

# 人骨关节炎软骨细胞上调成骨细胞中骨保护素的作用途径

李家乐<sup>1,2</sup>, 罗达胜<sup>1</sup>, 郑刘杰<sup>1</sup>, 刘伟<sup>1</sup>, 姚运峰<sup>1</sup>

https://doi.org/10.12307/2024.419

投稿日期: 2023-06-10

采用日期: 2023-07-24

修回日期: 2023-08-09

在线日期: 2023-08-23

中图分类号:

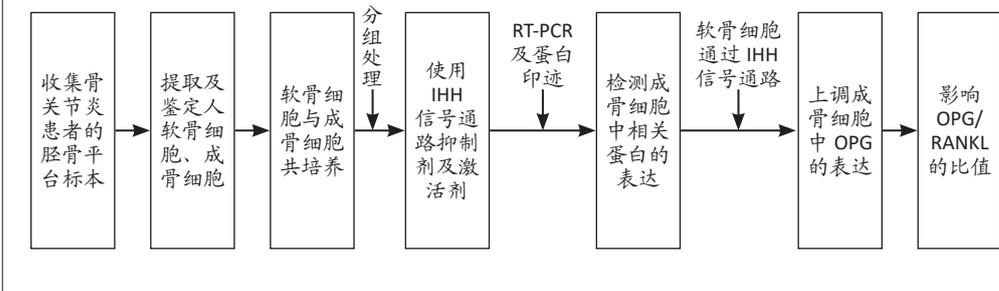
R496; R318; R681

文章编号:

2095-4344(2024)26-04194-08

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 人骨关节炎软骨细胞对软骨下成骨细胞的影响



## 文题释义:

印度刺猬蛋白(Indian hedgehog protein, IHH): 是一种细胞信号蛋白, 其是刺猬蛋白(Hedgehog protein, Hh)家族的成员之一, Hh在胚胎及出生后器官发育中起到重要的调控作用。近年研究发现IHH在骨关节炎的发生和发展中也起到调控作用。

OPG/RANKL比值: OPG能够通过结合RANKL阻断RANKL与其受体RANK结合抑制破骨细胞成熟, 进而抑制骨吸收, 因此OPG和RANKL的相对浓度和平衡决定了骨吸收和骨形成的平衡。当OPG的浓度高于RANKL时, 骨吸收被抑制, 有利于骨形成; 相反, 当RANKL的浓度高于OPG时, 骨吸收增加, 导致骨丢失。

## 摘要

背景: 研究发现上调的刺猬蛋白信号将导致骨关节炎标志物蛇毒蛋白Runx2、聚蛋白多糖酶5、COL10A1以及基质金属蛋白酶13的升高, 而抑制刺猬蛋白能减轻骨关节炎的严重程度。猜测骨关节炎软骨细胞能够通过印度刺猬蛋白(Indian hedgehog protein, IHH)信号通路影响成骨细胞来影响骨的形成。

目的: 探索人骨关节炎软骨细胞对软骨下成骨细胞的影响。

方法: 收集骨关节炎患者的胫骨平台标本, 使用酶解法提取软骨细胞, 利用酶预消化+骨块法提取成骨细胞。采用甲苯胺蓝染色和免疫荧光鉴定软骨细胞; 采用碱性磷酸酶染色和免疫荧光鉴定成骨细胞, 在海藻酸钠珠中以维持软骨细胞表型, 将其与成骨细胞共培养, 共培养系统中分别加入IHH信号通路的抑制剂(Cyclopamine, 10 nmol/L)和激活剂(Purmorphamine, 10 nmol/L), 48 h后收集各组成骨细胞, 利用qRT-PCR检测成骨细胞中Gli1、骨保护素、Runx2、甲状旁腺激素相关肽、碱性磷酸酶、核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of NF-κB ligand, RANKL)以及骨钙素等基因mRNA的表达; 利用Western blot检测各处理组的成骨细胞中Gli1、骨保护素、RANKL蛋白的表达。

结果与结论: ①与骨关节炎软骨细胞共同培养时, 成骨细胞中Gli1、骨保护素、RUNX2的mRNA表达水平明显增加, 而甲状旁腺激素相关肽的mRNA表达水平相对降低( $P < 0.05$ ); 加入IHH抑制剂(Cyclopamine)后, IHH信号通路目的基因Gli1在mRNA和蛋白水平上表达均明显降低( $P < 0.05$ ), 加入IHH信号通路激活剂(Purmorphamine)后, Gli1在mRNA及蛋白水平上表达均明显升高( $P < 0.05$ ); 骨保护素在实验中表现出与Gli1相同的变化趋势。②成骨细胞骨保护素/RANKL比值测定结果显示, 与骨保护素的趋势相同。③结果表明, 人骨关节炎软骨细胞能够促进成骨细胞中Gli1、骨保护素、Runx2等蛋白的表达; 其中骨保护素的上调与IHH信号通路相关; 骨关节炎软骨细胞能够通过IHH信号通路上调成骨细胞骨保护素的表达进而上调骨保护素/RANKL的比值, 这将有助于软骨下骨中的骨形成。

关键词: 骨关节炎; 成骨细胞; 软骨细胞; 印度刺猬蛋白信号通路; 骨保护素; 核因子κB受体活化因子配体

## Human osteoarthritic chondrocytes up-regulate the expression of osteoprotegerin in osteoblasts via the Indian hedgehog signaling pathway

Li Jiale<sup>1,2</sup>, Luo Dasheng<sup>1</sup>, Zheng Liujie<sup>1</sup>, Liu Wei<sup>1</sup>, Yao Yunfeng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China; <sup>2</sup>Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000, Anhui Province, China

Li Jiale, Master, Physician, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China; Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000, Anhui Province, China

Corresponding author: Yao Yunfeng, MD, Chief physician, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Upregulation of hedgehog protein signaling can increase the expression of osteoarthritis markers, Runx2, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, collagen type X alpha 1, and matrix metalloproteinase 13, while inhibition of hedgehog proteins attenuates the severity of osteoarthritis. It is speculated that osteoarthritic chondrocytes can influence bone formation by affecting osteoblasts through the Indian hedgehog protein (IHH)

<sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院, 安徽省合肥市 230601; <sup>2</sup>安徽医科大学附属阜阳医院, 安徽省阜阳市 236000

第一作者: 李家乐, 男, 1995年生, 安徽省阜南县人, 汉族, 2021年安徽医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨关节外科的研究。

通讯作者: 姚运峰, 博士, 主任医师, 安徽医科大学第二附属医院, 安徽省合肥市 230601

https://orcid.org/0000-0002-5888-3665 (李家乐)

基金资助: 安徽省自然科学基金项目(1608085MH167), 项目负责人: 姚运峰

引用本文: 李家乐, 罗达胜, 郑刘杰, 刘伟, 姚运峰. 人骨关节炎软骨细胞上调成骨细胞中骨保护素的作用途径 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26):4194-4201.



signaling pathway.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of human osteoarthritic chondrocytes on subchondral osteoblasts.

