

• 综 述 •

类风湿关节炎的中医实验动物模型及评价

薛 盟 举

西安外事学院医学院, 陕西省西安市丈八北路 408 号, 710077)

* 通讯作者: xuemengju@sogou.com, 15902900386

[摘 要] 动物模型的研究是中医科研的重要组成部分, 是中医现代化、中医继承与发展的基石。就近年来应用于中医药治疗类风湿关节炎(RA)实验研究的一些比较成熟的动物模型做综述和评价。

[关键词] 类风湿关节炎; 动物模型; 中医药; 评价; 综述

类风湿关节炎(RA)是一种以关节滑膜慢性炎症病变为主要特征的自身免疫性病变。近年来, 一些比较成熟的在临床表现、病理学和免疫机制等方面与人 RA 有许多相似特征动物模型的相继建立, 为中医药治疗 RA 的实验室研究创造了条件。总体上可分为单纯疾病动物模型和病证结合的动物模型。

1 单纯疾病动物模型

在 RA 动物模型中, 目前以佐剂性关节炎(AA)和Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)在临床表现、实验室指标和病理机制等方面与人 RA 有着相似或相近的特点, 目前已被广泛应用于 RA 的实验室研究。

1.1 佐剂性关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)模型

此模型是由 Freund 于 20 世纪 50 年代创立, 又称弗氏佐剂关节炎, 是免疫性关节炎动物模型的基本方法^[1]。分为完全佐剂(CFA)和不完全佐剂(IFA)。弗氏佐剂是将液体石蜡与无水羊毛脂按 2:1 或 6:4 的比例配成的混合液 1ml, 高压灭菌, 加入在 80℃ 灭活 1h 的减毒卡介苗或干燥结核菌 10mg 制成。不加卡介苗的为不完全佐剂。造模多采用大鼠足跖部皮下注射法, 一次注入 0.1ml。弗氏佐剂还可免疫多种动物, 如小鼠、兔、羊等。

AA 模型的原发病变主要表现为早期致炎部位的炎症反应, 致炎后 18h, 左足肿胀达峰值, 持续 3 天后逐渐减轻, 8 天后再度肿胀, 继发病变一般出现于致炎后的 10 天左右, 20 天左右达到高峰^[2]。表现为对侧和前足肿胀, 且进行性加重, 行动不便, 耳和尾部出现关节炎小结, 变应性角膜炎及体重下降, 这些表现接近人 RA^[3]。致敏对侧继发性自身免疫性肿胀, 提示 AA 大鼠与 RA 患者在关节肿胀方面

具有相似性。用 MRI 检测 AA 大鼠关节局部病理改变, 发现继发性对侧足爪在致炎后 10~18 天出现以滑膜炎、滑膜纤维素沉着、关节囊肿胀为特征的关节周围炎症; 第 18~30 天, 表现为持续性软组织炎症, 伴有骨质溶解性骨膜炎、骨膜新骨形成、单核细胞浸润、血管翳形成, 关节完全粘连^[4]。

AA 的发病原理主要是分子模拟理论^[5]。结核杆菌的一个蛋白分子与关节滑膜上的一个糖蛋白分子结构相似, 可以被同一株 T 细胞克隆所识别, 从而诱发针对关节的免疫反应。此外, 结核杆菌激发 65KD 的热休克蛋白(HSP65)与 AA 的发病关系密切, 用转入 HSP65 的病毒疫苗注入 CFA 免疫后 7 天的小鼠体内, 可以抑制 AA 的发生^[1], 说明 HSP65 对疾病的发生具有始动作用。陈柏松等研究发现, 该模型除了 T 细胞功能紊乱外, 体内还产生了高滴度的特异性抗Ⅱ型胶原抗体, 提示细胞和体液免疫均参与了病理过程^[6]。

在对 AA 模型的改进方面, 刘红香等^[7]用改进的油包水型 CFA 进行大鼠单侧踝关节腔内注射, 引起的单发性关节炎大鼠全身状态良好, 踝关节的炎性病变局限、固定、较轻, 而关节局部痛敏明显, 持续时间长, 而且稳定。还可在 CFA 诱导的关节炎发生后, 用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)来加强免疫效果, 能大大提高造模成功率, 缩短造模时间^[8-9]。

