

动,进而抗弯曲和抗股颈旋转的能力较强,有利于骨折的愈合。但是其手术过程中出血相对较多,手术切口较长,其固定方式为偏心固定从而抗剪切力相对较弱^[6]。本研究中 LISS 组的 24 例患者相比 PFNA 组的手术时间较长、切口长度较长、术中出血较多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

PFNA 是由 AO/ASIF 在股骨近端髓内钉 (proximal femoral nail, PFN) 的基础上改良而设计出来的^[7]。PFNA 用一枚螺旋刀片代替了 PFN 的 1 枚髁钉和 1 枚防旋钉,螺旋刀片的应用减少了术中的出血量和股颈内松质骨的丢失量。本研究中 PFNA 组的术中出血量 ($153.12 \pm 43.21\text{ml}$) 明显少于 LISS 组的术中出血量 ($220.11 \pm 53.12\text{ml}$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。螺旋刀片还能提高其锚合力从而提高了其固定的稳定性,能较好地防止旋转和塌陷作用,进而其抗拔除力也有一定程度的提高。Simmermacher 等^[8]认为 PFNA 的设计能够防止股骨头颈部的旋转,降低了螺旋刀片的股骨头的切割,在用于治疗不稳定型骨折时可以早期负重,是目前治疗不稳定型转子间骨折的最理想的内固定装置。

本研究认为 LISS 钢板和 PFNA 均是治疗股骨转子间骨折行之有效的方法,但相比之下 PFNA 更适合老年人的股骨转子间骨折。且其疗效确切,是目前治疗

股骨转子间骨折的理想内固定物,值得临床推广应用。

参考文献

- 1 陈伟,陈君祥. 股骨转子间骨折内固定方式的选择[J]. 健康之路, 2013, 12(11): 145-146
- 2 Ning Han, Sun GX, Li ZC, *et al.* Comparison of proximal femoral nail antirotation blade and reverse less invasive stabilization system - distal femur systems in the treatment of proximal femoral fractures[J]. Orthopaedic Surgery, 2011, 3(1): 7-13
- 3 缪海雄,王斌,刘伟乐,等. 反向 LISS-DF 与 PFNA 治疗股骨转子间骨折疗效分析[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(5): 136-138
- 4 Fang Z, Zhi S, Zhang H, *et al.* Less invasive stabilization system (LISS) versus proximal femoral nail anti-rotation (PFNA) in treating proximal femoral fractures: a prospective randomized study[J]. Journal of orthopaedic trauma, 2012, 26(3): 155-162
- 5 李杰,黄健华,霍维玲,等. 反向 Liss 与 PFNA 治疗股骨粗隆间粉碎性骨折的疗效分析[J]. 医学信息, 2013, 28: 115-117
- 6 苟琦,杨忠义. PFNA 及倒置 LISS 钢板治疗股骨近端骨折效果比较[J]. 中国卫生产业, 2014, 9: 1-2
- 7 Tao R, Lu Y, Xu H, *et al.* Internal fixation of intertrochanteric hip fractures: a clinical comparison of two implant designs[J]. The Scientific World Journal, 2013, 12(11): 825-834
- 8 Simmermacher RK, Ljungqvist J, Bail H, *et al.* The new proximal femoral nail antitotation (PFNA) in daily practice: results of a multicentre clinical study[J]. Injury, 2008, 39(8): 932-939

(收稿日期:2015-08-25)

(修回日期:2015-09-28)