**METHODS:** Tibial plateau specimens from patients with osteoarthritis were collected. Chondrocytes were extracted using enzymatic digestion, and osteoblasts were extracted using enzymatic pre-digestion + bone block method. Chondrocytes were identified by toluidine blue staining and immunofluorescence and osteoblasts were identified by alkaline phosphatase staining and immunofluorescence. Chondrocytes were cultured in sodium alginate beads to maintain chondrocyte phenotype and co-cultured with osteoblasts. The co-culture system was added with IHH signaling pathway inhibitor (cyclopamine, 10 nmol/L) and activator (purmorphamine, 10 nmol/L) separately. After 48 hours of co-culture, osteoblasts from each group were collected, mRNA expressions of Gli1, osteoprotegerin, Runx2, parathyroid hormone-related peptide, alkaline phosphatase, receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteocalcin were detected by qRT-PCR, and protein expressions of Gli1, osteoprotegerin and RANKL in osteoblasts were detected by western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The mRNA expression levels of Gli1, osteoprotegerin and RUNX2 in osteoblasts were significantly increased, while the mRNA expression levels of parathyroid hormone-related peptide were decreased ( $P < 0.05$ ) when co-cultured with human osteoarthritic chondrocytes. The mRNA and protein levels of Gli1 were significantly decreased after the addition of IHH signaling pathway inhibitor (cyclopamine) ( $P < 0.05$ ), and the mRNA and protein levels of Gli1 were significantly increased after the addition of IHH signaling pathway activator (purmorphamine) ( $P < 0.05$ ). Osteoprotegerin showed the same trend as Gli1 in the experiment. The osteoprotegerin/RANKL ratio followed the same trend as osteoprotegerin. To conclude, human osteoarthritic chondrocytes can promote the expression of Gli1, osteoprotegerin, Runx2 and other proteins in osteoblasts. The upregulation of osteoprotegerin is related to the IHH signaling pathway. Osteoarthritic chondrocytes can up-regulate the expression of osteoprotegerin in osteoblasts through the IHH signaling pathway and thus up-regulate the osteoprotegerin/RANKL ratio, which will contribute to bone formation in subchondral bone.

**Key words:** osteoarthritis; osteoblast; chondrocyte; Indian hedgehog signaling pathway; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand

**Funding:** the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 1608085MH167 (to YFY)

**How to cite this article:** LI JL, LUO DS, ZHENG LJ, LIU W, YAO YF. Human osteoarthritic chondrocytes up-regulate the expression of osteoprotegerin in osteoblasts via the Indian hedgehog signaling pathway. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(26):4194-4201.

## 0 引言 Introduction

在世界范围内, 大约有 2.4 亿骨关节炎患者是有临床症状的, 轻则慢性疼痛, 重则残疾甚至死亡, 因此骨关节炎是中老年人致残的最主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。目前关于骨关节炎的治疗主要以延缓患者病情进展为目的。在骨关节炎晚期, 患者关节活动大多受限, 生活质量明显受到影响。尽管目前人工关节置换术已经非常成熟, 但人工关节置换术也存在很多的问题, 如: 全膝关节置换术后患者满意度仅达到 80% 左右, 高额的手术费用及假体松动、假体感染等可影响假体使用寿命。因此有必要进一步探索研究骨关节炎的发病机制, 寻找新的治疗手段。

过去骨关节炎主要被视为关节软骨疾病, 大多数研究集中在关节软骨退变、肥大、软骨基质降解等方面。然而越来越多的证据表明骨关节炎是个全关节的疾病, 尽管进行性的软骨丢失和关节间隙狭窄是该病的特征, 但软骨下骨改变以及滑膜病变也参与其中<sup>[2-3]</sup>。

软骨下骨和软骨一起组成一个功能性的骨软骨单元, 主要起到减缓振荡及分散负荷作用; 软骨下骨由致密的皮质板(软骨下骨板)以及更接近骨髓腔的松质骨(骨小梁)组成<sup>[4]</sup>。软骨下骨的主要生理作用是缓解运动或者负重产生的力量, 软骨下骨板(皮质板)可以为关节软骨提供坚硬的支撑; 软骨下骨板下方的松质骨比皮质板更多孔, 体积、密度和刚度更小, 代谢更活跃, 可以维持关节弹性, 在关节负重时提供减震作用。另外软骨下骨是一种两相的材料, 包括提供刚度的羟磷灰石晶体组成的无机成分和主要由 I 型胶原蛋白、蛋白聚糖、黏多糖类及水组成的提供弹性与柔软的有机成分。两种成分通过特定的排列分散关节横向的负荷, 保护表面覆盖的关节软骨<sup>[5]</sup>。在骨关节炎中, 这些组织的组成、功能特性及结构发生了显著的变化。

关节软骨覆盖于软骨下骨, 具有维持关节环境稳定的重要功能, 其主要包括浅表的非钙化软骨层和深面的钙化软骨层。小分子物质能够从钙化软骨中渗透通过, 也因此钙化软骨在非钙化软骨-软骨下骨间相互的生理和病理功能上发挥

重要作用。软骨下骨和软骨是动态的受力结构, 在关节的承载中起着互补的作用。软骨下骨作为载体支持位于其上的关节软骨, 并将在关节所有的应力散开。当软骨下骨改变, 可使上覆的软骨受到异常的剪切力和张力, 导致继发性软骨损伤和退变。在关节软骨损伤或丧失后, 传递到下层骨骼的应力也将显著增加, 进而诱导软骨下骨损伤<sup>[6]</sup>。除了上述的生物力学作用, 软骨下骨与软骨间还存在复杂的生物学交流。当骨关节炎发生时, 软骨下骨的骨平衡被破坏, 软骨下骨与软骨间通道增加, 细胞因子、炎症因子则可经通道进入软骨, 干扰软骨细胞的代谢; 此时软骨细胞代谢的因子也可能影响软骨下骨<sup>[7]</sup>。SANCHEZ 等<sup>[8]</sup>将骨关节炎硬化区(SC)与非硬化区(N)成骨细胞分别与软骨细胞共培养 4 d, 发现与单独培养软骨细胞相比, 软骨细胞分泌的 SOX(SRY box gene)9 和 II 型胶原蛋白均减少, 硬化区成骨细胞组下降更明显, 说明成骨细胞能够诱导软骨细胞的退化。另外非硬化区成骨细胞促进软骨细胞中甲状旁腺激素相关肽(parathyroid hormone related peptide, PTHrP)及其受体 PTH-R 的表达, 硬化区成骨细胞抑制了 PTHrP 和 PTH-R 的表达, 说明骨的形成减少, 基质降解增加。另外有研究发现体外硬化区成骨细胞能明显抑制软骨细胞聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达以及蛋白的产生, 同时增加基质金属蛋白酶 13、基质金属蛋白酶 3 蛋白的生成。说明骨关节炎中成骨细胞能促进软骨细胞基质金属蛋白酶蛋白的表达, 抑制软骨细胞产生聚集蛋白聚糖蛋白, 进而促进软骨基质的降解和软骨的退化<sup>[9]</sup>。但关于骨关节炎中软骨细胞如何影响成骨细胞, 目前研究仍较少。

印度刺猬蛋白(Indian hedgehog protein, IHH)是刺猬蛋白(Hedgehog protein, Hh)家族的成员之一, 其能够与膜受体 Ptch1 结合, 解除 Ptch1 对 Smoothened(smo)蛋白的抑制, 而上调 Gli 家族锌指蛋白(Gli1/2)的表达, 进而调控下游相关蛋白的表达<sup>[10]</sup>。过去 Ihh 信号通路的研究主要集中在胚胎及出生后器官发育中的调控作用。近年的研究发现在软骨内成骨过程中 IHH 也起到重要作用, 如 IHH 可与 Runx2 相互调节, 促进成骨细胞增殖分化<sup>[11]</sup>; 另外 MAEDA 等<sup>[12]</sup>在动物实验中