1.2 胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型

CIA 模型是由 Trentham 于 1977 年首次报道^[10]。此后利用该模型对 RA 的病因、发病机制、药物筛选及免疫治疗等方面进行了大量研究。

CIA 的制备是首先将一定量的Ⅱ型胶原溶于 0.1 mol/L 的乙酸,使浓度为 1g/L,再与等体积的弗氏不完全佐剂或完全佐剂混合、乳化,制得Ⅱ型胶原乳剂,置于 4℃ 冰箱保存备用。免疫时,在动物背部、跖部、尾部多处进行皮内注射(0.5~2mg/只),免疫注射 20 天左右时,用少量(0.5mg/只)Ⅱ型胶原醋酸溶液腹腔内注射,作为激发注射^[10]。啮齿类动物和灵长类动物均可发生 CIA^[11]。

首次免疫注射后,因局部炎症刺激,可在皮内注射部位形成多处小的溃疡灶,一般 1 周左右可自行结痂愈合。典型的关节炎体征在初次免疫后 14~16 天出现,18~24 天(平均 21 天)病变最为严重。往往是动物的一侧后肢先出现典型的红肿现象,随之其余肢体也相继受累。一般前爪炎症发生率低,与前爪相比,后肢关节更易且更严重受累。肿胀一般持续 5~8 周,最终可导致关节的畸形^[10]。

Ⅱ型胶原是一种与免疫系统隔绝的蛋白,大量存在于关节软骨中^[10]。在某些病理条件下,可作为一种自身抗原呈现出来^[12]。Trentham 首次发现了 50% 的类风湿性关节炎患者血清中存在有抗Ⅱ型胶原的自身抗体^[10]。Foidact 等^[13]报道,多发性关节炎患者体内具有抗天然Ⅱ型胶原的抗体。这些现象提示,Ⅱ型胶原可诱导体内产生关节炎性质的自身免疫反应。根据这些论述,Trentham 和 Courteney^[10,14]分别用Ⅱ型胶原免疫大鼠和小鼠,从而相继成功地建立了 CIA 模型。

该模型的发生机制目前尚无定论,但可以肯定,免疫系统对Ⅱ型胶原的高度敏感性是该模型建立的主要原因^[10]。CIA 的产生和发展都依赖于自身 T 细胞和 B 细胞的激活。去除 T 细胞或去除 B 细胞,动物都不能用Ⅱ型胶原免疫诱发关节炎病变^[15]。

CIA 的病理改变表现为关节滑膜的 T 细胞、B 细胞的增生、浸润。CD4⁺ T 细胞是 CIA 的主要调节因素,而抗Ⅱ型胶原自身抗体、炎性细胞因子等体液免疫因素也在其病理过程中起到重要作用^[16]。用Ⅱ型胶原免疫注射动物一段时间后,肉眼可见单个或多个关节红、肿,动物行动不便。光镜下,早期滑膜组织中中性粒细胞、单核细胞,尤其是淋巴细胞浸润,关节腔内可见炎细胞,继之滑膜细胞增生,排列疏散、紊乱,滑膜细胞下纤维素大量渗出,胶原纤维沉着,甚至出现纤维素样坏死,或出现滑膜组织贴附软骨生长现象;滑膜脂肪垫组织水肿,炎细胞浸润,腱炎和骨髓炎也经常可见。电镜下可见滑膜细

胞中线粒体减少,溶酶体增多,细胞间隙增大^[10,17]。在对 CIA 小鼠相关免疫指标的检测中发现,CIA 小鼠的 T、B 淋巴细胞增殖明显,白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 2(IL-2)水平显著上升,局部足爪的 PGE 水平也大副升高,显示 CIA 模型是一种免疫性炎症^[18]。

1.3 CIA 与 AA 的比较

AA 与 CIA 虽然有许多相似之处,是研究 RA 较理想的模型,目前都被广泛应用于 RA 的实验研究,但多数学者认为,CIA 则更接近 RA 是更为理想的模型。

