

# 透骨消痛颗粒对关节软骨细胞wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路的调控\*\*☆

刘伯龄<sup>1</sup>, 邹吉林<sup>2</sup>, 梁珪清<sup>1</sup>, 刘献祥<sup>3</sup>, 李西海<sup>3</sup>, 吴广文<sup>3</sup>

## Regulatory effects of *Tougu Xiaotong* granule on wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway of articular chondrocytes

Liu Bo-ling<sup>1</sup>, Zou Ji-lin<sup>2</sup>, Liang Gui-qing<sup>1</sup>, Liu Xian-xiang<sup>3</sup>, Li Xi-hai<sup>3</sup>, Wu Guang-wen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Second Hospital of Fuzhou, Fuzhou 350007, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Department of Bone Traumatology, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>Academy of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

Liu Bo-ling☆, Doctor, Attending physician, Department of Orthopedics, Second Hospital of Fuzhou, Fuzhou 350007, Fujian Province, China  
liuboling2000@126.com

Supported by: the Youth Talent Foundation of Fujian Health Bureau, No. 2008-2-35\*; Open Subject of Fujian Provincial Key Laboratory of Integrative Medicine for Senile Diseases Chen Ke-ji Foundation for the Development of Integrative Medicine No. CKJ2008057 2008J1004-20\*

Received: 2011-06-06  
Accepted: 2011-09-09

### Abstract

**BACKGROUND:** *Tougu Xiaotong* granule composed of morinda root, radix paeoniae alba from Hangzhou of China, herba sarcandrae, and szechwan lovage rhizome can effectively delay alteration of macroscopic form of articular cartilage and degeneration of cartilage matrix and chondrocytes. But the underlying mechanism remains poorly understood.

**OBJECTIVE:** To observe the effects of *Tougu Xiaotong* granule on Wnt4, glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and  $\beta$ -catenin levels in wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway of chondrocytes.

**METHODS:** SD rat articular chondrocytes were isolated and induced with human interleukin-1 $\beta$  for degeneration. Passage 2 degenerated chondrocytes were randomly divided into a control group and a *Tougu Xiaotong* granule group. Alcohol extract product of *Tougu Xiaotong* granule was added to the *Tougu Xiaotong* granule group. After 4 and 8 days of culture, Wnt4, GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin levels were detected using RT-PCR and western blot methods.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Human interleukin-1 $\beta$  could induce the degeneration of chondrocytes. Wnt4, GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin protein expression was observed in the chondrocytes during the early stage of degeneration. But with time going, Wnt4 and  $\beta$ -catenin protein expression was decreased while GSK-3 $\beta$  expression was increased. After intervention with *Tougu Xiaotong* granule, these phenomena could be reversed. These findings suggest that *Tougu Xiaotong* granule can induce chondrocytes to synthesize Wnt4 and  $\beta$ -catenin and inhibit GSK-3 $\beta$  expression.

Liu BL, Zou JL, Liang GQ, Liu XX, Li XH, Wu GW. Regulatory effects of *Tougu Xiaotong* granule on wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway of articular chondrocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(46): 8574-8578. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 由巴戟天、杭白芍、肿节风和川芎等组成的透骨消痛颗粒能有效延缓关节宏观形态、软骨基质及软骨细胞退变。

**目的:** 观察透骨消痛颗粒对软骨细胞 wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路中 Wnt4、糖原合成酶 3 $\beta$  及  $\beta$ -连环蛋白的影响。

**方法:** 将 SD 大鼠关节软骨细胞分离培养成功后, 人白细胞介素 1 $\beta$  诱导软骨细胞退变, 取第 2 代退变软骨细胞, 随机分为对照组和透骨消痛颗粒组, 后者加入透骨消痛颗粒醇提物, 分别培养 4, 8 d 后, 采用 RT-PCR 检测 2 组 Wnt4、糖原合成酶 3 $\beta$ 、 $\beta$ -连环蛋白 mRNA 表达, 采用蛋白印迹法检测 Wnt4、糖原合成酶 3 $\beta$  及  $\beta$ -连环蛋白表达。