竞争性 ELISA 法测定软骨细胞蛋白聚糖代谢片段的可行性分析

周惠琼 张清 叶彬 孙晓莹 杨文芳

摘要 **目的** 本研究探讨竞争性 ELISA 法测定软骨细胞蛋白聚糖代谢片段的可行性,为蛋白聚糖相关研究提供一个新的方法。**方法** 利用单克隆抗体 (Mab-5D4) 通过竞争性 ELISA 法检测体外培养的兔关节软骨细胞蛋白聚糖的代谢片段,摸索最佳实验条件,计算本方法的板间差异和板内差异,同时通过 DMMB 分光光度法测定蛋白聚糖的代谢物糖胺聚糖 (GAG),并比较它们的相关性。**结果** 竞争性 ELISA 法测定蛋白聚糖 5D4 片段方法的板间差异为 10.38%,板内差异为 3.91%,实验组培养上清液 5D4 片段的浓度明显高于对照组 (328.22ng/ml vs 184.61ng/ml , $t = 5.67$, $P = 0.001$)。与常规分光光度法测定蛋白聚糖的代谢物 GAG 有较好的相关性 ($r = 0.453 \sim 0.579$, $P = 0.001$)。**结论** 竞争性 ELISA 法测定蛋白聚糖代谢产物方法简便,重复性好,可应用于蛋白聚糖代谢的相关研究。

关键词 蛋白聚糖 ELISA 软骨细胞

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.015

基金项目:首都临床特色应用研究基金资助项目 (Z121107001012019)

作者单位:100048 北京,解放军总医院附属第一医院风湿科(周惠琼、张清);100029 北京,中日友好医院风湿免疫科(周惠琼、叶彬、孙晓莹、杨文芳)

通讯作者:周惠琼,教授,主任医师,电子信箱:13901188181@163.com

Feasibility of ELISA for the Measurement of 5D4 Fragments in Cultured articular Chondrocytes. Zhou Huiqiong, Zhang Qing, Ye Bin, et al. Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

Abstract Objective Monoclonal antibodies (Mab) of 5D4 which specifically against structural carbohydrate epitopes on the KS of aggrecan have been produced and used to detect the fragment of aggrecan which represents the abnormal metabolism of articular cartilage. **Methods** Articular chondrocytes were cultured with stimulated subject of TNF- α for up to 8 days. Aggrecan catabolic fragments in medium were measured by ELISA using Mab-5D4. The inter-run variability and intra-run variability were calculated. The GAG was measured by using a modification of a 1,9-dimethylmethylene blue spectrophotometric assay (DMMB) and the correlations with the results of ELISA were detected. **Results** The coefficient of variance of inter-run and intra-run of ELISA were 10.38% and 3.91%, respectively. Fragments of 5D4 in medium of TNF- α groups significantly increase than control (328.22 ng/ml vs 184.61 ng/ml, $t = 5.67$, $P = 0.001$). There were good correlations between the results of ELISA and GAG detected by DMMB assay ($r = 0.453 - 0.579$, $P = 0.001$). **Conclusion** The consistency and repeatability of ELISA to detect the fragments of 5D4 released by chondrocytes is acceptable. The method can be used in the study of metabolism of aggrecan.

Key words Chondrocyte; ELISA; Aggrecan

软骨是关节的主要结构之一,蛋白聚糖(aggrecan)与Ⅱ型胶原同为关节软骨的主要成分,其中蛋白聚糖异常代谢是软骨病变的主要表现,常见的关节炎如骨关节炎(osteoarthritis, OA)及类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)都存在蛋白聚糖的异常代谢。既往蛋白聚糖的代谢研究常采用DMMB分光光度法测定蛋白聚糖的代谢物糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)来代表蛋白聚糖的降解,影响因素多,结果不稳定。近年来发现用针对蛋白聚糖代谢片段的单克隆抗体(Mab)通过ELISA法来检测蛋白聚糖的不同代谢片段,方法简单,重复性好,有一定的应用价值^[1,2]。其中Mab-5D4为一种识别蛋白聚糖代谢片段的单克隆抗体,它可与蛋白聚糖核心蛋白区的硫酸角质素(keratinsulphate, KS)链中重复出现的硫化七糖结合,所检测产物5D4片段是蛋白聚糖降解的标志物^[3]。本实验利用Mab-5D4通过竞争性ELISA法检测体外培养的软骨细胞蛋白聚糖的代谢片段,以摸索出一种简便而又实用的检测蛋白聚糖代谢片段的方法,应用于蛋白聚糖相关的科研和临床研究。

