



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110476890 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201910723857.9

(22)申请日 2019.08.07

(71)申请人 南通大学

地址 226019 江苏省南通市崇川区啬园路9号

(72)发明人 马颂华 陈罡 王小琴 刘燕

(74)专利代理机构 北京科家知识产权代理事务所(普通合伙) 11427

代理人 徐思波

(51)Int.Cl.

A01K 67/027(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

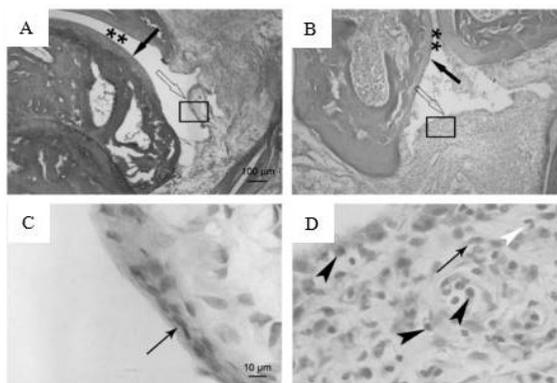
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法、应用及评价方法

(57)摘要

本发明提供一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,选取6-8周、雄性、DBA/1小鼠;将步骤(1)所选取的小鼠置于温度为20-24℃,相对湿度50%-60%,12小时明暗交替的清洁级动物房中饲养,自由摄食饮水,适应环境三天后用于制备模型;以鸡II型胶原免疫DBA/1小鼠诱导CIA模型,向小鼠尾根部皮内注射进行免疫;经三次免疫,本发明对关节炎的病理过程机制的研究和药物开发等具有重要意义;同时,本发明的评价胶原诱导性关节炎动物模型的方法,通过关节炎临床指数评分、踝关节病理学检查、血清中抗CII-IgG抗体水平等指标验证模型是否成功,对胶原诱导性关节炎动物模型进行全面评价。



1. 一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:
选取6-8周、雄性、DBA/1小鼠;
将步骤(1)所选取的小鼠置于温度为20-24℃,相对湿度50%-60%,12小时明暗交替的清洁级动物房中饲养,自由摄食饮水,适应环境三天后用于制备模型;
称取鸡Ⅱ型胶原100μg,溶于50μl的0.1 mol/L冰醋酸中,4℃过夜;制备得到胶原溶液A;
制备胶原乳剂B:将胶原溶液与CFA等体积混合,冰上利用玻璃研磨器充分研磨1小时,制成胶原乳剂B溶液;
制备胶原乳剂C:将胶原溶液A与IFA等体积混合,冰上利用玻璃研磨器充分研磨1小时,制成胶原乳剂C;
将小鼠利用固定器固定,暴露尾巴;
向小鼠尾根部皮内注射进行免疫:
(7-1)第一次免疫:小鼠尾根部皮内多点注射胶原乳剂B溶液100μl;具体包括以下步骤:
(7-1-1)先将尾根部位的毛刮干净,尾根部位局部常规消毒,左手拇指和食指按住小鼠尾根部皮肤使之绷紧,在两指之间,用微量注射器连接4.5注射针头穿刺,针头进入小鼠尾根部皮肤浅层,再向上挑起刺入,将药液注入皮内;
(7-1-2)注射后小鼠尾根部皮肤出现一白色小皮丘,选择4-5个点注射,胶原乳剂B溶液总剂量为100μl;
(7-2)第二次免疫:第一次免疫后的第21天,小鼠腹腔注射胶原乳剂C溶液 100μl作为继发免疫溶液;具体包括以下步骤:
(7-2-1)抓取小鼠,使其腹部朝上头部略向下垂;
(7-2-2)抓紧小鼠背部皮肤使腹部皮肤紧绷,于两大腿根连线与腹中线交叉点一侧约1 cm位置刺入皮下;
(7-2-3)在皮下平行腹中线推进针头3-5 mm,再以45°角向腹腔内刺入;
(7-2-4)针尖通过腹肌后,抵抗力消失,回抽时无回流物,推入药物;胶原乳剂C溶液总剂量为100μl;
(7-3)第三次免疫:第一次免疫后的第28天,在小鼠腹腔注射20μl脂多糖,所述脂多糖浓度为1 mg/ml,制成胶原诱导性关节炎动物模型。
2. 根据权利要求1所述的一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,其特征在于,所述冰醋酸的制备方法,包括以下步骤:将5μg纯冰醋酸溶于870 μl双蒸水中,混匀制成0.1 mol/L冰醋酸。
3. 根据权利要求1所述的一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,其特征在于,所述脂多糖的制备方法,包括以下步骤:10 mg脂多糖粉末溶于1 ml双蒸水,混匀制成1 mg/ml脂多糖溶液,使用时采用PBS稀释。
4. 一种根据权利要求1所述的胶原诱导性关节炎动物模型的应用,其特征在于,将所述胶原诱导性关节炎动物模型用于鸡Ⅱ型胶原参与关节炎的病理过程机制的研究和药物开发。
5. 一种评价根据权利要求1所述的方法制备的胶原诱导性关节炎动物模型的方法,其

