

Hedgehog信号调控骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化：调控方式及其串话机制尚待研究

刘宽, 吴兴(同济大学附属上海市第十人民医院骨科, 上海市 200072)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 骨髓间充质干细胞是目前公认理想的种子细胞来源, 在组织工程研究中具有不可替代的作用。Hedgehog 信号是骨髓间充质干细胞成脂、成骨和成软骨分化过程中重要的信号转导通路, 但以往的研究都主要集中在 hedgehog 对骨髓间充质干细胞成骨分化过程中的调控作用。

2 文章增加的新信息: 近来, hedgehog 信号在骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化过程中的信号转导机制, 也日益受到重视, 但也局限于单一的 hedgehog 信号同源蛋白对该过程的调控。骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化的过程, 是一个由多信号、多分子协同调控下完成的, 因此, 对骨髓间充质干细胞成软骨分化信号转导机制的研究, 应将重点放在不同信号通路相互联系和串话的机制上。文章综述近来 hedgehog 同源蛋白对骨髓间充质干细胞成软骨分化过程的信号调控, 在此基础上也阐述了 hedgehog 信号与其他信号通路的串话机制。

3 临床应用的意义: Hedgehog 信号通路对骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化过程的信号调控机制, 以及与其他信号通路的串话机制的阐明, 将有助于骨髓间充质干细胞更好的应用于软骨组织工程, 并最终应用于临床治疗软骨组织损伤与缺损。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 软骨; 骨髓间充质干细胞; hedgehog; 组织工程; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 软骨; Hedgehog 蛋白质类

基金资助:

国家自然科学基金(81371950)

摘要

背景: Hedgehog 信号通路在骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化过程中发挥重要的调控作用, 但具体的调控机制, 以及与其他信号通路的串话机制仍需进一步的研究, 是近来研究的热点。

目的: 介绍 hedgehog 信号在调控骨髓间充质干细胞成软骨分化过程中信号转导机制的研究现状与发展趋势, 以及与其他信号通路的相互串话。

方法: 通过搜索 CNKI, PubMed 及 Google Scholar 等数据库, 以“hedgehog, 骨髓间充质干细胞, 软骨形成, 软骨细胞”和“hedgehog, IHH, SHH, bone marrow mesenchymal stem cell, chondrogenesis, cartilage, chondrocyte”为检索词, 查阅有关 hedgehog 信号与骨髓间充质干细胞分化相关的文献, 最终共纳入 36 篇文献进行综述。

结果与结论: 骨髓间充质干细胞是目前公认的组织工程种子细胞来源, hedgehog 信号通路是运动系统发育过程中重要的信号分子。Hedgehog 信号蛋白 IHH 和 SHH 参与调控骨髓间充质干细胞的增殖与成软骨分化, 以及软骨形成后的表型维持, 且与其他信号通路发挥协同作用。然而, 具体的调控方式以及与其他信号的串话机制, 仍需进一步的研究, 是这一领域未来研究的方向。

刘宽, 吴兴. Hedgehog 信号调控骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化: 调控方式及其串话机制尚待研究[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(37):6040-6045.

Hedgehog signal regulates the chondrogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells: controlling methods and cross-talking relationship with other signals need further studies

Liu Kuan, Wu Xing (Department of Orthopaedics, Shanghai tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China)

Abstract

BACKGROUND: The hedgehog pathway has paid an important role in the progress of chondrogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells. However, the definite signal transduction pathway and cross-talking relationship with other common signal pathways are still poorly understood and the researches related to this field is to continue as a hotspot in the future study.

OBJECTIVE: To investigate the research progress of hedgehog signal pathway on the regulation of the chondrogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells and the relationship between hedgehog and other

刘宽, 男, 1987年生, 湖北省十堰市人, 汉族, 同济大学在读硕士, 主要从事软骨损伤修复、组织工程方面的研究。

通讯作者: 吴兴, 主任医师, 教授, 博士生导师, 同济大学附属上海市第十人民医院骨科, 上海市 200072

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.37.025
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)37-06040-06

稿件接受: 2014-08-02

Liu Kuan, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, Shanghai tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China

Corresponding author: Wu Xing, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopaedics, Shanghai tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China

Accepted: 2014-08-02

signal pathways in the process.

