

TNF- α 诱导大鼠软骨细胞焦亡模型的建立与评价

徐 靛,吴玉娇,袁晓阳,张 峰,程 刚,张运芳,魏 伟,严尚学

摘要 目的 建立肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的大鼠软骨细胞焦亡模型并评价模型的特点。方法 两步酶消化法获取大鼠膝关节软骨细胞,倒置相差显微镜观察大鼠软骨细胞的形态结构,甲苯胺蓝染色、II型胶原(Col II)免疫组化染色鉴定大鼠软骨细胞,用不同质量浓度 TNF- α (5、10、20、40 ng/ml) 诱导建立大鼠软骨细胞的焦亡模型,以 TNF- α (0 ng/ml) 为对照组。CCK-8 法检测大鼠软骨细胞活力,Western blot 检测大鼠软骨细胞焦亡信号相关蛋白,确定最佳刺激浓度,ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-18 的水平,免疫荧光检测大鼠软骨细胞 gasdermin D (GSDMD) 表达,扫描电镜观测大鼠软骨细胞焦亡的形态学改变。结果 与对照组相比,大鼠软骨细胞的活力随着 TNF- α 浓度升高而逐渐下降,并且核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)、半胱天冬酶 1 (caspase-1)、GSDMD、磷酸化核转录因子- κ B p65 (P-p65) 蛋白的表达增加。TNF- α (20 ng/ml) 可诱导大鼠软骨细胞基质金属蛋白酶-13 (MMP-13) 表达上调,Col II 表达减少,GSDMD 荧光表达增强,培养上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平增加,关节软骨细胞肿胀,显微结构破坏。结论 成功建立大鼠软骨细胞焦亡模型。TNF- α (20 ng/ml) 体外可致大鼠软骨细胞肿胀死亡,显微结构破坏,软骨基质降解,焦亡信号活化。

关键词 TNF- α ; 骨关节炎; 软骨细胞; 焦亡

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0781-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.020

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨退变和关节腔炎症为主要病理变化的慢性关节退变疾病^[1]。软骨细胞作为软骨组织中唯一的细胞类型,其功能的改变在 OA 中发挥着不可替代的关键作用^[2]。细胞焦亡又称细胞炎性坏死,是一种由 gasdermin 蛋白介导的细胞程序性坏死^[3],表现为细

胞不断胀大直至细胞膜破裂,导致细胞内容物释放进而激活强烈的炎症反应。最近研究认为,细胞焦亡与 OA 病理进展密切相关,如焦亡在滑膜变化中起关键作用^[4],与 OA 疼痛的病理机制相关^[5],并且会加剧软骨的退化^[6]。已有关于细胞焦亡方面的研究多集中于 OA 滑膜细胞、巨噬细胞,软骨细胞的相关研究较少。

基于细胞焦亡在 OA 发生发展过程中的作用,探索建立软骨细胞焦亡的细胞模型,对进一步阐明 OA 的病理机制,评价和筛选 OA 治疗药物具有重要意义。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是参与 OA 的重要促炎性细胞因子,可驱动炎症级联反应、诱导大量炎症和分解代谢因子产生^[7]。该研究拟采用两步酶消化法收集大鼠软骨细胞进行体外培养,以不同质量浓度 TNF- α 诱导,模拟 OA 微环境,筛选出稳定的软骨细胞焦亡体外模型,为进一步阐明 OA 发生机制、筛选治疗 OA 的药物并评价其疗效及作用机制提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量约 120 g,安徽省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(皖)2017-001。本实验已通过安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理审查委员会批准(编号:PZ-2020-044)。

1.2 主要试剂 II型胶原酶购自美国 Sigma 公司;大鼠 IL-1 β 、IL-18 酶联免疫试剂盒购自上海酶联公司;TNF- α 购自美国 Peprotech 公司;抗磷酸化核转录因子- κ B p65 (Phospho-NF- κ B p65, P-p65) 抗体及抗 p65 抗体为美国 CST 公司产品;抗半胱天冬酶 1 (caspase-1) 抗体及抗 gasdermin D (GSDMD) 抗体为美国 Proteintech 公司产品;抗核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor containing protein 3, NLRP3) 抗体及抗 β -actin 抗体为美国 Affinity 公司产品;抗基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 抗体及抗 II 型胶原 (type II collagen, Col II) 抗体为美国 Novus 公司产品。

