照组、雄性 CIA 组,每组 10 只,共 4 组。依据文献^[7],在初次免疫前 1 d,将 50 mg 牛 II 型胶原溶于 25 mL 0.01 mol/L pH = 3.2 的冰醋酸溶液中,放于 4 ℃ 冰箱过夜备用。

1.3.2 CIA 大鼠模型的制备

使用匀浆机将制备好的牛Ⅱ型胶原溶液与 25 mL 完全弗氏佐剂反复乳化,制成含牛Ⅱ型胶原 1.0 mg/mL 的乳化液。除雌性 & 雄性对照组大鼠外,其余大鼠使用 5% 的戊巴比妥 (5.0 mL/kg) 麻醉后进行初次免疫,每只大鼠分 5 个点 (背部 3 个点、尾根部及右后足掌) 皮内注射胶原乳剂各 0.1 mL。如图 1 所示,初次免疫动物 7 d 后进行二次免疫,在大鼠尾根部皮内注射含有牛Ⅱ型胶原 1.0 mg/mL 的胶原乳液每只 0.2 mL^[8]。对照组大鼠在相同的时间点、相同的部位注射等量的生理盐水。初次免疫后第 14 天,对大鼠进行关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分, AI 评分 ≥ 4 分为造模成功^[9]。

1.3.3 观测指标

(1) 一般情况

实验期间,每日观察大鼠的精神状态、进食情况、毛发色泽、活动灵活程度及关节的变化;初次免疫后,每 7 d 拍照记录大鼠的前后足爪关节;初次免疫前及初次免疫后每 7 d 称量 1 次大鼠体重。

(2) 关节炎指数 (arthritis index, AI)

初次免疫后第 7、14、21、28、35、42 天对雌性 & 雄性 CIA 组大鼠进行 AI 评分。依据 4 级评分法对 4 组大鼠的四肢关节进行 AI 评分,每只大鼠的 AI 评分最高为 16 分^[10]。

(3) 足肿胀度

在初次免疫前及初次免疫后第 0、7、14、21、28、35、42 天使用足容积测量仪测量大鼠右后侧足容积。测量前在大鼠右后足踝关节上 1 cm 处标记,将大鼠足爪浸入左侧注射器的水中,抽取右侧注射器上升的水至标注处,读取抽取的水体积读数即为大鼠的足容积,足肿胀度 = 造模后足容积 - 造模前足容积^[11]。

(4) X 线观察右后足爪变化

初次免疫后第 42 天,将大鼠进行麻醉。对大鼠行右后足爪 X 线检查,并由 1 名有经验的放射科医生及 1 名风湿科专家共同根据 Larsen 评分标准进

行评分,以评估右后足爪的骨破坏程度^[12]。
(5) ELISA 法检测血清炎症因子及纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) 水平

初次免疫后第 42 天,将各组大鼠麻醉后腹主动脉取血,离心后取上清,使用 ELISA 试剂盒检测血清肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素 1β (interleukin-1β, IL-1β) 以及 PAI-1 的水平。

(6) 脾指数

初次免疫后第 42 天,大鼠麻醉处死后,取各组大鼠脾称重 (图 1),并计算脾指数,脾指数 / (mg/g) = 脾质量 / 体重^[13]。

(7) HE 染色观察膝关节组织病理变化

取材后,将大鼠的右膝关节浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,使用快速脱钙液脱钙 7 d,组织梯度乙醇脱水、透明、浸蜡。将蜡块至冻台预冷 20 min 后,上切片机,切 4 mm 厚切片,将切下的蜡片至摊片机内恒温水域中展平,附于载玻片上。将粘附组织的蜡片使用 HE 染液染色后使用中性树脂封片,在光学显微镜下根据大鼠膝关节滑膜增生、炎症浸润、血管翳形成情况,进行病理损伤的半定量分析^[14]。

(8) 番红 O 固绿染色观察膝关节软骨变化

使用二甲苯将包埋有膝关节的石蜡切片脱蜡,梯度乙醇溶液脱水,使用 Weigert 苏木素滴染 5 min,洗去多余染液,分别使用固绿染液及番红染液滴染,使用体积分数 95% 乙醇分化数秒并风干,二甲苯透明,中性树胶封固后,在光学显微镜下观察大鼠膝关节软骨变化,并按照 Mankin 评分标准对软骨损伤程度进行评分^[14]。

(9) 肺组织病理学变化

取材后,将大鼠的肺组织浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,常规脱水、石蜡包埋后,切片 5 μm。将切下的蜡片放置于摊片机内恒温水域中展平,附于载玻片上。分别使用 HE 染液试剂盒进行 HE 染

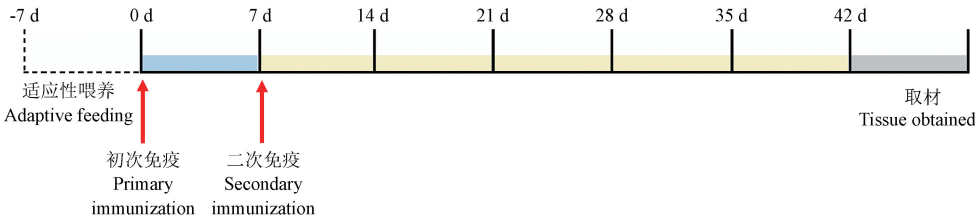


图 1 CIA 大鼠免疫及取材时间点示意图
Figure 1 Schematic diagram of immunization and sampling time points of CIA rats