发现通过组成型活性甲状旁腺激素 / PTHrP 受体的表达能部分缓解 IHH 突变体中的出生后生长板异常。而甲状旁腺功能亢进 ( 甲状旁腺激素升高 ) 能增强核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL) 产生, 并且在体外能活化成骨细胞蛋白激酶 A 来抑制骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 分泌, 进而通过 OPG/RANKL 系统增加破骨细胞的活性<sup>[13]</sup>。因此 IHH 也可能通过影响 OPG/RANKL 系统进而影响骨重塑。

IHH 在健康的动物关节软骨中检测不到表达, 同时在正常成人的关节软骨中, 也很难发现 IHH 的表达, 但在骨关节炎患者中却明显增加<sup>[14-15]</sup>。LIN 等<sup>[11]</sup>也发现上调的 Hh 信号将导致骨关节炎标志物蛇毒蛋白 Runx2、聚蛋白多糖酶 5、COL10A1 以及基质金属蛋白酶 13 的升高, 而抑制 Hh 能减轻骨关节炎的严重程度。

由此, 猜测骨关节炎软骨细胞能够通过 IHH 信号通路影响成骨细胞来影响骨的形成。为此研究设计如下实验: 首先从行关节置换的骨关节炎患者中获取标本; 在体外提取人骨关节炎的软骨细胞、成骨细胞, 将两者共同培养, 观察软骨细胞对成骨细胞成骨能力的影响; 同时通过加入 IHH 抑制剂或 IHH 激活剂, 检测 IHH 目的基因 Gli1 及相关蛋白的表达, 进而研究软骨细胞如何对软骨下成骨细胞产生影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞实验观察。两组间比较采用独立样本 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 9 月至 2021 年 3 月在安徽医科大学第二附属医院科研实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 组织标本的收集及处理 从行全膝关节置换术的 8 例骨关节炎患者中, 收集手术中废弃的胫骨平台标本 (用于提取成骨细胞及软骨细胞)。该研究通过了安徽医科大学第二附属医院医学研究伦理委员会批准, 批件号: PJ-YX2020-024 (F1), 审批时间: 2020-09-03。在取得组织样本后 2 h 内在无菌操作台中提取细胞。患者对治疗方案及标本的收集完全知情同意, 并签署了知情同意书。

在因骨关节炎需行全膝关节置换的患者中, 收集没有高血压、糖尿病、血友病等基础疾病的患者术中废弃的胫骨平台标本。收集时应注意遵循严格的无菌操作, 将标本放置在无菌的标本袋中, 并及时转入实验室内。在体积分数 75% 乙醇充分消毒标本袋后, 将标本转入无菌操作台中。在无菌操作台中适当剪除胫骨平台上残留的韧带, 之后使用生理盐水充分冲洗胫骨平台标本, 尽量去除其表面残留的关节液、血液等杂质。清理完表面杂质后将标本放置在干净无菌的培养皿 (直径 10 cm) 中, 准备提取细胞。提供组织标本的患者一般资料见表 1。

1.3.2 主要试剂和仪器 PBS(Hyclone, USA); 胰蛋白酶(Gibco, USA); 胶原酶 II、甲苯胺蓝、碱性磷酸酶测定试剂盒 (Solarbio, 中国); 40 g/L 多聚甲醛 (Biosharp, 中国); I 型胶原蛋白一抗、II 型胶原蛋白一抗 (Abcam, UM); Trizol 试剂 (Invitrogen,

表 1 | 骨关节炎胫骨平台标本供者一般资料

Table 1 | General information on donors of osteoarthritic tibial plateau specimens

患者编号	性别	年龄 (岁)	K-L 评分
1	女	70	IV
2	男	63	IV
3	女	63	IV
4	女	68	IV
5	女	55	III
6	女	64	IV
7	男	68	III
8	男	63	III

USA); TaqMan 反转录试剂、SYBRgreen 试剂 (Takara, JPN); Eclipse ti 荧光显微镜 (Nikon, Tokyo, Japan); Transwell(美国康宁公司); 聚偏乙烯膜 (Millipore, USA); Gli 1 抗体、OPG 抗体 (Affinity, 美国)、RANKL (Proteintech, 美国) 抗体、Cyclopamine(环巴胺)、Purmorphamine(2, 6, 9-三元取代嘌呤) (Selleck, USA)。

### 1.4 方法

1.4.1 人骨关节炎软骨细胞及成骨细胞的提取与培养 用 PBS 洗涤软骨组织 3 次, 胰蛋白酶处理 30 min, 然后用 0.2% 胶原酶 II 在 37 °C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中消化 16-20 h, 后通过 200 目细胞滤器离心, 收集过滤的消化液, 1 000×g 离心 10 min, 得到沉淀即为软骨细胞, 沉淀经培养液 ( $\alpha$ -MEM 培养基 + 体积分数 10% 血清 +1% 双抗) 混匀, 取部分细胞悬液用锥虫蓝染色 (锥虫蓝终浓度 0.04%) 后在显微镜下进行计数。同时, 按照既往文献中的方法制备海藻酸盐珠<sup>[9]</sup>。然后将软骨细胞以  $2 \times 10^4$ /珠的密度包埋在海藻酸盐珠中培养, 以维持其分化的表型。

将骨组织切成 1-3 mm 大小的小块, 置于 50 mL 离心管中, 用 10-15 mL PBS 洗涤, 摇匀 15 s, 静置 30 s 后丢弃上清。反复清洗, 直到骨头变成乳白色, 通常要清洗 3-5 次。胰酶初步消化 10 min, 胶原酶 II 消化 30 min。然后将骨块种植于 10 cm 培养皿中, 种植密度为 0.2-0.5 g/cm<sup>2</sup>, 加入 (DMEM-F12+ 体积分数 10% 血清 +1% 双抗) 培养液培养。7 d 后第 1 次更换培养基。当培养的原代细胞达到 80% 合度时, 用 2 g/L 胰蛋白酶处理传代培养。当传代后成骨细胞贴壁、状态稳定后, 更换为 ( $\alpha$ -MEM 培养基 + 体积分数 10% 血清 +1% 双抗) 培养液继续培养, 实验中所有的培养细胞均在传至第 3 代之前使用。

1.4.2 甲苯胺蓝染色鉴定软骨细胞 将原代软骨细胞高密度接种于 6 孔板 ( $2.5 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>), 待细胞贴壁后, PBS 冲洗, 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, 然后甲苯胺蓝染色 20 min, 洗涤后在显微镜下观察。

1.4.3 碱性磷酸酶染色鉴定成骨细胞 根据制造商的说明, 使用碱性磷酸酶测定试剂盒进行碱性磷酸酶染色。用 PBS 冲洗成骨细胞, 并在 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min。然后在避光湿盒中染色 15 min, 显微镜下观察。

1.4.4 免疫荧光鉴定软骨细胞和成骨细胞 成骨细胞和软骨细胞接种于 6 孔载玻片 ( $2.5 \times 10^4$ /孔) 中, 培养 24 h。用 40 g/L 多聚甲醛固定后, PBS 冲洗, 使用 0.5% Triton X-100 室温通透, PBS 冲洗, 用 5% 牛血清白蛋白 - 磷酸盐缓冲液