特征在于,包括以下步骤:

S1、临床指数评分:从第21天开始,每隔两天对制备的胶原诱导性关节炎动物模型的小鼠四个足爪进行评分,共进行了19次评分,评分标准如下:0分:无红肿;1分:轻度的红和肿;2:显著的皮肤发红和关节肿胀;3分:关节僵硬,肢体活动受限;四只足爪均被评分,小鼠最高评分为12分,最低评分为0分;实验为双盲设计;当评分高于8分时,表明模型可能建立成功;

S2、病理学切片观察:对第一次免疫后第37天的小鼠踝关节冰冻切片建立模型组,并将同龄健康小鼠踝关节冰冻作为对照组,对模型组和对照组进行HE染色,将完成染色的切片置于显微镜下进行观察拍片,比较模型组与对照组情况;若模型组小鼠的鼠踝关节中滑膜组织出现明显增生、关节腔有大量炎症细胞浸润、关节面软骨有破坏,表明模型可能建立成功;

S3、ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平:抽取第一次免疫后第37天的小鼠血清建立模型组,并将同龄健康小鼠血清作为对照组,ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平,若模型组血清中抗C II-IgG抗体水平高于对照组血清中抗C II-IgG抗体水平3倍,表明模型可能建立成功;

S4、至少满足以上S1或S2步骤中的要求,即可表明模型建立成功。

6. 根据权利要求5所述的一种胶原诱导性关节炎动物模型的评价方法,其特征在于,所述步骤S4为满足步骤S1、S2和S3的要求时,模型建立成功。

一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法、应用及评价方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法、应用及评价方法。

背景技术

[0002] 类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis,RA)是由免疫活性细胞和多种细胞因子介导的慢性全身性自身免疫性疾病。本病在我国人口的患病率为0.34%-0.36%,女性发病率比男性高三倍以上,是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要原因之一。RA的临床表现为多发性对称性关节病变、关节疼痛、肿胀、僵直和运动障碍。基本病理变化是滑膜炎和进行性关节破坏。免疫系统的紊乱和失衡是引起类风湿性关节炎发生和发展的主要原因。T、B淋巴细胞及其分泌的细胞因子在RA的发病以及疾病进展中发挥着重要作用。对于RA的临床治疗,目前主要应用非甾体类抗炎药、改善病情抗风湿药、糖皮质激素和生物制剂来控制病情,但不能有效阻止该疾病的发展。我们仍然需要进一步探索该类疾病的发病机制并且为患者提供新的治疗药物;因此,构建类风湿性关节炎模型,在研究类风湿性关节炎的治疗上具有重要作用,对关节炎的病理过程机制的研究和药物开发等具有重要意义。

发明内容

[0003] 本发明是提供一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,以解决背景技术中所提出的问题。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明的实施例提供一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

- (1) 选取6-8周、雄性、DBA/1小鼠;
- (2) 将步骤(1)所选取的小鼠置于温度为20-24℃,相对湿度50%-60%,12小时明暗交替的清洁级动物房中饲养,自由摄食饮水,适应环境三天后用于制备模型;
- (3) 称取鸡II型胶原 100 μg,溶于50μl的0.1 mol/L冰醋酸中,4℃过夜;制备得到胶原溶液A;
- (4) 制备胶原乳剂B:将胶原溶液与CFA等体积混合,冰上利用玻璃研磨器充分研磨1小时,制成胶原乳剂B溶液;
- (5) 制备胶原乳剂C:将胶原溶液A与IFA等体积混合,冰上利用玻璃研磨器充分研磨1小时,制成胶原乳剂C;
- (6) 将小鼠利用固定器固定,暴露尾巴;
- (7) 向小鼠尾根部皮内注射进行免疫:
 - (7-1) 第一次免疫:小鼠尾根部皮内多点注射胶原乳剂B溶液100μl;具体包括以下步骤:
 - (7-1-1) 先将尾根部位的毛刮干净,尾根部位局部常规消毒,左手拇指和食指按住小鼠

