

周晓旭,彭俊,胡海,等. TGF- β 3,HA,PTHrP 对人脐带间充质干细胞成软骨分化的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (10): 26-32.

Zhou XX, Peng J, Hu H, et al. Effects of transforming growth factor β 3, hyaluronic acid, and parathyroid hormone-related protein on chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 26-32.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.006

TGF- β 3,HA,PTHrP 对人脐带间充质干细胞成软骨分化的影响

周晓旭¹, 彭俊², 胡海², 张映辉³, 佟明华^{2*}, 顾为望^{1,3*}

(1.南方医科大学实验动物中心,广州 510000; 2.南部战区空军医院,广州 510000;
3.五邑大学,广东 江门 529020)

【摘要】 目的 探讨 TGF- β 3、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、甲状旁腺激素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)成软骨分化的影响,优化培养条件的组合方式。**方法** 体外分离培养人脐带间充质干细胞,形态学观察,流式检测表面抗体及成脂、成骨分化鉴定。取 P3 代细胞,加入不同组合的细胞因子进行成软骨诱导培养,分为 1~21 d TGF- β 3(G1)、1~28 d TGF- β 3(G2)、1~21 d TGF- β 3/1~21 d HA(G3)、1~28 d TGF- β 3/1~28 d HA(G4)、1~21 d TGF- β 3/1~21 d HA、14~21 d PTHrP(G5)、1~28 d TGF- β 3、1~28 d HA、14~28 d PTHrP(G6)、1~28 d TGF- β 3、1~28 d HA、21~28 d PTHrP(G7)7 组。**结果** 诱导培养 28 d 和 21 d 相比较,TGF- β 3 组和 TGF β 3/HA 组 COL2 α 1、COL10 α 1、SOX9、ACAN 的表达量上升;TGF β 3/HA/PTHrP 组 COL2 α 1、SOX9、ACAN 的表达量上升,COL10 α 1 下降。培养相同天数时,TGF β 3/HA 组较 TGF- β 3 组 COL2 α 1、SOX9、ACAN 的表达量上升;TGF β 3/HA/PTHrP 组同 TGF- β 3/HA 组比较,COL2 α 1、ACAN、SOX9 的表达量增加,COL10 α 1 表达量下降,且 PTHrP 加入 2 周较 1 周效果更明显。差异均有统计学意义。HE 和阿利新蓝染色结果与实时荧光定量 PCR 的结果一致。**结论** TGF- β 3、HA、PTHrP 可以不同程度的促软骨分化,其中联合应用 TGF- β 3、HA 28 d,在第 14 天时加入 PTHrP 一起培养,这种组合方式促进 HUC-MSCs 成软骨分化效果最好,且能抑制细胞肥大。

【关键词】 TGF- β 3;HA;PTHrP;人脐带间充质干细胞;成软骨分化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 10-0026-07

Effects of transforming growth factor β 3, hyaluronic acid, and parathyroid hormone-related protein on chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

ZHOU Xiaoxu¹, PENG Jun², HU Hai², ZHANG Yinghui³, TONG Minghua^{2*}, GU Weiwang^{1,3*}

(1. Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510000, China.
2. Southern Theater Air Force Hospital, Guangzhou 510000. 3. Wuyi University, Jiangmen 529020)

【基金项目】广东省科技计划项目(2013B060300013、2010A011200003、2016A020208004),国家自然科学基金项目(31271042),国家科技部国际合作项目(2011DFA33290),江门市创新团队项目(2017TD023290),广州市科技计划项目(201704020012),南方医科大学科研启动计划项目(PY2017N032)。

