

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20190308

· 短篇论著 ·

## 完全弗氏佐剂雌性SD大鼠类风湿关节炎模型的建立及塞来昔布对其治疗效果

孙瑞濛, 杨白雪, 宫艳畅, 郝敬强, 孙浩为, 李三鸣\*  
沈阳药科大学药学院, 本溪 117004

**[摘要]** **目的** 利用完全弗氏佐剂(CFA)建立雌性SD大鼠类风湿关节炎(RA)模型,并考察不同给药方式的塞来昔布对RA的治疗效果。**方法** 将24只雌性SD大鼠随机分成正常对照组和低、中、高剂量模型组( $n=6$ ),低、中、高剂量模型组分别用0.05、0.1、0.2 mL CFA(10 mg/mL)于大鼠右后肢足跖部注射诱导构建RA模型,筛选出合适的剂量。另取24只雌性SD大鼠分为正常对照组、模型对照组、塞来昔布口服组、塞来昔布注射组( $n=6$ ),后3组利用最佳致炎剂量CFA建立RA模型。塞来昔布口服组给予市售塞来昔布胶囊,每天灌胃1次,每次20 mg;塞来昔布注射组给予用原料药配制的塞来昔布混悬液,每周于大鼠右后肢足跖部注射给药1次,剂量20 mg/kg。测量各组大鼠足容积,并进行临床评分。通过ELISA检测各组大鼠血清中3种炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )的浓度,取大鼠踝关节组织进行H-E染色以观察组织病变情况。**结果** 在雌性SD大鼠中,足跖部注射0.1 mL CFA(10 mg/mL)可较好地模拟RA中度炎症反应,注射CFA后逐渐出现足爪红肿,全身临床评分及足部关节炎指数评分均有升高,炎症高峰期在免疫后19 d。塞来昔布口服组和注射组足容积较模型对照组减小( $P$ 均 $<0.05$ ),全身临床评分及足部关节炎指数评分均较模型对照组降低( $P$ 均 $<0.01$ ),血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 浓度均较模型对照组降低( $P$ 均 $<0.05$ ),踝关节组织病理改变均较模型对照组减轻;其中塞来昔布注射组的全身临床评分及足部关节炎指数评分低于口服组( $P$ 均 $<0.05$ ),踝关节组织病理改变轻于口服组。**结论** 足跖部注射0.1 mL CFA(10 mg/mL)可致SD雌性大鼠中度炎症反应,能较好地模拟RA的病理过程。每周经足跖部注射1次塞来昔布混悬液对模型大鼠RA的疗效优于每天口服1次塞来昔布。

**[关键词]** 类风湿关节炎; 雌性大鼠模型; 完全弗氏佐剂; 塞来昔布; 给药方式

**[中图分类号]** R 593.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2022)10-1217-05

### Establishment of rheumatoid arthritis model in female SD rats with complete Freund's adjuvant and the therapeutic effects of celecoxib

SUN Rui-meng, YANG Bai-xue, GONG Yan-chang, HAO Jing-qiang, SUN Hao-wei, LI San-ming\*  
School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, Liaoning, China

**[Abstract]** **Objective** To construct a rheumatoid arthritis (RA) model of female SD rats with complete Freund's adjuvant (CFA), and to investigate the therapeutic effects of celecoxib on RA with different administration methods. **Methods** Twenty-four female SD rats were randomly divided into normal control group and low-, medium-, high-dose model groups ( $n=6$ ), and 0.05, 0.1 and 0.2 mL of CFA (10 mg/mL) were injected into the right hind limb plantar region of the rats to induce RA models, and the appropriate dose was screened. Another 24 female SD rats were randomly divided into normal control group and 3 experimental groups after the establishment of the optimal inflammation model (model control group, celecoxib oral group, and celecoxib injection group) ( $n=6$ ). The celecoxib oral group was given commercial celecoxib capsules, 20 mg each time, once a day by gavage; the celecoxib injection group was given a celecoxib suspension, administered once a week at a dose of 20 mg/kg. The foot volume of rats was measured in each group, and the clinical scores were performed. The levels of 3 inflammatory factors (interleukin [IL]-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ]) in serum of rats in each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and the ankle joint tissues of rats were stained with hematoxylin-eosin staining to observe the pathological changes. **Results** In female SD rats, moderate inflammatory reaction of RA could be better simulated by injecting 0.1 mL CFA (10 mg/mL) into the plantar part of the foot. After CFA injection, the feet gradually become red and swollen, and the systemic clinical score and foot arthritis index score were both increased. The peak of inflammation appeared on day 19 after immunization. The foot volume, systemic clinical

