

熊翱,熊仁平,彭艳,等. 脂多糖诱导SD大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

Xiong A, Xiong RP, Peng Y, et al. Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 436-446.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.002

脂多糖诱导SD大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析

熊翱^{1,2}, 熊仁平^{2*}, 彭艳², 李宇¹, 江旭¹, 许建中^{1*}

(1. 郑州大学第一附属医院骨科, 郑州 450052;

2. 中国人民解放军陆军特色医学中心野战外科研究部, 重庆 400042)

【摘要】 目的 建立 Sprague Dawley (SD) 大鼠的正常膝关节滑膜细胞原代培养方法及脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 诱导成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 炎症模型。方法 选取 80 ~ 120 g SPF 级幼年 SD 大鼠, 分离其滑膜组织, 原代培养至第 3 代, 用组织化学染色法和 EdU 法检测 FLS 蛋白标志物 vimentin 和增殖功能。同时, 用滑膜组织作对照, 检测第 3 代至第 8 代原代培养 FLS 的特征蛋白表达, 筛选具有生理功能的高纯度且可用于后续实验的 FLS 细胞。LPS 诱导 FLS 炎症后, 检测 LPS 刺激 FLS 不同时间点的 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 和蛋白表达, 根据实验结果确定 LPS 成功诱导 FLS 炎症模型的时间点。最后, 检测 FLS 被 LPS 诱导前后的细胞因子、增殖功能和特征蛋白的表达, 为分析 FLS 炎症模型提供实验数据。结果 采用 0.2% I 型胶原酶消化法, 成功培养了 FLS 原代细胞。经检测蛋白标志物 vimentin, 第 3 代 FLS 纯度达 98% 以上。通过 FLS 特征蛋白检测, 筛选出具有生理功能且可用作后续实验的 FLS 为第 3 代至第 7 代原代细胞。通过对 LPS 诱导后的 FLS 的细胞因子和特征蛋白分析, 确定 1 μ g/mL LPS 诱导 FLS 细胞 3 h, 能复制出 FLS 炎症模型。结论 LPS 诱导的 FLS 炎症模型可作为体外研究炎性关节病的细胞模型。

【关键词】 成纤维样滑膜细胞; 原代培养; 波形蛋白; 炎性关节病; 模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0436-11

Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats

XIONG Ao^{1,2}, XIONG Renping^{2*}, PENG Yan², LI Yu¹, JIANG Xu¹, XU Jianzhong^{1*}

(1. the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China.

2. Army Characteristic Medical Center of the Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400042)

Corresponding author: XU Jianzhong. E-mail: 13937133786@163.com; XIONG Renping. E-mail: xiong_ren_ping@163.com

【Abstract】 Objective To establish synovial cell primary cultures and a lipopolysaccharide (LPS)-induced fibroblast-like synoviocyte (FLS) inflammatory model of a normal knee joint in Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** Normal knee joint synovium (80-120 g) was separated from specific-pathogen-free SD rats in an ice bath with phosphate-buffered saline. The primary synovium was cultured to the 3rd generation. Vimentin expression and FLS proliferation were detected via immunohistochemical staining and the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine method. Synovial tissue was used as a control

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81701915)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81701915).

【作者简介】 熊翱 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 骨科运动医学、创伤基础与临床。Email: 2528359578@qq.com

【通信作者】 许建中 (1964—), 男, 教授, 博士, 骨科主任, 主要研究方向: 骨关节疾病。Email: 13937133786@163.com;

熊仁平 (1963—), 男, 教授, 主要研究方向: 创伤分子生物学基础与临床。Email: xiong_ren_ping@163.com。

* 共同通信作者

to detect characteristic protein expressions in the FLS in the 3rd–8th generations of primary culturing and to screen the FLS for high purity and physiological functions for use in subsequent experiments. After LPS-induced FLS inflammation, the mRNA and protein expressions of IL-1 β and TNF- α were detected at different time points to determine the time point at which LPS could successfully induce an FLS inflammatory model. Finally, the cytokine expression, proliferative functions and characteristic proteins of the FLS before and after LPS induction were detected to provide experimental data to evaluate the FLS inflammatory model. **Results** FLS primary cells were successfully cultured with 0.2% collagenase I digestion. The FLS purity in the 3rd generation exceeded 98% for detecting vimentin. By detecting characteristic FLS proteins, FLS with physiological functions that could be used for subsequent experiments were selected as the primary cells from the 3rd–7th generations. Analyzing the cytokines and characteristic proteins in FLS before and after LPS induction revealed that 1 μ g/mL LPS is required to stimulate FLS cells for 3 h to replicate the FLS inflammatory model. **Conclusion** The LPS-induced FLS inflammatory model can be used to study inflammatory arthritis *in vitro*.

【Keywords】 fibroblast-like synoviocytes; primary culture; vimentin; inflammatory joint disease; model

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

纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 是关节滑膜的主要细胞之一^[1]。生理状态下的 FLS 参与润滑和免疫调节功能,维持关节腔稳态,参与关节的正常功能^[2];滑膜炎状态下的 FLS,由关节保护作用转变为关节破坏作用,分泌炎症介质,使滑膜免疫细胞浸润。免疫细胞诱导滑膜纤维化和滑膜新生血管形成^[3],加重 FLS 的促炎状态,导致蛋白酶和促炎细胞因子增加^[4],逐步导致关节功能丧失。所以,滑膜 FLS 在炎性关节病 (inflammatory joint disease, IJD) 中的作用研究越来越受到重视。但要对 FLS 进行深入研究,首先要解决的问题,是建立滑膜 FLS 的原代培养及其病理模型。

有研究者通过手术时获取伤病患者的关节滑膜分离原代培养滑膜细胞进行 FLS 研究^[5–6],但获取病人滑膜的影响因素多,为 IJD 的 FLS 研究增加了难度。据此,有学者采用手术和化学法 (木瓜蛋白酶、单碘乙酸钠和胶原酶等) 诱导 OA 模型^[7],分离其滑膜 FLS,偏重于骨关节退行性变的研究;有学者采用胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA)^[8],分离其滑膜 FLS,偏重于类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的发病机制和治疗研究;有学者建立佐剂性关节炎大鼠滑膜成纤维细胞 (AA-FLS)^[9],偏重于类风湿药物研究,等等。国内外学者从诱导的各类动物疾病模型中分离出的 FLS,对 FLS 的鉴定,绝大多数采用的是形态观察以及组织化学染色法和流式细胞术检测 FLS 的蛋白标志物波形蛋白 (Vimentin),只有极少数进行了 FLS 的细胞增殖功能鉴定^[6]。但他们都没有进行原代培养的正常 FLS 和诱导模型的 FLS 特征蛋白检测和分析。

不论是 OA,还是 RA 和强制性脊椎炎等 IJD,都

要释放促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等^[10–11],并且这些炎症因子与信号通路之间存在级联反应,通过各种途径促使 IJD 的发生发展。促炎因子不仅参与炎症生成阶段的调节,且在随后的炎症消退中也发挥重要作用。促炎因子已被确定为炎症的关键介质^[11]。鉴于此,若能诱导出 FLS 的炎症模型,势必对 IJD 的抑炎研究提供了工具。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌壁外壁的组成成分,是由脂质和多糖构成的物质。当其作用于人类或动物等其他生物细胞时,就会表现出多种生物活性。LPS 是动物免疫系统对入侵的革兰氏阴性菌的首要识别及攻击目标,它能够诱导动物分泌多种炎症细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,广泛用于动物疾病建模。国内外学者,通过小鼠乳头导管灌注 0.2 mg/mL 的 LPS 50 μ g 成功诱导小鼠乳腺炎模型^[12],D-氨基半乳糖联合 LPS 腹腔注射 8 周,隔日 1 次,成功诱导了小鼠慢性肝损伤模型^[13]。OA 和 RA 的研究中,LPS 刺激上调了 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平^[11,14]。由此可见,LPS 刺激 FLS 可以模仿类似于 OA 和 RA 的炎症环境。在 IJD 体外研究中,用 LPS 诱导 FLS 炎症状态,建立 FLS 炎症模型在理论上是可行的。

