

蛋白聚糖 - Aggrecan G₁ 区诱导小鼠脊柱炎和骶髂关节炎模型的建立

韩 青 梁 强 吴振彪 朱 平

摘 要 **目的** 建立强直性脊柱炎 BALB/c 小鼠实验动物模型,探讨人 Aggrecan G₁ 区纯化蛋白在脊柱炎和骶髂关节炎发病中的作用。**方法** 人 Aggrecan G₁ 纯化蛋白和弗氏佐剂免疫 BALB/c 小鼠,诱导产生脊柱炎和骶髂关节炎,建立强直性脊柱炎实验动物模型。采用 Micro-CT 对小鼠骨骼进行 3D 重建和组织病理学方法鉴定脊柱炎小鼠的发病程度和病理学特征。**结果** 用人 Aggrecan G₁ 区纯化蛋白和弗氏完全佐剂免疫后,实验小鼠脊柱炎和骶髂关节炎的发生率分别为 46% 和 9%。组织病理学显示,椎间盘间隙变窄,局部大量软骨细胞聚集,骨赘形成。micro-CT 3D 重建显示,椎间盘间隙变窄,骶髂关节面骨侵蚀。**结论** 成功建立和鉴定了人 Aggrecan G₁ 区纯化蛋白诱导的小鼠脊柱炎实验动物模型,为深入研究强直性脊柱炎的发病机制奠定实验基础。

关键词 强直性脊柱炎 动物模型 蛋白聚糖 Aggrecan

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.006

Induction of Spondylitis and Sacroiliitis in Mice by the G₁ Domain of the Proteoglycan Aggrecan. Han Qing, Liang Qiang, Wu Zhenbiao, et al. Department Clinical Immunology, Xijing Hospital, Shaanxi 710032, China

Abstract Objective To set up ankylosing spondylitis BALB/c mice experimental animal model and discuss the Aggrecan G₁ purified protein in the role of spondylitis and sacroiliitis. **Methods** Human - purified Aggrecan G₁ domain and FCA were injected into BALB/c mice to induce spondylitis and sacroiliitis. Spondylitis and sacroiliitis were determined by pathological examination and radiology. **Results** It was shown that immunity to human - purified Aggrecan G₁ domain resulted in spondylitis in the lumbar spine and sacroiliitis in 46% and 9% mice respectively. Accumulation of chondrocytes was observed in spinal intervertebral disc and the rodent sacroiliac joints. **Conclusion** We successfully established and identified Aggrecan G₁ area with purified protein induced spondylitis experimental animal model of mice, which will help to probe the further research on the pathogenesis ankylosing spondylitis.

Key words Spondylitis; Ankylosing; Disease models; Proteoglycans; Aggrecan

强直性脊柱炎(AS)是一种主要累及骶髂关节、脊柱的慢性进行性炎性疾病,严重者可致脊柱畸形和关节强直^[1,2]。临床主要表现为腰、背、颈、臀、髋部疼痛以及关节肿痛,严重影响患者生存质量^[3,4]。蛋白聚糖可能作为一种自身抗原参与了包括 AS 在内的某些关节炎性疾病的发病过程。本研究拟探讨蛋白聚糖 Aggrecan G₁ 区在 BALB/c 动物模型中对脊柱和骶髂关节发病的作用,并试图为强直性脊柱炎发病机制的研究提供一种以中轴脊柱发病为特征的动物

模型。

材料与方法

1. 实验动物:雌性 BALB/c 小鼠(6 周龄),体重 20 ± 2g,购自中国人民解放军第四军医大学动物实验中心。

2. 抗原制备:本实验的关节软骨来源于骨关节炎患者膝关节置换术后的关节软骨,经胍盐溶液萃取,软骨素酶 ABC、β-牛乳糖苷酶蛋白酶去除侧链,蛋白酶双消化处理后,4℃ 高速离心透析^[5,6]。关节软骨的胍的萃取采用氯化铯密度梯度离心法,样品冻干,确定 Aggrecan G₁ 化学成分,用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳非还原电泳鉴定纯度,及酶切之后产生的角质素和硫酸软骨素,将合并目标组分用超滤离心管将其浓缩,基质金属蛋白酶酶切获得 G₁ domain,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量,