2022-03-20 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究重大项目(编号:KJ2020ZD15)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省工程技术研究中心,合肥 230032

作者简介:徐 靛,女,硕士研究生;

魏 伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

严尚学,男,博士,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: yan-shx@163.com

1.3 主要仪器 全波长多功能酶标仪(型号: Infinite M1000 Pro, 瑞士 Tecan 公司); 荧光及化学发光成像系统(型号: ImageQuant LAS 4000, 美国 GE 公司); 激光共聚焦显微镜(型号: TCS SP8)、倒置 LED 显微镜(型号: DMi1)(德国徕卡公司); 场发射扫描电子显微镜(型号: GeminiSEM 300, 德国蔡司公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞的分离、培养 使用手术刀片缓慢刮取大鼠膝关节软骨, 无菌眼科剪将关节软骨剪碎至体积为 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 加入 0.25% 胰蛋白酶置于 37 °C 摇箱消化 40 min, 用含血清的培养基终止胰酶消化后, 加入 0.2% II 型胶原酶于 37 °C 摇箱内继续消化 2 h, 结束后将消化液吹散混匀, 离心后 PBS 重悬, 再离心, 加入完全培养基分散细胞后转移到普通培养瓶中培养, 48 h 后首次换液。待细胞长满后进行传代处理, 三代以内原代软骨细胞用于后续实验。

1.4.2 软骨细胞鉴定 以甲苯胺蓝染色与 Col II 免疫组织化学染色进行软骨细胞鉴定。采用爬片技术, 细胞贴壁后取出盖玻片, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 3% 过氧化氢室温下孵育 10 min, 5% BSA 封闭 10 min, 滴加 Col II 一抗, 4 °C 过夜。复温后滴加生物素标记的二抗, 室温下孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察并拍照记录。对于甲苯胺蓝染色, 固定后用甲苯胺蓝染色 5 min, 梯度乙醇脱水后常温干燥, 中性树胶封片。

1.4.3 CCK-8 法检测软骨细胞的活力 制备细胞悬液, 96 孔板每孔加入 5 000 个细胞, 过夜, 细胞充分贴壁, 给予 TNF- α (0、5、10、20、40 ng/ml) 不同浓度刺激, 其中 TNF- α (0 ng/ml) 为对照组。48 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8, 避光孵育 1.5 h, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度 A 值。细胞活力 (%) = $[(A_{\text{刺激组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.4.4 Western blot 检测软骨细胞焦亡信号蛋白、

MMP-13 及 Col II 的表达 收集 TNF- α (0、5、10、20、40 ng/ml) 不同浓度刺激后的细胞, 提取细胞总蛋白, 电泳, 转膜, 封闭, 分别加入 P-p65、p65、NLRP3、caspase-1、GSDMD、MMP-13、Col II、 β -actin 等一抗孵育过夜, 加二抗 37 °C 孵育 2 h, 洗膜显影。ImageJ 软件分析灰度值并进行统计分析。

1.4.5 ELISA 检测软骨细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-18 的水平 收集 TNF- α (20 ng/ml) 刺激组和对照组的细胞培养上清液, ELISA 法测定 IL-1 β 、IL-18 的浓度。

1.4.6 免疫荧光检测软骨细胞 GSDMD 表达 将软骨细胞以 TNF- α (20 ng/ml) 处理 48 h 后, 采用爬片技术以 4% 多聚甲醛固定 20 min, 用 5% BSA 封闭 1 h, 加入抗 GSDMD 抗体 4 °C 孵育过夜, 加入二抗室温孵育 1.5 h, 以 DAPI 染核 10 min, 用抗荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦显微镜拍照。

1.4.7 扫描电镜观测软骨细胞的形态学改变 将软骨细胞以 TNF- α (20 ng/ml) 处理 48 h 后, 采用爬片技术以 2.5% 戊二醛固定, 乙醇梯度脱水、临界点干燥、镀膜、扫描电镜观察细胞形态。

