

丹酚酸 B 促进人软骨细胞生长并上调 β -连环蛋白和类细胞介素-1 的表达*

刘少杰¹, 杨小红^{2,3}, 崔树良⁴, 梁佩红², 谭见容²,
张金丽², 沈伟哉⁵, 徐敏³

- (1. 暨南大学医学院附属广州市红十字会医院普外科, 广东 广州 510220;
2. 暨南大学医学院附属广州市红十字会医院//广州市创伤外科研究所, 广东 广州 510220;
3. 香港浸会大学中医药学院, 香港 九龙;
4. 澳大利亚墨尔本大学理学院动物学系, 墨尔本 3010;
5. 暨南大学医学院人体解剖学学系, 广东 广州 510632)

摘要: 为探讨中药丹参的主要活性成份丹酚酸 B 对人软骨细胞系 C28112 细胞的增殖作用及其调节作用机制中相关因子的初步辨识采用 MTS 法检测丹酚酸 B 的对软骨细胞作用的有效浓度; 吖啶橙荧光标记软骨细胞的 DNA 及 RNA, 观察细胞分裂及形态学改变; Western Blotting (WB) 检测 β -Catenin 及新型软骨生长因子类细胞介素 1 的蛋白质表达。结果显示 MTS 法检测加入丹酚酸 B 后的所有剂量实验组与对照组比较吸光度值均有不同程度的增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 丹酚酸 B 实验组可见明显核分裂及较多的双核现象, 细胞增生较活跃; 半定量 WB 分析结果显示丹酚酸 B 实验组比对照组的类细胞介素 1 蛋白表达量显著升高, β -Catenin 蛋白质表达量亦显上调趋势。表明丹酚酸 B 能促进人软骨细胞的增殖并上调了相关因子的表达。其作用机制可能与丹酚酸 B 作用于软骨细胞中 Wnt 信号调节通路, 上调信号调节因子 β -Catenin 表达量, 激活靶基因类细胞介素 1 的转录并促进其表达释放有关。

关键词: 丹酚酸 B; 软骨细胞; β -连环蛋白; 类细胞介素 1

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2013) 04-0110-06

Salvianolic Acid B Promotes Human Chondrocyte Growth and Up-Regulating the Expression of β -Catenin and CYTL-1

LIU Shaojie¹, YANG Xiaohong^{2,3}, CUI Shuliang⁴, LIANG Peihong², TAN Jianrong²,
ZHANG Jinli², SHEN Weizai⁵, XU Min³

- (1. Department of General Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510220, China;
2. Guangzhou Institute of Traumatic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510220, China;
3. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Kowloon, Hong Kong SAR, China;
4. Department of Zoology, Faculty of Science, the University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia;
5. Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To investigate the proliferative function of the major component of Salvia, the salvianolic acid B, on human chondrocyte cell line C28112 and to identify associated factors in regulatory signaling path-

* 收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (S2012010010616); 广东省科技计划资助项目 (2012A030400036); 广州市科技计划资助项目 (20121A021009); 广州市医药卫生科技重点资助项目 (2012J4100027)

作者简介: 刘少杰 (1970 年生), 男; 通讯作者: 杨小红; E-mail: dryang1192@tom.com

ways, the study investigated the effective concentration of salvianolic acid B for chondrocyte growth in culture using MTS method and observe the cell division and the morphological changes by using Acridine orange fluorescent labeling of DNA and RNA to as well as detect protein expression levels of β -Catenin and the new types of cartilage growth factor cytokine-like 1 (CYTL-1) by Western Blotting (WB) method. The results showed that the absorbance values (A) in experimental group detected by the MTS methods were higher than the control group in all doses with statistically significance ($p < 0.01$); In salvianolic acid B experimental group, splitting cell nucleus with more dual-nucleus cells were obviously seen, indicating more active cells in growth process; the semi-quantitative Western Blot analysis showed that the CYTL-1 expression in salvianolic acid B experimental group was significantly up-regulated compared to the control group, the expression of β -Catenin in experimental group showed a trend of up-regulation. So, salvianolic acid B promoted the growth of human chondrocytes. The functional mechanism could be that the salvianolic acid B acted on the Wnt signal transduction pathway in chondrocytes, up-regulated the expression level of β -Catenin, activated the transcription of the target gene CYTL-1, and then stimulated its expression and release.