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”计划项目(2015CB553704)

作者单位:710032 西安,中国人民解放军第四军医大学西京医院临床免疫科(韩青、吴振彪、朱平);国家分子医学转化科学中心-临床分子医学研究所(韩青、梁强、吴振彪、朱平);细胞工程中心(梁强)

通讯作者:朱平,电子信箱:zhuping@fmmu.edu.cn

标准曲线用牛血清蛋白,计算目标蛋白的浓度。高效液相色谱法、Superdex 200 分子筛纯化 Aggrecan G₁。

3. 免疫动物:模型组为阳性对照组($n = 30$);卵清蛋白组为阴性对照组($n = 30$)。实验动物选用基因易感 BALB/c 雌性小鼠(6 周)^[7]。给模型组腹腔抗原注射 100 μ g 蛋白聚糖(溶于 100 μ l 完全弗氏佐剂),同样剂量的蛋白聚糖(溶于 100 μ l 不完全弗氏佐剂),分别于第 0、3、6 周腹腔注射^[7,8]。阴性对照组给予腹腔注射非软骨相关抗原-卵清蛋白剂量、时间同模型组。

4. 组织病理学和放射学检查:于第 3 次免疫后 36 周取小鼠的脊柱、骶髂关节和外周关节(膝、踝关节)标本进行组织病理学和免疫组织化学检查,观察

细胞浸润、软骨和骨侵蚀的情况。用于组织病理学检查的组织标本为冠状和矢状切片,组织先用多聚甲醛溶液固定,然后用 EDTA 脱钙,最后用苏木素和伊红(HE)染色,镜下观察并行放射学检测^[7]。

结 果

1. 外周关节炎:各组动物均未出现外周关节红肿,病理学检查亦未发现外周关节的滑膜和软骨的炎性细胞浸润。

2. 脊柱炎:注射纯化后人 Aggrecan G₁ 后,46% 的雌性 BALB/c 小鼠出现了病理学上的脊柱炎表现,椎间盘聚集大量软骨细胞,椎间隙变窄甚至融合、骨赘形成(图 1)。

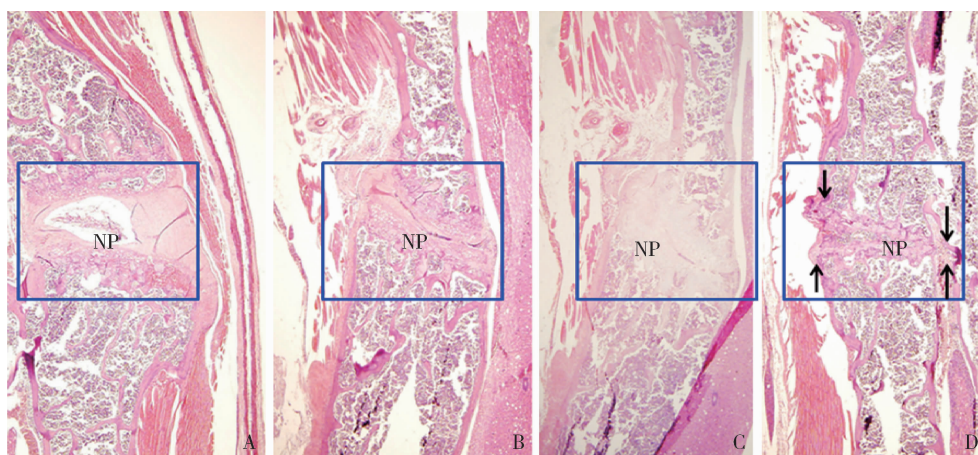


图 1 模型组小鼠与正常小鼠脊柱切片病理结果比较(HE, ×100)