METHODS: A computer-based online search in CNKI, PubMed and Google Scholar databases was performed using key words of "Hedgehog, IHH, SHH, bone marrow mesenchymal stem cells, cartilage, chondrogenesis" in English and Chinese, respectively. Literatures related to the process of chondrogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells were included and 36 articles were extensively summarized for review.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone marrow mesenchymal stem cells are currently accepted optimal cell seeds for the cartilage tissue engineering, and hedgehog is a critical signal molecule in the development of skeletal system. The IHH and SHH in hedgehog signal closely participate in controlling the processes of bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenesis, chondrocyte phenotype maintenance and cooperation with other common single pathways. However, the specific signal transduction mechanism and cross-talking contact with other signal pathways still need to be further studied, and it stands for the future research directions.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; cartilage; Hedgehog proteins

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81371950

Liu K, Wu X. Hedgehog signal regulates the chondrogenesis from bone marrow mesenchymal stem cells: controlling methods and cross-talking relationship with other signals need further studies. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(37):6040-6045.

0 引言 Introduction

软骨组织的损伤与缺损是导致关节退变、功能障碍的主要原因,严重影响着患者的劳动能力及生活质量。然而,软骨组织结构单一,无血管、神经等复杂因素,导致成熟的关节软骨组织自身修复能力有限^[1]。软骨组织工程的出现为治疗和修复软骨缺损提供了新的途径。骨髓间充质干细胞是组织工程常用的种子细胞,具有来源充足、多向分化特点,体外培养可大量增殖,且自体骨髓间充质干细胞不存在免疫排斥反应,已被公认有可能成为软骨组织工程理想的种子细胞来源^[2]。然而,骨髓间充质干细胞应用于软骨组织工程进行临床关节软骨修复尚不成熟,表现在骨髓间充质干细胞构建的软骨组织工程化组织较正常软骨形态、生物力学性能存在差异^[3]。此外,如何调控骨髓间充质干细胞定向分化成软骨细胞,使其分化的初级软骨细胞分化为成熟软骨细胞,并抑制其向肥大软骨细胞分化,即稳定分化后的细胞表型和延缓细胞衰老等^[4]。这需要更深入的研究了解骨髓间充质干细胞分化机制。

软骨的自然形成和修复需要多种信号表达分子协调,多种通路如TGF- β /BMP、Wnt、FGF、IGF、MEK/ERK、p38 MAPK和Hedgehog等均参与促进软骨形成的多向调控,hedgehog信号通路是主要的信号调节通路之一^[5-8]。在胚胎发育软骨内成骨的过程中,hedgehog信号是间充质干细胞向成骨细胞分化发育的必要条件,并随着成骨细胞的成熟,其活性呈进行性降低。近年来hedgehog蛋白及信号转导方式在骨和软骨形成中的调节作用日益受到重视。本文就hedgehog信号调控骨髓间充质干细胞成软骨分化过程中信号转导机制的研究进展进行综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索1995至2014年CNKI、

PubMed及Google Scholar等数据库,中文检索词为“骨髓间充质干细胞,刺猬蛋白,软骨生成,软骨细胞,信号通路”,英文检索词为“bone marrow mesenchymal stem cell, hedgehog, chondrogenesis, chondrocyte, signal pathway”。共检索到91篇文献。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: ①文献内容需与hedgehog信号调控骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化相关,针对性强。②原著文献论据充分,结论可信。③同一领域的文献选择近期发表或在权威杂志上发表的文献。

排除标准: ①重复性研究。②研究目的与本无无关。③较陈旧的文。

1.3 资料提取与文献质量评价 计算机初步检索获得91篇文献,其中英文文献85篇,中文文献6篇。通过阅读标题与摘要,排除研究目的与本文无关及重复文献;最终查阅全文,根据纳入和排除标准,共获得36篇符合标准的文献进行综述。

