

不同血清浓度对大鼠软骨细胞增殖、形态和基因表达的影响

刘丽芳 薛 艳 郑昱新 曹月龙 丁道芳

摘 要 **目的** 观察不同血清浓度对大鼠软骨细胞体外培养的形态、增殖和基因表达的调控作用。**方法** 取出生 24h SD 大鼠关节处软骨,0.1% 浓度的 II 型胶原酶多次消化后获得软骨细胞。软骨细胞培养于含 5% 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS),10% FBS 和 20% FBS 的 DMEM 低糖培养基中,分别为 5FBS 组,10FBS 组和 20FBS 组。24h 后镜下观察细胞形态变化,CCK8 方法检测 24、48 和 72h 软骨细胞增殖。Western blot 法检测软骨指标 II 型胶原 A1(COL2A1)和 MMP13(matrix metalloproteinases13)表达,定量 PCR 检测软骨特异性基因 Sox9、A - can、ADAMTS5、MMP9 和 MMP3 的表达及代谢相关基因 Nme2 和 PnP 表达。**结果** 5FBS 组的软骨细胞呈由鹅卵石样排列,10FBS 组和 20FBS 组细胞呈现长梭形改变,且血清浓度越大,形态改变越明显。和 5FBS 组比较,10FBS 组和 20FBS 组细胞增殖明显,呈血清浓度依赖性增加。10FBS 组和 20FBS 组的 MMP13 表达显著上调,II 型胶原表达显著下调。PCR 结果表明,和 5FBS 组比较,10FBS 组和 20FBS 组的 A - can 和 Sox9 表达下降,MMP9、MMP3 和 ADAMTS5 表达上调,且基因表达变化和血清浓度改变呈正相关。同时随着血清浓度增加,Nme2 和 PnP 表达显著上调。**结论** 血清浓度的增高促进软骨细胞代谢,引起软骨细胞退变。

关键词 血清浓度 软骨细胞 细胞增殖 形态改变 营养状态

中图分类号 R332

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.013

Influences of Different Nutritional Status in Rat Chondrocytes. Liu Lifang,Xue Yan,Zheng Yuxin,et al. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240,China

Abstract **Objective** To observe the effects of different concentrations of serum on the morphology, proliferation and gene expression in rat chondrocytes in vitro. **Methods** Chondrocytes were isolated from articular cartilages in newly - born (within 24 hours) SD rats, and incubated with 0.1% concentration type II collagenase by several times. The chondrocytes were cultured in a low glucose DMEM containing 5% fetal bovine serum (FBS group), 10% FBS(10FBS group) and 20% FBS(20FBS group) to simulate the different nutritional status of chondrocytes in vitro, and were defined as 5FBS group, and 20FBS group. The morphological changes were observed under the microscope after 24 hours culturing, The proliferation of chondrocytes was detected by CCK8 method after chondrocytes were treated with different concentrations of serum for 24 hours, 48 hours and 72 hours. The expressions of collagen II type A1 (COL2A1) and Matrix metalloproteinase 13 (MMP13) were analyzed by Western blot. The expression of Sox9, A - can, ADAMTS5, MMP9, MMP3 and metabolic genes (NME2,PnP) were assessed by quantitative PCR. **Results** The chondrocytes in 5FBS group exhibited the cobblestone arrangement, while the chondrocytes in 10FBS group and 20FBS group showed the change of the spindle, and higher the concentration of serum was, the more obvious the morphological changes were. Compared with 5FBS group, the chondrocytes' proliferation in 10FBS group and 20FBS group were obvious, which was dependent on the serum concentration. The expressions of MMP13 in 10 FBS group and 20FBS group significantly increased, while the expressions of COL2A1 significantly decreased. Compared with 5FBS group, the expression of A - can and Sox9 in 10FBS group and 20FBS group decreased, while MMP9, MMP3 and ADAMTS5 expression were up - regulated, moreover the changes of gene expressions and the concentrations of serum were positively correlated. With the increase of serum concentration, the expressions of Nme2 and PnP were also significantly increased. **Conclusion** The increased serum concentration promotes chondrocyte metabolism and causes chondrocyte degeneration.

