

孙庆云,闫振宇. 血友病鼠关节病模型构建研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 423-428.

Sun QY, Yan ZY. Progress in construction of a hemophilic arthropathy mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 423-428.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.020

血友病鼠关节病模型构建研究进展

孙庆云¹, 闫振宇^{1,2*}

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

【摘要】 血友病性关节病是由自发性关节内出血及反复关节内血肿引起, 是以慢性疼痛, 关节损伤, 生活质量下降为主要临床表现的一种衰竭性疾病。其生物学机制尚不完全清楚。目前血友病的转化动物模型对于确定该疾病的病理生理学及其并发症具有重要价值。因此, 需要建立一种血友病性关节病模型, 以便进一步研究血友病性关节病的病理生理机制以及潜在的干预治疗。血友病鼠因便于运输, 便于构建等优势成为研究者青睐的动物模型, 其构建的血友病性关节病模型也为今后的临床研究提供了基础。为此, 将对血友病鼠关节病模型的构建及研究展开叙述。

【关键词】 动物模型; 关节出血; 血友病; 鼠属

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 03-0423-06

Progress in construction of a hemophilic arthropathy mouse model

SUN Qingyun¹, YAN Zhenyu^{1,2*}

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China.

2. the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

Corresponding author: YAN Zhenyu. E-mail: hbyzy2011@163.com

【Abstract】 Hemophilic arthropathy is caused by spontaneous intra-articular hemorrhage and repeated intra-articular hematomas. Chronic pain, joint damage and decreased quality of life are the main clinical manifestations of hemophilic arthropathy. The biological mechanisms are not fully understood. Current translational animal models of hemophilia are of great value in determining the pathophysiology of the disease and its complications. Therefore, a hemophilic arthropathy mouse model was established to further investigate the pathophysiological mechanisms of hemophilic arthropathy as well as potential intervention treatments. A murine model of hemophilia provides advantages as an animal model for research because of easy transportation and easy construction, and its constructed hemophilic arthropathy model also provides the basis for future clinical research. This review will describe the construction and investigation of a mouse model of hemophilia arthropathy.

【Keywords】 animal model; hemarthrosis; hemophilia; rattus

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

血友病是一种遗传性 X 染色体相关出血性疾病, 主要是由 FVIII 或 FIX 异常引起。全球约有 40 万人受累, 男性发病率远大于女性, 大约每 5000 个男性新生儿中有 1 例为血友病 A 患者, 大约每 30000 个男性新生儿中有 1 例为血友病 B 患者^[1]。在临床上, 血友病 A

和 B 难以区分, 诊断必须通过分析特异性因子来确定, 根据 VIII 因子和 IX 因子的水平分为: 重型 ($\leq 1\%$)、中型 ($2\% \sim 5\%$)、轻型 ($6\% \sim 40\%$)^[2]。重型血友病常表现为为关节和肌肉自发性出血, 复发性出血导致滑膜肥厚、软骨损伤、关节间隙丢失和骨质改变, 靶关节活

[基金项目] 2019 年河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目。

Funded by the Government Funded Clinical Excellence Training Program of Hebei Province.

[作者简介] 孙庆云 (1993—), 女, 硕士研究生, 专业: 血液内科学。Email: 1084689337@qq.com

[通信作者] 闫振宇 (1974—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 止血与血栓。Email: hbyzy2011@163.com

动的减少导致肌肉持续性萎缩、关节强直、骨质疏松,最终导致血友病性关节炎^[3-7]。

血友病性关节炎发病机制复杂,包括软骨代谢紊乱,软骨细胞凋亡加速,滑膜细胞异常增殖以及滑膜液中炎性分子水平增加等,同时,其发病的危险因素也较多,例如治疗情况,功能锻炼,肥胖,年龄等^[8]。其患者的四肢任何关节都可发生关节积血,其中膝、肘和踝关节居多,而髋部、肩部和腕部受累较少见^[9]。从长期来看,治疗不当的患者常常会因进展性关节炎而丧失活动能力^[10]。目前血友病性关节炎的治疗包括预防治疗,物理治疗,关节腔穿刺,关节置换术等^[11]。对于血友病,最主要的治疗还是预防治疗,如果不进行预防,大多数重型血友病患者将在 2 ~ 5 岁之间发生关节内出血,并在其二三十岁时发生血友病性关节炎^[12]。Manco-Johnson 等^[13]发现血友病患者关节或软骨下骨中的慢性微出血会导致没有临床证据的关节恶化,而预防治疗可以阻止这一亚临床过程。主要的检测方法是放射学或磁共振成像(MRI)来评估关节的损伤程度,当显示软骨下囊肿、表面糜烂或关节间隙变窄即可定义为关节损伤,根据关节的出血次数和关节结构的改变,得知预防治疗和按需治疗均有不同程度的关节结构改变,但预防治疗的关节结构的正常率大于按需治疗的患者。且有研究表明,90%以上接受预防性治疗的患者在 30 ~ 40 岁时出现关节病变^[14-15]。随着进行性关节病患者的健康相关生存质量(HRQoL)的恶化^[16-17],以及为缓解疼痛和改善关节功能而进行的骨科干预治疗所需的相关费用的高昂,使血友病性关节炎的预防治疗成为血友病治疗的主要目标。