(BSA-PBS) 封闭, 封闭后滴入足量 I 型胶原蛋白 (稀释比例为 1 : 500) 或 II 型胶原蛋白 (稀释比例为 1 : 200) 一抗 4 °C 孵育过夜。隔日, PBST 清洗, 滴加荧光二抗, 室温孵育 1 h。使用 Eclipse ti 荧光显微镜捕获图像。

**1.4.5 建立体外共培养体系** 共培养体系使用孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  的 Transwell 小室进行<sup>[7, 16]</sup>。软骨细胞被放置在 Transwell 小室中, 每孔约 25 颗 (约  $5 \times 10^5$  个细胞)。成骨细胞放置在 6 孔板中培养, 当成骨细胞达到 80% 的融合 (大约  $1 \times 10^6$ ) 时, 将含有软骨细胞的小室转移到 6 孔板中, 构建共培养体系。在共培养系统中加入 4 mL 培养液 ( $\alpha$ -MEM+ 体积分数 10% 胎牛血清 +1% 双抗), 软骨细胞与成骨细胞以约 1 : 2 的比例一起共培养 48 h。

**分组处理:** 为探究软骨细胞对成骨细胞的作用以及 IHH 信号通路在其中扮演的角色。除了构建共培养体系, 在实验中还加入了 IHH 信号通路特异性的抑制剂与激活剂, 在使用药物 48 h 后测定成骨细胞中 Gli1 以及成骨相关基因的表达情况。实验分组见表 2。

表 2 | 细胞实验分组

Table 2 | Cell grouping

组别	处理方法	分组处理					
		1	2	3	4	5	6
Control 组	仅成骨细胞单独培养	+	+	+	-	-	-
Co-culture 组	海藻酸钠珠包埋的软骨细胞与成骨细胞共培养	-	-	-	+	+	+
Cyclopamine 组	环巴胺, IHH 通路抑制剂, 10 nmol/L	-	+	-	-	+	-
Purmorphamine 组	IHH 通路激活剂, 10 nmol/L	-	-	+	-	-	+

表注: “-”代表非此组或未加该药物; “+”代表是此组或添加此药物。

**1.4.6 实时聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测成骨相关基因 mRNA 的表达** 采用 Trizol RNA 分离法按照说明书提取 RNA。利用 TaqMan 反转录试剂将不含污染 DNA 的 RNA 样本反转录为 cDNA, 再用 SYBRgreen 试剂进行 qRT-PCR。在实时 PCR 仪上使用 cDNA 进行 RT-PCR, 通过熔解曲线判断该引物扩增反应的特异性, 通过扩增曲线确定 CT 值, 以  $\beta$ -actin 作为内参通过  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算基因相对表达量。相关基因的上下游引物见表 3。

表 3 | 引物序列

Table 3 | Primer sequences

基因	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
Gli 1	CCC CAA CTC CAC AGG CAT AC	CAC AGA TTC AGG CTC ACG CT
Runx2	TGG CGC TGC AAC AAG ACC CT	TCC ACT CCG GCC CAC AAA TC
PTHrP	GGT TCA GCA GTG GAG CGT CG	CTG CGA TCA GAT GGT GAA GGA A
ALPL	TGC ATA ACA TCA GGG ACA TTG	CCT GGC TTT CTC GTC ACT CT
OCN	TGT CAG AGT CCA GCA AAG GT	GGT CAG CCA ACT CGT CAC AG
OPG	TGC AGT ACG TCA AGC AGG AG	GCA AAC TGT ATT TCG CTC TGG
RANKL	GAT GGC ACT CAC TGC ATT TAT	TGT GCT ATC CAA CGA TAT
$\beta$ -actin	CCC TGG AGA AGA GCT ACG AG	GGA AGG AAG GCT GGA AGA GT

表注: PTHrP 为甲状旁腺激素相关肽; ALPL 为组织非特异性碱性磷酸酶; OCN 为骨钙素; OPG 为骨保护素; RANKL 为核因子  $\kappa\text{B}$  受体活化因子配体。

**1.4.7 Western blot 实验检测 Gli1、OPG、RANKL 蛋白水平** 提取成骨细胞总蛋白。按照 BCA 试剂盒说明书测定提取的蛋白浓度, 根据结果调整各组蛋白至相同浓度。将蛋白质通过 SDS-PAGE 分离, 然后转移到聚偏乙烯膜上。将膜与 Gli1

(稀释比例为 1 : 1 000)、OPG (稀释比例为 1 : 1 000) 或 RANKL (稀释比例为 1 : 500) 抗体在 4 °C 下孵育过夜。然后将膜与二抗 (稀释比例为 1 : 20 000) 孵育 1 h。最后, 向膜表面滴加超敏 ECL 显影液, 置于显影仪的暗箱中进行曝光显影及拍照。

**1.5 主要观察指标** ①人软骨细胞和成骨细胞鉴定结果; ②成骨相关基因 mRNA 的表达; ③ IHH 信号通路对 OPG/RANKL 的影响。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析。qRT-PCR 数据采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算相对表达值; 蛋白印迹实验结果通过 Image J 读取灰度值; 所有数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,  $P < 0.05$  视为差异有显著性意义。文章的统计学方法已经由安徽医科大学第二附属医院生物统计学专家审核。

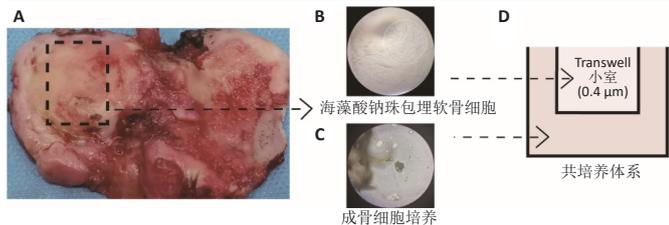
## 2 结果 Results

**2.1 提取细胞及构建共培养系统的流程** 从手术室收集标本后, 快速转至实验室, 无菌生理盐水、PBS 反复冲洗干净标本后, 从胫骨平台外侧区域 (图 1A) 分离提取人骨关节炎成骨细胞与软骨细胞。酶解法提取软骨细胞后, 除一部分细胞 2D 培养进行鉴定外, 其余细胞采用海藻酸钠珠包埋后培养 (图 1B)。将骨块用胰酶、胶原酶预消化后种植在培养皿中, 1 周左右可在倒置显微镜下看到成骨细胞从骨块中爬出 (图 1C)。建立软骨细胞-成骨细胞共培养体系时, 将海藻酸钠包埋的软骨细胞放在 0.4  $\mu\text{m}$  孔径的 Transwell 小室中, 然后将小室放在培养有成骨细胞的 6 孔板中 (图 1D)。

**2.2 培养及鉴定人软骨细胞** 从胫骨平台分离出软骨细胞后, 经细胞滤网过滤、离心后, 将细胞高密度种植 (约  $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) 到培养板中。待细胞贴壁后显微镜下观察拍照 (图 2A)。使用甲苯胺蓝对原代软骨细胞进行染色, 可见软骨细胞呈紫红色 (图 2B)。通过免疫荧光检测软骨细胞表达分泌 II 型胶原蛋白的情况, 结果显示软骨细胞的细胞核呈蓝色, 细胞胞浆中可见散在的 II 型胶原蛋白呈绿色 (图 2C-E)。

