

# $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对大鼠关节软骨细胞润滑素表达的影响

牛国栋,李思维,刘忠军,宋纯理,冷慧杰\*

(北京大学第三医院骨科,北京 100191)

**【摘要】** 目的 在细胞水平,探讨 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对软骨细胞润滑素合成和分泌的影响。方法 使用炎症因子TNF- $\alpha$ 对大鼠关节软骨细胞进行炎症干预,分别添加不同剂量 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 至正常及炎症状态下的软骨细胞,使用ELISA及Western Blot方法分别检测细胞上清中和细胞内润滑素分泌表达的变化,从而评估 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对大鼠关节软骨细胞润滑素的调节作用。结果 TNF- $\alpha$ 可以明显降低细胞活性,以及细胞内和细胞上清液中润滑素的表达分泌。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可以升高正常软骨细胞以及炎症状态下软骨细胞的活性,但是不能调节正常软骨细胞上清和胞内润滑素的分泌和表达。对于炎症状态的软骨细胞, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可以明显提高润滑素在细胞上清及细胞内的分泌表达,并有一定剂量依赖性。结论  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能够促进炎症状态下的软骨细胞润滑素的表达分泌,从而更好的保护软骨表面。

**【关键词】**  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; 润滑素; 软骨细胞; 关节炎

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017)010-0028-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.010.006

## $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates expression of lubricin of chondrocytes in rat articular cartilage

NIU Guo-dong, LI Si-wei, LIU Zhong-jun, SONG Chun-li, LENG Hui-jie\*

(Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of vitamin D on synthesis and secretion of lubricin in chondrocytes at the cellular level. **Methods** Rat articular chondrocytes were stimulated by TNF- $\alpha$ . Normal and inflammatory chondrocytes were treated by different doses of vitamin D respectively. ELISA and Western Blot were used to detect the secretion of lubricin in the supernatant and the synthesis level in the cells. **Results** TNF- $\alpha$  significantly reduced the activity of both normal chondrocytes and chondrocytes in inflammatory state. TNF- $\alpha$  also significantly reduced the expression of lubricin in the cells and supernatant.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  increased the activity of both normal chondrocytes and chondrocytes in inflammatory state.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  significantly elevated the secretion and expression of supernatant and intracellular lubricin only in chondrocytes stimulated by TNF- $\alpha$  in a dose-dependent manner, but not in normal chondrocytes. **Conclusions** Vitamin D can promote the secretion and expression of lubricin in inflammatory state chondrocytes, which may act as one of the mechanisms of vitamin D protecting the cartilage surface in osteoarthritis.

**【Key words】** Vitamin D; Lubricin; Chondrocytes; Osteoarthritis

骨性关节炎是常见多发病,因其病程长,且致病因素复杂,包括遗传因素,年龄因素,创伤后力学因素等,从某种意义上说,也是疑难病<sup>[1-3]</sup>。其中关

节损伤导致的关节不稳定而造成关节软骨表面过度的摩擦负荷,是软骨损伤的重要原因。关节软骨作为一种非常复杂的摩擦学系统,可在关节的各

**【基金项目】** 国家自然科学基金(编号:11472017)。

**【作者简介】** 牛国栋(1985 - ),男,硕士,主要从事骨性关节炎方面的研究。E-mail: tiankun23@163.com

**【通讯作者】** 冷慧杰(1975 - ),男,博士,副研究员,主要从事骨与关节力学生物学研究。E-mail: lenghj@bjmu.edu.cn

种运动情况下提供极低的摩擦,从而防止关节软骨的磨损<sup>[4]</sup>。关节的最佳功能状态与关节的低摩擦系数环境的维持是分不开的<sup>[5]</sup>。

关节腔中充填着软骨细胞和滑膜细胞分泌的关节滑液。在对关节软骨表层的保护中,关节腔中的滑液起着很重要的作用。关节滑液中的主要润滑成分包括透明质酸、润滑素以及表面活性磷脂。透明质酸作为滑液的主要成分(3.5 mg/dL),早已引起广泛关注,而润滑素是近年才引起了学者们的关注。最近的研究表明,透明质酸、润滑素和表面活性磷脂三者必须协同起润滑作用,缺一不可<sup>[6]</sup>。润滑素作为关节软骨表面边界润滑的最重要蛋白,主要由关节软骨最表面的软骨细胞和关节囊内表面的滑膜细胞所分泌,作为关节软骨表面的边界润滑剂和细胞保护剂,在维持关节结构与功能上起着重要的作用<sup>[7]</sup>。润滑素不仅在边界润滑中发挥着重要的物理性保护作用,还具有抗炎症、抗滑膜组织增生等生物性保护作用<sup>[8]</sup>。已经有研究建议将润滑素作为治疗骨性关节炎的一个重要策略<sup>[9]</sup>。

