

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.015.html>

建立大鼠骨性关节炎模型及补体复合物表达研究

张可可 毕意辉 陈学周 董 洲 张明凯 尤 涛

摘要 目的 通过建立大鼠骨性关节炎(OA)模型探讨补体复合物(MAC)在软骨及滑膜中的表达。方法 将30只SD大鼠随机分为对照组、4周组、8周组、12周组,每组10只。手术组取大鼠后肢一侧膝关节行前交叉韧带切断加内侧半月板切除术制造OA模型,手术后4周、8周及12周取两侧膝关节软骨行大体观察、HE染色、番红O-固绿染色、甲苯胺蓝染色估计软骨退变程度以及进行组织病理学的Mankin评分,免疫组化及Western blot法检测MAC在软骨中沉积及表达情况。结果 与对照组比较,手术组大鼠膝关节软骨4周、8周及12周后呈现软骨粗糙、糜烂、裂隙形成、缺损及骨赘形成等早中晚期OA表现。各组间Mankin计分差异均有统计学意义($P < 0.01$),损伤逐渐加重。各组间滑膜评分差异有统计学意义($P < 0.01$),炎症逐渐降低。免疫组化结果显示软骨细胞膜周围出现环形MAC沉积,滑膜中没有MAC。Western blot检测显示实验组有MAC条带,对照组没有。结论 MAC在OA大鼠软骨中表达增多,补体系统可能作为诊治OA的新方向。

关键词 骨性关节炎;补体;补体复合物;软骨;滑膜

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1785-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.015

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)现阶段仍缺乏有效的治疗,给国家卫生健康系统造成巨大经济负担^[1]。OA的发病机制一般被认为是关节内压力持续异常导致整个关节退行性关节损伤的一种疾病,已有研究^[2]表明OA病理因素包括遗传因素、创伤、炎症和代谢改变,现阶段更倾向于认为OA是一组病因所导致的疾病。研究^[3]显示OA通常伴有滑膜炎,认为滑膜在OA发病机制中起着主要作用,但后续的研究^[4]表明滑膜炎的炎症程度与OA患者的疼痛呈正相关性,但与软骨退变程度并不呈正相关性,

早期病理提示滑膜炎是低级别的,滑膜炎是次级反应,是软骨降解产物所导致的,所以推测OA中软骨才是起主要的病理作用。补体系统可以通过3条途径激活:经典途径、旁路途径和凝集素途径,最后发挥调理吞噬、炎症作用以及形成补体复合物(membrane attack compound, MAC)在细胞和细菌膜上打孔发挥溶菌、溶细胞的作用。上世纪已有研究^[5]表明补体系统成分C3在兔OA模型软骨中沉积。该课题旨在通过建立大鼠OA模型,检测MAC在软骨及滑膜细胞中沉积及表达情况,揭示补体系统可能是OA发病的病因,为诊治OA提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF级SD大鼠30只,雌雄各半,20~25℃环境饲养,200~230 g。MAC一抗(荷兰Hy-cult Biotech;北京Bioss公司); β -actin一抗(美国Sigma公司);组化及Western blot二抗,SABC试剂盒及DAB显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);Western blot相关试剂(美国ThermoFisher公司;美国Sigma公司);番红O-固绿和甲苯胺蓝染料(美国Sigma公司)。

1.2 动物模型建立 将30只SD大鼠分为3组,每组10只,10%水合氯醛腹腔麻醉(0.3 ml/100 g)后,备双后肢皮,仰卧于手术台上固定,消毒铺巾,任取一侧膝关节作为手术组,另一侧作为对照组,对照组仅切开皮肤,暴露关节腔,不切断前交叉韧带及内侧半月板。手术组沿髌韧带内侧纵行切口,切开皮肤及关节囊,屈曲膝关节,暴露关节腔,切断前交叉韧带以及内侧半月板,行抽屉实验阳性为造模成功,术中勿损伤关节软骨面,止血,生理盐水冲洗关节腔,逐层缝合膝关节。前3 d后肢肌肉注射青霉素(20万U/只)预防感染,术后不限制大鼠的饮食和活动。