色,使用 Masson 染色复合液进行 Masson 染色,在光学显微镜下观察大鼠肺组织病理形态变化^[15]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 对数据进行统计分析,使用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示计量资料,使用单因素方差分析进行多组间的比较,两组间的比较采用 SNK-*q* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad prism 9.5.0 绘制统计图。

2 结果

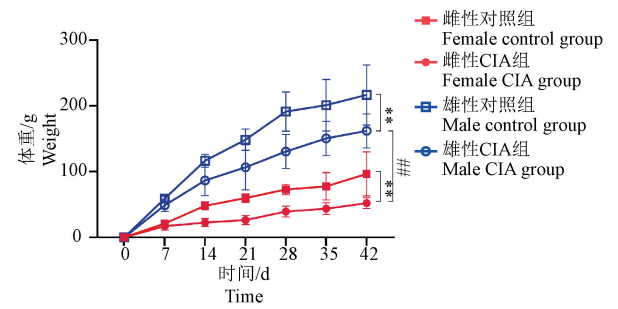
2.1 一般情况

初次免疫后第 14 天,雌性及雄性 CIA 组大鼠均造模成功。雄性及雌性对照组大鼠一般状态良好,饮食正常,活动敏捷。相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠活动受限、食量减少更明显。CIA 大鼠体重增长显著低于同性别对照组大鼠($P<0.01$),雌性 CIA 大鼠体重增长显著低于雄性 CIA 大鼠($P<0.01$,图 2)。雌性 CIA 大鼠出现关节红肿的时间点均较雄性 CIA 大鼠提前 2 d;雌性 CIA 大鼠在初次免疫第 12 天已出现明显的后足爪关节红肿,初次免疫第 19 天前足爪关节、腕关节均可观察到红肿;雄性 CIA 大鼠在初次免疫第 14 天出现明显的后足爪关节红

肿,初次免疫第 21 天前足爪关节、腕关节可观察到红肿。初次免疫第 21~28 天,雌性及雄性 CIA 大鼠各关节红肿均达到高峰,活动受限明显,甚至足爪拖行。初次免疫第 28 天后,关节红肿逐渐减轻,尤其以后足爪关节红肿减轻明显,部分大鼠出现关节畸形(图 3)。

2.2 关节炎指数及足肿胀度

初次免疫后,雌性及雄性 CIA 大鼠均逐渐出现

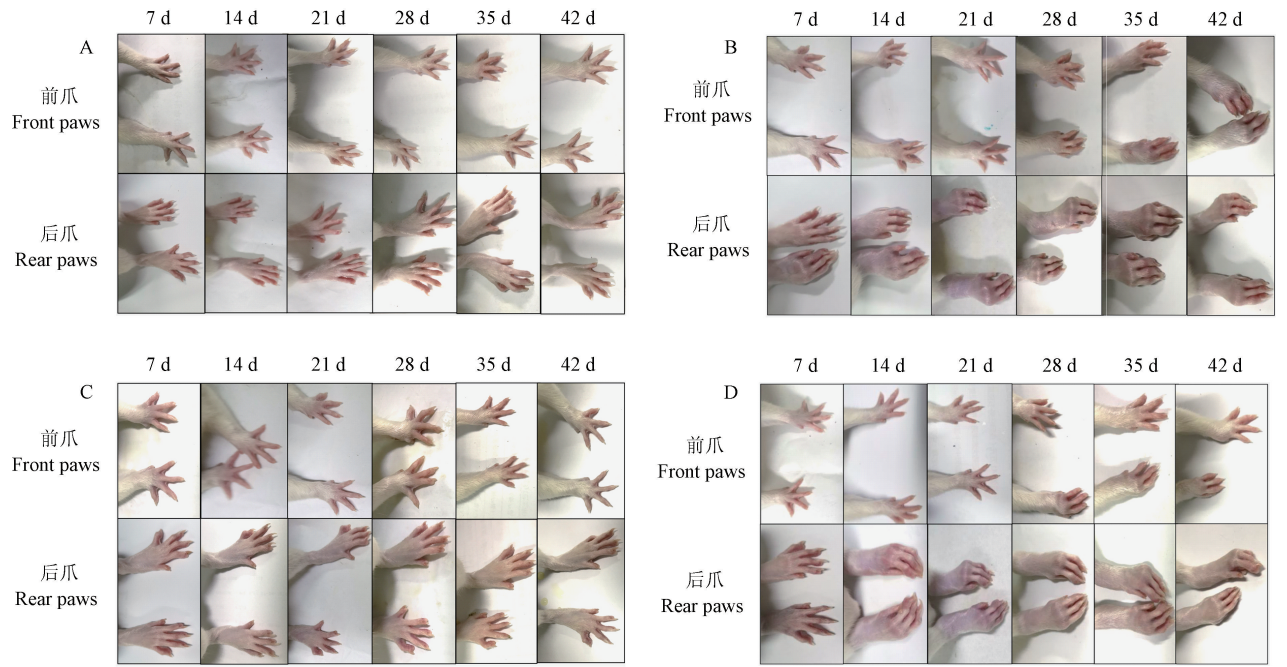


注:与同性别的对照组相比, ** $P<0.01$;与雄性 CIA 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 2 雌性及雄性大鼠体重增长趋势图

Note. Compared with control group of the same sex, ** $P<0.01$. Compared with the male CIA group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Weight growth trend of female and male rats



注:A:雌性对照组;B:雌性 CIA 组;C:雄性对照组;D:雄性 CIA 组。

图 3 雌性及雄性大鼠前后足爪图像

Note. A, Female control group. B, Female CIA group. C, Male control group. D, Male CIA group.