尾根部皮肤使之绷紧,在两指之间,用微量注射器连接4.5注射针头穿刺,针头进入小鼠尾根部皮肤浅层,再向上挑起刺入,将药液注入皮内;

(7-1-2)注射后小鼠尾根部皮肤出现一白色小皮丘,选择4-5个点注射,胶原乳剂B溶液总剂量为100 μ l;

(7-2)第二次免疫:第一次免疫后的第21天,小鼠腹腔注射胶原乳剂C溶液 100 μ l作为继发免疫溶液;具体包括以下步骤;

(7-2-1)抓取小鼠,使其腹部朝上头部略向下垂;

(7-2-2)抓紧小鼠背部皮肤使腹部皮肤紧绷,于两大腿根连线与腹中线交叉点一侧约1 cm位置刺入皮下;

(7-2-3)在皮下平行腹中线推进针头3-5 mm,再以45°角向腹腔内刺入;

(7-2-4)针尖通过腹肌后,抵抗力消失,回抽时无回流物,推入药物;胶原乳剂C溶液总剂量为100 μ l;

(7-3)第三次免疫:第一次免疫后的第28天,在小鼠腹腔注射20 μ l脂多糖,所述脂多糖浓度为1 mg/ml,制成胶原诱导性关节炎动物模型。

[0005] 进一步的,所述冰醋酸的制备方法,包括以下步骤:将5 μ g纯冰醋酸溶于870 μ l双蒸水中,混匀制成0.1 mol/L冰醋酸。

[0006] 进一步的,所述脂多糖的制备方法,包括以下步骤:10 mg脂多糖粉末溶于1 ml双蒸水,混匀制成1 mg/ml脂多糖溶液,使用时采用PBS稀释。

[0007] 一种胶原诱导性关节炎动物模型的应用,其特征在于,将所述胶原诱导性关节炎动物模型用于鸡II型胶原参与关节炎的病理过程机制的研究和药物开发。

[0008] 一种评价胶原诱导性关节炎动物模型的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、临床指数评分:从第21天开始,每隔两天对制备的胶原诱导性关节炎动物模型的小鼠四个足爪进行评分,共进行了19次评分,评分标准如下:0分:无红肿;1分:轻度的红和肿;2:显著的皮肤发红和关节肿胀;3分:关节僵硬,肢体活动受限;四只足爪均被评分,小鼠最高评分为12分,最低评分为0分;实验为双盲设计;当评分高于8分时,表明模型可能建立成功;

S2、病理学切片观察:对第一次免疫后第37天的小鼠踝关节冰冻切片建立模型组,并将同龄健康小鼠踝关节冰冻作为对照组,对模型组和对照组进行HE染色,将完成染色的切片置于显微镜下进行观察拍片,比较模型组与对照组情况;若模型组小鼠的鼠踝关节中滑膜组织出现明显增生、关节腔有大量炎症细胞浸润、关节面软骨有破坏,表明模型可能建立成功;

S3、ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平:抽取第一次免疫后第37天的小鼠血清建立模型组,并将同龄健康小鼠血清作为对照组,ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平,若模型组血清中抗C II-IgG抗体水平高于对照组血清中抗C II-IgG抗体水平3倍,表明模型可能建立成功;

S4、至少满足以上S1步骤或S2步骤中的要求,即可表明模型建立成功。

[0009] 进一步的,所述步骤S4为满足步骤S1、S2和S3的要求时,模型建立成功。

[0010] 本发明的上述技术方案的有益效果如下:本发明的胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法,以鸡II型胶原免疫DBA/1小鼠诱导CIA模型,对关节炎的病理过程机制的研究和

药物开发等具有重要意义；同时，本发明的评价胶原诱导性关节炎动物模型的方法，通过关节炎临床指数评分、踝关节病理学检查、血清中抗CII-IgG抗体水平等指标验证模型是否成功，对胶原诱导性关节炎动物模型进行全面评价。

