·论 著·

SOX6 和 SOX9 基因转染对人原发性骨关节炎关节软骨间充质祖细胞增殖和成软骨分化的调控作用

刘 军,王洪伟,陈 语,于海龙,王 琪,杨会峰,马骏雄,项良碧 (沈阳军区总医院骨科,辽宁 沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 观察 SOX6 和 SOX9 基因转染对原发性 OA 关节软骨 MPCs 的促增殖、分化作用,为通过调控关节软骨 MPCs 以防治原发性 OA 提供理论依据。**方法** 分别以 pAdTrack-CMV-SOX6、SOX9 腺病毒穿梭质粒构建 SOX6、SOX9 基因,并感染原发性 OA 关节软骨 MPCs,比较基因感染组和未感染组成软骨诱导分化后 TB、Ⅱ型胶原以及Ⅱ型胶原 mRNA 表达的变化。**结果** SOX6 和 SOX9 能够分别稳定感染 OA 关节软骨 MPCs;经二者分别感染的关节软骨 MPCs 成软骨诱导分化后,其 TB 染色、Ⅱ型胶原染色呈强阳性表达,未基因感染细胞为弱阳性着色;SOX6 基因感染原发性 OA 关节软骨 MPCs 的Ⅱ型胶原 mRNA 表达量为未基因感染细胞的 3.8 倍($P<0.01$),SOX9 基因为未感染细胞的 5.15 倍($P<0.01$)。**结论** 构建的 SOX6、SOX9 基因序列与基因库报道序列完全一致;SOX6 和 SOX9 能稳定感染原发性 OA 关节软骨 MPCs,并显著促进感染细胞成软骨分化;提示通过适宜浓度的 bFGF、TGF-β1 对原发性 OA 关节软骨 MPCs 的作用及 SOX6 和 SOX9 基因感染,可能具有促进原发性 OA 关节软骨损伤修复的作用。

[关键词] 骨关节炎;间充质祖细胞;SOX6;SOX9

[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)05-0477-05

Regulatory effect of SOX6 and SOX9 on the growth and differentiation properties into chondrocytes of MPCs in primary OA articular cartilage

LIU Jun, WANG Hong-wei, CHEN Yu, YU Hai-long, WANG Qi, YANG Hui-feng, MA Jun-xiong, XIANG Liang-bi
(Department of Orthopedics, General Hospital of Shenyang Military Area, Shenyang Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To observe the growth and proliferation capabilities of MPCs in primary OA articular cartilage and their differentiation properties into chondrocytes by applying related genes SOX6 and SOX9, so as to provide theoretical evidence in preventing and curing primary OA. **Methods** SOX6 and SOX9 genes were respectively ligated into adenovirus shuttle plasmids pAdTrack-CMV-SOX6 and pAdTrack-CMV-SOX9, then the recombinant plasmids were used to infect MPCs derived from primary OA articular cartilage. TB and the expressions of collagen type Ⅱ protein and mRNA in differentiated MPCs were compared between the infected group and the uninfected group. **Results** Either SOX6 gene or SOX9 gene could stably infect MPCs from primary OA cartilage. TB and collagen type Ⅱ were strongly positive in the SOX6- infected or SOX9-infected MPCs, while they were weekly positive in the uninfected MPCs. Collagen type Ⅱ mRNA expression in SOX6-infected MPCs derived from primary OA cartilage was 3.8 times of that in uninfected cells ($P<0.01$), and that in SOX9-infected MPCs was 5.15 times of that in the uninfected cells ($P<0.01$). **Conclusion** The stable transfection of SOX6 and SOX9 genes into MPCs derived from primary OA cartilage could significantly promote chondrogenic differentiation of MPCs. There must be feasible methods of gene technology to promote cell proliferation and differentiation of MPCs for repairing articular cartilage injury.