【作者简介】周晓旭(1992—)女,硕士。E-mail: minute1992@163.com

【通信作者】顾为望(1656—),男,教授,研究方向:实验动物模型制备与比较医学研究。E-mail: Guww100@163.com。

佟明华(1963—),女,主任医师,博士,研究方向:分子生物学和干细胞。E-mail: minghuat109@163.com。* 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate the effects of transforming growth factor (TGF)- β 3, hyaluronic acid (HA), and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and to optimize the combination of culture conditions. **Methods** Human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated and cultured in vitro for morphological examination, surface antibody detection, and adipogenic and chondrogenic differentiation. Different combinations of cytokines were added to P3 generation cells for chondrogenic differentiation as follows: TGF- β 3 on days 1–21 (G1), TGF- β 3 on days 1–28 (G2), TGF- β 3 on days 1–21 + HA on days 1–21 (G3), TGF- β 3 on days 1–28 + HA on days 1–28 (G4), TGF- β 3 on days 1–21 + HA on days 1–21 + PTHrP on days 14–21 (G5), TGF- β 3 on days 1–28 + HA on days 1–28 + PTHrP (G6) on days 14–28, and TGF- β 3 on days 1–28 + HA on days 1–28 + PTHrP on days 21–28 (G7). **Results** The expression levels of *COL2 α 1*, *COL10 α 1*, *SOX9*, and *ACAN* were higher in the TGF- β 3 and TGF- β 3/HA groups at 28 than 21 days of culture. In addition, the expression levels of *COL2 α 1*, *SOX9*, and *ACAN* were higher and that of *COL10 α 1* was lower in the TGF- β 3/HA/PTHrP group. When cultured at the same times, the expression levels of *COL2 α 1*, *SOX9*, and *ACAN* were higher in the TGF- β 3/HA group than TGF- β 3 group, and the expression levels of *COL2 α 1*, *ACAN*, and *SOX9* were higher and that of *COL10 α 1* was lower in the TGF- β 3/HA/PTHrP group than TGF- β 3/HA group. The effect of PTHrP addition for 2 weeks was significantly more obvious than that for 1 week ($P < 0.05$). The results of hematoxylin-eosin and alcian blue staining were consistent with the results of real-time quantitative polymerase chain reaction. **Conclusions** TGF- β 3, HA, and PTHrP can promote chondrogenic differentiation to different extents. When TGF- β 3 and HA were combined for 28 days and PTHrP was added on the 14th day (G6), this combination promotes best the chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and inhibits the cell hypertrophy.

[Keywords] TGF- β 3; HA; PTHrP; human umbilical cord mesenchymal stem cells; chondrogenic differentiation

软骨的损伤是多种骨科疾病的重要病理表现,如骨关节炎,由于软骨组织缺少血管、神经及淋巴的分布,故关节软骨损伤后一般难以自行修复,成为临床治疗的难题之一。近年来,间充质干细胞在软骨修复方面有一定的成果。脐带间充质干细胞具有来源广泛,良好的增殖能力及多向分化潜能等特性,为各学者研究使用。生长因子是间充质干细胞成软骨分化过程中不可或缺的成分。TGF- β 是经典的脐带间充质干细胞成软骨分化的诱导因子。有研究表明,较于 TGF- β 1, TGF- β 3 有更强的诱导间充质干细胞向软骨分化的能力,软骨相关基因(聚集蛋白聚糖,胶原蛋白 II, Sox9)的上调显著更多^[1-2]。透明质酸作为软骨基质的主要成分之一,也可以作为调节因子诱导成软骨分化。而间充质干细胞分化的软骨细胞的表型的不稳定和过早肥大阻碍了间充质干细胞用于软骨再生。多项研究表明甲状旁腺激素相关蛋白可以促进软骨形成,抑制间充质干细胞成软骨分化过程中的软骨细胞肥大。此外,PTHrP 可以促进软骨细胞增殖,抑制软骨细胞的成熟,从而延缓软骨内成骨的进展。本文就是探讨这三者的相互效应,优化诱导成软骨的因子组合方式。

1 材料和方法

1.1 实验材料

胎儿娩出后立即结扎脐带,无菌处理后放入

生理盐水中,充分洗净脐动静脉内的血液,剪成 1 ~ 2 cm 长度。用止血钳和镊子分离脐动静脉,外膜。剪碎脐带成 1 mm³ 大小的组织块,用 PBS 清洗一遍,均匀放置在培养瓶中,加脐带间充质干细胞培养基,置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。48 h 后换液,培养。取第三代细胞进行实验。(经家属知情同意后取足月健康产妇的新生儿脐带)

1.2 主要试剂与仪器

间充质干细胞成软骨分化基础培养基,丙酮酸钠,ITS,抗坏血酸,脯氨酸,地塞米松,青链霉素(铂晋生物),TGF- β 3 (Peprotech),透明质酸(山东福瑞达),PTHrP (Peprotech),人脐带间充质干细胞培养基(赛业),FBS(赛业),CD34,CD45,CD90,HLA-DR (BD),RNA 提取液(Servicebio),HyPure™ Molecular Biology Grade Water (HyClone),RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo),FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche)。

