文章编号:1000-5404(2013)11-1053-05

论著

EMILIN3基因促进人骨髓间充质干细胞增殖及向软骨细胞分化

秦 川,张 峡,王直兵,郭星宇,张 瑗,郝 勇 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 探讨EMILIN3基因对人骨髓间充质干细胞(human marrow mesenchymal stem cells,hMSCs)增殖及向软骨细胞分化的影响。**方法** 构建EMILIN3腺病毒表达载体,细胞分成hMSCs、hMSCs+对照腺病毒、hMSCs+EMILIN3腺病毒3组,MTT法检测细胞的增殖情况,Real-time PCR法检测上述细胞向软骨细胞诱导后CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA的表达。**结果** hMSCs+EMILIN3腺病毒组细胞增殖能力明显快于hMSCs+对照腺病毒组和hMSCs组($P<0.05$),hMSCs+对照腺病毒组与hMSCs组增殖能力相比有所降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。hMSCs+EMILIN3腺病毒组细胞中CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA的相对表达量与hMSCs+对照腺病毒组、hMSCs组相比明显增加($P<0.05$,$P<0.01$)。hMSCs+对照病毒组与hMSCs组相比有所增加,但没有明显的趋势($P>0.05$)。**结论** EMILIN3促进hMSCs增殖,并且可以增加hMSCs向软骨细胞诱导分化。

[关键词] 腺病毒载体;人骨髓间充质干细胞;软骨细胞;EMILIN3基因
[中图法分类号] R322.71; R329.26; R394.2 [文献标志码] A

EMILIN3 stimulates human mesenchymal stem cells proliferation and differentiation into cartilage cells *in vitro*

Qin Chuan, Zhang Xia, Wang Zhibin, Guo Xingyu, Zhang Yuan, Hao Yong (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of EMILIN3 gene on the proliferation of human marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) and the differentiation into cartilage cells. **Methods** The adenovirus plasmid of EMILIN3 was constructed. The cells were transfected with the plasmid or the blank vector, and the cells without transfection served as control. The proliferation of these cells was detected by MTT assay. The expression of CollagenⅡ, Aggrecan and SOX9 at mRNA level was also detected with real-time PCR. **Results** The proliferation was significantly increased in the hMSCs infected by the adenovirus plasmid of EMILIN3 than the cells with blank vector infection and control cells ($P<0.05$). But there was no difference in the proliferation between the 2 later groups of cells ($P>0.05$). The expression of CollagenⅡ, Aggrecan and SOX9 was increased by 2.5, 2.7 and 2.1 times respectively in the hMSCs infected by the adenovirus with EMILIN3 than that in the hMSCs infected by the control adenovirus ($P<0.05$). Compared with the hMSCs, there was no difference in the expression of above genes in the hMSCs infected by the blank vector. **Conclusion** EMILIN3 transfection enhances hMSCs proliferation and stimulate the cells to differentiate into cartilage cells.

[**Key words**] adenovirus vector; human marrow mesenchymal stem cells; cartilage cells; EMILIN3

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171720). Corresponding author: Zhang Xia, E-mail: Zhangsw199254330@163.com

关节软骨缺损后其自身修复能力有限,导致结构和功能上不可逆的损害。目前,临床治疗关节软骨缺损的方法有骨髓刺激修复和软骨移植修复,前者疗效随时间逐渐下降;后者材料来源受限,且异体组织具有免疫原性。随着生物医学工程的发展,自体软骨细胞因其功能相同、无免疫排斥反应,被用作组织工程软骨的种子细胞,但软骨细胞体外扩增能力有限,且取材局限较大[1-4],而间充质干细胞具有多向分化潜能,来源广泛,其中的骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells,MSCs)增殖能力强,可在体外大规模扩增而不丢失多向分化潜能,并且异体移植排斥反应小,有望成为组织工程软骨理想的种子细胞[5-6]。人骨髓间充

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171720)
[通信作者] 张 峡,E-mail: Zhangsw199254330@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1408.001.html(2013-03-27)