维生素 D (VD) 是一种类激素的营养物质,在人体中发挥的作用非常复杂,是目前的研究热点<sup>[10]</sup>。人们对于 VD 对于骨骼的重要生理作用已经非常明确,其缺乏会导致多种骨骼疾病,如佝偻病、骨质疏松、软骨病等<sup>[11, 12]</sup>。但 VD 水平与骨性关节炎的发生发展之间的关系尚存争议<sup>[13-16]</sup>。很多学者都在此领域进行探索。首先,已经有研究证实了软骨细胞中 VD 受体的表达<sup>[19]</sup>。并且,近来很多研究结果肯定了 VD 对关节软骨的保护作用<sup>[15, 17, 18]</sup>。VD 对于关节软骨的具体保护作用机制可能并不单一。目前文献中还没有研究探讨 VD 对润滑素的调节作用,而这对更全面认识 VD 在关节生理代谢中所起的作用有重要意义。我们的前期实验研究表明,VD 可以通过 TGF- $\beta$ 1 调节关节软骨 II 型胶原的表达和降解<sup>[20]</sup>。而有实验证明,TGF- $\beta$  在润滑素表达分泌的过程中起着非常重要的作用<sup>[5, 21, 22]</sup>。因此我们假设维生素 D 可能可以通过调节关节软骨润滑素的分泌来保护软骨。本研究在细胞水平上探索维生素 D 是否可以促进关节软骨细胞润滑素的表达,进一步理解维生素 D 保护关节软骨的潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验所用的软骨细胞取自 5 只出生后 24 h 内的 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠,由北京大学医学部

实验动物中心提供[SYXK(京)2016-0041]。

### 1.2 试剂

75% 乙醇(北京化工厂); $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (Selleck, 美国);双抗(Gibco, 美国);PBS(Hyclone, 中国);胎牛血清(Gibco, 美国);DMEM 低糖培养基(Hyclone, 中国);II型胶原酶(Sigma, 美国);甲苯胺蓝试剂(索莱宝公司, 中国);4% 多聚甲醛(索莱宝公司, 中国);TritonX-100 试剂(Sigma, 美国);5% BSA 试剂(中杉金桥公司, 中国);CCK-8 试剂盒(Dojindo, 日本);II型胶原抗体(Bioss, 美国);Lubricin Elisa 试剂盒(HCB, 加拿大);酶标仪(Thermo, 美国);抗 Lubricin 抗体(Santa Cruz, 美国);抗 GAPDH 抗体(谷歌生物, 中国)。

### 1.3 实验分组

本研究将软骨细胞分为六组,进行组间比较。分组具体包括无任何干预的对照组,正常低 VD 组,正常高 VD 组,诱导组,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组均为 TNF- $\alpha$  和 VD 同时给药。每一组软骨细胞处理条件见表 1。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 软骨细胞分离、培养与鉴定

使用冰冻致死法处理新生的 SD 大鼠,并使用 75% 酒精浸泡 5 min 消毒。从新生大鼠关节中获取关节软骨组织块,对软骨组织块处理并分离软骨细胞,对软骨细胞进行培养,并利用甲苯胺蓝染色和 II 型胶原染色对进行软骨细胞鉴定。具体方法细节请参考我们先前的研究<sup>[23]</sup>。因软骨细胞过度传代会发生细胞表型改变,本实验所用细胞均为 2~3 代软骨细胞。

#### 1.4.2 关节软骨细胞活性测定

对各组将软骨细胞进行活性检测时,以  $2.5 \times 10^4$  的密度接种于 96 孔细胞培养板中(每孔 100  $\mu\text{L}$ ),使细胞贴壁稳定。每组设置 6 个复孔,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,培养 3 h。用酶标仪在 490 nm 波长处测定各组细胞的吸光度值,来反映活细胞数量。