本研究通过分离 SD 雄性大鼠的膝关节滑膜组织,原代培养至第 3 代,进行 FLS 蛋白标志物 Vimentin 和增殖功能鉴定,同时,用滑膜组织作为对照,检测原代培养 FLS 的特征蛋白的表达,筛选具有生理功能且纯度达 95% 的 FLS,用 LPS 进行 FLS 炎症模型诱导,检测其促炎细胞因子和特征蛋白的表达,建立 FLS 炎症模型,为 IJD 发病机制及其治疗研究提供实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄 SPF (specific pathogen free animals) 级雄性 SD 大鼠 45 只, 体重约为 100 g, 购于陆军军医大学陆军特色医学中心实验动物中心【SCXK (军) 2017-0026】, 饲养于陆军军医大学陆军特色医学中心实验动物中心【SYXK (军) 2017-0058】。所有操作均符合陆军军医大学实验动物伦理学要求 (审批号: AMUWEC20201267), 严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 仪器与试剂

显微外科手术器械 (上海医疗器械有限公司), 25 cm² 培养瓶 (Hyclone), 0.22 μm 滤器 (millipore), CO₂ 培养箱 (Thermo, 美国), Millicell[®] EZISLIDE (Millipore)。戊巴比妥钠 (德国进口分装), DMEM (high glucose) (BI), 双抗 (GiBco), 0.25% 胰酶 (GiBco), 4% 多聚甲醛 (博士德), Anti-vimentin (Abcam, ab8978), Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Abcam, ab15017), DAPI (Abcam, ab228549), 小鼠 SP 试剂盒 (中杉金桥), DAB 染色试剂盒 (中杉金桥)。Western Blot 实验系统和试剂 (Bio Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 滑膜细胞的获取与原代培养

采用腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠, 剂量为 2 mL/(kg · bw)。75% 乙醇浸泡大鼠 10 ~ 20 min, 取双侧后膝关节 (图 1A、1B)。先后用自来水和含双抗 (100 μg/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) 的 PBS 冲洗膝关节后, 转移膝关节至超净工作台盛有含双抗的 PBS 平皿中, 进行滑膜组织分离。分离条件: 冰浴, 无菌, PBS 浸泡, 锐性。剪碎滑膜组织至 1 mm × 1 mm × 1 mm, 将其移至 10 mL 无菌离心管短暂低速离心, 弃上清, 加入 1 mL 0.2% I 型胶原酶重悬滑膜组织, 转移其至 25 cm² 培养瓶, 用 0.2% I 型胶原酶定容至 3 mL, 轻晃培养瓶, 使其底部滑膜组织均匀分布。在 37℃ 和 5% CO₂ 下, 消化滑膜组织 4 ~ 6 h, 使其变成棉絮状, 向培养瓶加入 10% FBS 终止消化。收集滑膜组织转移至无菌离心管, 短暂低速离心, 弃上清, 加入完全培养基重悬洗涤一次后, 移至 25 cm² 培养瓶, 用高糖完全培养基 (含双抗) 定容至 3 mL, 轻晃培养瓶, 使滑膜组织在底部均匀分布。在 37℃, 5% CO₂ 的培

养箱培养滑膜组织, 每天观察细胞游出情况, 第 2 天可见梭形细胞游出 (图 1C), 2 ~ 3 d 换液一次。

1.2.2 滑膜细胞传代

待原代培养细胞融合度达 70% ~ 80%, 吸弃培养基。向培养瓶加入含 EDTA-2Na 的 0.25% 胰酶消化, 轻晃培养瓶, 使消化液覆盖瓶底, 轻拍瓶底, 帮助消化。倒置显微镜观察到细胞间隙增大, 细胞回缩变圆且悬浮时, 向培养瓶加入 10% FBS 终止消化。收集细胞至离心管, 短暂低速离心。完全培养基洗涤 1 次, 再用完全培养基重悬细胞, 混匀, 按 1:2 ~ 1:3 传代至新的无菌培养瓶中。

1.2.3 滑膜细胞鉴定

(1) 细胞形态观察

在倒置显微镜下, 每天观察滑膜细胞的形态, 生长状态。梭形为 FLS, 圆形、椭圆形为巨噬样滑膜细胞。观察每代梭形细胞占视野细胞中的比例, 目测 FLS 的纯度。

(2) 细胞免疫荧光化学染色

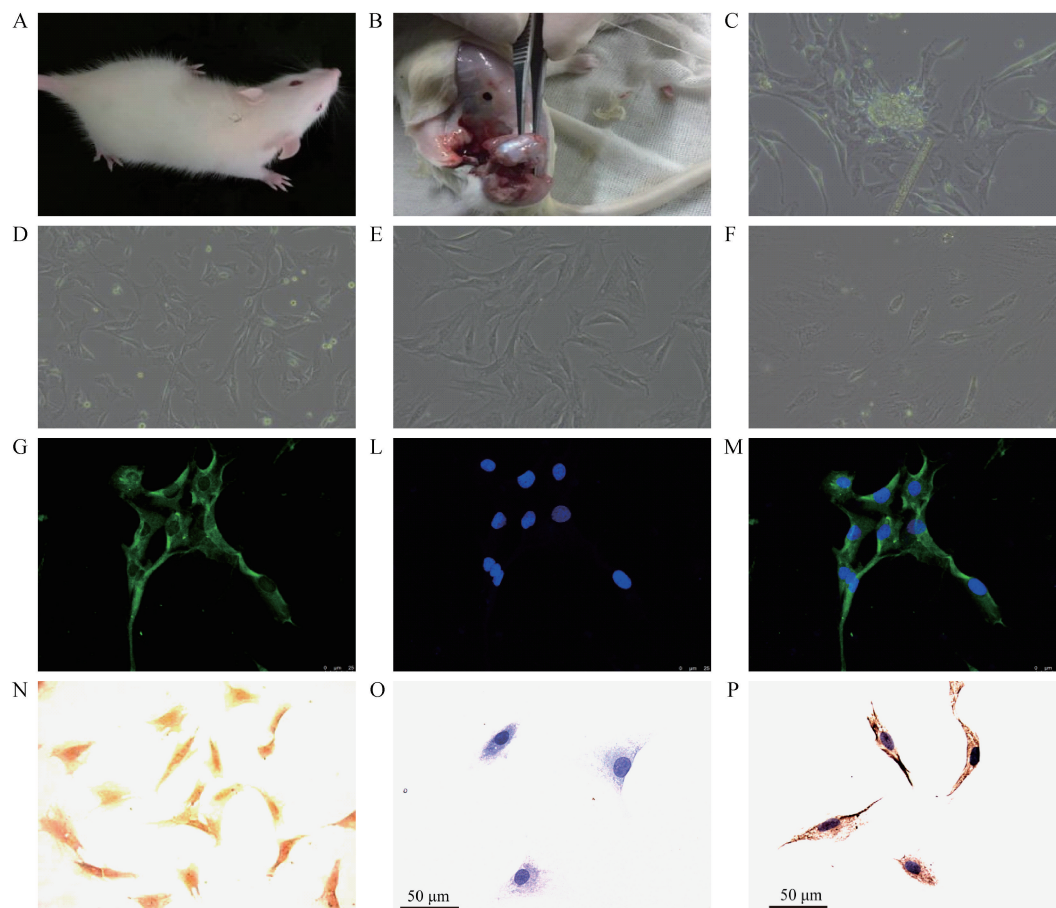
第 3 代滑膜细胞, 调整细胞比例为 4×10^4 /mL, 按每孔 0.2 mL 的容量接种至腹腔小室, 培养箱培养 24 h。向腹腔小室加入 4% 多聚甲醛 300 μL, 固定 20 min 后, PBS 洗 2 ~ 3 次。用 0.2% Triton X-100, 在 37℃ 下透化 20 min 后, 向腹腔小室加入鼠抗 Vimentin 抗体 (1:200), 4℃ 湿盒孵育过夜, 加入荧光 488 抗鼠 IgG (1:500), 在 37℃ 下避光孵育 1 h 后, 用 DAPI 对细胞核染色 (37℃) 15 min 后, 用防荧光淬灭剂封片。荧光显微镜观察并拍照。根据所测滑膜细胞中 Vimentin 染色情况, 判断 FLS 的纯度。如滑膜细胞中染色 Vimentin 的细胞在 98% 以上, 即 98% 以上的细胞为 FLS。

