文章编号:1000-5404(2013)10-0917-05

论著

阻断 TGF-β/TGF-βR Ⅰ通路对 ATDC5 细胞增殖、分化及细胞外基质的影响

王 权,戚华兵,王晓凤,朱 莹,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,骨代谢与修复中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 研究转化生长因子βⅠ型受体(transforming growth factor beta type Ⅰ receptor, TGF-βRⅠ)阻断剂 SB-505124 对软骨细胞增殖、分化及细胞外基质的影响与机制。**方法** 利用 Western blot 检测不同浓度的 SB-505124 处理后,前软骨细胞系 ATDC5 中 p-Smad2/3 的变化。MTT 法检测 SB-505124 处理对 ATDC5 细胞生长、增殖的影响及时间、浓度依赖性效应。Western blot 检测 c-Myc 蛋白水平的变化。Real-time PCR 检测 SB-505124 处理后软骨分化、细胞外基质合成及降解相关分子 Collagen Ⅱ、Aggrecan 及 Adamts5 表达与变化,并利用阿尔新蓝染色法检测 SB-505124 处理对 ATDC5 细胞中蛋白聚糖合成的影响。**结果** Western blot 检测结果示:SB-505124 处理 ATDC5 细胞明显抑制 TGF-β1 激活的 p-Smad2/3,并呈浓度依赖性;MTT 检测结果示:SB-505124 浓度和时间依赖性的抑制 ATDC5 细胞增殖;Real-time PCR 检测结果示:SB-505124 处理明显抑制 ATDC5 细胞中 Collagen Ⅱ、Aggrecan 的表达,同时上调了 Adamts5 的表达;阿尔新蓝染色结果提示 SB-505124 处理明显抑制 ATDC5 细胞中蛋白聚糖的合成。**结论** 利用 SB-505124 阻断内源性 TGF-β 信号,可抑制软骨细胞增殖、分化及细胞外基质的合成,同时促进细胞外基质的降解。

[关键词] 转化生长因子βⅠ型受体;SB-505124;ATDC5;细胞增殖;细胞外基质
[中图法分类号] R322.71;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Effect of blocking TGF-β/TGF-βRI signaling pathway on proliferation, differentiation and extracellular matrix of ATDC5 cells

Wang Quan, Qi Huabing, Wang Xiaofeng, Zhu Ying, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Center of Bone Metabolism and Repair, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of transforming growth factor beta type Ⅰ receptor (TGF-βRⅠ) inhibitor SB-505124 on the proliferation, differentiation and extracellular matrix of chondrocytes. **Methods** The expression of p-Smad2/3 in ATDC5 cells that were treated with different concentrations of SB-505124 was analyzed by Western blotting. The effect of SB-505124 on proliferation of ATDC5 cells was detected by MTT assay. The effect of SB-505124 on the expression of c-Myc protein was analyzed by Western blotting. The effect of SB-505124 on the markers of cell differentiation and extracellular matrix, including collagen Ⅱ, aggrecan and ADAMTS5 were analyzed by real-time PCR. The effect of SB-505124 on expression of sulfated proteoglycans was measured by Alcian blue staining. **Results** Western blotting results showed that the treatment with SB-505124 induced a decline of phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3), including carboxyl termini and linker region stimulated by TGF-β1 in ATDC5 cells. MTT assay results demonstrated that SB-505124 significantly inhibited ATDC5 cell proliferation in a dose-and time-dependent manner, and the expression of c-Myc protein was also inhibited. Real-time PCR showed that collagen Ⅱ and aggrecan were inhibited by SB-505124, while ADAMTS5 was elevated by SB-505124. Alcian blue staining showed that the staining intensity was reduced in SB-505124 treated cells. **Conclusion** SB-505124 can block endogenous TGF-β signaling

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81030036)
[通信作者] 陈 林,E-mail:linchen70@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130312.1339.003.html(2013-03-12)

pathway to inhibit cell proliferation, cell differentiation and synthesis of extracellular matrix, and to promote the degradation of extracellular matrix.