**结果与结论:** 采用人白细胞介素 1 $\beta$  可诱导软骨细胞退变, 软骨细胞退变早期均有 Wnt4、糖原合成酶 3 $\beta$  及  $\beta$ -连环蛋白表达, 但随着时间推移 Wnt4、 $\beta$ -连环蛋白表达下降, 而糖原合成酶 3 $\beta$  表达增高, 采用透骨消痛颗粒醇提物干预后均可逆转上述现象。说明透骨消痛颗粒醇提物能诱导软骨细胞转录合成  $\beta$ -连环蛋白和 Wnt4 蛋白, 并抑制糖原合成酶 3 $\beta$  表达。

**关键词:** 透骨消痛颗粒; 软骨细胞; wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 中医药; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.46.006

刘伯龄, 邹吉林, 梁珪清, 刘献祥, 李西海, 吴广文. 透骨消痛颗粒对关节软骨细胞 wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路的调控[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(46):8574-8578. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

骨性关节炎是多种因素共同作用下导致软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨三者降解和合成正常耦联失衡的结果, 而这一失衡又是炎症递质、基质成分经与特殊受体结合传递信号进入细胞核, 激活软骨细胞中基质金属蛋白酶和炎症基因的转录。骨性关节炎病程中的信号通路非常复杂, 目前研究表明, Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路在骨性关节炎病程中起着重要作用。Wnt信号转导途径调节控制着许多生命过程, 包括生物体的生长、发育、疾病、衰老与死亡等, 也包括细胞形态与功能的分化与维持、免疫、应激、

细胞癌变与细胞凋亡等<sup>[1]</sup>。透骨消痛颗粒是由巴戟天、杭白芍、川芎与肿节风等药物组成, 具有补肝肾、强筋骨、止痛等作用。长期运用于临床, 临床研究证实能有效的改善膝骨关节炎早、中的临床症状, 延缓关节宏观形态、软骨基质及软骨细胞退变<sup>[2-3]</sup>。

实验通过体外大鼠关节软骨细胞退变模型, 采用 RT-PCR 和 Western-blot 等方法检测 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号转导通路中 Wnt4、糖原合成酶 3 $\beta$  和  $\beta$ -连环蛋白等信号相关分子的基因、蛋白表达; 并通过透骨消痛颗粒在调控该信号转导通路中的作用靶点和强度, 旨在从细胞分子水平探讨透骨消痛颗粒调控软骨细胞 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路的作用机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外实验。

**时间及地点:** 于2009-05/2010-11在福建中医学院中西医结合研究院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康4周龄清洁级SD大鼠12只, 体质量80~100 g, 由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2008-0002。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[4]</sup>。

**试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶	美国 HyClone 公司
II型胶原酶	美国 Sigma 公司
总蛋白提取试剂盒	中国凯基生物公司
$\beta$ -连环蛋白抗体、糖原合成酶3 $\beta$ 抗体、Wnt4 抗体、内参 $\beta$ -actin	美国 Santa Cruz 公司
辣根酶标记兔抗山羊 IgG	北京中衫生物技术 有限公司
兔抗鼠 II 型胶原单克隆抗体、羊抗兔二抗 IgG、DAB 免疫组织化学试剂盒	武汉博士德生物试剂 有限公司

