

单味药鹿茸调控大鼠骨关节炎软骨组织 Smad2、3 表达的研究

牛 维¹ 孙志涛² 曹学伟¹ 汪睦勋² 严 正³ 郭 达¹ 樊粤光⁴

摘要 **目的** 观察单味中药鹿茸对大鼠骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨靶器官 Smad2、3 表达的影响。**方法** 选择 3 个月龄健康雌性 SD 大鼠 100 只, 体质量(200 ± 20)g。常规喂养 1 周后, 随机数字表法分成 5 组: 鹿茸低剂量组、鹿茸高剂量组、盐水组、模型组及正常组, 每组 20 只。除正常组外采用经典 Hulth 方法造模, 造模后 6 周, 行病理学观察, 确认造模成功, 鹿茸低剂量组按 0.021 g/100 g 给药, 鹿茸高剂量组按 0.084 g/100 g 给药, 盐水组每天灌服相应的生理盐水, 正常组及模型组不予任何处理。于灌胃后 2、4、6 周, 分别取大鼠双侧膝关节软骨, 采用免疫组织化学、荧光定量-PCR 和蛋白免疫印迹杂交方法分别检测 Smad2、3 mRNA 和蛋白表达。**结果** 病理观察可见成功制备 OA 模型, 免疫组织化学可见 Smad2、3 蛋白在软骨层广泛表达, 且定位于软骨细胞膜内。与模型组比较, 鹿茸低、高剂量组在灌胃后 2、4、6 周 Smad2、3 mRNA 表达量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与同组灌胃后 4 周比较, 灌胃后 6 周, 鹿茸高、低剂量组的 Smad2、3 mRNA 表达量有所下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 鹿茸低、高剂量组 Smad2、3 蛋白在灌胃后 2、4 周时, 其在软骨细胞中的表达量有明显的升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与同组灌胃后 2 周比较, 鹿茸低、高剂量组灌胃后 4 周升高更显著, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与同组灌胃后 4 周比较, 灌胃后 6 周时鹿茸低、高剂量组 Smad2、3 蛋白表达降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** (1) 鹿茸通过调控软骨细胞内 Smad2、3 基因和蛋白的表达而起到修复软骨的作用。(2) 软骨细胞内的 Smad2、3 基因表达及蛋白水平的上调可能是 OA 发病的重要机制之一。

关键词 骨关节炎; 鹿茸; Smad 2、3 基因; Smad 2、3 蛋白; 归经; 信号转导

Regulation of Single Herb Pilose Antler on the Expression of Smad2 and Smad3 in the Cartilage of OA Rats: an Experimental Research NIU Wei¹, SUN Zhi-tao², CAO Xue-wei¹, WANG Mu-xun², YAN Zheng³, GUO Da¹, and FANG Yue-guang⁴ 1 Department of Joints, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510120), China; 2 Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510405), China; 3 Department of Orthopedics, Huangpu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Jinan University, Guangzhou (510700), China; 4 Department of Joints, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510405), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of single herb pilose antler (PA) on the expression of Smad2 and Smad3 in the cartilage of osteoarthritis (OA) rats. **Methods** One hundred 3-month old female healthy SD rats, (200 ± 20) g, were recruited and routinely fed for 1 week. They were randomly divided into 5 groups, i.e., the low dose PA group, the high dose PA group, the normal saline control group, the model group, and the normal control group, 20 in each group. The model was prepared using classic Hulth method except the normal control group. After 6-week modeling, the model was confirmed successful by pathologic observation. PA at 0.021 g/100 g and 0.084 g/100 g was given by gastrogavage to rats in the low dose PA group and the high dose PA group respectively. Normal saline was adminis-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173285)

作者单位: 1. 广东省中医院关节科 (广州 510120); 2. 广州中医药大学第二临床医学院 (广州 510405); 3. 暨南大学医学院附属黄浦区中医院骨科 (广州 510700); 4. 广州中医药大学第一附属医院关节科 (广州 510405)