1.3 取材、标本处理及病理评分 大鼠麻醉后,分别于造模后4周、8周、12周,于冰盒上取后膝双侧股骨端及胫骨端,观察软骨表面损伤情况。修剪出双侧股骨端及胫骨端软骨,胫骨端内侧胫骨平台后1/2待用,于生理盐水冲洗后,锡纸包裹,放入冻存

2016-08-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171797);湖北省自然科学基金(编号:2011CHB022);中国博士后科学基金(编号:9021346201)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:张可可 男 硕士研究生;

尤 涛 男 副教授,责任作者 E-mail: youtaowh@163.com

管迅速投入液氮。然后取双侧膝关节胫骨端内侧胫骨平台后1/2,用手术刀修剪成0.5 cm×0.2 cm×0.5 cm大小骨块,漂洗后放入4%多聚甲醛固定24 h,后流水冲洗1 h,常温下10% EDTA脱钙液脱钙2个月,常规标本脱水、浸蜡、包埋制成石蜡块,然后连续5 μm厚切片,常规切片脱蜡至水行HE、番红O-固绿和甲苯胺蓝染色,并行Mankin评分^[6]。主要从4个方面评分,共计14分:软骨结构(0分:表面光滑,色泽正常;1分:软骨表面破坏;2分:有血管翳及表层破坏;3分:形成浅表裂隙并达到移行层;4分:局限性裂隙深达放射层;5分:全层软骨缺损)。软骨细胞(0分:正常;1分:细胞过多,紊乱;2分:细胞聚集成簇;3分:细胞少)。番红O-固绿染色(0分:正常;1分:轻度失染;2分:中度失染;3分:重度失染;4分:完全失染)。潮线完整性(0分:完整;1分:不完整,有大血管通过)。滑膜病理评分:共10分,从3方面评分:滑膜细胞增生层数、绒毛增生、细胞渗出^[7]。

1.4 免疫组化检测 软骨及滑膜切片常规脱蜡至水后,枸橼酸钠水浴95℃热修复20 min,3% H₂O₂灭活内源性过氧化氢酶10 min,山羊血清封闭15 min,抗大鼠MAC抗体(1:200)4℃过夜孵育,二抗室温孵育15 min,辣根酶标记链酶卵白素工作液15 min,DAB显色5 min,苏木精复染3 min,脱水透明,中性树脂封片。并应用半定量积分法测定模型组与对照组MAC沉积结果差异,每张切片取10个200倍视野下,按阳性细胞数占总细胞比例记分:0分:无差异或≤10%;1分:10%~25%;2分:25%~50%;3分:50%~75%;4分:75%~100%。取每张切片的平均值作为该张切片的百分比,每个标本任取3张,再求平均百分比作为每个标本的最终百分比,同时按染色轻度分级分为3个等级:0分:无阳性;1分:弱阳性;2分:阳性;3分:强阳性。结果相加,低表达:1~3分;高表达:4~7分。记录各个等级老鼠数,每组10只。

1.5 红细胞溶解实验 取大鼠洗涤红细胞加入10%人血清37℃水浴反应2 h,4℃、1 000 r/min离心10 min,取上清液备用,作为Western blot阳性对照。

1.6 Western blot 法检测 将软骨在液氮下研磨成粉末状,取软骨粉末和红细胞上清液分别加入RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂,RIPA裂解液:蛋白酶抑制剂为100:1)冰上裂解30 min,4℃、12 000 r/min离心20 min,取上清液,BCA蛋白定量后,加

入1×上样缓冲液,100℃变性10 min,等体积上样后电泳2 h,300 mA转膜3 h,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,MAC(1:1 000)及actin(1:15 000)一抗4℃过夜孵育,PBST洗涤3次,每次10 min,二抗室温孵育1 h,洗涤3次,每次10 min,ECL显影。

