

· 基础研究 ·

河蚌提取物葡聚糖对软骨细胞 Wnt 通路的调控作用研究

韦宋谱^{1,2}, 丁道芳¹, 王学宗¹, 庞坚¹, 郑昱新¹, 徐勤光¹, 曹月龙¹, 詹红生¹

(1. 上海中医药大学附属曙光医院骨伤科, 上海 201203; 2. 台州恩泽医疗中心(集团)路桥医院中医骨伤科, 浙江台州 318050)

【摘要】 目的: 探讨河蚌肉提取物葡聚糖 HBP-A (anodonta glucan HBP-A) 对体外软骨细胞 Wnt 通路的调控作用。方法: 体外培养大鼠软骨细胞, 添加 IL-1 β (10 ng/ml) 诱导分化, 分为空白组, IL-1 β 组, IL-1 β +IWP-2 (5 μ M, Wnt 通路抑制剂) 组, IL-1 β +HBP-A (0.3 mg/ml) 组, IL-1 β +IWP-2+HBP-A 共 5 组培养, 提取各组细胞 RNA 和蛋白, 采用 Rt-PCR 检测各组细胞 Wnt-3a、 β -catenin (24、48、72 h) 及 MMP-13 (72 h) 的基因表达; 采用 Western-blot 检测 β -catenin、MMP-13、Sox-9 和 Coll-II 蛋白的表达水平 (48 h)。结果: 细胞经 IL-1 β 诱导分化, Wnt-3a 基因表达升高, β -catenin 以及 MMP-13 基因和蛋白表达升高, Sox-9 和 Coll-II 蛋白表达下调。添加 HBP-A 干预可以抑制 IL-1 β 诱导下软骨细胞 Wnt-3a 基因的高表达、 β -catenin 以及 MMP-13 基因和蛋白的高表达, 上调 Sox-9 和 II 型胶原蛋白的表达。IWP-2 和 HBP-A 合用时, Wnt-3a、 β -catenin 基因以及 β -catenin 蛋白表达最低, Sox-9 蛋白表达最高。结论: HBP-A 可通过降低 Wnt/ β -catenin 信号通路表达, 延缓软骨细胞分化, 并且可与 Wnt 抑制剂协同调节 Wnt-3a、 β -catenin 和 Sox-9 因子的表达。

【关键词】 组织提取物; 软骨细胞; 葡聚糖类; 基因表达调控

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.06.005

Regulating effect of anodonta glucan HBP-A on chondrocytes through Wnt pathway WEI Song-pu, DING Dao-fang, WANG Xue-zong, PANG Jian, ZHENG Yu-xin, XU Qin-guang, CAO Yue-long*, and ZHAN Hong-sheng. *Department of Orthopaedics, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate regulation function of anodonta glucan HBP-A on chondrocytes through Wnt pathway in vitro. **Methods:** Rat chondrocytes were cultured and differentiated induced with IL-1 β (10 ng/ml) in vitro. Chondrocytes were divided into five groups: IL-1 β group, IL-1 β +IWP-2 (5 μ M, Wnt pathway inhibitor) group, IL-1 β +HBP-A (0.3 mg/ml) group and IL-1 β +IWP-2+HBP-A group. Wnt-3a, β -catenin (24 h, 48 h, 72 h) and MMP-13 (72 h) genes expression were detected by Rt-PCR, while β -catenin, MMP-13, Sox-9 and coll-II (48 h) protein expression were measured by Western-blot. **Results:** After induction of IL-1 β , gene expression of Wnt-3a, β -catenin and MMP-13 were increased, so were the protein expression of β -catenin and MMP-13. In contrast, protein expression of Sox-9 and Coll-II were declined. Following addition of HBP-A, Wnt-3a, β -catenin and MMP-13 were shown as induction of IL-1 β , but protein expression of Sox-9 and Coll-II were upgraded. Combining HBP-A with IWP-2 led to the lowest level in Wnt-3a, β -catenin gene and β -catenin protein expression and highest expression of Sox-9 protein. **Conclusion:** HBP-A could not only delay the differentiation of chondrocytes through downgrading the signal expression of Wnt/ β -catenin, but also adjust the expression of Wnt-3a, β -catenin and Sox-9 when combined with the Wnt inhibitor.