(3) 细胞免疫组织化学染色

第 3 代滑膜细胞参照细胞免疫荧光化学染色加入鼠抗 Vimentin 单抗, 下面步骤按小鼠 SP 试剂盒说明书进行。DAB 显色后显微镜下观察拍照分析。判断滑膜细胞 FLS 纯度的方法同 (2)。

(4) FLS 的 EdU 细胞增殖检测

参照 EdU 细胞增殖检测 (广州锐博生物科技有限公司, 产品编号: C10310-1) 说明书完成。简述如下: 第七代滑膜细胞, 调整细胞比例为 4×10^4 /mL, 按每孔 0.2 mL 的容量接种至腹腔小室, 培养箱培养 24 h。用细胞完全培养基按 1000:1 稀释 EdU 溶液, 制备成 50 μmol/L EdU 培养基; 每孔加入 100 μL 50 μmol/L 培养基孵育 12 h。向腹腔小室加入含 4% 多



注: A: SD 正常大鼠。B: 膝关节滑膜分离。C: 滑膜细胞培养第 1 天($\times 10$)。D: 滑膜细胞培养第 6 天第 1 代传代前($\times 10$)。E: 滑膜细胞培养至第 3 代($\times 10$)。F: 滑膜细胞培养至第 8 代($\times 10$)。G-M: 滑膜细胞培养至第 3 代 Vimentin 荧光化学鉴定($\times 40$, 标尺 = $25\ \mu\text{m}$) (G: Vimentin, 绿色; L: DAPI, 蓝色; M: Merge)。N-P: 滑膜细胞培养至第 3 代 Vimentin 组织化学鉴定($\times 40$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) (N: Vimentin 为棕黄色, DAPI 缺失; O: DAPI 为蓝色, Vimentin 缺失; P: Vimentin 为棕黄色, DAPI 为蓝色即细胞核)。

图 1 SD 大鼠正常滑膜细胞原代培养及其鉴定

Note. A, SD normal rats. B, Synovium of knee joint was separated. C, Synovial cells cultured on day 1 ($\times 10$). D, Synovial cells were cultured on the 6th day before the first passage ($\times 10$). E, Synovial cell culture to the third generation. F, Synovial cell culture to the eighth generation ($\times 10$). G-M, Fluorescence identification of vimentin from synovial cell culture to the third generation ($\times 40$, bar = $25\ \mu\text{m}$) (G, Vimentin, green. L, DAPI, blue. M, Merge). N-P, Histochemical identification of vimentin from synovial cell culture to the third generation ($\times 40$, bar = $50\ \mu\text{m}$) (N, Vimentin is brownish yellow, DAPI is absent. O, DAPI is blue, vimentin is absent. P, vimentin is brownish yellow, DAPI is blue, i.e. nucleus).

Figure 1 Primary culture and identification of normal synovial cells of SD rats

聚甲醛的 PBS $300\ \mu\text{L}$ 固定 30 min。用 0.5% Triton X-100 渗透剂孵育 10 min 后, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ Apollo[®] 染色反应液, 脱色摇床孵育 30 min。用 $100\ \mu\text{L}$ 0.5% Triton X-100 渗透剂脱色摇床清洗 2 ~ 3 次, 每次 10 min。在 37°C 下, 用 $100\ \mu\text{L}$ $1 \times$ Hoechst 33342 对 DNA 避光染色 25 min, PBS 洗 2 ~ 3 次, 用防荧光淬灭剂封片。荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 LPS 刺激 FLS

采用鉴定纯度超过 98% 的 FLS, 细胞比例为 $4 \times 10^4/\text{mL}$, 按每孔 0.2 mL 容量接种至腹腔小室, 培养箱培养 24 h。向腹腔小室加入 LPS, 使其终浓度为 $1000\ \text{ng}/\text{mL}$ (经过预实验获得), 刺激 FLS 细胞 24 h。在 0、1、3、6、12、24 h 的时间点, 分别用

0.25% 的胰酶消化 FLS 2 ~ 5 min, 用 10% FBS 终止消化, 各收集细胞 5 例, 贮于 -80°C 备用。

1.2.5 Western Blot 测定 FLS 中的细胞因子和特征蛋白表达

收集滑膜组织和培养对数生长期且纯度达到 98% 的第 3 ~ 8 代 FLS 及其经 $1000\ \text{ng}/\text{mL}$ LPS 刺激不同时间观测点的细胞, 各 5 例, 提取总蛋白。考马斯亮蓝法定量总蛋白, 调整样品总蛋白浓度为 $1.5\ \text{mg}/\text{mL}$ 。每孔上样 $20\ \mu\text{L}$, SDS-PAGE 电泳分离。0.3A 恒流湿转 50 min 或 1.5 h, 将凝胶电泳分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上。转膜结束后, PVDF 膜置入 6% 脱脂奶粉封闭。PVDF 膜经封闭洗膜后, 加入兔抗 IL-1 β 、TNF- α 、PCNA、

Collagen IV、Fibronectin、VEGF、Lubricin 和 Hyaluronan Synthase 2 多抗,按 1:1000 稀释。使 PVDF 膜与上面相应的一抗,在室温孵育 50 min 或 1.5 h。再次洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的 IgG(1:10 000),使 PVDF 膜与之在室温孵育 50 min, ECL 法检测。检测完毕,用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 洗涤 PVDF 膜 2 次 $\times$ 15 min,用抗体洗脱液(pierce 公司)洗脱 PVDF 膜上抗体,1 次 $\times$ 15 min,同上法洗膜和封闭后,用辣根过氧化物酶标记的甘油三磷酸脱氢酶(glycerol 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(1:10 000),与 PVDF 在室温孵育 50 min, ECL 法检测。扫描分析软件系统扫描 X 射线光片蛋白条带进行密度分析。结果采用目的蛋白的光密度值与 GAPDH 内参蛋白的光密度值比值校正上样量误差。

1.2.6 QRT-PCR 检测 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 基因变化

将用终浓度为 1000 ng/mL 的 LPS 刺激 FLS 后收集的细胞,采用 TRIzol 法提取总 RNA, promega 公司的反转录试剂合成 cDNA,用 IL-1 β (Forward: 5'-CCTTGTCGAAGTGTCTGAAG-3'; Reverse: 5'-GGGCTTGGAAGCAATCCTTA-3')、TNF- α (Forward: 5'-CAAGGAGGAGAAGTTCCCA-3'; Reverse: 5'-TTGGTGGTTTGCTACGACG-3') 和 GAPDH (Forward: 5'-TCTTCCAGGAGCGAGATCCC-3'; Reverse: 5'-TTCAGGTGAGCCCCAGCCTT-3') 引物^[15]去扩增,分析 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达。复管,重复 5 次。qRT-PCR 反应体系:2 $\times$ master mix(promega 公司)10 μ L, 消毒水 7 μ L, primer 0.5 μ L, cDNA 2 μ L。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C, 10 s 变性,PCR 优化的退火温度,59 $^{\circ}$ C, 15 s 退火,40 个循环。55 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C 观察 melt curve。

