

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00530

## 蛋白聚糖诱导小鼠关节炎模型的研究进展

童文文, 李 甲, 徐卫东\*

第二军医大学长海医院关节骨病外科, 上海 200433

**[摘要]** 蛋白聚糖诱导的小鼠关节炎模型(PGIA)是由人类关节软骨来源的蛋白聚糖免疫 BALB/c 小鼠或 C3H 小鼠的某些亚系而产生的系统性自身免疫性脊柱关节炎小鼠模型。该模型是目前唯一侵犯中轴骨系统的系统性自身免疫小鼠模型, 已成为脊柱关节炎动物模型的研究热点。本文旨在通过回顾国内外 PGIA 相关研究文献, 对普遍关注的 PGIA 动物模型的诱导、表型鉴定、免疫学特性及骨化相关信号通路等进行综述, 为脊柱关节炎动物模型研究提供理论基础。

**[关键词]** 脊柱关节炎; 蛋白聚糖类; 动物模型; 小鼠; 免疫

**[中图分类号]** R 684.3; R-332

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0530-06

### Proteoglycan-induced arthritis model in mice: research progress

TONG Wen-wen, LI Jia, XU Wei-dong\*

Department of Joint and Bone Disease, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** Proteoglycan-induced arthritis (PGIA) is a unique systemic autoimmune disease model of spondyloarthritis (SpA) induced by intraperitoneal immunization of either BALB/c or certain C3H colonies with cartilage proteoglycan. This model is currently the only systemic autoimmune mice model with axial skeleton manifestation, which has become a focus of study in SpA modeling. Here in this review we summarize the methods of animal model building, phenotype identification, immunological characteristics and pathways involved in bone remodeling of PGIA based on previous studies, hoping to provide references for study on SpA animal model.

**[Key words]** spondyloarthritis; proteoglycans; animal models; mice; immunity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5): 530-535]

脊柱关节炎(spondyloarthritis, SpA), 也称血清阴性脊柱关节病或脊柱关节病, 是以中轴和外周关节受累、具有家族聚集倾向、血清类风湿因子阴性以及与 HLA-B27 相关为特点的一组多系统受累的炎症性疾病。该组疾病包括强直性脊柱炎、银屑病关节炎、反应性关节炎、炎性肠病性关节炎、幼年特发性关节炎等。其发病原因及机制仍未明确, 并且未有确切疗效的治疗措施。为研究 SpA 的发病原因、机制以及治疗措施, 科研人员探索 SpA 相关动物模型的尝试从未间断过。其中, 转基因 SpA 模型有 HLA-B27 转基因小鼠、HLA-B27/h $\beta$ 2m 双转基因大鼠; 自发性 SpA 模型有 ANKET 小鼠、Ank/Ank 小鼠; 炎症驱动模型有 TNF<sup>ΔARE</sup> 小鼠; 外源性抗原诱导的 SpA 模型有蛋白聚糖诱导的小鼠关节炎模型(proteoglycan-induced arthritis, PGIA)。

不同的小鼠模型都部分表现出 SpA 相关特征性症状, 但尚无一种动物模型能完全模拟 SpA 临床病理表型和免疫学特性。PGIA 是目前唯一侵犯中轴骨系统的系统性自身免疫小鼠模型, 已成为脊柱关节炎动物模型研究的热点。该动物模型是由人类关节软骨来源的蛋白聚糖(proteoglycan, PG)免疫 BALB/c 小鼠或 C3H 小鼠的某些亚系而产生的系统性自身免疫性 SpA 小鼠模型。该小鼠模型最先出现外周关节的滑膜炎, 随后出现关节软骨的侵蚀, 最后关节软骨异常增殖。表现为外周足踝、足趾关节的红肿, 后期出现外周及脊柱关节的畸形、强直及功能受限<sup>[1]</sup>。

### 1 PGIA 动物模型的诱导及优化

#### 1.1 小鼠种群及易感基因 最常用于诱导 PGIA

**[收稿日期]** 2014-09-03 **[接受日期]** 2015-03-18

**[作者简介]** 童文文, 硕士生. E-mail: tww944057350@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-311161683, E-mail: xuwdsanghai@smmu.edu.cn

