

ATDC5:一株反映软骨形成完整过程的细胞系^{*}

冯其帅,高丽娜,崔元璐

(天津中医药大学中医药研究院,天津 300193)

摘要:中医学认为,筋骨失养,系肝肾虚衰所致。补肾中药的某些有效成分具有与细胞因子、激素类似的生理活性和广泛的药理作用,不仅可用于骨性关节炎的治疗,而且在组织工程及干细胞工程领域有广泛的应用前景。ATDC5细胞株来源于小鼠畸胎瘤株AT805,作为一个前软骨细胞株其分化过程与软骨形成过程类似。在细胞因子、激素和无机磷酸盐等作用下,ATDC5细胞将发生增殖、聚集进而进入软骨细胞分化阶段,分化为增殖性软骨细胞。增殖性软骨细胞随后继续分化为肥大性软骨细胞,从而进入终末分化阶段,软骨基质发生矿化,最终沉积成骨。通过从系统调节因子、局部调节因子和细胞培养条件三个方面,揭示ATDC5细胞增殖、分化与矿化的分子机制,为软骨发育研究及中药有效成分高通量筛选提供理论依据。

关键词:细胞生物学;补肾中药;ATDC5细胞;软骨形成;软骨细胞

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2015)06-0379-06

软骨形成过程始于间充质细胞增殖、聚集,其后逐步地分化为增殖性软骨细胞,而增殖性软骨细胞发生肥大化后分化为无增殖活性的肥大软骨细胞,进而肥大软骨细胞发生矿化进入终末分化阶段,最终被骨组织取代。ATDC5细胞株来源于小鼠畸胎瘤株AT805,作为一个前软骨细胞株其分化过程与软骨形成过程类似。研究表明,ATDC5细胞增殖、分化以及矿化阶段均可受诱导分化因子的影响,从而加速某一阶段的进程或者增强某一阶段的特征性软骨基质的表达。在软骨细胞分化早期,ATDC5细胞通过细胞聚集形成软骨小结并表达相应的特征性软骨基质,如聚集蛋白聚糖(Aggregan)、Ⅱ型胶原蛋白(Collagen type Ⅱ)等。伴随着软骨基质发生矿化,ATDC5细胞进入终末分化阶段,同时表达Collagen type X、碱性磷酸酶等标志性产物。研究证明,ATDC5细胞不仅具有稳定地表达软骨细胞外基质的能力,而且具有较强的增殖能力而便于体外扩增培养。

中医认为,肾藏精,主骨生髓,髓藏于骨腔内,

滋养骨骼^[1]。现代药理学表明,补肾壮骨中药不仅能够延缓软骨的损伤、降解以及退变,而且可以促进软骨分化与修复^[2]。本文将从系统调节因子、局部调节因子和细胞培养条件三个方面,揭示不同调节因子与ATDC5细胞的增殖、分化以及矿化之间的相互关系,为探究补肾壮骨中药软骨保护作用的分子机制提供一个展示软骨形成过程的细胞药理学模型。

1 系统调节因子

1.1 生长激素(GH)/胰岛素样生长因子-1(IGF-1)系统 生长激素具有广泛的生物学功能,其主要表现为具有促合成与生长发育的作用。在软骨形成过程中,生长激素可以促进软骨细胞的增殖与分化,调节蛋白质、糖及脂肪的代谢^[3]。一般认为,IGF-1通过介导生长激素从而发挥促进骨增长的作用,进而形成了GH/IGF-1功能系统^[4]。Koike等^[5]对ATDC5细胞进行成纤维细胞生长因子受体-3(FGFR3)突变诱导,MTT实验结果显示FGFR3突变的细胞增殖被抑制进而细胞凋亡。进一步研究发现,ATDC5细胞培养过程中加入IGF-1,IGF-1通过丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)信号通路可以促进细胞增殖和抑制细胞凋亡。IGF-1可以介导生长激素对软骨发育不全患者的治疗过程,其机制可能为通过PI3K和MAPK通路抑制FGFR3突变导致的凋亡。此外,生长激素可直接作

