

胶原在大鼠中成功诱导关节炎方案（CIA）

胶原诱导关节炎（CIA）首次应用是用Ⅱ型胶原免疫 Wistar(远亲杂交)、Sprague-Dawley (远亲杂交)和 Wistar-Lewis (近交) 中诱导成功。由于此 CIA 模型具有与人风湿病关节炎(RA)相同的免疫和病理特征，因此该模型先后扩展到小鼠及非人灵长类动物，并已作为人类关节炎研究的广泛应用的模型。然而，对于 CIA 模型来说，不同种属动物之间是有差异的。小鼠对 CIA 的敏感性与主要组织相容性复合体（MHC）相关，在小鼠品系中只有 DBA/1(H-2^d) 和 B10.RIII(H-2^f)两个品系对 CIA 敏感。大鼠对 CIA 的敏感性也与 MHC 相关，并与小鼠相比具有较宽的品系范围。因此，不同 MHC 型的不同品系的大鼠，尽管关节炎的发病率、严重程度及抗体和 T-cell 的特异性在不同品系间不同，但都能够诱发关节炎。

动物的管理与饲养

动物必须是 7-8 周龄健康的并在 SPF 条件下饲养的动物。一般来说，对于肠道菌群，不管是否致病都显著影响宿主对抗原的免疫应答。无菌的大鼠对佐剂诱发的关节炎高度易感（AIA），其次是 SPF 级大鼠及一般大鼠敏感性相对较低。即使同一品系，CIA 的发病率及严重程度也有显著差异，这种差异是由于饲养条件造成的。

众所周知，小鼠的饮食影响 CIA 的发病率及严重程度。然而在大鼠在中没有进行广泛研究。与小鼠相比，大鼠对Ⅱ型胶原的免疫应答更快且较短时间内能诱发关节炎，因此饮食对小鼠来可能不是影响关节炎的重要因素。然而，像小鼠一样，饲以高脂肪的食物对诱发关节炎更有利。

大鼠的品系

对Ⅱ型胶原的免疫应答以及关节炎的进展与 MHCRT1 位点相关而且用于免疫的Ⅱ型胶原的动物来源不同也会造成大鼠对Ⅱ型胶原的免疫应答以及关节炎的进展上的差异。然而，与小鼠相比，很多品系的大鼠对 CIA 敏感，并能诱发一定程度的关节炎。一般来说，猪的Ⅱ型胶原是最好的致炎胶原其后是牛的二型胶原，鸡的二型胶原致炎性最差。以下大鼠品系是已明确的对 CIA 高度易感的品系：BB/DR (RT1^u), Wistar Furth, LOU (RT1^u), OM (RT1^u)和 LEW (RT1^l) 大鼠。

动物质量也很重要。在这方面，肠道菌群可能是影响机体对二型胶原免疫应答和关节炎进展的重要影响因素之一。例如:Lewis 大鼠对 CIA 高度易感，同时发病率和炎症严重程度都很高。但是同是 SPF 级 Lewis 大鼠对 CIA 的敏感性由于年龄、饲养条件及免疫肠道菌而对

CIA 的敏感性存在显著差异。MDP(胞壁酰二肽)对加强 Lewis 大鼠对 CIA 的发病率和严重程度非常有效。但是我们建议在用 Lesis 大鼠造模之前先进行小规模试验，据我们所知 BB 大鼠是用于 CIA 造模最好的品系。