Key words: salvianolic acid B; chondrocyte; β -Catenin; cytokine-like 1

关节软骨损伤在临床上较为常见。由于软骨组织内无血管和神经组织, 软骨细胞被固定在一个致密的由胶原和蛋白多糖组成的固体基质中, 缺乏有效的自身分裂增殖和修复缺损的能力, 损伤后多发生骨关节炎, 病程往往逐步加重而导致关节功能的丧失^[1-2]。关节软骨的损伤修复一直是矫形外科的一个棘手难题, 目前临床上仍缺乏切实可行的治疗方法。

中药丹参为唇形科植物 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根和根茎, 根据《中华人民共和国药典》记载具有活血祛瘀, 通经止痛, 清心除烦, 凉血消痛的功能^[3]。作为治疗心脑血管疾病的一种常用的活血化瘀的传统中药, 具有悠久的临床应用历史。现代药理研究表明丹参主要的有效成份为脂溶性的丹参酮类和水溶性的酚酸类化合物两类, 尤其是水溶性成份, 无论从细胞、动物实验还是临床研究都有了很大的进展, 业已证实对心血管系统的作用十分明显^[4-5]。丹参的水溶性有效成份的生物学作用很广泛, 近年来的多项研究证实了丹参及其水溶性有效成份具有保护软骨细胞、抑制凋亡或防止关节软骨的退变等作用^[6-8], 但仅限于丹参复合成份的动物实验以及临床研究, 尚无丹参中具体的活性单体成分药物对软骨细胞活性作用的体外研究, 其药理机制也不清楚。丹酚酸 B (Salvianolic acid B, Sal B) 是传统中药丹参水溶性成份中活性最强的成份之一, 占水溶性药用成份总含量的 70%, 实验结果显示主要具有促增殖、抗氧化和细胞保护作用^[9-10]。丹酚酸 B 是否对软骨细胞也有类似对其他细胞一样的促增殖作用, 及其可能的作用机

制等至今仍鲜见报导。本文率先进行了中药丹参活性成份丹酚酸 B 对人软骨细胞的增殖作用实验研究, 并针对丹酚酸 B 对软骨信号通路中重要的新型软骨生长因子类细胞介素 1 (Cytokine-like 1, CYTL1) 的细胞表达调控, 在活性蛋白质水平上进行定性和半定量分析, 为丹酚酸 B 在软骨损伤修复的临床药物开发提供理论和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞 人软骨细胞系 C28112 为澳大利亚西澳大学 Dr. Jiake Xu 给广州市创伤外科研究所的赠品。

1.1.2 主要试剂 丹酚酸 B (昆明长春花科技有限公司, 批号 CCH601012, 纯度大于 90%), MTS 试剂盒 (Promega), CYTL1 一抗 (NOVUS), β -Catenin 一抗 (AVIVA), β -Actin (武汉博士德公司), 兔二抗 (SANTA CRUZ), 吖啶橙 (Sigma), 胎牛血清和 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) 培养液 (Gibco)。

1.1.3 主要仪器 激光共聚焦显微镜 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM) (Zeiss LSM 510 Meta system, 德国); 凝胶成像系统 (Bio-Rad ChemiDoc XRS+, 美国); 多模式检测系统 (Promega GloMax[®]-Multi+, 美国)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 C28112 细胞加入含 φ 为 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液中, 于 37 °C、 φ 为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养, 待细胞培养融合成 80%

后备用。

1.2.2 丹酚酸 B 对人软骨细胞的增殖检测 采用 MTS 法 (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) 进行, 将 C28112 细胞接种于 96 孔板中, 加入含有 $\varphi = 2\%$ 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM-F12 培养液, 细胞接种密度为 5×10^4 个/mL, 每孔 200 μL ($n = 3$); 丹酚酸 B 实验组按 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入药物, 对照组加入等体积 PBS 替代。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ 的 CO_2 培养箱中培养 24 h, 用 MTS 法 (操作按提供的说明书进行) 在多模式检测系统 490 nm 处读取吸光度值 (A 值), 以 A 值代表细胞的生长活性。