目前,胶原诱导性关节炎模型是国际上公认性关节炎模型^[18]。但由于血友病的自发性出血,不适于这种构建方式。目前已经成功构建的血友病动物模型包括血友病犬、绵羊、大鼠、小鼠和猪,但其中血友病犬、绵羊、猪多由自发性基因突变形成,而血友病鼠通常是通过破坏靶向基因而构建相应的模型^[19]。在相关研究中,犬类、绵羊、猪类模型容易受到实验动物数量的限制,而兔类模型容易受到模型构建的限制^[20],因而通过使用血友病鼠类模型,创建一个新的血友病性关节炎动物模型成为研究者的最佳选择,以便进一步研究血友病性关节炎的发病机制以及预防治疗。

1 血友病性关节炎小鼠模型的建立

2008 年, Hakobyan 等^[21]通过使用 F8 基因敲除的

重型血友病 A 小鼠(E16 FVIII B6; 129S4-F8^{tm1kz}/J)^[22-23], 由 Dr Haig Kazazian (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) 提供, F9 基因敲除的重型血友病 B 小鼠(B6; 129P2-F9^{tm1Dws}/J)^[24], 由 Darrel Stafford (Department of Biology, University of North Carolina at Chapel Hill) 提供, 和野生型小鼠(C57BL/6J), 购买自 Jackson 实验室(Bar Harbor, ME, USA)。三种小鼠菌株成功构建血友病性关节炎小鼠模型。该研究得到了 Institutional Animal Care 和 Use Committee of RUSH University 的审查和批准, 实验中所有小鼠都按照委员会的指导方针进行了维护和治疗。A、B 型血友病小鼠关节病模型的构建方法相同。在实验中通过用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉 3 ~ 4 月龄的小鼠, 剪除双侧膝关节毛发, 使用 30 g 针在每只小鼠的右膝关节囊腔骨下穿刺一次出血。部分小鼠在关节损伤前接受人重组因子 VIII (recombinant human coagulation VIII, rhFVIII) 静脉注射, 剂量为 280 U/kg (相当于 100% 校正), 每只动物左膝作为未受影响的对照组, 检查被穿刺关节是否出血, 并在穿刺后 24 h 皮下注射止痛剂。动物在受伤后特定时间被处死, 并测量小鼠膝关节从外侧到内测的最大直径^[20], 随后对小鼠的膝关节进行组织学检查, 并进行数字成像、X 线平片和显微计算机断层扫描成像, 并对结果进行分析。结果显示在单个且大量的关节积血后, 血友病小鼠在 14 d 后发生关节病, 显微 CT 也证明关节结构损伤与 Manco-Johnson 的研究结果一致^[13]。通过这些研究指标初步证明, 血友病性关节炎小鼠模型的成功构建。

2 血友病性关节炎小鼠模型的应用研究

血友病性关节炎小鼠模型的成功构建, 推动了研究者对于该种疾病的研究进展, 为此后关于该疾病的各项实验, 提供了必要的动物模型支持条件。2008 年, Sun 等^[25]使用该模型, 向小鼠关节内或静脉注射人凝血因子 IX (human coagulation IX, hFIX), 发现接受关节内注射的小鼠免于滑膜炎的侵害。随后在此基础上, 他们将表达 hFIX 的腺相关病毒(AAV) 基因转移载体注射到血友病 B 小鼠的膝关节, 结果显示用载体治疗的关节在损伤后 2 周出现的病理改变明显减少, 证明在没有循环 FIX 的情况下, 血管外因子活性和关节导向基因转移可改善血友病性关节炎。2013 年, Coeleveld 等^[26]在细胞因子的联合应用在早期软骨损