[**Key words**] transforming growth factor beta type Ⅰ receptor; SB-505124; ATDC5; cell proliferation; extracellular matrix

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81030036). Corresponding author: Chen Lin, E-mail: linchen70@163.com

转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGF-β)是TGF-β超家族成员中最具有代表性的成员。TGF-β通过与TGF-β受体(TGF-βR)结合激活下游信号通路,广泛参与机体多种重要的病理生理过程,在组织器官发育,肿瘤发生、发展以及组织器官纤维化、心血管疾病发生中发挥重要作用。TGF-β/TGF-βR信号通路有望成为治疗相应疾病新的治疗靶点[1]。目前已合成多种TGF-β/TGF-βR信号通路阻断剂,包括针对TGF-β配体的单克隆抗体和反义核苷酸以及针对TGF-β受体的阻断剂,为治疗多种TGF-β信号异常所致疾病提供了可能。TGF-β在骨骼发育,特别是软骨发生、发展及关节软骨稳态维持方面发挥重要作用,使用TGF-β/TGF-βR信号通路阻断剂治疗TGF-β异常所致疾病是否会影响软骨细胞的增殖、分化及细胞外基质的合成目前尚不清楚。小鼠前软骨细胞系ATDC5是目前研究各种药物对软骨内成骨过程中软骨细胞不同分化阶段作用的极好细胞模型[2]。本实验以该细胞为研究对象,利用TGF-βⅠ型受体(transforming growth factor beta type Ⅰ receptor, TGF-βRⅠ)阻断剂SB-505124,从细胞的增殖、分化及细胞外基质合成等方面探讨TGF-β/TGF-βR信号通路阻断剂对软骨细胞增殖、分化及细胞外基质合成的影响与机制。

1 材料与方法

1.1 材料

ATDC5细胞由美国纽约大学医学中心整形外科刘传聚教授惠赠,DMEM/F12培养基、胎牛血清、青/链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶均购自Hyclone公司,阿尔新蓝、ITS诱导剂、ALK5阻断剂(SB-505124)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、β-actin抗体均购自Sigma公司,TGF-β1购自Peprotech公司,anti-Smad2/3、anti-Phospho-Smad2 (Ser245/250/255)、anti-Phospho-Smad2 (Ser465/467)均购自Cell Signaling Technology公司,anti-c-Myc,HRP标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗购自Santa Cruz公司,BCA蛋白定量试剂盒、ECL化学发光试剂盒均购自Pierce公司,胶片购自Kodak公司,RNA反转录试剂盒、定量PCR反应试剂盒(SYBRTM Premix Ex TaqTM Kit)均购自Takara公司,蛋白酶抑制剂购自Roche公司。

1.2 方法

1.2.1 ATDC5细胞复苏、培养和传代 冻存的细胞从液氮罐中取出,迅速置于37 ℃水浴锅震荡解冻1~2 min,超净工作台中转移至15 mL离心管,800 r/min离心4 min,弃去上清,完全培养基(DMEM/F12含5%胎牛血清及100 U/mL青/链霉素)吹打混匀接种于6 cm皿,置于37 ℃含5% CO_2恒温培养箱培养,24 h后换液,以后每隔1 d换液1次,待细胞融合至90%以上,以0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 Western blot检测SB-505124在ATDC5细胞中对TGF-β1下游信号通路的阻断效果 ATDC5细胞接种于12孔板,共7个孔,待细胞融合达90%以上,无血清饥饿12~16 h后,给予不同浓度(0.5、1、5、10 μmol/mL)SB-505124预处理4~7孔细胞30 min,然后以TGF-β1、TGF-β1+DMSO或TGF-β1+不同浓度(0.5、1、5、10 μmol/mL)SB-505124同时处理2~7孔细胞30 min,其中第1孔不做任何处理,为空白对照组。含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 10 mmol/L Tris-HCl, pH=7.8,每10毫升细胞裂解液中加入蛋白酶抑制剂1片)收集总蛋白并用BCA法测定蛋白浓度,行Western blot检测TGF-β1激活的Smad信号相关分子的表达与变化,包括Smad2/3、Phospho-Smad2 (Ser245/250/255)、Phospho-Smad2 (Ser465/467)及内参β-actin。

1.2.3 Western blot检测SB-505124对c-Myc分子的蛋白水平的影响 细胞接种于12孔板,待细胞融合达90%以上,第1孔不做任何处理为空白对照组,其余各孔分别给予不同浓度(1、5、10 μmol/mL)SB-505124处理48 h,含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液收集总蛋白并用BCA法测定蛋白浓度,行Western blot检测c-Myc及内参β-actin蛋白水平的变化。