材料与方法

1. 主要试剂:牛软骨提取的蛋白聚糖(Sigma公司),Ⅱ型胶原酶(Sigma公司),二甲基亚甲蓝(1,9-dimethylmethylene blue, DMMB, Serva公司),硫酸软骨素A(Seikagaku Kogyo公司),细胞培养液达氏修正依氏培养基(DMEM)/F12(Invitrogen公司),软骨细胞源自新西兰大白兔(西澳大学动物中心提供),Mab-5D4(Mdbioproducts公司)。本研究通过中日友好医院伦理委员会批准。

2. 软骨细胞培养:软骨细胞取自新西兰大白兔膝关节的股骨髁。软骨细胞原代培养方法参照文献[4]。细胞单层融合后按1:2传代,第1代软骨细胞采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率,选择细胞存活率均>95%的适当实验浓度做进

一步的实验。将第1代软骨细胞转入12孔的组织细胞培养板,每孔细胞数为 1.5×10^5 /L,培养48 h后,为去除小牛血清对GAG和蛋白聚糖分解片段测定的干扰,用不含小牛血清的培养液洗涤2次。此后的培养均采用无小牛血清的培养液。将软骨细胞随机分为对照组、TNF- α 组,每组设3孔,TNF- α 组为培养液中含10 ng/ml的TNF- α ,对照组为培养液中无任何刺激因子。所有细胞继续培养8天,每2天更换收集培养液并储存于-20℃冰箱待进一步实验用。

3. 竞争性ELISA法检测蛋白聚糖的代谢片段^[5]:为了去除边缘效应,每次实验只利用标准酶标板居中的60孔,舍弃周边孔。标准参照物为软骨素酶处理后的蛋白多糖(proto-glycan treatment with chondroitinase, PG CASE)。(1)确定Mab-5D4在ELISA中的最佳作用浓度:将购置的原液Mab-5D4按1/500、1/5000、1/10000、1/20000、1/40000及1/80000稀释,以吸光度约为1,斜率最大处的Mab-5D4稀释度为最佳工作浓度。(2)建立标准曲线:每一酶标板均建立标准曲线,标准曲线的稀释浓度为:PG CASE:1000、500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.9 ng/ml。复孔检测,并设空白对照及非特异结合孔。(3)检测本实验中ELISA方法的稳定性:通过测定本实验方法的酶标板间差异(inter-run variability)和板内差异(intra-run variability),用以下的公式计算板间和板内的变异系数(coefficient of variance, CV),了解本实验方法的稳定性。 $CV = \text{标准差} / \text{均数}(A \text{值}) \times 100\%$ 。板内的变异系数:同一份待测的培养液,在同一酶标板同时测定6次,复孔测定,共12孔。取A值计算CV。板间的变异系数:同一份待测培养液在不同的酶标板中重复测定6次,复孔检测,取A值计算CV。

4. 测定细胞培养液中蛋白聚糖5D4代谢片段:用125 ng/ml的PG CASE包被酶联反应板,100微升/孔,4℃湿盒过夜。弃包被液,200 μ l封闭液37℃封闭1h,洗涤液洗涤3次。用稀释液配制10个1:2连续稀释的标准抗原(PG CASE)溶液;取150 μ l的Mab-5D4(1:200000稀释),加到圆底的微量滴定板的每个孔中,再加入150 μ l不同稀释倍数的标准抗原。同时以

相同方法混合 Mab-5D4 和待测培养液(均适当比例稀释),混匀溶液,37℃放置 60min。将 100μl 的标准混合液及待测混合液转移到抗原包被板中,37℃作用 1h,洗涤 3 次。加入酶标 II 抗(羊抗鼠 IgG)到各反应孔中,100 微升/孔,37℃作用 60min,洗涤 3 次。将底物加入到各反应孔中,100 微升/孔,37℃作用 90min。加入 50 微升/孔的终止液。