KEYWORDS Tissue extracts; Chondrocytes; Glucans; Gene expression regulation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(6):461-465 www.zggszz.com

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的发生主要侵袭

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81072830); 上海市教委创新项目 (编号: 11YZ64); 上海中医药事业发展三年行动计划项目 (编号: ZYSNXD-CC-YJXY)

Fund program: Provided by National Natural Science Foundation of China (No. 81072830)

通讯作者: 曹月龙 E-mail: ningtcm@126.com

Corresponding author: CAO Yue-long E-mail: ningtcm@126.com

髌、膝关节等大关节, 以关节软骨进行性退变与破坏为主要病理表现^[1-3]。Wnt 通路与软骨的生长、发育、衰退、凋亡过程, 维持软骨特性都有着密切的联系^[4-5]。研究表明, Wnt- β -catenin 通路可以调控骨关节炎的发生^[5-6]。

骨关节炎属中医痹证范畴, 病机属本虚标实, 肝肾亏虚于内, 风寒湿痰瘀困阻于外而发病^[7]。本课题组长期研究柔肝中药治疗骨关节炎的作用机制, 提

取了河蚌肉中的有效成分河蚌葡聚糖(HBP-A, 专利号: ZL200610028598.0)治疗膝骨关节炎。既往研究发现 HBP-A 对兔膝骨关节炎有治疗作用, 如体外添加对软骨细胞有促进增殖作用^[8-9], 体内实验还具有止痛效果^[10-11]。近期研究发现 HBP-A 在体内外都具有促进软骨细胞 II 型胶原的合成作用^[12]。为进一步探索其治疗骨关节炎的内在机制, 本研究继续用 HBP-A 单体体外干预培养软骨细胞, 检测软骨细胞 Wnt 通路上相关基因和蛋白表达变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 H-DMEM 培养基, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 0.2% II 型胶原酶, 含 EDTA 胰蛋白酶, 三抗(青霉素、链霉素及两性霉素), 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), Wnt-3a、 β -catenin、MMP-13、Sox-9 和 II 型胶原的引物以及抗体, 细胞培养皿等相关耗材以及 PCR、Western-blot 实验相关试剂及耗材。

1.2 主要仪器 生物安全柜(美国 Thermo 公司产品), HERA cell150 iCO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司产品), IX71 荧光倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司产品), TGRADIENT 基因扩增仪(德国 Biometra 公司产品), Step-one Plus 实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司产品), 蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 药物来源 提取河蚌肉中有效成分河蚌葡聚糖(HBP-A), 主要由 1,4 链接的葡萄糖残基组成, 部分残基的 3 位和 6 位具有少量的分支。此外, 该多糖中尚含有少量的 1,2 连接的葡萄糖残基。HBP-A 经 HPLC 方法测定分子量为 1.7×10^6 D, 比旋度 $[\alpha]_D$ 为 $+243.4^\circ$ (c0.5, H₂O)。采用 HPLC, Shode 糖分析柱示差检测, 主峰部位含量不少于 80%。

1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞的培养和鉴定 按照既往前期体外提取和培养软骨细胞的方法^[13]。

1.4.2 药物干预 体外分离培养大鼠软骨细胞, 按 1×10^5 密度传代, 取第 2 代细胞在培养液中添加 IL-1 β (10 ng/ml)^[14]。诱导软骨细胞分化, 在此基础上给予 Wnt 通路抑制剂(IWP-2)、河蚌葡聚糖 HBP-A 或 IWP-2 联合 HBP-A 干预培养。具体分组如下: ①空白组: 正常软骨细胞。②IL-1 β 组: 正常软骨细胞+IL-1 β (10 ng/ml)。③IL-1 β +IWP-2 组: 正常软骨细胞+IL-1 β (10 ng/ml)+IWP-2 (5 μ M)。④IL-1 β +HBP-A 组: 正常软骨细胞+IL-1 β (10 ng/ml)+HBP-A (0.3 mg/ml)。⑤IL-1 β +IWP-2+HBP-A 组: 正常软骨细胞+IL-1 β (10 ng/ml)+IWP-2 (5 μ M)+HBP-A (0.3 mg/ml)。