Key words Serum concentration;Chondrocytes;Cell proliferation;Morphological change;Nutritional status

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81073114, 81072830)

作者单位:200240 上海交通大学(刘丽芳);201203 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心(薛艳、郑昱新、曹月龙、丁道芳);201203 上海市中医药研究院骨伤科研究所(薛艳、郑昱新、曹月龙、丁道芳)

通讯作者:丁道芳,副研究员,电子信箱:d.wilhel@qq.com

关节炎在我国的总发生率约为 13%,其中以骨关节炎(osteoarthritis, OA)为最常见,发生随年龄增加而上升。骨关节炎是一种多因素引起的关节退行性改变的疾病。目前该疾病影响着数百万人,其治疗仍然是一个未解决的问题。其病理特点包括关节软骨变性破坏、软骨下骨硬化或囊性变、关节边缘骨质增生、滑膜增生、关节囊挛缩、韧带松弛或挛缩、肌肉萎缩无力等。据最新数据统计,在 60 岁以上的人群中, X 线检查有表现的骨关节炎女性发生率约 42.8%,男性约 21.5%,有症状的骨关节炎的女性发生率约为 15%,男性约 5.6%。且中国骨关节炎的现患率高于欧美国家^[1-4]。

目前主要分为 3 类:衰老相关的骨关节炎,损伤导致的骨关节炎和代谢综合征相关的骨关节炎。其中代谢综合征引起的骨关节炎最常见。代谢异常造成高营养状态如肥胖,既往的研究认为肥胖产生的过度的机械负荷超出关节承载能力,这是导致软骨损伤及骨关节炎的发生的主要原因,近年来肥胖的人群在整个世界范围迅速增加,由肥胖引起的 OA 严重威胁发展中国家的人群的健康^[5-7]。

为模拟软骨细胞在体外的营养状态,本课题设计了用 3 种不同浓度的血清来培养软骨细胞。分组培养大鼠软骨细胞后,观察软骨细胞形态增殖及软骨细胞退变的相关基因,代谢基因的改变。

材料与方法

1. 动物:新生 SD 大鼠 8 只购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物合格证号:SCXK(沪 2013-0016)。

2. 药物与试剂:DMEM 低糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗、磷酸盐缓冲液片剂均购自于 Biowest 公司;Ⅱ型胶原酶(美国 Sigma 公司);GAPDH(美国 CST 公司)、COL2A1(美国 Santacruz 公司),MMP13(美国 Santacruz 公司);RIPA 裂解液(中国碧云天公司)、PMSF(中国碧云天公司)、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司产品);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);AMV 反转录酶(日本 TaKaRa 公司);PCR 试剂 SYBR[®] Premix Ex TaqTM(日本 TaKaRa 公司);CCK8(日本 Dojindo 公司),羊抗鼠和羊抗兔的二抗(美国 CST 公司)。

3. 软骨细胞培养和形态学观察:采用本研究所已经成熟的软骨细胞培养方法,将 8 只新生 24h SD 大鼠 75% 乙醇浸泡 5min 麻醉处死,取出四肢关节处软骨,0.1% 的Ⅱ型胶原酶消化 1h,重复 3~4 次,收集

消化的细胞悬液,1000r/min,离心 10min 取细胞沉淀,培养于含 5% FBS(5FBS 组)、10% FBS(10FBS 组)和 20% FBS(20FBS 组)的低糖 DMEM 培养基中。为保证实验结果的可靠,本文中所有实验的血清均来自同一批次。

4. CCK8 法检测细胞增殖情况:将细胞用胰酶消化后,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板。分别培养于含 5% FBS(5FBS 组)、10% FBS(10FBS 组)和 20% FBS(20FBS 组)的低糖 DMEM 培养基中,培养 24、48 及 72h 后,每孔加入 CCK8 试剂 10 μ l,培养箱中 0.5h 后,室温轻微振荡混匀,酶标仪 450nm 波长下测定各孔 A 值。

5. Western blot 法检测蛋白表达:采用 Western blot 法检测各组蛋白的表达情况。首先收集蛋白样品,原代细胞培养于含 24h 后裂解细胞和蛋白浓度测定,蛋白变性后备用。蛋白样品电泳和转膜,10% BSA 室温封闭 1h;一抗 1:1000 稀释于封闭液中,4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 4 次,每次 10min;二抗室温孵育 1h,二抗用 TBST 1:20000 稀释,TBST 洗膜 4 次,每次 10min;化学发光法检测,X 线胶片曝光显影。