通讯作者: 孙志涛, Tel: 13058091643, E-mail: harrison0611@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.02.0209

tered to those in the normal saline control group. No treatment was given to rats in the normal control group and the model group. Bilateral knee cartilages were harvested at week 2, 4, and 6. mRNA and protein expressions of Smad2 and Smad3 were detected by immunohistochemical assay, fluorescent quantitative PCR, and Western blot. Results OA model was successfully prepared by pathological observation. Results of immunohistochemical assay showed that Smad2 and Smad3 expressed extensively in the cartilage, and located inside the chondrocyte membrane. Compared with the model group, mRNA expression of Smad2 and Smad3 obviously increased in the low dose PA group and the high dose PA group at week 2, 4, and 6, showing statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the same group at week 4 after gastrogavage, mRNA expression of Smad2 and Smad3 obviously decreased in the low dose PA group and the high dose PA group at week 6, showing statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the model group, protein expression of Smad2 and Smad3 obviously increased in the chondrocytes of the low dose PA group and the high dose PA group at week 2 and 4, showing statistical difference ($P < 0.01$). Compared with the same group at week 2 after gastrogavage, protein expression of Smad2 and Smad3 obviously increased in the low dose PA group and the high dose PA group at week 4, showing statistical difference ($P < 0.01$). Compared with the same group at week 4 after gastrogavage, protein expression of Smad2 and Smad3 obviously decreased in the low dose PA group and the high dose PA group at week 6, showing statistical difference ($P < 0.01$). Conclusions (1) The pilose antler could repair cartilages by regulating mRNA and protein expressions of Smad2 and Smad3. (2) Up-regulating mRNA and protein expressions of Smad2 and Smad3 might be one of important mechanisms for the pathogenesis of OA.

KEYWORDS osteoarthritis; pilose antler; Smad 2 gene and Smad 3 gene; Smad 2 protein and Smad 3 protein; meridian tropism; signal transduction

Smad2、3 是 TGF- β 信号转导通路中转导信号的关键分子之一,前期实验表明鹿茸能够提高 TGF- β_1 的表达,从而促进 TGF- β /Smad 信号通路的转导,起到修复软骨的作用。Smad2 和 Smad3 基因敲除模式小鼠的研究也明确 Smad2、3 在软骨细胞分化、增殖、成熟方面起到重要的调控作用^[1]。鹿茸归肝、肾经,能补肝肾、强筋骨,具有生精益血、补髓健骨之功效,现代药理学研究表明,鹿茸多肽有促进软骨细胞有丝分裂活性及促进软骨细胞分裂的作用^[2]。本实验通过探讨鹿茸对 Smad2、3 基因和蛋白表达的影响,进一步探讨鹿茸与骨性关节炎(osteoarthritis, OA)软骨组织 Smad2、3 的关联性。

材料和方法

1 动物 3 月龄健康雌性 SD 大鼠共 100 只,体重(200 ± 20)g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号:SCXK(粤)2008-0020,SPF 级。实验于广州中医药大学国家重点学科中医骨伤科学实验室完成。

2 药物 鹿茸片购于广东省中医院药房,加工成细粉,根据实验灌胃需要,用生理盐水配成 0.042 g/mL 的混悬溶液。注射用青霉素(哈药集团,批号 D1103222)。

3 仪器和试剂 RNeasy® Lipid Tissue Mini

Kit (德国, QIAGEN 公司), PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(日本, TaKaRa 公司), GoTaq® qPCR Master Mix (北京, Promega 公司), 兔源 Smad2、3 一抗 (Abcam), Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) 二抗 (Abcam), 免疫组化试剂盒(中国, 欣博盛公司), CFX96 Real-Time system (美国, Bio-Rad 公司), Centrifuge5804R 低温高速离心机(德国, Eppendorf 公司)。

4 方法

4.1 模型的建立 按经典 Hulth 方法^[3]造模,将 SD 大鼠左侧膝关节内侧副韧带切断,切除前后交叉韧带和内侧半月板。术后常规肌肉注射青霉素,20 万 U/只,连续注射 3 天,6 周后,随机处死 5 只,取模型侧膝关节,10% 的中性多聚甲醛固定,通过病理学观察确定造模成功。

4.2 实验分组及给药方法 选取 20 只作为正常组,余者进行 OA 造模,成功制备模型后,按随机数字表法分为 4 组(每组 20 只),即鹿茸低剂量组、鹿茸高剂量组、盐水组、模型组,同步进行平行对照研究。根据实验动物用药换算公式($Db = Da \times Rb/Ra \times (Wa/Wb)^{1/3}$)(其中 Db 为小鼠千克体重剂量, Da 为成人千克体重剂量, Rb、Ra 为体型系数, Wb、Wa 为已知动物体重,成人按标准体重 60 kg 计算),鹿茸低剂量组按 0.021

g/100 g 给药,鹿茸高剂量组按 0.084 g/100 g 给药,分别相当于临床成人的 6.3 和 25.2 倍,盐水组每天灌服相应的生理盐水,模型组不予任何处理,造模后 6 周开始灌胃给药,每天 1 次,分别于灌胃后 2、4、6 周断颈处死动物,每次处死 6 只,正常组每次处死 6 只,取大鼠双侧膝关节软骨,−80 ℃ 保存。