1.2.3 吖啶橙 (Acridine Orange, AO) 标记软骨细胞核酸^[11] 调节 C28112 细胞密度为 5×10^4 个/mL, 于 24 孔板上覆盖圆形盖玻片, 每孔 1 mL, 加入含有 $\varphi = 2\%$ FBS 的 DMEM-F12 培养液, 按 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度加入丹酚酸 B, 对照组加入等体积的 PBS, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ 的 CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 用常规方法加入多聚甲醛固定并洗涤细胞, 测定时加入 $w = 0.01\%$ 吖啶橙 2-3 滴, 染色 5 min, PBS 洗涤后在 CLSM 下观察软骨细胞形态标记情况, 控制图像采集的参数 (激光发射功率、针孔大小、光切厚度、增益等因素) 为同一条件, 采用双通道图像采集系统, 绿色荧光通道采集 DNA 荧光信号, 红色荧光通道采集 RNA 荧光信号, 激发波长为 DNA 488 nm, RNA 453 nm; 发射波长为 DNA 520 nm, RNA 615 nm。

1.2.4 WB 检测 β -Catenin、CYTL1 蛋白质表达

C28112 细胞培养、接种密度及药物作用浓度按上述 1.2.3 步骤进行处理, 两组细胞分别培养 24 h 后, 裂解细胞提取蛋白质并定量, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 $\varphi = 5\%$ 的分离胶及 $\varphi = 10\%$ 的浓缩胶, 电转至硝酸纤维素膜, $w = 5\%$ 脱脂奶粉 TBS 封闭 1 h, 分别加入抗 β -Catenin (1:750)、抗 CYTL1 (1:750)、抗 β -Actin (1:250) 多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内孵育过夜, 加入 HRP 标记的 IgG (1:1000), 室温 1 h, 洗膜后加入 ECL 液自显影, 用凝胶图像分析仪器和图像分析软件 (Bio-Rad Image Lab 3.0.1 Beta1) 分析结果。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计软件分析, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸 B 对人软骨细胞增殖效用的药物浓度

C28112 细胞加入按照梯度倍比稀释的丹酚酸 B, 在含有 $\varphi = 2\%$ FBS 的 DMEM-F12 中培养 24 h 后, 用 MTS 法测定细胞增殖结果如图 1。加入丹酚酸 B 后的所有剂量组与对照组比较吸光度值均有不同程度的增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 药物质量浓度从 3.13 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 促软骨细胞增殖呈不断上升的趋势, 以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为转折点开始出现下降的趋势。

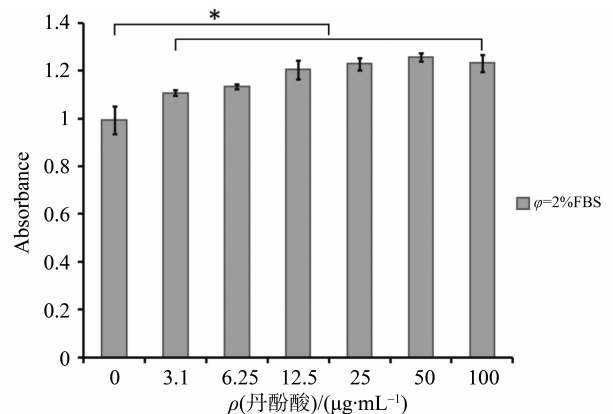


图 1 MTS 法检测丹酚酸 B 对 C28112 细胞的增殖

Fig. 1 MTS assay detects the growth of C28112 condrocytes treated with Salviaanolic acid B

The absorbance (A) represent the cell concentration in the media, which was complemented with 2% FBS and the amount of salviaanolic acid B for treatments as indicated in $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0 μg as control; * $P < 0.01$