林红等^[19]把 CIA 与 AA 大鼠模型在大体外观和足部组织病理学切片等方面进行观察比较,结果 CIA 大鼠滑膜增生及软骨破坏等继发性病变特征更为明显,关节炎持续时间也较长,更接近于人的类风湿性关节炎。AA 大鼠足部的病理切片中主要表现为大量炎性细胞浸润,而滑膜增生和软骨破坏则不如 CIA 大鼠明显,AA 缺乏慢性病理过程,病变具有一定自限性。结论 CIA 大鼠模型与 AA 相比是研究 RA 较为理想的动物模型。

力弘等^[20]认为,CIA 模型与 RA 有很多相似之处:症状类似 RA 的临床表现;病理学改变也从滑膜炎渐进到血管翳的形成,开始都是边缘损害,最终关节软骨破坏;都有针对Ⅱ型胶原的自身免疫,并受主要组织相容性复合体及相关基因控制;都有休克蛋白的变性;模型建立不限于大鼠;可仅与弗氏佐剂配合,完全由机体成分诱发 CIA;评估药物对各项免疫指标影响时,不像 AA 受细菌或其组分干扰。

汤文璐等^[15]也认为,CIA 与 AA 有许多相似之处,但 CIA 的免疫功能变化兼有体液免疫和细胞免疫,动物体内存在针对自身Ⅱ型胶原的高滴度 IgG 抗体,这些特性更接近于人的类风湿性关节炎,因此,CIA 是筛选和研究治疗 RA 药物的理想模型。

2 病证结合的动物模型

为了使动物模型更能体现中医学“证”的特色,近年来许多学者在单纯疾病动物模型的基础上,把西医的病和中医的证相结合,成功地创建了病证结合的 RA 动物模型。

2.1 风、寒、湿痹证模型

此型动物模型研究较为广泛。如金祝秋等^[21]将雄性实验大鼠置于 5~7℃,深 2cm 的冷水中,使其站立其中 20min,同时伴以 4 级风力。每日 1 次,连续 14 天。在造模的第 1 天,于大鼠右后足跖皮内

注射完全弗氏佐剂 0.1ml 1 次。14 天后,停止风寒湿诱因。肖长虹等^[22]自制造模箱,以改装过温控系统的空调机把箱内温度控制在 7~10℃,超声雾化器控制湿度(相对湿度为 100%),以鼓风机提供 18m/s 风速,并将实验大鼠置于 4 次/min 转盘上以保证各鼠接受风力湿度的均一,并在此基础上予以 CIA 造模。

2.2 风湿热痹证模型

风湿热痹证模型同上述风寒湿痹证动物模型,只是将风寒湿刺激改为风湿热刺激。如上述肖长虹等^[22]将自制造模箱内温度控制在 36~38℃,其他条件不变。造成大鼠风湿热痹证模型。

2.3 肾虚痹证模型

肾虚痹证模型是根据肾虚与性激素之间的关系,即男性雌激素升高而雄激素下降及女性雌激素减少、卵巢功能低下皆为肾虚的表现建立起来的^[23]。造模方法:雌鼠,以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,碘酊、酒精消毒,背部切口,摘除双侧卵巢,术后经青霉素预防感染。3 天后,再按照 CIA 造模方法进行造模。雄鼠于 II 型胶原免疫注射后第 2 天起每日灌胃 1 次,给乙烯雌酚 0.5ml(10mg/ml)。结果与单纯 CIA 对照,发现卵巢切除所致肾虚状态的 CIA 发病率及严重程度均较单纯 CIA 高而且重,说明雌激素水平低下在雌鼠 CIA 中起到了肾虚所应有的促进、加重病理过程的作用^[23]。

2.4 对病证结合动物模型的讨论

从上述病证结合的动物模型可以看出,此类模型只是简单地将中医证的动物模型与西医病的动物模型相叠加。目前各种中医证的动物模型已相继建立,如用上述方法,还可以建立血瘀、脾虚、气虚等病证结合的 RA 动物模型。但此类模型存在的问题是:证是外邪与人的体质相结合的产物,同一邪气作用于不同体质的人,可能产生截然相反的证。比如风、寒、湿痹模型,施加风寒湿因素是否都能产生风寒湿证?这一点值得怀疑。另外,人为施加的干预可能使原有的疾病动物模型发生改变,使动物模型的稳定性及可靠性受到影响。宜在今后的造模研究中重视与改进。