#### 1.4.3 软骨细胞上清液中润滑素含量的检测

检测各组软骨细胞上清液中润滑素表达时,以每孔  $5 \times 10^4$  的密度将软骨细胞接种于 24 孔板中,使细胞贴壁生长。每组设置 3 个复孔,细胞培养箱中培养。24 h 后收取 24 孔板中培养的软骨细胞上清液,4 $^{\circ}\text{C}$  离心机 1000 r/min 离心 20 min,抽取上清,检测各组润滑素的表达。

#### 1.4.5 软骨细胞内润滑素合成表达的检测

检测各组软骨细胞内润滑素合成时,将软骨细胞以  $5 \times 10^4$  密度接种于 24 孔板,使用 RIPA 裂解液

提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,制备用于蛋白免疫印迹检测的蛋白样品。制作 6% 分离胶、5% 浓缩胶,取 30  $\mu\text{g}$  样品蛋白上样,以 90 V 恒压电泳,样品进入分离胶后 140 V 恒压电泳,溴酚蓝抵达分离胶底部时停止电泳。以 240 mA 4 $^{\circ}\text{C}$  下电转膜 120 min。取出硝酸纤维素膜,于 5% BSA/TBST 封闭液中室温封闭 2 h,孵育 Lubricin 或 GAPDH 一抗,于摇床上 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。室温 TBST 洗膜 10 min,重复 3 次,添加相应二抗,摇床上室温孵育 1 h。室温 TBST

洗膜 10 min,重复 3 次,双红外激光扫描成像系统进行荧光显色分析。

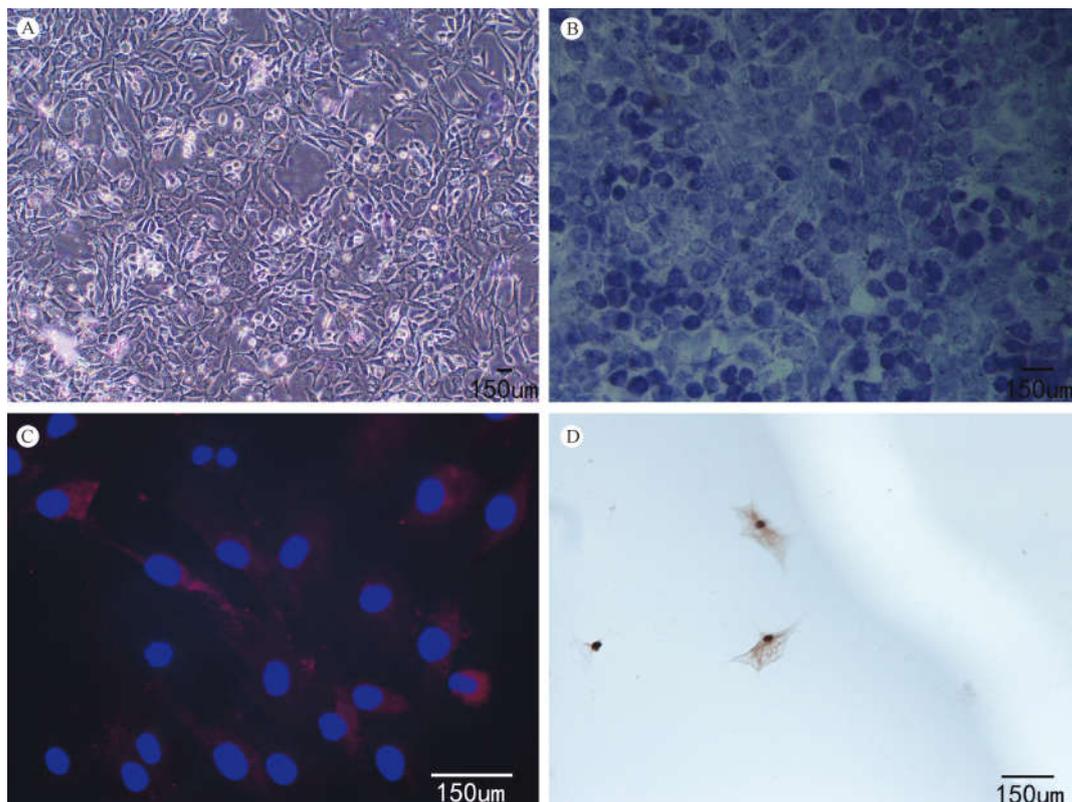
### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行数据处理,所有数据以平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。数据的组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA followed by the LSD post hoc test),以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