2 结果 Results

2.1 Hedgehog信号通路 Hedgehog基因首次是在果蝇体内发现,可影响胚胎分离的两极分化和器官的形成,它参与大部分哺乳动物中枢神经系统及运动系统四肢前后轴的发生发展,且通过调控细胞生长、轴突导向及细胞分化来维持内环境的平衡^[9]。在哺乳动物体内,hedgehog信号通路有3种同源蛋白IHH、SHH和DHH,以及两种膜受体Patch(Ptc1)和Smoothed(Smo)^[10],除DHH被发现是精子和外周神经胶质细胞产生的重要调节因子外,IHH和SHH在胚胎发育中发挥重要作用,IHH或SHH基因缺失或突变,均可导致运动系统骨骼发育的异常和畸形^[10-11]。Smo和Ptc1是hedgehog信号传导通路中非常重要的跨膜蛋白,Hh信号的传递与之密切相关。在Hh表达细胞初始合成Hh前体物质后,通过ER/Golgi分泌途径,进一步经历C端和N端修饰,以及

与胆固醇的共价连接, 形成脂质态的具有高信号活性的信号分子物质。此后, 通过细胞外基质硫酸类肝素蛋白多糖物质派送到靶细胞周围。在非Hh反应细胞, 无hedgehog配体存在, Ptc受体则通过阻止细胞内部的Smo转移至胞膜, 从而抑制Smo引起的Hh信号的传递^[11]。而在Hh反应细胞, Hh分子通过与三聚态受体Patched(ptc/ptch1)结合, 从而解除Smoothened(Smo)的抑制状态, 并促使Smo从细胞内转移至细胞外。活化的Smo同时可调控转录因子Ci/Gli的活性, 使Gli蛋白从微管中释放出来而不被剪切, 完整的Gli蛋白(Gli1、Gli2、Gli3)进入细胞核, Ci/Gli转录因子可与泛素化蛋白(Cul3和HIB/SPOP复合体)结合, 到达指定位置结合CBP蛋白, 从而活化靶基因, 促进BMP, WNT, PTC, FGF等相关基因的表达^[10-12]。图1显示具体的hedgehog信号通路模式^[13]。

2.2 Hedgehog信号通路与骨髓间充质干细胞成软骨细胞的分化 Hedgehog信号对间充质干细胞的调控表现为, 促进间充质干细胞的增殖并趋向软骨细胞分化, 且3种hedgehog信号蛋白均有利于体外组织工程软骨的构建, 效应呈剂量依赖性^[14-15]。环靶明(cyclopamine)是hedgehog信号通路的特异性抑制剂, 它可通过竞争性抑制细胞hedgehog受体Smo, 从而抑制Hh信号经由Smo向细胞内传递, 阻断hedgehog信号通路的传导^[16]。在骨髓间充质干细胞成软骨分化培养基中添加cyclopamine, 可致使骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞, II型胶原蛋白和糖胺聚的mRNA及蛋白的表达明显降低, 这说明Hedgehog-Smoothened(Smo)信号通路在间充质干细胞成软骨分化过程中起着重要的调控作用^[17]。此外, Hedgehog信号通路参与了间充质干细胞多向分化的调控, 其对间充质干细胞成骨、成软骨和成脂分化有不同的调节作用^[18]。随着研究进展发现, 在间充质干细胞分化成软骨细胞后, hedgehog信号进一步参与了滑膜关节软骨的形成及维持, 以及关节炎的病理形成。研究发现, 越是严重的关节炎中, hedgehog信号的活性越强^[19-20]。而在类风湿性关节炎患者的滑膜组织中, 可检测到Shh通路相关信号分子Shh和Gli1的表达明显上调, 这提示类风湿性关节炎患者中可能存在Shh或其他hedgehog信号分子信号的激活^[18]。然而, Hedgehog信号在关节炎病理形成过程中具体的调控机制, 仍有待进一步的探索, 这将为临床上预防关节炎的发生及发展, 以及研发新型靶向药物治疗关节炎提供理论依据。