1.3 统计学分析

实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 滑膜细胞形态和生长情况

分离的滑膜组织经培养 6 ~ 8 h 后,开始贴壁,1 d 后细胞游出,绝大部分为梭形(图 1C),圆形、椭圆形较少。培养第 6 天,细胞融合度达 70% ~ 80%,贴壁生长,但仍有极少的圆形、椭圆形细胞(图

1D)。培养第 12 ~ 14 天,已传至第 3 代的滑膜细胞形态基本上全为梭形,圆形、椭圆形等其他形状基本消失(图 1E)。第 8 代滑膜细胞增长缓慢,形态从梭形变为近似椭圆形,细胞间隙增大(图 1F)。滑膜细胞第 3 ~ 7 代,增殖活跃,生长情况良好(图 1G-M)。

2.2 滑膜细胞的免疫荧光化学和免疫组织化学染色

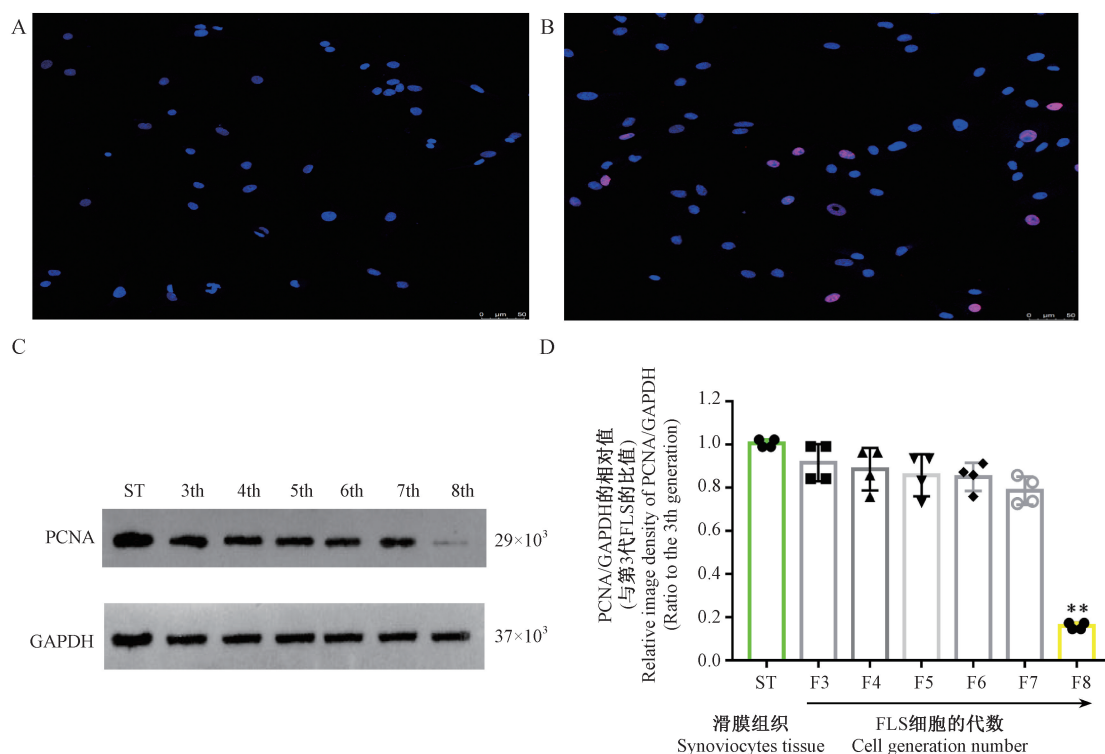
I 型胶原酶消化法获得的滑膜细胞第 3 代,用免疫染色观察:形态规则,呈梭形,其细胞核为卵圆形且位于细胞中央;滑膜细胞 Vimentin 染色阳性率大于 98%(图 1G-P)。Vimentin 为 FLS 特征性标注蛋白,提示培养的滑膜细胞为 FLS,且纯度达 98% 以上。

2.3 原代滑膜细胞的增值功能检测

对第 7 代滑膜细胞的 EdU 增殖实验,显示细胞具有增殖能力(图 2A, B)。通过对滑膜组织和第 3 ~ 8 代各代滑膜细胞的增殖核抗原 PCNA 蛋白的 Western Blot 检测分析,各代培养细胞同滑膜组织一样,都有增殖功能。与第 3 代比较,除第 8 代 PCNA 蛋白表达下调($t = -51.056$, ** $P < 0.01$),差异具有显著性外,余各代差异不具有显著性(图 2C, D)。

2.4 滑膜组织和滑膜 FLS 的细胞因子和特征蛋白检测

通过原代培养滑膜组织而获得的 FLS,与滑膜组织一样,都能表达具有天然免疫应答的细胞因子和特征蛋白。与第 3 代 FLS 的 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达量比较,第 4 ~ 7 代的每代 FLS 的 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达差异不显著,第 8 代 FLS 的 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达下调,差异具有显著性(图 3A-C)。原代培养获得的 FLS 具有分泌对关节囊有修复作用的结缔组织成分,与第 3 代 FLS 比较,第 4 ~ 7 代的每代 FLS 分泌 Collagen IV 和 Fibronectin 蛋白水平差异不显著,第 8 代 FLS 分泌 Collagen IV 和 Fibronectin 蛋白的能力下降,差异显著(图 4A-C)。同时,原代培养获得的 FLS 还有产生与滑膜组织一样的 Lubricin 和 Hyaluronan Synthase 2 蛋白的能力,与第 3 代 FLS 比较,第 4 ~ 7 代的每代 FLS 分泌功能没有显著差异,第 8 代分泌功能减弱,差异显著(图 4A、D 和 E)。综合对原代培养滑膜细胞获得的 FLS 的细胞因子和特征蛋白检测结果,确定滑膜细胞原代培养的第 3 ~ 7 代 FLS 可作为后续实验研究。



注:A,B:第7代滑膜细胞 EdU 增殖实验($\times 10$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) (A:阴性对照, 只将 DNA 染成了蓝色。B:将增殖细胞染成了红色, DNA 染成了蓝色)。C:滑膜组织和原代培养的第3代至8代 FLS 的增殖细胞核抗原蛋白(PCNA)的 Western Blot 结果。D:各组 PCNA 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 43.936$, $P < 0.001$ 。与第3代比较, 只有第8代 PCNA 蛋白表达显著下调, $** P < 0.01$ 。

图2 原代滑膜细胞传代后的增殖功能检测

Note. A and B, Proliferation of synovial cells to the seventh generation of EdU($\times 10$, bar = $50\ \mu\text{m}$) (A, Negative control, only DNA stained blue. B, Proliferating cells were dyed red and the DNA was dyed blue.). C, Western Blot results of PCNA protein in the synovial cells tissue (ST), the 3th to the 8th generation of fibroblast-like synovial cells (FLSs). D, One-way ANOVA between PCNA protein groups, $F = 43.936$, $P < 0.001$. Compared with the third generation, only the eighth generation of PCNA protein expression was significantly down regulated, $** P < 0.01$.