附图说明

[0011] 图1为本发明的小鼠固定器固定小鼠及小鼠注射的示意图；

图2为本发明中临床指数评分的结果图；

图3为本发明中对照组和模型组小鼠踝关节HE染色比较图；

其中，图3A为对照组小鼠踝关节HE染色图；图3B为模型组小鼠踝关节HE染色图；图3C为图3A中局部的放大图，图3D为图3B中局部放大图；

图4为本发明中ELISA法检测对照组和模型组小鼠血清中抗C II-IgG抗体相对水平比较图。

具体实施方式

[0012] 为使本发明要解决的技术问题、技术方案和优点更加清楚，下面将结合具体实施例进行详细描述。

[0013] 一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法，具体包括以下步骤：

(1) 选取6-8周、雄性、DBA/1小鼠。

[0014] (2) 将步骤(1)所选取的小鼠置于温度为20-24℃，相对湿度50%-60%，12小时明暗交替的清洁级动物房中饲养，自由摄食饮水，适应环境三天后用于制备模型。

[0015] (3) 称取鸡II型胶原 100 μg，溶于50μl的0.1 mol/L冰醋酸中，4℃过夜；制备得到胶原溶液A。其中，所述冰醋酸的制备方法，包括以下步骤：将5μg纯冰醋酸溶于870 μl双蒸水中，混匀制成0.1 mol/L冰醋酸。

[0016] (4) 制备胶原乳剂B：将胶原溶液与CFA等体积混合，冰上利用玻璃研磨器充分研磨1小时，制成胶原乳剂B溶液。

[0017] (5) 制备胶原乳剂C：将胶原溶液A与IFA等体积混合，冰上利用玻璃研磨器充分研磨1小时，制成胶原乳剂C。

[0018] (6) 将小鼠利用固定器固定，暴露尾巴。

[0019] (7) 向小鼠尾根部皮内注射进行免疫。

[0020] (7-1) 第一次免疫：小鼠尾根部皮内多点注射胶原乳剂B溶液100μl；具体包括以下步骤：

(7-1-1) 先将尾根部位的毛刮干净，尾根部位局部常规消毒，左手拇指和食指按住小鼠尾根部皮肤使之绷紧，在两指之间，用微量注射器连接4.5注射针头穿刺，针头进入小鼠尾根部皮肤浅层，再向上挑起刺入，将药液注入皮内。

[0021] (7-1-2) 注射后小鼠尾根部皮肤出现一白色小皮丘，选择4-5个点注射，胶原乳剂B溶液总剂量为100μl。

[0022] (7-2) 第二次免疫：第一次免疫后的第21天，小鼠腹腔注射胶原乳剂C溶液 100μl作为继发免疫溶液；具体包括以下步骤：

(7-2-1) 抓取小鼠，使其腹部朝上头部略向下垂。

[0023] (7-2-2) 抓紧小鼠背部皮肤使腹部皮肤紧绷,于两大腿根连线与腹中线交叉点一侧约1 cm位置刺入皮下。

[0024] (7-2-3) 在皮下平行腹中线推进针头3-5 mm,再以45°角向腹腔内刺入。

[0025] (7-2-4) 针尖通过腹肌后,抵抗力消失,回抽时无回流物,推入药物;胶原乳剂C溶液总剂量为100 μ l。

[0026] (7-3) 第三次免疫:第一次免疫后的第28天,在小鼠腹腔注射20 μ l脂多糖,所述脂多糖浓度为1 mg/ml,制成胶原诱导性关节炎动物模型。其中,所述脂多糖的制备方法,包括以下步骤:10 mg脂多糖粉末溶于1 ml双蒸水,混匀制成1 mg/ml脂多糖溶液,使用时采用PBS稀释。

[0027] 在本发明中,所需试剂的来源如下表1所示。

[0028] 表1 本发明中所需试剂的来源表

试剂名称	试剂来源
鸡 II 型胶原 (chick collagen type II, C II)	Sigma 公司
弗氏完全佐剂 (complete Freund' s adjuvant, CFA)	Chondrex 公司
弗氏不完全佐剂 (incomplete Freund' s adjuvant, IFA)	Sigma 公司
脂多糖	Sigma 公司

一种胶原诱导性关节炎动物模型的应用,将所述胶原诱导性关节炎动物模型用于鸡II型胶原参与关节炎的病理过程机制的研究和药物开发。

[0029] 一种评价胶原诱导性关节炎动物模型的方法,包括以下步骤:

S1、临床指数评分:从第21天开始,每隔两天对制备的胶原诱导性关节炎动物模型的小鼠四个足爪进行评分,共进行了19次评分,评分标准如下:0分:无红肿;1分:轻度的红和肿;2:显著的皮肤发红和关节肿胀;3分:关节僵硬,肢体活动受限;四只足爪均被评分,小鼠最高评分为12分,最低评分为0分;实验为双盲设计;当评分高于8分时,表明模型可能建立成功。

[0030] S2、病理学切片观察:对第一次免疫后第37天的小鼠踝关节冰冻切片建立模型组,并将同龄健康小鼠踝关节冰冻作为对照组,对模型组和对照组进行HE染色,将完成染色的切片置于显微镜下进行观察拍片,比较模型组与对照组情况;若模型组小鼠的鼠踝关节中滑膜组织出现明显增生、关节腔有大量炎症细胞浸润、关节面软骨有破坏,表明模型可能建立成功。

[0031] 其中,病理学切片观察具体包括以下步骤:

S2-1、灌注:以复合麻醉剂对第一次免疫后第37天的小鼠进行腹腔麻醉,经左心室向升主动脉快速灌注0.9%生理盐水100 ml,之后灌注含4%甲醛的磷酸缓冲液,先快后慢,待小鼠抽搐停止后,控制滴速,按照1滴/s,持续20 min;将小鼠踝关节剥离皮肤后,取出置于4%的多聚甲醛溶液中24小时;再将其移入10% EDTA 37℃脱钙15天,后移入含20%和30%蔗糖的磷酸盐缓冲液中进行梯度脱水。

[0032] S2-2、切片:将小鼠踝关节置于冻台上冰冻固定,在冰冻切片机-20℃下行矢状位切片;踝关节片厚15 μ m,将切片直接贴于明胶处理过的载玻片上,晾干。

[0033] S2-3、HE染色:切片水洗1-2s,苏木素30s,水洗5-10s,1%盐酸乙醇分化液1-3s,流

水冲洗5-10min,伊红10s,水洗1-2s,80%乙醇1-2s,95%乙醇1-2s,无水乙醇1-2s,二甲苯2-3s,中性树胶封片、将完成染色的切片置于显微镜下进行观察拍片。

[0034] HE染色结果如图3所示,其中,图3A为对照组小鼠踝关节HE染色图,图3A中空心箭头所指为对照组小鼠踝关节单层滑膜组织,关节腔(双星号所指)内无炎症细胞浸润,关节面软骨(图中黑色实心箭头所指)光滑。图3B为模型组小鼠踝关节HE染色图,模型组(d37)小鼠踝关节中滑膜组织明显增生(图中空心箭头所指),且关节腔有大量炎症细胞浸润,关节面软骨有一定程度的破坏。

[0035] 图3C为图3A中方框部分的放大图,图3D为图3B中方框部分的放大图;图3C中可看出,对照组显示成纤维细胞样的正常滑膜细胞(图中黑色实心箭头所指)。图3D中可看出,模型组小鼠显示存在大量炎症细胞(图中黑色楔形箭头所指)。

[0036] S3、ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平:抽取第一次免疫后第37天的小鼠血清建立模型组,并将同龄健康小鼠血清作为对照组,ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平,若模型组血清中抗C II-IgG抗体水平高于对照组血清中抗C II-IgG抗体水平3倍,表明模型可能建立成功。

[0037] 其中,ELISA法检测血清中抗C II-IgG抗体水平具体包括以下过程:称鸡II型胶原100 μg,溶于50 μl冰醋酸(0.1 mol/L)中,浓度为2 mg/ml,4 °C溶解过夜。用0.01 mol/L的PBS以1:20稀释鸡II型胶原,在96孔板的每孔加入100 μl稀释的鸡II型胶原,4 °C过夜。倒去96孔板里的鸡II型胶原,100μl PBST(PBS+Tween)洗涤3次。加入用0.01 mol/L的PBS以1:500稀释被检测的血清100μl,37 °C孵育30 min。PBST洗涤3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000),37 °C孵育1 h。洗涤96孔板,加100μl底物(TMB),静置10 min。加入100 μl终止液。酶标仪测OD值(450 nm)。每次取对照组和模型组的相对值,以对照组为参考。