酶标仪读 A(525nm)值,利用标准抗原-抗体的稀释系列所检测到的抑制活性数据,抑制率根据以下公式计算,制作标准的抗原-抑制曲线。将抗原浓度以对数标尺绘制在 x 轴上,将抑制率绘制在 y 轴上,待测抗原的抑制率(%) = 100 - $\frac{A(\text{标准抗原}) - A(\text{非特异结合})}{A(\text{空白对照}) - A(\text{非特异结合})} \times 100\%$ 。

5. 软骨细胞及培养液中 GAG 的测定:GAG 的含量采用 DMMB 分光光度法测定,体外软骨细胞培养过程中,GAG 释放入培养液中的水平代表蛋白聚糖的降解程度,释放入培养液中的 GAG 越多,表明蛋白聚糖的降解越明显。本实验采用 GAG 释放至培养液中的量占总体 GAG(细胞内 + 培养液)的百分率表示蛋白聚糖的降解。

6. 统计学方法:所有实验在相同的条件下重复 3 次,文中数据为 3 次实验数据的平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)。ELISA 法数据采用 GraphPad Prism 软件及 Excel 软件进行标准曲线的描绘及结果数据的读取。所有数据的统计学处理采用 SPSS 17.0 for windows 统计软件处理,符合正态分布的计量资料相关分析采用 Pearson 检验,非正态分布资料采用 Spearman 检验;采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

根据不同 Mab-5D4 抗体浓度的实验结果,1/200000Mab-5D4 稀释度为本研究 ELISA 法最佳工作浓度。应用竞争性 ELISA 法检测蛋白聚糖代谢片段 5D4 的结果稳定性,板内差异见表 1,板间差异 CV 的结果见表 2。

表 1 同一份待测培养液在同一酶标板重复测定 6 次 (共 12 孔)的 A 值

孔序	1	2	3	4	5	6	CV(%)
A 值	1.796	1.750	1.823	1.684	1.638	1.772	
A 值	1.621	1.687	1.743	1.745	1.801	1.652	3.91

表 2 同一份待测培养液在不同酶标板重复测定 6 次 (共 12 孔)的 A 值

板序	1	2	3	4	5	6	CV(%)
A 值	1.786	1.450	1.823	1.984	1.638	1.592	
A 值	1.621	1.357	1.703	1.775	1.701	1.452	10.38

ELISA 法测定培养液中 5D4 片段含量的标准曲线(以其中一酶标板为例,图 1)。培养 8 天时培养液

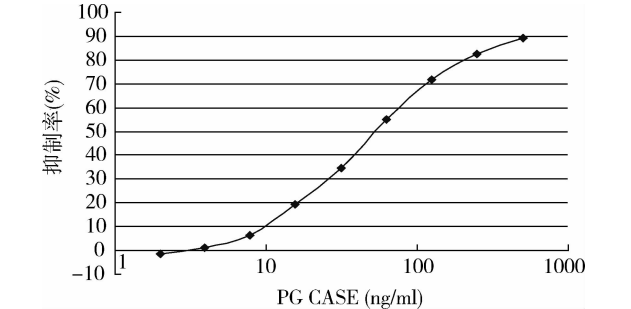


图 1 ELISA 法测定培养液中 5D4 片段含量的标准曲线

中 5D4 片段总含量测定,试验组培养液中 5D4 片段的含量与对照组比较明显增多(328.22ng/ml vs 184.61ng/ml, $t = 5.67$, $P = 0.001$)。培养不同时间(2~8 天)时,培养液中两组细胞 5D4 片段释放均逐渐减少,培养的前 3 个时间段(2、4 和 6 天),TNF-α 组释放的 5D4 片段均比对照组明显增多($P = 0.000$)。而培养的最后两天,两组细胞释放的 5D4 片段无区别。