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81473542);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20131210110008)。

作者简介:冯其帅(1990-),男,硕士研究生,从事中药药理学研究。

通讯作者:崔元璐,E-mail: cuiyuanlu@tjtu.edu.cn。

用于生长激素受体而发挥其调控作用^[6]。根据相关报道,ATDC5细胞自身可以表达内源性生长激素受体。利用生长激素诱导ATDC5细胞研究发现,生长激素通过直接作用于生长激素受体诱导STAT5磷酸化促进Collagen type II的表达从而加速ATDC5细胞早期分化的进程^[7]。

1.2 甲状腺素 甲状腺素具有广泛而复杂的生理作用,尤其对骨骼发育起着至关重要的作用^[8],其中先天甲状腺素分泌不足将导致侏儒症发生。3,5,3,5'-四碘甲状腺原氨酸(T4)是甲状腺素两种主要的活性成分。分子生物学研究表明,甲状腺素能够靶向作用于软骨发育调控基因,从而加速软骨细胞趋向于肥大软骨细胞分化的进程,促进软骨基质矿化,最终实现协调软骨形成过程的作用^[9]。Miura等^[10]研究发现,T3可以增强茜素红S染色而对阿利新蓝染色无影响,表明T3对ATDC5细胞的作用主要表现为促进终末分化而对早期分化无明显作用。Siebler等^[11]也发现T3可以抑制ATDC5细胞增殖,诱导碱性磷酸酶和Collagen type X的表达,加速软骨细胞向成骨细胞分化。在软骨分化发育过程中,T4可以被激活转化为T3从而调控软骨形成。

在软骨细胞增殖与分化过程中,成纤维细胞生长因子(FGFs)是重要调节因子之一,其中FGFR3基因突变可以引起软骨发育不全。研究发现,T3通过靶向于FGF/FGFR信号通路中关键蛋白HSPGs来调控ATDC5细胞分化发育^[12]。在软骨形成阶段,T3能够激活FGF2和FGF18调控ATDC5细胞的增殖与分化^[13]。除此之外,Ihh/PTHrP与甲状腺素的代谢和其活性成分T3存在着密切的联系,介导T3调控软骨形成过程。

1.3 雌激素 雌激素属于类固醇激素,靶向于细胞内雌激素受体(ER)发挥作用。雌激素受体是核受体超家族的成员,具有转录因子的作用,包括ER α 和ER β 两种亚型^[14]。雌激素对骨的作用可能是通过介导调控成骨细胞、成骨细胞前体、骨细胞和生长骨板的软骨细胞ER α 而实现的。为了探讨雌激素对ATDC5细胞增殖的影响,Zheng等^[15]利用 10^{-11} ~ 10^{-8} mol/L雌激素诱导ATDC5细胞,发现雌激素可以促进细胞增殖并且表现出时间和剂量依赖性。进一步研究发现,雌激素的作用机制为促进CNP信号通路中CNP、NPR-B和NPR-C蛋白表达而实现的。在软骨细胞对数生长期,雌激素与瘦素相辅相成,调控软

骨发育过程。研究发现,在ATDC5细胞中,雌激素与瘦素受体均有表达。雌激素可以通过雌激素受体促进瘦素受体的表达,而瘦素也可以通过ERK信号通路促进雌激素受体的表达,从而加速ATDC5细胞肥大化过程,促进其分化为成骨细胞^[16-17]。

1.4 骨保护素 骨保护素是一种骨代谢过程的中介分子,介导多种细胞因子和激素对破骨细胞分化与活化的负性调节作用^[18]。骨保护素是核因子(NF)NF- κ B受体活化因子配体(RANKL)的假受体,具有高度的RANKL亲和力。通常认为,骨保护素以竞争性结合的方式抑制核因子 κ B受体活化因子(RANK)与RANKL的结合,阻断级联反应从而抑制破骨细胞的形成以及骨吸收^[19]。在ATDC5软骨分化过程中,骨保护素和RANK两者均可以表达,两者相互结合从而抑制RANK的表达,进而抑制ATDC5细胞趋向破骨细胞分化而促进其增殖与分化^[20]。