1.5 检测指标和方法 主要观察 Wnt 通路上相关蛋白与基因表达, 具体方法: 培养细胞 24、48、72 h 后, 分别提取各组细胞 RNA 和蛋白, 采用 Real-time PCR 方法检测 3 个不同时间点 Wnt-3a 和 β -catenin 基因的表达以及检测 72 h 时 MMP-13 基因的表达。细胞经传代贴壁后加药干预 48 h 时采用 Western-blot 方法检测 β -catenin、Sox-9、MMP-13 和 Coll-II 蛋白的表达, 具体实验步骤参考试剂盒说明书。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件包进行统计分析。定量资料满足方差齐性, 采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 均数比较时, 若满足正态性检验和方差齐性检验, 采用独立重复测量方差分析, 独立样本采用单因素方差分析。所有的统计检验均采用双侧检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态学观察 正常的软骨细胞, 细胞饱满圆润, 形态均一, 均匀铺满皿底(图 1a)。IL-1 β +HBP-A 组细胞形态均一, 未见折光线强的凋亡细胞出现(图 1b)。空白组添加 IL-1 β 诱导后细胞较空白组细胞稀疏, 形态出现细长梭形样变, 且出现折光线较强的凋亡细胞(图 1c)。IL-1 β +IWP-2 组细胞更为稀疏, 细胞梭形样变, 凋亡细胞出现(图 1d)。IL-1 β +IWP-2+HBP-A 组细胞长梭形更为明显, 凋亡细胞数目增加(图 1e)。

2.2 各组细胞不同基因表达检测

2.2.1 各组干预后不同时间点 Wnt-3a 和 β -catenin 基因的变化 结果见表 1。IL-1 β 因子诱导后, Wnt-3a 与 β -catenin 因子表达明显升高, 在 48 h 与 72 h 时分别达到峰值, HBP-A 可抑制其高表达, 在 HBP-A 和 IWP-2 合用干预后, 两者具有协同降低 Wnt-3a 和 β -catenin 基因表达的作用。

2.2.2 各组干预 72 h 后 MMP-13 基因的表达 在 72 h 时, 各组 MMP-13 基因的表达结果: 空白组 1.000 ± 0.000 , IL-1 β 组 1.291 ± 0.009 , IL-1 β +IWP-2 组 0.411 ± 0.010 , IL-1 β +HBP-A 组 0.038 ± 0.007 , IL-1 β +IWP-2+HBP-A 组 0.025 ± 0.008 , 各组比较有统计学意义 ($F=16\ 390.000$, $P=0.001$)。Wnt 通路下游的炎性代表因子 MMP-13 表达与 β -catenin 基本保持一致, HBP-A 降低软骨细胞 MMP-13 基因的表达, 且 HBP-A 与 IWP-2 合用组表达最低。

2.3 干预各组细胞不同蛋白表达检测 结果见图 2。图中为药物干预各组细胞 48 h 后采用 Western-blot 检测 β -catenin、MMP-13、Coll-II、Sox-9 蛋白的表达情况, 与空白组相比, IL- β 组 β -catenin、MMP-13 蛋白表达升高, Coll-II、Sox-9 蛋白表达降低; 与 IL- β 组相比, IL-1 β +IWP-2 组、IL-1 β +HBP-