表 1 软骨细胞研究分组一览表

Tab.1 Groups of chondrocytes in the study

组名 Group names	TNF- $\alpha$ 诱导/20 ng/mL TNF- $\alpha$ stimulation	1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ 干预 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ treatment	
		低剂量/10 nmol/L Low dose	高剂量/100 nmol/L High dose
		对照组 Control group	-
正常低 VD 组 Normal low VD group	-	+	-
正常高 VD 组 Normal high VD group	-	-	+
诱导组 TNF- $\alpha$ stimulated group	+	-	-
诱导低 VD 组 Stimulated low VD group	+	+	-
诱导高 VD 组 Stimulated high VD group	+	-	+



注: A. 光镜下软骨细胞; B. 甲苯胺蓝染色; C. II 型胶原免疫荧光染色; D. 软骨细胞维生素 D 受体。

图 1 光镜下及染色后细胞形态观察

Note. A. Chondrocytes without staining ( $\times 10$ ); B. Chondrocytes stained with toluidine blue ( $\times 20$ ); C. Type II collagen ( $\times 40$ ); D. Vitamin D receptor in chondrocytes ( $\times 20$ ).

Fig.1 Microscopic images of chondrocytes observed using different staining

2 结果

2.1 关节软骨细胞及维生素 D 受体鉴定

通过光学显微镜观察,所培养的细胞形态符合软骨细胞特点(图 1A)。通过甲苯胺蓝染色和免疫荧光染色,分别可观察到蛋白聚糖(图 1B)和 II 型胶原表达(图 1C)。免疫细胞化学显示软骨细胞表面表达有维生素 D 受体(图 1D)。

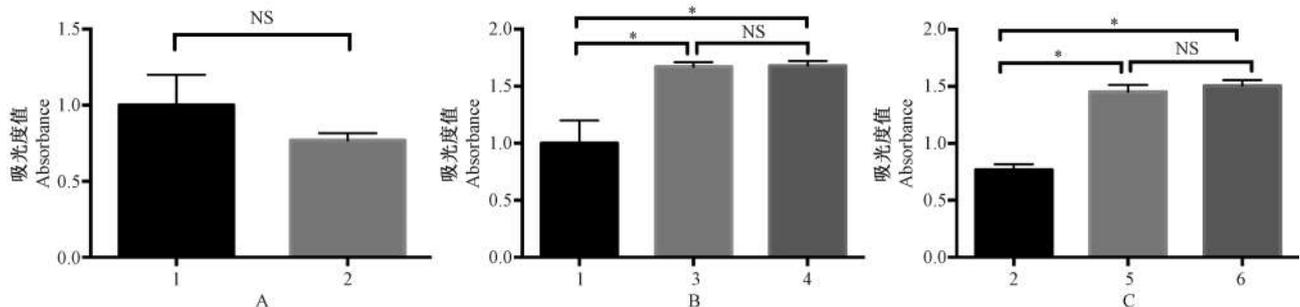
2.2  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对关节软骨细胞活性的调节作用

图 2 结果显示, TNF- $\alpha$  诱导并不能降低软骨细胞活性( $P > 0.05$ )。相对于对照组软骨细胞,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预对正常软骨细胞活性有促进作用,但正常低 VD 组和正常高 VD 组差异无显著性。对

于 TNF- $\alpha$  诱导的软骨细胞,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组均提高了诱导后软骨细胞活性,但两组之间差异无显著性( $P > 0.05$ )。

2.3  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对关节软骨细胞上清中润滑素分泌的影响

图 3 结果显示,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预对正常软骨细胞(无诱导)润滑素表达差异无显著性( $P > 0.05$ )。TNF- $\alpha$  诱导后,软骨细胞(诱导组)上清中润滑素表达明显降低(相对于对照组,  $P < 0.05$ )。  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  进一步干预可显著提高软骨细胞润滑素的细胞外分泌( $P < 0.05$ )。并且诱导低 VD 组和诱导高 VD 组软骨细胞上清中润滑素表达差异有显著性( $P < 0.05$ )。