4.3 膝关节病理观察 标本固定、脱钙后,正中矢状面剖开,取内外侧半关节,经逐级乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡后关节切面紧贴包埋盒底部包埋,连续切片厚 4.0~5.0 μm,切片常规脱蜡至水,自来水冲洗后行常规 HE 染色^[4]:切片入苏木精浸染 5 min,水洗,再入伊红浸染 5 min,水洗。二甲苯透明,中性树胶封固。光镜下观察染色的切片。

4.4 膝关节软骨 Smad2、3 免疫组化检测 采用链亲和素-生物素复合物(SABC)法,膝关节标本放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,放入浓盐酸脱钙液中,脱钙 1 周,每天换液 1 次,用磷酸盐(PBS)缓冲液代替一抗作为阴性对照,一抗为 Smad 2 兔抗大鼠单克隆抗体(1:100),Smad 3 兔抗鼠单克隆抗体(1:100),二抗为羊抗兔 IgG(1:100)。检测软骨 Smad2、3 在大鼠膝关节中的分布。

4.5 荧光定量-PCR 测定大鼠软骨 Smad 2、3 mRNA 表达 液氮中将软骨组织研磨成粉,余步骤按 RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit 试剂盒说明书进行操作,取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,然后进行荧光定量-PCR 反应。采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,Smad2 mRNA 上游引物为:5'-CCACTACCA-GAGGGTGGAGA-3',下游引物为:5'-CCTGCTGG-GAAATTTGTGTT-3',扩增的基因片段长度为 132bp;Smad3 mRNA 上游引物为:5'-GAGACAT-TCCACGCTTCACA-3',下游引物为:5'-GCTGCAT-TCCGGTTAACATT-3',扩增的基因片段长度为 110bp。以 β-actin 基因作为 PCR 的内参照,其上游引物为:5'-CCGCATCCTCTTCCTCCCT-3'(19bp),下游引物为:5'-GCCACAGGATTCCATACCCAG-3'(21bp),扩增的基因片段长度为 131 bp。引物均由 Invitrogen 公司合成,以 cDNA 为模板按 GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒说明书配制 20 μL 的 PCR 反应体系,按以下条件进行扩增:步骤 1,预变性,1 cycle,95 ℃,2 min;步骤 2,热循环,40 cycle,95 ℃,15 s,60 ℃,1 min;步骤 3,溶解曲线。每种样品做 3 个复孔,计算时取平均值。

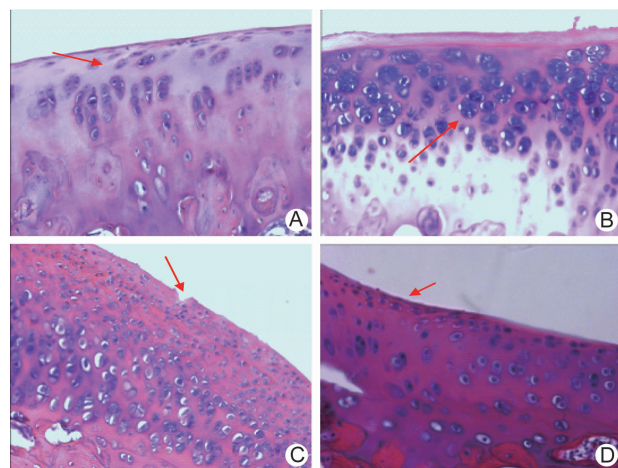
4.6 免疫印迹法分析大鼠软骨 Smad2、3 蛋白表达 蛋白质提取及 SDS-PAGE 凝胶电泳方法参照

《分子克隆实验指南》^[5]的经典方法进行蛋白质提取,一抗为 Smad2 兔抗大鼠单克隆抗体(1:10 000),Smad3 兔抗大鼠单克隆抗体(1:5 000),二抗为羊抗兔 IgG(1:2 000);内参 β-actin(1:1 000),ECL 发光液显影,拍照,对杂交带进行密度扫描分析,比较 Smad2、3 蛋白的相对表达。