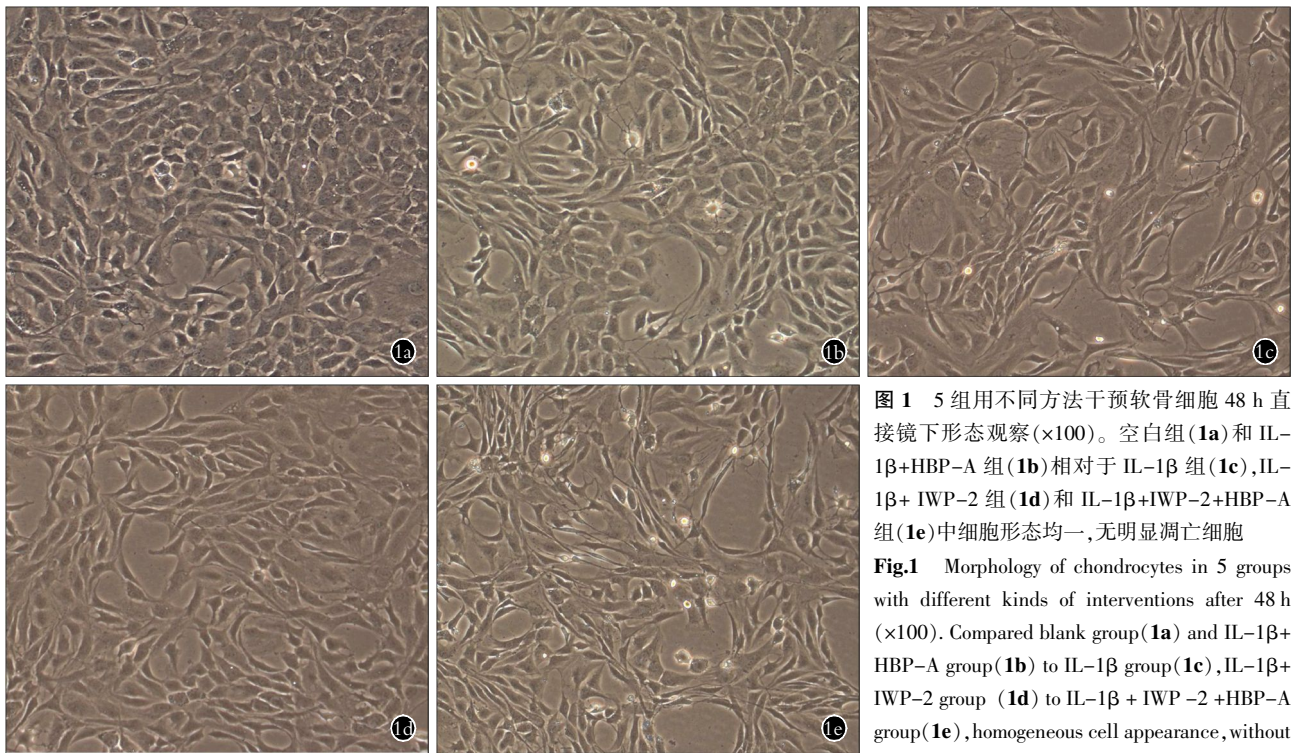


图 1 5 组用不同方法干预软骨细胞 48 h 直接镜下形态观察(×100)。空白组(1a)和 IL-1β+HBP-A 组(1b)相对于 IL-1β 组(1c), IL-1β+IWP-2 组(1d)和 IL-1β+IWP-2+HBP-A 组(1e)中细胞形态均一, 无明显凋亡细胞

Fig.1 Morphology of chondrocytes in 5 groups with different kinds of interventions after 48 h (×100). Compared blank group (1a) and IL-1β+HBP-A group (1b) to IL-1β group (1c), IL-1β+IWP-2 group (1d) to IL-1β+IWP-2+HBP-A group (1e), homogeneous cell appearance, without apoptotic cells

表 1 不同时间各组细胞 Wnt-3a 和 β-catenin 基因表达比较(̄x±s, 倍数)

Tab.1 Comparisons of Wnt-3a and β-catenin genes expression in different groups and times(̄x±s, times)

组别	Wnt-3a			β-catenin		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
空白组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
IL-1β 组	1.562±0.010 [▲]	10.755±0.050 [▲]	2.782±0.032 [▲]	0.943±0.012 [▲]	1.047±0.016 [▲]	5.914±0.015 [▲]
IL-1β+IWP-2 组	1.112±0.010 [▲]	2.616±0.098 [▲]	2.054±0.050 [▲]	0.611±0.023 [▲]	0.323±0.015 [▲]	5.423±0.018 [▲]
IL-1β+HBP-A 组	1.258±0.015 ^{▲#}	7.837±0.147 ^{▲#}	1.316±0.015 ^{▲#}	0.716±0.011 ^{▲#}	0.792±0.027 ^{▲#}	2.619±0.524 ^{▲#}
IL-1β+IWP-2+HBP-A 组	1.302±0.010 ^{▲#}	8.103±0.100 ^{▲#}	1.156±0.020 ^{▲#}	0.314±0.012 ^{▲#}	0.315±0.021 ^{▲#}	3.363±0.013 ^{▲#}
F 值	6 268.000			225.503		
P 值	0.001			0.001		

注:与空白组比较,▲P<0.001;与 IL-1 组比较,#P<0.001

Note: Compared with blank group, ▲P<0.001; compared with IL-1 group, #P<0.001

表 2 药物干预 48 h 各组细胞 β-catenin、MMP-13、Coll- II、Sox-9 蛋白表达比较(̄x±s, 倍数)