**2.3 培养及鉴定人成骨细胞** 待第 2 代成骨细胞长至 80% 融合时, 消化收集成骨细胞, 将成骨细胞种植在 6 孔板中 (图 3A)。培养一段时间后, 显微镜下观察细胞并拍照。碱性磷酸酶染色可见成骨细胞成蓝紫色 (图 3B)。免疫荧光检测成骨细胞表达分泌 I 型胶原蛋白的情况, 结果显示成骨细胞核呈蓝色, 细胞胞浆中可见散在的 I 型胶原蛋白呈绿色 (图 3C-E)。

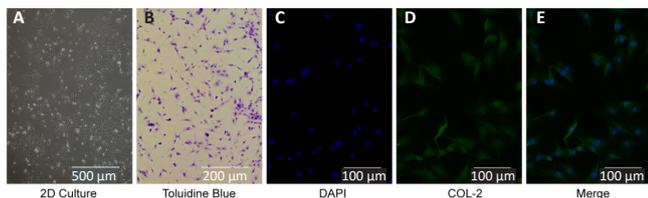
**2.4 共培养下人软骨细胞促进成骨细胞 OPG、Runx2 等成骨相关基因表达** 与软骨细胞共培养 48 h 后, 利用 qRT-PCR 检测成骨细胞成骨基因的相对于内参基因  $\beta$ -actin 的表达情况, 发现成骨细胞中 Gli1、OPG、Runx2 的 mRNA 均升高 ( $P < 0.05$ ), PTHrP 的 mRNA 表达相对下降 ( $P < 0.05$ )。在与软骨细胞共培养时, 成骨细胞中 ALPL 的 mRNA 表达稍降低, 骨钙素的 mRNA 表达稍增加, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 4。



图注：图 A 为从胫骨平台外侧提取细胞；B 为海藻酸钠珠包埋软骨细胞；C 为骨块法提取成骨细胞；D 为利用 Transwell 小室构建共培养体系。

图 1 | 实验流程示意图

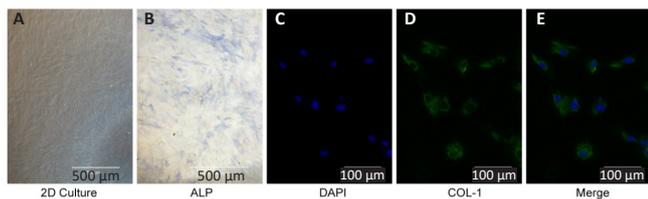
Figure 1 | Experimental flow diagram



图注：图 A 为 2D 培养的软骨细胞；B 为甲苯胺蓝染色；C-E 为免疫荧光检测软骨细胞 II 型胶原蛋白表达。

图 2 | 人软骨细胞的鉴定

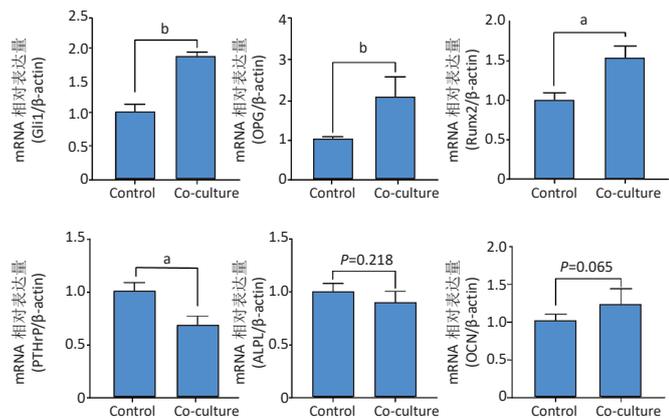
Figure 2 | Identification of human chondrocytes



图注：图 A 为 2D 培养下的成骨细胞；B 为碱性磷酸酶染色；C-E 为免疫荧光检测成骨细胞 I 型胶原蛋白表达。

图 3 | 人成骨细胞鉴定

Figure 3 | Identification of human osteoblasts



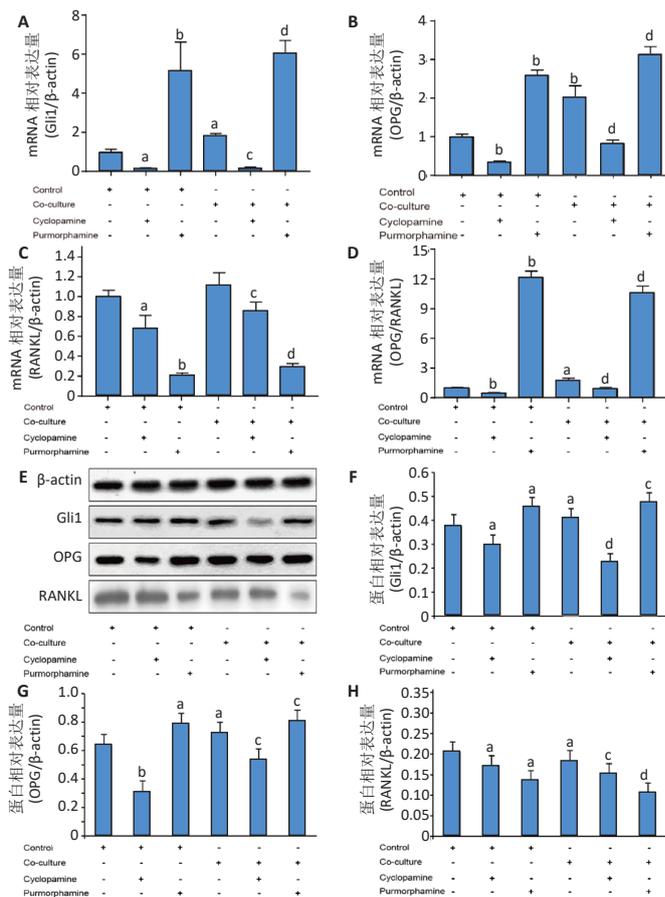
图注：<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。Control 组：仅成骨细胞单独培养；Co-culture：海藻酸钠珠包埋的软骨细胞与成骨细胞共培养。OPG：骨保护素；PTHrP：甲状旁腺激素相关肽；ALPL：组织非特异性碱性磷酸酶；OCN：骨钙素。

图 4 | qRT-PCR 检测相关基因 mRNA 的表达

Figure 4 | qRT-PCR detection of the mRNA expression of related genes

**2.5 IHH 信号通路对 OPG/RANKL 的影响** 共培养时，成骨细胞中 IHH 信号通路激活的目的基因 Gli1 的表达明显升高，提示骨关节炎软骨细胞能够通过 IHH 信号通路影响成骨细胞。为了进一步探究 IHH 信号通路的作用，使用了该通路的抑制剂（环巴胺，10 nmol/L）和激活剂（Purmorphamine，10 nmol/L），两者通过作用在细胞膜受体 smo 蛋白，进而控制 IHH 下游基