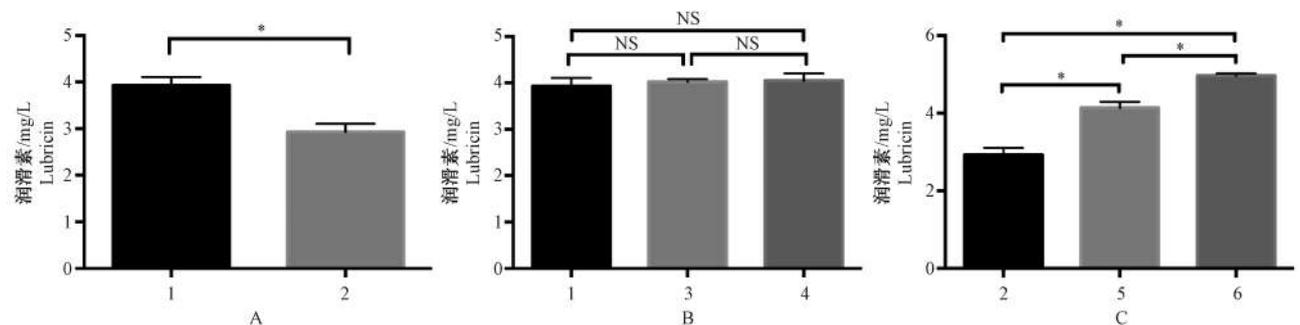


注: A. TNF- $\alpha$  诱导对正常软骨细胞活性的影响; B.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预对正常软骨细胞活性的影响; C.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预对 TNF- $\alpha$  诱导的软骨细胞活性的影响。1. 对照组; 2. 诱导组; 3. 正常低 VD 组; 4. 正常高 VD 组; 5. 诱导低 VD 组; 6. 诱导高 VD 组。\* 表示  $P < 0.05$ , NS 表示  $P > 0.05$ 。

图 2 CCK-8 测定的各组软骨细胞活性比较

Note. A. Effects of TNF- $\alpha$  stimulation; B. Effects of different doses of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on the normal chondrocytes; C. Effects of different doses of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on the chondrocytes stimulated by TNF- $\alpha$ . 1. Control group; 2. TNF- $\alpha$  stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group. \* indicates  $P < 0.05$ , NS indicates  $P > 0.05$ .

Fig. 2 Comparison of activities of chondrocytes from all the groups by CCK-8



注: A. TNF- $\alpha$  诱导对正常软骨细胞润滑素分泌的影响; B.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预对正常软骨细胞润滑素分泌的影响; C.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预对 TNF- $\alpha$  诱导的软骨细胞润滑素分泌的影响。1. 对照组; 2. 诱导组; 3. 正常低 VD 组; 4. 正常高 VD 组; 5. 诱导低 VD 组; 6. 诱导高 VD 组。\* 表示  $P < 0.05$ , NS 表示  $P > 0.05$ 。

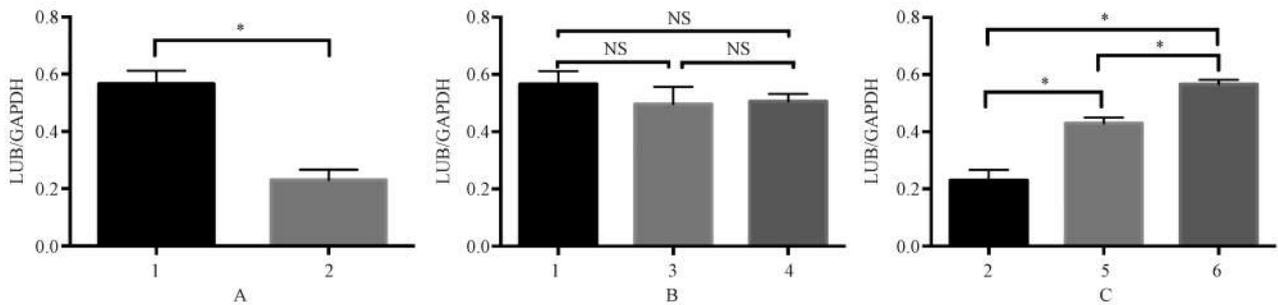
图 3 各组软骨细胞上清润滑素表达比较

Note. A. Effects of TNF- $\alpha$  stimulation; B. Effects of different doses of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on the normal chondrocytes; C. Effects of different doses of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on the chondrocytes stimulated by TNF- $\alpha$ . 1. Control group; 2. TNF- $\alpha$  stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group. \* indicates  $P < 0.05$ , NS indicates  $P > 0.05$ .