2.2 吖啶橙标记检测丹酚酸 B 对人软骨细胞的影响

CLSM 下观察到实验组软骨细胞结构清晰, 其形态呈三角形; DNA 标记细胞核呈黄绿色荧光, RNA 标记细胞质呈红色荧光。丹酚酸 B 组细胞增生较活跃, 可见明显核分裂、较多的双核甚至多核现象 (图 2: A 箭头所示), 核分裂期间, 细胞质出现染色质 RNA 浓染现象 (图 2: D-F)。而对照组软骨细胞集落较小, 核分裂现象及染色体分裂相比较少 (图 2: B)。

2.3 β -Catenin 和 CYTL1 的蛋白质表达

WB 分析结果显示, 丹酚酸 B 实验组软骨增殖新型细胞因子 CYTL1/ β -Actin 比率 (6.63) 与对照组 (3.45) 比较, 蛋白质表达量显著升高; 细胞增殖关键信号蛋白质 β -Catenin/ β -Actin 比率结果

显示, 实验组 (14.91) 与对照组 (12.21) 比较也有上升趋势 (图 3)。

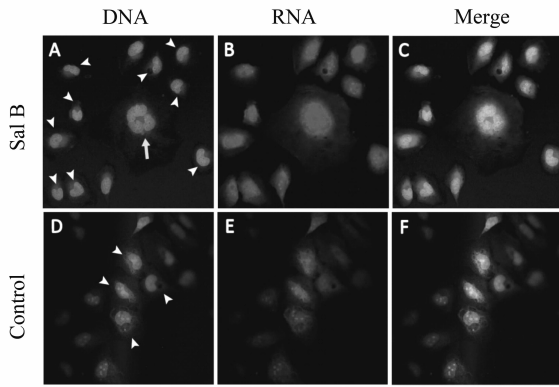


图 2 吖啶橙标记检测 C28112 细胞的 DNA/RNA

Fig. 2 Acridine orange fluorescent labeling detection of DNA / RNA in treated C28112 chondrocytes

Salvianolic acid B treated samples of A (DNA), B (RNA) and C (DNA and RNA merged) with the control of D, E and F respectively. Cells undergoing nuclei splitting are indicated by short arrowheads. Newly split cell nuclei are indicated by long arrow. (CLSM, $\times 400$)

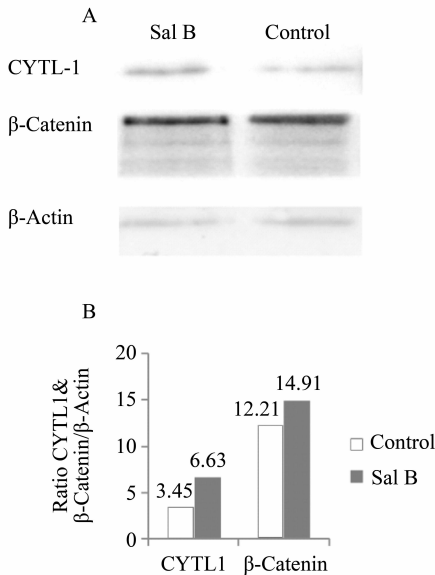


图 3 WB 检测 β -Catenin、CYTL1 的蛋白表达

Fig. 3 WB detection and analysis of the regulatory protein β -Catenin and cytokine-like 1 (CYTL-1) in cell lysates.

A: Proteins detected using specific antibody by WB; B: Semi-quantitative analysis of β -Catenin and CYTL-1 by their ratio to β -actin respectively. Sal B-Salvianolic acid B.