因的表达。在使用药物 48 h 后测定成骨细胞中 Gli1 以及成骨相关基因的表达情况，结果发现在使用激活剂后 Gli1 表达相较于对照组显著升高，使用抑制剂后 Gli1 表达显著降低，这说明加入激活剂或抑制剂能够特异性激活或抑制成骨细胞中 IHH 的信号通路（图 5A）。在 OPG、Runx2、PTHrP 等相关检测基因里，仅 OPG 的 mRNA 表达趋势与 Gli1 完全一致，当 IHH 信号通路被激活时，OPG 蛋白的 mRNA 表达显著升高；当 IHH 信号通路被抑制时，OPG 蛋白的 mRNA 的表达显著降低（图 5B）。另外在 OPG 基因的表达被抑制时 RANKL 的表达没有显著的升高；但 OPG 基因的表达增高时 RANKL 的表达明显降低（图 5B, C），差异有显著性意义（ $P < 0.05$ ）。进一步计算了 OPG/RANKL 的 mRNA 相对表达值，发现 OPG/RANKL 的 mRNA 的比值与 OPG mRNA 以及 Gli1 mRNA 的趋势相同（图 5D），最后使用 Western blot 检测了这些 mRNA 对应蛋白的表达量，发现与 mRNA 的趋势一致（图 5E-H）。这些结果表明骨关节炎软骨细胞能够通过 IHH 信号通路上调骨关节炎成骨细胞 OPG 的表达，从而进一步影响 OPG/RANKL 系统。



图注：与 Control 组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ；与 Co-culture 组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ 。Control 组：仅成骨细胞单独培养；Co-culture：海藻酸钠珠包埋的软骨细胞与成骨细胞共培养；- 代表非此组或未加该药物；+ 代表是此组或添加此药物；Cyclopamine：IHH 信号通路抑制剂；Purmorphamine：IHH 信号通路激活剂；OPG：骨保护素；RANKL：核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体。

图 5 | 不同处理条件 Gli1、OPG、RANKL 的 mRNA (A-D) 及蛋白 (E-H) 表达

Figure 5 | The mRNA (A-D) and protein (E-H) levels of Gli1, osteoprotegerin, and RANKL under different treatment conditions

### 3 讨论 Discussion

在此次研究中, 首先将人类骨关节炎软骨细胞和成骨细胞共培养, 发现与软骨细胞共培养时, 成骨细胞中 Gli1、OPG、Runx2 等成骨相关基因的 mRNA 表达明显增高, PTHrP 的 mRNA 表达降低; 然后通过添加 IHH 通路特异性抑制剂或激活剂, 发现这些基因中仅 OPG 依赖于 IHH 信号通路。这提示在骨关节炎中, 软骨细胞能够通过 IHH 信号通路促进成骨细胞 OPG 的表达; 由于 OPG 通常与 RANKL 一起研究, 进一步研究了各组中 RANKL 的表达情况, 并计算了各处理条件下 OPG/RANKL 的比值, 发现在加入 IHH 信号通路抑制剂后, RANKL 的表达未呈现出与 OPG 相反的趋势, 但各组 OPG/RANKL 比值的变化趋势与 OPG 相同, 这些结果阐释 2 种可能: 一是除了 OPG 外, 还有其他蛋白能够抑制 RANKL 的生成; 二是 IHH 信号通路能够通过 OPG 蛋白调节 OPG/RANKL 的比值。由于与软骨共培养时, 成骨细胞 OPG 及 OPG/RANKL 比值均升高, 加入 IHH 激活剂后, 这两者进一步增高, 而加入 IHH 抑制剂后, 这两者均明显降低; 这说明软骨细胞调节成骨细胞 OPG 的表达与 IHH 信号通路有关。以上这些发现有助于解释软骨和软骨下骨之间的串话机制。

在 20 世纪 60 年代, 人们发现从软骨细胞的基质中分离出来的软骨细胞和体外单层培养的软骨细胞发生了剧烈的形态学变化<sup>[17]</sup>, 正常的圆形软骨细胞向更扁平的多边形转变, 接近成纤维细胞<sup>[17-18]</sup>。这种现象最近被重新命名为“去分化”, 构成了软骨细胞生物学中的一个独特特征。去分化软骨细胞的形态修饰伴随着蛋白质合成谱的深刻变化。骨细胞表型改变是导致骨关节炎软骨内稳态丧失的重要机制<sup>[19-20]</sup>。异位肥大的软骨细胞重新启动是骨关节炎软骨的特征: ①肥大软骨细胞标志物(如 X 型胶原蛋白、基质金属蛋白酶 13、破骨细胞、IHH、CD36、碱性磷酸酶)在骨关节炎软骨中表达上调; ②这些标志物的上调可直接参与骨关节炎中的基质钙化和降解; ③软骨细胞终末分化过程中的基因表达与实验性骨关节炎相似<sup>[21-22]</sup>。异位去分化在骨关节炎软骨中可能不会发生。然而, 已证实的去分化软骨细胞标记物在骨关节炎软骨中上调, 并可显著参与骨关节炎软骨的纤维化或老化。此外, 还发现与骨关节炎相关的有害物质可以增强或加速去分化。在体外诱导的软骨细胞向去分化成纤维细胞样表型的转变同样也在骨关节炎软骨中原位发生<sup>[23-24]</sup>。与动物细胞或细胞系相比, 人原代细胞更能反映人体细胞的真实情况。然而, 在缺乏生理刺激的情况下, 被剥夺细胞外基质的软骨细胞迅速失去其特征表型, 并倾向于在体外条件下去分化<sup>[25]</sup>。目前维持软骨细胞表型的方法是高密度种植( $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ )和 3D 培养<sup>[26]</sup>。在此次研究中, 将软骨细胞嵌入 3D 海藻酸钠珠中, 以保持其成熟的表型<sup>[27-28]</sup>。

目前大多数关于成骨细胞的研究采取的是骨间充质干细胞诱导分化成骨细胞, 该方法能够简单便捷的获取大量正常的成骨细胞<sup>[29]</sup>。在采用该方法的研究中, 研究者通常使用成骨细胞特异性标志物碱性磷酸酶作为骨间充质干细胞诱导

分化成功的标志, 当加入成骨诱导液处理后, 可检测到表达碱性磷酸酶的细胞比例逐渐增高。由于此次研究主要集中在骨关节炎患者膝关节软骨-软骨下骨界面, 因此选择直接从软骨下骨局部提取原代人成骨细胞。

对于原代人成骨细胞, 既往研究中采用的主要提取方法是骨块培养和酶消化法<sup>[30-31]</sup>。在此次实验中, 首先按照以往一些文献中的方法进行了尝试, 发现酶消化法虽然能短时间获取成骨细胞, 但短时间内反复的消化离心, 获得细胞活性相对较差; 而单纯骨块培养法存在细胞难以爬出以及爬出时间较长。参考以往的方法, 用胰蛋白酶和胶原酶依次消化骨碎片, 对消化后的骨碎片进行骨块培养, 预消化后的骨块种植培养的成功率较高, 当成骨细胞散在聚集时, 将其消化后振荡, 使其分布均匀, 三四周可以看到 80% 原代成骨细胞相互接触融合(图 2A)。另外, 既往报道中关于人成骨细胞提取以及培养的方法均未明确统一, 结合以往的研究, 在此次实验中使用了 DMEM-F12 以及  $\alpha$ -MEM 2 种培养基。其中 DMEM-F12 更有利于成骨细胞的增殖, 而  $\alpha$ -MEM 培养基更有利于成骨细胞的分化, 因此, 在前期培养原代成骨细胞中采用了 DMEM-F12 进行培养, 之后成骨细胞采用  $\alpha$ -MEM 培养基(与软骨细胞培养基相同)培养一段时间后, 收集用于与软骨细胞共同培养。