伤过程中是否有效的实验研究中,通过针刺诱导血友病小鼠关节出血,将 IL-4 和 IL-10 的混合溶剂和对照溶剂分别注射到关节腔内,通过观察 35 d 后关节的损伤程度,同时检测关节退化所需的时间,证明关节出血后单次关节内注射 IL-4 和 IL-10 的混合试剂可限制血液诱导的软骨退变,而且提高两种因子的生物利用度会提高其在软骨退变中的保护作用。由于许多编码细胞因子、生长因子和缺氧调节因子的基因均可被 NF- κ B 激活,且其中许多基因是关节疾病发病机制的一部分,因此推断 NF- κ B 相关通路可能在血液诱导的关节损伤中起关键作用。为进一步了解其作用机制,Sen 等^[27]在 2013 年使用血友病性关节病小鼠模型,监测伤后一定时间内 NF- κ B 相关因子的表达,结果发现显著上调,由此表明 NF- κ B 相关的信号通路参与血友病性关节病的发生。随后在 2016 年, Hakobyan 等^[28]再次使用血友病小鼠关节积血模型,对可见出血评估(VBA),关节直径(JD),关节外出血评分(EBS)和关节内出血评分(IFS)4 项指标进行了评估,将 EBS 和 IFS 两项指标总结为关节出血评价系统(BSS),为临床前止血药物的开发提供了一个新的、有价值的补充。2018 年, Haxaire 等^[29]发现针刺诱导关节出血导致 FVIII 缺陷小鼠损伤关节中 TNF- α 水平升高,且 TNF- α 或 iRhom2 失活可减少血友病性关节病小鼠模型中出现的骨质减少和滑膜炎,由此可知血液进入关节激活了 iRhom2/ADAM17/TNF- α 途径,从而导致小鼠骨质减少和滑膜炎,因此,该促炎信号通路成为预防血友病关节病患者骨质疏松和关节损伤的新靶点。

上述多项研究中应用了血友病性关节病小鼠模型,说明其模型适用于该疾病实验研究,具有可用性。其体型大小使其易于运输。但是不可否认,其仍具有尚未完善的部分。小鼠模型的主要缺点是缺乏自发性出血表型,并且只能分析小体积的血液样本,这限制了该模型的适用性,从而无法深入了解再出血的机制^[30]。虽然血友病犬表现自发性出血表型,且与人类有明显的 F8 基因同源性,每年出血发作 1 ~ 5 次,但是其繁殖率较低并且支持研究所需的设施昂贵,并且很难在研究中接触到大量动物。血友病绵羊与血友病猪具有体型和自发性出血表型的优势,但管理起来相当费力^[19,31-32]。因此,就要求其他合适的关节病动物模型的构建,使其更适于其他深入研究。有研究表明^[30],血友病大鼠与人类血友病患者具有相似的表型,表现为血液循环受损和自发性肌肉骨骼出血,与血友病小鼠

相比,血友病大鼠的身体和血容量约为小鼠的 10 倍,且允许更大和更频繁的血液采样。根据指导方针^[33],25 g 的小鼠一周内只能采集 135 IL 的血液样本,而 250 g 的大鼠一周可以采集 1200 IL 的血液样本,这有助于在纵向疾病进展研究中大鼠作为自身基线对照,从而改进研究设计,并减少所需要的动物数量。此外,大鼠具有与小鼠相同的繁殖和住房优势,且大鼠体型较大也可进行临床相关成像。由此可知,血友病性关节病大鼠模型将更受到研究者的青睐。