2.3 IHH对间充质干细胞成软骨分化的调控 IHH是运动系统发育过程中的重要信号分子, IHH基因或蛋白的缺失, 会导致肢体末端的畸形发育, 同时伴有软骨细胞增殖率下降和肥大软骨细胞的膨胀^[19]。在体内, IHH既可以通过PTHrP间接控制软骨细胞肥大和骨形成,

也可独立于PTHrP发挥直接调控作用, 共同调节软骨细胞的分化。目前认为, 在软骨细胞肥大之前表达的IHH与PTHrP形成负反馈通路, IHH可促进关节周围的软骨细胞表达PTHrP, PTHrP通过与他的受体Pthr-1促进软骨细胞的增殖并抑制其肥大, 而后通过PKA途径负向调控IHH的表达。Fischer等^[20]研究发现, 持续的PTHrP(1-34)蛋白刺激可抑制人间充质干细胞成软骨细胞分化, 然而, 间歇性(3次/周, 6 h/次)的PTHrP(1-34)蛋白刺激可明显增加II型胶原蛋白和葡聚糖的基因表达及在基质中的分泌, 并同时下调IHH基因的表达及碱性磷酸酶的活性, cAMP/PKA发挥主要的信号通路调控作用。关节软骨细胞也可通过分泌PTHrP蛋白抑制软骨细胞肥大, 当骨髓间充质干细胞与关节软骨细胞共培养时, 则表现为软骨生成增加但并不肥大^[21]。在关于IHH调节软骨细胞分化机制上, 目前认为, IHH信号通过促进柱状软骨细胞的增殖, 从而抑制软骨细胞肥大分化, 但在更加成熟的肥大前软骨细胞, IHH则是通过促进软骨细胞退出细胞周期来促进其肥大^[22]。以上研究表明, IHH-PTHrP对间充质干细胞的直接效应是促进其增殖和成软骨细胞分化, 同时过量的PTHrP蛋白一方面通过下调IHH信号, 另一方面则抑制软骨细胞的过早成熟, 从而在促进间充质干细胞成软骨细胞分化的同时抑制其肥大老化。此外, Mak等^[22]研究发现, 在PTHrP^{-/-}个体的软骨组织或软骨细胞, 当过表达IHH蛋白时, 仍有刺激软骨细胞肥大的作用, 而在环靶明cyclopamine存在或Smo移除时, 软骨细胞肥大过程延长, 从而证明IHH存在一条独立于PTHrP通路之外的独立通路, 可直接调控软骨细胞的肥大。

IHH通过直接和间接作用对间充质干细胞的增殖与成软骨分化, 以及对软骨细胞肥大的调控, 为体外利用间充质干细胞构建组织工程化软骨提供新的思路, 但事实上却并不理想。Steinert等^[23]利用腺病毒构建IHH过表达载体转染人间充质干细胞, 发现无论是IHH基因单独转染, 还是联合骨形态发生蛋白2或转化生长因子 β 共同转染, 均可促进初始间充质干细胞成软骨细胞分化, 但是并不能阻止软骨细胞在增殖的同时向肥大和老化发展, 表现为碱性磷酸酶的活性增加, 胶原蛋白(Coll X)和磨练蛋白(annexin5)分泌增多。生物力学的刺激可对间充质干细胞的软骨分化产生重要影响, 然而, 目前并没有相关报道利用IHH对间充质干细胞成软骨分化的调控, 联合生物力学的刺激作用, 用来构建组织工程化软骨, 这也将是组织工程领域未来的研究方向。此外, IHH调控软骨细胞分化的具体机制, 与其他信号通路的串话也需要进一步研究, 这将为利用IHH促进间充质干细胞分化并抑制软骨老化提供理论依据。