质干细胞(hMSCs)向软骨细胞的分化需要特定的诱导环境,特别是需要一定的生长因子保证其迁移、增殖、存活及向软骨的分化潜能。目前,研究者已经发现部分信号分子具有调控MSCs迁移、增殖(PDGF-BB、FGF-2)和软骨分化(TGF-β1、TGF-β3、IGF-I)的作用[7-11]。EMILIN3是EMILIN基因家族(EMILIN1、EMILIN2、EMILIN3)的成员,在NH_2末端有半胱氨酸弹性蛋白微纤维富集区。Doi等[12]发现EMILIN3在软骨膜和发育的骨骼周围高表达,但是在成熟的成骨细胞几乎检测不到它的表达;在体外培养的hMSCs向软骨诱导过程中,随着时间的延长EMILIN3表达增加,推测此基因在骨骼的发育中可能发挥着重要作用。本研究拟通过检测EMILINN3对hMSCs增殖及向软骨分化的影响,以期为软骨修复提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

hMSCs及完全培养基购自赛业生物科技有限公司(广州),DNA标准(DL 2000)、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、*Taq*酶、dNTP、DH5α感受态细胞均购自TaKaRa公司(大连),*Eco*R Ⅰ购自美国NEB公司,1 kb DNA ladder Marker、反转录试剂盒购自Fermentas公司(深圳),质粒抽提试剂盒购自德国QIAGEN公司,腺病毒滴度测定试剂盒购自上海生博医学生物科技有限公司,MTT试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗人EMILIN3多克隆抗体购自美国药明康德-百奇生物科技有限公司(苏州),小鼠抗人GAPDH单克隆抗体和HRP标记的山羊抗兔/鼠抗IgG抗体购自美国Santa Cruz公司,地塞米松、丙酮酸钠均购自Sigma公司,rhTGF-β3购自Peprotech公司,Trizol购自美国Invitrogen公司,SYBR Green qRCR Mix购自TOYOBO生物科技有限公司(上海)。

1.2 EMILIN3腺病毒表达质粒构建

1.2.1 EMILIN3基因扩增 EMILIN3基因cDNA购自广州复能基因有限公司,测序正确后通过PCR进行基因扩增。反应体系:EMILIN3基因模板1 μL、H_2O 32.5 μL、5×Buffer 10 μL、dNTP(各2.5 mmol/L)4 μL、Primer(+)(10 μmol/L)1 μL、Primer(-)(10 μmol/L)1 μL、PrimeSTAR 0.5 μL等组成。循环条件:98 ℃预变性3 min,98 ℃变性10 s,55 ℃复性15 s,72 ℃延伸3 min,30个循环,最后72 ℃聚合10 min,获得2 336 bp的基因片段。上游:5′-CTCAAGCTTCGAATTCGCCAC-CATGGGCCGCCGCCGCCT-3′;下游:5′-CCATGGTGGCGAATTC-GTTGGCTTGCCCTGGCCG-3′。

1.2.2 EMILIN3腺病毒构建质粒 利用*Eco*R Ⅰ酶将pAdMax-Vector(CMV-EGFP-3Flag)腺病毒质粒线性化,电泳回收约4.77 kb的载体片段。同源重组反应体系:线性化pAdMax-Vector(40 ng/μL)5 μL、EMILIN3基因片段(40 ng/μL)5 μL、10×BSA(500 μg/mL)2 μL、10×Buffer 2 μL、In-Fusion Enzyme 0.5 μL、ddH_2O 5.5 μL,37 ℃孵育15 min,50 ℃孵育15 min,并设阳性对照和自连对照,转化大肠杆菌感受态细胞,37 ℃孵育16 h,挑取转化子进行菌落PCR鉴定。PCR阳性克隆鉴定反应体系:10×Buffer 2 μL、template 1 μL、dNTPs 1.6 μL、Primer(+)0.8 μL、Primer(-)0.8 μL、*Taq*聚合酶0.1 μL、ddH_2O 13.7 μL。循环条件:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,55 ℃复性30 s,72 ℃延伸30 s,进行30个循环,最后72 ℃聚合10 min。将阳性克隆送Invitrogen公司测序。PCR引物上游:5′-CTGGACAGCTTGCCCACTGAG-3′,下游:5′-CGTCGCCGTC-CAGCTCGA-CCAG-3′。