1.7 统计学处理 应用SPSS 16.0软件进行分析,计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。Mankin评分及滑膜评分采用多组完全随机秩和检验(Kruskal-Wallis检验),两两比较采用SNK-*q*检验。免疫组化评分均采用等级资料秩和检验,检验水准为 $\alpha=0.01$ 。

2 结果

2.1 大体观察 12周内未出现实验动物死亡,大鼠均纳入分析。肉眼观察可见对照组软骨表面平滑,有光泽,无缺损及糜烂。4周组可见滑膜明显增生,滑液呈透明、量增多,软骨发黄、粗糙、无缺损。8周组软骨出现小的缺损,侵及中层,滑膜增生较前减少,滑液变少、黄色浑浊。12周软骨出现较大的缺损,侵及深层,部分软骨下骨暴露,骨赘形成,滑膜增生不明显,呈纤维结节状,部分滑膜侵及缺损软骨处,滑液很少、黄色浑浊。见图1。

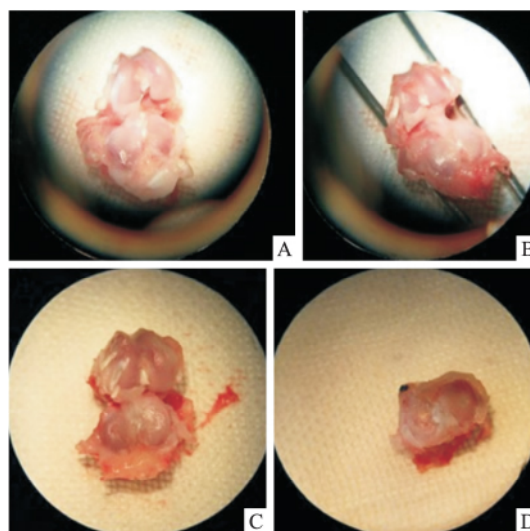


图1 膝关节面大体观察 ×20

A: 对照组; B: 4周组; C: 8周组; D: 12周组

2.2 软骨病理表现及评分 对照组软骨表面光滑,无裂隙,细胞分布均匀,番红O-固绿染色均染,无失染,滑膜细胞排列整齐;4周组软骨表面粗糙,无裂隙,细胞增多,排列紊乱,番红O-固绿及甲苯胺蓝染色轻度失染,滑膜衬里层细胞呈栅栏样增生,大量新生血管,淋巴细胞及浆细胞浸润;8周组软骨表面有

