

· 药理 ·

一种新的类风湿关节炎合并间质性肺病小鼠模型的建立与评价

许丽婷, 赵清玉, 杨超, 何莲花, 孙丛丛, 高双荣, 王丽丽, 刘春芳*, 林娜*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的:采用牙龈卟啉单胞菌(Pg)感染结合胶原诱导的方法建立类风湿关节炎合并间质性肺病(RA-ILD)小鼠模型,并通过关节、肺和血清等多方面病变特征进行综合评价。方法:将40只DBA/1小鼠随机分成4组,分别为Control组、Pg感染(Pg)组、胶原诱导性关节炎(CIA)组和Pg感染结合CIA(Pg+CIA)组,每组10只。观察小鼠关节炎临床积分、发病率等关节炎临床症状;微计算机断层扫描(Micro-CT)分析小鼠膝关节病变情况;苏木素-伊红(HE)、马松(Masson)染色检测小鼠膝关节和肺组织病理学形态变化和胶原沉淀情况;免疫组化法检测肺组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(Col I)和纤连蛋白(FN)蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠肺组织 α -SMA、Col I、FN、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 的mRNA表达量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清中Pg、环瓜氨酸肽(CCP)和免疫球蛋白G(IgG)含量。结果:关节病变评估:CIA组和Pg+CIA组小鼠关节发病率均为100%,关节红肿、畸形症状明显,受累肢体数分别为27、28分,临床积分分别为68、70分,Pg组关节未观察到明显的临床症状;CIA组和Pg+CIA组关节组织病理学和影像学病变严重,组织病理学评分、骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度和骨小梁数量均明显升高,与Control组比较差异显著($P<0.01$),Pg组未观察到明显的关节炎病理改变。肺部病变评估:Pg+CIA组可见明显的肺泡炎症、间质炎症细胞浸润和肺泡壁增厚等病理表现,胶原纤维蓝染严重,其组织病理学评分和胶原面积比均明显升高,与Control组、Pg组和CIA组比较差异显著($P<0.05$);肺中 α -SMA、Col I和FN的蛋白和mRNA表达水平明显升高,IL-6、TNF- α 和IL-1 β mRNA表达水平也明显升高,与Control组比较差异明显($P<0.05$)。血清学检测结果显示,Pg+CIA组CCP、Pg和IgG含量明显升高,与Control、Pg和CIA 3组比较均差异明显($P<0.05$)。结论:Pg感染结合胶原诱导DBA/1小鼠所建立的动物模型,表现出明显的类风湿关节炎和间质性肺病的症状及病理特征,同时伴有高水平的血清CCP,是一种新型的RA-ILD小鼠模型。相关研究将为RA-ILD发病机制探究和新药研发提供实验工具,也为环瓜氨酸肽抗体(ACPA)阳性的RA-ILD动物模型建立提供研究基础。

【关键词】 类风湿关节炎; 间质性肺病; 瓜氨酸化; 动物模型; 牙龈卟啉单胞菌

【中图分类号】 R282;R285;R259 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2026)06-0081-10

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20250537

【网络出版地址】 <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250318.1344.002>

【网络出版日期】 2025-03-18 16:10:24 **【增强出版附件】** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Establishment and Evaluation of New Mouse Model of Rheumatoid Arthritis Combined with Interstitial Lung Disease

XU Liting, ZHAO Qingyu, YANG Chao, HE Lianhua, SUN Congcong, GAO Shuangrong, WANG Lili,
LIU Chunfang*, LIN Na*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

【Abstract】 Objective: To establish a mouse model of rheumatoid arthritis with interstitial lung disease (RA-ILD) in DBA/1

【收稿日期】 2025-03-02

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82204712,82330124,82274176,81974529);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT25035)

【第一作者】 许丽婷,在读博士,从事抗炎中药药理研究,E-mail:939291701@qq.com

【通信作者】 *刘春芳,研究员,博士生导师,从事中药药理研究,E-mail:chunfang666@162.com;

*林娜,研究员,博士生导师,从事中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

1 mice using *Porphyromonas gingivalis* (Pg) infection combined with collagen-induced arthritis (CIA), and to comprehensively evaluate pathological characteristics in joints, lungs, and serum. **Methods:** Forty DBA/1 mice were randomly divided into four groups, *i.e.*, Control, Pg infection (Pg), CIA, and Pg infection combined with CIA (Pg+CIA), with 10 mice in each group. Arthritis clinical symptoms were evaluated by recording arthritis incidence and clinical scores. Micro-CT scanning was used to assess knee joint pathology. Histopathological changes and collagen deposition in knee joints and lung tissues were analyzed using hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Immunohistochemistry was performed to detect protein expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (Col I), and fibronectin (FN) in lung tissues. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to measure mRNA expression levels of α -SMA, Col I, FN, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and IL-1 β in lung tissues. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of Pg, cyclic citrullinated peptide (CCP), and immunoglobulin G (IgG). **Results:** Joint lesions: The CIA and Pg+CIA groups showed 100% arthritis incidence, with evident joint redness, swelling, and deformity. The number of affected limbs was 27 and 28, and clinical scores were 68 and 70, respectively. No obvious clinical symptoms were observed in the Pg group. Histopathological and imaging analyses showed severe joint lesions in the CIA and Pg+CIA groups, with significantly increased histopathological scores, bone mineral density, bone volume fraction, trabecular thickness, and trabecular number compared to the Control group ($P < 0.01$). No obvious joint pathology was observed in the Pg group. Lung lesions: The Pg+CIA group exhibited marked alveolar inflammation, interstitial inflammatory cell infiltration, and alveolar wall thickening, with pronounced blue staining of collagen fibers. Histopathological scores and collagen area ratios were significantly higher than those of the Control, Pg, and CIA groups ($P < 0.05$). Lung protein and mRNA expression levels of α -SMA, Col I, and FN were markedly increased, and mRNA levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β were significantly elevated compared to the Control group ($P < 0.05$). Serology: The Pg+CIA group showed significantly higher levels of CCP, Pg, and IgG compared with the Control, Pg, and CIA groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** DBA/1 mice subjected to Pg infection combined with CIA exhibited pronounced symptoms and pathological features of RA-ILD, along with elevated serum anti-CCP antibody levels. This model represents a novel RA-ILD mouse model, providing a valuable experimental tool for investigating RA-ILD pathogenesis and developing new therapeutics, and serves as a basis for establishing anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA)-positive RA-ILD animal models.