6. Real-time PCR 检测基因表达:原代软骨细胞经不同浓度(5% FBS、10% FBS 和 20% FBS)的胎牛血清培养 24h,抽提总 RNA 及浓度测定,取 2 μ g RNA 反转录。按照说明书进行 Real-time PCR 检测,以 GAPDH 作为内参基因(表 1)。

表 1 基因引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
A - can	上游引物:GCAGGGATAACGGACTGAAG
	下游引物:GAGTAAAGTGTCATAGTTCAGCTTG
MMP3	上游引物:TCGGTGCTTCAGTACCTTT
	下游引物:CTCGAGAATGTGAGTGGGGT
ADAMTS5	上游引物:AGCCATCCTGTTACACAGAG
	下游引物:CATTCCCAGGGTGTACAT
MMP9	上游引物:GGTCAGGTTTACAGCCACGA
	下游引物:GGTCAGGTTTACAGCCACGA
Sox9	上游引物:ATCTTCAAGCGCTGCAA
	下游引物:CGGTGGACCCTGAGATTG
Nme2	上游引物:CAAGCGATTTCAGCAGAAG
	下游引物:TGCTTCAGGTGTTCTCAGA
PnP	上游引物:TAGGAGGGCTGACCGCTAA
	下游引物:GCCATTGAGGAATCCAAACA
GAPDH	上游引物:TTCAACGGCACAGTCAAGG
	下游引物:CTCAGCACCAGCATCACC

7. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析,所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组

间差异采用单因素方差分析中 $LSD - t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 软骨细胞形态观察:大鼠软骨在含不同浓度 FBS 的低糖 DMEM 培养基中培养 24h 后,5FBS 组软

骨细胞大多数呈多角形等形态,排列成铺路石状;10FBS 组和 20FBS 组软骨细胞部分向成纤维样细胞转变,且细胞形态逐渐细长,呈成纤维细胞样改变,20FBS 组的软骨细胞成纤维样改变比 10FBS 组更为明显(图 1)。

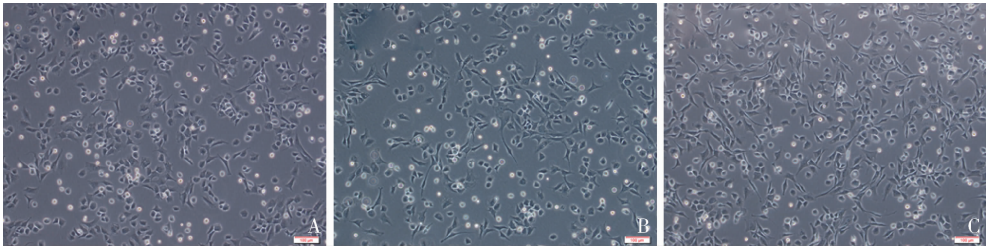


图 1 倒置显微镜下各组细胞形态观察(×100)
A. 5FBS; B. 10FBS; C. 20FBS

2. 软骨细胞增殖检测:软骨细胞传代后,分别培养于含 5% FBS (5FBS 组)、10% FBS (10FBS 组) 和 20% FBS (20FBS 组) 的低糖 DMEM 培养基中。CCK8 法分别连续观察 3 组细胞在 24、48 和 72h 增殖情况(图 2)。3 个不同时间点,测得 20FBS 组、10FBS 组吸光度值与 5FBS 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且 20FBS 组与 10FBS 组均高于 5FBS 组。在 48 和 72h 两个时间点,20FBS 组的吸光度值明显高于 10FBS 组($P < 0.05$)。

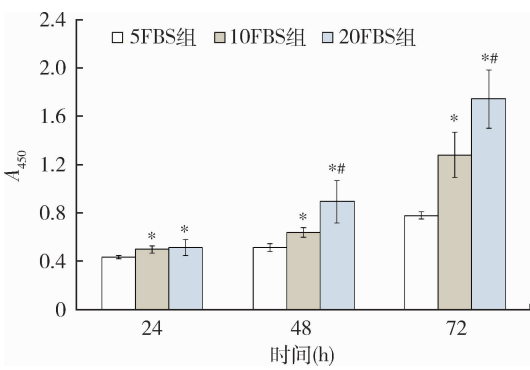


图 2 3 个时间点不同浓度血清中软骨细胞增殖的比较
与 5FBS 组比较,* $P < 0.05$;与 10FBS 组比较,# $P < 0.05$

3. COL2A1 和 MMP13 蛋白表达:软骨细胞培养于含 5% FBS、10% FBS 和 20% FBS 的低糖 DMEM 培养基中 24h。提取总蛋白,检测 COL2A1 和 MMP13 的表达,随着血清浓度增加,MMP13 表达也增加,两者呈正相关(图 3A 和 B);COL2A1 表达和血清浓度的改变呈负相关。COL2A1 的表达量下降,见图 3C。

