

环巴胺对佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞增殖和凋亡的影响

黄焱平^{1,2,3}, 曹威¹, 汪陶荣¹, 张俊强², 殷瞳昕⁴, 宋先兵³, 陈晓宇^{1,2}

摘要 目的 观察 Hedgehog (Hh) 信号通路抑制剂环巴胺对体外培养的佐剂性关节炎 (AA) 大鼠关节软骨细胞增殖和凋亡的影响。方法 SD 大鼠足趾皮内注射弗氏完全佐剂制备 AA 模型 (模型组), 对照组足趾皮内注射等量生理盐水; 观察继发侧足趾肿胀 28 d 后, HE 染色评价踝关节形态学变化; 胰酶-胶原酶消化培养 AA 大鼠软骨细胞, 采用甲苯胺蓝染色和 II 型胶原染色鉴定软骨细胞, CCK-8 法检测环巴胺处理对 AA 大鼠软骨细胞增殖的影响, Hoechst 33258 检测环巴胺对 AA 大鼠软骨细胞凋亡影响, Western blot 法检测 AA 大鼠软骨细胞中 Hh 信号通路相关蛋白 (Shh、Ptc1、Gli1) 的表达情况。结果 第 12 天, AA 大鼠继发侧关节肿胀明显, HE 染色表明 AA 大鼠踝关节破坏明显; II 型胶原和甲苯胺蓝染色证实成功培养 AA 大鼠软骨细胞; 不同剂量的环巴胺可促进 AA 大鼠软骨细胞增殖, 抑制其凋亡, 降低 Shh、Ptc1、Gli1 蛋白表达。结论 环巴胺可促进 AA 大鼠软骨细胞的增殖, 抑制其凋亡, 其机制与抑制 AA 大鼠软骨细胞 Hh 信号通路有关。

关键词 Hedgehog 信号通路; 环巴胺; 佐剂性关节炎; 软骨细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 593.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1000-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.003

类风湿性关节炎 (rheumatic arthritis, RA) 表现为滑膜细胞过度增生, 浸润并破坏滑膜下软骨组织或骨组织, 病程迁延可导致患者关节畸形和致残。因此, RA 治疗的关键是降低关节软骨和骨组织的破坏^[1]。动物体内普遍存在进化保守的 Hedgehog (Hh) 信号通路, 在胚胎期组织分化、肿瘤形成等方面作用广泛^[2]。研究^[3-4]证实, Hh 信号通路参与软

骨与骨发育和生长, 骨关节炎患者的关节软骨细胞中发现明显的 Hh 信号通路的激活, 基因沉默 Hh 信号通路后关节损伤症状得到缓解, 有望成为新的骨关节炎治疗手段。环巴胺 (cyclopamine) 为 Hh 通路抑制剂, 目前对 RA 患者病变进程中关节软骨细胞的影响研究报道较少。该研究拟建立大鼠佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 模型, 观察环巴胺在体外能否通过抑制 Hh 信号通路, 影响 AA 大鼠关节软骨细胞增殖, 旨在发现新的 RA 药物作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 20 只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 清洁级, 体质量 (160 ± 10) g, 购自安徽省实验动物中心。环境温度 (24.5 ± 1.0) °C、相对湿度 (59.0 ± 2.0) % 适应性喂养 1 周进行实验, 依据安徽医科大学实验动物处理程序。

1.2 主要试剂与仪器 弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA)、环巴胺、羊抗鼠 Shh 多克隆抗体、羊抗鼠 Ptc1 多克隆抗体和羊抗鼠 Gli1 多克隆抗体 (美国 Sigma 公司); 兔抗羊生物素二抗 (北京中杉金桥有限公司); 总蛋白抽提试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 硝酸纤维素膜 (美国 Whatman 公司); 显影液、定影液、胶片 (美国柯达公司); Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) (美国 Gibco 公司); 乙二胺四乙酸 (EDTA)、羧甲基纤维素钠为国产分析纯溶液; Multiskan FC 型全自动酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); PV-200 足趾容积测量仪 (成都泰盟软件有限公司)。