[**Keywords**] rheumatoid arthritis; interstitial lung disease; citrullination; animal models; *Porphyromonas gingivalis*

间质性肺病(ILD)是类风湿关节炎(RA)最常见的关节外症状表现,发生在40%~80%的RA患者,其死亡率为10%~20%,平均生存期为5~8年^[1]。ILD预后极差,是导致RA患者死亡的主要原因之一^[2]。建立实验动物模型是研究发病机制及研发创新药物的重要基础。胶原诱导性关节炎(CIA)和佐剂诱导性关节炎(AA)都能在出现明显RA临床症状和病理特征的同时,观察到胸膜下聚集的炎症细胞间质浸润和炎症细胞因子增加的肺部病理变化,但肺部症状不持久,且不能导致明显的肺纤维化^[3]。气管注射博来霉素是目前诱导ILD最为常见的方法,利用博来霉素结合CIA可以诱导RA-ILD模型,但肺部病变范围较局限,与人类病变的弥漫性分布有差异,且会给动物造成不可逆的器质性伤害^[3]。转基因动物模型成本高,成模时间长,也不能完全复制RA-ILD中主要病变类型寻常性间质性肺炎(UIP)的相关肺部病理表现^[4]。为此,建立一种兼具RA和ILD显著症状和病变特征,且简便可行的RA-ILD动物模型,成为当前RA-ILD研究领域亟待解决的问题。

研究证明,牙龈卟啉单胞菌(Pg)诱导的牙周炎是引起肺部炎症的触发因素,其可通过宿主的瓜氨酸化反应启动自身免疫反应^[5];同时Pg是RA-ILD

的关键危险因素之一,可诱导RA患者中高滴度的自身抗体如抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体的形成^[6-7]。抗环瓜氨酸肽抗体(ACPA)作为RA血清诊断标志物,也是RA-ILD的最强预测因子,在RA-ILD发生发展过程中发挥重要作用^[8]。研究报道,Pg感染8个月能直接诱导大鼠关节炎和抗-CCP2抗体的产生^[9],Pg感染结合胶原诱导能加重CIA动物的关节炎疾病严重度^[10-12]。课题组前期采用C3H小鼠进行Pg感染加上胶原诱导,成功建立起高水平表达ACPA的RA模型^[12]。鉴于Pg、胶原、ACPA、RA和肺部病变之间的关联性,本研究旨在建立一种新的RA-ILD伴ACPA高水平表达的小鼠模型,相关研究尚未见报道。研究将采用CIA易感的DBA/1小鼠,通过Pg感染加胶原诱导成模,为比较关节炎和肺纤维化病变情况,分别选用单独Pg感染及胶原诱导的CIA为对照组,观察关节炎临床症状和病理变化(发病率、临床积分、组织病理学、影像学)、肺部病变情况(组织病理学、肺纤维化标志物、炎症因子)及血清抗体水平变化情况,并进行综合评价。

1 材料

1.1 动物 40只6周龄的SPF级DBA/1雄性小鼠,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号SYXK(京)2019-0008],实验动物许可证号SYXK

(京)2021-0017。饲养温度为 (22 ± 2) °C,自由摄食和饮水,适应性饲养7 d后进行实验。

1.2 伦理 本研究中动物福利和实验过程均遵循中国中医科学院动物伦理委员会的相关规定(伦理批准编号 ERCCACMS11-208-02)。

1.3 药品和试剂 苏木素-伊红(HE)染色液、马松(Masson)三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120、G1340);Pg(北纳创联生物科技有限公司,货号BNCC353909);哥伦比亚血平板(广东环凯微生物科技有限公司,货号JY-A092878);牛Ⅱ型胶原乙酸溶液、完全弗氏佐剂(CFA)(美国Chondrex公司,货号分别为2002-2、7001);小鼠Pg、免疫球蛋白G(IgG)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为mL023665-J、mL057874);小鼠CCP ELISA试剂盒(北京Cusabio公司,货号CSB-EQ027743MO);小鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(Col I)、纤连蛋白(FN)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB111364、GB115707、GB114491);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔/小鼠二抗(美国Abcam公司,货号Ab205718);总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(金式金生物科技有限公司,货号分别为ET111、AE311);UltraSYBR Mixture(北京康为世纪有限公司,货号CW2602M)。

1.4 仪器 微计算机断层扫描仪(Micro-CT)、Quant Studio 3型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);XTS2013型体视显微镜、BX50型正置显微镜(日本奥林巴斯公司);KPJ-1A型烤片机、QPJ-C型轮转式切片机、BMJ-1B型生物组织包埋机(天津天利航空机电有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备和分组 根据体质量将40只DBA/1小鼠随机分为正常(Control)组、单独Pg感染(Pg)组、胶原诱导关节炎(CIA)组和Pg感染结合胶原诱导(Pg+CIA)组。Control组和每天涂抹100 μ L含有2%羧甲基纤维素(CMC)的磷酸盐缓冲液(PBS);Pg组每天涂抹100 μ L含有2% CMC的PBS液(加入 1×10^9 CFU \cdot mL⁻¹的Pg);CIA组每天涂抹含有100 μ L 2% CMC的PBS液,分别于第14、35天用牛Ⅱ型胶原和CFA等体积的乳浊液免疫;Pg+CIA组每天涂抹100 μ L含有2% CMC的PBS液(加入 1×10^9 CFU \cdot mL⁻¹的Pg),分别于第14、35天用牛Ⅱ型

胶原和CFA等体积的乳浊液免疫。见增强出版附加材料。

2.2 细菌活化 注入无菌水0.4 mL到冻干管中,轻轻吹打混匀,充分溶解成菌悬液。吸取菌悬液,均匀打入2个除过氧的哥伦比亚血平板(约200 μ L/个),涂布均匀,在37 °C的厌氧环境中培养。活化成功后,用于实验。用分光光度计测定细菌计数,积分吸光度(IA)值为1.0时,菌液浓度约为 1×10^9 CFU \cdot mL⁻¹。然后收集 1×10^9 CFU \cdot mL⁻¹细菌重悬于PBS中。

2.3 发病率和关节炎评分 统计小鼠RA发病率,发病率=每组小鼠发病只数/每组小鼠总数 \times 100%。参照文献[12]中关节炎评分标准,评分等级分为0~4分,分别对小鼠的4个踝腕关节、4个足中段和12个指趾关节进行评分,共20个关节,最高分为80分。