1.3 EMILIN3腺病毒包装和滴度测定

转染前1 d将293细胞接种在直径为10 cm的培养皿中,控制细胞转染时的融合度为70%~90%。将测序正确的含EMILIN3基因的腺病毒质粒与辅助包装质粒(pBHG lox ΔE1,3 Cre,Microbix公司)共转染293细胞7 h后换液,过夜培养后次日换液,此后隔2 d换1次液,10 d左右会出现病毒空斑,待细胞病变后通过密度梯度离心法纯化,利用上海生物医学生物科技有限公司腺病毒检测试剂盒AdTiter-EZ检测实验中包装的腺病毒滴度。

1.4 EMILIN3腺病毒感染hMSCs条件的优化

分别以10、50、100 3个感染梯度的感染复数(MOI)值病毒感染hMSCs,48 h后普通荧光显微镜观察感染效果,选择感染效果最好的MOI进行后续实验。

1.5 Western blot检测EMILIN3腺病毒感染hMSCs后EMILIN3蛋白的表达

将实验细胞分成3组:hMSCs、hMSCs+对照腺病毒、hMSCs+EMILIN3腺病毒组。收集前期复苏的hMSCs,配成1×10^5/mL的细胞悬液,接种到6孔板,第2天以MOI=100进行腺病毒感染,7 h后换液。感染后4 d左右收集细胞进行Western blot检测,用RIPA buffer裂解后测定蛋白浓度,每泳道上样20 μg,混合样品缓冲液5 μL,100 ℃加热5 min,10% SDS凝胶电泳,半干法转膜120 min,用TBST(含5%胎牛血清)室温封闭1 h,兔抗人一抗采用EMILIN3抗体(1∶300)4 ℃孵育过夜,山羊抗兔二抗(1∶400)37 ℃孵育2 h,ECL显影。

1.6 MTT检测EMINLIN3腺病毒感染前后hMSCs的增殖状态

细胞分组同1.5。按1.5方法进行接种和细胞感染,2 d后荧光显微镜下观察感染效率,选择感染效率在80%左右的孔中细胞接种到96孔板进行MTT实验。每组检测6个时间点:1、2、3、4、5、6 d,每个时间点重复3次,将测得的D(490)值绘制成生长曲线。

1.7 EMILIN3腺病毒感染前后hMSCs向软骨细胞诱导分化情况

细胞分组同1.5。按1.5方法进行接种和细胞感染,2 d后荧光显微镜下观察感染效率,待细胞融合率达到70%后,加入含有诱导剂(6.25 μg/mL胰岛素、1 mmol/L丙酮酸钠、1×10^{-7} mol/L地塞米松、1% ITS、10 ng/mL rhTGF-β3)的培养基进行诱导实验,诱导9 d后收集细胞,用Real-time PCR法检测hMSCs中Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)、聚集蛋白聚糖(Aggrecan)、性别决定基因9(SOX9)的基因表达水平。引物序列信息见表1。

表 1　引物序列信息

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物大小(bp)
Aggrecan	正义链:AGGCTATGAGCAGTGTGAACG	128
	反义链:GCACGCCATAGGTCCTGA	
Collagen Ⅱ	正义链:GCCTGGTGTCATGGGTTT	71
	反义链:GTCCCTTCTCACCAGCTTTG	
SOX9	正义链:TCCTCAGGCTTTGCGATTT	170
	反义链:TCCCAGCAGCACCGTTTT	
β-actin	正义链:AGGGGCCGGACTCGTCATACT	202
	反义链:GGCGGCACCACCATGTACCCT	

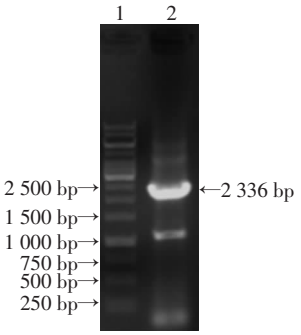
1.8　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件行 *t* 检验。