**[收稿日期]** 2019-03-31 **[接受日期]** 2020-04-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81690264, 81821004). Supported by National Natural Science Foundation of China (81690264, 81821004).

**[作者简介]** 孙瑞濛, 硕士生. E-mail: 645079992@qq.com

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 024-43520581, E-mail: li\_sanming@126.com

score, foot arthritis index score, the concentrations of serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  of the rats in the celecoxib oral group and injection group were significantly lower than those in the model control group (all  $P < 0.05$ ), and the pathological changes of ankle joint were all alleviated. The systemic clinical score and foot arthritis index score of the rats in the celecoxib injection group were significantly lower than those in the oral group (both  $P < 0.05$ ), and the pathological changes of ankle joint were mild in the injection group. **Conclusion** Injection of 0.1 mL CFA (10 mg/mL) into the plantar region of the foot can cause moderate inflammation reaction in female SD rats, and it can better simulate the pathological process of RA. Injecting celecoxib suspension once a week has a better effect than taking celecoxib orally once a day on RA in model rats.

[ **Key words** ] rheumatoid arthritis; female rat model; complete Freund's adjuvant; celecoxib; mode of administration

[ Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(10): 1217-1221 ]

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 占我国骨关节类疾病的 40%<sup>[1]</sup>, 是致残率较高的疾病<sup>[2]</sup>, 可在短短几年内出现严重的危害, 而且这些危害是不可逆的, 并伴有血管翳、关节间隙变窄、滑膜组织增生等症状<sup>[3-6]</sup>。因此, 及时、有效地控制 RA 的病情十分必要。目前用于炎症发病机制研究的动物模型有很多种, RA 的研究常使用完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的大鼠佐剂性关节炎模型<sup>[7-9]</sup>。虽然有文献报道了关于 RA 模型复制中 CFA 用量与模型复制之间的关系<sup>[10]</sup>, 但是所用实验动物均为雄性大鼠。本文探究不同剂量 CFA 对雌性 SD 大鼠的影响, 确定建立 RA 模型的 CFA 合适剂量, 然后以塞来昔布作为干预药物考察不同给药方式对 RA 的治疗效果。

## 1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 塞来昔布原料药 (纯度 > 99%) 购自大连美仑生物技术有限公司, 用稳定剂和生理盐水配制成质量浓度为 5 mg/mL 的塞来昔布混悬液; 塞来昔布胶囊 (商品名为西乐葆, 规格为 0.2 g) 购自辉瑞制药有限公司; CFA 购自美国 Sigma 公司, 质量浓度为 10 mg/mL。T1000 型电子天平购自常熟市双杰测试仪器厂, 电子数显游标卡尺购自杭州量具有限公司, YLS-7C 型足趾容积测量仪购自济南益延科技发展有限公司。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验动物 清洁级雌性 SD 大鼠 48 只, 体重 100~110 g, 自由进食和饮水。所有动物实验均遵循动物实验伦理学相关规定并通过伦理委员会审批。实验前将大鼠放置在鼠笼常规适应性喂养 3 d, 并定期清洁、消毒。

1.3 模型制备 将 24 只 SD 大鼠随机分成正常对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 6 只; 除正常对照组外, 低、中、高剂量组于大鼠右后肢

足跖部皮内注射不同剂量 (0.05、0.1、0.2 mL) 的 10 mg/mL CFA 进行致炎, 如大鼠外观表现为前肢、后肢或对侧肢体出现红肿, 耳、尾部出现红肿或炎性结节, 提示造模成功。