[0038] 如图4所示,其中模型组中抗C II-IgG抗体水平的相对值高于对照组中抗C II-IgG抗体水平的相对值5倍。

[0039] S4、至少满足以上S1步骤或S2步骤中的要求,即可表明模型建立成功。当步骤S4满足步骤S1、S2和S3的要求时,模型建立成功成功率更高。

[0040] 以上所述是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明所述原理的前提下,还可以作出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

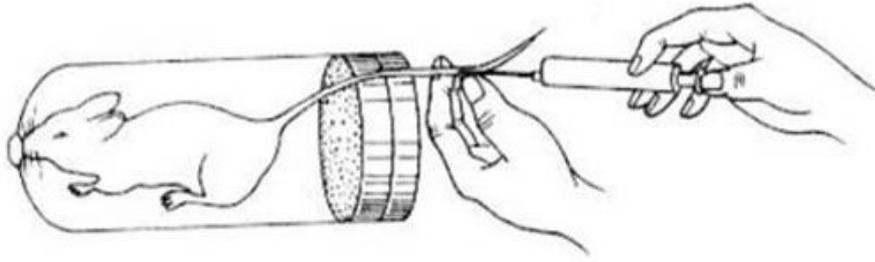


图1

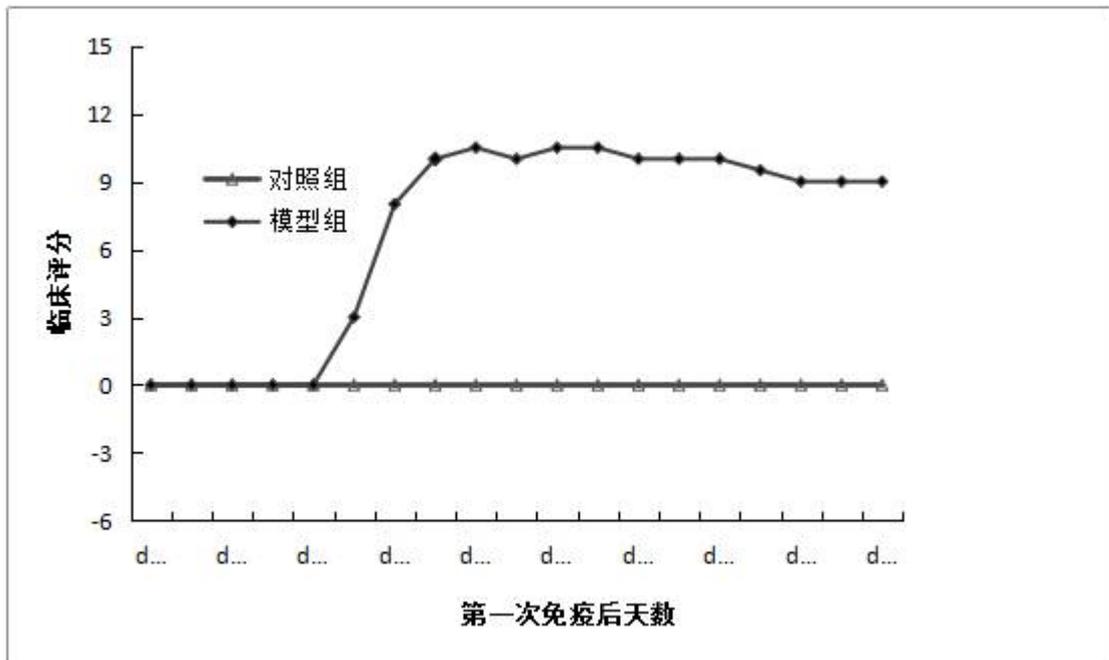


图2

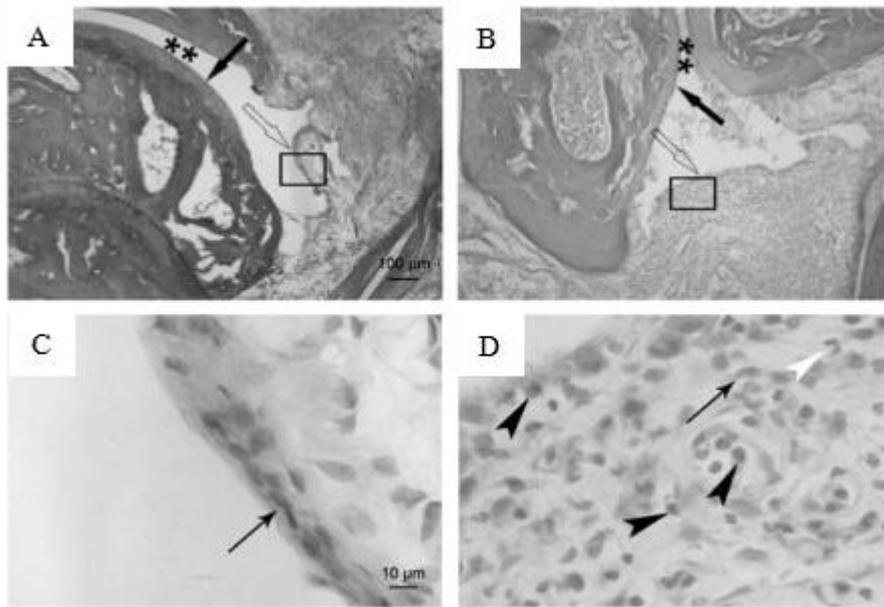


图3

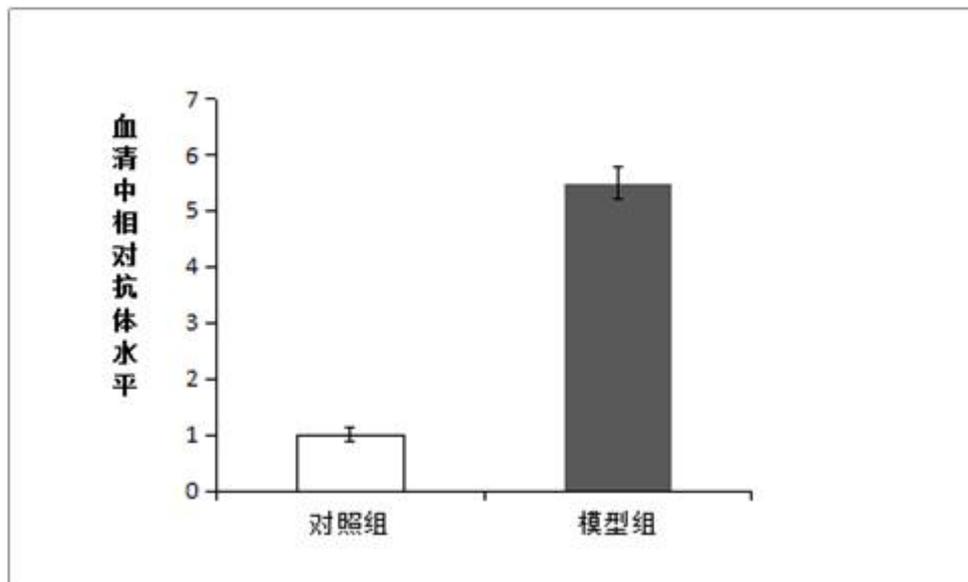


图4

专利名称(译)	一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法、应用及评价方法		
公开(公告)号	CN110476890A	公开(公告)日	2019-11-22
申请号	CN201910723857.9	申请日	2019-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学		
申请(专利权)人(译)	南通大学		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学		
[标]发明人	马颂华 陈罡 王小琴 刘燕		
发明人	马颂华 陈罡 王小琴 刘燕		
IPC分类号	A01K67/027 G01N1/30 G01N33/535 G01N33/564		
CPC分类号	A01K67/027 A01K2207/10 A01K2207/20 A01K2227/105 A01K2267/0368 G01N1/30 G01N33/535 G01N33/564		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种胶原诱导性关节炎动物模型的制备方法，选取6-8周、雄性、DBA/1小鼠；将步骤(1)所选取的小鼠置于温度为20-24℃，相对湿度50%-60%，12小时明暗交替的清洁级动物房中饲养，自由摄食饮水，适应环境三天后用于制备模型；以鸡II型胶原免疫DBA/1小鼠诱导CIA模型，向小鼠尾根部皮内注射进行免疫；经三次免疫，本发明对关节炎的病理过程机制的研究和药物开发等具有重要意义；同时，本发明的评价胶原诱导性关节炎动物模型的方法，通过关节炎临床指数评分、踝关节病理学检查、血清中抗CII-IgG抗体水平等指标验证模型是否成功，对胶原诱导性关节炎动物模型进行全面评价。