Figure 3 Images of front and rear paws of female and male rats

关节炎,初次免疫后第 21~28 天,关节炎指数逐渐达到峰值。初次免疫后第 21 天,相比雄性大鼠,雌性大鼠的 AI 评分显著升高($P<0.05$),其余时间点均无显著差异(图 4A)。

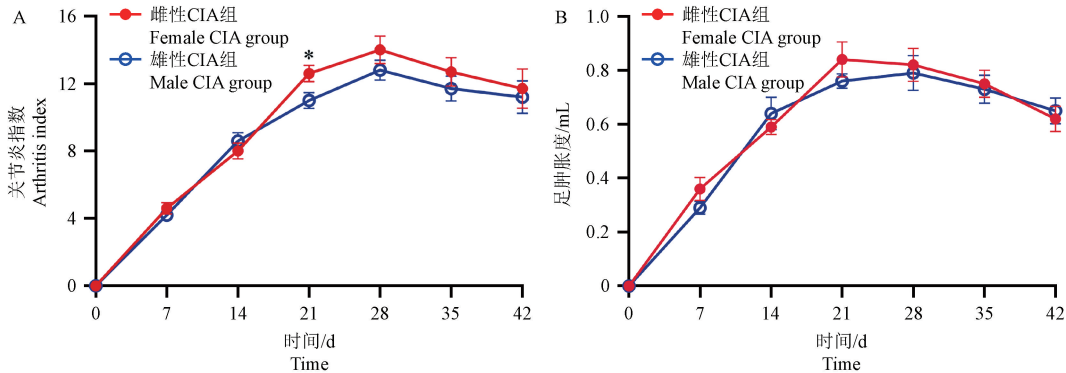
初次免疫后,雄性 & 雌性 CIA 大鼠逐渐出现后肢足肿胀,初次免疫后第 21~28 天,足肿胀度逐渐达到峰值,后逐渐呈下降趋势。雄性 & 雌性大鼠足肿胀度在各时间点均无显著差异($P>0.05$,图 4B)。

2.3 血清炎症因子及 PAI-1 水平

与同性别对照组比较,雌性 & 雄性 CIA 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、PAI-1 水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.001$);与雄性 CIA 大鼠相比,雌性 CIA 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平均显著升高($P<0.05$, $P<0.05$),但 PAI-1 水平无显著差异($P>0.05$,表 1)。

2.4 脾指数

与同性别对照组比较,雌性 & 雄性 CIA 组大鼠脾指数均显著升高($P<0.01$, $P<0.001$);相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠的脾指数显著升高($P<0.001$,图 5)。



注:A:关节炎指数趋势图;B:足肿胀度趋势图。与雄性 CIA 组相比, * $P<0.05$ 。
Figure 4 CIA 大鼠关节炎指数及足肿胀度趋势图
Note. A. Arthritis index trend chart. B. Trend chart of foot swelling. Compared with the male CIA group, * $P<0.05$.

Figure 4 Trend chart of arthritis index and foot swelling degree of CIA rats

表 1 雌性 & 雄性大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 PAI-1 的水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 1 Serum level of rats in each group TNF- α , IL-1 β and PAI-1 levels

组别 Groups	TNF- α / (pg/mL)	IL-1 β / (pg/mL)	PAI-1/ (pg/mL)
雌性对照组 Female control group	18. 26 $\pm$ 1. 62	68. 32 $\pm$ 5. 04	198. 76 $\pm$ 8. 07
雌性 CIA 组 Female CIA group	42. 47 $\pm$ 4. 53 ***	106. 43 $\pm$ 4. 75 ***	209. 12 $\pm$ 6. 58 *
雄性对照组 Male control group	17. 25 $\pm$ 2. 29	70. 42 $\pm$ 3. 55	188. 87 $\pm$ 6. 08
雄性 CIA 组 Male CIA group	38. 37 $\pm$ 1. 34 *** #	100. 45 $\pm$ 3. 16 *** #	207. 07 $\pm$ 8. 93 *

注:与同性别对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与雄性 CIA 组相比, # $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group of the same sex, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with the male CIA group, # $P<0.05$.

($P<0.05$,图 6C、6D)。

2.6 踝关节的病理学观察

踝关节 HE 染色结果所示,雄性及雌性对照组大鼠踝关节结构清晰完整,关节面光滑,无炎症细胞浸润及滑膜血管翳的侵蚀。雄性及雌性 CIA 大鼠踝关节均可见关节结构破坏,关节间隙狭窄甚至消失,滑膜血管翳中有大量炎症细胞浸润,部分关