流式细胞仪(BD),显微镜(Olympus),离心机(Anke),匀浆仪(赛维尔生物),台式高速冷冻型微量离心机(DragonLab),荧光定量 PCR 仪(ABI),超净工作台(苏净安泰),超微量分光光度计(Thermo),标准试剂型纯水仪(青岛富勒姆),离心管(Axygen Biosciences),CO₂ 培养箱(NAPCO)。

1.3 实验方法

1.3.1 人脐带间充质干细胞的鉴定

流式细胞仪检测表面抗原:取第 3 代脐带间充质干细胞,制成 $1\times 10^6\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ 单细胞悬液,加抗体,避光 20 min, PBS 洗一遍,用流式细胞仪进行细胞表面标志的测定。

成脂诱导分化:取 P3HUC-MSCs,加入成脂诱导分化培养基,培养 14 d 后,油红 O 染色。

成骨诱导分化:P3HUC-MSCs,加入成骨诱导分化培养基,培养 21 d 后,茜素红染色。

1.3.2 人脐带间充质干细胞成软骨诱导分化

当第 2 代细胞融合到 80%~90%时,用 0.25% 胰酶消化,获得第 3 代脐带间充质干细胞,计数。取 5×10^5 的细胞转移至 15 mL 离心管中,250 r/min 离心 4 min。弃上清,加入 1 mL 基础培养基,重悬细胞,重悬后 1000 r/min 离心 5 min,重复一遍。将所得的细胞沉淀用 0.5 mL 的成软骨诱导分化完全培养基重悬,重悬后离心 1000 r/min 离心 5 min。离心完毕后,将离心管的管盖拧松,置于 37℃,5% CO_2 的培养箱中培养。实验分成 7 组进行,见图 1。

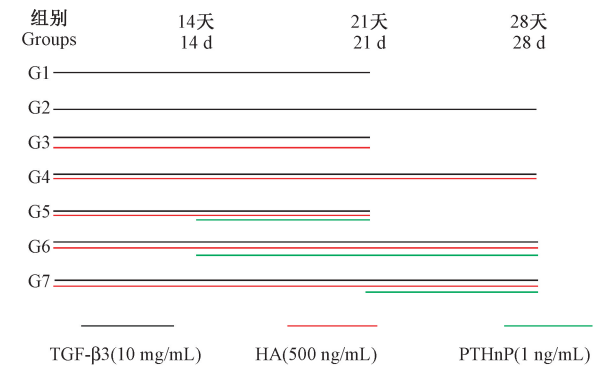


图 1 诱导成软骨分化的分组

Figure 1 Grouping of the chondrogenic differentiation test

1.3.3 HE 染色观察

培养完成后,用 4%多聚甲醛固定,石蜡切片脱蜡置于水中,苏木素染色,伊红染色,脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析。

1.3.4 阿利新蓝染色观察

将培养后的样品用 4%多聚甲醛固定,石蜡切片脱蜡置水,阿利新蓝染色,脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析。

1.3.5 荧光定量 PCR 检测

取出待检测的样,检测标志基因 II 型胶原,X 型胶原,SOX9,ACAN 的基因表达量。用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增。引物均

由 Servicebio 公司合成,以 ACTIN 为参照基因,各基因引物序列见表 1。数值由 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算得出。

表 1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of genes

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
COL-Ⅱ	Forward primer TGCAGGATGGGCAGAGGTATA
	Reverse primer CACAGATTATGTCGTGCGCAGAGG
COL-X	Forward primer ACAGGCAACAGCATTATGACCC
	Reverse primer TCGATGATGGCACTCCCTGA
SOX-9	Forward primer AGAACAGCCGCACGCTAAG
	Reverse primer CCCGTTCTTCACCGACTTCCT
ACAN	Forward primer AGGAACCATCAGCCTCGGAAG
	Reverse primer GTGCTGGGCCACTCAATTCTC
ACTIN	Forward primer CACCCAGCACAAATGAAGATCAAGAT
	Reverse primer CCAGTTTAAATCCTGAGTCAAGC

1.4 统计学方法

数据采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行描述性统计。计量资料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 one-way ANOVA 分析,两组间采用非配对 t 检验分析,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞的培养及鉴定