1.5 糖皮质激素 糖皮质激素是人体在生理状态下分泌的^[21]。在关节炎治疗中,地塞米松、氢化可的松、泼尼松等糖皮质激素作为抗炎药物经常被使用。在治疗过程中,发现地塞米松能够抑制骨骼发育,尤其是抑制软骨细胞的增殖。同样研究表明,地塞米松可抑制ATDC5细胞增殖和蛋白多糖的合成,其抑制蛋白多糖的机制是通过调控PI3K/Akt信号通路从而抑制Runx2转录因子实现的^[22],而抑制细胞增殖的机制是通过诱导细胞自噬而实现的^[23]。

1.6 胰岛素 胰岛素与IGF-I相类似,具有异二聚体 $\alpha 2 \beta 2$ 蛋白结构以及相似的下游信号通路和受体靶点。两者均可通过胰岛素受体(IR)、IGF-IR和IR/IGF-IR结合发挥其调节软骨细胞增殖和分化的作用。Yao等^[24]使用分别含有分化因子、生长因子和胰岛素的细胞培养基对ATDC5细胞进行培养,观察不同诱导分化因子对软骨细胞分化发育的影响。实验结果表明,3种细胞培养基均可以促进ATDC5细胞的增殖,其中以含有胰岛素的细胞培养基作用最为显著。此外,含有分化因子的细胞培养基可显著地增强软骨细胞分化特征性基质的表达,而含有胰岛素的细胞培养基可以促进软骨细胞矿化特征性基质的表达。重要的是ATDC5细胞在含有胰岛素的细胞培养基中培养时,其总糖胺聚糖表达量是最高的。胰岛素对ATDC5细胞的作用主要表现为促进细胞增殖和加速软骨细胞功能的表达。

2 局部调节因子

2.1 转化生长因子- β (TGF- β) 在软骨形成过程中,TGF- β 通过激活经典与非经典的 Smad 通路调节软骨特定功能蛋白的基因表达,涉及到软骨细胞聚集、增殖、细胞外基质合成以及矿化等各个阶段^[25]。在软骨细胞分化早期,TGF- β 以激活 Smad 3 与转录因子形成复合物的方式,募集 CREB/p300 到 Collagen type II 启动子上从而增强其表达。在 ATDC5 细胞中研究发现,TGF- β 主要通过两种方式实现对 ATDC5 细胞诱导分化作用:一方面通过 Smad 3 从而启动软骨基质的表达。另一方面通过 p38/ERK1/2 通路维持软骨基质长期的表达。Watanabe 等^[26]对 TGF- β 诱导 ATDC5 细胞软骨基质表达的作用及其机制进行了研究。结果表明,在细胞培养基中添加 TGF- β ,可迅速地促进 ATDC5 细胞中蛋白聚糖的表达。分子机制研究发现,无论处于增殖期还是分化期,TGF- β 对蛋白聚糖的诱导作用均由 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路所介导。Han 等^[27-28]对增殖期 ATDC5 细胞给予 TGF- β 1 诱导,培养 12 d 后,蛋白聚糖和 Collagen type II 的表达均显著上调,并具有时间、依赖性。在 ATDC5 细胞中,TGF- β 1 可以调控 SRp40 的表达从而促进纤维蛋白表达,纤维蛋白通过 RGDS 多肽调控蛋白聚糖和多功能蛋白聚糖之间的平衡^[29]。

2.2 骨形态发生蛋白(BMPs) BMPs 属于 TGF- β 超家族,是一类具有促软骨形成作用的内源性蛋白。处于不同分化阶段的 ATDC5 细胞将表达不同类型的内源性 BMPs。其中,BMP-2 在软骨细胞分化各个阶段均可以表达;BMP-6 在软骨小结形成阶段表达上调;BMP-7 在细胞钙化阶段才可以被检测到^[30]。