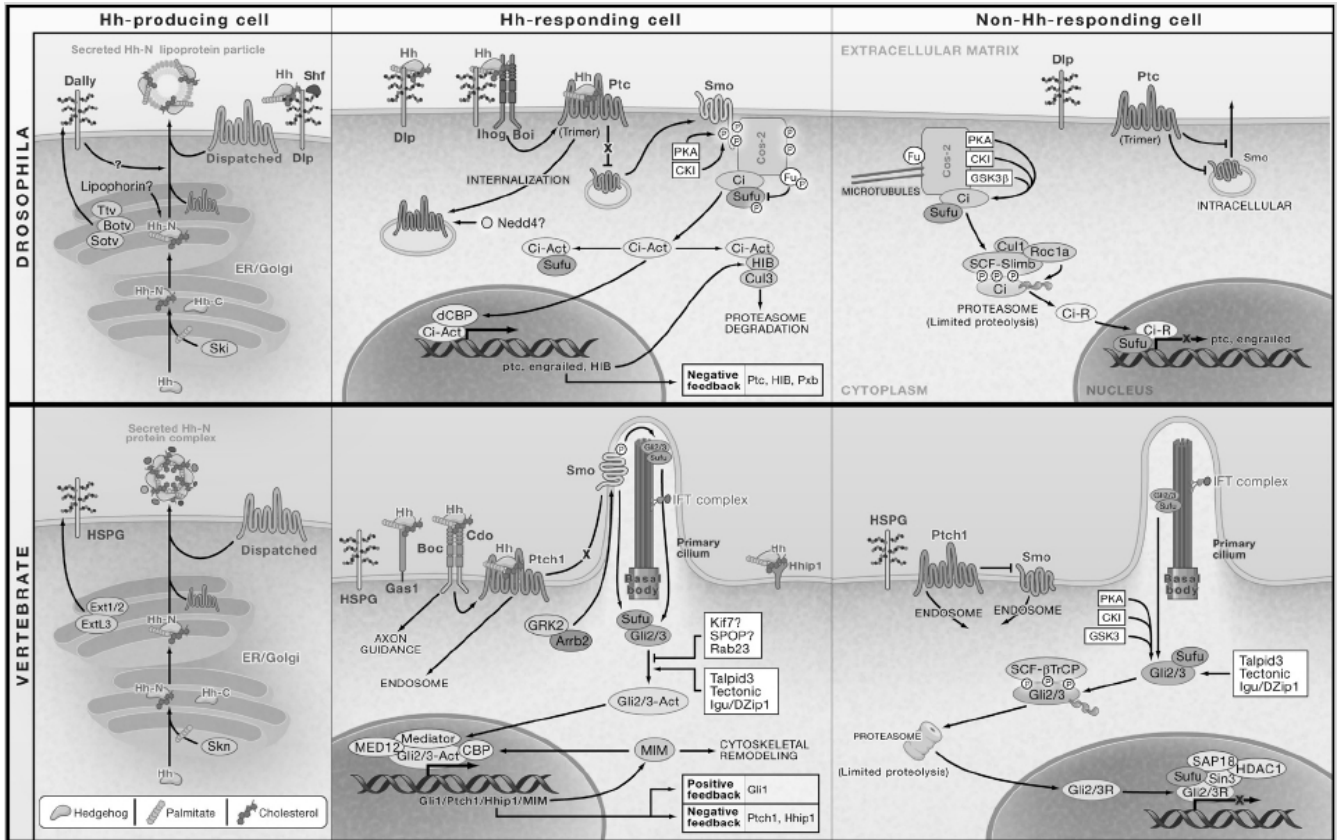


图 1 Hedgehog 信号通路模式图^[13]

2.4 SHH对间充质干细胞成软骨分化的调控 SHH信号是胚胎发育早期的重要信号分子,能够诱导肢体和脊髓中的间充质细胞向软骨细胞分化。研究发现,前体节中胚层在有SHH信号时会向软骨细胞分化,它通过与Nkx3.2和Sox9形成自调节环路,调控软骨分化与增殖,并且骨形态发生蛋白信号对分化晚期有特异性的调控作用^[24]。SHH在早期软骨细胞形成中同样具有重要作用,它可发挥比骨形态发生蛋白、转化生长因子等生长因子更强的促进间充质干细胞增殖,成软骨细胞分化作用,使软骨细胞特异性胞外基质II型胶原和葡聚糖表达增强^[25]。苍术内酯具有促进间充质干细胞成软骨分化及软骨胞外基质分泌的作用,研究发现,它是通过提升SHH信号,增加Gli1的转录实现的,当SHH信号被阻断时,这种维持软骨表型的效应明显减弱^[15]。此外,SHH信号也可对软骨细胞表型的维持具有调控作用。在低氧状态下,SHH信号可以刺激诱导软骨生成的转录因子Nkx3.2的生成,后者可抑制另一种诱导骨生成的转录因子Runx2的表达,从而维持软骨细胞的表型,促进软骨基质的分泌^[26]。以上研究表明,SHH信号在调控间充质干细胞成软骨分化过程中,具有重要作用,然而,具体的调控机制及与其他信号间的相互串话,仍有待进一步的研究。此外,虽然IHH与SHH同为hedgehog同源蛋白,在调控骨髓间充质干细胞成骨过程中,IHH和SHH却发挥着不同的作用^[27]。在体外软骨细胞培养过程中发现,