的是 BALB/c 小鼠,该品系小鼠对关节炎有基因易感性。BALB/c 小鼠(H-2d 单体)不同种群在发病率和发病的严重程度上都表现出差异,来自查尔斯河实验室和美国癌症研究所的 BALB/c 小鼠种群 PGIA 诱导率可达到 98%~100%。如果不发生基因污染,一般 BALB/c 小鼠种群 PGIA 诱导率至少达到 50%。研究发现雄性 BALB/c 小鼠在蛋白聚糖诱导后表现出较高的死亡率,故一般选择雌性小鼠用于诱导模型。而年龄在 16~20 周的小鼠与 6~8 周的小鼠相比,关节炎症状出现较早且症状更严重<sup>[2]</sup>。现研究发现另外一种对 PGIA 易感的是 C3H 小鼠的亚系(H-2K 单体型),该小鼠不同种群在 PGIA 发病率上也表现出极大差异,C3H/ChR 和 C3H/HeJCr 这两支种群对 PGIA 易感性较高,而 C3H/HeJ 和 C3H/BiDACr 则对 PGIA 表现出一定的抵制效应(易感性低于 10%),而具体导致该差异的基因基础有待进一步探索<sup>[3]</sup>。由于引起 PGIA 发病的基因背景十分复杂,研究人员在基因水平对差异易感性的原因进行了较多探索。通过对 PGIA 易感小鼠及 PGIA 抵抗小鼠杂交子代进行差异基因分析发现众多数量及质量性状相关位点。Adarichev 等<sup>[4]</sup>发现 X 染色体及 5、10、17、18 号染色体上的数量性状位点与 PGIA 发病相关,Glant 等<sup>[5]</sup>揭示 3 号染色体上的 Pgia26a 通过调控 T 细胞应答控制 PGIA 的发病,19 号染色体上的 Pgia23 和 Pgia12 与 PGIA 的低发病率相关。虽然研究发现众多与 PGIA 发病、严重程度相关的基因位点,但各组研究结果差异较大且未进行进一步验证,PGIA 复杂的发病基因背景仍需要不断探索。

### 1.2 PGIA 诱导抗原

关节软骨是一种无血管组织,不受自身免疫系统的监视。当软骨降解后能够暴露和释放独特的抗原分子物质,这些物质能够被自身免疫系统识别从而激发免疫反应。PGIA 是关节软骨来源的蛋白聚糖注入小鼠腹腔后引发自身免疫反应而形成的关节炎模型,蛋白聚糖作为抗原在模型建立过程中至关重要。蛋白聚糖相对分子质量约 2 000 000~3 000 000,由核心蛋白(相对分子质量 220 000)以及连接在核心蛋白上的硫酸软骨素侧链(chondroitin sulfate, CS, 相对分子质量 20 000~30 000)和硫酸角质素(keratan sulfate, KS, 10 000~20 000)侧链构成,而核心蛋白由 G1、

G2、G3 以及 KS、CS 侧链附着部位共同组成。蛋白聚糖是细胞外基质的重要成分之一,可与细胞外基质中的胶原、纤粘连蛋白、层粘连蛋白及弹性蛋白结合构成具有组织特性的细胞外基质<sup>[6]</sup>。

软骨中抗原的提取经历粗提、蛋白聚糖的纯化以及去糖基化等 3 个主要步骤。粗提是将磨碎的软骨放入含有蛋白酶抑制剂的盐酸胍溶液中进行萃取,软骨研磨前需将结缔组织以及血管剔除干净,研磨后软骨颗粒的大小直接影响着萃取的质量。提取液中一定量的蛋白酶抑制剂将有助于防止蛋白聚糖的降解。粗提的蛋白聚糖在去糖基化后可直接用于 PGIA 的诱导,在检测蛋白聚糖特异性 B 细胞和 T 细胞反应时,则需要对粗提的蛋白聚糖进一步纯化。氯化铯梯度离心法是较常用的纯化方法,相对分子质量较大的蛋白聚糖将沉积在离心管底。由于蛋白聚糖具有众多 T 细胞抗原表位的核心蛋白被 100~120 条糖胺聚糖侧链所掩盖,离心后的蛋白聚糖同样需要经过进一步去糖基化才能用于 PGIA 的诱导。软骨素酶 ABC 和  $\beta$ -内切半乳糖苷酶分别降解 CS 和 KS 侧链,从而暴露相应抗原表位,使得注入小鼠腹腔的抗原能够激发相应免疫应答反应,引发关节炎<sup>[6]</sup>。