**透骨消痛颗粒:** 透骨消痛颗粒醇提取物的制备: 取药物粉碎, 以体积分数95%乙醇回流提取3次, 1 h/次, 回收乙醇, 得到浸膏, 再加双蒸水, 制成质量浓度1 g/mL生药的混悬液, 置于4 °C冰箱保存。

**实验方法:**

**大鼠关节软骨细胞的分离、培养及表面标志抗原的检测:** 大鼠断颈处死, 体积分数75%乙醇浸泡5 min, 无菌条件下分离膝关节, 切取软骨, 含双抗磷酸缓冲液(PBS)漂洗3次, DMEM漂洗3次, 剪成大小约1 mm<sup>3</sup>, 置入盛有体积分数0.2% II型胶原酶的培养皿, 置于37 °C培养箱中, 每隔60 min取1次上清液, 800 r/min, 离心5 min, 收集细胞沉淀, 重复4次。用DMEM完全培养液(含体积分数10%胎牛血清, 维生素C 50 mg/L和青链霉素各100 U/mL)重悬细胞, 200目不锈钢筛网过滤, 血球计数板计数调整细胞悬液浓度为(2.0~3.0) $\times 10^8$  L<sup>-1</sup>, 接种于培养瓶, 37 °C体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱原代培养, 倒置显微镜下

观察细胞长满80%后传代, 甲苯胺蓝染色鉴定第2代软骨细胞。

**白细胞介素1 $\beta$ 诱导大鼠软骨细胞退变:** 取第2代软骨细胞, 按1 $\times 10^4$ /cm<sup>2</sup>接种于6孔板。采用质量浓度10  $\mu$ g/L白细胞介素1 $\beta$ 诱导软骨细胞退变<sup>[5]</sup>, 倒置显微镜观察软骨细胞形态、生长状况, 诱导4 d后行免疫组织化学染色检测 II型胶原并与未诱导组相对照。

**分组:** 实验取第2代退变软骨细胞以1 $\times 10^8$  L<sup>-1</sup> 接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 培养48 h, 随机分为2组: 对照组和透骨消痛颗粒组(加入透骨消痛颗粒醇提取物1 g/mL), 每组6孔, 分别培养4, 8 d后, 采用RT-PCR检测2组Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 和 $\beta$ -连环蛋白mRNA表达, 蛋白印迹法(Western Blot)检测Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 和 $\beta$ -连环蛋白的表达。

**甲苯胺蓝染色鉴定软骨细胞:** 将第2代软骨细胞爬片72 h, PBS冲洗, 40 g/L中性甲醛固定30 min, 用体积分数1%甲苯胺蓝染色30 min, 迅速用无水乙醇漂洗1次, 干燥, 封固, 光学显微镜下观察。

**II型胶原免疫组织化学染色观察退变大鼠软骨细胞功能:** 白细胞介素1 $\beta$ 诱导前后软骨细胞爬片, PBS 冲洗, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, 含体积分数0.5%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的甲醇室温处理30 min, 蒸馏水洗3次; 滴加封闭液, 室温20 min, 甩去余液; 滴加5 mg/L II型胶原单克隆抗体, 置于湿盒内4 °C过夜, PBS洗2 min, 共洗3次; 生物素化山羊抗兔IgG 37 °C作用20 min, PBS 冲洗2 min, 共3次。链霉亲和素-过氧化物酶复合物置于室温30 min, PBS冲洗5 min, 共4次; DAB显色, 脱水, 透明, 封固。

每张细胞爬片随机观察200倍视野10个, 采用Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件对 II型胶原阳性染色(棕褐色)的吸光度值进行定量分析。

**RT-PCR检测大鼠软骨细胞Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 和 $\beta$ -连环蛋白 mRNA表达:** 各组软骨细胞, 按操作说明提取总RNA, 取1  $\mu$ g RNA 反转录成cDNA, 以此cDNA为模板行RT-PCR扩增Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 、 $\beta$ -连环蛋白, 以GAPDH为内参, Primer 5 设计引物序列。

**RT-PCR 扩增反应条件:** 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C/50 °C/50 °C/50 °C各30 s, 72 °C 30 s, 35个循环, 72 °C 10 min, 4 °C终止保存。扩增产物经1.5%琼脂糖电泳, 采用凝胶成

<sup>1</sup> 福州市第二医院骨科, 福建省福州市 350007; <sup>2</sup> 苏州市中医院骨伤科, 江苏省苏州市 215000; <sup>3</sup> 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建省福州市 350108