IHH和SHH呈周期性表达,当其中一种蛋白增加时,另一种蛋白的表达受到抑制,说明在生长发育过程中,两种蛋白可能起到互补作用^[28]。IHH和SHH在调节间充质干细胞成软骨分化过程中,是否发挥协同作用或是拮抗作用,有待研究来证实。

在组织工程领域,陈美玲等^[29]将SHH基因导入骨髓间充质干细胞中,与骨移植材料复合后,植入犬下颌骨种植体周围骨缺损模型中,发现基因修饰的骨髓间充质干细胞分化成骨后,可明显促进骨缺损区域的骨再生修复。这说明SHH介导的基因增强型骨组织工程在修复骨缺损中具有良好的发展前景。Kellner等^[14]利用聚丙烯三维支架材料体外培养牛关节软骨细胞,发现3种hedgehog同源蛋白均可促进组织工程软骨组织的增殖和基质糖蛋白的含量,软骨组织形态也更加成熟,效应呈剂量依赖型且与血清浓度无关。这使得hedgehog相关衍生物为软骨组织工程带来更广阔的前景。遗憾的是,目前并无相关研究证实SHH或其他hedgehog同源蛋白,对骨髓间充质干细胞构建的组织工程软骨形成的影响。这在未来的研究中,有待进一步的探索。

2.5 Hedgehog信号与其他信号串话调控间充质干细胞成软骨细胞分化 软骨的自然形成和修复需要多种信号表达分子协调,多种信号通路均参与调控间充质干细胞成软骨细胞的分化及软骨表型的维持。研究证实,在运动系统的发展,包括软骨内成骨及滑膜关节形成的过程中,

hedgehog信号与TGF β 1以及Wnt/ β -catenin之间具有内在联系^[30-31]。Hedgehog信号与Wnt/ β -catenin信号通路可发挥协同作用, 促进关节表面蛋白的分泌, 后者对于维持滑膜关节的功能及延缓关节炎的病理形成至关重要^[31]。以上研究表明, hedgehog信号与其他信号通路间存在广泛的内在联系, 共同调控运动系统的发育, 具体的调控、串话机制, 尤其是对间充质干细胞成软骨分化相关机制的研究, 将是组织工程领域的研究重点。

目前认为, SHH通过调节BMP及受体BMPRs的表达促进软骨形成, hedgehog信号中介Gli1可直接激活BMP信号, 这证实hedgehog通路及BMP通路在调节软骨形成中相互联系^[32-33]。SHH也可通过诱导转录因子Nkx3.2调控Runx的表达, 从而调节软骨细胞的表型及胞外基质的分泌^[26]。IHH调控间充质干细胞成软骨细胞的分化, 研究发现则与IHH上调FGF8的表达有关, 使早期软骨相关基因Sox9表达增加^[34]。Ihh-PTHrP轴调节骨骺区软骨细胞的增殖与分化, 维持骨骺区细胞的稳定, 而这种调节作用是通过调控Sox-9、Ptc及BMP-6的表达实现的^[35]。此外, 在早期软骨细胞形成中, IHH可通过下调runx2及runx3信号的表达抑制小鼠肢体胚芽软骨细胞形成, 而外源性重组体IHH蛋白则能通过增加Gli1蛋白激活runx2及runx3的表达, IHH与runx2及runx3发挥协同作用, 促进间充质干细胞成软骨细胞分化^[36]。由此可见, 间充质干细胞成软骨分化是一个由多分子, 多信号参与调控的复杂过程, hedgehog信号与其他信号通路可以单独调节这一过程, 但更重要的是通过相互联系, 共同发挥调控作用。Hedgehog在调控间充质干细胞成软骨分化过程中与其他信号通路的相互联系, 需要进一步的研究, 也代表着未来的研究方向。