3 讨论

丹酚酸是从鼠尾草属植物丹参中提取的一类既

有咖啡酰缩酚酸结构又有新木脂素骨架的水溶性成份, 包括丹酚酸 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和异丹酚酸 C 等, 都具有很强的抗脂质过氧化和清除自由基作用, 其中丹酚酸 B 由三分子丹参素和一分子咖啡酸缩合而成, 是含量最高、活性最强的水溶性单体成份, 大量研究证实对多种组织细胞均有显著的促增殖作用。研究表明丹酚酸 B 能促进大鼠成骨细胞增殖^[12], 可通过刺激成骨、诱导血管生成和抑制脂肪细胞分化, 从而防止糖皮质激素引起的骨质流失^[13]; 丹酚酸 B 有促进骨髓源性神经干细胞的增殖、分化和自我更新等作用^[14]; 山等^[15]通过实验研究显示, 丹酚酸 B 对体外培养的神经干细胞有明显的促增殖作用, 其有效质量浓度在 1 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 而且促增殖作用依丹酚酸 B 质量浓度的增加而增强。本研究采用 MTS 法检测丹酚酸 B 对人软骨细胞的生长活性, 结果显示丹酚酸 B 的所有剂量组与对照组比较吸光度值均有不同程度的显著增高, 差异有统计学意义 (如图 1), 揭示药物质量浓度从 3.13 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对人软骨细胞均有促增殖作用。由于在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为转折点开始出现下降的趋势, 在进一步的机制研究中, 采用了增殖生长曲线的上升中间段 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为施药剂量。试验中采用相同的处理手段对兔软骨细胞作连续 8 d 的增殖测试, 结果显示与对照组比较均有显著性差异 (结果未发表), 其中处理 1 d 的结果差别最大; 另外在分子生物学检测中对人软骨细胞分别作了 1 ~ 2 d 的测试, 结果显示基因表达在第 1 天的测试中已经出现与对照组的区别, 且 2 d 处理与 1 d 并无明显差异; 因此, 本研究采用 1 d 的实验结果表示丹酚酸 B 的作用。由于体内关节软骨细胞由胶原纤维及蛋白多糖包裹, 周围没有血管及神经组织, 其营养要求较低, 既往研究显示体外培养的软骨细胞在理想的营养媒介中 ($\varphi = 10\%$ FBS) 生长旺盛, 其生长速度较一般组织快, 干扰了丹酚酸 B 的作用^[11, 16]。因此, 在本研究中为模仿体内的营养缺乏环境, 曾尝试采用多种降低培养液中的血清浓度的实验方法 (φ 为 1%、2% 和 5% FBS), 以 $\varphi = 2\%$ FBS 最为理想, 并适合软骨细胞的生长特性。

DNA 是所有生物遗传的主要物质基础, 遗传信息通过 DNA 转录成 RNA, 然后由 RNA 翻译成特定的蛋白质, 再通过蛋白质执行各种生命功能^[17]。DNA 和 RNA 是细胞的重要成份, 其含量变化直接反映细胞内代谢活性的情况^[18]。荧光素吖啶橙是一种三杂环芳香类染料, 常用于细胞内核酸的定量

测定, 可对细胞内 DNA 和 RNA 进行双重染色, 是良好的细胞化学染料。其主要优点是既能观察到细胞的清晰结构, 又能同时反映出细胞内 DNA (绿色) 和 RNA (红色) 两种核酸成份的变化, 特异性强; 核酸的含量越多, 荧光的颜色越鲜亮^[19]。吖啶橙 (AO) 与核酸的结合方式有两种: 一种是嵌入核酸双链的碱基对之间, 形成 AO-DNA 复合物发出黄绿色和绿色荧光; 另一种是与单链核酸的磷酸发生静电间相互作用, 形成 AO-RNA 复合物发出橙色和红色荧光。杨等^[11, 16]采用 AO 染色对低强度 He-Ne 激光对软骨细胞生长的观察, 发现弱激光照射后软骨细胞 DNA 合成、细胞核分裂显著增多, 低强度 He-Ne 激光对软骨细胞有促增殖作用。而本研究 AO 染色实验结果显示, 丹酚酸 B 实验组的软骨细胞可见较多的染色体分裂相, 与对照组相比双核细胞增多 (如图 2), 核分裂期间 RNA 增多, 呈现了积极合成蛋白质的细胞学特征。这一形态学观察结果支持了本研究中分子生物学分析对促进细胞增殖的推断。