成骨细胞是骨细胞的前体细胞, 它们之间有着密切的联系和相互作用。骨细胞主要介导骨组织对机械载荷的反应, 而成骨细胞主要调节骨的形成和矿化, 在此次研究中发现当与软骨细胞共培养时, 成骨细胞标志物碱性磷酸酶的表达下降(碱性磷酸酶在骨细胞中不表达)(图 3D), 而骨细胞的标志物骨钙素表达升高(骨钙素在成骨细胞中不表达), 尽管两者的变化没有明显的统计学差异(可能与共培养时间较短有关), 但这提示了与软骨细胞共培养时成骨细胞向骨细胞分化<sup>[30]</sup>。

骨-软骨界面的微环境系统具有独特的动态性, 其特征是多种细胞参与的持续重塑<sup>[32]</sup>。SANCHEZ 等<sup>[33]</sup>发现骨性关节炎患者的软骨下骨成骨细胞表现出骨合成代谢分子的增加以及成骨细胞表型的改变。NAKAOKA 等<sup>[34]</sup>共培养小鼠软骨细胞和牛成骨细胞, 发现小鼠软骨细胞能够以旁分泌方式促进牛成骨细胞分化。在此次研究中发现与软骨细胞共培养可以促进成骨细胞中成骨相关基因的表达(图 3)。

OPG 于 1997 年首次发现, 是肿瘤坏死因子受体超家族的一员, 因其具有抑制破骨细胞生成的作用又被称为破骨细胞抑制因子<sup>[35-36]</sup>。目前关于 OPG 在骨转换中的作用有许多研究报道, 简而言之, 骨转换的主要参与者是成骨细胞和破骨细胞, 其中破骨细胞是骨溶解的关键, OPG 则是调控破骨细胞成熟分化的关键。在骨组织局部, 成骨细胞产生的 OPG 充当诱饵受体, 以同源二聚体的形式与同源三聚体 RANKL 结合, 从而阻止其与 RANK 结合以及随后的破骨细胞激活<sup>[37]</sup>。OPG 的表达受到许多因子的调控, 如骨形态发生蛋白 2、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 11、白细胞介素 18 可等以促进成骨细胞分泌 OPG<sup>[38]</sup>。在此次研究中, 发现与骨关节炎软骨细

胞共培养时,成骨细胞分泌了更多的 Gli1(IHH 通路的目的基因)和 OPG。当加入 IHH 抑制剂时, Gli1 和 OPG 生成明显减少;而加入 IHH 激活剂时, Gli1 和 OPG 的生成明显增多;这说明软骨细胞能够 IHH 信号通路能够促进 OPG 的生成。

RANKL 也是 TNFR 家族的一员,于 1998 年首次发现<sup>[39]</sup>。其可由成骨细胞系、免疫细胞以及一些癌细胞合成。在骨组织局部,其主要由成骨细胞以膜蛋白的方式分泌,通过接触位于破骨细胞表面的 RANK 受体,促进破骨细胞的成熟分化<sup>[40]</sup>。由于 OPG 与 RANKL 均有成骨细胞分泌,且 OPG 能够抵消 RANKL 的作用,因此 OPG/RANKL 的比值在骨转换中非常重要;当两者比值减小时,骨溶解增加,当比值增大时,骨合成增加<sup>[41-42]</sup>。在既往的研究中,人们发现骨关节炎早期 OPG/RANKL 比值减小,骨关节炎晚期 OPG/RANKL 比值增大,这与骨关节炎早期以骨吸收为主、晚期以骨硬化为主有关,这可以解释骨关节炎早期的骨吸收和晚期的骨硬化<sup>[43]</sup>。在此次研究中,所有细胞都来自于晚期骨关节炎患者手术切除的组织,在与软骨细胞共培养时,OPG mRNA 以及蛋白水平均明显增高,尽管 RANKL 的 mRNA 及蛋白水平未呈现明显相反的变化,但 OPG/RANKL 水平明显升高,这提示骨关节炎晚期软骨可能促进软骨下骨硬化。对于实验中 RANKL 表达未呈现出与 OPG 完全相反的趋势,比如加入 IHH 抑制剂后 OPG 明显降低,而 RANKL 未明显升高。作者认为可能原因是:由于 IHH 能够促进成熟的成骨细胞分泌 RANKL,因此虽然 OPG 的表达被抑制时 RANKL 通常升高,但由于 IHH 也被抑制,因此 RANKL 未呈现明显的升高<sup>[44]</sup>。实验结果提示 IHH 与 OPG 对成骨细胞 RANKL 表达的影响具有拮抗作用,且 OPG 对 RANKL 表达的影响更为明显。

IHH 是刺猬家族的一员,在长骨的发育和关节的形成中起着关键作用<sup>[45-46]</sup>。Hh 配体与 Ptch1 结合释放 Smo 蛋白, Smo 利用鞭毛内运输蛋白转运到纤毛,进而促进 Hh 靶基因的表达<sup>[47]</sup>。在以前的研究中, IHH 被证明参与软骨-软骨下骨的通讯。此次研究中发现在共培养中,成骨细胞中 IHH 信号通路的目的基因 Gli1 的 mRNA 及蛋白水平明显增加<sup>[48]</sup>。为了进一步研究 IHH 信号通路在成骨过程中的作用,向共培养系统分别添加 IHH 信号通路特异性的抑制剂 (Cyclopamine) 或激活剂 (Purmorphamine)<sup>[49-50]</sup>,结果发现,加入 IHH 特异性抑制剂后, IHH 信号通路目的基因 Gli1 表达明显受到抑制;当加入 IHH 特异性激活剂后, Gli1 表达明显增高,说明加入特异性的激活剂或抑制剂后, IHH 信号通路明显被激活或者抑制。当加入 IHH 激活剂或抑制剂后,发现 OPG 的 mRNA 及蛋白表达趋势与 Gli1 一致,且都具有显著差异。这提示软骨细胞通过 IHH 信号通路促进成骨细胞 OPG 蛋白的表达。另外实验中 OPG/RANKL 比值与 OPG、Gli1 水平变化趋势保持一致。这些结果提示骨关节炎软骨细胞能够通过 IHH 信号通路上调成骨细胞中 OPG 的表达以及 OPG/RANKL 比值,这将有助于骨形成,可能是骨关节炎晚期软骨下骨出现硬化的机制之一。

最后该研究也有一定的局限性:首先,研究只使用了人骨关节炎软骨细胞和成骨细胞,未使用正常软骨细胞和成骨细胞作为对照;其次,在预实验中通过 MTT 法检测了与软骨细胞共培养时成骨细胞增殖的活性未发现明显变化,因此研究主要集中在软骨细胞对成骨细胞成骨基因表达的影响上;最后,尽管结果发现软骨细胞在体外能够通过 IHH 信号通路上调成骨细胞 OPG 的表达,进而提高 OPG/RANKL 比值,但进一步机制仍待进一步研究。

**结论:**实验提取培养了人骨关节炎的软骨细胞及成骨细胞,研究发现人骨关节炎软骨细胞在体外能够促进成骨细胞中 Gli1(IHH 信号通路的目的蛋白)、OPG、Runx2 等蛋白的表达;加入 IHH 抑制剂与激活剂后, OPG 与 Gli1 呈现出相同的变化趋势,这提示骨关节炎软骨细胞能够激活成骨细胞 IHH 信号通路,上调成骨细胞 OPG 的表达进而上调 OPG/RANKL 的比值,这将有助于软骨下骨中的骨形成。