DA 大鼠对 CIA 的敏感，但是同时 AIA(佐剂诱发的关节炎)及矿物油诱发的关节炎(仅矿物油)高度敏感，因此不推荐用于 CIA 的造模。

注 1: 与小鼠相反大鼠对同源(大鼠) II 型胶原是敏感的，同时诱发和猴一样的关节炎。

注 2: 与小鼠和猴子相反，大鼠对 II 型胶原抗体是针对 II 型胶原分子构象的特异性抗体。

因此胶原变性或免疫 II 型胶原的单独 CB 肽段都不能在大鼠中致炎。

胶原

因为去糖基化的胶原会影响关节炎的产生，同时一些未去除的杂质比如：胃蛋白酶可能会导致 T 细胞刺激试验中产生假阳性，因此 II 型胶原应按规定高度纯化。如果按恰当的方法冻干的胶原-20℃避光保存的条件下，是非常稳定的。纯化的胶原溶于 0.05M 浓度的醋酸中，终浓度为 2-4mg/mL，温和搅拌，4℃过夜。胶原溶液在 4℃保存一周，此后需在-20℃保存。Chondrex 公司提供较完整的不同免疫级别的 II 型胶原。(见表 1)

表 1 不同种属来源 II 型胶原

Catalog#	Description
20011	鸡 II 型胶原, 10mg
20012	鸡 2 型胶原, 5 ml x 2 mg/ml
20021.	牛 2 型胶原, 10 mg
20022	牛 2 型胶原, 5 ml x 2 mg/ml
20031	猪 2 型胶原, 10 mg
20032	猪 2 型胶原, 5 ml x 2 mg/ml
20041	大鼠 2 型胶原, 5 mg
20042	大鼠 2 型胶原, 2.5 ml x 2 mg/ml
20051	人 2 型胶原, 1 mg
20052	人 2 型胶原, 0.5 ml x 2 mg/ml
20061	小鼠 2 型胶原, 1 mg
20062	小鼠 2 型胶原, 0.5 ml x 2 mg/ml

乳剂的制备

1) 由于大鼠通常对佐剂诱发的关节炎(AIA)是敏感的,因此必须使用不完全佐剂(IFA),货号是 7002。乳剂的质量是能否诱发关节炎高发病率的关键因素。乳剂的制备有多种方法。但是不推荐注射器或超声波处理的方法。这些方法将导致乳剂不能够有效的、稳定的诱发关节炎。此外,超声波处理方法,至少将胶原分成 2 个片段,这些小片段在正常体温下,很容易变性。推荐使用电动的高速搅拌器:

用高速搅拌器(带直径 $\leq 5\text{mm}$ 的刀片, Fig.1)搅拌不完全佐剂(IFA)和胶原溶液(Fig 2a)。如果刀片够不到注射器低端,可以把 5mL 或 10mL 的注射器从活塞处剪去一半 (Fig.2b)。把注射器夹紧,固定在铁架台上,并冰浴。最后一步很重要,因在搅拌过程中会发热,会引起蛋白变性,变性的蛋白不能够诱发关节炎 (CIA)。



Fig1. 高速搅拌器 Fig2 刀片, 截断的注射器, 汉密尔顿玻璃注射器、



Fig. 截断的注射器, 支架上固定, 冰浴

2) 加 1 体积（最多 2.5mL）不完全完全佐剂到注射器，再加等体积的胶原溶液（0.05M 醋酸溶解的的胶原溶液，终浓度 2mg/mL），边低速搅拌边滴入胶原溶液。

3) 继续混合，直到在最大转速产生稳定的乳液（转速约 3000 rpm/2-3 min）。在再次混合前确保乳液是冰浴中。对于大体积（2-5mL）为了使乳液混合均匀，建议在混匀过程中移动搅拌位置。

注：可能需重复搅拌 2-3 次

4) 将一滴乳剂滴与一烧杯水中，检测乳剂的稳定性。如果乳剂是稳定的，在水中是成团的，不散开。

注：如果乳剂在水面散开，表明乳剂不稳定。再加几滴佐剂，重新混合后，再检测。

5) 将乳剂转移到 1mL Hamilton 玻璃注射器。不加建议采用塑料注射器，因为很难做到一个准确的注射剂量。

注 1：通过用力甩注射器将乳剂中的气泡赶出注射器（活塞部向下）。否则很难做到一个精确的注射剂量。

注 2：建议在乳剂制备好的一小时内，注射完毕。乳剂在用前一直保持 4℃。

注射部位

在鼠尾根部注射 0.2mL(胶原：200μg)乳剂（Fig.4）。例如：从尾根部 2cm 处插入针头，直到针尖插入位置距尾根部 0.5cm。针插入皮下且每次注射充分擦拭，防止乳液的露出。针头沿斜向上与鼠尾方向平行插入。如果要加强免疫，注射部位在尾根部 3cm 处，针尖插入皮下距鼠尾根部 1.5cm 处。