3 血友病性关节病大鼠模型的构建

2016 年, Sørensen 等^[34]人通过使用 13 ~ 15 周龄的 F8^{-/-}大鼠(SD-F8^{tm1sage}) 在 Sprague Dawley 背景下,饲养于 Novo Nordisk A/S(Maaloev, Denmark),和野生型大鼠成功构建血友病关节病大鼠模型。该研究得到了 Danish Ministry of Justice 的批准,实验中所有动物都根据 Danish Animal Experiments Council 的指导方针进行。大鼠饲养在标准条件下,光照/黑暗周期为 12 h/12 h,温度为 20 ~ 23 °C,相对湿度为 30% ~ 60%,自由进食和饮水,每天监测出血体征。F8^{-/-}大鼠的数据曾报道过,证实 F8^{-/-}大鼠是血友病 A 的转化动物模型^[30]。在实验中用 5%异氟烷、0.7 L/min O₂、0.3 L/min N₂O 诱导,2%异氟烷、0.7 L/min O₂、0.3 L/min N₂O 维持麻醉,在吸入麻醉下进行所有入侵手术。将 20 只野生型大鼠和 60 只 F8^{-/-}大鼠,随机分配到两个损伤类型,一组(10 只野生型大鼠和 40 只 F8^{-/-}大鼠)在第 0 天接受单次针刺诱导出血,在第 14 天处死。另一组(10 只野生型大鼠和 20 只 F8^{-/-}大鼠)在第 0 天和第 14 天分别接受针刺诱导出血,在第 28 天处死,目的是研究再次出血是否会加重血友病性关节病的进展。在接受针刺诱导出血前,F8^{-/-}大鼠按 1:1 随机分配,接受 300 IU/kg rhFVIII 或者相同体积的缓冲液治疗。rhFVIII 的剂量是基于 F8^{-/-}大鼠血浆中 APTT 的体外正常化^[30],野生型大鼠给予缓冲液。然后对大鼠进行麻醉,静脉注射 rhFVIII 或缓冲液后,皮下注射丁丙诺啡 0.03 mg/kg 镇痛,有研究表明丁丙诺啡作为镇痛剂不会影响膝关节出血后的炎症影响^[35]。剪掉左膝上的毛发,用 30 g 针穿过髌骨韧带,引发关节出血。在接下来的 7 d,在饮用水中添加 6 mg/L 的丁丙诺啡。

根据慢性关节病变评分系统^[36],组织学评估及日常评估得出,所有未经治疗的血友病关节病动物切片的组织病理学评估符合血友病^[37-40]。预防性使用

rhFVIII 治疗显著降低了关节的病理,并显示关节出血临床症状的减少,从而证实了 F8^{-/-}大鼠作为血友病关节病相关模型的潜力。初步证明血友病性关节病大鼠模型构建成功。

4 血友病性关节病大鼠模型的应用研究

众所周知,凝血因子 VIII 替代治疗血友病 A 最严重并发症是产生中和抗体,为进一步研究出血是否会促进抑制物的形成,2016 年, Lövgren 等^[41]将血友病大鼠分为两组,其中一组接受针刺出血,另一组作为对照,随后均给予 rhFVIII 治疗,通过分析结果证明关节出血后给予 rhFVIII 治疗可加强抑制物的形成,这表明出血是潜在的危险信号,即 rhFVIII 替代疗法同时并发出血可增加抑制物的形成。随后 Christensen 等^[42]在 2017 年使用体内 US (Ultrasonography, US) 和体外 μ CT 检测血友病性关节病大鼠的膝关节,观察到与血友病性关节病相关的病理,并且 μ CT 确定的疾病严重程度与组织病理学之间存在强相关性, rhFVIII 治疗可降低两种成像技术确定的病理,证明 US 和 μ CT 是检测血友病性关节病的合适成像技术,可用于疾病进展的纵向研究。研究发现,大多数产生抑制物的血友病患者不能诱导免疫耐受,需要旁路制剂进行长期出血管理。重组人活化凝血因子 VII (recombinant human coagulation VII, rhFVIIa) 是血友病抑制物患者出血的按需旁路止血剂。预防性使用 rhFVIIa 可以使产生抑制物的患者得到持续的止血治疗,但在这种情况下, rhFVIIa 循环水平和临床结果的关系仍不清楚。为了解决这一问题, Zintner 等^[43]在 2019 年使用该大鼠模型,通过腺相关病毒(AAV)基因转移模拟了大鼠 FVIIa 转基因的活化因子 VII 预防,与未经处理的血友病性关节病大鼠相比,重组大鼠 FVIIa 按需给药可缓解出血。当大鼠 FVIIa 转基因水平 ≥ 708 ng/mL 可减少血友病大鼠的出血,而水平 > 1250 ng/mL 则可消除出血。这些数据首次确定了在模拟 FVIIa 预防的环境中,血友病性关节病动物的 FVIIa 循环抗原水平和出血比例之间的关系。

上述各项研究表明,血友病性关节病大鼠模型的成功构建为以后的一系列深入研究提供了必要前提。首先,血友病性关节病大鼠模型可表现出与人类类似的自发性出血表型,其次,大鼠的繁殖优势可使我们快速获得具有统计学意义的大队

列数据,以识别治疗引起的临床变化。相关优势使得该模型有助于对血友病性关节病的发病机制及治疗干预的研究。但是,由于是自发性出血模型,非预期出血可能给实验带来偏倚,且出血量大小未知,这是在以后的实验中需要克服的一大难题。