Tab.2 Comparisons of β-catenin, MMP-13, Coll- II and Sox-9 protein expression in 5 groups (̄x±s, times)

组别	β-catenin	MMP-13	Coll- II	Sox-9
空白组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
IL-1β 组	1.091±0.082 [▲]	1.048±0.008 [▲]	0.471±0.011 [▲]	0.259±0.008 [▲]
IL-1β+IWP-2 组	0.856±0.015 [▲]	0.234±0.017 [▲]	0.325±0.021 [▲]	0.850±0.011 [▲]
IL-1β+HBP-A 组	0.211±0.015 ^{▲#}	0.380±0.010 ^{▲#}	0.867±0.020 ^{▲#}	0.511±0.008 ^{▲#}
IL-1β+IWP-2+HBP-A 组	0.038±0.004 ^{▲#}	0.612±0.016 ^{▲#}	0.685±0.015 ^{▲#}	0.980±0.010 ^{▲#}
F 值	476.217	930.752	4003.000	2713.000
P 值	0.001	0.00	0.001	0.001

注:与空白组比较,▲P<0.001;与 IL-1 组比较,#P<0.001

Note: Compared with blank group, ▲P<0.001; compared with IL-1 group, #P<0.001

A 组和 IL- β +IWP-2+HBP 组 β -catenin、MMP-13 蛋白表达降低, Coll- II、Sox-9 蛋白表达升高。表 2 结果表明: HBP-A 干预后, 与 IL-1 β 诱导组对比, β -catenin、MMP-13 蛋白表达降低, Sox-9 与 Coll- II 蛋白表达升高, HBP-A 和 IWP-2 合用后对 β -catenin 与 Sox-9 的蛋白调节方面可以起到协同作用。

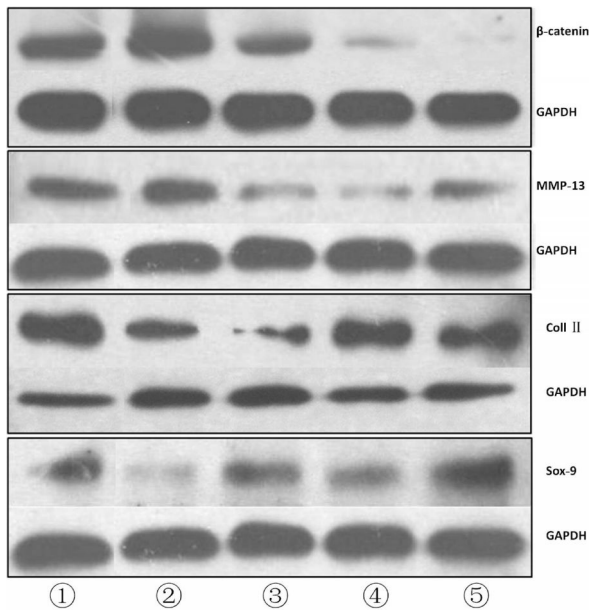


图 2 48 h 时 β -catenin、MMP-13、Coll- II 和 Sox-9 蛋白在 5 组软骨细胞中的表达。与空白组(①)相比, IL- β 组(②) β -catenin、MMP-13 蛋白表达升高, Coll- II、Sox-9 蛋白表达降低。与 IL- β 组相比, IL-1 β + IWP-2 组(③)、IL-1 β +HBP-A 组(④)和 IL- β +IWP-2+HBP 组(⑤) β -catenin、MMP-13 蛋白表达降低, Coll- II、Sox-9 蛋白表达升高

Fig.2 Protein expression of β -catenin, MMP-13, Coll- II and Sox-9 in 5 groups of chondrocytes after 48 h. Compared to Blank group (①), protein expression of β -catenin and MMP-13 were increased, Coll- II and Sox-9 were decreased in IL-1 β group (②); Compared to IL-1 β group, protein expression of β -catenin and MMP-13 were decreased, Coll- II and Sox-9 were increased in IL-1 β + IWP-2 group (③), IL-1 β +HBP-A group(④) and IL-1 β + IWP-2 +HBP-A group(⑤)