2.1.1 人脐带间充质干细胞形态学观察

人脐带间充质干细胞生长迅速,增殖能力良好,细胞呈“梭形”生长,随着细胞大量生长后,细胞呈“漩涡状”生长。见图 2。

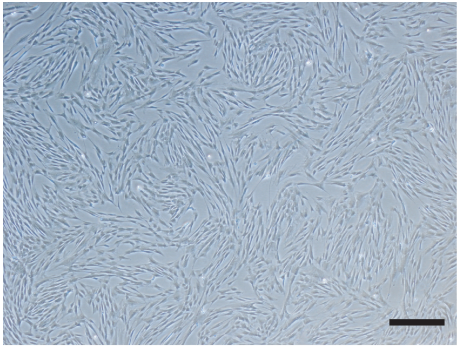


图 2 人第三代脐带间充质干细胞(Bar = 500 μm)

Figure 2 The third-generation human umbilical cord mesenchymal stem cells

2.1.2 流式细胞仪检测细胞表面抗原

应用流式细胞仪检测细胞表面抗原后显示,CD44 和 CD90 为阳性,阳性率分别为 99.69% 和 99.74%,CD34 和 HLA-DR 的表达率是 0.04% 和 0%,小于 2%,符合间充质干细胞的定义。见图 3。

2. 1. 3 成脂成骨诱导分化能力

人脐带间充质干细胞成脂分化后,经油红 O 染色,镜下可见脂滴被染成橙红色,见图 4。成骨分化后,经茜素红染色,镜下可见钙质结节被染成红色,见图 5。

2. 2 不同细胞因子组合的人脐带间充质干细胞成软骨分化的能力

2. 2. 1 HE 染色

通过 G2 组和 G1 组相比,G4 组和 G3 组相比,诱导 28 d 比 21 d 形成的软骨组织染色阳性区域增大,细胞增多,G6 组 G7 组和 G5 组相比,G7 组的阳性染色区域较大,G6 组染色较深且分布均匀。培养 21 d 的三组相比,G1 组染色阳性区域最小,细胞聚集在软骨组织外围,细胞最少,G3 组较 G1 组染色阳性区域无明显差别,细胞分布均匀,数量较 G1 组多,G5 组较前两组染色区域大,细胞较密集。培养 28 d 的四组相比,G2 组染色分布不均,细胞数量较少,G4 组 G6 组染色阳性区域无明显差别,G4 组有

部分未染色,细胞较少分布较松散,G6 组细胞多,分布均匀且密集,G7 组染色区域较大,细胞较多。见图 6。

2. 2. 2 阿利新蓝染色

阿利新蓝染色检测酸性黏多糖,结果同 HE 染色较一致。见图 7。

2. 2. 3 荧光定量 PCR 检测基因表达量

TGF-β3 组和 TGFβ3/HA 组,培养 28 d 较 21 d, COL2α1、COL10α1、SOX9、ACAN 表达量上升。在 TGFβ3 基础加入 HA 后, COL2α1、SOX9、ACAN 的表达量增加。差异有统计学意义。再加入 PTHrP 后,和 TGFβ3/HA 组比较, COL2α1、SOX9、ACAN 的表达量上升, COL10α1 的表达量下降, G5 组 G3 组、G6 组 G4 组、G7 组 G4 组、G7 组 G6 组之间均有统计学差异。说明 HA、PTHrP 可以上调 II 型胶原、SOX9、ACAN 的表达量,降低 COL10α1 的表达量,且加入 PTHrP 两周比加入一周效果更好。见图 8。

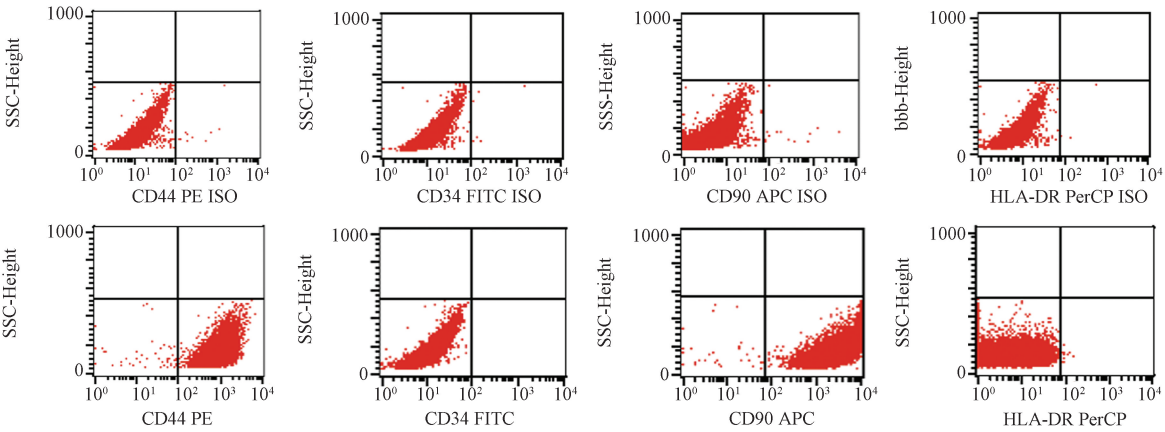


图 3 人脐带间充质干细胞流式细胞检测

Figure 3 Human umbilical cord mesenchymal stem cells determined by flow cytometry