在 PGIA 动物模型的诱导实验中用作抗原的蛋白聚糖主要是从人、犬和猪的软骨中提取出来的,牛、羊软骨来源的蛋白聚糖也可用作抗原,但是诱导的发病率和严重程度都较低,而猫、鼠、兔、鸡等动物软骨来源的蛋白聚糖则无法诱导出关节炎模型<sup>[7]</sup>。而最新研究显示商品化的牛软骨来源的蛋白聚糖可用于 PGIA 的诱导且诱导率较高<sup>[8]</sup>。Glant 等<sup>[9]</sup>从胎儿、骨关节炎患者、风湿性关节炎患者以及正常人的关节软骨中分别提取蛋白聚糖用于 PGIA 的诱导,结果发现从骨关节炎患者软骨中提取得到的蛋白聚糖在作为抗原诱导 PGIA 时效率最高。其后研究显示胎儿、成人以及关节退行性病变患者的软骨其蛋白聚糖的分子组成是不同的。胎儿软骨蛋白聚糖相对成人软骨蛋白聚糖含有更多的 CS 侧链以及更少的 KS 侧链,此时的蛋白聚糖是相对完整的分子,免疫原性较弱。随着年龄的增长、软骨的退变以及炎症的影响,更多的金属酶更广泛地作用于蛋白聚糖核心蛋白,而核心蛋白暴露的抗原表位和部分降解的片段能够激发滑膜关节的免疫反应<sup>[10]</sup>。重组的蛋白聚糖 G1 区域也被用于关节炎的诱导,产



生的关节炎 (proteoglycan aggrecan G1-induced arthritis, GIA) 与 PGIA 相比临床表型相似, 而特异的自身抗体是不同的<sup>[11]</sup>。通过对 PGIA 抗原的进一步研究将有助于人类脊柱关节病潜在抗原的探索并为该类疾病的发病机制提供更多假说。

1.3 PGIA 免疫佐剂的选择 佐剂是非特异性免疫增强剂, 当与抗原一起注射或预先注入机体时, 可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。弗氏佐剂 (Freund's adjuvants) 是较常用的动物实验的佐剂, 其中不完全弗氏佐剂 (IFA) 是液体石蜡与羊毛脂混合而成, 在不完全佐剂中加入卡介苗或死的结核分枝杆菌, 即为完全弗氏佐剂 (CFA)。蛋白多糖混合弗式佐剂注入机体后, 可使抗原物质缓慢地释放, 延长了抗原的作用时间, 同时佐剂吸附了抗原后, 增加了抗原的表面积, 使抗原易于被巨噬细胞吞噬。在刺激机体免疫系统方面弗式佐剂可促进淋巴细胞之间的接触, 增强辅助 T 细胞的作用, 提高机体初次和再次免疫应答的抗体滴度并可以改变抗体的产生类型以及产生迟发型变态反应。弗式佐剂的缺点是在注射入腹腔后有形成肉芽肿的可能<sup>[12]</sup>, 这对小鼠的生理状态和实验结果可能有部分干扰。

为了研究新的更优良的佐剂, Hanyecz 等<sup>[13]</sup>使用双十八烷基二甲基溴化铵 (dimethyldioctadecylammonium bromide, DDA) 用于 PGIA 模型诱导, 结果显示使用 DDA 作为免疫佐剂与弗式佐剂相比不仅在更短的时间出现小鼠关节炎表现, 而且发病的严重程度更甚。随后 Stoop 等<sup>[14]</sup>的研究结果显示两种免疫佐剂诱导的关节炎模型在发病率和疾病严重程度上并无差异, 差异主要表现在诱导产生的 T 淋巴细胞比例上, 即弗式佐剂诱导产生的 T 细胞以 Th17 为主而 DDA 诱导产生的 T 细胞以 Th1 为主。由于佐剂在诱导模型时能够影响免疫应答的类型及强度, 在研究该模型发病机制时应注意佐剂潜在的影响。

## 2 PGIA 临床表型及病理学鉴定

诱导 PGIA 模型常用的方法是将相应剂量的抗原和免疫佐剂混合后, 分别第 0 周、第 3 周、第 6 周分 3 次注入小鼠腹腔。在第 3 次抗原注射结束后 2 周左右可观察到外周关节红、肿等关节炎表现。根据小鼠关节炎症状的严重程度 (无任何炎性肿胀为 0 分, 一个脚趾受累表现出肿胀为 1 分, 大于 1 个