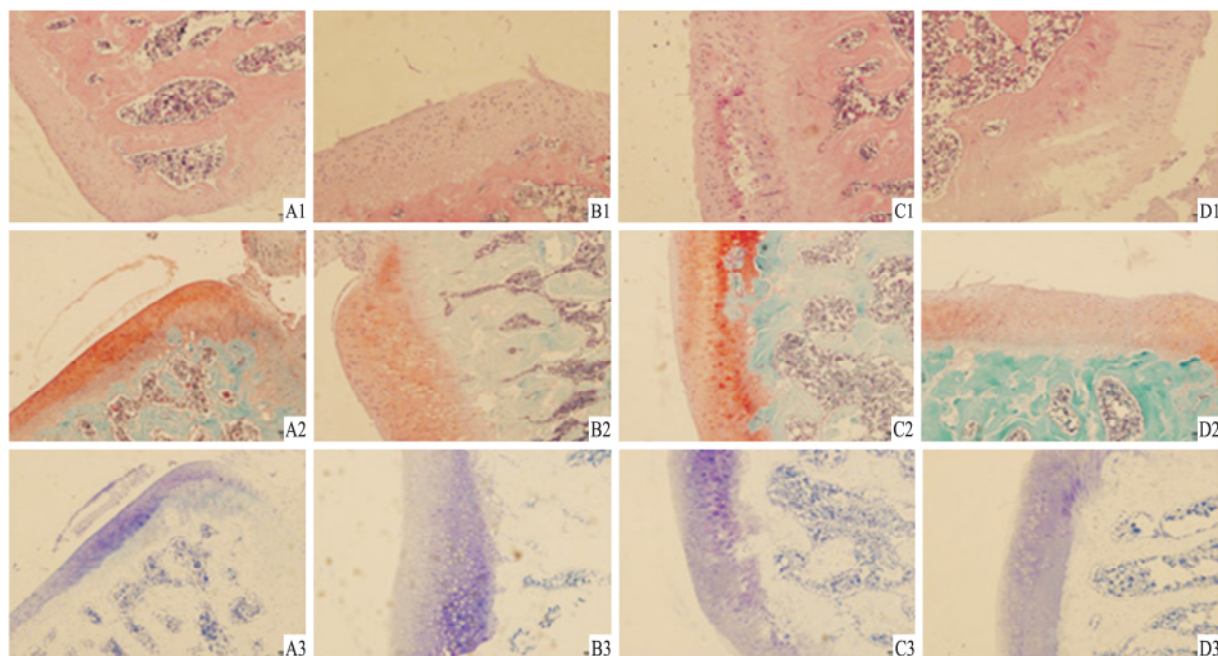


图2 软骨病理染色 ×200

A: 对照组; B: 4 周组; C: 8 周组; D: 12 周组; 1: HE 染色; 2: 番红 O-固绿染色; 3: 甲苯胺蓝染色

裂隙形成,深达中间层,软骨细胞增多,同源细胞群增多,潮线规则,番红 O-固绿及甲苯胺蓝染色中重度失染,滑膜绒毛增生,单核细胞浸润,大量新生血管;12 周组软骨出现大的缺损及裂隙,达深层,细胞数减少,潮线消失,番红 O-固绿及甲苯胺蓝染色重度或完全失染,滑膜纤维增生明显,结节状增生。见图 2、图 3。Mankin 评分: 对照组为 (0.11 ± 0.17) 分、4 周组为 (3.89 ± 1.31) 分、8 周组为 (8.17 ± 1.67) 分、12 周组为 (12.89 ± 1.05) 分。见图 4。各组间评分逐渐增高,关节炎表现越来越重,各组间比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 20.75, P < 0.01$)。滑膜评分: 对照组为 (0.00 ± 0.00) 分;4 周组为 (5.17 ± 0.75) 分;8 周组为 (4.17 ± 0.75) 分;12 周组为 (2.83 ± 0.75) 分。各组间两两比较差异有统计学意义($\chi^2 = 19.84, P = 0.000$)。各组间评分逐渐减低,滑膜炎严重程度变低。

2.3 免疫组化结果 软骨免疫组化结果显示各组表达强度分布类似,对照组:10 个标本均呈无表达;4 周组:1 个无表达,1 个低表达,8 个高表达;8 周组:2 个低表达,8 个高表达;12 周组:1 个低表达,9 个高表达。实验组大部分老鼠分布在呈高表达栏,对照组则分布在无表达栏。实验组可见大部分软骨细胞膜周围分布有呈圈的阳性 MAC 沉积,对照组无表达(图 5)。实验组和对照组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 28.18, P < 0.01$),对照组间比较差异无统