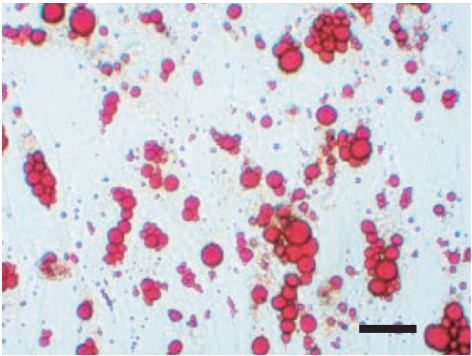


图 4 成脂分化图 (Bar=100 μm)

Figure 4 Adipogenic differentiation

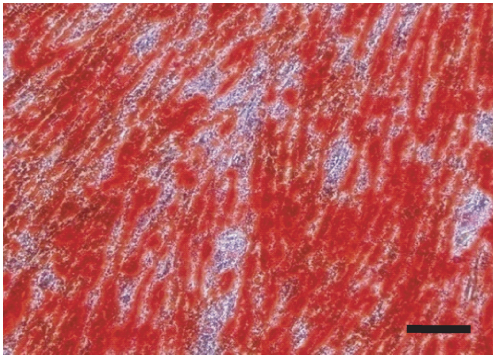


图 5 成骨分化图 (Bar=100 μm)

Figure 5 Osteogenic differentiation

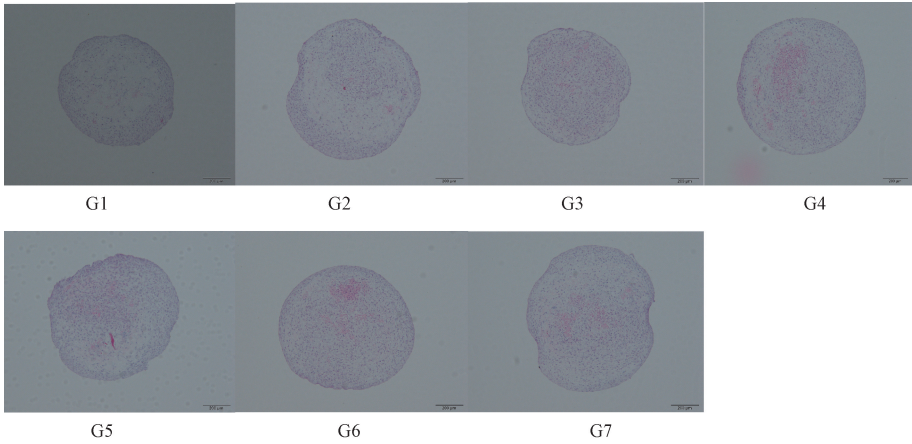


图 6 人脐带间充质干细胞加入不同细胞因子组合后形成的软骨组织的 HE 染色 (Bar=200 μm)

Figure 6 Morphology of the cartilage tissues in each group, formed by human umbilical cord mesenchymal stem cells combined with different cytokines. HE staining.