第一作者及通讯作者: 刘伯龄<sup>\*</sup>, 男, 1976年生, 江西省新干县人, 汉族, 2006年苏州大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事骨关节疾病基础与临床研究。  
liuboling2000@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2011)46-08574-05

收稿日期: 2011-06-06  
修回日期: 2011-09-09  
(20101224005/WJ-S)

像系统对Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 、 $\beta$ -连环蛋白与GAPDH的灰度值比值进行定量分析。

引物信息:

引物	引物序列(5'-3')	片段长度 (bp)	退火温度 (°C)
Wnt4	Sense: GGT CAG CCC ACA GGG TTT CCA	240	55
	Anti-sense: ACC GCT CGC CAG CAT GTC TTT		
糖原合成酶 3 $\beta$	Sense: TAG TCC GAT TGC GGT ATT T	512	50
	Anti-sense: CTC CCT TGT TGG TGT TCC T		
$\beta$ -连环蛋白	Sense: TCC GCA TGG AGG AGA TAG TTG	337	50
	Anti-sense: ACC GAA AGC CGT TTC TTG TAG		
GAPDH	Sense: TGC TGA GTA TGT CGT GGA G	288	50
	Anti-sense: GTC TTC TGA GTG GCA GTG AT		

Western Blot 检测细胞Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 、 $\beta$ -连环蛋白的蛋白表达水平: 各组软骨细胞, 参照试剂说明书, 分组提取总蛋白, 采用BCA法测定蛋白浓度。

每份样品取25  $\mu$ L (含20  $\mu$ g 总蛋白)进行12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转移至PVDF膜上, 放入封闭液中封闭室温孵育2~4 h, 分别与兔抗鼠 $\beta$ -连环蛋白、糖原合成酶3 $\beta$ 、 $\beta$ -actin单克隆抗体(1:1 000)4 °C 孵育过夜, 羊抗兔多克隆二抗IgG(1:5 000)37 °C 孵育2 h, 洗涤10 min, 共3次, ECL底物显色, X射线片曝光。

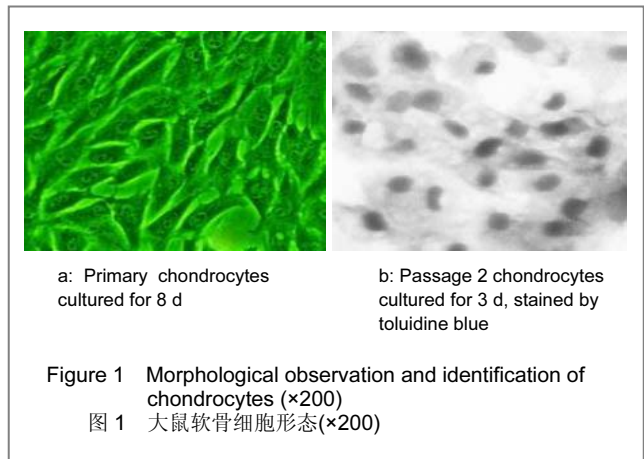
Fluor-s凝胶成像分析系统对蛋白条带进行分析, 数据用目的蛋白与 $\beta$ -actin的灰度值比值表示。

主要观察指标: 透骨消痛颗粒干预后大鼠Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 、 $\beta$ -连环蛋白 mRNA和蛋白表达的变化。

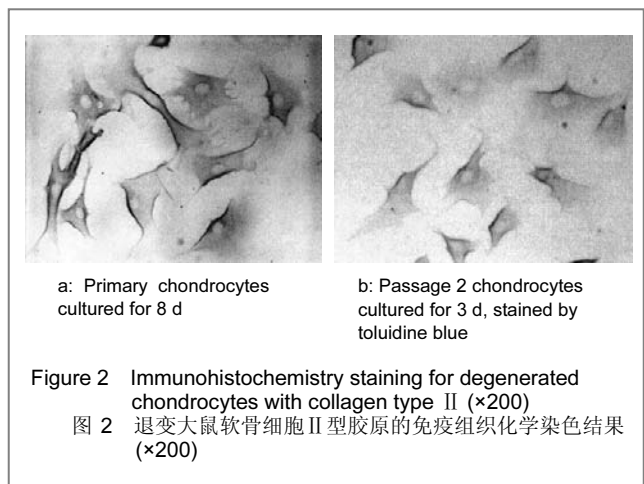
统计学分析: 采用SPSS 13.0统计学软件处理数据, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 组间均数差异的多重比较用SNK-q 检验。P < 0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果