注 1：背部皮下注射也非常有效，但需注射更多的胶原乳剂（0.5-1mL）。

注 2：无论如何，我们不建议背部皮下注射或腹腔注射胶原乳剂和佐剂，如初次免疫或加强免疫。因为不完全佐剂在腹膜和腹腔引起严重的炎症反应。



图 4：皮下免疫乳剂

免疫程序

II 型胶原的自身 IgG 抗体水平及其亚型（可激活补体），对关节炎的发生很重要。依据实验目的有很多种方法可诱发高发病率的关节炎。

a. 通过单次免疫（无加强免疫）诱发关节炎

依据说明书方法制备乳剂（胶原-不完全佐剂）和免疫，由于不同品系的敏感性的差异，一般在 2-3 周可诱发关节炎。在一些免疫应答较强的品系，发病率达到 80-90%。对于一些高度易感品系如 BB 大鼠，关节炎严重程度，临床评分可达到 10-12 分（最高 16 分）。

b 通过加强免疫诱发关节炎

为了确保关节炎的发病率和严重度，可在初次免疫 7 天后加强免疫。按说明书方法，准备胶原-不完全佐剂，尾部皮下注射 0.1mL,会短时间内产生严重的关节炎。

按要求制备胶原+IFA 乳剂（1：1）

初次免疫(0day)：200 ul 乳剂/只

加强免疫（7day）：100ul 乳剂/只

c 用人工合成的胞壁酰二肽作为佐剂诱导关节炎

完全弗氏佐剂含灭活的结核杆菌，不能和二型胶原合用免疫大鼠。但是，可以用另一种佐剂 MDP(N-acetylmuramyl-alanyl-D-isoglutamine hydrate) 用于免疫。用双蒸水溶解 MDP 至 4-8mg/ mL。胶原溶解于 0.5M 的醋酸中，终浓度为 4mg/ mL。免疫前等体积混合 MDP 和胶原溶液。将 MDP-胶原混合物和等体积的 IFA(不完全佐剂)按上述方法混合。尾部皮下注射 0.2 mL。与仅使用不完全佐剂相比，这种方法在关节炎的发病率、严重性和一致性（实验批间）都会大大提高。

注：单独使用高剂量（0.8mg/只）的 MDP 也能诱发关节炎。因此，建议依据不同品系，优化使用 MDP 剂量。不要在 DA 大鼠使用这种方法。

关节炎的发生

于小鼠相比（约 4 周），关节炎在大鼠中产生的更快，初次免疫后，2-3 周出现关节肿胀。在 BB 大鼠发生关节炎的时间比其它品系更快，约 12-14 天。如果免疫有效，3 周后 100% 发生关节炎。

临床评分

关节炎可通过临床评分来定性评估或用测厚仪来测量爪子厚度来评估。这些方法适用于所有的关节炎模型比如经典的 CIA，佐剂诱导的关节炎和棉线诱导的关节炎。

表 2 关节炎炎症程度的临床评分

得分	发病情况
0	正常
1	轻度的、踝关节、腕关节发红、肿胀
2	踝关节或腕关节中度发红肿胀
3	爪子严重发红、肿胀，包括指端
4	四肢最大程度发炎，包括多关节。

地址：北京市朝阳区小营路 10 号阳明广场南楼 9B1（邮编：100101）

电话：18611095289 或 13910004809

QQ：1985563437

免费电话及企业 QQ：4006508846

Email: bioleadtech@163.com biolead@126.com

网址：www.biolead.com.cn