脚趾受累为 2 分, 足趾僵直失去关节功能为 3 分, 踝关节肿胀僵直为 4 分<sup>[1]</sup>), 对模型小鼠的四肢进行评分, 总评分在 0~16 之间。外周关节表型评分体系可直观地评价该模型的炎症及骨化进展, 并为评判干预措施的效果提供较为直观的指标。中轴关节炎及骨化的累及无明显临床表型, 需借助病理及影像学方法来进行观察。

组织病理学分析显示 PGIA 模型病变关节主要表现为淋巴细胞的浸润和组织水肿, 并伴有关节间隙多型核细胞的浸润以及滑膜巨噬细胞和成纤维样细胞的增殖, 而同时存在的关节软骨腐蚀以及软骨细胞增殖最终导致关节的强直。中轴关节的累及最早可见于第 3 次抗原注射后 8 周, 首先是骶髂关节受累, 接着病变影响到腰椎、胸椎以及颈椎。模型小鼠脊柱大体上表现为椎间盘间隙的消失和骨赘的形成。在脊柱关节病的急性阶段大量浸润的单核细胞导致椎间盘变形, 病变及重吸收的纤维环使得髓核突出压迫脊髓。脊柱病变主要通过组织病理切片进行观察, 表现为椎间盘的炎性细胞浸润和骨化<sup>[1]</sup>。小鼠颞下颌关节亦出现骨关节炎样软骨破坏<sup>[15]</sup>, 这也使得该模型可用于下颌关节炎的研究。PGIA 脊柱的炎症及骨化相关病理学特性使得该模型成为研究脊柱关节炎炎症、骨化及两者关系的良好载体, 是目前唯一侵犯中轴骨系统的系统性自身免疫小鼠模型。

## 3 PGIA 免疫学特性

3.1 B 细胞应答 PGIA 是外源性物质注入小鼠体内通过一系列自身免疫反应而引起的关节炎模型。免疫反应在疾病发病进程中至关重要。核心蛋白在各个物种之间具有高度的一致性, 加之糖胺聚糖侧链的掩盖, 使其 B 细胞抗原性相对较弱, 但核心蛋白的降解产物作为新的抗原在自体 and 异体都具有较强的免疫原性。注射入小鼠腹腔的人核心蛋白特异性抗体在免疫后 2 周即可检测到, 而小鼠蛋白多糖特异性自身抗体直到 4 周左右才能检测到, 该类抗体通过促炎性因子的释放以及基质金属蛋白酶的激活在 PGIA 关节炎的发生以及发展阶段都有重要作用<sup>[16]</sup>。另外, Brennan 等<sup>[17]</sup>发现 CS、KS 特异性 B 淋巴细胞是一种高效的抗原提呈细胞, 与普通抗原提呈细胞相比能够显著提高 PG 抗原提呈进程。Hamel 等<sup>[18]</sup>使用去 B 淋巴细胞治疗方法干预, 显示

出 B 淋巴细胞可通过加强效应性 T 细胞活性以及抑制调节性 T 细胞效应来调节炎性反应。另外, B 淋巴细胞上可诱导共刺激分子(inducible costimulator, ICOS)的表达是活化效应 T 细胞所必需的,抑制 ICOS 的表达可显著抑制各类炎性因子的产生<sup>[19]</sup>。综上,可以认为 B 淋巴细胞在整个 PGIA 发病进程中起着重要的辅助作用。