Figure 2 Proliferative function of primary synovial cells

2.5 LPS 刺激 FLS 后不同时间点炎症因子的 mRNA 和蛋白的表达

1000 ng/mL 的 LPS 刺激 FLS 后, 与 0 h 相比较, IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达迅即上升, 在 3 h 达到高峰, 其均值是 0 h 的 17.865 倍和 19.177 倍, 随后下降, 但仍高于 0 h (图 5A, B)。同时, IL-1 β 和 TNF- α 在蛋白质上的表达, 与 0 h 相比较也迅即上调, 在 6 h 达到高峰, 但与 3 h 比较无显著差异, 6 h 的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 蛋白表达与 GAPDH 内参蛋白表达的比值是 1.003 和 1.380, 随后下降。6 h 后但仍高于 0 h (图 5C, D)。综合 LPS 刺激 FLS 后的细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在基因和蛋白质上的表达情况, 确定 LPS 刺激 FLS 的时间为 3 h, 刺激 FLS 的 LPS 终浓度为 1000 ng/mL, 完成 LPS 诱导 FLS 的炎症模型。

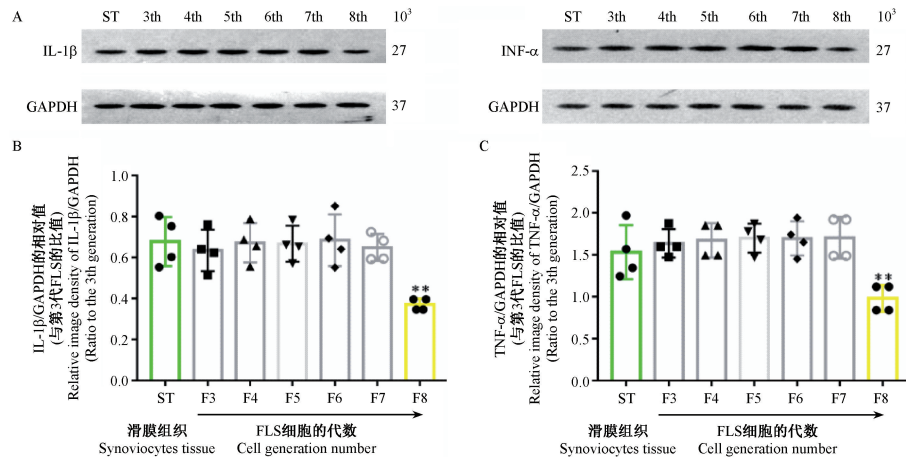
2.6 LPS 刺激 FLS 后 3 h 细胞因子和特征蛋白的表达

1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较,

细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在蛋白质上上调显著, 增殖核抗原 PCNA 蛋白增加明显 (图 6A); Collagen IV 和 Lubricin 蛋白表达增加且差异显著, 具有修复关节囊作用的结缔组织成分 Fibronectin 蛋白明显下调 (图 6B); Hyaluronan Synthase 2、VEGF 和 Cadherin 蛋白表达增加且差异显著 (图 6C)。

3 讨论

建立实验动物的体内和体外模型, 目的都是为了更好地研究疾病的发病机制、治疗方法及其效果评价, 但动物的选择要根据实验需要和研究目的来确定, 同时还要兼顾实验时间的长短、动物饲养成本的高低、操作难易程度等。为了研究 RA 的滑膜增生, 陈芳等^[16]改良了组织块法, 分离培养了兔膝关节 FLS。滑膜炎症是 OA 和 RA 等 IJD 的共同病理过程, 其动物模型, 应选择动物成熟期短, 能满足较短的实验周期, 且生存及抗感染能力较强的动物。据统计, 目前 1/4 OA 动物模型选择大鼠作为



注:A:滑膜组织(ST)及其原代培养第3代~第8代 FLS 的 IL-1 β 、TNF- α 及其 GAPDH 的 Western Blot 结果。B:各组 IL-1 β 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 5.115, P = 0.002$ 。IL-1 β 蛋白表达相对光密度值,与第3代 FLS 比较,第8代 FLS 降低非常显著($t = -5.639, ** P < 0.01$)。ST、第4代~第7代 FLS 变化差异不具有显著性。C:各组 TNF- α 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 8.672, P < 0.001$ 。TNF- α 蛋白表达相对光密度值,与第3代 FLS 比较,第8代 FLS 降低非常显著, $** P < 0.01$ 。ST、第4代~第7代 FLS 变化差异不具有显著性。

图3 滑膜组织和滑膜 FLS 的细胞因子 Western Blot 检测分析

Note. A, Western Blot results of IL-1 β , TNF- α and GAPDH in synovium tissue (ST) and primary synovium cells after passage. B, One-way ANOVA between IL-1 β protein groups, $F = 5.115, P = 0.002$. Compared with the expression of IL-1 β protein in the third generation FLS, the expression of IL-1 β protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -5.639, ** P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. One way ANOVA between TNF- α protein groups, $F = 8.672, P < 0.001$. Compared with the expression of TNF- α protein in the third generation FLS, the expression of TNF- α protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($** P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS.

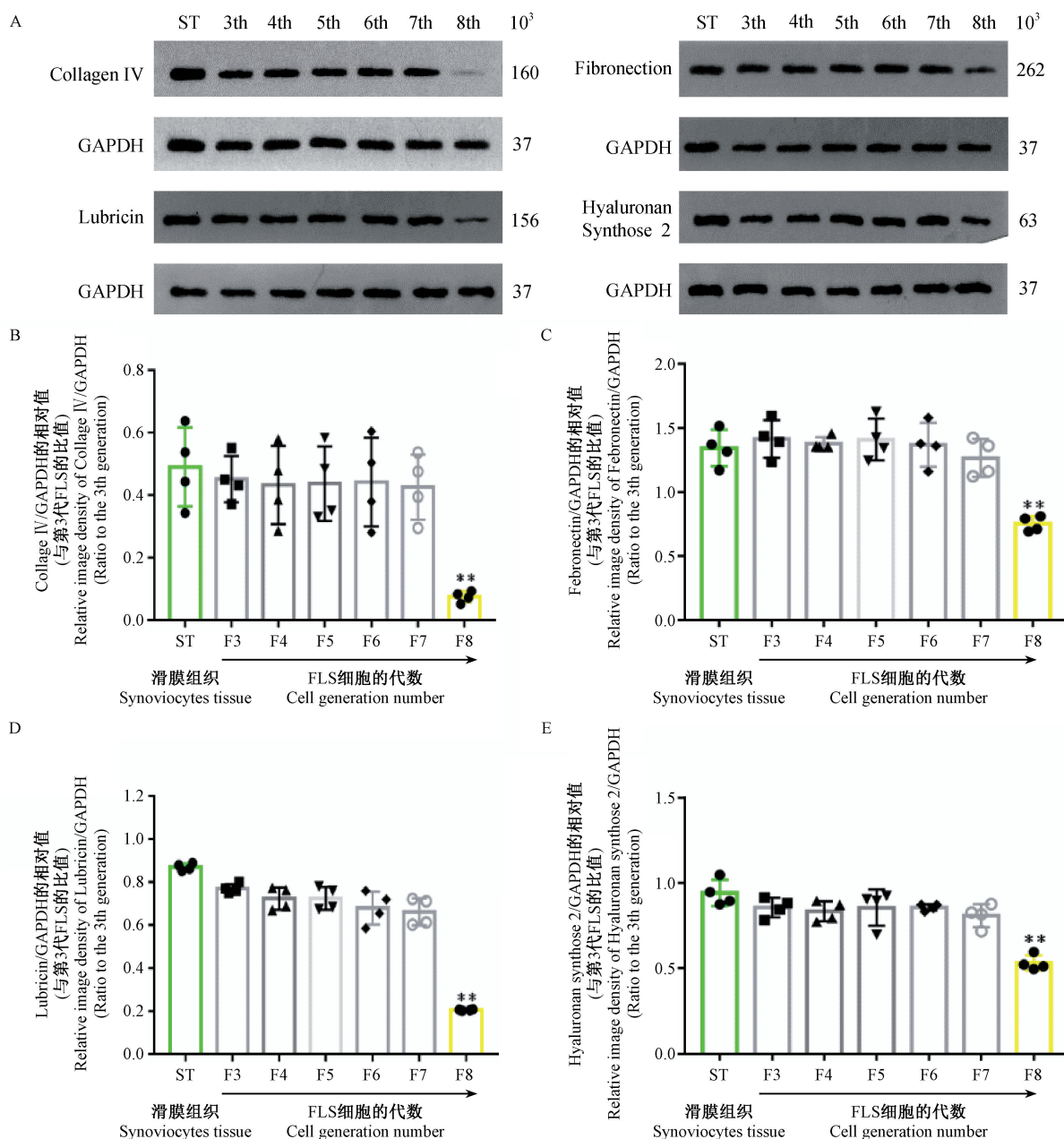
Figure 3 Western Blot analysis of cytokines in synovial tissue and FLS