Keywords: osteoarthritis; mesenchymal progenitor cells; SOX6; SOX9

原发性骨关节炎(osteoarthritis, OA)关节软骨中间充质祖细胞(mesenchymal progenitor cells,MPCs)数量仅占其关节软骨细胞数量的 3% ~4%,虽然 OA 关节软骨MPCs比正常人增殖活跃,但其成软骨、成骨分化能力较低。如何利用有效基因过表达,调控原发性 OA 关节软骨 MPCs 的增殖和成软骨分化作用,恢复 OA 关节软骨细胞调节和维持软骨组织损伤与修复的动态平衡,具有重要的科学意义和临床应用前景。在体外培养中添加细胞因子易流失,且细胞因子价格昂贵,因此结合应用转基因技术,将具有促进关节软骨 MPCs 增殖和成软骨分化的目的基因导入其中,在细胞中高表达促进关节软骨 MPCs 的增殖和分化,修复退变和损伤的软骨,无疑具有重要的作用。目前对 SOX

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201405012

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30672200)

[通讯作者] 王洪伟,E-mail:cplawhw@163.com;项良碧,E-mail:xiangliangbi1963@163.com

[收稿日期] 2014-01-13 [修回日期] 2014-02-25

家族促软骨分化作用研究,国内外相关文献报道较少。本实验应用基因转染技术,用 SOX6、SOX9 基因感染原发性 OA 关节软骨的 MPCs,诱导其成软骨分化,比较 SOX6、SOX9 基因感染和未感染组细胞的成软骨分化能力的变化。进一步探讨基因治疗在关节软骨退变中应用的可行性,为临床治疗软骨退变和软骨损伤提供新的理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用免疫磁珠方法分选得到原发性 OA 及正常人关节软骨 MPCs。SOX6、SOX9 基因转染相关试剂:脂质体(美国 lipofectAMINE 2000)、Ⅱ型胶原多克隆抗体(美国 santa cruze) Pme I,Pac I 内切酶(英国 NEB)、Xho I,Sal I,T4 连接酶及 T 载体(大连宝生物公司)、腺病毒载体。主要仪器设备:细胞培养、RT-PCR 检测仪器设备。

1.2 方法

1.2.1 SOX6、SOX9 基因的构建 细胞及细胞株(人胚肾 FT-293 细胞)购自 invitriogen 公司。pAdTrack-CMV-SOX6,SOX9 的构建。pAdtrack-CMV-SOX6,SOX9 穿梭质粒的鉴定。使用 Sal I、Xho I 双酶切后,凝胶电泳鉴定应见到 576bp 片段为 SOX6,SOX9,9.2kb 片段为 pAdtrack-CMV 载体片段。pAdEasy-SOX6,SOX9 重组质粒构建与鉴定。pAdEasy-SOX6,SOX9 重组腺病毒基因组质粒的鉴定。

1.2.2 pAdEasy-SOX6,SOX9 重组腺病毒的包装、筛选及鉴定

本实验中腺病毒载体是一种复制缺陷病毒,不能自行包装成为具有感染能力的病毒颗粒,因此我们必须在 293 包装细胞中进行包装。本试验所采用的 293 细胞是由 Invitrogen 公司提供的 FT-293 细胞,与普通的 293 细胞相比,具有较强的黏附能力和空斑形成能力。均成功包装为有感染能力的腺病毒。

1.2.3 病毒纯化 以 CsCl2 方法纯化病毒,并进行滴度测定。通过 RFP 阳性细胞计数法测定。滴度 = IU × 计量孔相对于第一孔的稀释倍数/第一孔加入病毒体积。

1.2.4 SOX6、SOX9 基因感染原发性 OA 关节软骨 MPCs

以不同滴度(1×10^4,2×10^4,3×10^4,4×10^4,5×10^4)病毒感染细胞,24 h 后观察感染效率,确定最佳感染浓度。

1.2.5 基因感染原发性 OA 关节软骨 MPCs 的成软骨分化

进行基因感染及未感染细胞成软骨诱导培养,每日倒置显微镜下观察比较基因转染和未转染组 OA 关节软骨 MPCs 的形态变化和生长情况,观察周期 14 d。基因转染和未转染组细胞成软骨分化检测指标包括:①TB 染色;②Ⅱ型胶原免疫细胞化学检测(方法同前);③Ⅱ型胶原 mRNA 定量 RT-PCR 检测。成软骨诱导培养 2 周,取 6 孔板中的细胞,用定量 RT-PCR 检测细胞Ⅱ型胶原 mRNA 表达。操作方法同Ⅱ型胶原基因 mRNA 检测。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,如方差齐性,采用两样本 t 检验统计学方法进行组间比较,如方差不齐性,则采用非参数统计学方法,多组间比较采用多样本方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,P 值均表示双侧概率。