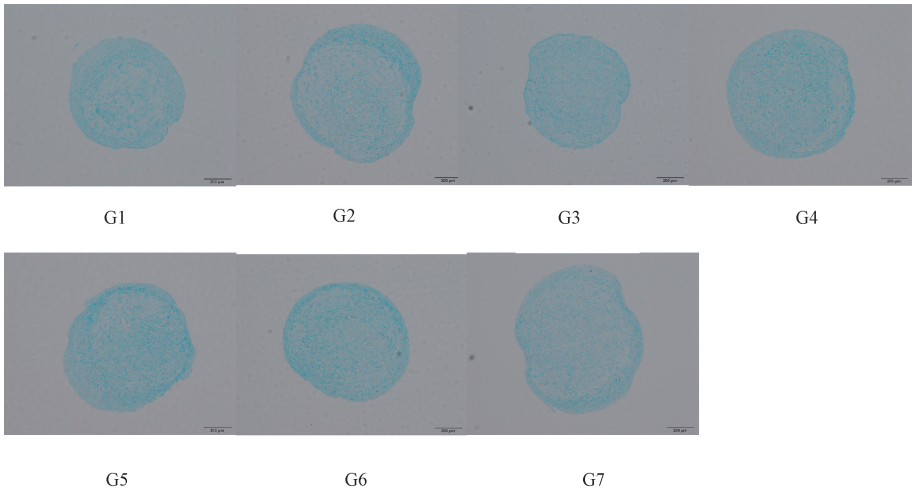


图 7 人脐带间充质干细胞加入不同细胞因子组合后形成的软骨组织的阿利新蓝染色 (Bar=200 μm)

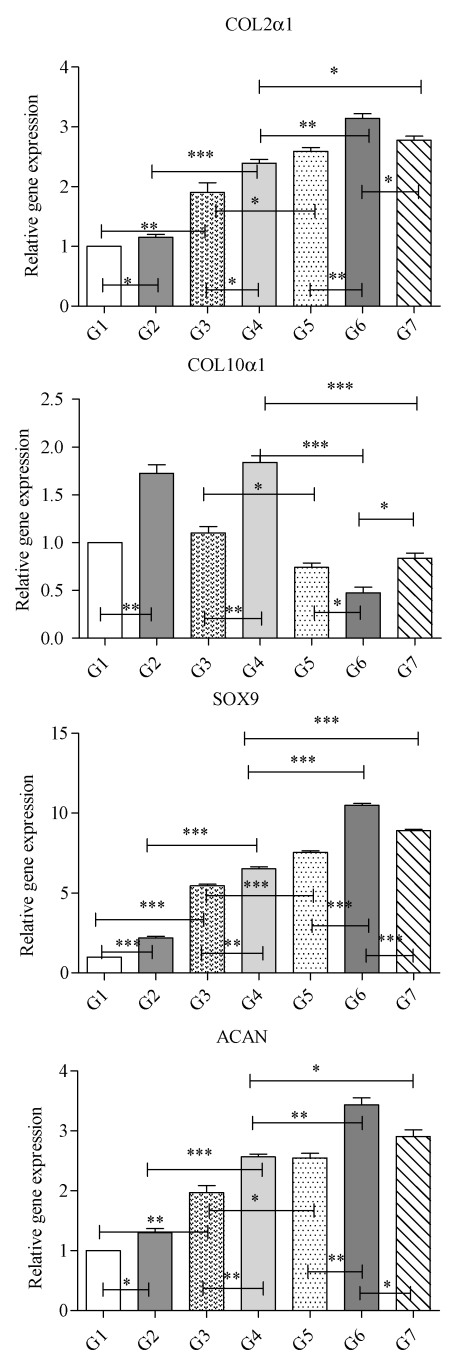
Figure 7 Morphology of the cartilage tissues formed by human umbilical cord mesenchymal stem cells in each group, combined with addition of different cytokines. Alcian blue staining.

3 讨论

软骨是由软骨细胞、胶原和蛋白多糖组成,由于无血管、神经及淋巴组织的特性,一旦损伤很难自我修复,一直是临床亟待解决的难题。随着组织工程技术和间充质干细胞技术的进步和发展,已经有很多实验研究表明干细胞向软骨细胞分化的能力^[3-4]。为了让干细胞向软骨定向分化,一般是在培养时加入细胞因子或利用生物支架等等,例如转化生长因子-β 家族 (TGF-β)、骨形态发生蛋白 (BMP)、胰岛素样生长因子 (IGF)、成纤维样生长因子 (FGF)、甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHrP)、Ⅱ型胶原透明质酸支架^[5-6]。本实验就是通过 HE、阿利新蓝染色以及测定 Ⅱ型胶原、X 型胶原、SOX9、ACAN

的表达量来探讨 TGF-β3、HA 及 PTHrP 三者对人脐带间充质干细胞成软骨分化的联合作用。COL Ⅱ 关节软骨的重要组成成分,是检测 hUCMSCs 向软骨分化效果的指标。ACAN 是软骨细胞特异性的标志物,基因表达和产物可用于评估软骨形成^[7]。COL2α1、ACAN 的表达量高表明成软骨分化的效果好。X 型胶原是软骨细胞肥大的标志,会使软骨细胞失去性能,进一步分化导致肥大的软骨细胞钙化。SOX9 是软骨发育和成熟过程中的关键转录因子,多种信号通路在软骨形成过程中调节 SOX9 的表达和活性^[8-9]。