2.1 大鼠软骨细胞形态观察和鉴定 原代软骨细胞, 接种细胞为小圆形, 培养24 h 后细胞开始贴壁, 软骨细胞边缘出现突起, 可见伪足伸出, 细胞呈不规则三角形、四边形等多边形, 培养约8 d, 致密生长状态下的软骨细胞相互排列紧密, 特别紧密处软骨细胞融合成典型铺路石样, 见图1a。第2代软骨细胞, 甲苯胺蓝染色, 可见细胞核呈深蓝色, 以圆形、椭圆形为主, 细胞内呈紫红色异染颗粒, 细胞周围也出现紫红色异染颗粒, 见图1b。



2.2 退变的大鼠软骨细胞中II型胶原的表达 正常培养的第2代软骨细胞, 加入退变诱导剂白细胞介素1 $\beta$ 诱导4 d后, 细胞生长缓慢, 细胞形态缩小, 细胞间隙增宽, 细胞外基质降解, 并可见钙化结节形成。白细胞介素1 $\beta$ 诱导4 d后, 软骨细胞及胞外基质棕黄色着色的吸光度值, 未诱导组(0.45 $\pm$ 0.24)明显高于诱导后(0.17 $\pm$ 0.05; P < 0.05), 见图2。



2.3 退变大鼠软骨细胞Wnt4, 糖原合成酶3 $\beta$ ,  $\beta$ -连环蛋白mRNA的表达 见图3, 表1。

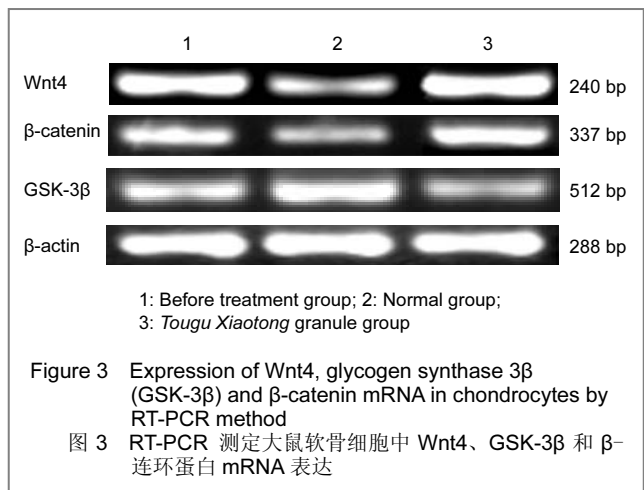


表 1 退变的大鼠软骨细胞 Wnt4、GSK-3β 和 β-连环蛋白 mRNA 表达  
Table 1 Expression of Wnt4, glycogen synthase 3β (GSK-3β) and β-catenin mRNA in degenerated chondrocytes (x±s, n=6)

Group	Wnt4	β-catenin	GSK-3β
Before treatment	0.95±0.07 <sup>ab</sup>	0.73±0.06 <sup>ab</sup>	0.57±0.05 <sup>ab</sup>
Normal	0.32±0.04 <sup>b</sup>	0.41±0.07 <sup>b</sup>	0.88±0.08 <sup>b</sup>
Tougu Xiaotong granule	1.23±0.09	0.92±0.08	0.35±0.04

<sup>a</sup>P < 0.01, vs. normal group. <sup>b</sup>P < 0.05, vs. Tougu Xiaotong granule group

培养 4 d 后各组软骨细胞 Wnt4、糖原合成酶 3β、β-连环蛋白 mRNA 均有表达, 对照组 8 d 后软骨细胞 Wnt4、β-连环蛋白与干预前相比表达下降 ( $P < 0.01$ ), 而糖原合成酶 3β 与干预前相比表达增高 ( $P < 0.01$ ); 透骨消痛颗粒组 8 d 后软骨细胞 Wnt4、β-连环蛋白与干预前和对照组相比表达均增高 ( $P < 0.05$ ), 而糖原合成酶 3β 表达下降 ( $P < 0.05$ ).