蛋白聚糖免疫诱导 BALB/c 小鼠产生脊柱炎的病理改变:A. 正常小鼠椎间盘(方框所示);B. 模型组小鼠椎间隙变窄(方框所示);C. 模型组小鼠椎间隙明显变窄甚至消失(方框所示);D. 模型组小鼠脊柱强直,骨赘形成(方框中箭头所示);NP: 髓核

3. 骶髂关节炎:模型组小鼠出现脊柱炎的同时 9% 的雌性小鼠也出现了骶髂关节的侵蚀和破坏。micro-CT 3D 重建表现为骶髂关节骨质疏松、骨侵蚀、破坏(图 2)。

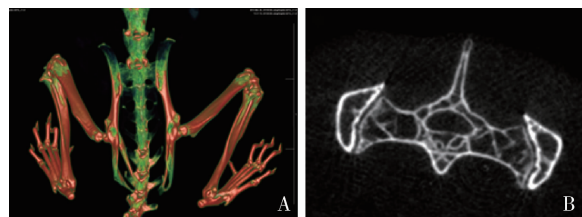


图 2 micro-CT 骶髂关节 3D 重建

A. 骶髂关节(绿色)显示骨质疏松;B. 左侧骶髂关节骨侵蚀、破坏(Ⅲ级),右侧骶髂关节轻度骨侵蚀(Ⅱ级)

讨 论

AS 的发病机制至今尚不清楚,主要以中轴脊柱、骶髂关节病变为主^[9,10]。15% 的脊柱关节炎患者会

发生脊柱椎间盘炎,但是当前随着 MRI 技术的应用检测椎间盘炎的发生率已经上升到 60%^[11]。AS 的发生主要机制与 HLA-B27 有关,研究发现 HLA-B27 转基因动物在无菌环境下并不能发展为脊柱炎^[12-14]。而这种动物模型发展成的脊柱炎与人类的病理机制并不相同^[14,15]。蛋白聚糖是细胞基质的重要组成部分,主要存在于关节软骨或椎间盘髓核中^[16,17]。因此很可能成为自身免疫病的靶向抗原,抗原环境导致自身免疫反应的发生,椎间盘完全丢失,骨赘形成,关节完全融合^[18,19]。蛋白聚糖分离纯化后对 BALB/c 小鼠进行免疫,蛋白聚糖作为自身抗原而诱发自身免疫疾病^[20]。

本实验通过人关节软骨蛋白聚糖诱导的小鼠脊柱炎动物模型十分接近临床 AS,主要以脊柱炎为特征,表现为椎间盘炎、椎间隙变窄甚至消失、软骨下骨

赘形成甚至脊柱强直。BALB/c 小鼠在用人蛋白聚糖-聚集蛋白聚糖或聚集蛋白聚糖 G₁ 反复免疫后可出现脊柱炎或关节炎。证实了蛋白聚糖能够诱导基因易感性 BALB/c 小鼠发生脊柱炎,聚集蛋白聚糖在此脊柱炎动物模型中发挥了关键性作用,在 AS 的发病中也存在重要作用。

本研究局限性在于研究中使用的标本来源于骨关节炎患者膝关节置换术后的关节软骨,软骨样本含有很少,与年龄匹配的正常供体比较,软骨标本中的蛋白聚糖极易被基质金属蛋白酶降解,由于体内强烈的降解环境,来自骨关节炎患者的软骨标本不足以诱导出关节炎。笔者认为关节炎未发生主要原因有以下几个方面:①国内提供的 BALB/c 小鼠品系与国外实验室有较大差异,基因背景无法保证;②动物模型的周龄偏小;③模型组的动物数量偏少。今后的研究中在经费允许的情况下,可以从国外直接购入 BALB/c 基因背景纯正的小鼠,饲养至较高周龄(16~24 周)的小鼠,且应扩大实验动物数量,进一步提高模型发生率。