经过软件灰度值分析,MMP13 和 COL2A1 各组之间的差异均有统计学意义($P < 0.05$),分别见图 3B 和图 3D。

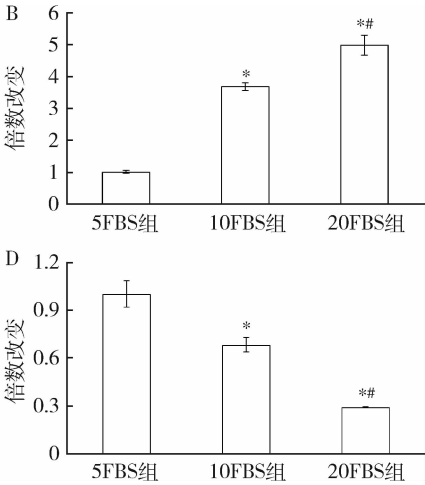
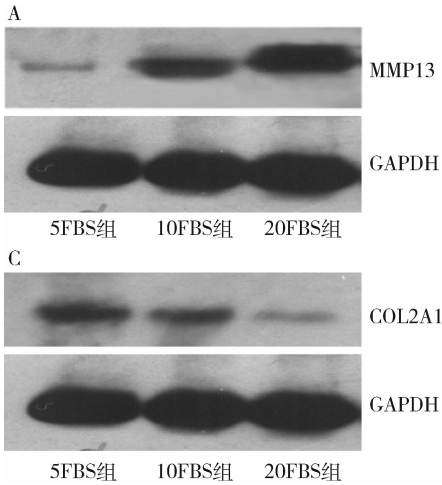


图 3 不同浓度血清中软骨细胞的 COL2A1 和 MMP13 蛋白表达量的影响
与 5FBS 组比较,* $P < 0.05$;与 10FBS 组比较,# $P < 0.05$

4. 基因 mRNA 水平检测:软骨细胞传代 24h 后,分别培养于含 5% FBS (5FBS 组)、10% FBS (10FBS 组) 和 20% FBS (20FBS 组) 的低糖 DMEM 培养基中 24h。提取总 RNA,定量 PCR 检测 ADAMTS5、MMP3、MMP9、A - can、Sox9、PnP 及 Nme2 的 mRNA 表达。ADAMTS5、MMP3、MMP9、PnP 和 Nme2 的表达随着血

清浓度的增加而显著增加,A - can 和 Sox9 基因表达随血清浓度增加而下降,各组之间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4)。基质蛋白酶 (ADAMTS5、MMP3、MMP9) 和代谢相关基因的表达和血清浓度的改变呈正相关,A - can 和 Sox9 表达和血清浓度改变呈负相关。