1.4 给药方案 于造模后当天给予药物治疗。取 24 只大鼠随机分成正常对照组、模型对照组、塞来昔布口服组、塞来昔布注射组, 每组 6 只。模型对照组、塞来昔布口服组、塞来昔布注射组建立 RA 模型后, 模型对照组给予生理盐水, 塞来昔布口服组每天灌胃 1 次、每次 20 mg 塞来昔布, 塞来昔布注射组每周于大鼠右后足脚掌处注射给予 20 mg/kg 塞来昔布混悬液 (5 mg/mL)。

1.5 观察和检测指标 在同一时间、同一地点使用电子天平称量各组大鼠的体重, 用足趾容积测量仪测量每只大鼠右后足 (标记线以下) 的足容积 (mL), 用游标卡尺测量大鼠足周长。根据既往报道的评分标准进行全身 (耳、鼻、尾、前足爪、后足爪) 临床评分和足部关节炎指数评分<sup>[11]</sup>。实验结束后采血, 采用 ELISA 检测血清中 3 种炎症因子 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ) 的浓度; 将大鼠采用颈椎脱臼法处死, 取下炎症最严重部位的踝关节处进行切片和常规 H-E 染色, 在显微镜下观察组织病理学改变。

1.6 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用重复测量资料的方差分析或单因素方差分析进行比较, 多重比较采用最小显著性差异法。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 最佳致炎模型的筛选 由图 1 可见, 注射 CFA 后大鼠体重随着时间的延长而增加, 其中正常对照组、低剂量组和中剂量组大鼠体重平稳增加, 但高剂量组的体重增加比其他 3 组略慢, 且高剂量组大鼠在病程中出现精神萎靡、毛发失去光泽、活动障碍等现象;

注射 CFA 后, 低剂量组、中剂量组和高剂量组大鼠足容积出现快速增长, 19 d 时达到高峰, 大鼠足容积和足周长均随 CFA 剂量的增加增大; 正常对照组大鼠没有炎症表现, 3 个剂量组大鼠注射 CFA 后全身

临床评分和足部关节炎指数评分均上升, 足部关节炎指数评分至 10 d 后基本平稳。结果表明, 中剂量组可以很好地模拟炎症程度, 属于中度炎症环境, 能更好地贴合临床情况, 可用于后续研究。

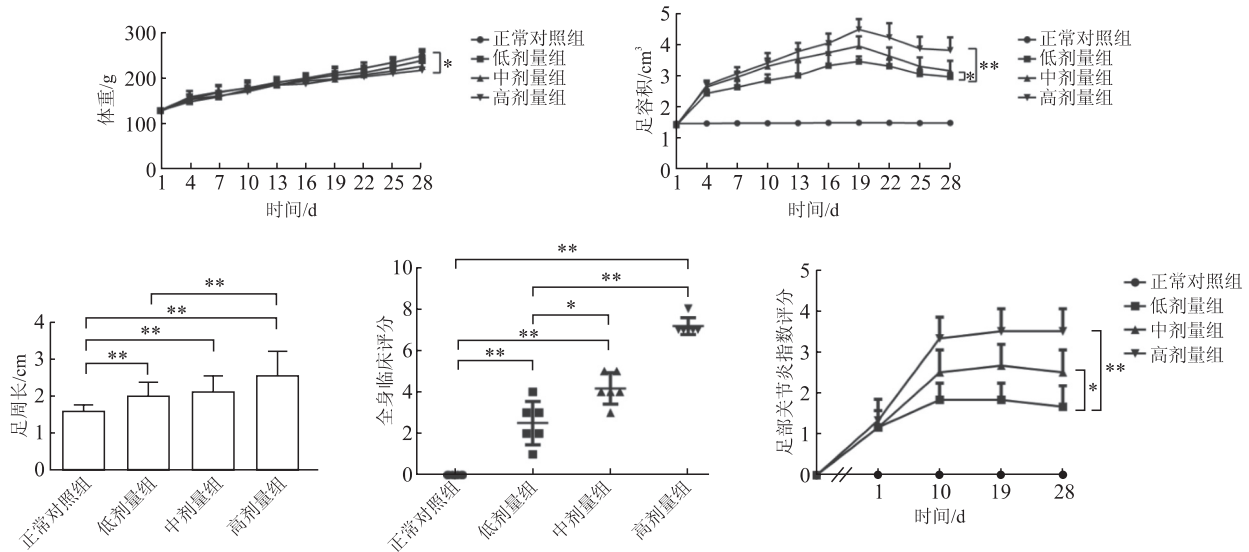


图 1 各组 RA 模型大鼠造模后体重、足容积、足周长、全身临床评分和足部关节炎指数评分的变化  
低、中、高剂量组大鼠分别给予 0.05、0.1、0.2 mL 10 mg/mL 完全弗氏佐剂。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . RA: 类风湿关节炎。