2.4 动物取材 初次感染细菌56 d后进行小鼠取材。取材前对小鼠进行禁食不禁水处理12 h以上。取材当天麻醉小鼠后进行摘眼球取血,血液室温静置并离心提取血清。小鼠的2个后肢于4%多聚甲醛固定,肺组织分别放于-80 °C冷冻保存和4%多聚甲醛浸泡过夜以便用于病理学检测。

2.5 ELISA检测小鼠血清ACPA、Pg和IgG蛋白表达量 小鼠取血后,将血液静置、离心获得血清。用ELISA试剂盒检测小鼠血清含量。按照说明书步骤进行操作,通过酶标仪在450 nm处测定各孔吸光度A,计算浓度。

2.6 Micro-CT检测骨计量参数指标 将小鼠膝关节置于10%甲醛溶液中固定48 h后, Micro-CT扫描并摄片后进行3D关节重建。对各组小鼠膝关节骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)进行计量学参数统计分析。

2.7 HE染色观察小鼠膝关节病理形态学变化 取膝关节,多聚甲醛固定,EDTA慢速脱钙后用石蜡包埋,切片备用。60 °C烤片30 min,将切片放在二甲苯中脱蜡处理并通过梯度乙醇溶液逐步水化。切片依次放入苏木素染液和伊红染液中染色,分化液分化后0.5%氨水返蓝,中性树脂封片,镜下观察拍照并分析结果。小鼠肺组织固定后即可进行石蜡包埋,后续步骤参考膝关节操作。肺组织HE染色病理评分标准见表1^[13]。

2.8 Masson染色检测小鼠肺组织病理变化 将小鼠肺组织切片顺次放入二甲苯中脱蜡处理并通过梯度乙醇溶液逐步水化, Weigert铁苏木素染色后

表1 肺部病理评分标准

Table 1 Lung pathology scoring criteria

评分	肺炎病变程度	间质炎症细胞浸润	肺泡壁增厚程度
0	肺实质结构正常	未见或偶见炎症细胞	肺泡壁结构正常
1	5%~25%肺泡受损	少量炎症细胞浸润	肺泡壁稍微增厚
2	25%~50%肺泡受损	轻度炎症细胞浸润	肺泡壁轻度增厚
3	50%~75%肺泡受损	中度炎症细胞浸润	肺泡壁显著增厚
4	75%~100%肺泡受损	重度炎症细胞浸润	肺泡壁严重增厚,出现纤维化和结节形成

酸性乙醇分化, Masson 蓝化液返蓝后丽春红品红染色, 磷钼酸溶液洗后滴加苯胺蓝染色液, 乙醇脱水 and 二甲苯透明后用中性树胶封固, 显微镜下观察拍照, 使用 Image J 对阳性染色(呈蓝色)面积进行计量并分析结果。

2.9 免疫组化法检测小鼠肺组织 α -SMA、Col I 和 FN 蛋白表达量 石蜡切片依次放入二甲苯中脱蜡处理并通过梯度乙醇溶液逐步水化, 置于柠檬酸抗原修复缓冲液修复抗原, 3% 双氧水溶液室温避光孵育, 阻断内源性过氧化物酶; 血清封闭后滴加一抗 α -SMA (1:600)、Col I (1:1 000) 和 FN (1:2 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育后 DBA 显色, 苏木素复染并返蓝后依次加入乙醇、二甲苯脱水后稍晾干, 中性树胶封片。光学显微镜镜检, 随机采集图像并使用 Image J 分析各组随机视野下阳性目标光密度, 用平均积分吸光度 *AA* 代表指标表达量, 显示代表性图像。

2.10 Real-time PCR 检测小鼠肺组织中 α -SMA、Col I、FN、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β mRNA 表达量 每组取小鼠左肺液氮研磨成粉末, 使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 测定其纯度和浓度, 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。使用 SYBR green Real-time PCR 试剂盒在 Real-time PCR 检测系统上检测。反应程序设置为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 1 min, 循环 40 次。溶解曲线分析 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参, 并使用标准 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测定相对基因表达。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 2。

2.11 统计学方法 数据统计使用 GraphPad Prism 10 软件进行处理。采用 Shapiro-Wilk test 检验计量资料正态性, 多组数据采用 Bartlett 检验判断方差齐性。符合正态分布资料多组比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。多组间比较疾病病程

表2 引物序列

Table 2 Primer Sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
α -SMA	上游 AGCCATCTTTTCATTGGGATGGAG	128
	下游 CATGGTGGTACCCCTGACA	
Col I	上游 CTGGCGGTTTCAGGTCCAAT	190
	下游 TCCAAACCACTGAAGCCTCG	
FN	上游 TGGATCCCCTCCAGAGAAG	171
	下游 AGTTGGGGAAGCTCATCTGTC	
IL-6	上游 CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG	101
	下游 GGACTTTTGTACTCATCTGCAC	
TNF- α	上游 AGCCCTGGTATGAGCCCATCTATC	126
	下游 TCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC	
IL-1 β	上游 GGACAGGATATGGAGCAACAAGTGG	131
	下游 TCATCTTTCAACACGCAGGACAGG	
GAPDH	上游 AGTGGCAAAGTGGAGATT	83
	下游 GTGGAGTCATACTGGAACA	

度采用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析组间差异。分析计量资料的结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同造模方法对关节炎临床症状的影响 本研究在模型建立过程中, 观察并记录小鼠关节炎临床积分、发病率等发病相关情况。结果表明, Control 组和 Pg 组动物均无明显的关节炎症状, CIA 组和 Pg+CIA 组小鼠在 Pg 首次感染后 38 d 开始出现关节红肿症状, 随后肿胀逐渐加重, 足趾变形, 部分关节出现活动受限, 临床积分逐渐升高, 发病率均为 100%。CIA 组受累肢体数为 27, 最高临床积分是 68 分(总分为 80 分), Pg+CIA 组受累肢体数为 28, 最高临床积分是 70 分。随着病变时间延长, CIA 组和 Pg+CIA 组临床积分呈升高趋势, 与 Control 组和 Pg 组比较, CIA 组和 Pg+CIA 组临床积分均显著升高 ($P < 0.01$); 与 CIA 组比较, Pg+CIA 组临床积分有升高趋势, 差异无统计学意义。见表 3、表 4、图 1。