1.5 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞形态学观察 经过两步酶消化法分离得到的原代软骨细胞为球形, 呈悬浮状态, 大小均一, 具有较强的折光性。贴壁后的软骨细胞大部分呈圆形、椭圆形或短梭形, 培养 4 d 后, 软骨细胞呈不规则的卵圆形或多角形, 可见成簇现象。细胞基本爬满瓶底后, 此时软骨细胞多为圆形, 胞体丰满, 胞质均匀, 核大而圆并且互相连接成“铺路石”样结构。传代后细胞贴壁时间较原代细胞缩短, 增殖速度加快(图 1)。

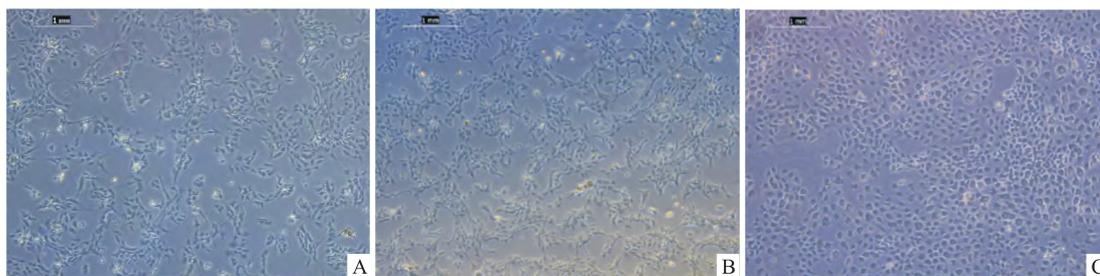


图 1 不同培养时间的大鼠软骨细胞形态 $\times 50$

A: 培养 4 d; B: 培养 10 d; C: 培养 15 d

2.2 软骨细胞鉴定 3代内的阳性软骨细胞甲苯胺蓝染色可见细胞内有蓝紫色异染颗粒,Col II 免疫组织化学染色可见胞浆呈棕黄色。分离培养后二者均为阳性的软骨细胞比例约为 98%。见图 2。

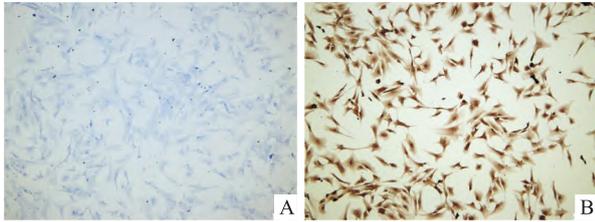


图 2 大鼠软骨细胞鉴定 ×100
A: 甲苯胺蓝染色;B: Col II 染色

2.3 不同浓度 TNF-α 对细胞活力的影响 以不同浓度 TNF-α 处理软骨细胞 48 h,CCK-8 检测结果显示(图 3),随着 TNF-α 浓度增加,软骨细胞活力逐渐下降。与对照组比较,TNF-α(20,40 ng/ml)可抑制软骨细胞活力($F=4.474, P<0.05$)。

2.4 不同浓度 TNF-α 对软骨细胞焦亡信号蛋白的影响 图 4 结果显示,TNF-α(5,10,20,40 ng/ml)均可促进软骨细胞 P-p65、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的蛋白表达,且随着浓度增加,蛋白表达水平逐渐升高。TNF-α(5 ng/ml)组 P-p65、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的蛋白表达与对照组比较差异均无统计学意义。TNF-α(10 ng/ml)组 P-p65、NLRP3 的蛋白表达与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。而 TNF-α(20 ng/ml)和 TNF-α(40 ng/ml)处理的焦亡信号蛋白表达均存在显著性差异($P<0.05$ 或 0.01)。结合 CCK-8 结果,选择 TNF-α 浓度为 20 ng/ml 进行后续实验。

2.5 TNF-α 对软骨细胞 MMP-13 和 Col II 表达的

影响 为进一步了解 TNF-α 对软骨细胞胶原代谢的影响,实验检测了 TNF-α(20 ng/ml)刺激软骨细胞后 MMP-13 和 Col II 的表达水平。图 5 结果显示,TNF-α(20 ng/ml)可提高软骨细胞 MMP-13 水平($t=4.337, P<0.05$),降低 Col II 的表达($t=4.287, P<0.05$)。结果提示 TNF-α(20 ng/ml)破坏了软骨细胞内的基质平衡。