Fig. 3 Expression of lubricin in the supernatant of cultured chondrocytes

## 2.4 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对关节软骨细胞内润滑素合成的影响

图 4 和图 5 结果表明, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预对无诱导的软骨细胞润滑素表达差异无显著性( $P > 0.05$ )。TNF- $\alpha$ 诱导后,软骨细胞(诱导组)中润滑素表达降低(相对于对照组, $P < 0.05$ )。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 进一步干预,诱导低 VD 组和诱导高 VD 组均显著上调了软骨细胞内润滑素的分泌( $P < 0.05$ ),且诱导高 VD 组分泌的润滑素量显著高于诱导低 VD 组( $P < 0.05$ )。



注:A. TNF- $\alpha$ 诱导对正常软骨细胞润滑素表达的影响;B.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 干预对正常软骨细胞润滑素表达的影响;C.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对TNF- $\alpha$ 诱导的软骨细胞的影响。1. 对照组;2. 诱导组;3. 正常低VD组;4. 正常高VD组;5. 诱导低VD组;6. 诱导高VD组。\*表示 $P < 0.05$ ,NS表示 $P > 0.05$ 。

图 5 各组软骨细胞内润滑素表达的比较

Note. A. Effects of TNF- $\alpha$  stimulation; B. Effects of different doses of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on the normal chondrocytes; C. Effects of different doses of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on the chondrocytes stimulated by TNF- $\alpha$ . 1. Control group; 2. TNF- $\alpha$  stimulated group; 3. Normal low VD group; 4. Normal high VD group; 5. Stimulated low VD group; 6. Stimulated high VD group. \* indicates  $P < 0.05$ ,NS indicates  $P > 0.05$ .

Fig. 5 Expression of lubricin in the chondrocytes

## 3 讨论

润滑素是关节软骨的一种保护性蛋白,在维持关节正常生理功能中发挥着重要作用。在骨性关节炎起始与发展的过程中,关节软骨表面的润滑素表达是降低的<sup>[24]</sup>。润滑素分泌的降低可能意味着关节软骨表面边界润滑能力的下降、关节软骨表面摩擦系数的增高和软骨磨损的增加。并且,关节软骨摩擦系数的增加引起的表面物理性改变可以导致关节软骨生物性改变,即逐渐引起软骨表面软骨细胞的凋亡,过度分泌MMP等基质金属蛋白酶和炎症因子,加速关节软骨的降解<sup>[25,26]</sup>。分泌的炎症因子会进一步导致关节软骨润滑素的降低,形成一种恶性循环<sup>[25]</sup>。因此,润滑素在OA的发生发展中所起的作用不可忽视。

我们使用了炎症因子TNF- $\alpha$ 对软骨细胞进行干预,诱导关节软骨细胞炎症反应,模拟骨性关节

炎发生时软骨细胞的改变。TNF- $\alpha$ 是一种在骨性关节炎起始和发展中发挥重要作用的炎症因子,可以明显促进软骨细胞的分解代谢<sup>[27,28]</sup>。研究结果显示,相对于没有TNF- $\alpha$ 干预的正常软骨细胞,TNF- $\alpha$ 干预确实可导致软骨细胞上清中及胞质中润滑素表达降低,这与Jones有关生长因子和细胞因子对润滑素生物调节的研究结果相似,同时与临床观察到的骨性关节炎时润滑素表达下降的结果相呼应<sup>[5]</sup>。

在临床流行病学研究中,维生素D水平与骨性关节炎的发生发展关系尚不明确<sup>[29]</sup>。这可能与影响流行病学研究结果的因素错综复杂有关。近来越来越多的研究结果显示维生素D对关节软骨退变能起到重要的抑制作用<sup>[20,29]</sup>。本研究首先证实了大鼠软骨细胞中维生素D受体(VDR)的表达,Tetlow在人体软骨细胞研究中也发现了VDR的存在<sup>[19]</sup>。同时,实验结果显示无论是在正常状态下的

软骨细胞还是炎症状态下的软骨细胞,维生素 D 都能提高软骨细胞的活性,说明维生素 D 能够促进软骨细胞的生长和增殖。对于 TNF- $\alpha$  诱导后的软骨细胞,酶联免疫吸附反应与蛋白免疫印迹的结果表明,无论是胞外润滑素分泌水平还是在胞质内合成水平, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预可以显著抑制因 TNF- $\alpha$  干预导致的润滑素表达下降。而且,随着剂量的增加,对润滑素表达的影响亦增加。这说明  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  可以升高骨性关节炎的软骨细胞润滑素的表达,在骨性关节炎过程中,可能通过促进润滑素的表达来保护关节软骨。