1.3 动物分组和模型制备 雄性 SD 大鼠 20 只, 随机分为正常组和模型组, 每组 10 只, 模型制备参照文献^[5]报道, 采取 0.1 ml FCA 左侧足趾皮下注射制备 AA 模型, 正常组注射等量生理盐水。

1.4 模型评定 AA 大鼠模型评价参照文献^[5]报道, 主要利用足爪肿胀度和关节 HE 染色形态学检查。足爪肿胀度测量应用足容积测量仪, 测量 SD 大鼠致炎右侧 (非致炎侧) 踝关节下容积, 从致炎后第 12 ~ 28 天, 每 4 d 测量继发侧足爪容积, 足爪肿胀度 (Δml) = 继发侧注射后足爪容积 - 注射前足

2018-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81373421); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201710366015)

作者单位: 安徽医科大学¹ 组织胚胎学教研室、² 形态学实验中心、

⁴ 临床医学院, 合肥 230032

³ 安徽医学高等专科学校人体解剖学与组织胚胎学教研室, 合肥 230601

作者简介: 黄焱平, 男, 硕士研究生, 讲师;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xcyayd@163.com

爪容积。HE 染色观察踝关节形态学改变,第 28 天处死大鼠后,取两组大鼠踝关节浸入 10% 的甲醛溶液中固定 24 h 后,浸入含 10% EDTA 的脱钙溶液中脱钙 8 周处理,大鼠踝关节常规脱水、透明、石蜡包埋、4 μm 厚切片,HE 染色,观察两组大鼠踝关节形态学改变。

1.5 关节软骨细胞分离培养和鉴定 参照文献^[6],采用胰酶联合 II 型胶原酶分离 AA 大鼠软骨细胞,操作步骤如下,将大鼠踝关节浸泡 75% 乙醇中 30 min 后,在无菌操作台中,去皮,小心剥离关节表面白色膜状透明软骨层,在无菌培养皿中先用 37 $^{\circ}\text{C}$ 胰酶消化 30 min,然后再用 0.2% II 型胶原酶消化 3 h,200 目滤网过滤,1 500 r/min 离心 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。收集洗涤后的细胞,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的 5% CO_2 培养箱中培养 48 h,去除悬浮细胞,待贴壁细胞连接呈片状时可应用胰酶传代培养。软骨细胞的鉴定应用甲苯胺蓝染色、免疫细胞化学染色 II 型胶原显色,实验所用的细胞为传代培养 3~5 代的 AA 大鼠软骨细胞。

1.6 CCK-8 法测定环巴胺处理后大鼠软骨细胞增殖情况 处于对数生长期的 AA 大鼠踝关节分离培养的透明软骨细胞,含 10% FBS 的 DMEM 培养基 5×10^4 /L 接种于 96 孔板中,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h;细胞增殖实验包括 5 组:每组环巴胺终浓度分别为 0、0.03、0.3、3、10 $\mu\text{mol/L}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养 44 h,然后每孔加入 CCK-8 溶液 20 μl 再培养 4 h。取出培养板,应用全自动酶标仪,在波长为 450 nm 处测吸光度(absorbance, A) 值 A_{450} ,测定 AA 大鼠软骨细胞的增殖情况,每组设 5 个复孔,实验重复 3 次,以试验测得的均值为实验结果。

1.7 Hoechst 33258 染色检测环巴胺处理后软骨细胞凋亡情况 取对数生长期的软骨细胞,按照 1×10^6 /孔接种于 6 孔细胞培养板中,贴壁培养 24 h 后,软骨细胞分 4 组: AA 模型组(AA 大鼠培养软骨细胞未予药物刺激)、环巴胺给药组(环巴胺作用软骨细胞,终浓度为 0.3、3、10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h,吸弃培养液,4% 多聚甲醛溶液固定 30 min; PBS 清洗 3 次,每次 5 min。弃去清洗液并吸干,每孔 50 μl Hoechst 33258 染色液,避光染色 10 min, PBS 清洗 2 次,每次 10 min,荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 Western blot 法检测环巴胺处理软骨细胞对 Shh、Gli1、Ptch1 蛋白的影响 25 ml 培养瓶中按照