作为诱导成骨细胞分化重要的细胞外信号分子之一,BMP-2 是软骨形成过程中间充质细胞分化所必需的调节因子,其发挥作用主要涉及到两条信号通路:BMP-2/Smads/Runx2/Osterix 信号通路和 BMP-2/Smads/Msx2/Osteri 信号通路^[31]。Shukunami 等^[32]研究发现,BMP-2 上调 Collagen type X 和 ALP 基因表达同时下调 Collagen type II 基因的表达,从而促进 ATDC5 细胞分化为肥大软骨细胞。体外实验发现,BMP-7 可以促进软骨细胞外基质合成进而促进软骨细胞早期分化^[33-34]。Caron 等^[35]将 BMP-7 与 BMP-2 以微克级浓度诱导处于分化期 ATDC5 细胞,分析 BMP-7 与 BMP-2 对 ATDC5 细胞差异性作用。实验结果显示,BMP-2 可以促进 ATDC5 细

胞 Collagen type X、ALP、Runx2 和 MMP-13 等软骨细胞肥大化特征性产物的表达,而 BMP-7 促进软骨细胞分化特征性基因 Aggrecan、Collagen type II 和 Sox9 的表达而抑制矿化产物的表达。由此表明,BMP-2 是肥大软骨细胞的诱导因子,而 BMP-7 是增殖性软骨细胞的诱导因子。

2.3 Sox9 Sox9 作为一个重要转录因子,在软骨细胞早期分化中扮演着极其重要的角色。首先,Sox9 与软骨细胞特异增强子 Col2 α 1 结合从而直接调控 Collagen type II 表达^[36];其次,L-Sox5、Sox6 与 Sox9 三者能够形成蛋白复合物,相互协同作用于 Col2 α 1 增强子序列从而促进 Collagen type II 的表达。Sox9 也可以通过结合于 PTHrP 基因的启动子区增加 PTHrP 基因启动子活性,进而促进软骨细胞增殖和分化^[37]。此外,Wnt/ β -catenin 和 TGF- β /Smad 信号通路通过调控 Sox9 从而参与到软骨细胞早期分化过程中^[38]。

在 ATDC5 细胞中,存在着一个负责调控 Sox9 基因表达的含有 30 个碱基对的增强子。Ushita 等^[39]研究发现 NF- κ B RelA 可以促进 ATDC5 细胞表达 Collagen type II,其作用机制为 NF- κ B RelA 靶向结合 Sox9 增强子,调控 Col2a1 基因从而促进软骨基质 Collagen type II 的表达。低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP4)是一种 Wnt 信号通路抑制剂。Asai 等^[40]对 LRP4 在 ATDC5 细胞分化过程中的作用进行了相关研究,结果表明 LRP4 通过阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路而增强 Sox9 基因表达而促进软骨基质 Collagen type II 和 Aggrecan 的表达,促进 ATDC5 细胞早期分化。

2.4 Runx2 作为软骨细胞成熟的调控中心,Runx2 已经成为目前研究的热点。Runx2 是软骨形成过程中沉积阶段的特征性产物,在前肥大软骨细胞和肥大软骨细胞中表达量显著上升,而在增生性软骨细胞中,其表达量明显下降^[41]。在 ATDC5 细胞中,Runx2 的表达量在其肥大化阶段、增殖与分化阶段显著增加。Runx2 可以通过促进 Collagen type X 表达来加速 ATDC5 细胞向肥大软骨细胞分化^[42]。Runx2 在 ATDC5 细胞成熟过程中发挥着重要的作用。利用 siRNA 技术干扰 ATDC5 细胞 Runx2 的表达,发现肥大化的 ATDC5 细胞成骨特征性产物的表达降低,减缓软骨细胞成熟进程^[43]。