**3.2 T 细胞应答及相关细胞因子** 相对于较弱的 B 淋巴细胞激活作用,蛋白聚糖能够引发强烈的 T 淋巴细胞免疫反应。蛋白聚糖分子包含有一条 2 200 个氨基酸的骨干(核心蛋白)以及连接在骨干上的 100~120 条带负电荷的糖胺聚糖侧链。大约共有 143 个抗原表位存在于核心蛋白上,其中 121 个存在于球形区域,22 个存在于侧链连接区域。在 BALB/c 小鼠中仅有 27 个抗原表位可引发 T 细胞免疫应答,而 C3H 小鼠中也仅有 21 个<sup>[20-21]</sup>。Buzás 等<sup>[20]</sup>研究发现仅有 4 个基因位点和关节炎的发生有较明确的关系,其中 3 个位于 G1 区,一个位于 G3 区。完整的蛋白聚糖分子由于抗原表位被糖胺聚糖侧链所掩盖,是一种较弱的抗原,在活体中新陈代谢、老化以及炎症作用下蛋白聚糖分子的完整性受到破坏,T 细胞抗原表位的暴露将引起强烈的 T 淋巴细胞反应,体外实验时利用相关的酶消化糖胺聚糖侧链能够达到相同的效果<sup>[7]</sup>。进一步研究显示 T 细胞抗原表位的瓜氨酸化可改变 T 细胞免疫识别及应答反应<sup>[22]</sup>。

PGIA 小鼠淋巴器官及病变关节均能够检测到自身反应性 T 细胞,初始时认为迁移至关节部位的 T 细胞是关节炎起始以及进展的主要影响因素,后研究发现在抗原特异性 T 细胞协助下产生的自身抗体是 PGIA 发生及进展的主要因素<sup>[23]</sup>。T 细胞受体(T cell receptor, TCR)转基因 BALB/c 小鼠对 PGIA 易感性显著增高,高周龄纯合子 TCR TgA 小鼠则出现自发关节炎的表现,并且 TCR 信号强度的大小影响着自体 T 细胞的活化和凋亡,也关系到 PGIA 的发病和严重程度<sup>[24]</sup>。反应性 T 淋巴细胞中以 CD4<sup>+</sup> T 细胞较活跃,而更以 Th1 细胞占主导地位。脾脏以及关节组织匀浆中都检测到极高的 Th1 细胞因子(IFN- $\gamma$ ),中和 IFN- $\gamma$  治疗能够抑制关节炎的恶化。IFN- $\gamma^{-/-}$  小鼠诱导 PGIA 时与野生型相比不仅发病时间延迟,严重程度也明显较轻。

Finnegan 等<sup>[25]</sup>发现在关节炎发病前用 Th2 反应相关细胞因子进行干预能够防止关节炎的发生,显示出将 Th1 反应转为 Th2 反应有益于控制关节炎。IL-4 是 Th2 反应的重要炎性因子,该因子通过抑制促炎性因子的表达来调控巨噬细胞活动,进而进一步影响 IL-12 和 TNF- $\alpha$  等炎性因子的产生。在 PGIA 诱导早期阶段,IL-4 的干预能有效预防外周关节炎的发生,而 IL-4 不足小鼠 PGIA 发病时间明显缩短,严重程度也较对照组高<sup>[26]</sup>。

关于 IL-17 在 PGIA 发病中的作用,Doodes 等<sup>[27]</sup>在 IL-17 缺陷鼠上诱导出与野生鼠相同的 PGIA,故认为 IL-17 在 PGIA 诱导过程中无相关作用。进一步研究发现 IL-17 缺陷时,过量分泌的 IFN- $\gamma$  弥补了 IL-17 分泌的不足<sup>[28]</sup>,并且中和 IL-17 治疗对模型鼠有一定作用<sup>[29]</sup>,这些都显示出 IL-17 在 PGIA 发病中的作用。Rodeghero 等<sup>[30]</sup>发现不同抗原注射部位对炎性因子的分泌亦有影响,腹腔注射时以 IFN- $\gamma$  分泌为主,而皮下注射时 IFN- $\gamma$  和 IL-17 均有分泌,故一般认为 IL-17 和 IFN- $\gamma$  在 PGIA 发病过程中有协同作用。IL-23 被认为在皮下注射抗原时参与疾病的进展过程,而腹腔注射诱导的该模型疾病进程无 IL-23 的参与<sup>[31]</sup>。综上所述,PGIA 是细胞、体液免疫以及各类细胞因子共同作用下产生的复杂的自身免疫性疾病。