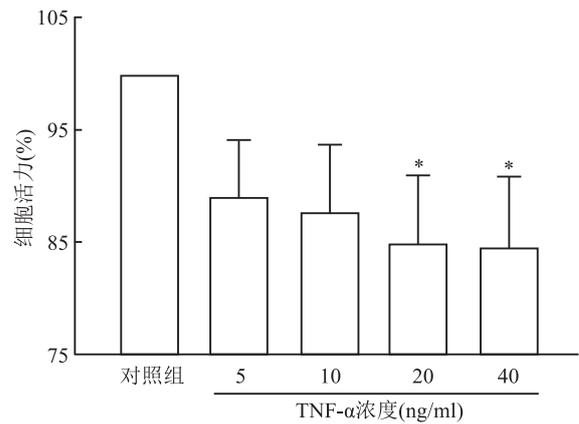


图 3 不同浓度 TNF-α 对细胞活力的影响($n=3$)
与对照组比较: * $P<0.05$

2.6 TNF-α 对软骨细胞培养上清液中 IL-1β、IL-18 水平的影响 ELISA 结果显示,与对照组细胞培养上清液中的 IL-1β、IL-18 水平相比,TNF-α(20 ng/ml)刺激可上调关节软骨细胞培养上清液中促炎细胞因子 IL-1β [(10.210 ± 0.512) vs (24.680 ± 0.449) , $t=21.230, P<0.001$] 和 IL-18 水平 [(40.000 ± 3.408) vs (96.360 ± 5.598) , $t=8.599, P<0.01$]。结果提示 TNF-α(20 ng/ml)可促进软骨细胞内炎症因子 IL-1β、IL-18 的释放。

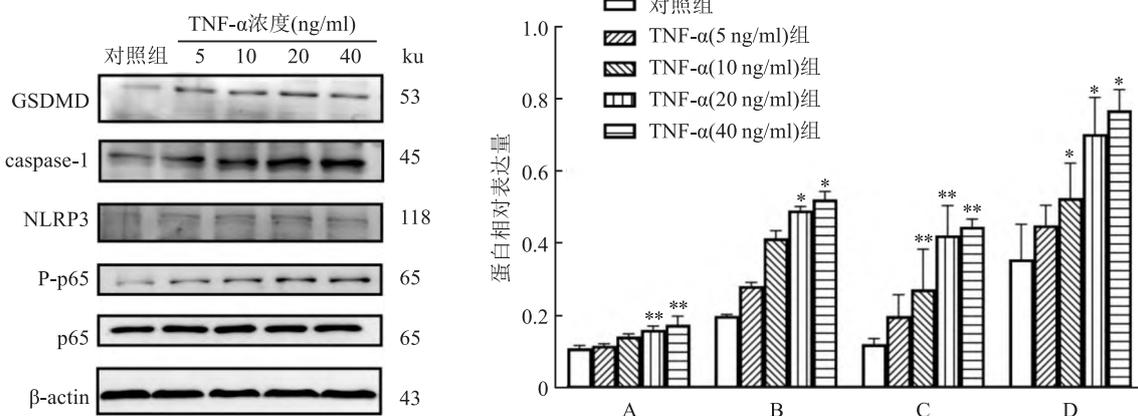


图 4 TNF-α 对软骨细胞焦亡信号蛋白的影响($n=3$)

A: GSDMD/β-actin; B: caspase-1/β-actin; C: NLRP3/β-actin; D: P-p65/p65; 与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

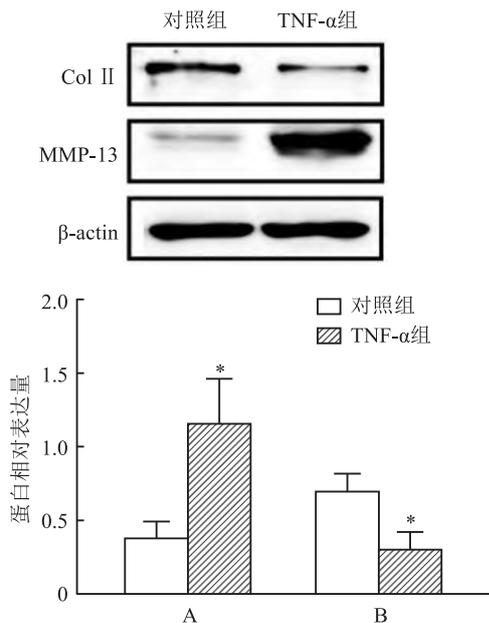


图5 TNF-α对软骨细胞MMP-13和Col II表达的影响(n=3)
A: MMP-13/β-actin; B: Col II/β-actin; 与对照组比较: * P < 0.05