2.2 不同给药方式下塞来昔布对炎症模型大鼠的疗效 由图 2 可见, 正常对照组、模型对照组、塞来昔布注射组大鼠体重随着时间的延长稳步增加, 而塞来昔布口服组体重于 22 d 后呈现下降趋势, 可能是由于口服塞来昔布在胃肠道内产生不良反应所

致; 塞来昔布注射组和口服组大鼠的足容积均较模型对照组减小 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 塞来昔布注射组和口服组大鼠的全身临床评分和足部关节炎指数评分均较模型对照组降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 且塞来昔布注射组低于口服组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

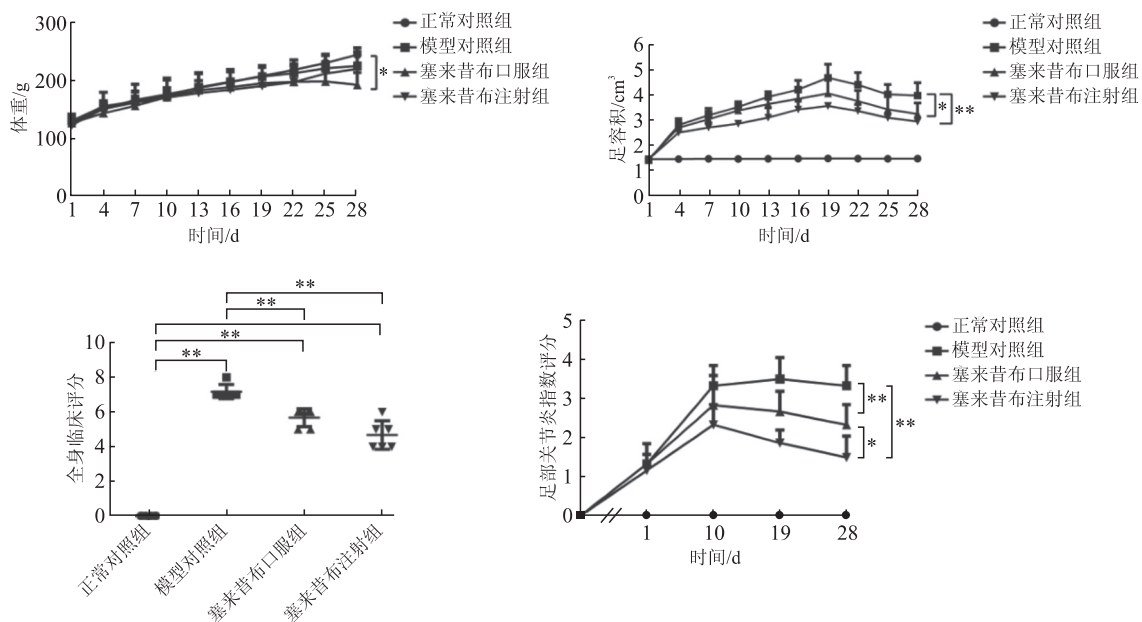


图 2 塞来昔布对 RA 模型大鼠体重、足容积、全身临床评分和足部关节炎指数评分的影响  
模型对照组、塞来昔布口服组和塞来昔布注射组大鼠均给予 0.1 mL 10 mg/mL 完全弗氏佐剂。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . RA: 类风湿关节炎。

由图3可见,塞来昔布注射组、口服组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平与模型对照组相比均降低( $P$ 均 $<0.05$ ),塞来昔布注射组3种炎症因子的浓度虽低于口服组但两组间差异均无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )。由图4可见,模型对照组大鼠