2　结果

2.1　人 EMILIN3 基因 PCR 扩增

PCR 扩增 EMILIN3 基因 CDS 区片段,电泳回收获得 2 336 bp 片段(图 1),与预期结果相符。

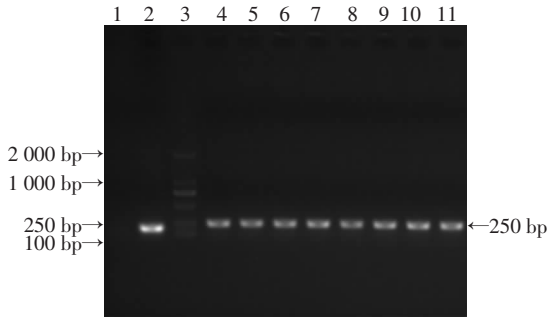


1:标准;2:EMILIN3

图 1　EMILIN3 基因 CDS 区 PCR 扩增结果

2.2　EMILIN3 腺病毒表达质粒阳性克隆鉴定

PCR 鉴定阳性克隆得到的片段大小为 250 bp,与预期的理论值相符(图 2),PCR 鉴定的阳性克隆经测序验证后与设计序列一致。



1:阴性对照(ddH_2O);2:空载组;3:DNA 标准(DL 2000);4 ~ 11:挑取的 8 个转化子

图 2　EMILIN3 腺病毒质粒的 PCR 鉴定

2.3　病毒滴度测定

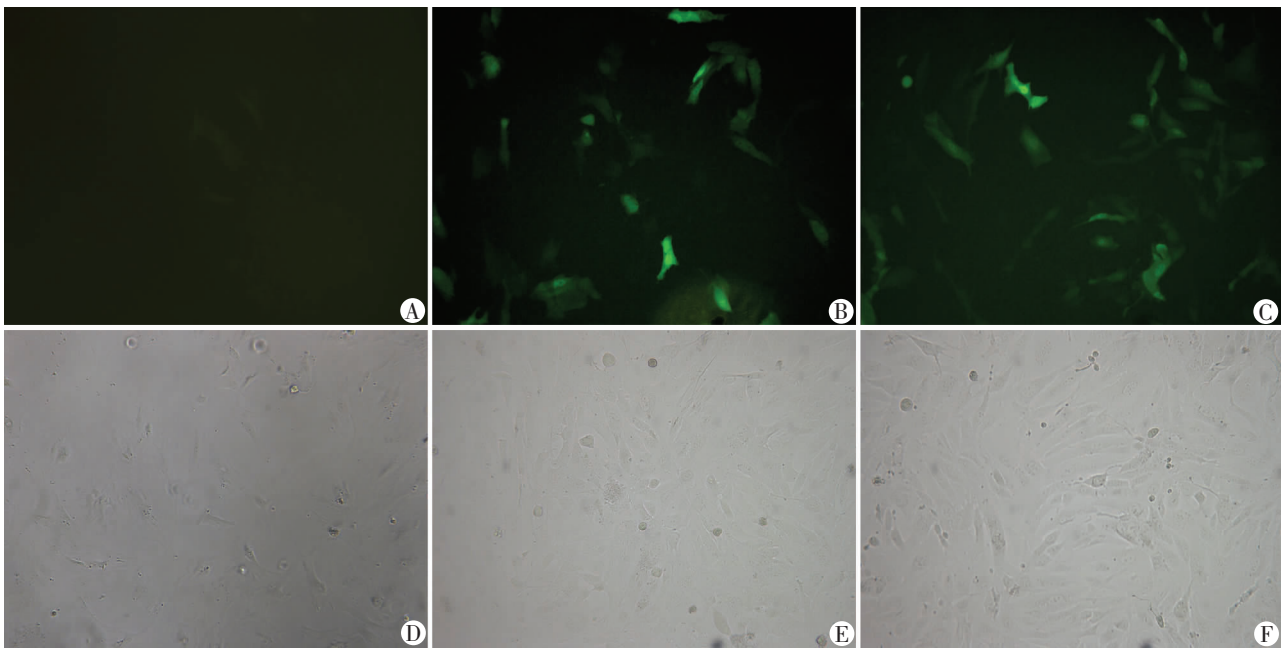
利用腺病毒滴度测定试剂盒测得对照腺病毒的滴度是 5×10^{10} IFU/mL,EMILIN3 病毒的滴度是 1.4×10^{11} IFU/mL。