5 总结及展望

目前血友病性关节病是血友病最严重的并发症,其病理生理机制尚不完全清楚,因此构建相应的动物模型,进一步研究其机制,成为了研究者最关注的问题。实验鼠因其自身优势,如繁殖量大,便于管理等成为实验中最常用的实验动物。血友病小鼠关节病模型已成功构建,但小鼠采血量小且缺乏自发性出血表型,进而选择体积相对较大的 SD 大鼠,但因其自发性出血,出血量大小未知,也为实验带来了一定的困难。虽然各种动物模型均有利弊,但是实验动物模型为实验研究带来的优势不容小觑。总之,建立一种生理指标稳定、模型构建简单、且易操作的血友病性关节病模型有助于我们对血友病性关节病的发病机制、病理改变的进一步认知,也为新型疗法的开发比如基因治疗提供了可能,并且为今后的临床研究打下了坚实的基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] Bhatnagar N, Hall GW. Major bleeding disorders: diagnosis, classification, management and recent developments in haemophilia[J]. Arch Dis Child, 2018, 103(5):509-513.
- [2] White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, et al. Definitions in hemophilia: recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis[J]. Thromb Haemost, 2001, 85(3):560.
- [3] Jansen NW, Rosendaal G, Lefeber FP. Understanding haemophilic arthropathy: an exploration of current open issues[J]. Br J Haematol, 2008, 143(5):632-640.
- [4] Simpson ML, Valentino LA. Management of joint bleeding in hemophilia[J]. Expert Rev Hematol, 2012, 5(4):459-468.
- [5] Vanderhave KL, Caird MS, Hake M, et al. Musculoskeletal care of the hemophiliac patient[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2012, 20(9):553-563.
- [6] Carcao MD, Aledort L. Prophylactic factor replacement in hemophilia[J]. Blood Rev, 2004, 18(2):101-113.