然而对于未经 TNF- $\alpha$  诱导的正常软骨细胞, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预虽然可以提升软骨细胞活性,但并没有显著升高关节软骨细胞润滑素的表达水平。首先,结果说明维生素 D 发挥生物反应可能与细胞所处的状态相关,炎症状态下的软骨细胞和正常状态下的软骨细胞分泌润滑素对维生素 D 的敏感度有显著差异。Li 等<sup>[20]</sup> 在关于  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  对软骨细胞 CTXII 和 TGF- $\beta$  研究中也发现了类似的现象。在正常生理状态下的关节软骨, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预不能增加其润滑素的表达,可能不能通过该途径来预防骨性关节炎的发生;而一旦处于骨性关节炎状态, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  可促进炎症状态下的软骨细胞润滑素的表达,可能成为维生素 D 保护关节软骨的途径之一。另外,TNF- $\alpha$  诱导可以降低软骨细胞润滑素的表达,但对细胞活性没有显著影响; $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预正常软骨细胞可以增加细胞活性,但对软骨细胞润滑素分泌没有显著影响;不同剂量的  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预 TNF- $\alpha$  诱导的软骨细胞,可以显著影响润滑素的表达,但对细胞活性没有显著影响。这些结果提示润滑素的分泌与软骨细胞活性没有必然联系,可能跟细胞炎症与否状态相关,这个问题尚待进一步研究。

骨性关节炎的多发性和复杂性长期困扰着患者和医疗工作者。尽管维生素 D 对关节作用的机制还不十分明确,但其对关节积极的保护使其成为一个极具前景的选择。并且,目前已有研究证明人重组润滑素可以改善关节炎症状,但距其应用于临床还有一段距离。维生素 D 可以促进炎症状态下的软骨细胞润滑素分泌表达这一作用,提供了一个新的思路,值得我们进一步探讨。

#### 参考文献:

[ 1 ] Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis[J].

Lancet, 2015, 386(9991): 376-387.

- [ 2 ] Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, et al. Osteoarthritis - an untreatable disease? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(4): 331-344.
- [ 3 ] Olson SA, Horne P, Fuman B, et al. The role of cytokines in posttraumatic arthritis[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2014, 22(1): 29-37.
- [ 4 ] Greene GW, Banquy X, Lee DW, et al. Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(13): 5255-5259.
- [ 5 ] Jones AR, Flannery CR. Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines[J]. Eur Cell Mater, 2007, 13: 40-45.
- [ 6 ] Seror J, Zhu L, Goldberg R, et al. Supramolecular synergy in the boundary lubrication of synovial joints[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6497.
- [ 7 ] Jones AR, Gledhill JP, Hughes CE, et al. Binding and localization of recombinant lubricin to articular cartilage surfaces[J]. J Orthop Res, 2007, 25(3): 283-292.
- [ 8 ] Iqbal SM, Leonard C, Regni SC, et al. Lubricin/proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of Toll-like receptors in vitro[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18910.
- [ 9 ] Flannery CR. Novel therapies in OA[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(5): 614-619.
- [ 10 ] 付强,刘源. 钙、磷与维生素 D 对动物骨代谢的影响研究进展. 中国比较医学杂志, 2006, 16(8): 502-505
- [ 11 ] Bouillon R, Camieliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice[J]. Endocr Rev, 2008, 29(6): 726-776.
- [ 12 ] Priel B, Treiber G, Pieber TR, et al. Vitamin D and immune function[J]. Nutrients, 2013, 5(7): 2502-2521.
- [ 13 ] George J. Vitamin D supplementation and progression of knee osteoarthritis[J]. JAMA, 2016, 316(3): 347-348.
- [ 14 ] Onuora S. Osteoarthritis: Vitamin D not effective for knee OA[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(5): 252.
- [ 15 ] Mabey T, Honsawek S. Role of vitamin D in osteoarthritis: molecular, cellular, and clinical perspectives[J]. Int J Endocrinol, 2015, 2015: 383918.
- [ 16 ] Zhang FF, Driban JB, Lo GH, et al. Vitamin D deficiency is associated with progression of knee osteoarthritis[J]. J Nutr, 2014, 144(12): 2002-2008.
- [ 17 ] Muraki S, Dennison E, Jameson K, et al. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(11): 1301-1306.
- [ 18 ] Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, et al. The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: a consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) [J]. Maturitas, 2014, 79(1): 122-132.