3 细胞培养条件

3.1 无机磷酸盐 在软骨形成过程中,无机磷酸盐

可以加速增殖性软骨细胞向肥大性软骨细胞分化,促进软骨细胞的成熟以及细胞外基质矿化进程。Magne 等^[44]利用 CaCl_2 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 调节 ATDC5 细胞培养基中无机磷、钙的浓度,观察细胞成熟和矿化情况。研究表明,无机磷酸盐可以增加 ATDC5 细胞 Collagen type X 的表达,诱导软骨细胞发生矿化。此外,无机磷酸盐也可以通过降低 Bcl-2/Bax 比值、DNA 片段化和激活 Caspase-3 从而诱导 ATDC5 细胞凋亡。

3.2 维生素 C 维生素 C 在骨与软骨发育过程中发挥着至关重要的作用。对于许多间充质来源的细胞,如脂肪细胞、成骨细胞、成肌细胞和软骨细胞,维生素 C 是一种必要的诱导分化因子^[45]。维生素 C 缺乏将导致软骨细胞增殖缓慢、软骨基质合成降低以及成骨细胞数量减少。目前,很多研究工作都在 ATDC5 细胞培养基中加入维生素 C,其目的在于促进 ATDC5 细胞增殖和分化,从而缩短实验周期^[46-47]。在细胞培养基中加入高剂量的维生素 C,可使 ATDC5 细胞软骨基质 Aggrecan、Collagen type II 和 Collagen type X 的表达显著地增加,软骨细胞增殖与分化阶段的时间由 21 d 缩短为 7 d,同时软骨肥大分化阶段也显著地得到增强^[48]。

4 结论

在软骨形成过程中,软骨细胞一般需要经历3个不同分化阶段:前软骨细胞、增殖性软骨细胞和肥大性软骨细胞。在诱导分化因子作用下,ATDC5 细胞展现出了分化为不同特征性软骨细胞的潜力。在生长激素、IGF-1、骨保护素、TGF- β 、BMP-7 和 Sox9 等调节因子的作用下,ATDC5 细胞趋向分化为增殖性软骨细胞,分化早期阶段特征性产物表达升高,其增殖与分化过程得以加快。在甲状腺素、雌激素、BMP-2、Runx2、无氧磷酸盐等调节因子的作用下,ATDC5 细胞趋向分化为肥大化软骨细胞,进而成熟分化为成骨细胞,分化晚期阶段特征性产物表达升高,其矿化与成骨的过程得以加速。

综上所述,ATDC5 细胞可作为一个体外细胞药理学模型,反映软骨形成中软骨细胞增殖、分化与矿化的完整过程,用以筛选具有促软骨分化发育作用的中药方剂或中药的活性成分,便于揭示补肾中药在软骨细胞增殖、分化以及矿化各个阶段调控作用的分子机制。

参考文献:

[1] 张荣华,欧阳菁. 肾主骨生髓理论与骨髓间充质干细胞

骨向分化[J]. 中医杂志, 2006, 47(10):730-732.