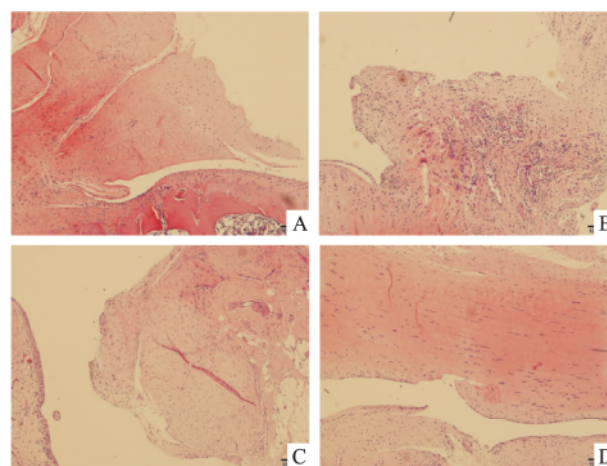


图3 滑膜 HE 染色 ×200

A: 对照组; B: 4 周组; C: 8 周组; D: 12 周组

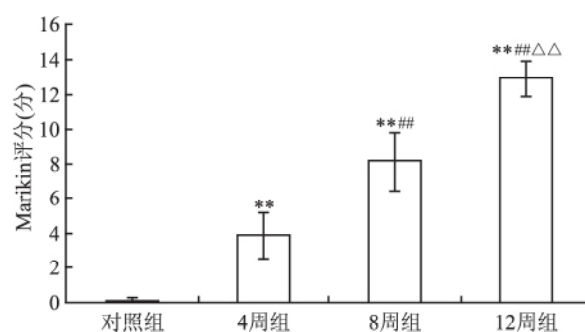


图4 Mankin 评分

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 4 周组比较: ## $P < 0.01$; 与 8 周组比较: △△ $P < 0.01$

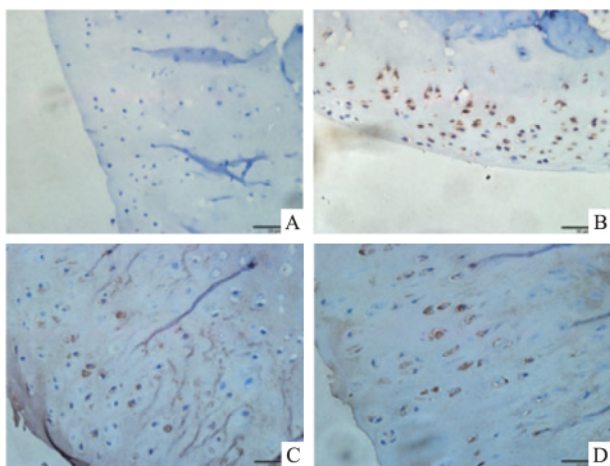


图5 软骨中 MAC 表达 SP×400
A: 对照组; B: 4 周组; C: 8 周组; D: 12 周组

计学意义。滑膜免疫组化未见 MAC 沉积。

2.4 Western blot 结果 Western blot 检测显示与红细胞阳性对照同一列出现一条带(>200 ku), 条带较弥散, 不规则, 而对照组未检测到。见图 6。

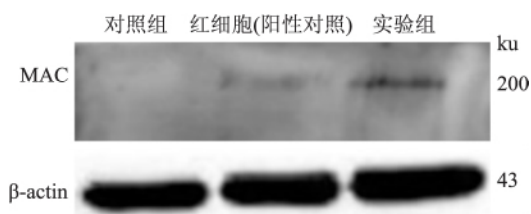


图6 Western blot 法检测对照组、红细胞组、实验组 MAC 沉积

3 讨论

OA 是一种多因素病变,患者通常伴有影像学的改变和临床症状。OA 最常发生的部位是手、髌、膝和脊柱,有临床症状的患者提示关节已发生明显的功能受损,临床症状通常包括:关节疼痛、肿胀以及僵硬,这些症状与低级别的滑膜炎相关^[8]。但已有报道指出滑膜炎只是增加 OA 软骨损伤的风险,并不增加损伤的量,只有在 MRI^[9]或关节镜^[10]中之前就存在很严重的滑膜炎才会导致软骨损伤加重,而且滑膜炎与损伤程度并不是呈“剂量”依赖性的,更有报道^[3]指出滑膜炎与软骨损伤完全无相关性。本实验通过前交叉韧带加内侧半月板大部切除术成功模拟出大鼠早中晚 OA 模型,关节软骨损伤主要集中在股骨内侧髌前部和胫骨端内侧胫骨平台后部,这是由于前交叉韧带离端后胫骨端前移所导致的。同时显示滑膜炎随时间的延长并没有加重,而