2.4　腺病毒感染 hMSCs 条件优化

以 10、50、100 3 个梯度的 MOI 值病毒感染 hMSCs。荧光观察发现实验构建的腺病毒在 MOI = 100 时,感染效果最好(图 3)。

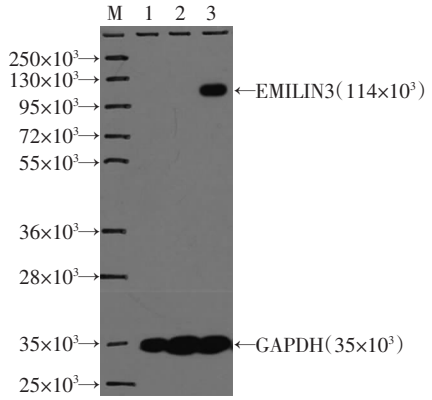
2.5　Western blot 检测 EMILIN3 腺病毒感染 hMSCs 后 EMILIN3 蛋白的表达

hMSCs、hMSCs + 对照腺病毒 2 组细胞检测不到 EMILIN3 蛋白的表达,hMSCs + EMILIN3 腺病毒组细胞在(95 ~ 130) × 10^3 处有阳性条带,其大小和 EMILIN3-GFP-Flag 融合蛋白(114 × 10^3)吻合(图 4)。



A、D:MOI = 10;B、E:MOI = 50;C、F:MOI = 100;A ~ C:荧光视野;D ~ F:白光视野

图 3　不同 MOI 腺病毒感染 hMSCs 效果　(荧光显微镜 ×200)

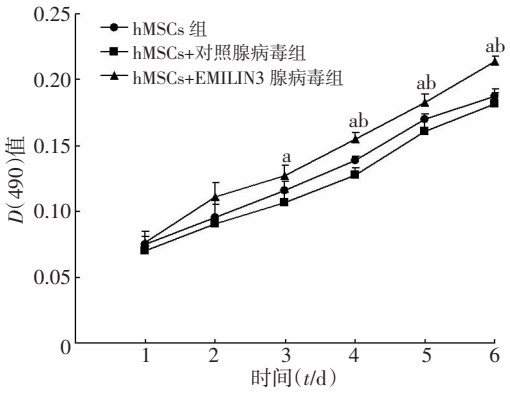


M:标准;1:hMSCs 组;2:hMSCs + 对照腺病毒组;3:hMSCs + EMILIN3 腺病毒组

图4 Western blot 检测 EMILIN3 腺病毒感染 hMSCs 后 EMILIN3 蛋白的表达

2.6 MTT 实验检测 EMILIN3 腺病毒感染 hMSCs 后细胞增殖能力

hMSCs + 对照腺病毒组细胞与 hMSCs 组细胞相比增殖能力降低,但差异均没有统计学意义($P > 0.05$);第 1、2 天,hMSCs + EMILIN3 腺病毒组细胞与 hMSCs + 对照腺病毒组细胞、hMSCs 组细胞相比差异均没有统计学意义($P > 0.05$)。第 3 ~ 6 天,hMSCs + EMILIN3 腺病毒组细胞 $D(490)$ 值与 hMSCs + 对照腺病毒组细胞相比有统计学差异($P < 0.05$)。第 4 ~ 6 天,hMSCs + EMILIN3 腺病毒组细胞 $D(490)$ 值与 hMSCs 组细胞相比有统计学差异($P < 0.05$)。见图 5。