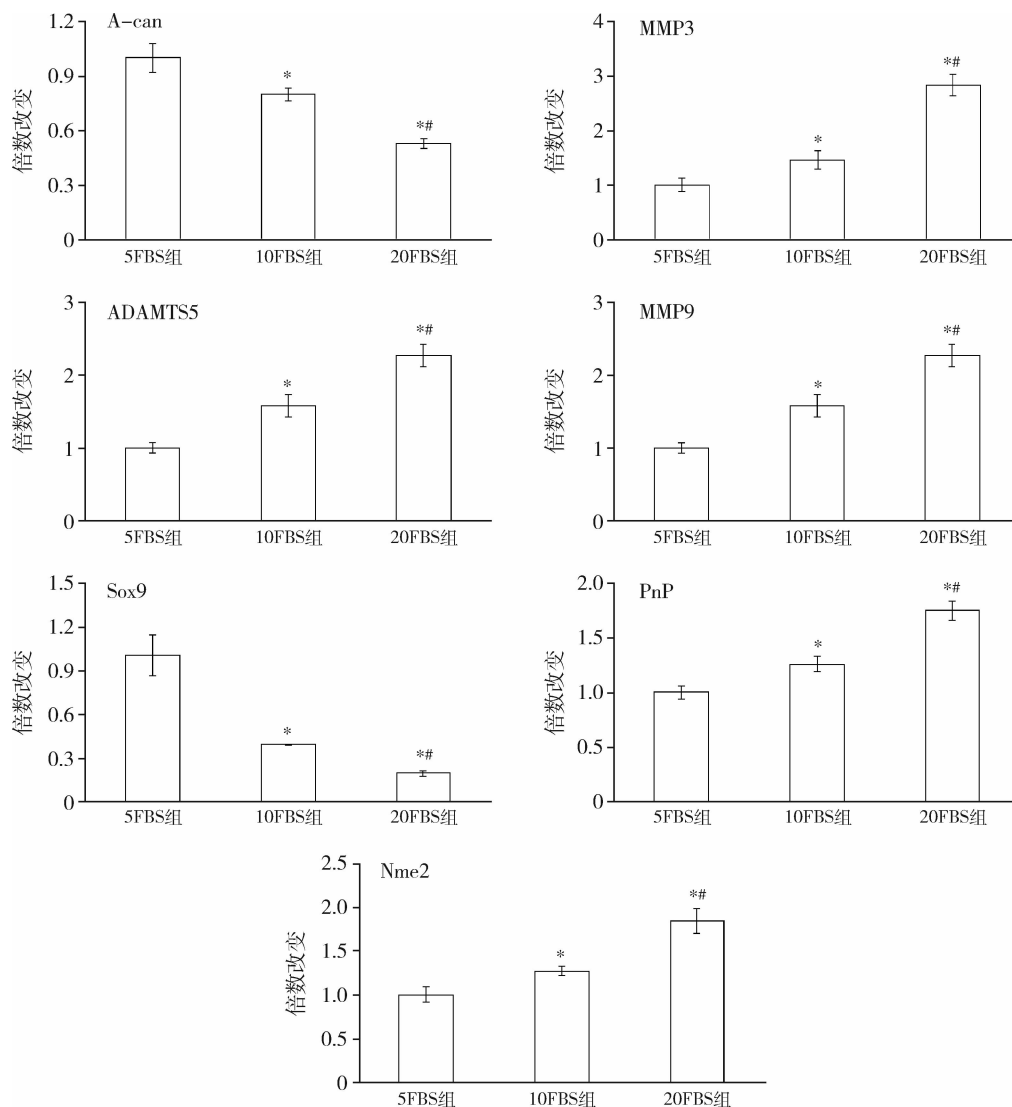


图 4 不同浓度血清中软骨细胞相关基因的 mRNA 表达比较

与 5FBS 组比较,* $P < 0.05$;与 10FBS 组比较,# $P < 0.05$

讨 论

最近的研究提出 OA 是由代谢异常引起的系统性炎症性疾病,高营养状态(常见于肥胖患者)将容易造成代谢性炎症的发生。本次研究采用 3 种不同浓度的血清培养软骨细胞,模拟软骨细胞在体外的不同营养状态,观察软骨细胞形态,增殖及软骨细胞退变和代谢相关基因的改变^[8-10]。

软骨细胞形态的改变及代谢增加都是早期骨关节炎重要的生理指标之一。本次研究通过收集 P1 代软骨细胞,在其培养皿中加入不同血清浓度的 DMEM 培养基使软骨细胞处于不同的营养状态中,建立软骨高营养模型。不同血清浓度培养 24h 后,形态学上有明显的改变,即软骨细胞在越高的营养状态下越难以维持自身原本多角形的正常形态,呈纤维细胞样形

态,且生长速度加快,增殖行为越为明显,且形态的改变和增殖均具有浓度依赖性。这一结果表明高营养状态会刺激软骨细胞形态改变及增殖加快,加速软骨细胞的代谢^[11,12]。

正常的软骨结构是由细胞外基质如Ⅱ型胶原和可聚蛋白聚糖(aggrecan 为主)组成。为维持软骨结构完整,基质成分通过基质降解酶如 MMP13 和 ADAMTS5 等不断进行更新和重塑,基质的降解和合成基质同时进行,从而维持软骨结构的完整。当软骨组织中这种合成和降解失衡时,软骨细胞将发生老化、退变和炎症。血清浓度对软骨细胞的影响不仅存在于细胞形态和增殖,同时基因表达也存在显著差异^[13,14]。