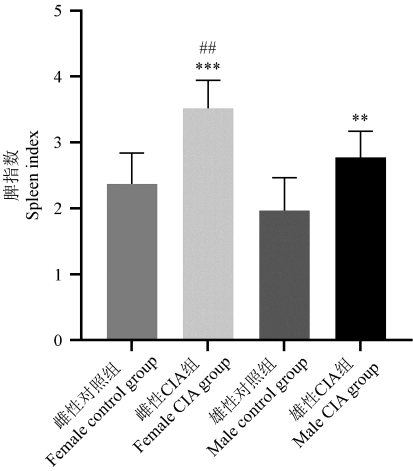
节面均被严重侵蚀。踝关节病理评分结果显示,雌性 CIA 大鼠在滑膜增生、炎症浸润方面均较雄性 CIA 大鼠严重($P<0.05$),但在血管翳方面无显著差异($P>0.05$,图 7)。

2.7 足爪 X 线观察

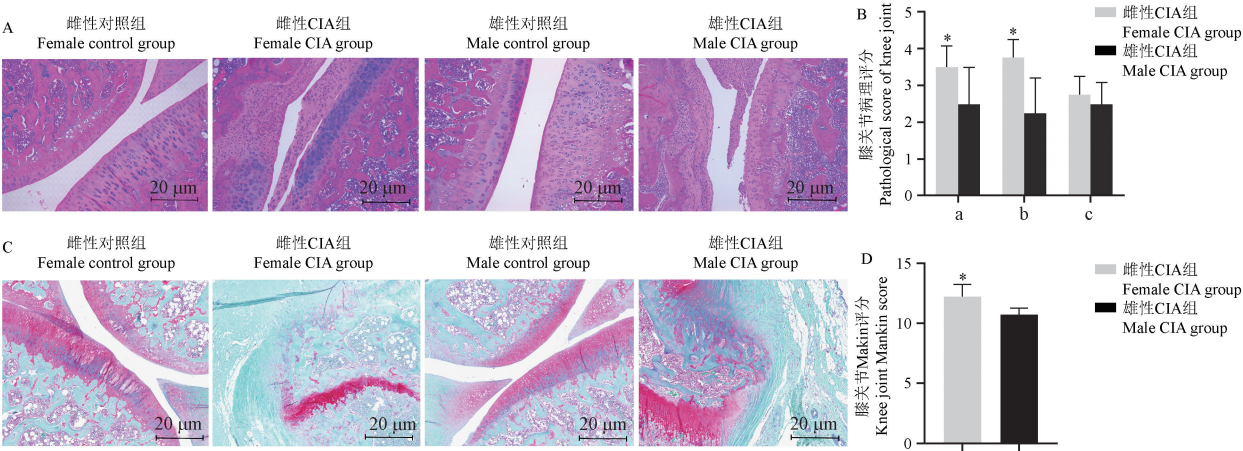
右后足爪 X 线显示,雌性及雄性对照组大鼠关节面平整,雌性及雄性 CIA 组大鼠可见明显的关节破坏,关节间隙狭窄,甚至出现足趾关节融合,且雌性比雄性大鼠关节破坏更明显;Larsen 评分显示,雌性 CIA 组大鼠骨破坏较雄性 CIA 组大鼠严重($P<0.05$,图 8)。

2.8 肺组织的病理学观察

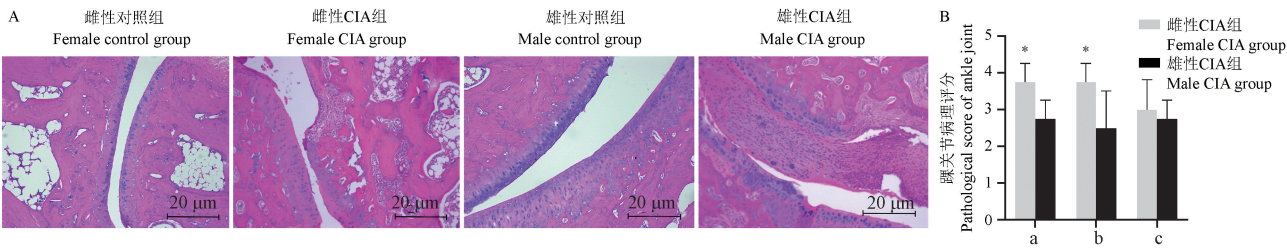
肺组织 HE 染色结果显示,雌性及雄性对照组大鼠肺组织 HE 染色可见清晰完整的肺泡结构,未见明显的炎症细胞浸润。在雌性及雄性 CIA 组大鼠肺组织中,尤其是胸膜下区域,均可见大量的炎症细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺泡壁破坏、肺间隔有增宽增粗,局部有毛细血管扩张、充血;雌性 CIA 大鼠比雄性 CIA 大鼠的病变程度和范围更重(图 9A)。肺组织 Masson 染色结果显示,雌性及雄性对照组大鼠肺组织结构正常,无明显肺纤维化;雌性及雄性 CIA 组大鼠的胸膜下区域肺间质及血管周围均可见轻度的肺纤维化,雌性较雄性 CIA 组大鼠肺纤维化程度重(图 9B)。



注:与同性别对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与雄性 CIA 组相比, ## $P<0.01$ 。
Figure 5 Statistics of spleen index in female and male rats



注:A:膝关节 HE 染色;B:膝关节病理评分柱状图;C:膝关节番红 O 固绿染色;D:膝关节软骨损伤 Mankin 评分。a:滑膜增生;b:炎症浸润;c:血管翳形成。与雄性 CIA 组相比, * $P<0.05$ 。
Figure 6 雌性及雄性大鼠膝关节 HE 染色及番红 O 固绿染色
Note. A, HE staining of knee joint. B, Histogram of pathological score of knee joint. C, Cronin O solid green staining of knee joint. D, Mankin score of knee joint cartilage injury. a, Synovial hyperplasia. b, Inflammatory infiltration. c, Pannus formation. Compared with the male CIA group, * $P<0.05$.
Figure 6 HE staining and safranin O fast green staining of knee joint in female and male rats