表3 不同造模方法对小鼠关节炎发病率的影响 (n=10)

Table 3 Effects of different modeling methods on incidence of arthritis in mice (n=10)

组别	发病率/%	受累肢体数/个	最高临床积分/分
Control组	0	0	0
Pg组	0	0	0
CIA组	100	27(前足10/后足17)	68
Pg+CIA组	100	28(前足12/后足16)	70

3.2 不同造模方法对膝关节影像学改变 Micro-CT检测技术用于评价各组小鼠膝关节病变程度。Micro-CT结果显示,Control组膝关节光滑完整,骨

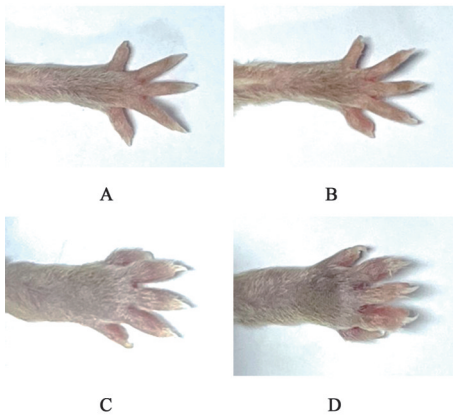
轮廓清晰。Pg组关节表面较光滑完整,CIA组小鼠膝关节表面疏松粗糙,凹凸不平,骨结构遭到较严重侵蚀。而Pg+CIA组与其他三组比较,膝关节表面更加疏松粗糙,骨质侵蚀更加明显,骨组织表面出现成片蜂窝状侵蚀点,见图2。骨计量学参数统计结果显示,与Control组比较,CIA组和Pg+CIA组BMD、BV/TV、Tb.Th和Tb.N显著降低(P<0.01);与Pg组比较,Pg+CIA组BMD、BV/TV、Tb.Th和Tb.N明显降低(P<0.05),CIA组BMD和Tb.Th明显降低(P<0.05);与CIA组比较,Pg+CIA组有降低趋势,但差异无统计学意义。见表5。

表4 不同造模方法对小鼠临床积分表的影响 (x̄±s, n=10)

Table 4 Effect of different modeling methods on clinical scores in Mice (x̄±s, n=10)

组别	36 d	38 d	40 d	42 d	44 d
CIA组	0.00	10.22±8.33 ^{1,3)}	21.80±11.58 ^{1,3)}	35.00±6.20 ^{1,3)}	44.44±7.67 ^{1,3)}
Pg+CIA组	0.00	11.33±7.87 ^{1,3)}	24.67±5.92 ^{1,3)}	33.33±9.00 ^{1,3)}	43.33±5.66 ^{1,3)}
组别	46 d	48 d	50 d	54 d	56 d
CIA组	49.44±6.39 ^{1,3)}	53.00±7.07 ^{1,3)}	53.78±5.33 ^{1,3)}	57.11±6.57 ^{1,3)}	58.00±7.62 ^{1,3)}
Pg+CIA组	48.22±5.33 ^{1,3)}	52.33±5.10 ^{1,3)}	53.11±6.57 ^{1,3)}	55.56±7.92 ^{1,3)}	56.89±10.35 ^{1,3)}

注:与Control组比较¹⁾P<0.01;与Pg组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与CIA组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01(表5-表12同)。Control组和Pg组临床积分均为0



注:A.Control组;B.Pg组;C.CIA组;D.Pg+CIA组(图2-图6同)

图1 不同造模方法对小鼠关节炎临床特点的影响

Fig. 1 Effect of different modeling methods on clinical characteristics of arthritis in mice

3.3 不同造模方法对膝关节HE的影响 膝关节HE染色结果显示,Control组和Pg组小鼠关节表面光滑,细胞排列整齐,无血管翳和炎症细胞浸润。CIA组和Pg+CIA组可见膝关节内滑膜组织大量炎症细胞浸润和肉芽组织增生,血管翳形成,骨和软骨明显损伤,关节间隙变窄。组织病理学评分结果显示,与Control组和Pg组比较,CIA和Pg+CIA组膝关节组织病理评分均显著升高(P<0.01),但2组

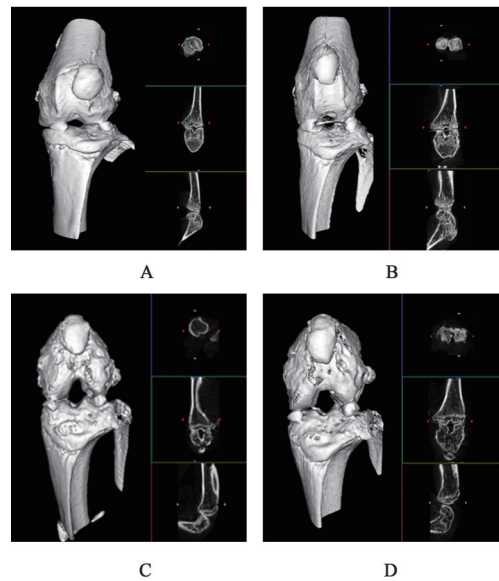


图2 不同造模方法对小鼠膝关节病变程度的影响

Fig. 2 Effect of various modeling methods on knee joint pathology in mice

之间差异无统计学意义。见图3、表6。

3.4 不同造模方法对肺组织病理组织学变化的影响 Control组肺组织结构清晰,肺泡表面光滑,无明显变形或破裂,呼吸道上皮细胞排列整齐,间质未见纤维组织增生和炎症细胞浸润。Pg组小鼠可

表5 不同造模方法对小鼠BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of various modeling methods on BMD, BV/TV, Tb.Th, and Tb.N in mice from different treatment groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	BMD /%	BV/TV /%	Tb.Th /mm ⁻¹	Tb.N /1·mm ⁻¹
Control组	640.37±50.62	0.95±0.15	0.58±0.12	4.25±0.75
Pg组	610.43±54.93	0.90±0.20	0.48±0.10	3.50±0.50
CIA组	420.48±45.36 ^{1,2)}	0.85±0.35 ¹⁾	0.36±0.08 ^{1,2)}	2.76±0.53 ¹⁾
Pg+CIA组	419.05±45.38 ^{1,2)}	0.80±0.12 ^{1,2)}	0.35±0.09 ^{1,2)}	2.53±0.63 ^{1,2)}