Wnt 信号途径广泛地存在于各物种中, 调控多种生命过程, 是一种对细胞增殖和分化具有重要调节作用的信号传导系统。这一复杂的信号传导体系含有信号启动、分子传递、靶基因转录活化等关键环节, 并由多种分子参与、相互影响、相互制约和协同作用^[20-22]。近年来, 大量的研究结果已经确立了 Wnt 信号通路在胚胎软骨和骨骼发育中的关键地位^[23]。Wnt 信号传导途径中, 细胞外 Wnt 因子与膜受体卷曲蛋白 Frizzled 结合, 活化一系列胞质蛋白的相互作用, 使 β -Catenin 蛋白在胞质内有足够的累积, 致使 β -Catenin 进入细胞核, 进一步活化核内基因而促使细胞增殖。研究表明, 调节 β -Catenin 在胞内的稳定和累积为 Wnt 信号通路的关键, 是影响细胞增殖的主要原因之一^[21, 23]。骨形态发生蛋白 2 可通过 Wnt/ β -Catenin 信号经典途径, 上调 β -Catenin, Cyclin D1 和 Dvl1 基因从而促进软骨细胞的增殖^[24]; 双氢青蒿素对人骨肉瘤细胞株 143B 增殖和凋亡的研究中, 表明可通过抑制 Wnt/ β -Catenin 信号转导通路中关键蛋白因子 β -Catenin 的活性而抑制人骨肉瘤细胞株的生长。因此, β -Catenin 的活性对细胞的生长或抑制具有明确的调控作用。本研究中 WB 结果显示丹酚酸 B 实验组与对照组比较, 软骨细胞 β -Catenin 蛋白有上调趋势 (如图 3), 与文献报道的信号调节结果一致, 表明 β -Catenin 上调可能是促进人软骨细胞增殖的原因之一。

β -Catenin 为细胞粘附连接所必需, 与 T 细胞因子/淋巴样增强因子 (TCF/LEF) 共同作用激活靶基因的转录, 使其下游的靶基因表达增强。CYTL1 是一种新发现的特异性软骨细胞调控因子, 具有高度的软骨组织表达特异性, 仅在肺组织中少量表达外, 在多种其它组织中均未能检测到。Kim 等^[25]对 CYTL1 作了大量研究, 发现它可以特异性地促进软骨细胞增殖, 并通过刺激 Sox9 转录激活相关信号通道而使 II 型胶原、蛋白多糖等软骨细胞特异性基因表达上调。CYTL1 在骨髓间充质细胞表达很低, 但在通过增加胰岛素样生长因子表达来诱导骨髓基质细胞向软骨方向转化和软骨形成期间 CYTL1 表达大幅度增加, 显示其具有重要的促进软骨增殖的作用^[25]。CYTL1 基因敲除小鼠的体内作用研究显示对维持关节软骨内环境的稳定具有重要作用^[26]。本研究中 WB 结果显示丹酚酸 B 干预后, 软骨细胞 CYTL1 蛋白表达明显增高 (如图 3), 软骨细胞的生长与 CYTL1 表达相关, 揭示其对软骨细胞增殖的调控作用, 为参与软骨细胞生长中的另一个重要因子。

关节软骨损伤后难以修复, 虽经长期的探索研究, 但尚无理想的修复方法。丹参是常用的活血化淤的中药, 在我国广泛应用于心脑血管病和四肢关节退行性病的临床治疗, 具有活血化瘀, 改善微循环等作用。丹参对不同组织细胞的作用不尽相同, 对外周多种正常组织细胞有促进增殖的作用。本文的研究结果显示中药丹参的主要水溶性活性成份丹酚酸 B 同样能促进人软骨细胞的增殖, 其作用机制可能与丹酚酸 B 在软骨细胞中通过 Wnt 信号通路上调 β -Catenin, 激活靶基因 CYTL-1 表达并促进其成熟蛋白的释放相关。其对信号通路中上下游受控因子的影响和相互制约、与其它信号通路中各调节因子的互动与协调等有待于进一步探索。本研究为解决长期的骨科临床医学难题、开发和利用我国宝贵的中医药资源等开辟了新的途径。

参考文献:

- [1] AIGNER T, SODER S, GEBHARD P M, et al. Mechanisms of disease; role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence [J]. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2007, 3: 391 - 399.
- [2] LIN A C, SEETO B L, BARTOSZKO J M, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis [J]. *Nature Medicine*, 2009, 15: 1421 - 1425.