3.0×10^6 /瓶接种处于对数生长期的软骨细胞,每瓶加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 5 ml,培养 24 h 后,以加入完全培养基为对照组,给药组按照加入不同浓度的环巴胺分为 3 组(环巴胺终浓度 0.3、3、10 $\mu\text{mol/L}$) ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后,分离提取蛋白样本,BCA 法测定蛋白浓度,计算后取 30 μg 蛋白样品作为上样量检测, SDS-PAGE 胶电泳蛋白分离,湿转到 PVDF 膜上。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,5% 的脱脂奶粉抗原封闭 1 h 后,再转入杂交袋中,一抗(羊抗鼠 Shh 蛋白 1:1 000、羊抗鼠 Gli1 蛋白 1:1 500、羊抗鼠 Ptch1 蛋白 1:1 500、羊抗鼠 β -actin 蛋白 1:1 500) 多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;次日室温下, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;蛋白条带半干电转, ECL 增强化学发光,暗室中显影、定影、曝光压片。凝胶分析成像系统软件 Band Scan 5.0 对目的条带和内参条带 β -actin 进行灰度值检测。蛋白检测实验重复 3 次。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,细胞增殖、足爪肿胀度、Hh 信号通路蛋白检测计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠继发性关节炎评价 应用足趾容量仪排水法检测足爪肿胀度, HE 染色观察两组大鼠继发性侧关节结构的改变来评价继发性关节炎。足爪肿胀度观察结果表明,与正常对照组比较, AA 大鼠于第 12 天出现继发性侧足肿胀,肿胀程度在 20 d 时最为明显,在整个实验期间,对照组大鼠继发性侧的足爪容积基本无改变,见图 1。大鼠继发性侧踝关节 HE 染色表明,注射生理盐水的对照组关节透明软骨表面有薄层滑膜组织,软骨细胞生活在软骨陷窝中,由边缘向中央软骨细胞逐渐长大,可见同源细胞群,见图 2A;模型组大鼠踝关节见关节滑膜组织增生,关节腔减小或消失,增生的滑膜组织向滑膜下的软骨和骨组织中侵袭,软骨细胞在基质中排列连续性破坏,呈排列紊乱状态,见图 2B。

2.2 AA 大鼠透明软骨细胞培养和鉴定 经过分离培养的原代 AA 大鼠踝关节软骨细胞呈类圆形,12 h 后细胞呈扁平多角形,细胞贴壁生长,72 h 左右细胞完全贴壁,呈梭形或多边形;生长 1 周左右时

细胞连接呈片状,可用胰酶消化传代培养。软骨细胞鉴定采用细胞化学和免疫组化技术,甲苯胺蓝染色显示:AA大鼠踝关节的透明软骨细胞胞质为浅蓝色,核着色较胞质深,呈蓝色,胞质中可见少许异染颗粒,见图3A;进一步鉴定采用免疫组化染色技术检测II型胶原表达情况,可见SD大鼠踝关节软骨细胞胞质为黄色的II型胶原阳性表达,见图3B,以上鉴定结果证实本研究培养的细胞是关节透明软骨细胞。

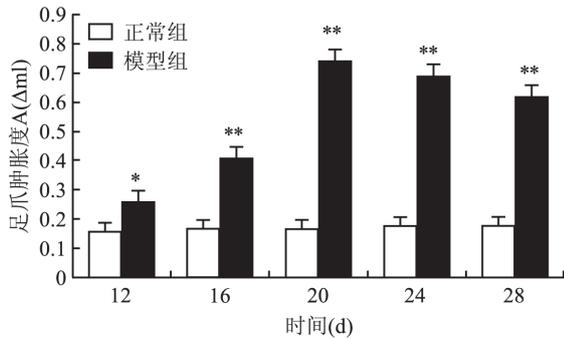


图1 不同时间点AA大鼠继发性足爪肿胀度(Δml)与正常组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