1.2.4 MTT法检测细胞增殖 对数生长的ATDC5细胞以5 000/孔接种于96孔板,每孔100 μL,每组6个复孔,12 h后加入含有不同浓度(1、2.5、5、10 μmol/mL)SB-505124的完全培养基处理细胞,每隔2天换液1次,处理3 d后进行检测。时间依赖性实验中,加入5 μmol/mL SB-505124处理至不同的时相点(1、3、5 d)。测定孔每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),继续培养4 h后终止培养,吸去培养基,每孔加入150 μL DMSO,室温避光震荡10 min,使结晶充分溶解,在酶标490 nm处测定每孔光密度值[D(490)值]。细胞抑制率=[对照组D(490)-实验组D(490)]/对照组D(490)×100%

1.2.5 ATDC5细胞软骨分化诱导 Micromass培养:ATDC5细胞经0.25%胰蛋白酶消化后给予完全培养基重悬计数,调整

细胞浓度为10^7/mL,取10 μL细胞悬液滴于12孔板中,置于37 ℃含5% CO_2恒温培养箱内培养1 h后,分为2组,分别加入含ITS(含5.5 μg/mL人转铁蛋白、3×10^{-8} mol/L亚硒酸钠、10 μg/mL牛胰岛素)完全培养基1 mL(对照组)和同时含ITS及10 μmol/mL SB-505124的完全培养基1 mL(SB-505124处理组)进行软骨分化诱导,置于恒温培养箱内继续培养,隔天换液,连续培养7 d。

1.2.6 阿尔新蓝染色 取分化诱导7 d的ATDC5细胞,弃培养基,PBS漂洗2次,4%多聚甲醛室温固定1 h后,PBS漂洗3次,每次3 min,加入1%阿尔新蓝染色液(1 g阿尔新蓝溶于含0.1 mol/L HCl蒸馏水)室温孵育15 min,蒸馏水冲洗,体视学显微镜(×20)采集图像。

1.2.7 Real-time PCR检测Collagen Ⅱ、Aggrecan、Adamts5表达 采用Trizol法提取经过7 d分化诱导的ATDC5细胞总mRNA,按照反转试剂盒说明书进行逆转录反应,按照定量试剂盒说明配制反应体系,利用MX3000P定量PCR仪检测目的基因的表达与变化,各样本目的基因的表达强度用其对应的内参基因(环孢素A结合蛋白Cyclophillin A)的量进行校正,每次均设3个复孔。PCR引物序列:内参CyclophilinA基因上游引物:5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3′,下游引物:5′-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3′,扩增产物长度82 bp;Collagen Ⅱ基因上游引物:5′-CTGGTGGAGCAGCAAGAGCAA-3′,下游引物:5′-CAGTGGACAGTAGACGGAGGAAAG-3′,扩增产物长度156 bp;Aggrecan基因上游引物:5′-CCTGCTACTTCATCGACCCC-3′,下游引物:5′-AGATGCTGTTGACTCGAACCT-3′,扩增产物长度150 bp;Adamts5基因上游引物:5′-GGAGCGAGGCCATTTACAAC-3′,下游引物:5′-CGTAGACAAGGTAGCCCACTTT-3′,扩增产物长度110 bp。扩增条件为95 ℃ 30 s;[95 ℃ 5 s(变性),57 ℃ 20 s(退火),72 ℃ 15 s(延伸)]×40个循环;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s,MX3000P定量PCR仪自动计算样本的Ct值和目的基因相对含量。

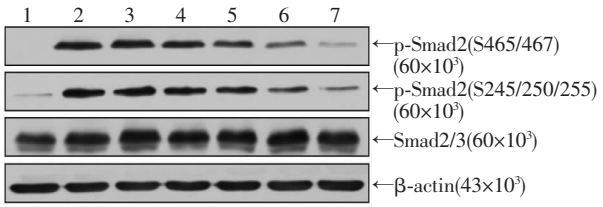
1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行独立样本t检验。

2 结果

2.1 ATDC5细胞内SB-505124对TGF-β信号通路的影响

与空白对照组比较,TGF-β1处理明显激活Smad2分子C-末端[Phospho-Smad2 (Ser465/467)]及Linker区[Phospho-Smad2 (Ser245/250/255)]磷酸化,提示TGF-β1能有效激活ATDC5细胞中Smad2蛋白的磷酸化,同时TGF-β1 + DMSO处理细胞相比TGF-β1处理组,p-Smad2蛋白水平没有明显变化,提示DMSO对TGF-β1介导的Smad2蛋白的磷酸化没有影响。而不同浓度SB-505124处理后,TGF-β1激活的Smad2蛋白磷酸化明显降低,并呈浓度依赖性,提示SB-505124在ATDC5细胞中有效并明显抑制TGF-β1激活的Smad2蛋白的磷酸化。见图1。