软骨损伤却是逐渐加重的,滑膜炎并不在 OA 病理角色中扮演中心作用。这也验证了为什么临床上用非甾体类抗炎药(如塞来昔布)治疗 OA 仅能减轻疼痛,但不能阻止关节炎进展。

免疫组化结果显示实验组软骨中 MAC 均呈高表达,而滑膜免疫组化未检测到 MAC 沉积,因此分析滑膜并不能形成 MAC,只是能够释放补体成分蛋白到滑液中从而加重软骨补体反应。滑膜虽在早晚期 OA 中均能促进促炎介质的释放,但实则是一个二级反应。首先患者关节损伤,软骨退变,降解产物释放到滑液中,引起早期滑膜炎,滑膜释放炎症介质如 IL-1、TNF-α、VEGF^[11]等以及补体成分 C3、C5、C7、C9 到滑液中^[12],软骨营养环境遭到破坏,激活补体系统,各成分补体在软骨细胞膜周围沉积形成补体复合物(MAC/C5b-9),引起细胞膜上孔洞形成,造成细胞破裂,软骨细胞作用失调,软骨细胞降解产物进一步增多,又加重滑膜炎退变,进而再一次损害软骨,如此循环往复造成关节不可逆的损伤。

同时免疫组化结果显示软骨细胞虽然高表达 MAC,但细胞看起来形态学上仍保存完好,所以亚溶解量的 MAC(sMAC)并不足以使细胞死亡,Wang et al^[12]发现 sMAC 可通过信号通路引起促炎介质和分解代谢分子的释放,MAC 与 ERK1/2 同时存在同一细胞中,ERK1/2 可抑制 MAC 的溶细胞作用。sMAC 还可以引起细胞的分泌、黏附、聚集,甚至细胞分裂,对抗细胞溶解。有核细胞可通过胞吞作用清除 MAC,这一过程通过 Ca^{2+} 调节^[13]。

Western blot 结果提示与红细胞阳性对照同一处出现 MAC 条带,红细胞溶解实验加的是人血清,利用异种属血清与红细胞相互反应激活补体系统,同时人血清可提供补体成分的原理,来提供阳性对照的标本。可见红细胞组与实验组均出现条带模糊不清的现象,这是由于补体复合物(MAC/C5b-9)是一个不定的复合物,其由 C5b-8、C6、C7、C8、C9 组成,C5b-8 可激发 C9,使 12~18 个 C9 发生自发聚合,与 C5b-8 共同在细胞膜上组成一个环状结构,使细胞渗漏,最后导致细胞死亡。可见 C9 是一个不定的成分,在 Western blot 上 MAC 的位置应该是一个不定的条带,所以结果显示条带弥散,只是显示 MAC 条带大概处于 >200 ku 的位置,与研究^[14]结果相似。

因此 MAC 可能在 OA 病理角色中处于一个中心作用的地位,滑膜与关节软骨相互作用加重软骨损伤,这对今后 OA 诊治有重要意义,有可能对逆转

软骨损伤提供新的研究思路。但同时应该认识到本实验仍存在一定的局限性: 人为造成半月板损伤的 OA 与退行性 OA 致病机制不尽相同, MAC 沉积是否同样表达在软骨细胞中尚待验证。Corvetta et al^[15]报道部分 OA 患者(6 例患者中有 3 例)滑膜中也有 MAC 沉积, 但本实验检测结果显示滑膜不存在 MAC, 滑膜只作为补体成分的供应结构, 分析与 Corvetta et al 用 C9 抗体而非 MAC 抗体有关, 同时 Wang et al^[12]定量发现滑膜基本无 MAC 存在, 本文结果与之相似。由于 MAC 属于不定的补体复合物, Western blot 检测方法只能定性证明 MAC 存在, 没法定量比较各组间差异。而且滑膜炎和软骨损伤在 MAC 形成前谁是第一个出现的, 不好定论, 同时也很难制造只有关节炎或者只有滑膜炎的动物模型, 具体哪些因素促进两者补体系统中哪些成分激活, 激活哪条补体途径, 怎么加速补体系统级联反应有待进一步研究。