4.7 统计学方法 采用统计软件 SPSS 18.0 进行数据的统计处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间及以上比较用单因素方差分析,两两比较采用配对 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠膝关节病理改变(图 1) 正常组关节表面光滑,软骨的 4 层结构及潮线清晰可见,所有造模动物造模后 2 周时,光镜下可见表层软骨细胞肿胀变圆,扁平的软骨细胞减少,软骨细胞簇集;4 周时,表层及中层细胞收缩,细胞数量弥漫性增多,出现大量簇集细胞团;6 周后,大部分软骨的表层细胞消失,软骨表面出现溃烂缺损,软骨细胞数量减少,可见坏死崩解细胞,潮线紊乱甚至消失。

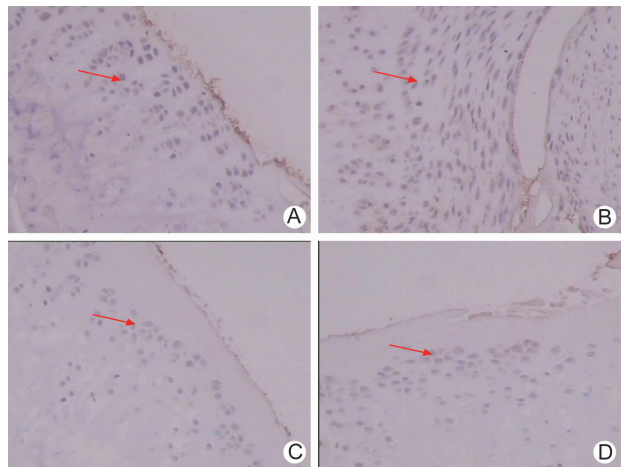


注:A 为造模后 2 周;B 为造模后 4 周;C 为造模后 6 周;D 为正常组;箭头所指为阳性部位

图 1 大鼠膝关节病理改变(HE, ×200)

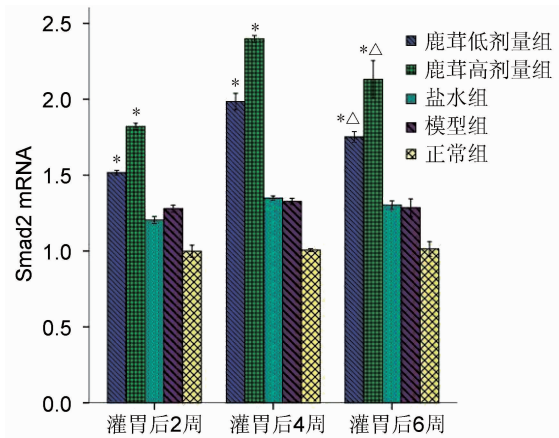
2 各组大鼠免疫组织化学检测结果比较(图 2) 免疫组化可见鹿茸低剂量和高剂量组软骨层有广泛的棕褐色细胞,数量明显高于盐水组和模型组。

3 各组大鼠软骨 Smad2、3 mRNA 的表达(图 3、4) 与模型组比较,鹿茸低剂量和高剂量组在灌胃后 2、4、6 周 Smad2、3 mRNA 表达量明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与同组灌胃后 4 周比较,灌胃后 6 周,鹿茸高、低剂量组的 Smad2、3 mRNA 表达量有所下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。



注:A 为鹿茸低剂量组;B 为鹿茸高剂量组;C 为盐水组;D 为模型组;箭头所指为阳性区域

图 2 各组大鼠软骨组织中 Smad2、3 蛋白免疫组织化学检测(×100)