3 展望 Prospects

软骨组织工程为临床治疗软骨组织损伤与缺损提供新的途径, 骨髓间充质干细胞也将继续做为理想的种子细胞来源进行研究。Hedgehog信号通路对间充质干细胞成软骨分化的调控机制, 以及与其他信号同路的串话机制, 将是这一领域未来研究的热点问题, 这将为临床预防及治疗关节炎, 构建组织工程软骨修复软骨缺损提供理论支持。此外, 由于骨髓间充质干细胞成软骨分化的过程, 不仅受到多种信号通路共同调控, 细胞及组织所处的生长环境及受到的生物力学因素影响也与之密切相关。遗憾的是, 目前对间充质干细胞成软骨分化的研究中多半将信号对的调控和生物力学刺激的影响分开进行研究。今后的研究将更加注重间充质干细胞和软骨细胞生长的物理化学环境, 对hedgehog信号调控间充质干细胞分化的影响。这将为体外利用骨髓间充质干细胞构建生物力学性能好, 软骨细胞表型稳定的组织工程化软骨, 用于修复软骨组织缺损带来新的希望。值

得注意的是, 在组织工程领域, 已有一些报道利用重组HH家族蛋白作为调控干细胞软骨定向分化的信号分子, 构建组织工程软骨移植物用于体内修复软骨缺损模型, 且取得一定研究结果, 但仍然存在着构建的软骨组织生物力学性能较差及软骨老化的问题。相信随着分子生物学和组织工程学进一步的研究进展, 这些问题都会得到解决。

作者贡献: 第一作者负责资料收集、分析文献, 并完成本综述; 通讯作者指导论文构架、审校论文并提出重要修改意见; 第一作者对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: hedgehog 基因-是一种分节极性基因, 因突变的果蝇胚胎呈多毛团状, 酷似受惊刺猬而得名, 又称刺猬基因。哺乳动物中存在 3 个 Hedgehog 的同源蛋白: SonicHedgehog(SHH)、Indian Hedgehog(IHH) 和 Desert Hedgehog(DHH), 分别编码 Shh、Ihh 和 Dhh 蛋白。Hedgehog 信号通路在胚胎发育过程中发挥重要调控作用, IHH 或 SHH 基因缺失或突变, 均可导致运动系统骨骼发育的异常和畸形。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Moran CJ, Pascual-Garrido C, Chubinskaya S, et al. Restoration of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am. 2014;96(4):336-344.
- [2] Gopal K, Amirhamed HA, Kamarul T. Advances of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of cartilage defects: A systematic review. Exp Biol Med (Maywood). 2014;239(6):663-669.
- [3] Bagaria V, Patil N, Sapre V, et al. Stem cells in orthopedics: current concepts and possible future applications. Indian J Med Sci. 2006;60(4):162-169.
- [4] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol Adv. 2008;26(1):1-21.
- [5] Chung R, Wong D, Macsai C, et al. Roles of Wnt/ β -catenin signalling pathway in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. Bone. 2013;52(2):651-658.
- [6] Mara CS, Duarte AS, Sartori A, et al. Regulation of chondrogenesis by transforming growth factor-beta 3 and insulin-like growth factor-1 from human mesenchymal umbilical cord blood cells. J Rheumatol. 2010;37(7):1519-1526.
- [7] Li J, Zhao Z, Liu J, et al. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. Cell Prolif. 2010;43(4):333-343.
- [8] Cai J, Deng L. Regulations of Hedgehog signaling pathway on mesenchymal stem cells. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2010;24(8):993-996.