踝关节滑膜增生严重,且有血管翳形成、滑膜组织内小血管增生、扩张充血,说明有大量炎症细胞浸润;塞来昔布注射组和口服组上述病理变化较模型对照组减轻,其中注射组趋向于正常对照组。

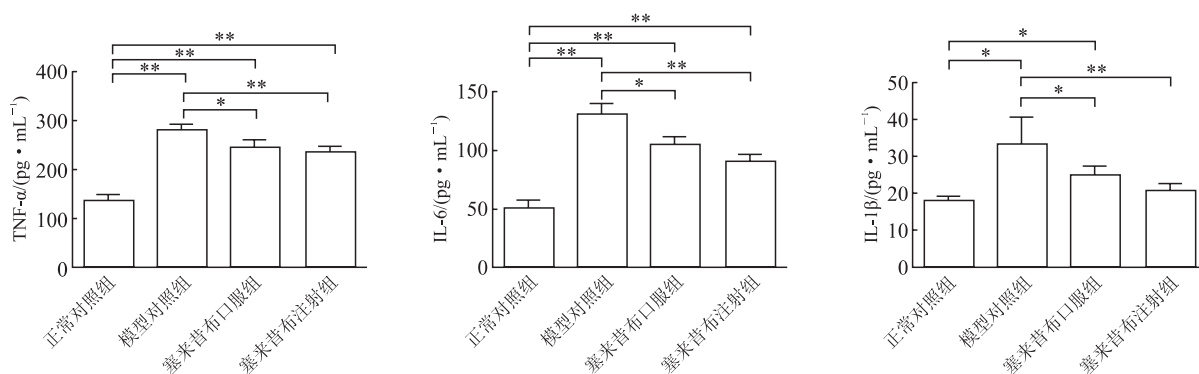


图3 塞来昔布对RA模型大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 浓度的影响

模型对照组、塞来昔布口服组和塞来昔布注射组大鼠均给予0.1 mL 10 mg/mL完全弗氏佐剂。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . RA: 类风湿关节炎; TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; IL: 白细胞介素.

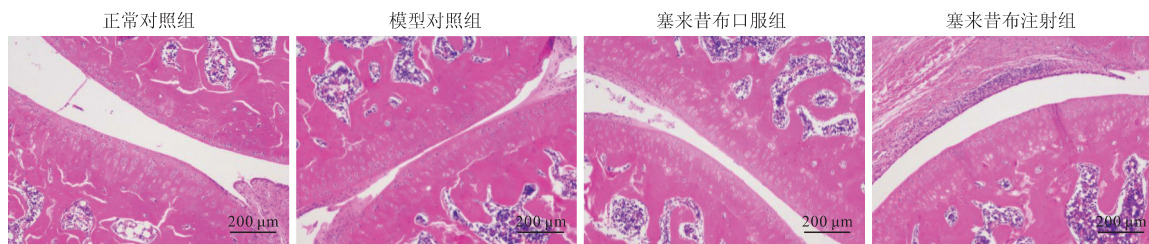


图4 塞来昔布对RA模型大鼠踝关节组织病理变化的影响(H-E染色)

模型对照组、塞来昔布口服组和塞来昔布注射组大鼠均给予0.1 mL 10 mg/mL完全弗氏佐剂. RA: 类风湿关节炎.

### 3 讨论

RA是一种自身免疫病,是以关节病变为主并伴有活动性障碍的炎症性疾病<sup>[12]</sup>.佐剂性关节炎是一种以关节滑膜组织破坏为特征的免疫性关节炎,其组织病理学改变和发病机制与RA极为相似<sup>[13]</sup>.本实验结果表明,以0.05 mL 10 mg/mL的CFA构建的RA模型大鼠炎症轻微,可能不利于观察药物的治疗作用;以0.1 mL 10 mg/mL的CFA构建的RA模型大鼠属于中度炎症环境,有助于观察药物治疗的疗效;而以0.2 mL 10 mg/mL CFA构建的RA模型大鼠属于重度炎症环境,临床上对于重度炎症采用药物治疗往往疗效不佳.因此,本研究选取0.1 mL 10 mg/mL的CFA作为最佳致炎剂量造模.