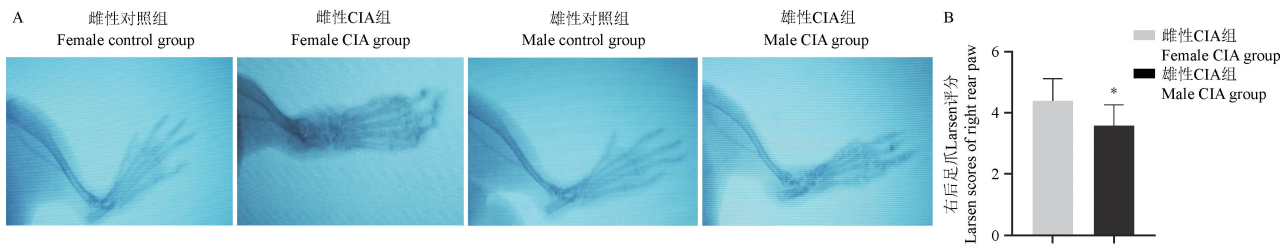


注:A:踝关节 HE 染色;B:踝关节病理评分。a:滑膜增生;b:炎症浸润;c:血管翳形成。与雄性 CIA 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 7 雌性及雄性大鼠踝关节 HE 染色

Note. A, HE staining of ankle joint. B, Pathological score of ankle joint. a, Synovial hyperplasia. b, Inflammatory infiltration. c, Pannus formation. Compared with the male CIA group, * $P < 0.05$.

Figure 7 HE staining of ankle joint in female and male rats

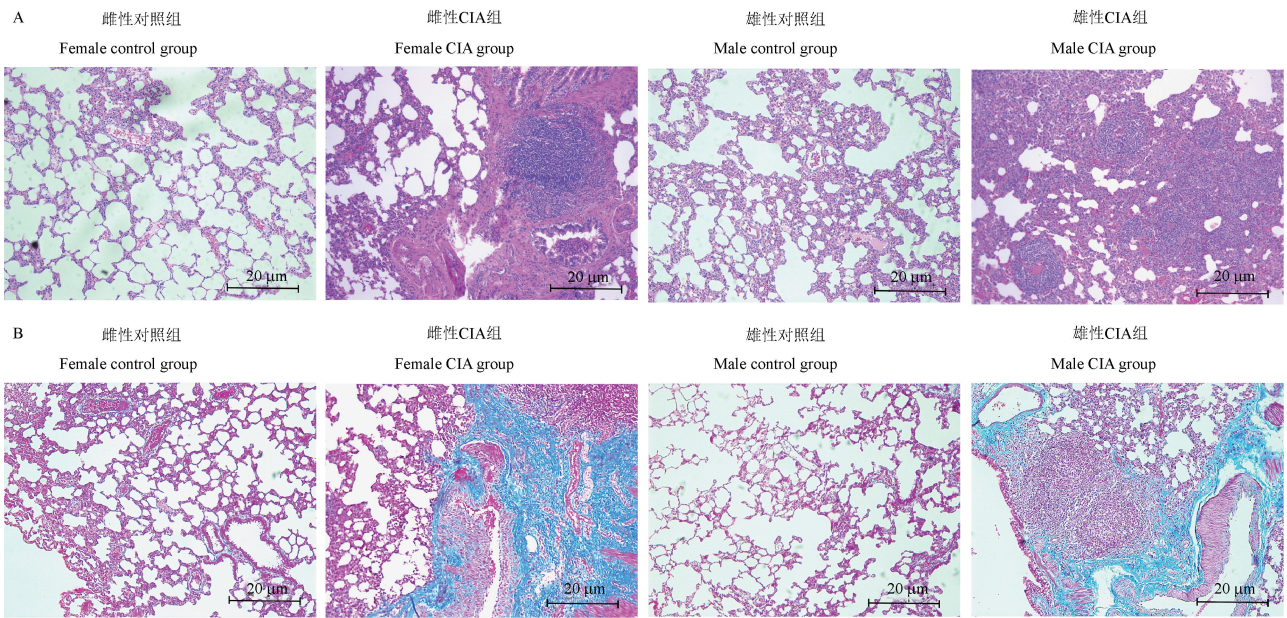


注:A:右后足爪 X 线;B:右后足爪 Larsen 评分。与雄性 CIA 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 8 雌性及雄性大鼠右后足爪 X 线

Note. A, Right rear paw X-ray. B, Larsen scores of right rear paw. Compared with the male CIA group, * $P < 0.05$.

Figure 8 Right rear paw X-ray of female and male rats



注:A:肺组织 HE 染色;B:肺组织 Masson 染色。

图 9 肺组织 HE 染色及 Masson 染色

Note. A, HE staining of lung tissue. B, Masson staining of lung tissue.