1:空白对照组;2:TGF-β1处理组;3:TGF-β1 + DMSO处理组;4:TGF-β1 +0.5 μmol/mL SB-505124处理组;5:TGF-β1 +1 μmol/mL SB-505124处理组;6:TGF-β1 + 5 μmol/mL SB-505124处理组;7:TGF-β1 +10 μmol/mL SB-505124处理组

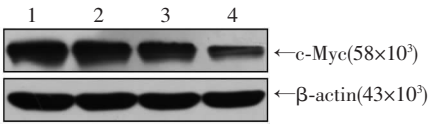
图1 Western blot检测SB-505124抑制TGF-β1激活的Smad2蛋白的磷酸化

2.2 MTT法检测SB-505124对ATDC5细胞的增殖的影响

MTT法检测显示:给予不同浓度(1、2.5、5、10 μmol/mL)SB-505124处理ATDC5细胞3 d,随着浓度增加,SB-505124对ATDC5细胞的生长抑制效果越来越明显,抑制率分别为(17.00±2.64)%、(31.13±0.48)%、(43.33±2.08)%、(54.33±3.51)%,呈浓度依赖效应,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。在前期实验的基础上,我们以5 μmol/mL SB-505124分别处理ATDC5细胞1、3、5 d,MTT检测结果显示:随着时间延长,SB-505124对ATDC5细胞的生长抑制效果越来越明显,在1、3、5 d抑制率分别为(18.66±3.51)%、(42.33±3.05)%、(62.42±2.96)%,呈时间依赖效应,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 Western blot检测SB-505124对c-Myc蛋白水平的影响

与对照组相比,SB-505124明显抑制c-Myc蛋白水平的表达,并呈浓度依赖效应(图2),提示SB-505124抑制ATDC5细胞的增殖可能与下调c-Myc蛋白水平有关。



1:空白对照组;2:1 μmol/mL SB-505124处理组;3:5 μmol/mL SB-505124处理组;4:10 μmol/mL SB-505124处理组

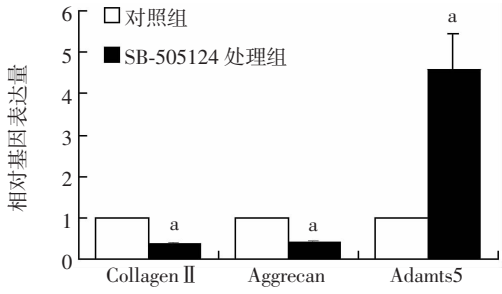
图2 Western blot检测SB-505124抑制c-Myc蛋白的表达

2.4 Real-time PCR检测SB-505124对软骨分化和软骨外基质合成及降解标志物的影响

Real-time PCR结果显示,相比对照组,ITS诱导培养7 d的ATDC5细胞中加入SB-505124处理,可明显抑制Collagen Ⅱ、Aggrecan基因的表达($P<0.01$),同时促进Adamts5基因的表达($P<0.01$,图3)。

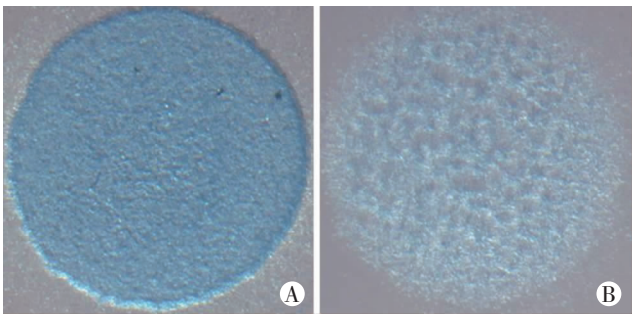
2.5 阿尔新蓝染色检测SB-505124对软骨蛋白聚糖合成的影响

对经ITS进行软骨诱导分化7 d的ATDC5细胞的Micromass行阿尔新蓝染色，体视学显微镜下观察拍照，与对照组相比，SB-505124处理组明显抑制蛋白聚糖的表达，表现为处理组细胞外基质阿尔新蓝染色明显变浅(图4)。



a：$P<0.01$，与对照组比较

图3 Real-time PCR检测SB-505124对软骨分化和软骨外基质合成及降解标志物的影响



A：对照组；B：SB-505124处理组

图4 体视学显微镜下观察阿尔新蓝染色后细胞外基质着色情况 (×20)