注:与模型组同期比较,* $P < 0.05$;与本组灌胃后 4 周比较, $\Delta P < 0.05$;下图同

图 3 各组大鼠软骨 Smad2 mRNA 表达比较

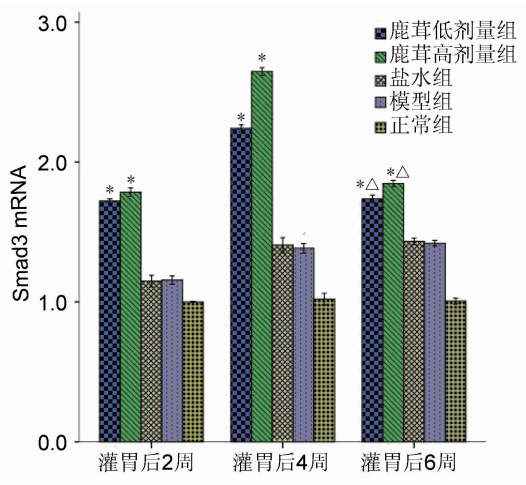


图 4 各组大鼠软骨 Smad3 mRNA 表达比较

4 各组大鼠软骨 Smad2、3 蛋白表达(表 1、2)与模型组比较,鹿茸低、高剂量组 Smad2、3 蛋白在灌胃后 2、4 周时,其在软骨细胞中的表达量有明显的升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与本组灌胃后 2 周比较,鹿茸低、高剂量组灌胃后 4 周升高更显著,差异有统计学意义($P < 0.01$);与本组灌胃后 4 周比较,灌胃后 6 周时鹿茸低、高剂量组 Smad2、3 蛋白表达均降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠软骨 Smad2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Smad2		
		灌胃后 2 周	灌胃后 4 周	灌胃后 6 周
鹿茸低剂量	6	0.71 ± 0.04	1.04 ± 0.11 * Δ	0.86 ± 0.08 * Δ
高剂量	6	0.94 ± 0.03	1.48 ± 0.09 * Δ	1.19 ± 0.12 * Δ
盐水	6	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.04
模型	6	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.04
正常	10	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.04

注:与模型组同期比较,* $P < 0.01$;与同组灌胃后 2 周比较, $\Delta P < 0.01$;与同组灌胃后 4 周比较, $\Delta P < 0.01$;下表同

表 2 各组大鼠软骨 Smad3 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Smad3		
		灌胃后 2 周	灌胃后 4 周	灌胃后 6 周
鹿茸低剂量	6	0.82 ± 0.06	1.23 ± 0.09 * Δ	1.06 ± 0.14 * Δ
高剂量	6	0.96 ± 0.04	1.57 ± 0.07 * Δ	1.20 ± 0.04 * Δ
盐水	6	0.40 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.52 ± 0.07
模型	6	0.42 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.52 ± 0.06
正常	10	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.04

讨 论

Smad2、3 是 Smad 蛋白家族主要成员之一,属于受体激活型 Smad(R-Smad),二者具有极高的同源性,其结构上的区别主要表现在 Smad2 的 MH1 区比 Smad3 多了 2 个氨基酸片段^[6],Smad2、3 作为将细胞外 TGF- β 信号传导至核内的中介分子,起到关键性的作用。目前,对于 TGF- β /Smad 信号通路的转导已有了比较清晰的认识,即 TGF- β s 先与 TGF- β R II 结合形成复合物,TGF- β R II 可被 TGF- β R I 识别并结合,形成 TGF- β R II-TGF- β -TGF- β R I 三聚体,而后 TGF- β R I 的 GS 区 Ser/Thr 经磷酸化活化,再识别并结合下游的 Smad2/3,磷酸化其 MH2 区的 SSXS 基序,使其活化,并解除 MH1 区对 MH2 区的抑制作用,激活后的 Smad2/3 与 TGF- β R I 分离,与 Smad4 形成异源复合物,后移位至核内,单独或结合其他转录调节因子,调节靶基因的表达^[7]。该通路对软骨细胞的分化、增殖和成熟具有重要的调控作用。

实验中发现,鹿茸高、低剂量组在灌胃后 2、4 周时,大鼠关节软骨内的 Smad2、3 mRNA 的表达增

高,其蛋白水平也是相应增高,这可能是因为鹿茸提高了 TGF- β 和其受体的表达,同时激活了其下游 Smad2/3 信号通路,促进了该信号的转导,抑制了软骨细胞的肥大化和终末分化。正如 Yao JY 等^[8]所认为的: TGF- β /Smad 信号能够抑制软骨细胞的肥大化,保持关节软骨细胞的功能。在麦尔软骨中研究发现^[9],强烈表达的 Smad2、3 可能对软骨细胞的增殖及细胞外基质合成方面具有重要的调控作用,而且 Smad3 的激活增强了核因子 Sox9 与 CBP/p300 的结合,从而促进了软骨细胞的特异性增殖基因 COL2A1 基因的表达^[10]。最近的研究表明,缺乏 Smad2/3 信号通路可导致软骨细胞终末分化,而过表达 Smad2、3 可以阻止这种情况的发生^[11,12]。可见,Smad2、3 对软骨细胞的增值、分化起到重要的调控作用,鹿茸由于提高了 Smad2、3 的表达从而促进了关节软骨的修复。