参考文献

- Ghasemirad M, Attaya H, Lesha E, *et al.* Ankylosing spondylitis: A state of the art factual backbone [J]. *World J Radiol*, 2015, 7(9): 236-252
- Onuora, S. Spondyloarthritis: Evidence from animal studies supports the 'enthesal stress' hypothesis of ankylosing spondylitis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(5): 248
- Chen C, Zhang X, Xiao L, *et al.* Comparative effectiveness of biologic therapy regimens for ankylosing spondylitis: a systematic review and a network Meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(11): e3060
- Braem K, Lories RJ. Insights into the pathophysiology of ankylosing spondylitis: contributions from animal models [J]. *Joint Bone Spine*, 2012, 79(3): 243-248
- Glant TT, Radacs M, Nagyri G, *et al.* Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(5): 1312-1321
- Glant TT, Mikecz K. Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102: 313-338
- Bárdos T, Szabó Z, Czipri M, *et al.* A longitudinal study on an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(7): 981-987
- Hanyecz A, SE Berlo, S Szántó, *et al.* Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(5): 1665-1676
- Duan Z, Gui Y, Li C, *et al.* The immune dysfunction in ankylosing spondylitis patients [J]. *Biosci Trends*, 2017, 11(1): 69-76
- Liao HT, Lin YF, Tsai CY, *et al.* Bone morphogenetic proteins and Dickkopf-1 in ankylosing spondylitis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2017: 1-6
- LeoA B Joosten, Monique M A Helsen, Fons A J van de Looal. *et al.* Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNF α , anti-IL-1 α /beta and IL-1Ra [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(Suppl): 110-122
- Jung SH, Cho SM, Yim SH, *et al.* Developing a risk-scoring model for ankylosing spondylitis based on a combination of HLA-B27, single-nucleotide polymorphism, and copy number variant markers [J]. *J Rheumatol*, 2016, 43(12): 2136
- Corthay A, Hansson AS, Holmdahl R. T lymphocytes are not required for the spontaneous development of enthesal ossification leading to marginal ankylosis in the DBA/1 mouse [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(4): 844-851
- Chen B, Li J, He C, *et al.* Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1943-1951
- Martín-Esteban A, Sanz-Bravo A, Guasp P, *et al.* Separate effects of the ankylosing spondylitis associated ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases determine the influence of their combined phenotype on the HLA-B*27 peptidome [J]. *J Autoimmun*, 2017, 79: 28
- Shekhawat VK, Schmid TM, Pennekamp PH, *et al.* Implications of trauma and subsequent articulation on the release of Proteoglycan-4 and tissue response in adult human ankle cartilage [J]. *J Orthopaed Res*, 2016, 35(5): 667-676
- Abdelhakem M, Yamashita A, Atiba A, *et al.* Expression of NG2 proteoglycan in the degenerated intervertebral disc in dachshunds [J]. *J Veterin Med Sci*, 2016, 78(1): 97-100
- Rik JU Lories, Frank PL, Kurt de V. Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(2): 221
- Beckett MC, Ralphs JR, Caterson B, *et al.* The transmembrane heparan sulphate proteoglycan syndecan-4 is involved in establishment of the lamellar structure of the annulus fibrosus of the intervertebral disc [J]. *Eur Cell Mater*, 2015, 30: 69-88; discussion 88
- Lories R, Matthys P, Vlam KD, *et al.* Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoprositis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(5): 595-598
- Wang J, Markova D, Anderson DG, *et al.* TNF- α and IL-1 β promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(46): 39738-39749
- Kristen MC, Jo KF, Jonathan T, *et al.* Matrix metalloproteinase 17 is necessary for cartilage aggrecan degradation in an inflammatory environment [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(4): 683-689
- Hao DS, Li M, Wu ZH, *et al.* Synovial fluid level of adiponectin correlated with levels of aggrecan degradation markers in osteoarthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(11): 1433-1437
- Sharma S, Panitch A, Neu CP. Incorporation of an aggrecan mimic prevents proteolytic degradation of anisotropic cartilage analogs [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(1): 4618-4625
- Balint F, Ferenc B, Oktavia T, *et al.* BALB/c mice genetically susceptible to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis show colony-dependent differences in disease penetrance [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(1): 21

(收稿日期:2017-04-07)

(修回日期:2017-04-21)