Figure 9 HE staining and Masson staining of lung tissue

3 讨论

RA 是一种病因不明的自身免疫性疾病,病变主要位于四肢小关节,随着疾病的进展,可累及全身各个系统,严重影响患者的生活质量。RA 的发病存在着性别不平衡,女性与男性的发病比例通常为 3:1 左右。根据一项全球 RA 的调查结果,女性 RA 的患病率约为 0.35%,而男性患病率约为 0.13%^[16]。相比男性,女性患者发病更早、疾病活动度更高、病程更长、致残率更高^[17]。有研究认为,这种差异可能与遗传、生活方式、性激素等多种因素有关^[3,18]。选择合适的动物模型是深入探究 RA 性别差异及其相关病理生理机制的关键环节,CIA 模型是最常用的 RA 动物模型,也是 RA 体内研究的标准动物模型。目前雌性及雄性 CIA 大鼠在 RA 的动物实验研究中均有应用,但这些研究多集中在关节炎的发病机制及关节炎治疗领域^[9,19];针对 CIA 大鼠性别差异的研究集中在关节炎及关节病理损伤的比较,但在不同的研究中结论并不一致,且尚未探究关节外病变的差异^[20-22]。本研究通过构建雄性及雌性 CIA 大鼠,从关节炎症、软骨损伤、骨破坏、心血管风险相关的血清 PAI-1 的表达情况等多个方面比较了雄性及雌性 CIA 大鼠的病变差异;同时也首次探索了 CIA 大鼠肺组织的病理变化,初步提示了雌性及雄性 CIA 大鼠均能兼备关节炎和肺间质病变,但雌性较雄性病变程度更重。

目前报道的制作 CIA 模型的大鼠包括 DA 大鼠、Lewis 大鼠、Wister 大鼠、SD 大鼠,DA 大鼠对新环境适应力差、免疫力低,且多需国外引进、价格昂贵,Lewis 大鼠、Wister 大鼠、SD 大鼠均为国内 CIA 研究常用的大鼠,结合课题组既往的造模经验,本研究选择了 SD 大鼠进行造模^[9]。在本研究中发现,雌性 CIA 大鼠足爪关节症状比雄性大鼠早 2 d 出现,雌性 CIA 大鼠的 AI 评分在第 21 天较雄性大鼠高;雌性 CIA 大鼠脾指数较雄性 CIA 大鼠升高,雌性 CIA 大鼠膝关节、踝关节在炎症细胞浸润、滑膜细胞增殖等方面的病变程度均较雄性大鼠严重。与本研究结果相似,Dimitrijević 等^[22]在使用 DA 大鼠诱导的 CIA 模型中也发现雌性大鼠关节炎评分在第 17~39 天高于雄性大鼠,并且雌性大鼠较雄性大鼠发病提早 3 d。研究认为,这一现象的发生可能与 Th17/Treg 轴有关,与雄性大鼠相比,雌性大鼠发炎的足爪组织中 GM-CSF、TNF- α 和 IL-6、IL-1 β 水

平较高,这些炎症因子能够驱动 Th17 细胞分化,促进 IL-17 的分泌,导致雌性 CIA 大鼠关节症状更严重^[22]。此外,与雄性大鼠相比,雌性 CIA 大鼠血清中的促氧化剂/抗氧化剂比率升高,脾中单核细胞/巨噬细胞的生成增强,且单核细胞 CD11b⁺ 细胞表现出更强的吞噬、粘附和迁移能力,这种不同性别之间单核细胞系所带来差异可能也是导致雌性 CIA 大鼠症状更严重的原因^[23]。与本次研究使用的 SD 大鼠不同,在 DA 大鼠制作的 CIA 模型中雄性大鼠仅有后足显示关节炎的迹象,未出现前爪的关节炎,考虑可能与造模动物本身的基因易感性有关。值得注意的是,在药物相关的研究中已证实,不同性别 CIA 模型所表现出的差异会对药物的治疗作用产生影响,比如,一项关于萘普生对 CIA 大鼠的治疗作用的研究发现,萘普生在雄性 CIA 大鼠中的作用强于雌性 CIA 大鼠,尤其是对足爪肿胀方面^[24]。这也提示我们,在药物治疗的试验研究中应当关注性别差异引起的疗效差异。

尽管 CIA 模型是目前常用的 RA 动物模型,但对于该模型的关节外病变目前研究较少。类风湿关节炎间质性肺疾病(rheumatoid arthritis-interstitial lung disease,RA-ILD)是 RA 最常见的关节外表现,约有 2%~10% 的 RA 患者会发展为该病,也是 RA 患者死亡的主要原因之一^[25]。该病主要表现为肺部的炎症及纤维化,其常见的病理类型报告普通间质性肺病和非特异性间质性肺病,其中以非特异性间质性肺病最为多见,然而 RA-ILD 的发病机制尚不清楚。合适的动物模型是深入探索 RA-ILD 的关键,既往研究 RA-ILD 多采用博来霉素诱导的肺纤维化动物模型,尽管这种模型造模周期短,形成的间质性肺病相对稳定,但是这与 RA-ILD 不可逆、进展缓慢的特点以及病理变化差异较大,并且该模型无法兼备关节炎和肺间质病变两种疾病状态,存在诸多不足^[26-27]。因此,我们探索了 CIA 大鼠是否存在肺间质性病变。本研究发现,雌性及雄性 CIA 大鼠肺组织病理中均可以观察到大量的炎症细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺泡壁破坏,尤其是胸膜下区更为明显,这与人类 RA-ILD 是相似的。尽管雌性及雄性 CIA 大鼠的胸膜下区域肺间质及血管周围均可见轻度的肺纤维化,但相比雄性 CIA 大鼠,雌性的炎症细胞浸润程度、纤维化程度更重。在 CIA 小鼠的研究中有文献报道,初次免疫 49 d 后,肺组织周围可见片状间质浸润,尤其在胸膜下区域,其中