表 3 软骨细胞培养不同时间段培养液中 5D4 含量及 GAG 释放的百分率

组别 [#]	5D4(ng/ml)		GAG(%)	
	TNF-α 组	对照组	TNF-α 组	对照组
1	156.32 ± 33.99*	90.56 ± 26.09	61.47 ± 12.90*	34.54 ± 6.43
2	92.54 ± 24.04*	40.32 ± 17.25	43.09 ± 10.42	38.16 ± 9.64
3	46.36 ± 14.14*	28.19 ± 9.97	46.24 ± 9.85	30.18 ± 5.01
4	33.44 ± 16.27	25.61 ± 10.72	29.41 ± 8.19	21.24 ± 4.28

[#]组别 1、2、3、4 分别代表培养的时间段:2、4、6 及 8 天。与对照组比较,* $P = 0.000$

软骨细胞培养不同时间段(2~8 天)时 GAG 释放入培养液的百分率在培养的第 1 时段(2 天),TNF-α 组软骨细胞 GAG 释放高于对照组(61.47% ± 12.90% vs 34.54% ± 6.43%, $P = 0.000$),其余 3 个时间段两组无差别,详见表 3。软骨细胞培养的不同时间段 GAG 的释放与 5D4 片段检测的结果呈明显正相关($r = 0.453 \sim 0.579$, $P = 0.000$)。

讨 论

软骨是关节的重要组成部分,软骨细胞的主要功能是分泌细胞外基质,维持软骨的正常代谢从而维持关节的完整性和稳定性。蛋白聚糖是软骨细胞的产物之一,与 II 型胶原同为关节软骨的主要构成成分。20 世纪 60 年代,国外研究者就对蛋白聚糖异常代谢与关节疾病间的关系做了相关研究,认为蛋白聚糖的进行性破坏与关节病变有明显的相关性,OA 患者血

清及关节液的蛋白聚糖代谢片段水平与关节的放射学改变有关,蛋白聚糖的异常代谢可望能预测关节破坏的进程^[6-8]。

蛋白聚糖的主体结构由一个核心蛋白和3个球状结构域(globular domain, G_1 , G_2 , G_3)组成。核心蛋白在 G_2 和 G_3 之间,是富含 GAG 侧链的区域,GAG 的主要成分是硫酸角质素(KS)和硫酸软骨素(chondroitin, CS),核心蛋白的 GAG 区域是易受蛋白酶作用的部位,测定 GAG 的分泌常作为蛋白聚糖代谢的指标。近年来,针对蛋白聚糖不同部位的 Mab 逐渐用于研究与关节相关的蛋白聚糖代谢^[9,10]。Straglics 等^[11]用多种针对蛋白聚糖不同部位的 Mab 检测幼年特发性关节炎患者的关节液,发现他们的蛋白聚糖代谢模式不同于成年 OA 患者。

Mab-5D4 为一种识别蛋白聚糖代谢片段的单克隆抗体,它可与蛋白聚糖核心蛋白区的 KS 链中重复出现的硫化七糖结合,所检测产物 5D4 片段是蛋白聚糖降解的标志物^[3]。既往研究发现体外培养的猪软骨小体在机械性压力作用下,5D4 片段不同程度地增多,其增多的程度和蛋白聚糖代谢的标志物 GAG 的变化相平行。在十字韧带切断的损伤性膝关节炎模型中,损伤后的第1周90%的关节积液中5D4 片段明显增多,在2~3周所有损伤关节的积液均可检测到5D4 片段,而对侧正常关节的积液中始终无5D4 片段出现,提示急性损伤可引起蛋白聚糖的降解。

国内有关蛋白聚糖相关研究较少,特别是应用单克隆抗体通过 ELISA 法检测蛋白聚糖代谢片段的可行性如何一直无相关报道。本研究选择可与蛋白聚糖核心蛋白区的 KS 链结合的 Mab-5D4,通过竞争性 ELISA 法检测体外培养的兔膝关节软骨细胞蛋白聚糖代谢片段,计算不同酶标板的板间和板内的变异系数,了解本方法的板间差异和板内差异,判断其结果稳定性。为了更好地区分蛋白聚糖在异常条件作用下的代谢情况,本研究选择了常见的炎症因子 $TNF-\alpha$ 作为刺激因子,观察软骨细胞受刺激后蛋白聚糖的代谢情况与正常对照组的比较。