COL2A1 的缺失或者变异,通常能造成非常严重的软骨退化甚至衍生出骨骼异常的疾病。MMP13 是降解软骨基质 COL2A1 主要的蛋白酶。通过蛋白定量分析 COL2A1 和 MMP13 的表达,发现大鼠软骨细胞 COL2A1 基因的表达随血清浓度的增高而呈现逐渐下调趋势,而 MMP13 的表达则呈逐渐上调趋势。可见高营养状态可能通过提高 MMP13 的表达来促进软骨细胞的退变^[15,16]。

软骨细胞的退变还常伴随着其他基质降解酶的表达增加如 ADAMTS5 和 MMP3,同时蛋白多聚糖的降解(A-can)。Sox9 是软骨细胞中重要的转录因子,对软骨细胞表型的维持及正向调控Ⅱ型胶原基因的表达发挥重要作用。在笔者的研究中发现,高营养状态下,软骨细胞的标志基因 A-can 和 Sox9 都呈现逐渐下调趋势,而降解软骨基质的调控基因 ADAMTS5、MMP9 和 MMP3 都呈逐渐上调趋势^[17~20]。

进一步研究代谢途径中重要的标志基因 Nme2 和 PNP 在不同的营养状态下的表达量差异,发现随着血清浓度的增高,大鼠软骨细胞的代谢基因表达均逐步上升。这些基因的改变与形态及增殖变化相一致,再次证明了高营养状态会破坏软骨细胞,表明了不同的营养状态对软骨细胞代谢水平具有重大影响,可能在早期骨关节炎病程中起着重要作用。

综上所述,本项研究在体外建立软骨细胞不同的营养状态的模型,观察了细胞增殖、形态、软骨细胞基质及调控基因,及代谢等基因的表达,验证了营养过剩的状态下易诱发软骨退变,而软骨退变是骨关节炎的发生的前期阶段,表明高营养状态与骨关节炎的发生存在相关性,从而警示公众营养过剩问题对于骨关

节病程的危害性,也为骨关节炎的预防和治疗,提供了新的思路和方向^[21,22]。关于血清中何种成分或者哪些成分对软骨细胞的增殖,形态和基因表达产生变化,目前还没有相关的报道,这也是我们接下来的研究所面临和解决的问题,这些成分很可能成为骨关节炎治疗的突破点。

参考文献

- Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, *et al.* Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(9):2065-2071
- NeffaM, Holzinger D, BerenbaumF, *et al.* The danger from within: alarmins in arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(11):669-683
- 丁呈彪,周云. 膝骨性关节炎患者滑膜炎的发病机制及研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(51):8327-8332
- 吕庆列,勾禹,田发明,等. 蛋白酶激活受体 2 在骨关节炎发病机制中的研究进展[J/OL]. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(12):1-7
- Gierman LM, van der Ham F, Koudijs A, *et al.* Metabolic stress - induced inflammation plays a major role in the development of osteoarthritis in mice[J]. *Arthr Rheum*, 2012, 64(4):1172-1181
- Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity - induced osteoarthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54(4):588-600
- 李盛华,周明旺,陈娴,等. 代谢性骨性关节炎分子机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(2):233-237
- Zhuo Q, Yang W, Chen J, *et al.* Metabolic syndrome meets osteoarthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(12):729-737
- Wang X, Hunter D, Xu J, Ding C, *et al.* Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2015, 23(1):22-30
- 黄淑婷. 膝骨关节炎患者关节结构改变与脂肪细胞因子及肥胖的相关性研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2014
- Collins KH, Reimer RA, Seerattan RA, *et al.* Using diet - induced obesity to understand a metabolic subtype of osteoarthritis in rats[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2015, 23(6):957-965
- 张磊,曾炎,扶世杰,等. C518 大鼠膝关节正常和退变软骨细胞形态特征观察[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2015, 9(24):4606-4610
- 钱晓伟,潘丹岷,谭湘陵,等. 中药血清对大鼠 bMSCs 体外成软骨分化中 COL2A1 和 Acan 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(2):340-343
- 季卫锋,童培建,袁小凤,等. 补肾法与活血法对 SD 大鼠膝骨性关节炎滑膜 IL-1 β 、TNF- α 及软骨 MMP-13、ADAMTS-5 的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2012, 20(2):1-5
- Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, *et al.* Role of interleukin - 1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. *Arthr Rheum*, 2005, 52(1):128-135