以 M2 表型的 CD11b 巨噬细胞增多为主,该表型的巨噬细胞可以促进纤维化发生,但研究者未观察到 CIA 小鼠的肺纤维化,此外,CIA 小鼠模型的肺组织还存在 IgG 和补体 C3 的沉积,以及抗瓜氨酸纤维蛋白抗体的产生。遗憾的是,这项研究仅针对雄性 CIA 小鼠进行了探索,雌性 CIA 小鼠中是否也存在相似的表现尚不清楚^[28]。

除间质性肺疾病外,RA 患者的动脉粥样硬化和继发的心血管事件发生率也高于一般人群^[29]。既往有研究证实,CIA 大鼠模型存在血管内皮损伤等早期动脉粥样硬化改变^[30]。PAI-1 是调节纤溶活性的一种单链糖蛋白,它能减少纤维蛋白的清除,使血液处于高凝状态,导致动脉粥样斑块形成、粥样斑块破裂、血栓形成等,是心血管事件的危险因素^[31]。在 RA 中 PAI-1 的表达较正常人显著升高^[32]。在本研究中,我们发现 CIA 大鼠的 PAI-1 表达较同性别对照组大鼠均显著升高,但未观察到雌性与雄性 CIA 大鼠的 PAI-1 表达具有显著差异。类似的,Kwieciński 等^[33]在雄性 DBA/1 小鼠诱导的 CIA 小鼠模型中也观察到血清 PAI-1 表达较正常雄性小鼠显著升高,并认为 CIA 小鼠能够模拟人类 RA 纤溶系统的变化,但该研究同样未观察雌性小鼠。

在本研究中,我们对比了不同性别的 CIA 模型之间关节及关节外病变的差异,并首次探索了 SD 大鼠诱导的 CIA 模型是否合并有间质性肺炎。该研究提示,使用 SD 大鼠构建的雄性及雌性 CIA 模型均能兼备关节炎和肺间质病变两种疾病状态,相比雄性 CIA 大鼠,雌性 CIA 大鼠发病时间更早,AI 评分、血清炎症因子及脾指数均更高,膝关节及踝关节病理损伤、右后足爪骨破坏程度均更重。这些差异也反映了不同性别的 CIA 大鼠对免疫损伤的反应是不同的,在 CIA 大鼠相关的试验研究中,尤其在药物治疗领域,应当考虑到性别差异带来的影响。本研究尚存在一些不足,尽管我们在雄性及雌性 CIA 大鼠初次免疫后的第 42 天观察到了肺间质性病变,但这种病变是否稳定存在尚不清楚,仍需在未来的研究通过更大的样本量和更长的实验周期进行验证。

参考文献:

[1] RADU A F, BUNGAU S G. Management of rheumatoid arthritis: an overview [J]. Cells, 2021, 10(11): 2857.
[2] 徐洪琳,张蜀澜. 类风湿关节炎相关肺间质病变生物标志物

[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2021, 15(4): 448-453.
XU H L, ZHANG S L. Biomarkers for rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease [J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2021, 15(4): 448-453.
[3] FAVALLI E G, BIGGIOGGERO M, CROTTI C, et al. Sex and management of rheumatoid arthritis [J]. Clinic Rev Allerg Immunol, 2019, 56(3): 333-345.
[4] ROSLONIEC E F, CREMER M, KANG A H, et al. Collagen-induced arthritis [J]. Curr Protoc Immunol, 2001, Chapter 15: 15.5.1-15.5.25.
[5] WANG S, ZHOU Y, HUANG J, et al. Advances in experimental models of rheumatoid arthritis [J]. Eur J Immunol, 2023, 53(1): e2249962.
[6] CHOUDHARY N, BHATT L K, PRABHAVALKAR K S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(3): 193-200.
[7] GAO Q, QIN H, ZHU L, et al. Celastrol attenuates collagen-induced arthritis via inhibiting oxidative stress in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84: 106527.
[8] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1868: 3-7.
[9] 马天越,方宜梅,郭甘霖,等. 二四汤对牛Ⅱ型胶原诱导大鼠类风湿关节炎的干预机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 38-45.
MA T Y, FANG Y M, GUO G L, et al. Mechanisms of ersi decoction on rheumatoid arthritis rats induced by bovine type II collagen-solution [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(5): 38-45.
[10] POUTOGLIDOU F, POURZITAKI C, MANTHOU M E, et al. Infliximab prevents systemic bone loss and suppresses tendon inflammation in a collagen-induced arthritis rat model [J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(3): 661-672.
[11] 南丽红,刘玉凤,黄枚,等. 雷公藤炮制前后对胶原诱导型关节炎大鼠的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5795-5799.
NAN L H, LIU Y F, HUANG M, et al. Effects of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. before and after processing on CIA model rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5795-5799.
[12] LI X, ZHANG L, XU Y, et al. Therapeutic effect of matrine on collagen-induced arthritis rats and its regulatory effect on RANKL and OPG expression [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 4186102.
[13] 富雨萍,李佳钰,陆麒麟,等. 从炎症、凋亡与自噬评价 Mtb 诱导类风湿关节炎风湿热痹动物模型 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 44-52.
FU L P, LI J Y, LU Q J, et al. Evaluation of animal model of rheumatoid arthritis induced by *Mycobacterium tuberculosis* from inflammation, apoptosis and autophagy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(23): 44-52.
[14] MU Y R, CAI L, ZHOU M Y, et al. Acetazolamide ameliorates