实验动物^[17]。大鼠模型能模拟人类 IJD 发病机制和病理过程,且具有操作方便易行、稳定性高、干扰因素少等特性。本实验不仅是建立滑膜 FLS 原代培养方法,更重要的是建立 FLS 炎症模型,所以我们选择了 SPF 级 SD 大鼠。建模获得成功,为研究 IJD 提供了良好的实验条件。

在 OA 和 RA 等 IJD 中,由于可溶活性因子和细胞表面的相互作用激活 FLS,合成并释放促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等,激活免疫系统,从免疫防御转变为免疫破坏,破坏关节,改变关节正常功能^[18]。越来越多的研究^[19]显示:IJD 滑液促炎因子分泌增加,滑膜明显增厚,其 FLS 异常增殖和侵袭。IJD 中润滑素水平降低,透明质酸分子的数量下降,滑液的润滑能力也下降,增高了磷脂水平,脂肪链变短,不能有效减轻关节活动的摩擦力^[20]。促炎因子在炎症模型的高表达,是模拟炎症病理状态的关键。尤欣等^[21]以 hIL-1 β 为炎症抗原诱导兔膝关节炎,检测到关节滑膜组织 hIL-1 β mRNA 的表达,滑膜组织呈结节样增生,关节炎的严重程度与注入关节腔的 MFG hIL-1 β 转染兔滑膜细胞数目成正相关。熊乐等^[22]向大鼠坐骨神经断端显微注射 LPS (2 g/L) 1 μ L,术后 1.5 h 和 24 h 的 IL-1 β mRNA 和单核细

胞趋化蛋白-1 (MCP-1) mRNA 的表达明显升高。运用 LPS 诱导乳腺炎模型^[12],导致 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子释放异常增加,加重炎症。LPS 作为炎症抗原,LPS 激活了固有的免疫系统,可通过细胞信号转导系统激活单核巨噬细胞、内皮细胞、FLS、上皮细胞等合成和释放多种细胞因子和炎性介质,具有良好的一致性和重复性^[12]。利用 LPS 刺激 FLS 促进促炎因子的分泌,可以诱导出 FLS 的炎症病理过程,LPS 诱导的 FLS 炎症模型,符合 IJD 的基本特征^[20]。

IJD 的主要特征是促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 高表达,通过一系列炎症级联反应和激活各类信号通路,调节下游因子,促使 IJD 的发生和加剧,直至关节破坏。IJD 的临床症状是关节疼痛、僵硬和关节残废^[14]。软骨降解在 IJD 的发病中起着重要作用,丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路是软骨降解的主要途径。促炎因子是激活 p38-MAPK 信号通路的主要因素之一,MAPK 信号通路的异常激活又可促进炎症反应,导致软骨基质降解酶的释放,从而加速软骨退化^[23]。体外 FLS 炎症模型的建立,对 MAPK 信号通路研究提供了工具。IL-1 β 是 IJD 首要致病因子

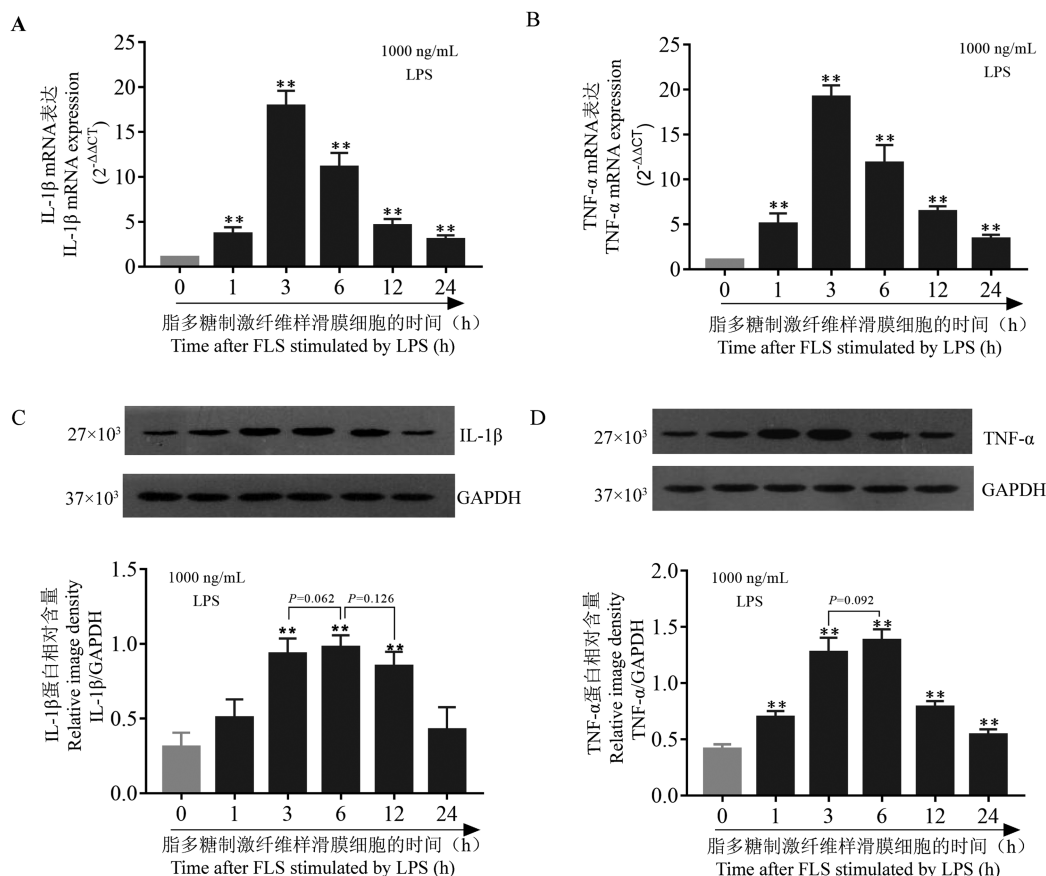


注: A: 滑膜组织 (ST) 及其原代培养第 3 代 ~ 第 8 代 FLS 的特征蛋白的 Western Blot 结果。B: 各组 Collagen IV 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 5.315, P = 0.003$ 。Collagen IV 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -5.339, ** P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。C: 各组 Fibronectin 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 8.372, P < 0.0001$ 。Fibronectin 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -5.616, ** P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。D: 各组 Lubricin 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 58.239, P < 0.0001$ 。Lubricin 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -53.712, ** P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。E: 各组 Hyaluronan synthase 2 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 7.312, P < 0.0001$ 。Hyaluronan synthase 2 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -4.335, ** P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。