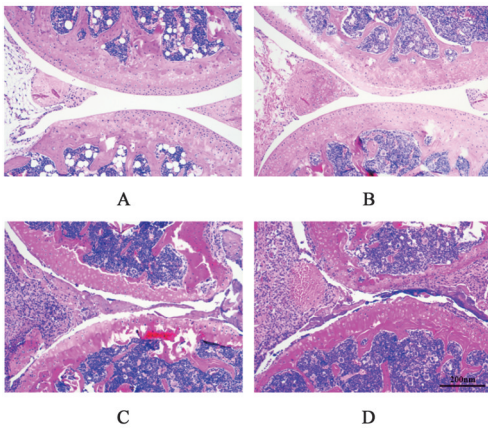


图3 不同造模方法对各组小鼠膝关节组织病理学变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of different modeling methods on knee joint histopathology in mice (HE, ×200)

见肺泡大面积出血、水肿、坏死,肺泡间隔中度或重度增厚,伴轻度或中度炎症细胞浸润,以淋巴细胞和单核细胞为主,较Control组有明显差异。CIA组小鼠可见肺泡壁轻度或中度增厚,伴轻微或轻度炎症细胞浸润,以淋巴细胞和单核巨噬细胞为主,较Control组有明显差异。CIA+Pg组可见大面积肺泡出血、水肿、坏死,肺泡间隔轻度~重度增厚,间质可见中度或重度肉芽肿性炎症细胞浸润,呈团状分

表7 不同造模方法对各组小鼠肺组织病理学评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of different modeling methods on histopathological scores of mouse lung tissue ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	肺炎炎性病变评分	间质炎症细胞浸润评分	肺泡壁增厚评分	肺组织病变程度总分
Pg组	2.50±0.53 ¹⁾	2.50±0.53 ¹⁾	1.50±0.53 ¹⁾	6.50±0.53 ¹⁾
CIA组	2.30±0.48 ¹⁾	1.80±0.63 ¹⁾	1.70±0.48 ¹⁾	5.80±1.23 ¹⁾
Pg+CIA组	3.70±0.48 ^{1,3,5)}	3.30±0.48 ^{1,3,5)}	3.00±0.67 ^{1,3,5)}	10.00±1.15 ^{1,3,5)}

注:Control组各评分均为0

3.5 不同造模方法对小鼠肺组织纤维化程度的影响 Masson染色用于直观地反映不同组间肺纤维化程度,胶原纤维为蓝色,肌纤维为红色。Control组可

表6 不同造模方法对小鼠膝关节组织病理学评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of different modeling methods on histopathological scores of mouse knee joints ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	组织病理学评分/分
Control组	0.51±0.29
Pg组	1.26±0.57
CIA组	8.35±0.98 ^{1,3)}
Pg+CIA组	8.53±0.82 ^{1,3)}

布,以淋巴细胞和单核细胞为主,也有少量的中性粒细胞聚集,较Control组、Pg组和CIA组均明显加重,见图4。进一步从肺泡炎症病变程度、间质炎症细胞浸润和肺泡壁增厚程度3个方面对小鼠肺组织进行综合评分,并根据三者之和计算肺组织病变程度总分,结果显示,4组中,与Control组、Pg组、CIA组比较,CIA+Pg组肺泡炎症病变评分、间质炎症细胞浸润评分、肺泡壁增厚病变评分和肺组织病变程度总分显著升高($P<0.01$);与Control组比较,Pg组与CIA组4项评分显著升高($P<0.01$)。见表7。

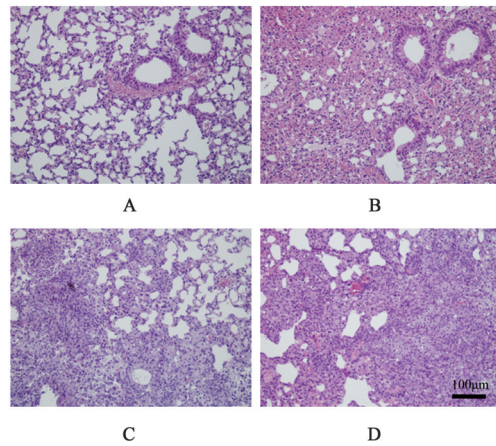


图4 不同造模方法对小鼠肺组织病理学变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 4 Effect of different modeling methods on pathological changes in mouse lung tissue (HE, ×400)

见肺组织结构正常,且肺组织中胶原纤维染色主要位于气管与毛细血管基底膜及其周围,肺泡正常且无纤维组织增生;Pg组肺组织结构致密,气管与毛细

血管基底膜及其周围有少量胶原纤维增多,肺泡有大量炎症细胞浸润;CIA组结构大致正常,气管与毛细血管基底膜及其周围的胶原纤维无明显增多,肺泡有少量炎症细胞浸润;CIA+Pg组结构致密,气管与毛细血管基底膜及其周围有胶原纤维增多,肺泡有大量炎症细胞浸润。进一步的胶原纤维分析结果显示,四组中,Pg+CIA组胶原面积比最高,与其他3组比较显著升高($P<0.01$),CIA组胶原面积比与Control组相比也显著升高($P<0.01$)。见表8和图5。

表8 不同造模方法对各组小鼠肺组织胶原面积比的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 8 Effect of different modeling methods on collagen area ratio in mouse lung tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	胶原面积比
Control组	0.009±0.002
Pg组	0.058±0.012 ¹⁾
CIA组	0.035±0.005
Pg+CIA组	0.157±0.013 ^{1,3,5)}

3.6 不同造模方法对小鼠肺组织 α -SMA、Col I和FN的蛋白和mRNA表达量的影响 小鼠肺组织免疫组化检测结果显示,Control组肺组织未见 α -SMA、Col I和FN阳性着色,Pg组和CIA组可见少量 α -SMA和Col I褐色着色、较多FN褐色着色,Pg+CIA组可见较多 α -SMA、Col I和大量的FN阳性染色。Image J软件分析结果显示,四组中Pg+