本研究结果显示,用 Mab-5D4 测定蛋白聚糖代谢片段的板内 CV 值为 3.91%,板间 CV 值为 10.38%,与既往的研究相似,均具有较好的稳定性,

为可以推广应用的范围^[5]。实验中 $TNF-\alpha$ 组的总体 5D4 片段含量明显高于对照组,说明 $TNF-\alpha$ 可刺激软骨细胞蛋白聚糖的分解。本实验同时显示用 Mab-5D4 测定蛋白聚糖代谢片段与 GAG 测定值有较好的相关性($r=0.453\sim0.579$, $P=0.001$)。

在不同时间段的实验中,前3个时间段(2、4、6天) $TNF-\alpha$ 组的 5D4 片段均明显大于对照组,第4时间段两组间无差别,而 GAG 的结果有所不同,虽然 $TNF-\alpha$ 组4个时间段的 GAG 结果均大于对照组,但只有第1时间段(2天)差异有统计学意义,其他3个时间段仅略高于对照组。说明本实验所测的两个指标虽然都代表蛋白聚糖的降解,有一定的相关性,但它们之间还是有所差别,可能代表蛋白聚糖核心蛋白区不同部位的降解。

本研究显示,竞争性 ELISA 法通过 Mab-5D4 测定蛋白聚糖代谢片段的方法稳定性好,重复性高,与传统的蛋白聚糖代谢指标 GAG 有较好的相关性,如同时应用两种方法可望能更好地进行蛋白聚糖代谢的相关研究。

参考文献

- 1 周惠琼,张奉春.抗蛋白聚糖单克隆抗体在关节软骨代谢研究中的应用[J].中华风湿病学杂志,2007,11(8):503-505
- 2 Hughes CE, Caterson B, Fosang AJ, *et al.* Monoclonal antibodies that specifically recognize neopeptide sequences generated by aggrecanase and matrix metalloproteinase cleavage of aggrecan: application to catabolism in situ and in vitro[J]. Biochem J, 1995, 305(3):799-804
- 3 Hayes AJ, Hughes CE, Caterson B. Antibodies and immunohistochemistry in extracellular matrix research [J]. Methods, 2008, 45(1):10-21
- 4 Guerne PA, Sublet A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts[J]. J Cell Physiol, 1994, 158(3):476-484
- 5 Chan SS, Kent GN, Will RK. A sensitive assay for the measurement of serum chondroitin sulfate 3B3(-) epitope levels in human rheumatic diseases[J]. Clin Exp Rheumatol, 2001, 19(5):533-540
- 6 Straglics A, Hansson M, Lohmander LS. Human aggrecanase-generated synovial fluid fragment levels are elevated directly after knee injuries due to proteolysis both in the inter globular and chondroitin sulfate domains[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(8):1047-1057
- 7 Staffan L, Martin E, André S, *et al.* Association between synovial fluid levels of aggrecan ARCS fragments and radiographic progression in knee osteoarthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2010, 12(6):R230

(下转第96页)

MSC 与不同肿瘤相互作用的分子机制,找出适合的 MSC - 特异肿瘤的配对,能够帮助在临床治疗中诱导有效的肿瘤抑制作用而避免促进作用。

在本研究中,笔者通过体外间接共培养实验研究发现,培养过人脐带间充质干细胞的培养基可以起到抑制肿瘤细胞的生长、侵袭和黏附,并促进其凋亡的作用,表明人脐带间充质干细胞可能具有抑制肿瘤生长和其成瘤性的作用。这种作用是具有时间特异性的,即处理 24h 之内未见明显的抑制效果,需要将处理时间延长至 48h 或 72h 后才能发挥作用。同时,笔者还分析了 MSC 条件培养基发挥这些作用的分子层面的影响。首先, MSC 条件培养基通过下调细胞内 Ki - 67、PCNA 和组蛋白 H3 的磷酸化的水平抑制 HepG₂ 的增殖。其次,通过激活 caspase - 3 和抑制 Bcl - 2 来促进细胞凋亡。