- [2] 郭 婕,张前德. 补肾中药对关节软骨的保护作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12):2515-2518.
- [3] 贺道远,曾凡星. 生长激素/胰岛素样生长因子 I 轴和运动[J]. 中国临床康复, 2006, 10(16):153-155.
- [4] 王守丰,邱 勇. 软骨内成骨的调控[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(16):1147-1149.
- [5] Koike M, Yamanaka Y, Inoue Metal, et al. Insulin-like growth factor -1 rescues the mutated FGF receptor 3 (G380R) expressing ATDC5 cells from apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK[J]. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2003, 18(11):2043-2051.
- [6] Argetsinger LS, Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor[J]. Physiological Reviews, 1996, 76(4):1089-1107.
- [7] Gevers EF, Hannah MJ, Waters MJ, et al. Regulation of rapid signal transducer and activator of transcription -5 phosphorylation in the resting cells of the growth plate and in the liver by growth hormone and feeding [J]. Endocrinology, 2009, 150(8):3627-3636.
- [8] Bassett JD, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2003, 14(8):356-364.
- [9] Harvey CB, O'Shea PJ, Scott AJ, et al. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function [J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2002, 75(1):17-30.
- [10] Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, et al. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2002, 17(3):443-454.
- [11] Siebler T, Robson H, Shalet SM, et al. Dexamethasone inhibits and thyroid hormone promotes differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells[J]. Bone, 2002, 31(4): 457-464.
- [12] Bassett JH, Swinhoe R, Chassande O, et al. Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate [J]. Endocrinology, 2006, 147(1):295-305.
- [13] Barnard JC, Williams AJ, Rabier B, et al. Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis [J]. Endocrinology, 2005, 146(12): 5568-5580.
- [14] Pavao M, Traish AM. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta[J]. Steroids, 2001, 66(1):1-16.
- [15] Zheng P, Ma H, Su Z, et al. Estrogen stimulates cell

- proliferation and regulates the expression of proteins in C-type natriuretic peptide signaling pathway during chondrogenesis in ATDC5 cells [J]. *Zhonghua Chinese Journal of Pediatrics*, 2014, 52(8):596–601.
- [16] Wang SJ, Li XF, Jiang LS, et al. Estrogen stimulates leptin receptor expression in ATDC5 cells via the estrogen receptor and extracellular signal-regulated kinase pathways [J]. *Journal of Endocrinology*, 2012, 213(2):163–172.
- [17] Wang SJ, Li XF, Jiang LS, et al. Leptin regulates estrogen receptor gene expression in ATDC5 cells through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113(4):1323–1332.
- [18] 马世波, 孙立婷, 韩璐, 等. 骨保护素[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(2):71–72.
- [19] Kobayashi Y, Takahashi N. Genomic approaches to bone and joint diseases. Mutations of RANK, OPG and RANKL genes found in humans [J]. *Clinical Calcium*, 2008, 18(2):202–209.
- [20] Galal N, El Beialy W, Deyama Y, et al. Effect of estrogen on bone resorption and inflammation in the temporomandibular joint cellular elements [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2008, 21(6):785–790.
- [21] 李鑫, 杨蕊, 臧强, 等. 糖皮质激素的药理作用机制研究进展[J]. *国际药理学研究杂志*, 2009, 36(1):27–30.
- [22] Fujita T, Fukuyama R, Enomoto H, et al. Dexamethasone inhibits insulin-induced chondrogenesis of ATDC5 cells by preventing PI3K-Akt signaling and DNA binding of Runx2 [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, 93(2):374–383.
- [23] Zhao Y, Zuo Y, Huo H, et al. Dexamethasone reduces ATDC5 chondrocyte cell viability by inducing autophagy [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(3):923–927.
- [24] Yao Y, Zhai Z, Wang Y. Evaluation of insulin medium or chondrogenic medium on proliferation and chondrogenesis of ATDC5 cells [J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 569.
- [25] Massagué J. TGF β signalling in context [J]. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(10):616–630.
- [26] Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor- β -induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(17):14466–14473.
- [27] Han F, Adams CS, Tao Z, et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) regulates ATDC5 chondrogenic differentiation and fibronectin isoform expression [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 95(4):750–762.
- [28] Han F, Gilbert JR, Harrison G, et al. Transforming growth factor- β 1 regulates fibronectin isoform expression and splicing factor SRp40 expression during ATDC5 chondrogenic maturation [J]. *Experimental Cell Research*, 2007, 313(8):1518–1532.
- [29] Kutsuna T, Inoue H, Takeda H, et al. Fibronectin regulates proteoglycan production balance in transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2011, 28(5):829–834.
- [30] Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, et al. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells [J]. *Cell Structure and Function*, 2000, 25(3):195–204.
- [31] 王霖霞, 李玉坤. BMP-2 信号通路与成骨细胞分化 [J]. *国际骨科学杂志*, 2009, 30(2):132–133.
- [32] Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, et al. Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5 [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 241(1):1–11.
- [33] Nishihara A, Fujii M, Sampath TK, et al. Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 301(2):617–622.
- [34] Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair [J]. *International Orthopaedics*, 2007, 31(6):773–781.
- [35] Caron MM, Emans PJ, Cremers A, et al. Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7 [J]. *Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society*, 2013, 21(4):604–613.
- [36] Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. Sox9 is required for cartilage formation [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(1):85–89.
- [37] Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, et al. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(1):160–165.
- [38] Topol L, Chen W, Song H, et al. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting β -catenin phosphorylation in the nucleus [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2009, 284(5):3323–3333.
- [39] Ushita M, Saito T, Ikeda T, et al. Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic Cells [J]. *Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society*, 2009, 17(8):1065–1075.
- [40] Asai N, Ohkawara B, Ito M, et al. LRP4 induces extracellu-