2.4 两组细胞 Wnt4, GSK-3β, β-连环蛋白的蛋白表达  
培养 4 d 后各组软骨细胞 Wnt4、GSK-3β、β-连环蛋白均有表达, 对照组培养 8 d 后软骨细胞 Wnt4、β-连环蛋白表达较干预前下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 GSK-3β 表达增高 ( $P < 0.01$ ); 透骨消痛颗粒组培养 8 d 后软骨细胞 Wnt4、β-连环蛋白表达较对照组增高 ( $P < 0.05$ ), 而 GSK-3β 表达下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 4, 表 2。

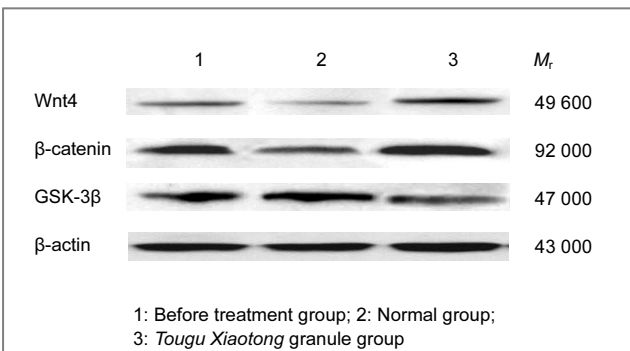


Figure 4 Expression of Wnt4, glycogen synthase 3β (GSK-3β) and β-catenin protein in chondrocytes by Western Blot

图 4 Western Blot 测定各组细胞 Wnt4, GSK-3β, β-连环蛋白的表达

表 2 大鼠软骨细胞 Wnt4、GSK-3β、β-连环蛋白的蛋白表达  
Table 2 Expression of Wnt4, glycogen synthase 3β (GSK-3β) and β-catenin protein in chondrocytes by Western Blot (x±s, n=6)

Group	Wnt4	β-catenin	GSK-3β
Before treatment	0.62±0.06 <sup>b</sup>	0.84±0.08 <sup>a</sup>	0.94±0.07 <sup>b</sup>
Normal	0.45±0.05	0.52±0.06	1.06±0.09
Tougu Xiaotong granule	0.76±0.06 <sup>b</sup>	1.03±0.09 <sup>b</sup>	0.83±0.06 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.01, <sup>b</sup>P < 0.05, vs. normal group

### 3 讨论

Wnt 信号转导途径调节控制着许多生命过程, 包括生物体的生长、发育、疾病、衰老与死亡等, 也包括细胞形态与功能的分化与维持、免疫、应激、细胞癌变与细胞凋亡等<sup>[6]</sup>。Wnt 家族的各成员在骨与软骨发育过程中具有重要调节作用<sup>[7-9]</sup>。在肢芽间充质细胞发育为成熟骨骼组织过程中, 间充质细胞经历的演变: 间充质细胞聚集→增殖型软骨细胞→前肥大型软骨细胞→肥大型软骨细胞→软骨细胞凋亡、坏死、血管侵入, 软骨内骨化。这一系列连续性变化中, 软骨细胞在多个环节被调控, 正、负调控机制共同维持着一种动态平衡, 保证了骨骼的正常发育形态。Wnt 家族及其信号传导途径中的相关信号分子, 如 Frizzled 受体、β-连环蛋白和糖原合成酶 3β 等, 对于这种平衡系统的维持发挥着重要的作用<sup>[10-11]</sup>。鉴于 Wnt/β-连环蛋白信号途径在软骨生成中的重要作用, 其是否也在骨性关节炎软骨退变过程中发挥重要的调控作用是课题组关注的焦点。因此, 阐明关节软骨细胞内 Wnt/β-连环蛋白信号通路的具体作用机制, 有目的的调控关节软骨细胞功能, 将是延缓关节软骨退变的关键环节。