2 结果

2.1 SOX6、SOX9 基因的构建、鉴定及纯化

2.1.1 pAdTrack-CMV-SOX6,SOX9 腺病毒穿梭质粒构建

成功获得 SOX6,SOX9 基因克隆,经过 PCR 检测,该基因克隆证实与 Genebank 报道序列一致(见图 1)。图 1 结果显示,SOX 基因克隆左为 SOX6,条带为 2 500bp 左右,右为 SOX9,条带为 1 750bp左右。(Marker 为 DL2000,由上至下依次为 2 000,1 000,750,500,250,100 bp)。pAdTrack-CMV-SOX6,SOX9 双酶切鉴定(见图 2)。图 2 结果显示,T-SOX6,SOX9 和 pAdTrack-CMV 双酶切获得 SOX6,SOX9 目的片段和病毒载体骨架质粒 pcDNA3.1-SOX6,SOX9 重组载体经 Sal I、Xho I 双酶切,凝胶电泳后,紫外透射反射检测仪上可观察到预期大小的目的片段(SOX6 约 2 500bp,SOX9 约 1 800bp)。经 Sal I、Xho I 双酶切后 pAdTrack-CMV 同样可以释放出同样大小目的片段,与预期的结果相符。重组 pAdEasy-SOX6,SOX9 经 Pac I 酶切可见 23 kb SOX6 和4.0 kb SOX9 片段。

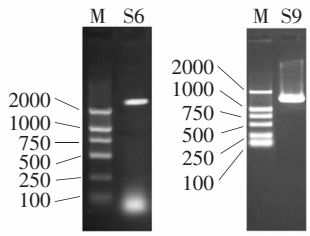
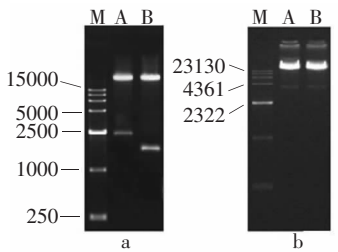


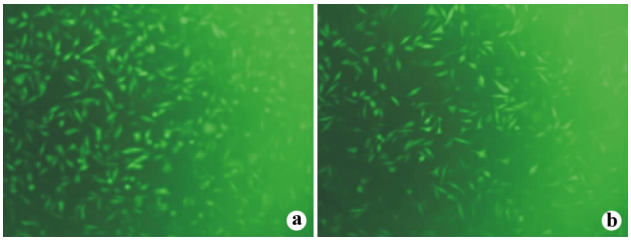
图 1 PCR 检测 SOX6,SOX9 基因克隆



a:pAdTrack-CMV 释放出预期大小目的片段;b:pAdEasy-SOX6,SOX9 经 Pac I 酶切可见 23 kb 和 4.0 kb 左右片段

图 2 SOX6、SOX9 双酶切鉴定

2.1.2 病毒包装、纯化与滴度测定 脂质体包裹 pAdEasy-SOX6,SOX9 同源重组腺病毒基因组质粒转染 293FT 包装细胞 10 d 后,光镜下观察到空斑形成,细胞变圆、肿胀、脱壁,细胞核变大等病变。绿色荧光的表达情况显示,荧光显微镜下观察,在绿色荧光激发通道 GFP 受激发,表达 GFP 基因的细胞发出明亮的绿色荧光(见图 3)。重组腺病毒感染的 293 细胞,在培养 2~3 d后有绿色荧光表达,并且逐渐增多,荧光表达逐步增强。Ad-SOX6,SOX9 重组腺病毒经 293FT 细胞 5 轮扩增提高滴度,之后大量扩增,采用倍比稀释法测定腺病毒滴度为 5×10^{10} PFU/mL。