3 存在的问题及展望

上述 RA 动物模型,虽与人 RA 在临床表现、病理、免疫学等方面有着相似或相近的特点,但其都是在一定条件下建立的,不能完全反映 RA 的所有特点。RA 是由遗传、感染、环境、免疫等多种复杂因

素共同作用而致,而 RA 动物模型只是侧重于某一个或某几个因素而建立起来的。所以还应在对 RA 病因病机深入研究的基础上,进一步探寻一种更能全面反映 RA 特点的动物模型。

对 RA,中医按痹证进行辨治,往往视其病程长短、体质强弱、局部症状以及舌象、脉象等将其分证治疗,处方用药也因证而异。作为中医药治疗 RA 研究的实验动物模型,应当体现中医证的特点。但是目前应用最为广泛的 AA、CIA 模型,本身并未考虑中医的证,故病证结合动物模型更应受到广泛重视及深入研究。

参考文献

- [1]李仪奎. 中药药理实验方法学[J]. 上海:上海科学技术出版社,1991:32.
- [2]Easser RE, Hildebrand AR, Angelo RA, et al. Measurement of radiographic changes in adjuvant-induced arthritis in rats by quantitative image analysis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1):129-138.
- [3]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):2060-2073.
- [4]Philippe L, Cegout-Pottier P, Guingamp C, et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats [J]. Am J Physiol, 1997, 273(4 Pt 2):1550-1556.
- [5]黄乃艳. 类风湿性关节炎的动物模型[J]. 激光生物学报, 2000, 9(2):142.
- [6]陈柏松, 徐玉东, 钟淑琦, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评价[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(6):489.
- [7]刘红香, 许伟, 罗非, 等. 改进的大鼠单发佐剂性关节炎模型的建立和实验观察[J]. 中国疼痛医学杂志, 1996, 2(4):223.
- [8]Wernhoff P, Olofsson P, Holmdahl R. The genetic control of rheumatoid factor production in a rat model of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12):3584-3596.
- [9]陈柏松, 徐玉东, 钟淑琦, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评价[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(6):489-491.
- [10]Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis [J]. J Exp Med, 1977, 146(3):857-868.
- [11]Staines NA, Wooley PH. Collagen arthritis—what can it teach us? [J]. Br J Rheum, 1994, 33(9):798-807.
- [12]Moder KG, Nabozny GH, Luthra HS, et al. Immunoge-

- netics of collagen induced arthritis in mice; a model for human polyarthritis[J]. Reg Immunol, 1992, 4(5): 305-313.
- [13] Foidart JM, Abe S, Martin GR, et al. Antibodies to type II collagen in relapsing polychondritis[J]. N Engl J Med, 1978, 299(22): 1203-1207.
- [14] Courteney JS, Dallman MJ, Dayan AD, et al. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice[J]. Nature, 1980, 283(5748): 666-667.
- [15] 汤文璐, 李俊, 徐叔云. II 型胶原性关节炎动物模型的研究概况[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(6): 495-498.
- [16] 周强, 吕厚山, 栗占国. 胶原诱导的关节炎动物模型研究现状及进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(4): 228.
- [17] Stains NA, Hardingham T, Smith M, et al. Collagen-induced arthritis in the rat: modification of immune and arthritic responses by free collagen and immune anti-collagen antiserum[J]. Immunology, 1981, 44(4): 737-744.
- [18] 严尚学, 陈凤芹, 黄德武, 等. 小鼠胶原性关节炎模型的制备及评价[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(3): 149-151.
- [19] 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.
- [20] 力弘, 贾永锋, 潘雁, 等. II 型胶原蛋白诱导的类风湿性关节炎的动物模型[J]. 上海医科大学学报, 1997, 24(3): 231-233.
- [21] 金祝秋, 郭建生, 彭芝配, 等. 大鼠风寒湿痹证模型的建立与前列腺素 E2 的关系[J]. 湖南中医学院学报, 1996, 16(1): 40.
- [22] 肖长虹, 顾为望, 李留洋, 等. 类风湿性关节炎风寒湿痹与风湿热痹动物模型的研究[J]. 中医杂志, 1996, 37(6): 361.
- [23] 艾景录, 吕爱平, 徐世杰, 等. 性腺功能异常型肾虚痹证发生机理的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1(1): 42.