3 讨论

TGF-β信号通过激活经典与非经典的Smad通路参与了细胞增殖、分化、迁移、凋亡等生理过程的调节，在胚胎发育、创伤愈合、肿瘤发生、造血及炎症反应等生理病理过程中发挥重要作用[3]。经典的TGF-β/Smad信号通路包括配体、受体及Smad蛋白。哺乳动物中主要存在TGF-β 1～3亚型，TGF-β受体属于丝氨酸/苏氨酸激酶受体家族，包括TGF-βRⅠ、TGF-βRⅡ、TGF-βRⅢ，其中TGF-βRⅡ具有自身磷酸化功能，直接与TGF-β结合。TGF-βRⅠ又称ALK5，有高度保守的富含甘氨酸及苏氨酸残基的GS区，该GS区被TGF-βRⅡ磷酸化后使TGF-βRⅠ具有激酶活性。参与TGF-β信号通路的Smad蛋白包括通用型Smad4、受体激活型Smad2、Smad3及抑制型Smad7。经典TGF-β/Smad信号通路的激活过程大致为：TGF-βs首先与TGF-βRⅡ结合，TGF-βRⅡ发生二聚化并导致自身磷酸化，磷酸化的TGF-βRⅡ进一步磷酸化TGF-βRⅠ的GS区，导致TGF-βRⅠ受体丝氨酸/苏氨酸激酶激活，从而特异性识别并激活Smad2/3，磷酸化其MH2区SSXS结构，激活后的Smad2/3与受体解离并与细胞质内Smad4结合，形成异源复合物，二者共同入核与核内相应转录因子结合启动调控基因的表达[3]。

调控TGF-β信号通路有望成为新的治疗靶点，目前已研制多种TGF-β/TGF-βR信号阻断剂，包括针对TGF-β配体的单克隆抗体及反义核苷酸，并且部分已在临床Ⅲ期试验中证明是安全有效的[1]。由于TGF-β配体的多样性，阻断单一配体并不能完全阻断TGF-β信号。TGF-βRⅠ(ALK5)作为TGF-β信号传递过程中的重要分子，抑制ALK5活性，阻断ALK5与Smad2/3的结合或ALK5对Smad2/3的磷酸化被认为是阻断TGF-β异常所致疾病的重要靶点。针对这一靶点，目前已合成了多种ALK5阻断剂，如SB-431542、SB-505124、LY-364947及A83-01等，临床前试验表明ALK5阻断剂在肿瘤及纤维化疾病动物模型疗效显著[4-8]，并有研究提示SB-505124是目前最有效和特异的ALK5阻断剂[9]。本实验表明，SB-505124可以明显抑制ATDC5细胞中TGF-β1激活的p-Smad2，提示全身应用这些有效的ALK5抑制剂可能会对软骨细胞的生物学特性产生影响。

研究[10-11]表明TGF-β在骨骼发育，特别是软骨发生、发展及关节软骨稳态维持方面发挥重要作用。在间充质细胞特异敲除TGF-βRⅡ(Prx1-Cre小鼠与TGF-βRIIflox/flox交配)或ALK5(Dermo1-Cre小鼠与缺失ALK5flox/flox交配)，抑制TGF-β信号可导致小鼠软骨发育畸形、肢体短小及关节融合。过表达显性负突变的TGF-βRⅡ或者全身敲除Smad3均导致关节软骨的异常肥大分化，被骨组织替代，出现关节炎[12-13]。但是利用TGF-β阻断剂特别是ALK5阻断剂治疗TGF-β异常所致疾病是否会影响骨骼特别是软骨的发育目前尚不清楚。

一般认为TGF-β通过抑制c-Myc和上调p21抑制多种细胞，特别是肿瘤细胞的增殖[14-15]，但体外细胞实验表明，TGF-β可通过激活c-Myc等原癌基因或上调其他生长因子促进鄂成骨细胞和成纤维细胞的增殖[16-17]。本研究发现，SB-505124处理ATDC5可明显抑制软骨细胞的增殖，呈浓度和时间依赖性，可能与SB-505124抑制c-Myc表达有关。