(下转第 39 页)

蓝染色在观察软骨细胞的细胞形态、软骨分层结构的情况、II 型胶原纤维的显示、潮线及软骨下骨的改变中,效果更好;而番红 O 染色、固绿染色在观察软骨组织缺失方面有一定的优势;固绿染色单独使用效果不如前几种染色好。在研究中,应该结合实验室的研究条件、经费、实验周期长短等多种因素综合选择染色方法,以得到预期的效果。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention[J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 1343 - 1355.
- [ 2 ] Yu F, Zeng H, Lei M, et al. The effects of SIRT1 gene knock-out through the activation of SREBP2 protein mediated PI3K/AKT signal pathway on osteoarthritis in mice[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, 36(5): 683 - 690.
- [ 3 ] Lei M, Wang JG, Xiao DM, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1 $\beta$ -mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor- $\kappa$ B activity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2 -

3): 73 - 79.

- [ 4 ] 于斐,雷鸣,曾晖,等. 高龄小鼠沉默信息调节因子 1 基因敲除后膝关节骨关节炎模型的建立[J]. *中国组织工程研究杂志*, 2015, 19(49): 7895 - 7901.
- [ 5 ] Bonzo, Brocker C, Jiang C, et al. Hepatic sirtuin 1 is dispensable for fibrates-induced peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  function in vivo[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(7): E824 - 837.
- [ 6 ] Nakamura, Nguyen MT, Mackem S. Kinetics of tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage-specific CreER(T) to assay temporal activity windows along the proximodistal limb skeleton[J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(9): 2603 - 2612.
- [ 7 ] 李彦会,刘永春,史敏. 三种阿利新蓝染色方法效果观察[J]. *河北医科大学学报*, 2005, 26(6): 464.
- [ 8 ] 张巧全,余年,林兴建,等. 阿利新蓝染色对脑膜癌的诊断价值[J]. *临床神经病学杂志*, 2015, 28(1): 46 - 48.
- [ 9 ] 姬瑞娟,孙爱军,施丽英,等. 番红 O-固绿染色在关节组织学应用的改进[J]. *解剖学杂志*, 2011, 34(5): 716 - 718.

[ 收稿日期 ] 2017 - 02 - 07

#### (上接第 33 页)

- [ 19 ] Tetlow LC, Woolley DE. Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2001, 9(5): 423 - 431.
- [ 20 ] Li S, Niu G, Wu Y, et al. Vitamin D prevents articular cartilage erosion by regulating collagen II turnover through TGF- $\beta$ 1 in ovariectomized rats[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2016, 24(2): 345 - 353.
- [ 21 ] Neu CP, Khalafi A, Komvopoulos K, et al. Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor beta signaling[J]. *Arthritis Rheumat*, 2007, 56(11): 3706 - 3714.
- [ 22 ] Miyatake K, Iwasa K, McNary S M, et al. Modulation of superficial zone protein/lubricin/PRG4 by kartogenin and transforming growth factor- $\beta$ 1 in surface zone chondrocytes in bovine articular cartilage[J]. *Cartilage*, 2016, 7(4): 388 - 397.
- [ 23 ] 李思维,牛国栋,刘忠军,等. 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 调控关节软骨 II 型胶原降解的实验研究[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2015, 8(2): 161 - 166.
- [ 24 ] Young AA, Mclellan S, Smith MM, et al. Proteoglycan 4 downregulation in a sheep meniscectomy model of early osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(2): R41.

- [ 25 ] Jay GD, Fleming BC, Watkins BA, et al. Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection[J]. *Arthr Rheumat*, 2010, 62(8): 2382 - 2391.
- [ 26 ] Lee SY, Niikura T, Reddi AH. Superficial zone protein (lubricin) in the different tissue compartments of the knee joint: modulation by transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta[J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(11): 1799 - 808.
- [ 27 ] Oestergaard S, Sondergaard BC, Hoegh-Andersen P, et al. Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation[J]. *Arthr Rheumat*, 2006, 54(8): 2441 - 2451.
- [ 28 ] Richette P, Dumontier MF, Francois M, et al. Dual effects of 17 $\beta$ -oestradiol on interleukin 1 $\beta$ -induced proteoglycan degradation in chondrocytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(2): 191 - 199.
- [ 29 ] Arden NK, Cro S, Sheard S, et al. The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis, the VIDEO study: a randomised controlled trial[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2016, 24(11): 1858 - 1866.

[ 收稿日期 ] 2017 - 04 - 20