目前许多学者已经意识到作用于一种靶点的单分子药物不能有效的治疗复杂疾病, 目前药物开发的模式已从单一靶点药物开发转向基于系统生物学的药物开发, 中医药疗法具有多途径、多靶点的特性, 透骨消痛颗粒是以“肾主骨”、“肝主筋”等中医理论为指导, 针对骨关节炎发病机制及治疗认识基础上组方, 具有补肝肾、强筋骨的功效。因此, 实验主要观察透骨消痛颗粒对退变软骨细胞的 Wnt4、β-连环蛋白和糖原合成酶 3β 表达影响, 从而影响软骨细胞 β-连环蛋白活性的作用机制。

关节软骨由软骨细胞和细胞外基质组成, 实验采用机械-II 型胶原酶消化法, 可分离培养出较高纯度的软骨细胞, 甲苯胺蓝与第 2 代软骨细胞分泌的蛋白多糖发生耦合反应, 聚合成多聚体出现异染性<sup>[12]</sup>。在骨关节炎的软骨细胞、关节滑液及滑膜组织均能检出较高水平的白细胞介素 1β。已有证据表明, 白细胞介素 1β 在软骨细胞的降解、退变过程中起到最重要的分解作用<sup>[13]</sup>。实验采用白细胞介素 1β 诱导软骨细胞退变, 免疫组织化学结果提示退变软骨细胞 II 型胶原含量减少。实验结果中发现软骨细胞退变早期 Wnt4、糖原合成酶 3β 和 β-连环蛋白均表达, 但随着时间推移 Wnt4、β-连环蛋白表达下降, 而糖原合成酶 3β 表达增高, 透骨消痛颗粒醇提物干预后, Wnt/β-连环蛋白信号通路激活后, 促使 β-连环蛋白转移至细胞核内, 抑制 β-连环蛋白-Axin-APC-糖原合成酶 3β 复合物形成, 降低糖原合成酶 3β 的活性从而抑

制 $\beta$ -连环蛋白的磷酸化, 导致 $\beta$ -连环蛋白在胞质内稳定的积累, 继而进入细胞核, 激活转录因子Tcf-4/LEF, 调节目的基因的表达<sup>[14]</sup>。软骨细胞内 $\beta$ -连环蛋白的水平受Wnt4、糖原合成酶3 $\beta$ 的动态调控, 实验显示, 透骨消痛颗粒醇提物能诱导软骨细胞转录合成 $\beta$ -连环蛋白、Wnt4, 抑制糖原合成酶3 $\beta$ 表达。

#### 4 参考文献

- [1] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Development*. 1997;11(24):3286-3305.
- [2] Lin MN, Liu XX. *Fujian Zhongyiyao*. 2005;36(4):15-16. 林木南, 刘献祥. 透骨消痛颗粒防治膝骨性关节炎30例[J]. *福建中医药*, 2005, 36(4):15-16.
- [3] Liu XX, Zhou JT, Li XH, et al. *Zhongyi Zhenggu*. 2005;17(10):3-5. 刘献祥, 李西海, 周江涛. 透骨消痛颗粒对膝骨性关节炎组织形态的影响[J]. *中医正骨*, 2005, 17(10):3-5.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2006-09-30.
- [5] Aida Y, Maeno M, Suzuki N, et al. The effect of IL-1 beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue of inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci*. 2005; 77(25):3210-3221.
- [6] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Development*. 1997;11:3286-3305.
- [7] Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ. Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone*. 2009;44(4):522-527.
- [8] Kawaguchi H. Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):8-11.
- [9] Topol L, Chen W, Song H, et al. Sox 9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3323-3333.
- [10] Zhu M, Tang D, Wu Q, et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):12-21.