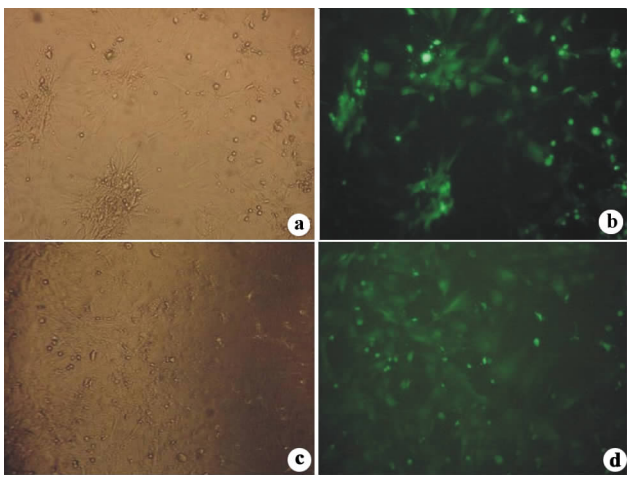


a:pAdEasy-SOX6,同源重组腺病毒基因组质粒转染健康 293 包装细胞收获病毒,再次感染 293FT 细胞;b:pAdEasy-SOX9,同源重组腺病毒基因组质粒转染健康 293FT 包装细胞收获病毒,再次感染 293FT 细胞

图 3 pAdEasy-SOX9 绿色荧光的表达情况(×100)

2.2 SOX6、SOX9 基因能有效感染 OA 关节软骨 MPCs

结果显示,接种 5×10^3 MPCs 细胞于 96 孔培养板,培养 1 d 后加入不同滴度病毒液 SOX6 或 SOX9 病毒液感染细胞,24 h 后观察显示两种基因包装病毒在 2×10^4 滴度时对 MPCs 细胞具有良好的侵袭性,感染效率近 100%,且细胞生长状态良好(1×10^4滴度时感染效率仅 60%,3×10^4 ~ 5×10^4 滴度时有部分细胞死亡),见图 4。



a:同视野普通光镜;b:同视野荧光;c:同视野普通光镜;d:同视野荧光

图 4 SOX6 及 SOX9 对 MPCs 的感染(×200)

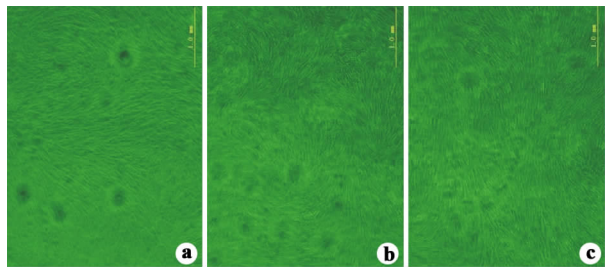
2.3 SOX6、SOX9 基因感染的原发性 OA 关节软骨 MPCs 成软骨分化潜能

2.3.1 细胞形态学观察 基因感染组细胞经成软骨诱导培养,可见明显的细胞聚集生长、基质分泌,高密度接种处可形成多个结节,并逐渐增大;未感染组细胞聚集培养后形成结节数量少,结节形态小,分泌基质少,见图 5。

2.3.2 TB 染色 SOX9 基因感染组软骨诱导分化的"微团"结节培养 14 d,其 TB 染色深浓;SOX6 基因感染组成软骨诱导分化"微团"结节培养 14 d,TB 染色也呈深染,但弱于 SOX9;未感染组成软骨诱导分化"微团"结节培养 14 d,TB 染色浅淡(见图 6)。

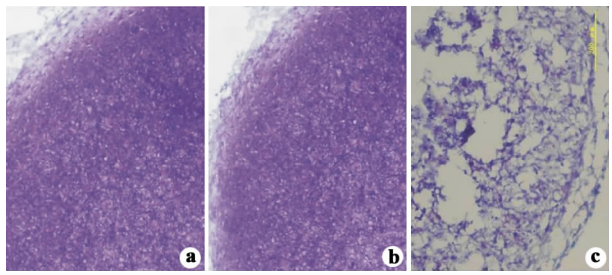
2.3.3 Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色 SOX9 基因感染组成软骨诱导分化的"微团"结节培养 14 d,Ⅱ型胶原呈强阳性表达(图 7a);SOX6 基因感染组成软骨诱导分化"微团"结节培养 14 d,Ⅱ型胶原呈阳性表达(图 7b);未感染组成软骨诱导分化"微团"结节培养 14 d,Ⅱ型胶原表达呈弱阳性(图 7c)。