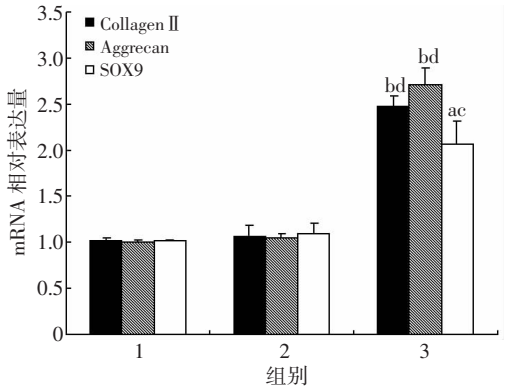


a:$P < 0.05$,与 hMSCs + 对照腺病毒组比较;b:$P < 0.05$,与 hMSCs 组比较

图5 MTT 实验检测 EMILIN3 腺病毒感染 hMSCs 后细胞增殖能力的变化

2.7 Real-time PCR 检测 hMSCs 向软骨诱导后 CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA 的表达

经过前期成软骨诱导后,3 组细胞均能检测到 CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA 的表达,说明诱导成功。hMSCs + EMILIN3 腺病毒组细胞中 CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA 的相对表达量与 hMSCs + 对照腺病毒组相比明显增加($t = 10.99$, $P < 0.01$;$t = 19.09$, $P < 0.01$;$t = 5.08$, $P < 0.05$)。hMSCs + EMILIN3 腺病毒组细胞中 CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA 的相对表达量与 hMSCs 组相比也明显增加($t = 20.11$, $P < 0.01$;$t = 16.76$, $P < 0.01$;$t = 7.03$, $P < 0.05$)。hMSCs + 对照腺病毒组与 hMSCs 组相比有所增加,但没有明显的趋势($P > 0.05$)。见图 6。



a:$P < 0.05$, b:$P < 0.01$,与 hMSCs + 对照腺病毒组比较;c:$P < 0.05$, d:$P < 0.01$,与 hMSCs 组比较

1:hMSCs 组;2:hMSCs + 对照腺病毒组;3:hMSCs + EMILIN3 腺病毒组

图6 Real-time PCR 检测 hMSCs 向软骨诱导后 CollagenⅡ、Aggrecan、SOX9 mRNA 的表达

3 讨论

近年来,由于 MSCs 具有多向分化潜能、来源丰富、易获得、免疫原性低等优点而被广泛应用于软骨修复研究。Planka 等[13-14]在豚鼠中利用 MSCs 有效地修复了损伤软骨。MSCs 向软骨细胞的分化高度依赖于细胞存活的局部微环境,受其中存在的生长因子影响明显。前期研究发现,PDGF-BB、FGF-2 可以促进 MSCs 增殖,TGF-β1、TGF-β3、IGF-I 等可诱导 MSCs 向软骨分化[6],但是有些实验则发现上述部分因子无法起到相应的作用。因此,需要继续优选能提高 MSCs 生长状态和成软骨定向分化的生长因子。

Doi 等[12]在小鼠胚胎中发现,EMILIN3 在软骨膜和发育的骨骼周围高表达,但是在成熟的成骨细胞几乎检测不到;在体外培养的 hMSCs 向软骨诱导过程中,随着时间的延长 EMILIN3 表达增加。因此,推测此基因在骨骼生成的过程中可能发挥着重要的作用。本研究通过构建 EMILIN3 表达腺病毒,研究其对 hMSCs 增殖和向软骨诱导分化的影响。图 2 ~ 4 显示,实验构建的 EMILIN3 表达腺病毒表达正常,能够正常感染 hMSCs,绿色荧光蛋白表达正常,可以为后期 EMILIN3 基因功能的研究奠定良好的基础;EMILIN3 在 hMSCs 中不表达,或表达量很低,这与 Doi 等[12]在体外培养的 hMSCs 中的检测结果一致。

为探索 EMILIN3 基因对 hMSCs 生长状态的影响,

本研究采用MTT实验检测EMILIN3对hMSCs增殖的影响。MTT结果显示,hMSCs+对照腺病毒组细胞与hMSCs组细胞相比增殖能力降低,但差异均没有统计学意义;hMSCs+EMILIN3腺病毒组细胞与hMSCs+对照腺病毒组细胞、hMSCs组细胞相比增殖速度均有升高。这说明EMILIN3可以促进hMSCs的增殖,有利于改善hMSCs的生长状态,但是其机制尚少见文献报道。Mongiat等[15]研究发现,同家族的EMILIN2能够增加人内皮细胞的增殖、存活和迁移能力,但腺病毒本身对hMSCs的增殖有一定的抑制作用,这可能与载体本身的毒性和细胞本身的耐受有关。