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 1 部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:70-71.
- [4] FENG L X, JING C J, TANG K L, et al. Clarifying the signal network of salvianolic acid B using proteomic assay and bioinformatic analysis [J]. *Proteomics*, 2011, 11: 1473-1485.
- [5] 徐义宏. 复方丹参滴丸的研究应用进展[J]. *中国实用医药*, 2010, 05:258-259.
- [6] JIANG H J, HUANG X J, TAN Y C, et al. Core decomposition and implantation of calcium phosphate cement/Danshen drug delivery system for treating ischemic necrosis of femoral head at Stages I, II and III of antigen reactive cell opsonization[J]. *Chin J of Traumatol*, 2009, 12: 285-290.
- [7] 杜晓红, 肖巍, 姜婷. 中西医结合治疗膝关节骨性关节炎的临床观察[J]. *湖北中医杂志*, 2012, 34(10): 47-48.
- [8] 段戡, 周江南, 成平. 丹参加玻璃酸钠关节内注射对家兔实验性膝骨性关节炎软骨退变的影响[J]. *中医正骨*, 2007, 19(2): 4-7.
- [9] 王凤美, 陈军辉, 李磊, 等. 高纯度丹酚酸 B 的制备工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(6): 3-5.
- [10] LU B, YE Z, DENG Y, et al. MEK/ERK pathway mediates cytoprotection of salvianolic acid B against oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow stem cells[J]. *Cell Biology International*, 2010, 34(11): 1063-1068.
- [11] 杨小红, 刘承宜, 刘少杰, 等. 光生物调节作用对软骨细胞基质分泌及超微结构变化的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29(6): 368-373.
- [12] 范焕琼, 崔燎. 丹酚酸 B 对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(7): 978-979.
- [13] CUI L, LI T, LIU Y, et al. Salvianolic acid B prevents bone loss in prednisone-treated rats through stimulation of osteogenesis and bone marrow angiogenesis[J]. *Plo Sone*, 2012, 7(4): e34647.
- [14] ZHANG N, KANG T, XIA Y, et al. Effects of salvianolic acid B on survival, self-renewal and neuronal differentiation of bone marrow derived neural stem cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 697(1/2/3): 32-39.
- [15] 山爱景. 丹酚酸 B 对小鼠胚胎脑神经干细胞增殖和分化的诱导[D]. 广州: 暨南大学医学院人体解剖学系, 2006: 32-43.
- [16] 杨小红, 叶惠贞, 李斯明, 等. 低强度 He-Ne 激光对软骨细胞增殖的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27(2): 68-71.
- [17] 郑国清, 刘九芬, 黄达人, 等. DNA 序列作为信息隐藏载体的研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44: 13-16.
- [18] 季宇彬, 姜薇, 尚明, 等. 甘草黄酮对 S180 和 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响[J]. *中草药*, 2005, 36(10): 1518-1520.
- [19] KUSUZAKI K, TAKESHITA H, MURATA H, et al. Acridine orange induces binucleation in chondrocytes [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001, 9(2): 147-151.
- [20] MOON R T, KOHN A D, de FERRARI G V, et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(9): 691-701.
- [21] BAUER M, WILLERT K. Wnt signaling: the beta-catenin's meow [J]. *Genes & Development*, 2012, 26(2): 105-109.
- [22] ZHONG N, GERSCH R P, HADJIARGYROU M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation [J]. *Bone*, 2006, 39(1): 5-16.
- [23] CHUN J S, OH H, YANG S, et al. Wnt signaling in cartilage development and degeneration [J]. *BMB Reports*, 2008, 41(7): 485-494.
- [24] LI X, PENG J, WU M, et al. BMP2 promotes chondrocyte proliferation via the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2011, 4(4): 621-626.
- [25] KIM J S, RYOO Z Y, CHUN J S. Cytokine-like 1 (Cyt1) regulates the chondrogenesis of mesenchymal cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(40): 29359-29367.
- [26] JEON J, OH H, LEE G, et al. Cytokine-like 1 knockout mice (Cyt1^{-/-}) show normal cartilage and bone development but exhibit augmented osteoarthritic cartilage destruction [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(31): 27206-27213.