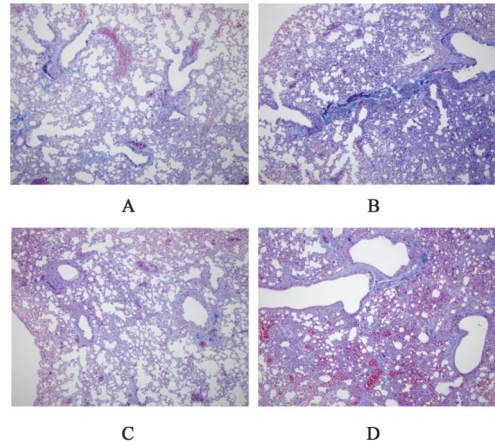


图5 不同造模方法对各组小鼠肺组织病理学变化的影响 (Masson, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of different modeling methods on pathological changes in mouse lung tissue (Masson, $\times 200$)

CIA组小鼠肺组织的 α -SMA、Col I和FN蛋白阳性平均积分吸光度值均最高,与Control组和Pg组比较,Pg+CIA组 α -SMA、Col I和FN蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),与CIA组比较,Pg+CIA组 α -SMA明显升高($P<0.01$)。与Control组比较,Pg组和CIA组Col I和FN蛋白表达显著升高($P<0.01$),见图6和表9。Real-time PCR检测结果显示,与Control组比较,其他3组 α -SMA、Col I、FN mRNA表达水平显著升高($P<0.01$);与Pg组和CIA组比较,Pg+CIA组 α -SMA、FN mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见表10。

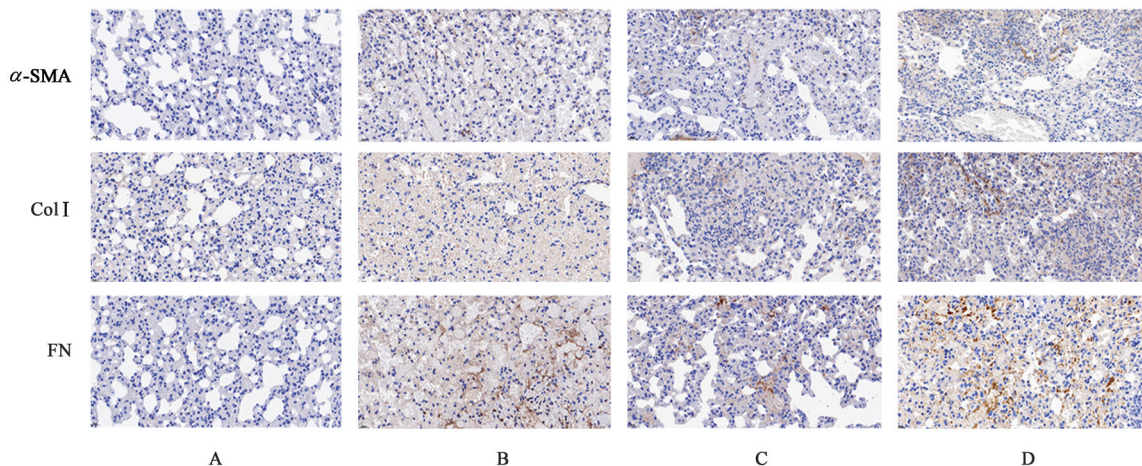


图6 不同造模方法对各组小鼠肺组织 α -SMA、Col I、FN蛋白的表达水平的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 6 Expression levels of α -SMA, Col I, and FN proteins in lung tissue of mice from different treatment groups (IHC, $\times 400$)

3.7 不同造模方法对小鼠肺组织IL-6、TNF- α 和IL-1 β mRNA表达量的影响 Real-time PCR检测结果显示,与Control组比较,Pg组和Pg+CIA组IL-6、TNF- α 和IL-1 β mRNA表达水平显著升高($P<$

0.01),CIA组TNF- β 、IL-1 β mRNA表达水平显著升高($P<0.01$);与Pg组比较,Pg+CIA组IL-6、IL-1 β mRNA表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与CIA组比较,Pg+CIA组TNF- α mRNA表达水平显著升

表9 不同造模方法对各组小鼠 α -SMA、Col I、FN蛋白表达含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 9 Effect of different modeling methods on α -SMA, Col I, and FN protein expression in mouse lung tissue ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	α -SMA	Col I	FN
Control组	0.140±0.018	0.071±0.005	0.037±0.008
Pg组	0.168±0.005	0.109±0.013 ¹⁾	0.120±0.011 ¹⁾
CIA组	0.174±0.007	0.115±0.004 ¹⁾	0.136±0.007 ¹⁾
Pg+CIA组	0.354±0.060 ^{1,2,5)}	0.127±0.009 ^{1,2)}	0.155±0.011 ^{1,2)}

表10 不同造模方法对各组小鼠 α -SMA、Col I、FN的mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 10 Effect of different modeling methods on mRNA expression levels of α -SMA, Col I, FN in mice from different treatment groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	α -SMA mRNA	Col I mRNA	FN mRNA
Control组	1.00±0.10	1.00±0.30	1.00±0.07
Pg组	2.49±0.68 ¹⁾	1.25±0.30 ¹⁾	1.44±0.01 ¹⁾
CIA组	2.62±0.45 ¹⁾	1.41±0.06 ¹⁾	1.87±0.47 ¹⁾
Pg+CIA组	3.52±0.12 ^{1,3,4)}	1.75±0.21 ¹⁾	3.55±0.12 ^{1,3,5)}

高($P<0.01$)。见表11。

表11 不同造模方法对各组小鼠IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 11 Effect of different modeling methods on mRNA expression levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in mice from different treatment groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IL-6 mRNA	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA
Control组	1.00±0.22	1.00±0.14	1.00±0.15
Pg组	1.23±0.07 ¹⁾	2.64±0.28 ¹⁾	1.28±0.10 ¹⁾
CIA组	1.18±0.12	1.41±0.26 ¹⁾	1.55±0.06 ¹⁾
Pg+CIA组	1.52±0.06 ^{1,4)}	2.75±0.04 ^{1,5)}	1.90±0.31 ^{1,3)}

3.8 不同造模方法对血清CCP、Pg和IgG含量的影响 小鼠血清抗体检测结果显示,与Control组比较,Pg+CIA组IgG、CCP、Pg含量显著升高($P<0.01$),CIA组IgG含量显著升高($P<0.01$),Pg组Pg含量显著升高($P<0.01$);与Pg组比较,CIA组IgG含量显著升高($P<0.01$),Pg含量显著降低($P<0.01$);与CIA组比较,Pg+CIA组IgG、CCP、Pg含量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表12。