- lar matrix productions and facilitates chondrocyte differentiation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 451(2):302–307.
- [41] Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2002, 87(1):1–8.
- [42] Zheng Q, Zhou G, Morello R, et al. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte – specific expression in vivo [J]. The Journal of Cell Biology, 2003, 162(5):833–842.
- [43] Zhang Y, Yang TL, Li X, et al. Functional analyses reveal the essential role of SOX6 and RUNX2 in the communication of chondrocyte and osteoblast[J]. Osteoporosis International, 2015, 26(2):553–561.
- [44] Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, et al. Phosphate Is a Specific Signal for ATDC5 Chondrocyte Maturation and Apoptosis –Associated Mineralization: Possible Implication of Apoptosis in the Regulation of Endochondral Ossification [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2003, 18 (8):1430–1442.
- [45] Temu TM, Wu KY, Gruppuso PA, et al. The mechanism of ascorbic acid –induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells[J]. American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism, 2010, 299(2):E325– E334.
- [46] Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, et al. Cellular Hypertrophy and Calcification of Embryonal Carcinoma – Derived Chondrogenic Cell Line ATDC5 In Vitro[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 1997, 12(8):1174– 1188.
- [47] Altaf F, Hering T, Kazmi N, et al. Ascorbate –enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells[J]. Eur Cell Mater, 2006, 12: 64–69.
- [48] Denison TA, Koch CF, Shapiro IM, et al. Inorganic phosphate modulates responsiveness to 24, 25 (OH) $_2$ D $_3$ in chondrogenic ATDC5 cells [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2009, 107(1):155–162.
- (收稿日期:2015–08–19)

ATDC5: A well-characterized cell line of reflecting a complete chondrogenesis progress

FENG Qi-shuai, GAO Li-na, CUI Yuan-lu

(Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: The malnutrition of bone and muscle is caused by the failure of liver and kidney in traditional Chinese medicine. Some effective components, isolated from nourishing kidney drugs have the widely pharmacological effects, which is similar to cytokines or hormones that are used for osteoarthritis treatment, tissue engineering and stem cell engineering. ATDC5 cell, derived from mouse teratocarcinoma AT805, is characterized as a chondrogenic cell line which goes through a sequential process analogy to chondrogenesis. Under the effects of the differentiation factors, such as cytokines, hormones, inorganic phosphate, etc, ATDC5 cells proliferate, gather and differentiate into proliferating chondrocytes. And then mineralized matrix is produced and proliferating chondrocytes subsequently differentiate into hypertrophic chondrocytes and are gradually replaced by bone. From system regulation factors, local regulation factors and cell culture conditions, this review will reveal the molecular mechanism of proliferation, differentiation and mineralization of ATDC5 cell, which provides the theory basis for cartilage development researches and high-throughput screening of effective components of Chinese traditional medicine.

Key words: cell biology; nourishing kidney drugs; ATDC5 cell; chondrogenesis; chondrocytes

声 明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中,以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意本期刊编辑部上述声明。