- [11] Chun JS, Oh H, Yang S, et al. Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep*. 2008;41(7):485-494.
- [12] Karsdal MA, Sumer E U, Wulf H, et al. Induction of increased cAMP levels in articular chondrocytes blocks matrix metalloproteinase-mediated cartilage degradation, but not aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1549-1558.
- [13] Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*. 2004; 427(Suppl):S37-46.
- [14] Yuasa T, Otani T, Koike T, et al. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: Its possible role in joint degeneration. *Lab Invest*. 2008;88(3):264-274.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 福建省卫生厅青年人才项目(2008-2-35); 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室开放课题·陈可冀中西医结合发展基金资助(CKJ2008057 2008J1004-20)。

**作者贡献:** 刘伯龄进行实验设计, 实验实施为李西海、吴广文, 实验评估为刘献祥, 资料收集为梁珪清、邹吉林, 刘伯龄成文, 刘献祥审核, 刘伯龄对文章负责。

**致谢:** 本次实验得到福建中西医结合研究院郑良朴和吴银生的帮助, 在此深表感谢。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

#### 本刊组织构建栏目已出版“血管组织工程”研究的相关文章: 学术部

○血管组织工程种子细胞原代培养技术的改良  
唐新华, 黄玲, 夏宁, 等.  
2008, 12(42): 8277-8280  
[关键词]血管组织工程; 血管内皮细胞; 血管平滑肌细胞

○血管组织工程种子细胞在再生医学中的应用  
李春民, 汪忠镐  
2010, 14(32): 6022-6026  
[基金]国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(2006AA02A134)  
[关键词]种子细胞; 内皮细胞; 平滑肌细胞; 间充质干细胞; 血管组织工程

○骨桥蛋白反义核苷酸对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响  
李辉, 刘奇峰, 刘闰男  
2010, 14(20): 3646-3649  
[基金]国家自然科学基金资助项目(30871074)  
[关键词]骨桥蛋白; 血管平滑肌细胞; 增殖; 细胞周期; 血管组织工程

○内皮前体细胞与平滑肌细胞联合培养构建组织工程血管: 最适比例验证  
谢尚喆, 刘水, 方宁涛, 等.  
2008, 12(20): 3826-3830  
[关键词]内皮前体细胞; 平滑肌细胞; 联合培养; I型胶原凝胶; 血管组织工程

○小口径人工血管血液相容性  
欧阳晨曦, 李沁, 王维慈, 等.  
2008, 12(6): 1119-1123  
[关键词]人造血管; 聚氨酯; 血液相容性

○高分子材料小口径人造血管的相关研究  
王维慈, 欧阳晨曦, 周飞, 等.  
2008, 12(1): 125-128  
[关键词]高分子; 人造血管; 聚氨酯; 生物相容性; 顺应性

○促红细胞生成素对大鼠内皮祖细胞生物学特点的影响  
王东, 王亮, 刘庆国, 等.

2010, 14(15): 2705-2708

[基金]国家自然科学基金资助项目(30772229); 国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20070062008)

[关键词]内皮祖细胞; 促红细胞生成素; 细胞培养; 功能; 大鼠; 血管组织工程

○成人外周平滑肌祖细胞与成熟血管平滑肌细胞生物学特性的比较  
王世知, 袁庆文, 陈锋, 等.  
2009, 13(46): 9071-9075  
[关键词]平滑肌细胞; 祖细胞; 外周血

○人工血管内皮化的研究进展  
胡波, 何延政  
2007, 11(10): 1923-1926  
[关键词]人工血管; 内皮细胞; 内皮化; 综述文献

○利用人骨髓间充质干细胞在生物反应器中构建小口径血管  
李宏, 安琦, 吴莹琛, 等.  
2009, 13(11): 2178-2182  
[关键词]组织工程; 血管生物反应器; 骨髓间充质干细胞; 流体力学