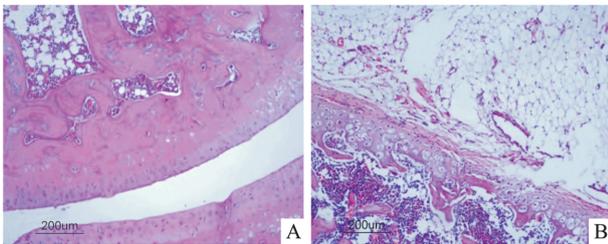


图2 大鼠踝关节腔形态学改变 HE × 100
A: 正常组; B: 模型组

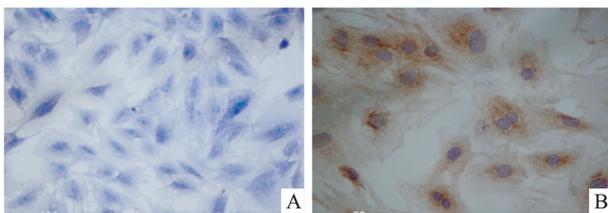


图3 关节透明软骨细胞鉴定

A: 甲苯胺蓝染色呈阳性 × 200; B: 免疫组化染色II型胶原呈阳性表达 × 400

2.3 不同浓度环巴胺对AA大鼠软骨细胞增殖的影响 96孔培养板中,加入100 μl浓度为5 × 10⁴/L的AA大鼠软骨细胞悬液培养24 h后,加入环巴胺处理(终浓度为0、0.03、0.3、3、10、30 μmol/L)软骨细胞48 h后,CCK-8检测细胞增殖,结果表明,环巴胺可促进AA模型组软骨细胞增殖,且随着环巴胺处理浓度(0.3、3、10、30 μmol/L)的上升,其促进增

殖作用较AA模型组的软骨细胞的增殖差异有显著性(F = 10.351, P < 0.05, P < 0.01),见图4。考虑低浓度(0.03 μmol/L)环巴胺对AA大鼠软骨细胞增殖作用不明显,后续实验中选择环巴胺处理终浓度分别为0.3、3、10 μmol/L。

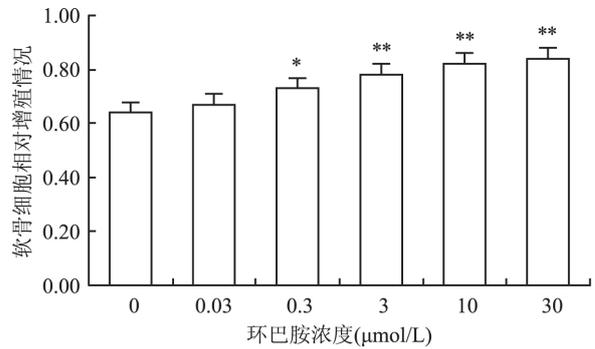


图4 不同浓度环巴胺对AA大鼠软骨细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, n = 6)
与模型组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.4 环巴胺对AA大鼠关节软骨细胞凋亡的影响

培养的大鼠关节软骨细胞在荧光显微镜下,通过Hoechst 33258染色后,可见AA模型组软骨细胞有较多的细胞核出现碎裂和染色质的固缩,呈现凋亡细胞形态学改变,见图5A,环巴胺给药组的AA大鼠软骨细胞的凋亡较模型组减少,见图5B~D,表明环巴胺有减少AA大鼠关节软骨细胞凋亡的作用。