#### 4 PGIA 骨化通路相关研究

Wnt 信号通路和 Dickkopf (DKK)-1 是最近发现的与骨化发生密切相关的因素。Wnt 信号通路是促骨化因素,在正常个体及关节炎进程中均具有重要作用,是维持骨形成及骨破坏稳态的重要通路<sup>[32]</sup>;而 DKK-1 是 Wnt 信号通路的抑制剂,它可以抑制骨化进程,阻断 DKK-1 可促进髋髂关节的融合<sup>[33]</sup>,相关研究也显示强直性脊柱炎患者体内 DKK-1 失衡<sup>[34]</sup>。对于 PGIA 小鼠的骨化相关因素研究发现该模型中 Wnt 信号通路抑制剂 DKK-1 和 SOST 的表达较正常组显著降低<sup>[35]</sup>。因此 PGIA 小鼠 Wnt 信号通路的进一步探索将有助于揭示骨化相关机制,并且为脊柱关节炎患者骨化的预防及治疗提供新的思路。

#### 5 结论及展望

脊柱关节炎是一组慢性炎症性自身免疫疾病,

具有特定的病理生理、临床、放射学和遗传特征,目前发病机制仍不清楚。动物模型是研究人类疾病的重要工具,然而目前尚无任何一种动物模型能完全模拟脊柱关节炎的发病过程和临床表现。关节及脊柱的骨化强直是脊柱关节病中强直性脊柱炎后期的特征性临床表现,骨化与炎症的关系以及骨化自身的病理机制都是亟待解决的难题。PGIA 小鼠是目前唯一侵犯中轴骨系统的系统性自身免疫小鼠模型,后期出现外周和中轴关节的骨化强直使得该模型成为研究骨化机制的良好载体,对脊柱关节炎的基础研究具有极为重要的意义。然而用于诱导 PGIA 的蛋白聚糖提取过程烦琐、市场价格昂贵并且模型诱导周期较长,这在一定程度上限制了 PGIA 小鼠模型的普及推广。未来基因及免疫学方面的研究将有助于进一步了解该小鼠模型的发病机制,从而为人类脊柱关节炎疾病的诊断和治疗提供依据。

#### [参考文献]

- [1] Bárdos T, Szabó Z, Czipri M, Vermes C, Tunyogi-Csapó M, Urban R M, et al. A longitudinal study on an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64: 981-987.
- [2] Farkas B, Boldizsar F, Tarjanyi O, Laszlo A, Lin S M, Hutas G, 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: R21.
- [3] Glant T T, Bárdos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdéz J C, Otto J M, et al. Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice: evidence of genetically acquired resistance to autoimmune disease [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44: 682-692.
- [4] Adarichev V A, Valdez J C, Bárdos T, Finnegan A, Mikecz K, Glant T T. Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci [J]. *J Immunol*, 2003, 170: 2283-2292.
- [5] Glant T T, Adarichev V A, Boldizsar F, Besenyei T, Laszlo A, Mikecz K, et al. Disease-promoting and -protective genomic loci on mouse chromosomes 3 and 19 control the incidence and severity of autoimmune arthritis [J]. *Genes Immun*, 2012, 13: 336-345.
- [6] Glant T T, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics [J]. *Crit Rev Immunol*, 2003, 23: 199-250.
- [7] Glant T T, Mikecz K. Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102: 313-338.
- [8] Ishikawa L L, Colavite P M, da Rosa L C, Balbino B, França T G, Zorzella-Pezavento S F, et al. Commercial bovine proteoglycan is highly arthritogenic and can be used as an alternative antigen source for PGIA model [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 148594.
- [9] Glant T T, Cs-Szabó G, Nagase H, Jacobs J J, Mikecz K. Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from normal and osteoarthritic human cartilage [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 1007-1118.
- [10] Lark M W, Bayne E K, Flanagan J, Harper C F, Horner L A, Hutchinson N I, et al. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100: 93-106.
- [11] Glant T T, Radacs M, Nagyéri G, Olasz K, Laszlo A, Boldizsar F, 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: 1312-1321.
- [12] Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 70: 849-860.
- [13] Hanyecz A, Berlo S E, Szántó S, Broeren C P, Mikecz K, Glant T T. 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: 1665-1676.
- [14] Stoop J N, Tibbitt C A, van Eden W, Robinson J H, Hilkens C M. The choice of adjuvant determines the cytokine profile of T cells in proteoglycan-induced arthritis but does not influence disease severity [J]. *Immunology*, 2013, 138: 68-75.
- [15] Ghassemi-Nejad S, Kobezda T, Rauch T A, Matesz C, Glant T T, Mikecz K. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, 19: 458-465.