众所周知,TGF-β3 是经典的成软骨诱导因子,可以促进软骨细胞增殖,调节软骨细胞分化,增强 ECM 的合成,在软骨形成过程中起到重要的作用。



注: 两两相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图 8 各组软骨的基因表达量

Note. Comparison between two groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 8 Expression of the chondrogenic genes in each group

从本实验中可以看出, 只加入 TGF-β3 培养 21 d 就可以诱导 hUCMSCs 成软骨分化, 培养 28 d 时, 形成的软骨细胞数量增多, 酸性黏多糖增加, COL2α1、SOX9 及 ACAN 的表达量增加。TGF-β3 与 TGFβR-II 结合, 激活 Smad 蛋白信号通路, 表达 II 型胶原和 SOX9^[10-11]。

HA 是一种酸性黏多糖, 是关节滑液和软骨基质的重要组成成分, 有润滑、保护和营养关节软骨的作用。在 MSCs 成软骨分化的过程中, HA 不仅可以用作支架材料, 也可以作为调节因子。多项研究证实了 HA 可以促进软骨的形成^[12-15], 主要是通过与一些细胞表面受体 (CD44, CD168, RHAMM 等) 的相互作用^[16-17]。本研究的结果也表明 HA 和 TGF-β3 有协同作用。在 TGF-β3 基础上加入 HA 后, 明显可以促进软骨细胞的增殖, 上调 COL2α1, ACAN, SOX9 的表达量, 促进软骨生成的效果优于单 TGF-β3 的效果, 并且培养 28 d 效果也优于 21 d。

PTHrP 是抑制软骨细胞肥大的重要因素, 而细胞肥大的特征之一就是 COL-X 的增多。本研究的结果表明 PTHrP 联合 TGF-β3/HA 可以抑制 COL-10α1 的表达量, 增加 COL-2α1、SOX9、ACAN 的表达量, 并且 PTHrP 作用的时间也影响抑制细胞肥大的效果。在添加 PTHrP 的三组中, 虽然从 14 d 或 21 d 使用 1 周的 PTHrP, 都能促进软骨生成, 抑制细胞肥大, 但联合应用 TGF-β3, HA 28 天, 在第 14 天时加入 PTHrP 一起培养再培养 14 d 的效果最好, COL-2α1、SOX9、ACAN 的表达量最高, 而 COL-10α1 的表达量最低。多数学者认为, PTHrP 通过与 Ihh 形成负反馈轴来调节软骨分化, 离开细胞周期变成肥大的软骨细胞分泌 Ihh 诱导合成 PTHrP, 作用于 PTH/PTHrP 受体 (PTH1R), 受体激活触发几种不同的细胞内信号传导途径, 包括 Gαs/腺苷酸环化酶/环腺苷一磷酸 (cAMP)/蛋白激酶 A (PKA) 和 Gαq/11/磷脂酶 Cβ/蛋白激酶 C (PKC) 等, 抑制软骨细胞持续肥大, 使软骨细胞保持增殖状态, 并且负反馈调节 Ihh^[18-19]。体外 MSC 在软骨形成的第一天开始表达 PTHrP, 并且随后下调 PTHrP 表达, 伴随着促进肥大成熟^[20]。当 PTHrP 合成的水平降至一定程度时, 软骨细胞会停止增生并发生肥大^[21]。KIM^[22]的实验结果表明 PTHrP 可以促进软骨形成并抑制 MSCs 体外软骨形成中的肥大, SOX9, GAG 和 COL-2α1 的表达量增加, COL-10α1 的表达量减少, 本实验结果与之相似。有研究表明 SOX9 会直接抑制软骨细胞 COL-10α1 和 VEGFA 等的肥大基因表达^[23-24]。猜测是 PTHrP 一定程度上通过上调 SOX9, 抑制 COL-10α1 的表达。但是也有研究者认为 PTHrP 限制了软骨细胞的分化和成熟。PTHrP 选择性抑制 X 型胶原的合成, 对 II 型胶原合成基本没有影响, 而合成 X 型胶原是软骨细胞分化成熟的标志, 提示 PTHrP 可抑制软骨细胞成熟过程^[25]。造成这种结果的不同主要考虑是由于使用 PTHrP