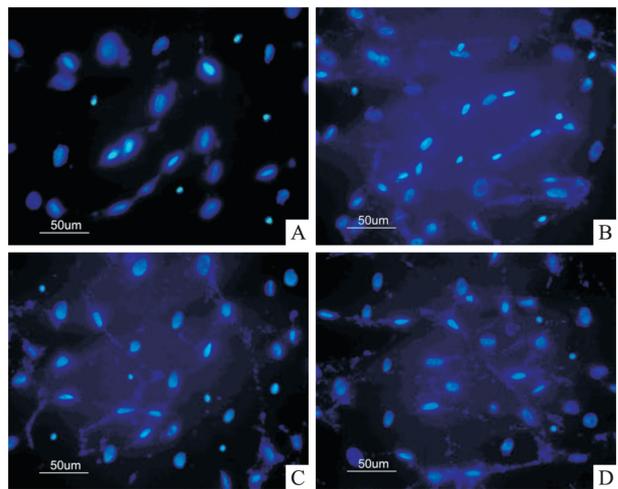


图5 环巴胺对AA大鼠软骨细胞凋亡的影响 × 200
A: 模型组; B: 环巴胺(0.3 μmol/L); C: 环巴胺(3 μmol/L); D: 环巴胺(10 μmol/L)

2.5 环巴胺体外影响软骨细胞中Hh通路相关蛋白的表达 环巴胺(终浓度0、0.3、3、10 μmol/L)处理AA大鼠软骨细胞24 h后,Western blot法检测显示,与AA模型大鼠软骨细胞中Hh通路中相关蛋白比

较环巴胺处理组的 Shh、Gli1、Ptc1 蛋白表达水平呈一定程度的下降趋势,见图 6A;与 AA 模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.01$) 见图 6B。

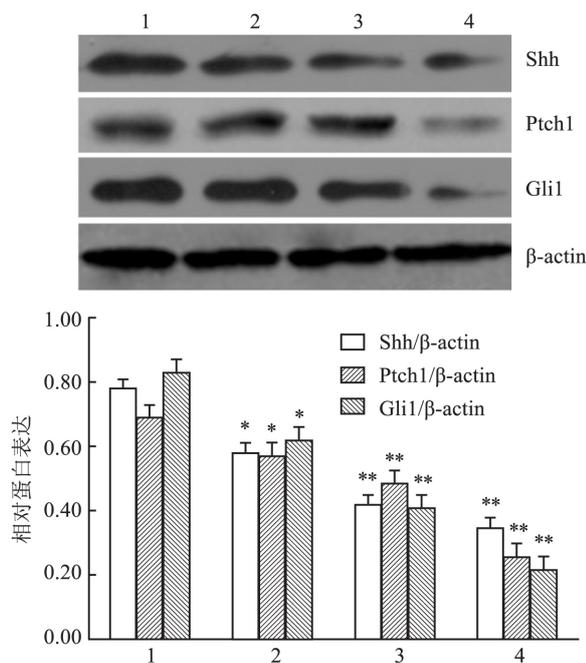


图 6 Western blot 法检测环巴胺影响软骨细胞中

Hh 通路中相关蛋白($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

1: 模型组; 2: 环巴胺(0.3 μ mol/L); 3: 环巴胺(3 μ mol/L); 4: 环巴胺(10 μ mol/L); 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

RA 属于自身免疫性疾病,主要原因为滑膜组织增生,导致软骨和骨进行性破坏,病程迁延至患者关节功能障碍,甚至残疾^[1]。由 FCA 诱导的 AA 模型是经典的探讨 RA 机制的动物模型^[5],本研究中成功采用 FCA 大鼠足底皮下注射诱导 SD 大鼠,通常注射侧足爪(原发侧)肿胀外,继发侧足爪于原发侧 10 d 后有炎性反应,本研究通过关节肿胀度评估继发侧足爪关节炎改变,研究结果表明,注射 FCA 12 d 后,SD 大鼠继发侧关节肿胀明显。HE 染色表明注射 FCA 后,模型组大鼠较正常组踝关节滑膜组织增生,并侵袭关节软骨中,导致软骨细胞形态改变,表明 AA 大鼠模型造模成功。软骨组织主要由软骨细胞和细胞外基质组成,覆盖在关节表面,软骨细胞在软骨囊内活跃增生和分裂,形成同源细胞群,是软骨更新和修复中最重要的细胞^[6]。在 RA 形成过程中,软骨细胞正常的增殖和代谢发生改变,其异常的凋亡降低了软骨密度,软骨细胞产生的软骨基质平衡紊乱,导致关节软骨受损,严重影响关节的功