(收稿日期: 2011-01-24; 修回日期: 2011-07-21)

[编辑: 李 巍]

欢迎邮购《中国现代名中医医案精粹》

《中国现代名中医医案精粹》(1-6 集), 由董建华、王永炎两位院士牵头, 组织全国第一批、第二批、第三批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师编写, 共收录 434 位名老中医的 5172 例医案。这些医案是现代中医名家灵活运用中医理法方药治病活人的真实记录。通过阅读这些医案, 读者如同在名老中医的带领下一步一步走近患者, 进行思考分析, 对于广大的中医医生临床诊治、深入研究及成长发展具有重要的指导作用。医案中的按语或为名医本人所撰, 或由后人、门徒所加; 编者评注由丛书主编、副主编所撰。第 1、2 集主要收录 146 位名老中医的 1850 例医案, 第 3、4 集主要收录 142 位名老中医的 1884 例医案, 第 5、6 集主要收录 146 位名老中医的 1438 例医案。本丛书特点: ①所选名中医在全国有广泛的影响, 极具权威性。②各集内对名中医均按行政区划和军队分类编排。③每则医案均由名老中医亲自选定, 真实、可靠。其中一部分名老中医已逝世, 因此所收医案尤为珍贵。④每集正文后均有该集的病名病证索引, 第 6 集书末附有丛书的总病名病证索引, 方便读者查阅。

《中国现代名中医医案精粹》(1-6 集) 为精装 16 开本, 已由人民卫生出版社于 2010 年 12 月出版。第 1 集 694 页, 定价 95 元; 第 2 集 669 页, 定价 92 元; 第 3 集 720 页, 定价 96 元; 第 4 集 820 页, 定价 108 元; 第 5 集 619 页, 定价 85 元; 第 6 集 558 页, 定价 75 元。单购一集每本加邮挂号费 5 元, 全套购买免邮费。款到寄书。汇款地址: 北京市东直门南小街 16 号中医杂志北京医海林音像书店; 邮政编码: 100700; 联系电话: (010) 64013162, (010) 64014411-3053。

全国第七届“中西医结合治疗肝病高级专修班”通知

由中华中医药学会继续教育部、中医杂志社、北京东方中医药培训中心主办, 河北中医肝病医院协办的“全国第七届中西医结合治疗肝病高级专修班”定于 2012 年 9 月 14-17 日在河北中医肝病医院举办。本期高级专修班的办学宗旨是: 浓缩中西医结合治疗肝病理论与实践精华, 突出临床实用经验, 使学员开阔视野, 在短期内获得该领域内名老中医诊治经验以及最新的肝病研究治疗动态。本期专修班将邀请国内知名肝病专家教授重点传授自己在临床工作中的治疗经验及行之有效的中医传统方、验方, 并将介绍治疗肝病中药研究进展方向等。凡参加本期专修班学习者可获得国家级教育学分(I 类学分 12 分)。现将有关事宜通知如下:

一、日期安排: 9 月 14 日(星期五)全天报到; 9 月 15-16 日专家讲座及交流; 9 月 17 日返程。二、培训地点: 河北省石家庄市河北中医肝病医院。三、交通路线: 1. 石家庄火车站售票厅外停车场有河北中医肝病医院班车(每天 10 趟)免费接送, 接站电话: 0311-88786114。2. 石家庄火车站乘 31 路公共汽车至正定汽车站换 4 路公交车到河北中医肝病医院下车; 或石家庄博物馆乘 130 路公共汽车到河北中医肝病医院站下车。3. 石家庄京石高速公路正定出口处下车至河北中医肝病医院。4. 乘飞机者从石家庄机场乘民航班车或出租汽车到河北中医肝病医院(该院位于机场与石家庄市中心之间的京石高速公路正定出口处)。四、收费标准: 980 元(包括学费、资料费、国家级医学继续教育学分证书费、工作餐费等), 旅游费及住宿费自理。金星假日大酒店(四星级)140 元/人。五、咨询电话: 0311-88788272, 88787701, 13091000293, E-mail: zygbyy@126.com 六、联系人: 刘素敏、张涵