的剂量、分子量、时间等的不同引起的。只有 N 末端完整的 PTH 和 PTHrP 才能有效刺激聚糖蛋白聚糖合成^[26]。

综上所述, TGF- β 3, HA, PTHrP 可以不同程度的促软骨分化。本实验表明, 这其中联合应用 TGF- β 3, HA 28 d, 在第 14 天时加入 PTHrP 一起培养, 这种组合方式促进 HUC-MSCs 成软骨分化效果最好, 且能抑制细胞肥大。但缺乏相应的体内实验, 下一步将进行动物实验或进一步研究其具体的信号通路。

参考文献:

- [1] Eslaminejad MB, Karimi N, Shahhoseini M. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated by GSK-3 inhibitors [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 140(6): 623-633.
- [2] Tapp H, Deepe R, Ingram JA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat; transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R89.
- [3] Wang Y, Yuan M, Guo QY, et al. Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(9): 1661-1678.
- [4] Fan L, Chen J, Tao Y, et al. Enhancement of the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage repair by ghrelin [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(6): 1387-1397.
- [5] Huang L, Yi L, Zhang C, et al. Synergistic effects of FGF-18 and TGF- β 3 on the chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells in the pellet culture [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7139485.
- [6] Yeh HY, Lin TY, Lin CH, et al. Neocartilage formation from mesenchymal stem cells grown in type II collagen-hyaluronan composite scaffolds [J]. *Differentiation*, 2013, 86(4-5): 171-183.
- [7] Ansar MM, Esfandiariy E, Mardani M, et al. A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture [J]. *Adv Biomed Res*, 2012, 1: 24.
- [8] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10): 1226-1238.
- [9] Li J, Dong S. The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 2470351.
- [10] Jin G, Westphalen CB, Hayakawa Y, et al. Progastrin stimulates colonic cell proliferation via CCK2R-and β -arrestin-dependent suppression of BMP2 [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(4): 820-830.
- [11] Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, et al. A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators [J]. *Cell*, 2011, 147(7): 1511-1524.
- [12] Dvorakova J, Velebny V, Kubala L. Hyaluronan influence on the onset of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(5): 685-690.
- [13] 王昌耀, 于丽, 王英振, 等. 不同浓度透明质酸对骨髓来源间充质干细胞成软骨分化的影响 [J]. *中华临床医师杂志*. 2011, 5(21): 6213-6220.
- [14] Sharon A, Jessica SH, Valerie B, et al. A chondromimetic microsphere for in situ spatially controlled chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Control Release*, 2014, 179: 42-51.
- [15] Deng Y, Sun AX, Overholt KJ, et al. Enhancing chondrogenesis and mechanical strength retention in physiologically relevant hydrogels with incorporation of hyaluronic acid and direct loading of TGF- β [J]. *Acta Biomater*, 2019, 83: 167-176.
- [16] Bian L, Guvendiren M, Mauck RL, et al. Hydrogels that mimic developmentally relevant matrix and N-cadherin interactions enhance MSC chondrogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013, 110(25): 10117-10122.
- [17] Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix [J]. *Stem Cells*. 2006, 24(4): 928-935.
- [18] Fischer J, Ortel M, Hagmann S, et al. Role of PTHrP (1-34) pulse frequency versus pulse duration to enhance mesenchymal stromal cell chondrogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(12): 2673-81.
- [19] Fischer J, Aulmann A, Dexheimer V, et al. Intermittent PTHrP (1-34) exposure augments chondrogenesis and reduces hypertrophy of mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(20): 2513-23.
- [20] 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 [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2696-2706.
- [21] Zhao Q, Brauer PR, Xiao L, et al. Expression of parathyroid hormone-related peptide (PthRP) and its receptor (PTH1R) during the histogenesis of cartilage and bone in the chicken mandibular process [J]. *J Anat*, 2002, 201(2): 137-151.
- [22] Kim YJ, Kim HJ, Im GI. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(1): 104-108.
- [23] Hattori T, Müller C, Gebhard S, et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification [J]. *Development*, 2010, 137(6): 901-911.
- [24] Leung VY, Gao B, Leung KK, et al. SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(11): e1002356.
- [25] O'keefe RJ, Loveys LS, Hicks DG, et al. Differential regulation of type-II and type-X collagen synthesis by parathyroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 1997, 15(2): 162-174.
- [26] Harvey AK, YU XP, Frolik CA, et al. Parathyroid hormone-(1-34) enhances aggrecan synthesis via an insulin-like growth factor-I pathway [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(33): 23249-23255.