**作者贡献:**姚运峰负责实验设计,李家乐、罗达胜、郑刘杰负责实验实施,刘伟、姚运峰负责评估。

**利益冲突:**文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:**这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:**文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] NELSON AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(3):319-325.
- [2] O'NEILL TW, MCCABE PS, MCBETH J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32(2):312-326.
- [3] AHO OM, FINNILA M, THEVENOT J, et al. Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173726.
- [4] HUGLE T, GEURTS J. What drives osteoarthritis?-synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(9):1461-1471.
- [5] STEWART HL, KAWCAK CE. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Front Vet Sci*. 2018;5:178.
- [6] LI G, YIN J, GAO J, et al. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):223.
- [7] BURR DB, GALLANT MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):665-673.
- [8] SANCHEZ C, DEBERG MA, PICCARDI N, et al. Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(11):988-997.
- [9] SANCHEZ C, DEBERG MA, PICCARDI N, et al. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6,-1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(11):979-987.

- [10] 朴星银, 蒋传路. 胶质瘤相关 Hedgehog 信号通路的研究进展 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2012,11(17):526-528.
- [11] LIN AC, SEETO BL, BARTOSZKO JM, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med.* 2009;15(12):1421-1425.
- [12] MAEDA Y, SCHIPANI E, DENSMORE MJ, et al. Partial rescue of postnatal growth plate abnormalities in *Ihh* mutants by expression of a constitutively active PTH/PTHrP receptor. *Bone.* 2010;46(2):472-478.
- [13] HOFBAUER LC, KUHN CA, VIERECK V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(3):268-275.
- [14] SCHARSTUHL A, GLANSBEEK HL, VAN BEUNINGEN HM, et al. Inhibition of endogenous TGF- $\beta$  during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol.* 2002;169(1):507-514.
- [15] TCHETINA EV, SQUIRES G, POOLE AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol.* 2005;32(5):876-886.
- [16] SALTZMAN BM, RIBOH JC. Subchondral Bone and the Osteochondral Unit: Basic Science and Clinical Implications in Sports Medicine. *Sports Health.* 2018;10(5):412-418.
- [17] ANDERSON HC, CHACKO S, ABBOTT J, et al. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. VII. Effects of 5-bromodeoxyuridine and prolonged culturing on fine structure of chondrocytes. *Am J Pathol.* 1970;60(2):289-312.
- [18] VON DER MARK K, GAUSS V, VON DER MARK H, et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977;267(5611):531-532.
- [19] REICHENBERGER E, AIGNER T, VON DER MARK K, et al. In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev Biol.* 1991;148(2):562-572.
- [20] FUKUI N, PURPLE CR, SANDELL LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep.* 2001;3(6):496-505.
- [21] SUN MM, BEIER F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(1):74-82.
- [22] PITSILLIDES AA, BEIER F. Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(11):654-663.
- [23] MORT JS, BILLINGTON CJ. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res.* 2001;3(6):337-341.
- [24] MOULIN D, SALONE V, KOUFANY M, et al. MicroRNA-29b Contributes to Collagens Imbalance in Human Osteoarthritic and Dedifferentiated Articular Chondrocytes. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9792512.
- [25] HDUD IM, EL-SHAFEI AA, LOUGHNA P, et al. Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) channels in different passages of articular chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4433-4445.
- [26] WANG D, REN H, LI C, et al. Orexin A prevents degradation of the articular matrixes in human primary chondrocyte culture. *Mol Immunol.* 2018;101:102-107.
- [27] FINGER F, SCHORLE C, ZIEN A, et al. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3395-3403.
- [28] SAAS J, LINDAUER K, BAU B, et al. Molecular phenotyping of HCS-2/8 cells as an in vitro model of human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(11):924-934.
- [29] SCHULZE S, WEHRUM D, DIETER P, et al. A supplement-free osteoclast-osteoblast co-culture for pre-clinical application. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4391-4400.
- [30] SUN Q, CHOUDHARY S, MANNION C, et al. Ex vivo construction of human primary 3D-networked osteocytes. *Bone.* 2017;105:245-252.
- [31] ROSENBERG N, ROSENBERG O, WEIZMAN A, et al. In vitro Effects of the Specific Mitochondrial TSP0 Ligand Ro5 4864 in Cultured Human Osteoblasts. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2018;126(2):77-84.
- [32] FLORENCIO-SILVA R, SASSO GR, SASSO-CERRI E, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.
- [33] SANCHEZ C, DEBERG MA, BELLAHCENE A, et al. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis Rheum.* 2008;58(2):442-455.
- [34] NAKAOKA R, HSIONG SX, MOONEY DJ. Regulation of chondrocyte differentiation level via co-culture with osteoblasts. *Tissue Eng.* 2006;12(9):2425-2433.
- [35] SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-319.
- [36] YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, et al. Identity of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A Mechanism by which OPG/OCIF Inhibits Osteoclastogenesis in Vitro 1. *Endocrinology.* 1998;139(3):1329-1337.
- [37] SCHNEEWEIS LA, WILLARD D, MILLA ME. Functional Dissection of Osteoprotegerin and Its Interaction with Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand. *J Biol Chem.* 2005;280(50):41155-41164.
- [38] REID P, HOLEN I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol.* 2009;88(1):1-17.
- [39] GEUSENS P. Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis--focus on denosumab. *Clin Interv Aging.* 2009;4:241-250.
- [40] SILVA I, BRANCO JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port.* 2011;36(3):209-218.
- [41] TYROVOVA JB. The "Mechanostat" Principle and the Osteoprotegerin-OPG/RANKL/RANK System PART II. The Role of the Hypothalamic-Pituitary Axis. *J Cell Biochem.* 2017;118(5):962-966.
- [42] HOFBAUER LC, KHOSLA S, DUNSTAN CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):2-12.
- [43] UPTON AR, HOLDING CA, DHARMAPATNI AA, et al. The expression of RANKL and OPG in the various grades of osteoarthritic cartilage. *Rheumatol Int.* 2012;32(2):535-540.
- [44] MAK KK, BI Y, WAN C, et al. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Developmental Cell.* 2008;14(5):674-688.
- [45] LIANG W, LI X, GAO B, et al. Observing the development of the temporomandibular joint in embryonic and post-natal mice using various staining methods. *Exp Ther Med.* 2016;11(2):481-489.
- [46] MAEDA Y, NAKAMURA E, NGUYEN MT, et al. Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(15):6382-6387.
- [47] HUANGFU D, ANDERSON KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development.* 2006;133(1):3-14.
- [48] DIDIASOVA M, SCHAEFER L, WYGRECKA M. Targeting GLI Transcription Factors in Cancer. *Molecules.* 2018;23(5):1003.
- [49] LEIJTEN JC, BOS SD, LANDMAN EB, et al. GREM1, FRZB and DKK1 mRNA levels correlate with osteoarthritis and are regulated by osteoarthritis-associated factors. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R126.
- [50] ALI SA, AL-JAZRAWI M, MA H, et al. Regulation of Cholesterol Homeostasis by Hedgehog Signaling in Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(1):127-137.

(责任编辑: YJ, WZH, ZN, WL)