2.3.4 Ⅱ型胶原 mRNA 表达 图 8 结果显示,SOX6 能增强Ⅱ型胶原 mRNA 的表达,是未感染组的 3.8 倍($P<0.05$)。SOX9 基因对Ⅱ型胶原 mRNA 的表达具有更强的促进作用,感染组是未感染组的 5.15 倍($P<0.01$)。



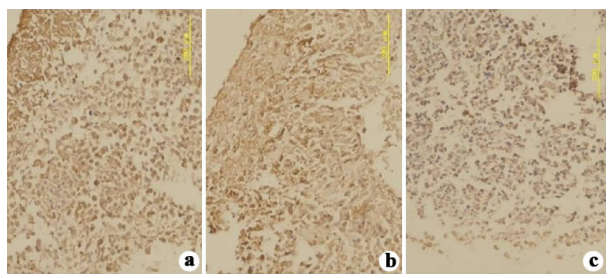
a:SOX9 感染组;b:SOX6 感染组;c:未感染组

图 5 各组软骨样结节形成情况(×100)



a:SOX9 感染组;b:SOX6 感染组;c:未感染组

图 6 各组 TB 染色情况(×200)



a:SOX9 感染组;b:SOX6 感染组;c:未感染组

图 7 各组Ⅱ型胶原染色情况(×200)

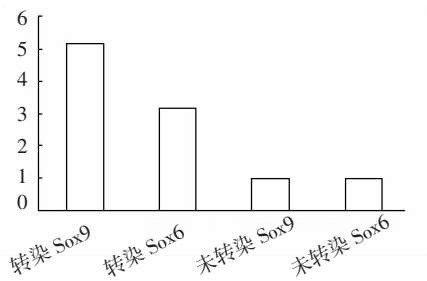


图 8 SOX6、SOX9 基因感染组和未感染组Ⅱ型胶原 mRNA 基因表达变化

3 讨论

SOX 基因家族是控制发育的一类新的以 SRY 基因为代表的基因家族[1]。这类基因功能的实现依赖于

一个 DNA 的结合基序列称为 HMG2box 编码的产物[2-3]。SOX9 在软骨细胞分化过程中发挥非常必要的作用,其对于建立软骨生长板及促进正常的软骨内成骨和及时发育都是必需的,并且 SOX9 与 SOX6 共同表达于所有分化的软骨细胞和软骨前细胞[4]。SOX9 主要参与对软骨细胞分化进行调节的过程,而对于正常状态关节软骨的代谢变化与Ⅱ型胶原的表达没有增强效应[5]。既往文献报道 SOX9 参与调节软骨细胞的成熟过程,但其对软骨细胞的具体作用,离体培养细胞环境与体内环境存在的差异等问题有待进一步研究[6]。SOX9 基因作用于软骨细胞的分化阶段,SOX9 在退变的软骨细胞中表达明显增多,该基因参与软骨退变和 OA 软骨细胞的分化与调控过程[7]。Yang 等[8]通过实验证实了通过纤维蛋白凝胶封装或转染 SOX 基因(SOX5, 6, 9)的移植间充质干细胞能够成功分化为成熟的软骨细胞并用于重建透明关节软骨。Kim 等[9]通过实验指出,SOX 基因(SOX5, 6, 9)在人类间充质干细胞的表达明显低于软骨细胞。电穿孔介导的共转染 SOX 基因(SOX5, 6, 9)能够增强人类间充质干细胞的软骨形成并抑制人类间充质干细胞的肥大。SOX9 基因转染能够改善软骨形成[10],SOX9 基因功能的缺失会导致体外鼠胚胎干细胞软骨分化的缺陷[11]。SOX5, SOX6 和 SOX9 的结合能够为永久性软骨的诱导提供足够信号[12]。转录因子 SOX9 在软骨分化过程中发挥重要作用, SOX5、SOX6 的基因表达需要 SOX9[13]。转录因子 SOX9 在软骨形成过程中发挥重要作用,但是在软骨内骨化的晚期起抑制作用。单独 SOX9 基因或 SOX9 基因与 SOX5、SOX6 基因过度表达都会抑制小鼠初级软骨细胞的成熟与钙化[14]。SOX6 和 SOX9 对成软骨分化的调控作用非常复杂,存在的争议也较多[15-16]。诸多因素如细胞培养条件、细胞的增殖状态等均会影响 SOX 基因对 MSCs 成软骨分化的调节作用,尤其是细胞的分化状态对 SOX9 作用的影响更为巨大,有关的确切机制尚不明,考虑可能与以下因素有关:①细胞因子刺激后信号传递途径的改变及细胞表面受体表达的改变;②周围细胞外基质发生变化影响胶原合成效应。SOX9 调节转录的确切分子机制还不是很清楚,只有确定了它们作用的靶基因,研究才能进一步突破[17-18]。