综上所述,人脐带间充质干细胞具有抑制肝脏肿瘤细胞增殖、促进其凋亡的作用。值得注意的是, MSC 由 50% 密度增殖到 100% 密度的时间较短(常规培养条件 24 ~ 36h 便可完成)。在如此短的时间内产生的条件培养基就能够显著抑制 HepG₂ 细胞的成瘤性,说明 MSC 在生长过程中很有可能快速分泌一些抑癌物质。近期研究发现, DKK - 1 可能是 MSC 分泌的最重要的抗肿瘤分子之一^[11]。 DKK - 1 是 Wnt 通路的直接抑制分子,直接作用的主要受体 Wnt 通路细胞膜上的受体之一——LRP6。除了白血病,亦有报道指出 MSC 分泌的 DKK - 1 可以通过抑制 Wnt 通路减缓乳腺癌细胞的生长^[12]。鉴于 MSC 还可以分泌一些促进肿瘤生长的旁分泌因子,例如白介素 6 等, MSC 在动物模型和临床研究中对于 HCC 生长的分子影响机制还需要进一步研究。

参考文献

- 1 Studeny M, Marini FC, Champlin RE, *et al.* Bone marrow - derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon - beta delivery into

tumors[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13):3603 - 3608

- 2 Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, *et al.* VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(4):622 - 631
- 3 Zhu Y, Sun Z, Han Q, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK - 1[J]. *Leukemia*, 2009, 23(5):925 - 933
- 4 Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(5):1235 - 1247
- 5 Qiao L, Xu Z, Zhao T, *et al.* Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model[J]. *Cell Res*, 2008, 18(4):500 - 507
- 6 Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, *et al.* The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(2):245 - 251
- 7 Abdel aziz MT, El Asmar MF, Atta HM, *et al.* Efficacy of mesenchymal stem cells in suppression of hepatocarcinogenesis in rats: possible role of Wnt signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30:49
- 8 Li ZK, He CY, Xiao J, *et al.* Treating end - stage liver diseases with mesenchymal stem cells: an oak is not felled at one stroke [J]. *OA Tissue Engineering*, 2013, 1(1):3
- 9 Zhan J, Li Y, Yu J, *et al.* Culture medium of bone marrow - derived human mesenchymal stem cells effects lymphatic endothelial cells and tumor lymph vessel formation. [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(3):1221 - 1226
- 10 Räsänen K, Herlyn M. Paracrine signaling between carcinoma cells and mesenchymal stem cells generates cancer stem cell niche via epithelial - mesenchymal transition [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(9):775 - 777
- 11 Chan JK, Lam PY. Human mesenchymal stem cells and their paracrine factors for the treatment of brain tumors [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(10):539 - 543
- 12 Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, *et al.* Dkk - 1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1):67 - 77

(收稿日期:2015 - 02 - 09)

(修回日期:2015 - 02 - 13)

(上接第 56 页)

- 8 Eya Kalai, Afef Bahlous, Nadine Charni, *et al.* Association of serum levels of aggrecan ARGS, NITEGE fragments and radiologic knee osteoarthritis in Tunisian patients [J]. *Joint Bone Spine*, 2012, 79(6):610 - 615
- 9 Melrose J, Isaacs MD, Smith SM, *et al.* Chondroitin sulphate and heparan sulphate sulphation motifs and their proteoglycans are involved in articular cartilage formation during human foetal knee joint development[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 138(3):461 - 475

- 10 Lotz M, Martel - Pelletier J, Christiansen C, *et al.* Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives [J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72:1756 - 1763
- 11 Struglics A, Lohmander LS, Last K, *et al.* Aggrecanase cleavage in juvenile idiopathic arthritis patients is minimally detected in the aggrecan Interglobular domain but robust at the aggrecan C - terminus [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2012, 64(12):4151 - 4161

(收稿日期:2015 - 01 - 27)

(修回日期:2015 - 02 - 26)