本研究考察了各组大鼠的体重、足容积、足周长、全身临床评分、足部关节炎指数评分,血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的浓度,以及踝关节局部炎

症病理学特征等变化,结果显示塞来昔布口服和注射用药均可减轻RA模型大鼠的全身和足关节炎反应,并且塞来昔布注射组的全身临床评分及足部关节炎指数评分低于口服组、踝关节组织病理改变轻于口服组,表明塞来昔布局部注射用药的疗效优于口服.此外,本研究结果还显示,塞来昔布口服组大鼠的体重于22 d后呈现下降趋势,推测可能是由于口服塞来昔布在胃肠道内产生不良反应所致.塞来昔布作为一种非甾体抗炎药,是治疗RA的首选药物,但其长时间服用会造成严重的胃肠道刺激<sup>[14]</sup>,是患者终止治疗的主要原因.与口服用药相比,局部注射塞来昔布可减少用药次数和用药剂量,减少不良反应<sup>[15]</sup>.

综上所述,本研究采用0.1 mL 10 mg/mL的CFA建立的雌性大鼠佐剂性RA模型关节炎表现明显,每周经足跖部注射1次塞来昔布混悬液对RA大鼠的疗效优于每天口服1次塞来昔布.该模

型能够较好地模拟 RA 的病理过程, 可用于 RA 药物治疗效果的研究, 为进一步了解 RA 发病机制和评价新药提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 胡长玲, 林兵, 郑承剑, 秦路平, 韩婷. 抗类风湿性关节炎的天然药物及其作用机制研究进展[J]. 中草药, 2011, 42: 1435-1440.
- [2] 石磊, 李小峰, 张莉芸, 王彩虹, 李芳, 茹晋丽, 等. 类风湿关节炎动物模型的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2009, 9: 215-217.
- [3] 宋珊珊, 张玲玲, 魏伟. 实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2011, 27: 1648-1653.
- [4] 王蕾, 王武. 类风湿性关节炎的影像学研究进展[J]. 中日友好医院学报, 2012, 26: 242-244.
- [5] 周海燕, 刘鹏程, 王成林. 类风湿性关节炎的影像学诊断价值[J]. 医学研究杂志, 2011, 40: 19-21.
- [6] ANANDARAJAH A, THIELE R, GIAMPOLI E, MONU J, SEO G S, FENG C Y, et al. Patients with rheumatoid arthritis in clinical remission manifest persistent joint inflammation on histology and imaging studies[J]. J Rheumatol, 2014, 41: 2153-2160.
- [7] KLARESKOG L, MCDEVITT H. Rheumatoid arthritis and its animal models: the role of TNF- $\alpha$  and the possible absence of specific immune reactions[J]. Curr Opin Immunol, 1999, 11: 657-662.
- [8] KERWAR S S, RIDGE S C, ORONSKY A L. Animal models of rheumatoid arthritis[J]. Clin Immunol News, 1988, 9: 162-164.
- [9] 吴伟, 李慧, 邹军, 王森. 骨关节炎小动物模型的制备及量表评价[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21: 4529-4535.
- [10] 彭传玉, 罗磊, 胡玲, 宋小鸽, 唐照亮, 吴子建, 等. 不同剂量弗氏完全佐剂对类风湿关节炎模型大鼠复制的影响[J]. 中国医药指南, 2012, 10: 1-3.
- [11] 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 黄蓓, 吴育晶, 汪庆童, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28: 453-457.
- [12] 刘琼, 王晨瑶, 方剑乔. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12: 313-316.
- [13] 马东来, 李俊, 陈敏珠, 徐叔云. 卡芬尼对大鼠佐剂性关节炎治疗作用的免疫机制[J]. 中国免疫学杂志, 1992, 8: 114-119.
- [14] 吕磊, 殷宇刚, 徐军. 塞来昔布与小剂量阿司匹林联用致老年消化道大出血一例[J]. 中国医师进修杂志, 2016(2): 177-178.
- [15] 涂院海. 106例类风湿关节炎活动期加用激素口服和局部注射治疗临床比较[J]. 中国基层医药, 2007, 14: 1182-1183.

[本文编辑] 尹 茶