能^[7]。本研究免疫组化结果表明,软骨细胞中产生基质的重要组成成分 II 型胶原表达阳性;甲苯胺蓝染色,软骨细胞的胞质浅蓝色,证实培养的细胞为 AA 大鼠的软骨细胞。

在临床上,RA 的治疗主要是对症和抗炎处理,特异性治疗药物尚缺乏,异甾体类生物碱环巴胺是从藜芦属植物中分离提取,具有抑制肿瘤生长功能^[4],而 RA 发病中,滑膜细胞异常增殖呈类肿瘤样生长的特性,导致软骨细胞增殖出现异常^[5]。本研究中先采用 CCK-8 法检测了软骨细胞增殖情况,然后通过环巴胺体外给药观察 AA 大鼠软骨细胞增殖情况,研究表明,随着环巴胺浓度的升高,AA 模型大鼠软骨细胞增殖随之增加。为探讨该现象,该实验观察了环巴胺对软骨细胞的凋亡作用,Hoechst 33258 能穿透细胞膜,为蓝色非嵌入型的荧光染料,可与细胞中 DNA 聚 AT 序列结合,在荧光显微镜紫外光激发时呈亮蓝色荧光,细胞凋亡时,DNA 断裂,呈核碎裂和染色质固缩,故可通过 Hoechst 33258 染料进行细胞凋亡检测^[8]。该研究中通过 Hoechst 33258 染色后,AA 模型组软骨细胞有较多的核碎裂和染色质固缩的凋亡细胞形态学改变,环巴胺给药组细胞凋亡减少。故环巴胺提高软骨细胞增殖可能与其抑制 AA 大鼠关节软骨细胞凋亡作用有关。

骨关节炎中,存在活化的 Hedgehog(Hh) 信号通路参与骨和关节破坏^[9]。Hh 信号通路包含以下几个过程^[10]:首先是 Hh 信号分子 Dhh、Shh、Ihh 等通过跨膜受体 Smo、Ptc,激活转录因子 Glis 家族,活化的转录因子 Glis 家族进入细胞核内,最后通过下游靶基因发挥功能。RA 时,Hh 蛋白结合 Ptc 蛋白,降低了 Ptc 蛋白对 Smo 的抑制作用,导致下游核转录因子 Glis 家族激活,靶基因表达增加,加剧 RA 病情。Hh 信号通路的异常激活在骨关节炎病中的研究广受关注,可调节骨与软骨生长与发育^[11]。本研究 Western blot 结果表明,未给予环巴胺的 AA 模型大鼠关节软骨细胞中 Hh 蛋白表达水平较高,存在 Hh 信号通路蛋白异常激活现象;在环巴胺作用 AA 大鼠软骨细胞 24 h 后,Hh 信号通路蛋白 Shh 蛋白、Ptc1 蛋白、Gli1 蛋白水平表达明显下降,表明环巴胺体外给药可显著下降 AA 大鼠软骨细胞中 Hh 信号通路蛋白的表达,抑制其过度活化,这可能进一步说明环巴胺处理后,AA 大鼠关节软骨细胞增殖修复,较骨细胞凋亡减少。

综上所述,本研究表明,Hh 通路抑制剂环巴胺可纠正紊乱的 AA 大鼠关节软骨细胞增殖,抑制关节软

骨细胞凋亡 提示干预 AA 大鼠软骨细胞 Hh 信号通路,有可能保护 RA 关节潜在的应用价值。

(致谢:感谢安徽医科大学药学院李荣博士在实验中给予的帮助。)