3 讨论

既往研究表明, 10 ng/ml IL-1 β 是诱导软骨细胞分化的最佳浓度, 若其用量过高易对细胞产生严重的损害, 用量过低则达不到诱导目的^[14]。0.3 mg/ml HBP-A 也是基于其发挥药效作用的较佳浓度参数^[6]。为检测药物的最佳药效时间点, 分别选取 24、48、72 h 3 个时间点检测 β -catenin 和 Wnt-3a 的表达情况。因 72 h 连续体外培养细胞不更换新的培养液, 细胞会因缺乏营养, 而退变加剧, 影响其结构和功能, 所以选取 72 h 为最长检测时间点。

为明确 HBP-A 治疗骨关节炎的作用靶点, 本实验采用 Wnt 通路抑制剂 IWP-2 干预软骨细胞。有研究认为 IWP-2 干预靶点为一种膜结合酰基转移酶,

若加强 Wnt 信号分泌的 L 细胞系 (L-Wnt-STF cells), 可以将 β -catenin 蛋白表达完全抑制。而本实验中未发现有完全抑制的现象, 这可能与本实验采用普通体外培养的大鼠软骨细胞有关, 因细胞内不仅含有 Wnt 信号经典通路蛋白还含有非经典通路蛋白等^[15], 故通路下游的 β -catenin 蛋白未完全抑制。从 HBP-A 组结果, 可以看到明显的抑制作用, β -catenin 蛋白表达不仅低于 IL-1 β 诱导组, 也低于 IWP-2 组, IWP-2+HBP-A 联合组的 β -catenin 蛋白表达最低。说明 HBP-A 除抑制 Wnt 靶点外, 还可能存在调节其他靶点。

基因表达的结果显示, 随着时间的延长, IL-1 β 诱导基因表达升高, 证实 IL-1 β 可诱导软骨细胞分化退变, 且随时间延长逐渐加剧。添加药物干预后, 24 h 时 IWP-2 对 β -catenin 的抑制作用显著, 随着时间的推移, 抑制效力逐渐下降; 而 HBP-A 抑制 β -catenin 基因表达作用随时间逐渐加强, 说明 HBP-A 起效慢, 作用时间长。

药物添加不仅影响基因的表达变化, 同样会调节蛋白的表达, 故需检测 Wnt 通路上代表性蛋白因子。IL-1 β 诱导后 β -catenin 蛋白表达升高, 证明了 IL-1 β 因子诱导的细胞退变模型与 Wnt- β -catenin 信号通路有直接的关系, 也与基因检测结果相符。MMP-13 蛋白表达趋势大体同 β -catenin, 但 IWP-2 和 HBP-A 合用组较单一组表达要高, 这可能是两者在抑制 MMP-13 蛋白表达中有相互竞争的作用靶点引起, 或可能通过 MMPs 家族中的其他因子起作用, 如 MMP-2-9 等蛋白^[16], 有待进一步研究。

本实验还对 Wnt 通路相关的 Sox-9 蛋白以及作为软骨细胞特异性标志的 II 型胶原蛋白进行检测。Sox-9 作为抑制细胞肥大化的重要指标之一, Sox-9 蛋白的表达与软骨的损坏程度呈负相关^[17]。IL-1 β 诱导后 Sox-9 蛋白的表达最低, 说明细胞肥大化改变最严重。添加 HBP-A 或 IWP-2 后, Sox-9 蛋白表达升高且 IWP-2+HBP-A 合用组高于单独使用组, 说明 IWP-2 和 HBP-A 起到一定程度的协同作用。

综上, 河蚌肉提取物葡聚糖 HBP-A 体外添加培养软骨细胞能够抑制 Wnt 通路上 Wnt-3a, β -catenin, MMP-13 基因及蛋白的表达, 同时提高 Sox-9 蛋白表达, 延缓软骨细胞 II 型胶原的降解, 并且与 Wnt 抑制剂 IWP-2 协同抑制 Wnt-3a 及 β -catenin 因子, 提高 Sox-9 因子的表达。

参考文献

[1] 中华医学会风湿病学分会. 骨关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(6): 416-419.
Branch of Rheumatology of Chinese Medical Association. The guidelines on diagnosis and treatment of osteoarthritis[J]. Zhonghua Feng