2.7 TNF-α对软骨细胞GSDMD表达的影响

GSDMD定位于细胞质中,炎症环境下细胞膜上亦有表达。与对照组软骨细胞相比,TNF-α(20 ng/ml)刺激后的关节软骨细胞GSDMD荧光表达增强。见图6。

2.8 TNF-α对软骨细胞焦亡形态学的影响 扫描电镜结果(图7)显示,对照组软骨细胞结构完整,

TNF-α(20 ng/ml)刺激后关节软骨细胞肿胀变形,细胞膜穿孔并破裂,显微结构破坏。结果提示TNF-α(20 ng/ml)可诱导软骨细胞发生焦亡形态学变化。

3 讨论

在经典的焦亡信号中,危险信号可刺激细胞膜上的模式识别受体并与之结合,形成由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白和效应分子caspase-1组成的NLRP3炎症小体^[8],这些炎症小体激活caspase-1后进一步切割GSDMD产生膜孔,导致细胞肿胀并最终溶解,释放大量的促炎细胞因子,如IL-1β、IL-18等,这些致炎性细胞因子又进一步促进了焦亡的发生^[9]。近年来研究^[6]表明,OA患者的NLRP1和NLRP3表达水平显著升高;在OA患者的软骨中,未及时被吞噬的凋亡小体,可连同软骨钙化的增加通过继发性细胞焦亡加重OA^[10],这些研究提示细胞焦亡与OA的发生、发展过程密切相关。

在本研究中,采用两步酶消化法提取的大鼠软骨细胞,细胞形态特征明显,甲苯胺蓝和Col II染色为阳性,且纯度达到98%以上,提示软骨细胞提取分离成功。TNF-α(20 ng/ml)可抑制大鼠软骨细胞活力,致细胞穿孔破裂、显微结构破坏,其焦亡特征性信号分子P-p65、NLRP3、caspase-1和GSDMD表达水平上升,且培养上清液中IL-1β、IL-18水平升