- [9] Plaisant M, Giorgetti-Peraldi S, Gabrielson M, et al. Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2011;6(2):e16798.
- [10] Ehlen HW, Buelens LA, Vortkamp A. Hedgehog signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006;78(3):267-279.
- [11] Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP. Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell*. 2001;106(2):781-792.
- [12] Ikram MS, Neill GW, Regl G, et al. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol*. 2004;122(6):1503-1509.
- [13] Chen MH, Wilson CW, Chuang PT. SnapShot: hedgehog signaling pathway. *Cell*. 2007;130(2):386.
- [14] Kellner K, Lang K, Papadimitriou A, et al. Effects of hedgehog proteins on tissue engineering of cartilage in vitro. *Tissue Eng*. 2002;8(4):561-572.
- [15] Li X, Wei G, Wang X, et al. Targeting of the Sonic Hedgehog pathway by atractylenolides promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(8):1328-1335.
- [16] Wu X, Cai ZD, Lou LM, et al. The effects of inhibiting hedgehog signaling pathways by using specific antagonist cyclopamine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5966-5977.
- [17] Wu X, Li SH, Lou LM, et al. The effect of the microgravity rotating culture system on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Biotechnol*. 2013;54(2):331-336.
- [18] 王明霞, 黄建林, 朱尚玲, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 Sonic Hedgehog 信号通路表达的初步研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2012,28(3):483-487.
- [19] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*. 1999;13(16):2072-2086.
- [20] Fischer J, Aulmann A, Dexheimer V, et al. Intermittent PTHrP(1-34) Exposure Augments Chondrogenesis and Reduces Hypertrophy of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Dev*. 2014. [Epub ahead of print]
- [21] Fischer J, Dickhut A, Rickert M, et al. Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2696-2706.
- [22] Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, et al. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development*. 2008;135(11):1947-1956.
- [23] Steinert AF, Weissenberger M, Kunz M, et al. Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):R168.
- [24] Zeng L, Kempf H, Murtaugh LC, et al. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev*. 2002;16(15):1990-2005.
- [25] Warzecha J, Göttig S, Brüning C, et al. Sonic hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *J Orthop Sci*. 2006;11(5):491-496.
- [26] Kawato Y, Hirao M, Ebina K, et al. Nkx3.2-induced suppression of Runx2 is a crucial mediator of hypoxia-dependent maintenance of chondrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;416(1-2):205-210.
- [27] 张雪萍, 马晓丽, 汪运山, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Hedgehog 信号分子的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011;15(14):2487-2490.
- [28] Wu LN, Lu M, Genge BR, et al. Discovery of sonic hedgehog expression in postnatal growth plate chondrocytes: differential regulation of sonic and Indian hedgehog by retinoic acid. *J Cell Biochem*. 2002;87(2):173-187.
- [29] 陈美玲, 曹颖光. Sonic hedgehog 基因对犬下颌骨种植体周围骨缺损修复的影响[C]. 武夷山: 中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会口腔颌面发育和再生医学学术会议论文集, 2011: 67-68.
- [30] Mak KK, Chen MH, Day TF, et al. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development*. 2006;133(18):3695-3707.
- [31] Iwakura T, Inui A, Reddi AH. Stimulation of superficial zone protein accumulation by hedgehog and Wnt signaling in surface zone bovine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):408-417.
- [32] Murtaugh LC, Chyung JH, Lassar AB. Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev*. 1999;13(2):225-237.
- [33] Kawai S, Sugiura T. Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone*. 2001;29(1):54-61.
- [34] Zhou J, Meng J, Guo S, et al. IHH and FGF8 coregulate elongation of digit primordia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(3):513-518.
- [35] 张树威, 金伟, 祝少博, 等. 甲状旁腺素相关蛋白亚基因对骨髓干细胞的调控[J]. *中国组织工程研究*, 2013,17(10):1814-1820.
- [36] Kim EJ, Cho SW, Shin JO, et al. Ihh and Runx2/Runx3 signaling interact to coordinate early chondrogenesis: a mouse model. *PLoS One*. 2013;8(2):e55296.