- Shi Bing Xue Za Zhi, 2010, 14(6):416-419. Chinese.
- [2] 王学宗, 郑昱新, 曹月龙, 等. 全膝关节磁共振成像积分对膝骨关节炎诊断价值的探讨[J]. 中国骨伤, 2012, 28(5):364-368.
Wang XZ, Zheng YX, Cao YL, et al. Study on the diagnostic value of whole-organ magnetic resonance imaging score (WORMS) in knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 28(5):364-368. Chinese with abstract in English.
- [3] 王学宗, 高宁阳, 刘婷, 等. 软骨标志物 CTX-II 在骨关节炎中的应用[J]. 中国骨伤, 2013, 26(3):260-263.
Wang XZ, Gao NY, Liu T, et al. Application of biomarker CTX-II in osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(3):260-263. Chinese with abstract in English.
- [4] Chun JS, Oh H, Yang S, et al. Wnt signaling in cartilage development and degeneration[J]. BMB Rep, 2008, 41(7):485-494.
- [5] 高宁阳, 曹月龙, 刘婷, 等. Wnt 信号通路与骨关节炎[J]. 中国骨伤, 2010, 23(4):320-323.
Gao NY, Cao YL, Liu T, et al. Wnt signaling pathways and osteoarthritis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(4):320-323. Chinese with abstract in English.
- [6] Cao YL, Liu T, Gao NY, et al. Glucan HBP-A increase type II collagen expression of chondrocytes in vitro and tissue engineered cartilage in vivo[J]. Chin J Integr Med, 2013, 16(6):1364-1370.
- [7] 石印玉, 徐荣善, 陈友红. 养血软坚方治疗膝骨关节炎的临床报告[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1994, 2(4):33-36.
Shi YY, Xu RS, Chen YH. Clinical reports about nourishing and soft hard prescription treatment of knee osteoarthritis[J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 1994, 2(4):33-36. Chinese.
- [8] Cao Y, Pang J, Zhan H, et al. The research of Chinese herb HBP-A on the intervention of injectable constructs with chondrocytes and alginate hydrogel[J]. Bone, 2008, 7(43):S87.
- [9] 冯伟, 石印玉. MTT 法分析中药含药血清对体外软骨细胞增殖影响的研究[J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(1):43-45.
Feng W, Shi YY. Studies MTT assay serum containing medicine on proliferation of chondrocytes in vitro[J]. Shang Hai Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2000, 14(1):43-45. Chinese.
- [10] 曹月龙, 郑昱新, 石印玉, 等. 养血软坚胶囊治疗膝骨关节炎疗效及安全性评价的随机对照试验[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(6):423-427.
Cao YL, Zheng YX, Shi YY, et al. Efficacy study on Yangxue ruanjian jiaonang in the management of osteoarthritic knee with randomized controlled trial[J]. Zhongguo Yao Wu Yu Lin Chuang, 2004, 4(6):423-427. Chinese.
- [11] Cao Y, Shi Y, Zheng Y, et al. Blood-nourishing and hard-softening capsule costs less in the management of osteoarthritic knee pain: a randomized controlled trial[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2005, 2(3):363-368.
- [12] Cao YL, Liu T, Pang J, et al. Glucan HBP-A increase type II collagen expression of chondrocytes in vitro and tissue engineered cartilage in vivo[J]. Chin J Integr Med, 2013.
- [13] 韦宋谱, 张晓钢, 丁道芳, 等. 一种获取具有旺盛增殖力的大鼠软骨细胞培养方法[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(7):8-12.
Wei SP, Zhang XG, Ding DF et al. A method for cultivating high proliferative chondrocytes in rats[J]. Shang Hai Zhong Yi Yao Za Zhi, 2012, 46(7):8-12. Chinese.
- [14] Zhou PH, Liu SQ, Peng H. The effect of hyaluronic acid on IL-1beta-induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 2008, 26(12):1643-1648.
- [15] Mödder UI, Rudnik V, Liu G, et al. A DNA binding mutation in estrogen receptor-alpha leads to suppression of Wnt signaling via beta-catenin destabilization in osteoblasts[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(7):2248-2255.
- [16] Chen B, Dodge ME, Tang W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer[J]. Nat Chem Biol, 2009, 5(2):100-107.
- [17] Dy P, Wang W, Bhattaram P, et al. Sox-9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes[J]. Dev Cell, 2012, 22(3):597-609.

(收稿日期:2013-11-10 本文编辑:连智华)

·读者·作者·编者·

本刊关于“通讯作者”有关事宜的声明

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通讯作者的稿件,与该稿件相关的一切事宜均与通讯作者联系。如文内未注明通讯作者的文章,按国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明!

《中国骨伤》杂志社