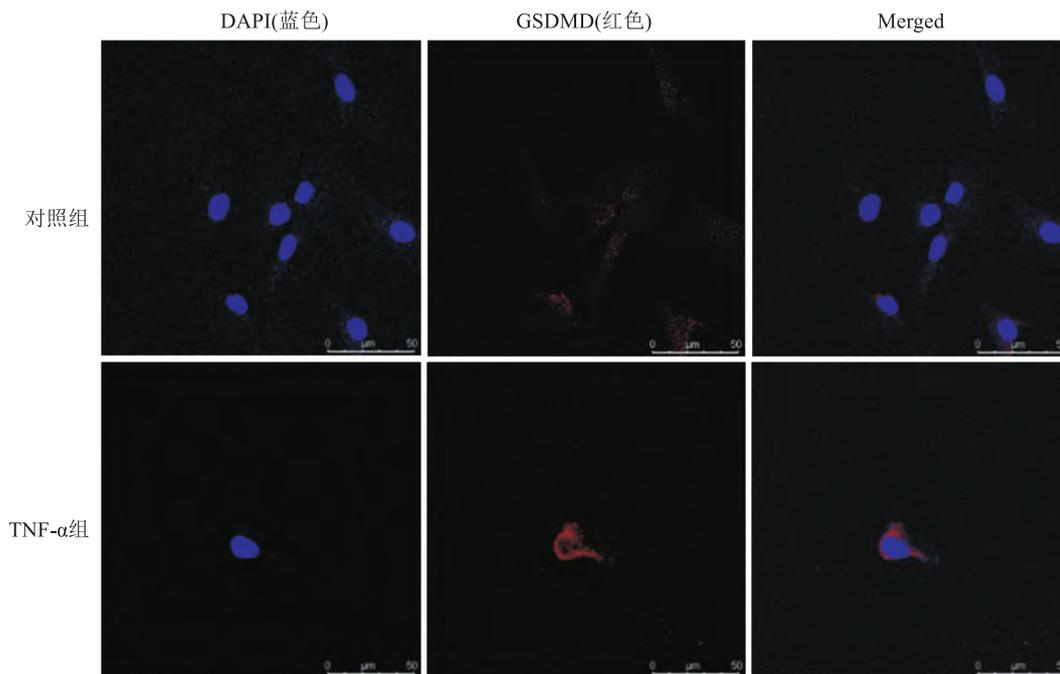


图6 TNF-α刺激对软骨细胞GSDMD表达的影响 ×630

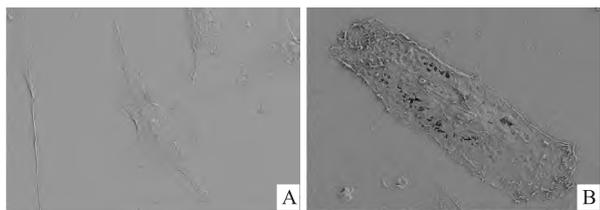


图7 扫描电镜下软骨细胞的形态变化 ×1 000
A:对照组;B:TNF- α 组

高。这些结果表明,TNF- α (20 ng/ml)可以成功诱导大鼠软骨细胞焦亡模型。细胞外基质丢失被认为是OA软骨损伤的主要原因之一^[11-12]。在基质组成中,Col II与其它胶原蛋白及非胶原蛋白结合,形成稳定的网状结构,为软骨提供拉伸强度^[13]。在炎症过程中,NF- κ B途径的激活抑制了软骨细胞合成代谢,并诱导基质金属蛋白酶的表达^[2]。TNF- α (20 ng/ml)通过激活NF- κ B信号促进大鼠软骨细胞MMP-13表达升高,诱导Col II降解,导致了软骨细胞基质破坏。

综上所述,TNF- α (20 ng/ml)可模拟炎症微环境诱导大鼠软骨细胞焦亡发生。该模型可广泛用于研究OA发病机制及体外筛选治疗OA的潜在药物。

参考文献

[1] O'Neill T W, Felson D T. Mechanisms of osteoarthritis (OA) pain[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2018, 16(5):611-6.
[2] Li Z H, Huang Z Y, Zhang H, et al. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF- κ B/NLRP3 crosstalk [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:8868361.

[3] Shi J J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575):660-5.
[4] Bougault C, Gosset M, Houard X, et al. Stress-induced cartilage degradation does not depend on the NLRP3 inflammasome in human osteoarthritis and mouse models [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(12):3972-81.
[5] Mapp P I, Walsh D A. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(7):390-8.
[6] Man S M, Kanneganti T D. Regulation of inflammasome activation [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1):6-21.
[7] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1):33-42.
[8] Swanson K V, Deng M, Ting J P Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8):477-89.
[9] Chen X, He W T, Hu L C, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9):1007-20.
[10] Roach H I, Aigner T, Kouri J B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(3):265-77.
[11] Zu Y, Mu Y, Li Q, et al. Icarin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1):307.
[12] 丁振飞,常俊,黄威,等.抑制软骨细胞线粒体自噬增加MMP-1和MMP-13表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4):600-4.
[13] Fan C C, Zhao X C, Guo X F, et al. P2X4 promotes interleukin-1 β production in osteoarthritis via NLRP1 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1):340-4.

Establishment and evaluation of pyroptosis model of rat chondrocytes induced by TNF- α

Xu Liang, Wu Yujiao, Yuan Xiaoyang, Zhang Feng, Cheng Gang, Zhang Yunfang, Wei Wei, Yan Shangxue
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Engineering Research Center of Anti-inflammatory and Immune Drugs, Hefei 230032)

Abstract Objective To establish and evaluate the pyroptosis model of rat chondrocytes induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Methods** A two-step enzymatic digestion method was used to obtain rat articular chondrocytes, inverted phase contrast microscope was used to observe the morphological structure of chondrocytes. Toluidine blue staining and type II collagen (Col II) staining were used to identify chondrocytes. Different mass concentrations of TNF- α (5, 10, 20, 40 ng/ml) were used to establish the pyroptosis model with TNF- α (0 ng/ml) as the control group. Cell viability was detected by CCK-8 method and proteins of pyroptosis signal were detected by Western blot. The levels of IL-1 β and IL-18 in cultured supernatants were examined by ELISA kits. The expression of gasdermin D (GSDMD) in chondrocytes was detected by immunofluorescence. Scanning electron microscope was used to observe the morphological changes of chondrocyte. **Results** Compared with the control group, the cell