图 4 滑膜组织和滑膜 FLS 的特征蛋白 Western Blot 检测分析

Note. A, Western Blot results of Collagen IV, Fibronectin, Lubricin, Hyaluronan synthase 2 and GAPDH in ST and its subcultured primary synovium cells from the third to the eighth generation. B, One way ANOVA between Collagen IV protein groups, $F = 5.315, P = 0.003$. Compared with the expression of Collagen IV protein in the third generation FLS, the expression of Collagen IV protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -5.339, ** P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. C, One way ANOVA between Fibronectin protein groups, $F = 8.372, P < 0.0001$. Compared with the expression of Fibronectin protein in the third generation FLS, the expression of Fibronectin protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -5.616, ** P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. D, One way ANOVA between Lubricin protein groups, $F = 58.239, P < 0.0001$. Compared with the expression of Lubricin protein in the third generation FLS, the expression of Lubricin protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -53.712, ** P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. E, One way ANOVA between Hyaluronan synthase 2 protein groups, $F = 7.312, P < 0.0001$. Compared with the expression of Hyaluronan synthase 2 protein in the third generation FLS, the expression of Hyaluronan synthase 2 protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -4.335, ** P < 0.01$). There was no significant difference between the st, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS.

Figure 4 Western Blot detection of characteristic protein in synovial tissue and FLS



注: A 和 B: 显示用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的相对表达含量。单因素方差分析结果: IL-1 β 的 $F = 172.477, P < 0.0001$ 。与 0 h 比较, 其余各观察时间点均 $**P < 0.01$, 3 h 为其表达峰值 (17.865 ± 1.754); TNF- α 的 $F = 162.478, P < 0.0001$ 。与 0 h 比较, 其余各观察时间点均 $**P < 0.01$, 3 h 为其表达峰值 (19.177 ± 1.317)。C 和 D: IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的相对表达含量。单因素方差分析结果: IL-1 β 的 $F = 28.694, P < 0.0001$, 与 0 h 比较, 1 h 和 24 h 观察时间点的 P 值分别为 0.057 和 0.078, 其余各观察时间点均 $**P < 0.01$, 6 h 为其表达峰值 (1.003 ± 0.096); TNF- α 的 $F = 175.03, P < 0.0001$, 与 0 h 比较, 1 ~ 24 h 观察时间点均 $**P < 0.01$, 6 h 为其表达峰值 (1.380 ± 0.099)。

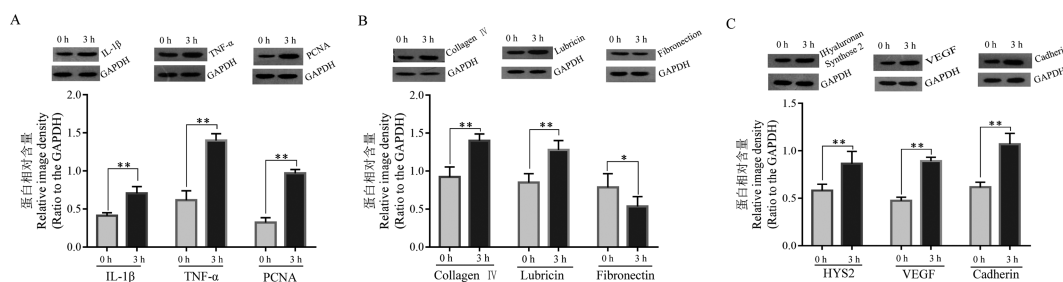
图 5 荧光 qRT-PCR 法和 Western Blot 法检测 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 后不同时间点 IL-1 β 和 TNF- α 的表达 ($n = 5$)

Note. A and B show the relative expression data of IL-1 β and TNF- α mRNA with $2^{-\Delta\Delta CT}$. In statistical analysis, One-way ANOVA of IL-1 β , $F = 172.477, P < 0.0001$, compared with 0 h, $**P < 0.01$ at other observation time points, 3 h was its expression peak (17.865 ± 1.754); $F = 162.478, P < 0.0001$ of TNF- α . Compared with 0 h observation time point, P value of other observation time points were less than 0.01, 3 h was its expression peak (19.177 ± 1.317). C and D showed the Western Blot analysis of IL-1 β and TNF- α protein. One-way ANOVA of IL-1 β , $F = 28.694, P < 0.0001$. Compared with 0 h, P value of 1 h and 24 h observation time points were 0.057 and 0.078, respectively. P value of other observation time points were less than 0.01, 6 h was its expression peak (1.003 ± 0.096) (C). One-way ANOVA of TNF- α protein, $F = 175.03, P < 0.0001$. Compared with 0 h, $**P < 0.01$ at 1–24 h, and the peak value was (1.380 ± 0.099) at 6 h (D).

Figure 5 Detection of IL-1 β and TNF- α expression at different time points after FLS stimulation with 1000 ng/mL LPS by fluorescence QRT-PCR and Western Blot ($n = 5$)

之一,其可通过刺激产生磷酸化的 p38-MAPK 来合成大量 NO, 反馈激活 MAPK 通路, 促进 IL-1 β 的产生, 增加前列腺素 E2 及环氧化酶-2 (COX-2) 的水平, 引起软骨损伤。TNF- α 可介导多种炎症因子, 可以与 p38-MAPK 形成正反馈环路, 活化的 p38-MAPK 通路可促进 TNF- α 的表达, 过度表达 TNF- α 可诱导软骨细胞凋亡。这些促炎因子通过各种途

径激活信号通路, 促使 IJD 的发生发展。NF- κ B 信号通路影响着 OA、RA 等 IJD 炎症反应的各个阶段。NF- κ B 信号通路参与血管内皮细胞黏附分子的表达并且与 KOA 患者淤血状态密切相关。淤血和患处新生毛细血管是关节疼痛的重要因素。NF- κ B 信号通路也是软骨降解进程中的关键分子途径, 其通过促进 MMP-1、MMP-2、MMP-3 等多种降解酶的分



注: A: 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较, IL-1 β 蛋白相对表达量升高, $t = -6.817$, ** $P < 0.01$; TNF- α 蛋白相对表达量升高, $t = -11.443$, ** $P < 0.01$; PCNA 蛋白相对表达量上调, $t = -17.801$, ** $P < 0.01$ 。B: 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较, Collagen IV 蛋白相对表达量上调, $t = -6.702$, ** $P < 0.01$; Lubricin 蛋白相对表达量升高, $t = -5.686$, ** $P < 0.01$; Fibronectin 蛋白相对表达量下调, $t = 2.518$, * $P < 0.05$ 。C: 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较, Hyaluronan Synthase 2 (HYS2) 蛋白相对表达量升高, $t = -4.364$, ** $P < 0.01$; VEGF 蛋白相对表达量上调, $t = -16.668$, ** $P < 0.01$; Cadherin 蛋白相对表达量上调, $t = -7.637$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 Western Blot 法检测 1000 ng/mL LPS 诱导 FLS 后 3 h 细胞因子和特征蛋白的表达

Note. A, 1000 ng/mL LPS stimulated FLS for 3 h, compared with that before stimulation, the relative expression of IL-1 β protein was increased, $t = -6.817$, ** $P < 0.01$; the relative expression of TNF- α protein was increased, $t = -11.443$, ** $P < 0.01$; the relative expression of PCNA protein was increased, $t = -17.801$, ** $P < 0.01$. B, 1000 ng/mL LPS stimulated FLS for 3 h, compared with that before stimulation, the relative expression of collagen IV protein was increased, $t = -6.702$, ** $P < 0.01$; the relative expression of lubricin protein increased, $t = -5.686$, ** $P < 0.01$; the relative expression of fibronectin protein decreased, $t = 2.518$, * $P < 0.05$. C, 1000 ng/mL LPS stimulated FLS for 3 h, compared with that before stimulation, the relative expression of hyaluronan synthase 2 (HYS2) protein increased, $t = -4.364$, ** $P < 0.01$; the relative expression of VEGF protein increased, $t = -16.668$, ** $P < 0.01$; the relative expression of cadherin protein was up-regulated, $t = -7.637$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Detection of the expression of cytokines and characteristic proteins in 3 hours after FLS stimulation with 1000 ng/mL LPS by Western Blot