4 讨论

RA-ILD动物模型目前主要分为两类,一类是RA单纯疾病模型,如CIA、AA和TNF-Tg3647转基因小鼠模型;另一类是复合模型,如CIA结合博来霉素或有机粉尘提取物模型、SKG转基因小鼠结合

表12 不同造模方法对小鼠CCP、Pg、IgG蛋白含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 12 Effect of different modeling methods on CCP, Pg, and IgG protein expression levels in mice from different treatment groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IgG/g·L ⁻¹	CCP/U·mL ⁻¹	Pg/ μ g·L ⁻¹
Control组	2.68±0.98	12.57±4.81	0.79±0.25
Pg组	3.66±1.22	18.95±4.50	1.55±0.36 ¹⁾
CIA组	10.51±2.93 ^{1,3)}	19.18±5.36	0.98±0.32 ³⁾
Pg+CIA组	14.52±4.97 ^{1,3,4)}	28.05±6.38 ^{1,2,4)}	2.19±0.64 ^{1,5)}

酵母多糖模型等。这些动物模型各有特点,其建立条件和模型评价方法也缺乏统一的标准,至今尚未见较完全模拟RA-ILD临床病理特征的理想动物模型,这在一定程度上影响了RA-ILD病理机制的研究以及新药研发的进程。已知Pg可诱导RA患者产生高滴度的自身抗体如抗-CCP抗体,而抗-CCP抗体的过度表达不仅促进RA的炎症进程和骨破坏,还表现为更为显著的关节疼痛症状^[14]。同时,还会引发促纤维化细胞因子和趋化因子的释放,促进成纤维细胞的增殖和向肌成纤维细胞的分化,最终导致肺组织纤维化的发生^[15]。DBA/1小鼠是RA易感动物品系,其所建立的CIA模型是最经典的RA动物模型,关节炎病变明显且发病率高。为此,本研究采用DBA/1小鼠Pg感染加胶原诱导的方法,通过关节、肺部和血清等多部位的样本检测,综合评估模型的可行性和病变特点,为了增加客观性,实验采用单独Pg感染和CIA两组进行对照。

关节炎临床症状观察、组织病理学和影像学检测是检测实验性RA关节病变的常用方法。本研究中,关节炎临床症状评估结果显示,CIA组和Pg+CIA组小鼠关节发病率均为100%,关节红肿、畸形明显,受累肢体数和临床积分均较高,而Pg组未见任何临床症状表现。关节组织病理学和影像学检测结果显示,CIA和Pg+CIA组关节炎炎症浸润、血管翳形成、骨和软骨破坏明显,Pg组未见明显关节病变。提示本实验条件下,胶原和Pg加胶原诱导均可引起严重的关节炎,有别于单纯Pg感染。而与CIA组比较,Pg+CIA组在临床积分、病理和影像学改变方面虽均有加重趋势,但差异无统计学意义,这与文献报道的Pg感染大鼠8个月能直接诱导关节炎^[9]的结果不同。分析其可能原因,一方面是本实验造模条件下,CIA组关节炎发病率100%,疾病严重程度达到平台高峰期,在这个情况下,叠加Pg感染也难以增加疾病严重程度;另一方面本实验Pg感

染的时间短(不足2月),还有大小鼠的种属差别等,故未能很明显观察到Pg加重CIA严重度的现象。当然,血清抗体检测结果显示,Pg+CIA组的IgG水平明显高于CIA组,这在一定程度上也反映了Pg的免疫特性。

RA-ILD是在关节炎症和骨丢失的同时伴有以UIP为主的ILD病变,一般病理表现为肺部炎症和进行性纤维化^[16]。为了更全面观察肺部病变,实验进行了肺组织病理学分析、肺纤维化标志物和炎症因子检测。HE、Masson和IHC染色结果显示,Pg组和CIA组可见肺泡炎症、间质炎症细胞浸润和肺泡壁增厚等病理表现,Pg组还可见少量的胶原纤维着色,而CIA组则未见明显的胶原纤维,肺中Col I和FN蛋白, α -SMA、Col I、FN mRNA,IL-6、TNF- α 和IL-1 β mRNA水平明显升高,与Control组比较差异显著,提示单独Pg感染和胶原诱导关节炎时均可引起小鼠肺部发生病理改变,且以炎症反应为主,相关结果与文献报道的CIA可引起一定程度、自限性的肺部病变但缺乏肺纤维化的情况相符^[4]。Pg+CIA组可见明显的肺泡炎症、间质炎症细胞浸润和肺泡壁增厚等病理表现,肺气管与毛细血管基底膜及其周围胶原纤维程度严重,成纤维细胞标志物 α -SMA和细胞外基质标志物Col I和FN阳性染色和mRNA表达水平升高,IL-6、TNF- α 和IL-1 β mRNA表达水平也明显升高,与Control组、Pg组和CIA组比较均差异明显,提示Pg+CIA可导致小鼠明显的ILD表现,其病变程度比Pg组和CIA组严重,这与本实验中Pg+CIA组血清抗体水平最高的结果相符合,因为高滴度的抗-CCP抗体是RA患者发生ILD的危险因素^[17],也更容易引发关节炎^[18]。

高滴度的ACPA抗体是RA的诊断标志及RA-ILD的预测因子。本研究的血清抗体水平检测结果显示,Pg+CIA组抗-CCP抗体、抗-Pg抗体和IgG含量均最高,CIA组IgG含量及Pg组抗-Pg抗体含量也升高,但升高程度不及Pg+CIA组,提示本实验条件下单独Pg感染可诱导抗-Pg抗体产生,而CIA主要诱导IgG分泌,这与课题组前期的实验结果一致^[19];单独Pg感染和单独CIA均可一定程度诱导抗-CCP抗体产生,但强度比较弱,二者叠加后能放大效应,明显促进抗-CCP抗体生成,是诱导高水平ACPA的比较理想条件,其原因可能和Pg的主要毒力因子Pg肽精氨酸脱亚氨酶能强化内源肽基精氨酸脱亚胺酶4相关的瓜氨酸化,促进抗-CCP抗体产生有关^[16]。新近研究显示,ACPA滴度与RA-ILD发

病密切相关,既可直接导致滑膜细胞迁移和骨丢失^[20-22],也可通过NETs诱导成纤维细胞活化导致肺部纤维化^[23]。联想到本研究中Pg+CIA比单独CIA肺部病变严重的情况,推测血清高水平ACPA确实是加重肺部病变的因素之一。