参考文献

- [1] Brooks P M. The burden of musculoskeletal disease—a global perspective[J]. *Clin Rheumatol* 2006 25(6): 778–81.
- [2] Gobeze R, Kho A, Krastins B, et al. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther* 2007 9(2): R36.
- [3] Hill C L, Hunter D J, Jingbo N, et al. Synovitis detected on magnetic resonance imaging and its relation to pain and cartilage loss in knee osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis* 2007 66(13): 1599–603.
- [4] Fernandez-Madrid F, Karvonen R L, Teitge R A, et al. Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis[J]. *Magn Reson Imaging* 1995, 13(2): 177–83.
- [5] Moskowitz R W, Kresina T F. Immunofluorescent analysis of experimental osteoarthritic cartilage and synovium: evidence for selective deposition of immunoglobulin and complement in cartilaginous tissues[J]. *J Rheumatol* 1986 13(2): 391–6.
- [6] Mankin H J, Johnson M E, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules[J]. *J Bone Joint Surg Am* 1981 63(1): 131–9.
- [7] Pelletier J P, Martel-Pelletier J, Ghandur-Mnaymneh L, et al. Role of synovial membrane inflammation in cartilage matrix breakdown in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheumatol* 1985 28(5): 554–61.
- [8] Felson D T. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee[J]. *N Engl J Med* 2006 354(8): 841–8.
- [9] Roemer F W, Felson D T, Yang T, et al. The association between meniscal damage of the posterior horns and localized posterior synovitis detected on T1-weighted contrast-enhanced MRI—the MOST study[J]. *Semin Arthritis Rheum* 2013 42(6): 573–81.
- [10] Ayral X, Pickering E H, Woodworth T G, et al. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients[J]. *Osteoarthritis Cartilage* 2005 13(5): 361–7.
- [11] Bonnet C S, Walsh D A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation[J]. *Rheumatology* 2005 44(1): 7–16.
- [12] Wang Q, Rozelle A L, Lepus C M, et al. Identification of a central role for complement in osteoarthritis[J]. *Nat Med* 2011 17(12): 1674–9.
- [13] Badea T D, Park J H, Soane L, et al. Sublytic terminal complement attack induces c-fos transcriptional activation in myotubes[J]. *J Neuroimmunol* 2003 142(1–2): 58–66.
- [14] Webster S, Luea L F, Brachovaa L, et al. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging* 1997 18(4): 415–21.
- [15] Corvetta A, Pomponio G, Rinaldi N, et al. Terminal complement complex in synovial tissue from patients affected by rheumatoid arthritis, osteoarthritis and acute joint trauma[J]. *Clin Exp Rheumatol* 1992 10(5): 433–8.

Increased expression of complement complex in cartilage of osteoarthritis

Zhang Keke, Bi Yihui, Chen Xuezhou, et al

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the role of MAC in cartilage and synovial membrane by establishing the model of rat osteoarthritis. **Methods** 30 SD rats were randomly divided into control group, 4-week group, 8-week group and 12-week group. 10 rats were in each group. One of the operation group rats hind knee joints suffered anterior cruciate ligament transection and medial meniscus resection to induce a model of OA, 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks after surgery, both sides of the knee joint cartilages were removed for gross observation, hematoxylin and eosin (HE) staining and safranin O-fast green double dyeing, toluidine blue staining to assess histopathological injuries. Then immunohistochemistry and Western blot were used to detect the deposition and expression of MAC in