- [16] Dayer E, Mathai L, Glant T T, Mikecz K, Poole A R. Cartilage proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Antibodies that recognize human and mouse cartilage proteoglycan and can cause depletion of cartilage proteoglycan with little or no synovitis[J]. *Arthritis Rheum*,1990,33:1394-1405.
- [17] Brennan F R, Mikecz K, Buzás E I, Ragasa D, Cs-Szabó G, Negroiu G, et al. Antigen-specific B cells present cartilage proteoglycan (aggrecan) to an autoreactive T cell hybridoma derived from a mouse with proteoglycan-induced arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 1995,101:414-421.
- [18] Hamel K M, Cao Y, Ashaye S, Wang Y, Dunn R, Kehry M R, et al. B cell depletion enhances T regulatory cell activity essential in the suppression of arthritis [J]. *J Immunol*,2011,187:4900-4906.
- [19] Hamel K M, Cao Y, Olalekan S A, Finnegan A. B cell-specific expression of inducible costimulator ligand is necessary for the induction of arthritis in mice[J]. *Arthritis Rheumatol*,2014,66:60-67.
- [20] Buzás E I, Végvári A, Murad Y M, Finnegan A, Mikecz K, Glant T T. T-cell recognition of differentially tolerated epitopes of cartilage proteoglycan aggrecan in arthritis[J]. *Cell Immunol*,2005,235:98-108.
- [21] Hanyecz A, Berlo S E, Szántó S, Broeren C P, Mikecz K, Glant T T. 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: 1665-1676.
- [22] Misják P, Bösze S, Horváti K, Pásztói M, Pálóczi K, Holub M C, et al. The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis[J]. *Immunol Lett*,2013,152:25-31.
- [23] Angyal A, Egelston C, Kobezda T, Olasz K, László A, Glant T T, et al. Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints[J]. *Arthritis Res Ther*,2010, 12;R44.
- [24] Olasz K, Boldizsar F, Kis-Toth K, Tarjanyi O, Hegyi A, van Eden W, et al. T cell receptor (TCR) signal strength controls arthritis severity in proteoglycan-specific TCR transgenic mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012,167:346-355.
- [25] Finnegan A, Mikecz K, Tao P, Glant T T. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines[J]. *J Immunol*,1999,163:5383-5390.
- [26] Finnegan A, Grusby M J, Kaplan C D, O'Neill S K, Eibel H, Koreny T, et al. IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms[J]. *J Immunol*,2002,169:3345-3352.
- [27] Doodes P D, Cao Y, Hamel K M, Wang Y, Farkas B, Iwakura Y, et al. Development of proteoglycan-induced arthritis is independent of IL-17[J]. *J Immunol*, 2008,181:329-337.
- [28] Doodes P D, Cao Y, Hamel K M, Wang Y, Rodeghero R L, Mikecz K, et al. IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis [J]. *J Immunol*,2010,184:1552-1559.
- [29] Kezic J M, Glant T T, Rosenbaum J T, Rosenzweig H L. Neutralization of IL-17 ameliorates uveitis but damages photoreceptors in a murine model of spondyloarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*,2012,14;R18.
- [30] Rodeghero R, Cao Y, Olalekan S A, Iwakura Y, Glant T T, Finnegan A. Location of CD4<sup>+</sup> T cell priming regulates the differentiation of Th1 and Th17 cells and their contribution to arthritis[J]. *J Immunol*, 2013, 190:5423-5435.
- [31] Olalekan S A, Cao Y, Finnegan A. Tissue specific CD4<sup>+</sup> T cell priming determines the requirement for interleukin-23 in experimental arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*,2014,16:440.
- [32] Lories R J, Corr M, Lane N E. To Wnt or not to Wnt; the bone and joint health dilemma[J]. *Nat Rev Rheumatol*,2013,9:328-339.
- [33] Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, David J P, Zwerina J, Richards W, et al. Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints[J]. *Ann Rheum Dis*,2010,69:592-597.
- [34] Daoussis D, Liossis S N, Solomou E E, Tsanaktsi A, Bounia K, Karampetsou M, et al. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis[J]. *Arthritis Rheum*,2010,62:150-158.
- [35] Haynes K R, Pettit A R, Duan R, Tseng H W, Glant T T, Brown M A, et al. Excessive bone formation in a mouse model of ankylosing spondylitis is associated with decreases in Wnt pathway inhibitors[J]. *Arthritis Res Ther*,2012,14;R253.