本实验观察了 SOX6、SOX9 基因转染的 OA 关节软骨中的 MPCs 的成软骨分化过程,结果发现 SOX6、SOX9 基因转染的 OA 关节软骨 MPCs 细胞经微球培养后可见明显的细胞聚集现象,形成大量的乳白色类软骨样结节;未转染组形成结节数量少,形态小,分泌基质少。OA 关节软骨 MPCs 基因转染组细胞成软骨分化诱导后 TB 染色显示Ⅱ型胶原染色呈强阳性,未转染组仅为阳性着色;Ⅱ型胶原定量 RT-PCR 检测结果发现 SOX6 基因转染 OA 关节软骨 MPCs 细胞,在成软骨分化过程中,能显著增强Ⅱ型胶原 mRNA 的表达,是未转染组的 3.8 倍;SOX9 基因对Ⅱ型胶原 mRNA 的表达具有更强的促进作用,转染组是未转染组的 5.15 倍,说明 SOX6、SOX9 转染 OA 关节软骨 MPCs 能显著促进 OA 关节软骨 MPCs 成软骨分化并合成关节软骨细胞外基质Ⅱ型胶原,促进软骨退变和损伤的修复。Lee 等[19]通过实验指出,脂肪干细胞与 SOX 基因(SOX5, SOX6, SOX9)共转导能够明显促进骨软骨缺损模型的在体软骨愈合并且能够阻止手术诱导的骨关节炎的退行性变。Kim 等[20]通过实验指出,髋关节骨关节炎与 SOX9 启动子表观遗传学的改变有关,包括 DNA 的甲基化及组蛋白修饰的改变。Lee 等[21]通过实验指出,SOX 基因(SOX5, 6, 9)及蛋白随着人类关节软骨骨关节炎的进展而减少。Haag 等[22]通过人体标本的实验研究指出,SOX6 与 SOX9 在骨关节炎软骨细胞转录水平的下降是骨关节炎软骨细胞表型稳定性丢失的原因。本研究为临床上进行 MPCs 基因转染,促进其增殖和分化,体外扩增修复关节软骨损伤提供新的治疗方法。

[参考文献]

[1] Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6[J]. J Biol Chem, 2000, 275(15):10738 - 10744.

[2] Shakibaei M, Seifarth C, John T, et al. Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between Sox9 and Erk1/2[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(11): 1382 - 1395.

[3] Kulyk WM, Franklin JL, Hoffman LM. Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme[J]. Exp Cell Res, 2000, 255(2):327 - 332.

[4] Murakami S, Lefebvre V, de Crombrugghe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha[J]. J Biol Chem, 2000, 275(5):3687 - 3692.

[5] Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J]. Genes Dev, 2002, 16(21):2813 - 2828.

[6] Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage[J]. Gene Ther, 2004, 11(4):351 - 359.

[7] Bi W, Huang W, Whitworth DJ, et al. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(12):6698 - 6703.