- [7] Hoots WK. Pathogenesis of hemophilic arthropathy [J]. *Semin Hematol*, 2006, 43(Suppl 1):S18-S22.
- [8] 郭文娟,赵永强.血友病关节病的发病机制及危险因素[J].血栓与止血学,2012,18(1):42-44.
Guo WJ, Zhao YQ. Haemophilic Arthropathy: Pathogenesis and Risk Factors[J]. *Chin J Thromb Hemostasis*, 2012, 18(1):42-44.
- [9] Goto M, Takedani H, Nitta O, et al. Joint function and arthropathy severity in patients with hemophilia[J]. *J Jpn Phys Ther Assoc*, 2015, 18(1):15-22.
- [10] Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B[J]. *Lancet*, 2003, 361(9371):1801-1809.
- [11] 兰霞, 苏庸春. 血友病性骨关节病的诊断与治疗进展[J]. 儿科药科学杂志, 2015, 21(8): 62-64.
Lan X, Su YC. The progress of diagnosis and treatment of hemophilic arthropathy [J]. *J Pediatr Pharm*, 2015, 21(8): 62-64.
- [12] Rodriguez-Merchan EC, Jimenez-Yuste V, Aznar JA, et al. Joint protection in haemophilia [J]. *Haemophilia*, 2011, 17 (Suppl 2):1-23.
- [13] Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(6):535-544.
- [14] Oldenburg J. Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens [J]. *Blood*, 2015, 125(13):2038-2044.
- [15] Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group [J]. *J Intern Med*, 1994, 236(4):391-399.
- [16] Gringeri A, Lundin B, von Mackensen S, et al. A randomized clinical trial of prophylaxis in children with hemophilia A (the ESPRIT Study) [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(4):700-710.
- [17] Klamroth R, Pollmann H, Hermans C, et al. The relative burden of haemophilia A and the impact of target joint development on health-related quality of life: results from the ADVATE Post-Authorization Safety Surveillance (PASS) study [J]. *Haemophilia*, 2011, 17(3):412-421.
- [18] 肖智勇, 张令令, 张小锐, 小鼠胶原诱导性关节炎模型的建立及其免疫学变化研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(10):136-139.
Xiao ZY, Zhang LL, Zhang XY. Establishment and Immunological Evaluation of Mouse Model of Collagen Induced Arthritis [J]. *Chin J Comp Med*, 2011, 21(10):136-139.
- [19] Lozier JN, Nichols TC. Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. [J]. *Semin Hematol*, 2013, 50(2):175-184.
- [20] Valentino LA, Hakobyan N, Kazarian T, et al. Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of a murine model of human factor VIII deficiency [J]. *Haemophilia*, 2004, 10(3):280-287.
- [21] Hakobyan N, Enockson C, Cole AA, et al. Experimental haemophilic arthropathy in a mouse model of a massive haemarthrosis: gross, radiological and histological changes [J]. *Haemophilia*, 2008, 14(4):804-809.
- [22] Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, et al. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A [J]. *Nat Genet*, 1995, 10(1):119-121.
- [23] Bi L, Sarkar R, Naas T, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies [J]. *Blood*, 1996, 88(9):3446-3450.
- [24] Lin HF, Maeda N, Smithies O, et al. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B [J]. *Blood*, 1997, 90(10):3962-3966.
- [25] Sun J, Hakobyan N, Valentino LA, et al. Intraarticular factor IX protein or gene replacement protects against development of hemophilic synovitis in the absence of circulating factor IX [J]. *Blood*, 2008, 112(12):4532-4541.
- [26] van Meegeren MER, Roosendaal G, Coeleveld K, et al. A single intra-articular injection with IL-4 plus IL-10 ameliorates blood-induced cartilage degeneration in haemophilic mice [J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(4):515-520.
- [27] Sen D, Chapla A, Walter N, et al. Nuclear factor (NF)- κ B and its associated pathways are major molecular regulators of blood-induced joint damage in a murine model of hemophilia [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(2):293-306.
- [28] Hakobyan N, Valentino LA, Cong L, et al. Haemarthrosis model in mice: BSS-Bleeding Severity Score assessment system [J]. *Haemophilia*, 2016, 22(5):790-798.
- [29] Haxaire C, Hakobyan N, Pannellini T, et al. Blood-induced bone loss in murine hemophilic arthropathy is prevented by blocking the iRhom2/ADAM17/TNF α pathway [J]. *Blood*, 2018, 132(10):1064-1074.
- [30] Nielsen LN, Wiinberg B, Hager M, et al. A novel F8 $^{-/-}$ rat as a translational model of human hemophilia A [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(8):1274-1282.
- [31] Booth CJ, Brooks MB, Rockwell S, et al. WAG-F8(m1Ycb) rats harboring a factor VIII gene mutation provide a new animal model for hemophilia A [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(11):2472-2477.
- [32] Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, et al. Porcine model of hemophilia A [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49450.
- [33] Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes [J]. *J Appl Toxicol*, 2001, 21(1):15-23.
- [34] Sorensen KR, Roepstorff K, Wiinberg B, et al. The F8 $^{-/-}$ rat as a model of hemophilic arthropathy [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(6):1216-1225.
- [35] Groth M, Kristensen A, Ovlisen K, et al. Buprenorphine does not impact the inflammatory response in haemophilia A mice with

- experimentally-induced haemarthrosis[J]. Lab Anim, 2014, 48(3):225-236.
- [36] Valentino LA, Hakobyan N. Histological changes in murine haemophilic synovitis: a quantitative grading system to assess blood-induced synovitis[J]. Haemophilia, 2006, 12(6):654-662.
- [37] Christensen KR, Kjelgaard-Hansen M, Nielsen LN, et al. Rapid inflammation and early degeneration of bone and cartilage revealed in a time-course study of induced haemarthrosis in haemophilic rats[J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58(4):588-599.
- [38] Speer DP. Early pathogenesis of hemophilic arthropathy. Evolution of the subchondral cyst[J]. Clin Orthop Relat Res, 1984, (185):250-265.
- [39] Wyseure T, Mosnier LO, von Drygalski A. Advances and challenges in hemophilic arthropathy[J]. Semin Hematol, 2016, 53(1):10-19.
- [40] Valentino LA. Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(9):1895-1902.
- [41] Lövgren KM, Søndergaard H, Skov S, et al. Joint bleeds increase the inhibitor response to human factor VIII in a rat model of severe haemophilia A[J]. Haemophilia, 2016, 22(5):772-779.
- [42] Christensen KR, Roepstorff K, Petersen M, et al. Visualization of haemophilic arthropathy in F8^{-/-} rats by ultrasonography and micro-computed tomography[J]. Haemophilia, 2017, 23(1):152-162.
- [43] Zintner SM, Small JC, Pavani G, et al. Gene-based FVIIa prophylaxis modulates the spontaneous bleeding phenotype of hemophilia A rats[J]. Blood Adv, 2019, 3(3):301-311.

[收稿日期] 2019-12-30