泌及 COX-2、NO 等分解代谢因子的合成,加剧关节炎软骨的凋亡和软骨的炎症反应^[24]。TNF- α 对 FLS 的增殖有促进作用,可使滑膜组织纤维样变并增加滑液中的炎症因子,加重病情。FLS 还具有类似肿瘤细胞增殖的特性,可突破生理屏障侵入软骨和骨,导致关节破坏。FLS 入侵体参与 FLS 与软骨的附着,其内富含基质金属蛋白酶,可特异性地使细胞外基质变性^[25]。LPS 既是炎症抗原,又是 NF- κ B 的激动剂,运用 LPS 诱导体外 FLS 炎症模型的建立,有利于进行信号通路的干预,探讨如何降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGF 和 MMP 等蛋白的表达,从而减弱或抑制住 IJD 诱导的疼痛和炎症,延缓或阻止关节退变,达到治疗的目的。

综上所述,本研究建立的 SD 大鼠正常膝关节滑膜 FLS 原代培养方法,FLS 纯度高,成本低,来源容易,重现性好,操作简单,实验时间可控。关键是第 3 ~ 7 代 FLS 具有宿主骨关节滑膜组织中的 FLS 的生理功能,且能分泌具有关节囊修复作用的结缔组织成分,还能合成透明质酸和润滑素等保证关节内环境的稳定的物质。LPS 能诱导原代培养的滑膜组织 FLS 分泌促炎细胞因子和诱导 IJD 特征蛋白的表达改变,复制出 IJD 的基本特征。总之,LPS 诱导的 FLS 炎症模型可作为体外研究 IJD 的细胞模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] Moasheri A, Raymann MP, Gualillo O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(5): 302-311.
- [2] 宋朋飞, 阚卫兵, 袁琴, 等. 滑膜病变在骨关节炎中的表现 [J]. 中国骨伤, 2012, 25(5): 442-444.
Song PF, Han WB, Yuan L, et al. Synovial lesions in osteoarthritis [J]. Chin J Orthopa Trauma, 2012, 25(5): 442-444.
- [3] Canzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis [J]. Bone, 2012, 51(2): 249-257.
- [4] Orlowsky EW, Kraus VB. The role of innate immunity in osteoarthritis; when our first line of defense goes on the offensive [J]. J Rheumatol, 2015, 42(3): 363-371.
- [5] 朱立帆, 周建新, 曾金才, 等. S100 钙结合蛋白 B 在骨性关节炎软骨损伤修复中的作用及机制研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(11): 1429-1434.
Zhu LF, Zhou JX, Zeng JC, et al. The role and mechanism of S100calcium binding protein B in osteoarthritis cartilage damage repair [J]. Chin J Reparat Reconstruct Surg, 2018, 32(11): 1429-1434.
- [6] 丁娟, 王志军, 董晓薇, 等. RA 滑膜成纤维细胞的原代培养及鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(36): 7008-7011.
Ding J, Wang ZJ, Dong XW, et al. Primary culture and identification about fibroblast-like synoviocytes of RA [J]. Progr Modern Biomed, 2012, 12(36): 7008-7011.
- [7] Pauly HM, Larson BE, Coatney GA, et al. Assessment of cortical and trabecular bone changes in two model of post-

- traumatic osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2015, 33 (12): 1835–1845.
- [8] González C, Abello P, Cepeda R, et al. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2007, 18 (3): 127–135.
- [9] 高皖皎, 邓秋狄, 佟丽, 等. 佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析 关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31 (12): 1693–1698.
- Gao WJ, Deng QD, Dong L, et al. Establishment and characteristic analysis of fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31 (12): 1693–1698.
- [10] Min S, Wang C, Lu W, et al. Serum levels of the bone turnover marker dickkopf-1, osteoprotegerin, and TNF- α in knee osteoarthritis patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2017, 36 (10): 2351–2358.
- [11] Zhang B, Wang LS, Zhou YH. Elevated microRNA-125b promotes inflammation in rheumatoid arthritis by activation of NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1151–1157.
- [12] 黄永周, 李漪, 丛竹军. 栀子苷对乳腺炎动物模型 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28 (11): 95–99.
- Huang YZ, Li Y, Cong ZJ. Effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in an animal model of mastitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28 (11): 95–99.
- [13] 翟亚南, 王晶晶, 袁李瑶, 等. D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠慢性肝损伤模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24 (5): 62–65.
- Zhai YN, Wang JJ, Li M, et al. Chronic hepatic injury modeling in mice induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide combination [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24 (5): 62–65.
- [14] Zhang L, Zhang L, Huang Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synovial cell pyroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 2019: 6326517.
- [15] Shruthi PJ, Sujatha K, Srilatha CH, et al. Nucleolar organizer region count PCNA and Ki-67 indices are diagnostic makers of malignancy and cell proliferation rate in bovine lymphosarcoma [J]. *J Veterinar Sci Technol*, 2016, 7 (2): 1–7.
- [16] 陈芳, 刘琴, 王丽平, 等. 改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26 (4): 75–78.
- Chen F, Liu Q, Wang LP, et al. Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26 (4): 75–78.
- [17] McCoy AM. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations [J]. *Vet Pathol*, 2015, 52 (5): 803–818.
- [18] Filer A. The fibroblast as a therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13 (3): 413–419.
- [19] Li S, Chen JW, Xie X, et al. Autophagy inhibitor regulates apoptosis and proliferation of synovial fibroblasts through the inhibition of PI3K/AKT pathway in collagen-induced arthritis rat model [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (5): 2065.
- [20] Kosinska MK, Ludwig TE, Liebisch G, et al. Articular joint lubricants during osteoarthritis and rheumatoid arthritis display altered levels and molecular species [J]. *PLoS One*, 2015; 10 (5): e0125192.
- [21] 尤欣, 唐福林, 吴士宏, 等. 人白介素-1 β 诱导兔膝关节炎模型的临床及病理特点 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12 (2): 65–70.
- You X, Tang HL, Wu SH, et al. Characteristics and Major Pathologies of Lapin Knee Arthritis Induced by Intra-articular Expression of Human Interleukin-1 β [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2004, 12 (2): 65–70.
- [22] 熊乐, 张蓓, 沈若武, 等. 脂多糖干预对大鼠周围神经损伤后瓦勒变性的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25 (2): 211–217.
- Xiong Y, Zhang P, Shen RW, et al. Effect of lipopolysaccharide on Wallerian degeneration after peripheral nerve injury in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25 (2): 211–217.
- [23] Xu L, Zhai LL, Ge Q, et al. Vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) regulates apoptosis of chondrocytes via p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in osteoarthritis [J]. *Inflammation*, 2017, 40 (6): 1924–1932.
- [24] Ji B, Cuo W, Ma H, et al. Isoliquiritigenin suppresses IL-1 β induced apoptosis and inflammation in chondrocyte-like ATDC5 cells by inhibiting NF- κ B and exerts chondroprotective effects on a mouse model of anterior cruciate ligament transection [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40 (6): 1709–1718.
- [25] Asano T, Iwasaki N, Kon S, et al. A9 β 1 integrin acts as a critical intrinsic regulator of human rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53 (3): 415–424.

[收稿日期] 2020-04-23