松油烯 4 醇体内外对人肺癌细胞系 A-549 增殖抑制作用

潘乾广[1a],石 瑶[1a],叶秀峰[1ab],胡仕林[2],晏家瑛[2],周也涵[1a],万 丹[1a] (1. 重庆医科大学:a. 病理科;b. 神经科学研究中心,重庆 400016;2. 重庆市日用化学工业研究所,重庆 400065)

[摘 要] **目的** 探讨松油烯 4 醇体内外对人肺癌细胞系 A-549 增殖抑制作用及其可能机制。**方法** 不同浓度松油烯 4 醇作用于 A-549 细胞 24 h 后,应用 MTT 法检测抑制率及 IC_{50};CCK-8 比色分析法绘制不同浓度下的生长曲线;透射电镜观察药物作用后细胞超微结构的变化;流式细胞仪检测细胞周期、凋亡、细胞内 Ca^{2+} 浓度变化;将 A-549 细胞移植瘤裸鼠分为对照组、低剂量组、高剂量组药物连续腹腔注射 10 d 后分别测量各组移植瘤体积和重量,观察药物的体内抗肿瘤作用。**结果** A-549 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 0.067% v/v;CCK-8 实验结果表明给药组生长曲线明显较对照组平缓,并与给药剂量呈显著相关性;电镜观察可见经松油烯 4 醇处理的 A549 细胞内自噬泡数量明显增加。FCM 检测周期显示 S 期阻滞;检测显示细胞凋亡率明显增加,凋亡率呈现浓度-效应关系;各药物干预组 A-549 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均明显高于对照组($P<0.05$)。体内实验显示各实验组经松油烯 4 醇治疗后移植瘤生长缓慢,治疗结束时治疗组移植瘤质量及瘤体积明显低于对照组($P<0.05$),高、低剂量组的瘤质量抑制率分别为 77.6% 和 53.3%。**结论** 松油烯 4 醇在体外能抑制 A-549 细胞的增殖。

[关键词] 松油烯 4 醇;A-549;裸鼠成瘤;Ca^{2+};凋亡;自噬

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)05-0481-05

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201405013

[基金项目] 重庆市科委攻关计划项目(CSTC,2012ggB10002)

[通讯作者] 叶秀峰,E-mail:yxf1960@126.com

[收稿日期] 2014-01-05 [修回日期] 2014-02-03

[8] Yang HN, Park JS, Woo DG, et al. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes[J]. Biomaterials, 2011, 32(30):7695 – 7704.

[9] Kim HJ, Im GI. Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(12):2103 – 2114.

[10] Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, et al. Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(6):1845 – 1855.

[11] Hargus G, Kist R, Kramer J, et al. Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro[J]. Int J Dev Biol, 2008, 52(4):323 – 332.

[12] Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, et al. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(11):3561 – 3573.

[13] Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J]. Genes Dev, 2002, 16(21):2813 – 2828.

[14] Amano K, Hata K, Sugita A, et al. Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(21):4541 – 4551.

[15] Spokony RF, Aoki Y, Saint-Germain N, et al. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus[J]. Development, 2002, 129(2):421 – 432.

[16] Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, et al. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice[J]. Nat Genet, 2001, 28(3):216 – 217.

[17] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators[J]. Dev Biol, 2000, 227(2):239 – 255.

[18] 赵庆华. SOX9 蛋白对人颈椎退变疾病透明软骨细胞作用的实验研究[D]. 第二军医大学. 2007.

[19] Lee JM, Im GI. SOX trio-co-transduced adipose stem cells in fibrin gel to enhance cartilage repair and delay the progression of osteoarthritis in the rat[J]. Biomaterials, 2012, 33(7):2016 – 2024.

[20] Kim KI, Park YS, Im GI. Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage[J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(5):1050 – 1060.

[21] Lee JS, Im GI. SOX trio decrease in the articular cartilage with the advancement of osteoarthritis[J]. Connect Tissue Res, 2011, 52(6):496 – 502.

[22] Haag J, Gebhard PM, Aigner T. SOX gene expression in human osteoarthritic cartilage[J]. Pathobiology. 2008, 75(3):195 – 199.

(编辑:魏 源)