综上,本研究通过Pg感染、胶原诱导DBA/1小鼠及二者叠加3种方式的对比研究,观察到单独Pg感染可引起肺部炎症病变和血清高水平的抗-Pg抗体,但不能引起明显的关节炎;CIA可引起严重的关节炎和骨破坏及肺部炎症病变,以及高水平的血清IgG抗体,但缺乏明显的纤维化特征;Pg+CIA不仅能导致严重的关节炎和骨破坏,显著的肺部炎症和纤维化病变,还可产生血清高水平的抗-CCP抗体、抗-Pg抗体和IgG抗体。可见,采用Pg感染结合胶原诱导DBA/1小鼠的方法,能建立接近RA和ILD临床病变特征,同时伴有高水平血清抗-CCP抗体的新型RA-ILD动物模型。相关研究将为RA-ILD发病机制探索和新药研发提供实验载体,也为ACPA阳性的RA-ILD动物模型建立提供实验基础和研究参考。当然,本研究还存在一定的局限性,比如Pg感染周期较长,操作过程较复杂等。另外,由于RA-ILD是由遗传和环境因素共同作用的结果,目前仅由Pg感染结合CIA所建立的模型,尚难以复制出临床复杂多元的病理背景,所有均有待进一步的改进和完善。

[利益冲突] 林娜、刘春芳为本刊编委,未参与文章的审校环节,本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] OLIVEIRA R P, RIBEIRO R, MELO L, et al. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease [J]. *Pulmonology*, 2022, 28(2): 113-118.
- [2] RAIMUNDO K, SOLOMON J J, OLSON A L, et al. Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease in the United States: Prevalence, incidence, and healthcare costs and mortality [J]. *J Rheumatol*, 2019, 46(4): 360-369.
- [3] YAN Q, HE L, WANG L, et al. Experimental animal models for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease [J]. *Sci Tradit Chin Med*, 2025, 3(2): 124-136.
- [4] KENNEY H M, WOOD R W, RAMIREZ G, et al. Implementation of automated behavior metrics to evaluate voluntary wheel running effects on inflammatory-erosive arthritis and interstitial lung disease in TNF-Tg mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2023, 25(1): 17.
- [5] JENNING M, MARKLEIN B, YTTERBERG J, et al. Bacterial citrullinated epitopes generated by *Porphyromonas gingivalis* infection-A missing link for ACPA production [J].

- Ann Rheum Dis, 2020, 79(9):1194-1202.
- [6] LUGLI E B, CORREIA R E S M, FISCHER R, et al. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17(1):9.
- [7] NANNINI C, MEDINA-VELASQUEZ Y F, ACHENBACH S J, et al. Incidence and mortality of obstructive lung disease in rheumatoid arthritis: A population-based study[J]. Arthritis Care Res, 2013, 65(8):1243-1250.
- [8] KIM Y, YANG H I, KIM K S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis-interstitial lung disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19):14509.
- [9] COURBON G, RINAUDO-GAUJOUS M, BLASCO-BAQUE V, et al. Porphyromonas gingivalis experimentally induces periodontitis and an anti-CCP2-associated arthritis in the rat[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(5):594-599.
- [10] JUNG H, JUNG S M, RIM Y A, et al. Arthritic role of Porphyromonas gingivalis in collagen-induced arthritis mice [J]. PLoS One, 2017, 12(11):e0188698.
- [11] 杨超, 仲格嘉, 刘春芳, 等. 抗瓜氨酸化蛋白抗体高表达类风湿关节炎动物模型的研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(18):2930-2937.
- YANG C, ZHONG G J, LIU C F, et al. Research progress of rheumatoid arthritis animal model with high expression of anti-citrullinated protein antibodies [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(18):2930-2937.
- [12] YANG C, HU Z, WANG L, et al. Porphyromonas gingivalis with collagen immunization induces ACPA-positive rheumatoid arthritis in C3H mice [J]. Clin Immunol, 2024, 258:109859.
- [13] BAI R F, PEI J Q, PE S Q, et al. LPA2 alleviates septic acute lung injury via protective endothelial barrier function through activation of PLC-PKC-FAK [J]. J Inflamm Res, 2023, 16:5095-5109.
- [14] CATRINA A, KRISHNAMURTHY A, RETHI B. Current view on the pathogenic role of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis [J]. RMD Open, 2021, 7(1):e001228.
- [15] DIESLER R, COTTIN V. Pulmonary fibrosis associated with rheumatoid arthritis: From pathophysiology to treatment strategies[J]. Expert Rev Respir Med, 2022, 16(5):541-553.
- [16] DAI Y, WANG W, YU Y, et al. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: An overview of epidemiology, pathogenesis, and management [J]. Clin Rheumatol, 2021, 40(4):1211-1220.
- [17] NATALINI J G, BAKER J F, SINGH N, et al. Autoantibody seropositivity and risk for interstitial lung disease in a prospective male-predominant rheumatoid arthritis cohort of U. S. Veterans [J]. Ann Am Thorac Soc, 2021, 18(4):598-605.
- [18] GROSSE J, ALLADO E, ROUX C, et al. ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis: Two distinct erosive disease entities on radiography and ultrasonography [J]. Rheumatol Int, 2020, 40(4):615-624.
- [19] 杨超, 胡智星, 高双荣, 等. 四种不同抗原诱导的类风湿关节炎小鼠模型的病变特点比较研究[J]. 药学报, 2023, 58(6):1586-1595.
- YANG C, HU Z, GAO S, et al. Comparison of pathological features in mouse models of rheumatoid arthritis induced by four different antigens [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(6):1586-1595.
- [20] KRISHNAMURTHY A, JOSHUA V, HAJ HENSVOLD A, et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(4):721-729.
- [21] SUN M, RETHI B, KRISHNAMURTHY A, et al. Anticitrullinated protein antibodies facilitate migration of synovial tissue-derived fibroblasts [J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(12):1621-1631.
- [22] ZHAO F, ZHANG W D, JIANG Y L, et al. Risk factors of patients with interstitial lung disease complicated with rheumatoid arthritis [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(1):221-226.
- [23] AKIYAMA M, KANEKO Y. Pathogenesis, clinical features, and treatment strategy for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(5):103056.

[责任编辑 张丰丰]