淫羊藿次苷 II 通过 p38MAPK 调控成骨细胞护骨素表达的体外研究

龚一昕¹, 刘尚全^{1,2}, 袁媛², 张维娜¹

摘要 目的 观察淫羊藿次苷 II (ICA II) 对大鼠成骨细胞 (OBs) 护骨素 (OPG) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 表达水平的影响, 探讨 ICA II 治疗骨质疏松症的相关机制。方法 原代培养 OBs, 分为对照组、ICA II 组、混合组 (ICA II + p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580)、抑制剂组 (SB203580) 组。PNPP 法检测各组 OBs 碱性磷酸酶 (ALP) 活性, Western blot 法检测 p38MAPK 蛋白、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、OPG 蛋白水平, RT-PCR 法检测各组 OPG mRNA 水平。结果 与对照组比较, ICA II 组 ALP 活性显著上调 ($P < 0.01$), 混合组 ALP 活性较 ICA II 组下降 ($P < 0.05$); ICA II 组 p-p38MAPK 水平较对照组显著升高 ($P < 0.01$), 混合组 p-p38MAPK 水平较 ICA II 组明显降低 ($P < 0.01$); 各组间总 p38MAPK 表达量无明显差异; ICA II 组 OPG 分泌水平较对照组明显上调 ($P < 0.01$), 混合组 OPG 蛋白分泌与 ICA II 组相比明显受抑制 ($P < 0.01$); ICA II 组 OPG mRNA 水平较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 混合组 OPG mRNA 水平较 ICA II 组下降 ($P < 0.05$)。结论 ICA II 可促进成骨细胞分化和上调成骨细胞 OPG 表达, p38MAPK 信号通路可能参与这一过程。

关键词 淫羊藿次苷 II; 成骨细胞; 护骨素; p38MAPK; 骨质疏松

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1790-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.016

骨质疏松是一种以骨量减少、骨组织微结构退行性改变、骨强度降低为特征的全身代谢性骨病。淫羊藿 (*Herba Epimedii*) 系小檗科 (*Berberidaceae*) 淫羊藿属 (*Epimedii*) 植物, 是中医治疗骨质疏松方剂中使用频率最高的中草药之一^[1]。主要成分淫羊藿苷 (*Icaritin*, ICA) 在肠道内脱去糖基生成淫羊藿次苷 II (*Icariside* II, ICA II), 以 ICA II 的形式吸收并发挥作用^[2]。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK) 是真核细胞信号转导调控机制中分布最广、介导胞外信号引起胞内反应的重要信号系统, 可能是成骨细胞的活化、增殖、分化的关键信号通路之一^[3]。该研究通过体外培养大鼠成骨细胞 (osteoblasts, OBs), 观察 ICA II 对大鼠 OBs 的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 水平、护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 表达的影响, 同时应用 p38MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 进行干预, 探讨 ICA II 对 OBs 的作用及其与 p38MAPK 信号通路的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 出生 24 h 以内的新生 SD 大鼠 (SPF 级) 购自安徽医科大学动物实验中心; 淫羊藿药材

2016-07-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30840106)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第三附属医院内分泌科, 合肥 230061² 合肥市滨湖医院中心实验室, 合肥 230601

作者简介: 龚一昕, 女, 硕士研究生;

刘尚全, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 52100325@qq.com

cartilage. **Results** Compared with the control group, knee cartilages of operation groups after 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks were rough, contained erosion, defects, cracks and osteophyte formation from the early to the late stage of OA. There were statistically significant differences in Mankin score between the random two groups ($P < 0.01$), and damage gradually increased. There was statistical significance in synovium score among the groups ($P < 0.01$), and the inflammation gradually decreased. MAC deposited around the cartilage cell membrane in immunohistochemistry. There was no MAC in the synovial membrane basically. The results of Western blot showed that there was a MAC band in the experimental group, while the control group not. **Conclusion** MAC is expressed in cartilage of rats with osteoarthritis, and the complement system may be a new direction for the diagnosis and treatment of osteoarthritis.

Key words osteoarthritis; complement; membrane attack complex; cartilage; synovial membrane