泌,加强炎症反应,随后抑制其持续存在的炎症反应,使其顺利进入增生阶段。

回阳生肌法拆方研究发现活血通络方与益气温阳方均可促进免疫抑制小鼠疮面愈合,其机制可能是通过促进巨噬细胞表型转化,促使疮面修复由炎症期过渡到增殖期,这与笔者的实验结果相一致,提示疡愈涂剂可能促进巨噬细胞表型转化,今后还需深入研究^[4]。

综上所述,疡愈涂剂能促进免疫抑制小鼠皮肤伤口愈合,其机制可能是早期促进创面局部炎症因子分泌,加剧炎症反应来启动创面的修复,随后下调炎症因子,促进成纤维细胞增殖和血管生成从而促进肉芽组织形成。

参考文献

- 1 Powers JG, Higham C, Broussard K, *et al.* Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management[J]. J Am Acad Dermatol, 2016,74(4):607-626
- 2 贾连城,吕培文. 吕培文应用回阳生肌法治疗慢性难愈性皮肤溃疡经验总结[J]. 中国医药导报, 2015,12(28):85-88
- 3 朱艳萍. 吕培文治疗下肢慢性溃疡经验总结[J]. 北京中医药, 2014,33(9):660-662
- 4 蒙玉娇,何秀娟,林燕,等. 回阳生肌膏拆方对慢性皮肤溃疡模型小鼠疮面愈合及疮面巨噬细胞表型转化的影响[J]. 中医杂志, 2017,58(3):244-249
- 5 盛巡,李光善,李萍,等. 疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面 I、Ⅲ胶原合成及 MMPs、TIMP-1 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005,21(8):1508-1513
- 6 李萍,李光善,韩秋萍,等. 疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面 PCNA 表达及成纤维细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006,12(3):44-47
- 7 何秀娟,吕喆,龙军,等. 疡愈涂剂对人白细胞与血管内皮细胞

- 黏附影响的分子机制[J]. 首都医科大学学报, 2010,31(6):752-755
- 8 Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, *et al.* One systemic administration of transforming growth factor- β 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing[J]. J Clin Invest, 1993,92(6):2841-2849
- 9 Beer H D, Fassler R, Werner S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair[J]. Vitam Horm, 2000,59:217-239
- 10 李萍,刘欣,梁代英,等. 肉桂提取物及桂皮醛对人体表微循环及局部温度相关变化的影响[J]. 中国中药杂志, 2006,31(3):262-264
- 11 姜涛,王剑. 桂皮醛对 LPS 诱导的 Raw264.7 巨噬细胞迁移和 M1 极化的抑制作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016,27(3):361-365
- 12 李光善,李萍,盛巡,等. 黄芪多糖、桂皮醛、川芎嗪对实验性糖尿病大鼠创面成纤维细胞增殖作用的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004,10(4):20-22
- 13 何秀娟,李萍,邱全瑛,等. 麝香酮抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其表面 ICAM-1、VCAM-1 和 CD44 表达[J]. 中国免疫学杂志, 2006,22(2):148-150
- 14 何秀娟,林燕,蒙玉娇,等. 桂皮醛抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其分子机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017,22(1):43-47
- 15 李萍,何秀娟,张颖,等. 黄芪多糖对细胞增殖及血管内皮细胞与白细胞粘附作用的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2004,20(9):141-144
- 16 Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination[J]. Int J Legal Med, 1996,108(5):231-236

(收稿日期:2017-11-10)

(修回日期:2017-11-29)

(接第 57 页)

- 16 刘宁,谭文成,夏吉生,等. miR-34a 靶向 MMP-13 调控大鼠软骨细胞凋亡的机制[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版, 2016, 37(2):139-145
- 17 Sandy JD, Verscharen C. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo [J]. Biochem J, 2001, 358(Pt 3):615
- 18 Bau B, Gebhard PM, Haag J, *et al.* Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro [J]. Arth Rheum, 2010, 46(10):2648-2657

- 19 Tew S R, Li Y, Pothacharoen P, *et al.* Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. Osteoarthr Cartil, 2005, 13(1):80-89
- 20 黄林剑,李辉,谢千阳,等. 静压力下兔髌突软骨细胞 COL2A1、SOX9、COL1A1 和 ALP 的表达变化[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2014,12(4):295-300
- 21 马玉环,郑文伟,林平冬,等. 骨关节炎软骨退变与炎症的关系[J]. 风湿病与关节炎, 2015,4(8):50-53
- 22 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2017,21(20):3255-3262

(收稿日期:2017-11-23)

(修回日期:2017-12-22)