Schiavinato等[16]在小鼠胚胎中利用原位杂交技术也发现,EMILIN3在软骨膜和发育的骨骼周围高表达。本研究选取hMSCs向软骨分化的重要指标Aggrecan、SOX9、CollagenⅡ[17],通过Real-time PCR检测EMILIN3对hMSCs向软骨诱导分化后3个指标的影响。图6显示,hMSCs经诱导后hMSCs+EMILIN3腺病毒组细胞中Aggrecan、Sox9、CollagenⅡ表达均高于hMSCs+对照腺病毒组和hMSCs组,且差异明显。因此,可以推断EMILIN3能够促进hMSCs向软骨诱导分化。Schiavinato等[16]在HEK 293 T细胞中发现EMILIN3能够抑制proTGF-β1、proTGF-β2、proTGF-β3的活性,而成熟的TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3能够诱导MSCs向软骨分化。这似乎与EMILIN3促进hMSCs向软骨诱导分化有一定的矛盾之处,但是据此并不能说明EMILIN3抑制proTGF-β1、proTGF-β2、proTGF-β3的活性便可以降低TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3的蛋白活性,还需要通过实验进一步的求证。

综上所述,本实验检测到EMILIN3腺病毒可以促进hMSCs增殖和向软骨细胞的诱导分化,为EMILIN3作为候选的软骨修复生长因子提供了初步的实验依据,但是EMILIN3通过什么通路增强hMSCs增殖以及促进hMSCs向软骨细胞的诱导分化机制尚不清楚,还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Mithoefer K, McAdams T, Williams R J, *et al*. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis[J]. Am J Sports Med, 2009, 37(10): 2053-2063.

[2] Kang S W, Bada L P, Kang C S, *et al*. Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid[J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(3): 435-439.

[3] Strauss E, Schachter A, Frenkel S, *et al*. The efficacy of intra-articular hyaluronan injection after the microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions[J]. Am J Sports Med, 2009, 37(4): 720-726.

[4] Solheim E, Hegna J, Oyen J, *et al*. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee: results at 5 to 9 years[J]. Knee, 2010, 17(1): 84-87.

[5] Chung R, Foster B K, Xian C J. Preclinical studies on mesenchymal stem cell-based therapy for growth plate cartilage injury repair[J]. Stem Cells Int, 2011, 2011: 570125.

[6] Madry H, Cucchiarini M. Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair[J]. Croat Med J, 2011, 52(3): 245-261.

[7] Xian C J, Foster B K. Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2006, 1(2): 213-229.

[8] Chung R, Foster B K, Zannettino A C, *et al*. Potential roles of growth factor PDGF-BB in the bony repair of injured growth plate[J]. Bone, 2009, 44(5): 878-885.

[9] Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, *et al*. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(3): 914-919.

[10] Tang Q O, Shakib K, Heliotis M, *et al*. TGF-beta3: A potential biological therapy for enhancing chondrogenesis[J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(6): 689-701.

[11] Noth U, Steinert A F, Tuan R S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(7): 371-380.

[12] Doi M, Nagano A, Nakamura Y. Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(4): 888-893.

[13] Planka L, Gal P, Kecova H, *et al*. Allogeneic and autogenous transplantations of MSCs in treatment of the physeal bone bridge in rabbits[J]. BMC Biotechnol, 2008, 8: 70.

[14] Planka L, Necas A, Srnec R, *et al*. Use of allogenic stem cells for the prevention of bone bridge formation in miniature pigs[J]. Physiol Res, 2009, 58(6): 885-893.

[15] Mongiat M, Marastoni S, Ligresti G, *et al*. The extracellular matrix glycoprotein elastin microfibril interface located protein 2: a dual role in the tumor microenvironment[J]. Neoplasia, 2010, 12(4): 294-304.

[16] Schiavinato A, Becker A K, Zanetti M, *et al*. EMILIN-3, peculiar member of elastin microfibril interface-located protein (EMILIN) family, has distinct expression pattern, forms oligomeric assemblies, and serves as transforming growth factor β(TGF-β) antagonist[J]. J Biol Chem, 2012, 287(14): 11498-11515.

[17] Chun J S, Oh H, Yang S, *et al*. Wnt signaling in cartilage development and degeneration[J]. BMB Rep, 2008, 41(7): 485-494.

(**收稿**:2013-01-07;**修回**:2013-02-04)

(编辑 龙 亮)