- the severity of collagen-induced arthritis in rats; Involvement of inducing synovial apoptosis and inhibiting Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107214.
- [15] 景菲, 胡旭东, 彭渊, 等. 结合网络药理学探讨扶正化癆方对肺纤维化小鼠 PI3K-Akt 信号通路的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(2): 28-33.
- JING F, HU X D, PENG Y, et al. Exploring the effects of fuzheng Huayu recipe on PI3K-akt signaling pathway in mice with pulmonary fibrosis based on network pharmacology [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2022, 29(2): 28-33.
- [16] CROSS M, SMITH E, HOY D, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(7): 1316-1322.
- [17] SHIN S, PARK E H, KANG E H, et al. Sex differences in clinical characteristics and their influence on clinical outcomes in an observational cohort of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2021, 88(3): 105124.
- [18] NGO S T, STEYN F J, MCCOMBE P A. Gender differences in autoimmune disease [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2014, 35(3): 347-369.
- [19] 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠骨桥蛋白表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(3): 1359-1362.
- ZHANG D M, LI B L. Effects of Biqi Capsule on the expression of osteopontin in collagen-induced arthritis rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(3): 1359-1362.
- [20] 赵宏艳, 王燕, 肖诚, 等. 不同品系、不同性别对大鼠 CIA 发病情况的比较研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(9): 761-764.
- ZHAO H Y, WANG Y, XIAO C, et al. Comparative study of the incidence in collagen-induced arthritis rats of different gender and species [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2010, 16(9): 761-764.
- [21] 秦苏萍, 李慧, 李向阳, 等. 性别差异对类风湿性关节炎大鼠模型的影响[J]. *徐州医学院学报*, 2014, 34(12): 865-867.
- QIN S P, LI H, LI X Y, et al. Effects of gender on rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2014, 34(12): 865-867.
- [22] DIMITRIJEVIĆ M, ARSENOVIĆ-RANIN N, KOSEC D, et al. Sexual dimorphism in Th17/Treg axis in lymph nodes draining inflamed joints in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76: 198-214.
- [23] DIMITRIJEVIĆ M, ARSENOVIĆ-RANIN N, BUFAN B, et al. Sex-based differences in monocytic lineage cells contribute to more severe collagen-induced arthritis in female rats compared with male rats [J]. *Inflammation*, 2020, 43(6): 2312-2331.
- [24] LI X, DUBOIS D C, ALMON R R, et al. Modeling sex differences in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and disease progression effects of naproxen in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45(5): 484-491.
- [25] KAWANO-DOURADO L, DOYLE T J, BONFIGLIOLI K, et al. Baseline characteristics and progression of a spectrum of interstitial lung abnormalities and disease in rheumatoid arthritis [J]. *Chest*, 2020, 158(4): 1546-1554.
- [26] 李燕飞, 胡长平, 李峰. 肺纤维化动物模型研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(2): 211-215.
- LI Y F, HU C P, LI F. Research progress of animal models of pulmonary fibrosis [J]. *J Med Sci Cent South China*, 2016, 44(2): 211-215.
- [27] 姚璐莎, 王雁芳, 范伏元. 通痹颗粒对类风湿关节炎继发肺间质病变模型大鼠的保护作用[J]. *世界中医药*, 2020, 15(12): 1743-1746.
- YAO L S, WANG Y F, FAN F Y. Protective effect of Tongbi Granule on rats with pulmonary interstitial disease secondary to rheumatoid arthritis [J]. *World Chin Med*, 2020, 15(12): 1743-1746.
- [28] 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): 533-545.
- [29] 杨洋, 张晓红, 黄鹤. 类风湿关节炎与心血管疾病相关性的研究进展[J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(6): 571-574.
- YANG Y, ZHANG X H, HUANG H. Research advances on the correlation between rheumatoid arthritis and cardiovascular disease [J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2019, 24(6): 571-574.
- [30] 李振彬, 焦爱军, 刘文萍, 等. 三七总皂苷配伍雷公藤多苷对胶原诱导性关节炎大鼠心血管损伤的保护作用[J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(1): 52-55.
- LI Z B, JIAO A J, LIU W P, et al. Protective effect of *Panax notoginsenosidum* combined with *Tripterygium* glycosides on the cardiovascular injury in rats with collagen induced arthritis [J]. *Med Pharm J Chin People's Liberation Army*, 2015, 27(1): 52-55.
- [31] TORRES-CARRILLO N, TORRES-CARRILLO N M, MARTÍNEZ-BONILLA G E, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 C/G polymorphism in relation to plasma levels in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Med*, 2009, 9(3): 223-228.
- [32] MCENTEGART A, CAPELL H A, CRERAN D, et al. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2001, 40(6): 640-644.
- [33] KWIECIŃSKI J, JOSEFSSON E, JIN T. Fibrinolysis is down-regulated in mouse collagen-induced arthritis, but its normalization does not alleviate the course of disease [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(11): 1021-1029.