miR-138 调控 TrkA-TRPV1 信号通路对 KOA 模型大鼠软骨损伤的影响

杨 砥,徐远坤

摘要 目的 探究 miR-138 调控 TrkA-TRPV1 信号通路对膝骨性关节炎(KOA)模型大鼠软骨损伤的影响。方法 选取 40 只健康 SD 大鼠,随机分为正常组、模型组、沉默组、过表达组,分别进行干预。对比各组大鼠行为学、软骨组织学评分,检测关节液中炎症因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素(IL)-1、IL-6]及软骨组织中骨代谢标志物[基质金属蛋白酶(MMP-13)、II型胶原(Col II)]、TrkA、TRPV1、miR-138 表达水平,分析 miR-138 对 KOA 大鼠软骨损伤的影响。结果 与正常组相比,模型组、沉默组、过表达组大鼠行为学、软骨组织学评分升高($P < 0.05$);与过表达组相比,模型组、沉默组大鼠行为学、软骨组织学评分升高($P < 0.05$)。与正常组相比,模型组、沉默组、过表达组大鼠 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平及 MMP-13、TrkA、TRPV1 表达升高,Col II、miR-138 表达降低($P < 0.05$);与过表达组相比,模型组、沉默组大鼠 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平及 MMP-13、TrkA、TRPV1 表达升高,Col II、miR-138 表达降低($P < 0.05$)。结论 miR-138 可缓解 KOA 模型大鼠软骨损伤,其机制或与 TrkA-TRPV1 信号通路的抑制相关。

关键词 酪氨酸激酶 A-顺势感受器电位香草受体 1 信号通路;miR-138;膝骨性关节炎;软骨损伤

中图分类号 R 36

2022-02-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860855);贵州卫生健康委科学技术基金(编号:gzwj2020-1-123)

作者单位:贵州中医药大学第一附属医院骨伤科,贵阳 550002

作者简介:杨 砥,男,硕士,副主任医师;

徐远坤,男,硕士,副教授,副主任医师,责任作者,E-mail:xyk_2005@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0786-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.021

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)作为慢性退行性骨关节疾病,多发于中老年群体,以膝关节疼痛及活动障碍为主要表现^[1]。流行病学调查显示,KOA 已成为全球公认的主要致残原因,且近年来 KOA 发病呈年轻化发展趋势,故有效预防 KOA 对人类健康具有重要裨益^[2-3]。目前,KOA 发病机制尚未完全阐明。有学者^[4-5]指出,miR-138 在 KOA 患者关节液中呈低表达,提示其可能参与 KOA 的发生发展,造成软骨损伤,但其具体作用机制尚不明确。基于此,该文建立 KOA 模型,通过 TrkA-TRPV1 信号通路调控 miR-138,探究 miR-138 对 KOA 大鼠软骨损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 选取 40 只健康 SD 大鼠,体重 203~252(227.50 \pm 20.82)g,由科文斯医药研发(上海)有限公司提供,实验动物许可证号:SYXK(沪)2021-0001。实验动物处置严格遵守实验动物管理与保护的有关规定,饲养环境恒温(21.50 \pm 2.00) $^{\circ}$ C,相对湿度 42%~50%左右,自由饮水摄食,12 h/12 h 黑夜光照循环,以维持基础状态。

1.1.2 主要试剂 TrkA 一抗(兔来源,批号:ab76291)、二抗(抗兔,批号:ab150078)购自北京义

viability of rat chondrocytes gradually decreased with the increase of TNF- α concentration and the expression of nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor containing protein 3 (NLRP3), caspase-1, GSDMD and Phospho-NF- κ B p65 (P-p65) proteins increased. Furthermore, TNF- α (20 ng/ml) could up-regulate the expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), the fluorescence expression of GSDMD and the levels of IL-1 β and IL-18 while the expression of Col II was distinctly reduced. What's more, the articular chondrocytes were swollen, and the microstructure was destroyed. **Conclusion** TNF- α (20 ng/ml) can cause the swelling and death of rat chondrocytes, degradation of cartilage matrix and activation of pyroptosis signaling pathway. The pyroptosis model of rat chondrocytes was successfully established.

Key words TNF- α ; osteoarthritis; chondrocyte; pyroptosis