参考文献

- [1] Zhang J, Song X, Cao W, et al. Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32928.
- [2] Armas-López L, Zúñiga J, Arrieta O, et al. The Hedgehog-Gli pathway in embryonic development and cancer: implications for pulmonary oncology therapy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(36): 60684-703.
- [3] Thompson C L, Chapple J P, Knight M M. Primary cilia disassembly down-regulates mechanosensitive Hedgehog signalling: a feedback mechanism controlling ADAMTS-5 expression in chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(3): 490-8.
- [4] Li R, Cai L, Ding J, et al. Inhibition of hedgehog signal pathway by cyclopamine attenuates inflammation and articular cartilage damage in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *J Pharm Pharmacol* 2015, 67(7): 963-71.
- [5] Chen X Y, Li J, Cheng W M, et al. Effect of total flavonoids of *Chrysanthemum indicum* on the apoptosis of synoviocytes in joint of adjuvant arthritis rats [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(4): 695-704.
- [6] 丁婧, 李荣, 胡向阳, 等. 环巴胺对佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞增殖凋亡的影响及其抗凋亡机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(4): 446-51.
- [7] Gambassi S, Geminiani M, Thorpe S D, et al. Smoothed-antagonists reverse homocystin acid-induced alterations of Hedgehog signaling and primary cilium length in alkaptonuria [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(11): 3103-11.
- [8] Musumeci G, Loreto C, Carnazza M L, et al. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(2): 307-13.
- [9] Thorpe S D, Gambassi S, Thompson C L, et al. Reduced primary cilia length and altered Arl13b expression are associated with deregulated chondrocyte Hedgehog signaling in alkaptonuria [J]. *J Cell Physiol* 2017, 232(9): 2407-17.
- [10] Rockel J S, Yu C, Whetstone H, et al. Hedgehog inhibits β -catenin activity in synovial joint development and osteoarthritis [J]. *J Clin Invest* 2016, 126(5): 1649-63.
- [11] Bechtold T E, Saunders C, Decker R S, et al. Osteophyte formation and matrix mineralization in a TMJ osteoarthritis mouse model are associated with ectopic hedgehog signaling [J]. *Matrix Biol*, 2016, 52: 339-54.

Effect of cyclopamine on the articular cartilage cell proliferation and apoptosis of adjuvant arthritis rat *in vitro*

Huang Yanping^{1,2,3}, Cao Wei¹, Wang Taorong¹, et al

(¹Dept of Histology and Embryology, ²Morphological Experiment Center, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of Human Anatomy and Histology Embryology Anhui Medical College Hefei 230601)

Abstract Objective To observe the effect of Hedgehog (Hh) signaling pathway inhibitor cyclopamine on the proliferation of chondrocytes in adjuvant arthritis (AA) *in vitro*. **Methods** AA model was established by injection of Freund's complete adjuvant in the toe skin of SD rats, and the same amount of normal saline was injected into the control group. Secondary swelling was detected, the changes of the ankle joints were evaluated by HE staining after 28 d. Pancreatic enzyme-collagenase cultured cartilage cells of AA model rats, chondrocytes were identified by toluidine blue staining and collagen type II immunocytochemistry staining, the effect of different dose of cyclopamine on cartilage cell proliferation was detected by CCK-8 method, chondrocytes apoptosis in AA rats were detected by Hoechst 33258 staining, Hh signaling pathways related protein (Shh, Ptch1 and Gli1) in chondrocytes expression were detected by Western blot method. **Results** From 12nd day, the rats showed significant swelling in the secondary arthrosis in AA rats, and HE staining showed that AA rats were damaged significantly. Chondrocytes of AA rats were proved successful by type II collagen and methylaniline blue. The growth of chondrocytes could increase significantly, and could inhibit apoptosis and decrease the expression of Shh, Ptch1 and Gli1 protein in high concentrations of cyclopamine. **Conclusion** Cyclopamine inhibits the proliferation and apoptosis of chondrocytes in AA rats, and its mechanism is related to inhibit Hh signal pathway in AA rats.

Key words Hedgehog signaling pathway; cyclopamine; adjuvant arthritis; articular chondrocyte; proliferation; apoptosis