研究[18]表明TGF-β促进软骨细胞外基质合成,在软骨细胞分化早期,TGF-β激活的Smad3与转录因子Sox9形成复合物,募集CREB/p300到Ⅱ型胶原(collagen Ⅱ)启动子上促进其表达。给予TGF-β1处理ATDC5细胞,一方面通过快速磷酸化经典Smad通路,启动基质蛋白如软骨聚集蛋白聚糖(aggrecan)表达,另一方面通过p38/Erk通路维持基质蛋白如软骨聚集蛋白聚糖的长期表达[19]。本研究发现SB-505124处理ATDC5细胞后,Ⅱ型胶原及软骨聚集蛋白聚糖合成明显降低,蛋白多糖合成降低,而Adamts5 mRNA水平明显增加。Adamts5属于含凝血酶结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)家族成员之一,是软骨聚集蛋白聚糖(aggrecan)主要降解酶,敲除Adamts5可缓解小鼠关节炎表型[20-21]。SB-505124处理后抑制软骨早期分化和细胞外基质的合成,促进软骨基质的降解,提示在应用ALK5信号通路抑制剂治疗肿瘤等情况下可能会导致关节炎的发生,但本结论尚需更多的实验和临床研究证据。

参考文献:

[1] Akhurst R J, Hata A. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 790-811.

[2] Yao Y, Wang Y. ATDC5: An excellent *in vitro* model cell line for skeletal development[J]. J Cell Biochem, 2012, [Epub ahead of print].

[3] Massague J. TGFβ signalling in context[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(10): 616-630.

[4] Ganapathy V, Ge R, Grazioli A, *et al*. Targeting the Transforming Growth Factor-beta pathway inhibits human basal-like breast cancer metastasis[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 122.

[5] Connolly E C, Saunier E F, Quigley D, *et al*. Outgrowth of drug-resistant carcinomas expressing markers of tumor aggression after long-term TβRI/II kinase inhibition with LY2109761[J]. Cancer Res, 2011, 71(6): 2339-2349.

[6] Zhang M, Kleber S, Rohrich M, *et al*. Blockade of TGF-β signaling by the TGFβR-Ⅰ kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2011, 71(23): 7155-7167.

[7] Melisi D, Ishiyama S, Sclabas G M, *et al*. LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type Ⅰ and type Ⅱ dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(4): 829-840.

[8] Tran T T, Uhl M, Ma J Y, *et al*. Inhibiting TGF-beta signaling restores immune surveillance in the SMA-560 glioma model[J]. Neuro Oncol, 2007, 9(3): 259-270.

[9] Vogt J, Traynor R, Sapkota G P. The specificities of small molecule inhibitors of the TGFβ and BMP pathways[J]. Cell Signal, 2011, 23(11): 1831-1842.

[10] Seo H S, Serra R. Deletion of Tgfbr2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints[J]. Dev Biol, 2007, 310(2): 304-316.

[11] Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, *et al*. Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development[J]. Dev Biol, 2009, 332(2): 325-338.

[12] Serra R, Johnson M, Filvaroff E H, *et al*. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis[J]. J Cell Biol, 1997, 139(2): 541-552.

[13] Yang X, Chen L, Xu X, *et al*. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage[J]. J Cell Biol, 2001, 153(1): 35-46.

[14] Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, *et al*. TGF-β - an excellent servant but a bad master[J]. J Transl Med, 2012, 10: 183.

[15] 于宏, 姜政, 王丕龙. pEGFP-N1-TGF-β1重组质粒对结肠癌细胞增殖、细胞周期及侵袭性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 943-946.

[16] Zhu X, Ozturk F, Liu C, *et al*. Transforming growth factor-β activates c-Myc to promote palatal growth[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(10): 3069-3085.

[17] Xiao L, Du Y, Shen Y, *et al*. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway[J]. Front Biosci, 2012, 17: 2667-2674.

[18] 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.

[19] Watanabe H, de-Caestecker M P, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(17): 14466-14473.

[20] Glasson S S, Askew R, Sheppard B, *et al*. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis[J]. Nature, 2005, 434(7033): 644-648.

[21] Stanton H, Rogerson F M, East C J, *et al*. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*[J]. Nature, 2005, 434(7033): 648-652.

(**收稿**:2013-01-09;**修回**:2013-01-24)

(编辑 龙 亮)