灌胃后 6 周时,鹿茸低、高剂量组 Smad2、3 基因和蛋白的表达量没有继续增高反而降低,这可能是因为 TGF- β 信号通路中,Smad 信号虽是其最重要的下游信号分子之一,但同时还有其他一些信号通路起着转导作用,包括 MAPK、Rho、phosphatidylinositol-3-kinase 通路等^[13],调控着软骨细胞的增殖和分化。采用基因芯片技术对关节炎患者进行分析的结果也显示,多种信号通路参与了关节炎的发生、发展^[14]。Mailhot G 等^[15]发现 Smad1/5/8 信号通路的激活,可以导致软骨细胞的终末分化和肥大化,而用氮胞酸作用于软骨细胞,不仅可以减弱 Smad2/3 信号的转导,而促进 Smad1/5/8 信号的转导,同时亦能提高 X 型胶原和碱性磷酸酶的表达。这些研究表明 Smad1/5/8 信号通路在软骨终末分化中也起到重要的作用^[16]。可见,在软骨的修复阶段,包括 TGF- β /Smad 等多种信号通路参与了其中的软骨细胞增殖、分化过程,本实验中,6 周后,Smad 2/3 的表达虽有下降,但软骨的修复仍然在继续,这表明其他信号通路在此时起到了关键性作用,具体是哪条通路和因子的启动,本实验尚未涉及,有待于后期进一步的深入研究。

通过本次实验,可见:(1)鹿茸通过激活 Smad2/3 信号通路,促进了关节软骨的修复;(2)Smad2/3 在后期表达的降低,表明软骨的修复可能是多条信号通路和因子相互的交谈的结果,在庞大的交织网中,各种信号相互协调,对软骨细胞的增殖和分化起到调控作用,下一步,应对这种变化做进一步的研究,以明确鹿茸修复软骨的机制。

参 考 文 献

- [1] Wang H, Zhang J, Sun Q, et al. Altered gene expression in articular chondrocytes of Smad3 (exS/ex8) mice, revealed by gene profiling using microarrays[J]. J Genet Genomics, 2007, 34(8): 698-708.
- [2] 翁梁,周秋丽,王丽娟,等. 鹿茸多肽促进表皮和成纤维细胞增殖及皮肤创伤愈合[J]. 药学学报, 2001, 36(11): 817-820.
- [3] 翟吉良,翁习生,邱贵兴. 骨关节炎动物模型的建立及选择[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(11): 843-845.
- [4] 中华医学会编著. 临床技术操作规范. 病理学分册[M]. 北京:人民军医出版社, 2004:37-41.
- [5] 黄培堂译. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2008: 138-141.
- [6] Yagi K, Goto D, Hamamoto T, et al. Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3[J]. J Biol Chem, 1999, 274(2): 703-709.
- [7] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily[J]. Science, 2002, 296(5573): 1646-1647.
- [8] Yao JY, Wang Y, An J, et al. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis[J]. Eur J Human Genet, 2003, 11(9): 714-717.
- [9] Ito Y, Bringas P, Mogharei A, et al. Receptor-regulated and inhibitory Smads are critical in regulating transforming growth factor beta-mediated Meckel's cartilage development[J]. Dev Dyn, 2002, 224(1): 69-78.
- [10] Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, et al. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8343-8350.
- [11] Li TF, Darowish M, Zuscik MJ, et al. Smad3-deficient chondrocytes have enhanced BMP signaling and accelerated differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(1): 4-16.
- [12] Yang X, Chen L, Xu X, et al. TGF- β /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage[J]. J Cell Biol, 2001, 153(1): 35-46.
- [13] Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling[J]. Cell Res, 2009, 19(1): 128-139.
- [14] Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, et al. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodeling, Wnt and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signaling[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(5): 100-121.
- [15] Mailhot G, Yang M, Mason-Savas A, et al. BMP-5 expression increases during chondrocyte differentiation *in vivo* and *in vitro* and promotes proliferation and cartilage matrix synthesis in primary chondrocyte cultures[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(1): 56-64.
- [16] Zuscik MJ, Baden JF, Wu Q, et al. 5-azacytidine alters TGF- β and BMP signaling and induces maturation in articular chondrocytes[J]. J Cell Biochem, 2004, 92(2): 316-331.

(收稿:2013-02-27 修回:2013-11-15)