

Kartogenin 与软骨修复的研究进展

邵加华,陈松,谢金硕,许震宇,吴海山*
第二军医大学长征医院关节外科,上海 200003

[摘要] 骨关节炎是一种由多因素引起的退行性病变,以关节软骨退化、关节边缘和软骨下骨反应性增生为特征,而干细胞用于软骨再生有良好的发展前景。目前,一种新的小分子化合物 kartogenin(KGN)被发现,它拥有极强的促软骨分化能力,能有效地促进间充质干细胞向软骨细胞分化。当 KGN 可明显抑制白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)引起的细胞外基质和蛋白聚糖的减少,同时 KGN 对于促进软骨细胞分泌物 lubricin 的分泌与转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、骨形态发生蛋白 7(bone morphogenetic protein 7, BMP-7)具有协同作用,此外,KGN 还促进腱-骨连接处形成软骨样组织,并且与壳聚糖结合的 KGN 较未结合的 KGN 成软骨能力更强。本文就 KGN 对于软骨修复的研究进展作一综述。

[关键词] 骨关节炎;软骨细胞;软骨修复;kartogenin
[中图分类号] R 684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)04-0471-06

Research progress in kartogenin and cartilage repair

SHAO Jia-hua, CHEN Song, XIE Jin-shuo, XU Zhen-yu, WU Hai-shan*
Department of Joint Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] As a degenerative disease caused by multiple factors, osteoarthritis is characterized by articular cartilage degeneration and reactive hyperplasia of joint edge and the subchondral bone. Recently, kartogenin (KGN) was identified to promote chondrocyte differentiation. KGN can block interleukin 1 β (IL-1 β)-caused loss of extracellular matrix and proteoglycan. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), bone morphogenetic protein 7 (BMP-7), and KGN together can synergistically promote the expression of lubricin in chondrocytes. KGN can also induce cartilage-like tissue formation in tendon-bone junction. In addition, chitosan (CHI)-KGN nanoparticles and CHI-KGN microspheres can more effectively induce chondrogenic differentiation than unconjugated KGN. Here in this paper we summarized the roles of KGN in regulating the cartilage regeneration.

[Key words] osteoarthritis; chondrocytes; cartilage repair; kartogenin
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(4): 471-476]

近年来,随着人口老龄化加速,越来越多的人为关节软骨损伤而烦恼,在这其中,尤以骨关节炎(osteoarthritis,OA)患者为重。OA 是一种由多因素引起的退行性病变,以关节软骨退化、关节边缘和软骨下骨反应性增生为特征,临床表现为缓慢发展的关节疼痛、压痛、僵硬、关节肿胀、活动受限和关节畸形等。OA 的形成涉及多种病理机制,包括细胞外基质的降解、新基质的生成不足、细胞凋亡、软骨细胞肥大化(即软骨细胞出现去分化现象,导致软骨细胞体积增大、增殖能力和细胞的基本功能丧失、细胞外基质无法分泌,成为肥大化细胞)等^[1]。关节软骨在关节的活动中至关重要,但由于其中缺乏血管

和神经,人体自身对关节软骨的修复能力十分有限,临床上用于治疗 OA 最有效的方法为手术——关节置换,但该方法有可能引起诸多不良反应,并且价格昂贵,且只适用于晚期的 OA 患者。目前对于早期的 OA 患者尚缺乏有效的治疗手段,大多数方法只能暂时缓解患者的症状,无法延缓或阻止 OA 的进程。在针对 OA 方面,我们亟需一种更为简便和有效的治疗手段。目前,关节腔内注射药物在世界范围内应用广泛,如注射糖皮质激素、透明质酸钠等,但是,这些抗炎药和止痛药只能暂时缓解症状,并不能从根本上解决问题,无法使损伤的关节软骨再生,难以使患者获得长期良好的疗效。近年来,大量的

研究了探讨干细胞作为软骨再生药物的疗效,使用组织工程干细胞定向分化的方法再生关节软骨已经成为研究热点。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有向各种细胞分化的潜能,如果能促进 MSC 向软骨细胞分化则对治疗 OA 具有重要意义。而最 2012 年,一种新的小分子化合物 kartogenin (KGN) 被发现,它拥有极强的促软骨分化能力。KGN 是由 Johnson 等^[2]从 22 000 多种结构不同的杂环类药性分子中筛选出的一种复合物,能有效地促进骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BMSC)向软骨细胞分化。本文就 KGN 对于软骨修复的研究进展作一综述。

1 KGN 对软骨细胞的作用

Johnson 等^[2]研究发现,加入 KGN 后软骨细胞相关的基因产物明显增加,在 5 组(DMSO、10 nmol/L KGN、100 nmol/L KGN、1 μ mol/L KGN、10 μ mol/L KGN)中,加入 KGN 组的聚集蛋白聚糖、II 型胶原、lubricin 蛋白、盘状结构域受体(discoidin domain receptor, DDR)表达均较 DMSO 对照组增加,而骨钙蛋白表达降低,其中以 10 μ mol/L KGN 结果最为显著。同时,为期 21 d 的软骨小球培养后发现,在加入 KGN 后,金属蛋白酶 I 的抑制剂、II 型胶原和聚集蛋白聚糖含量均增多,这可以保持软骨表型并阻止基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)对细胞外基质的进一步破坏。通常,胶原生成的增加常与 OA 软骨中 MMP 的活性增加有关^[3]。然而,KGN 并不改变 MMP-3、MMP-13 或者聚蛋白多糖酶的表达^[2]。

在牛初代软骨细胞和软骨移植物中加入肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和制瘤素 M,模拟在 OA 病理过程中细胞因子引起的损伤,实验结果显示软骨细胞较对照组释放了 4~5 倍的一氧化氮(nitric oxide, NO)。而加入 1~5 μ mol/L KGN 后,NO 的释放量减少了 70%。在体外软骨组织块中加入 5 μ mol/L KGN,细胞因子引起的糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)的释放量减少了 60%^[4]。这些数据证明,KGN 可在 OA 的病理环境中保护已存在的软骨细胞。Johnson 等^[2]设计了 2 种不同的大鼠 OA 模型,一种以关节内注射 VII 型胶原酶模拟慢性关节损伤,另一种则以切断膝关节内

的 3 条主要韧带模拟急性关节损伤。在慢性损伤模型中,向关节腔内注射 KGN 的实验组较对照组表现出关节软骨表层和中层纤维化的减少以及软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)的明显减少。而 COMP 在 OA 者血清中浓度较高且与病变严重程度有关^[5]。在急性损伤模型中,关节腔内注射了 KGN 的实验组其胫骨外侧平台关节评分(基于 OARSI 评分系统)较对照组降低了 50%,而 II 型胶原碎片实验组较对照组明显减少,对照组为实验组的 1.8 倍,OA 引起的疼痛也明显减轻(通过双足平衡测痛仪评估)。且在动物实验中未观察到任何毒性反应^[2]。这表明 KGN 不仅具有修复关节软骨作用,还对原有的关节软骨具有保护作用。

KGN 通过与其配体细丝蛋白 A(filamin A, FLNA)结合发挥作用。FLNA 是一种肌动蛋白结合蛋白,可与肌动蛋白结合以连接细胞内的纤维网络和膜蛋白,它除了可作为 KGN 的配体与 KGN 结合外,还与核结合因子 β (core-binding factor β , CBF- β)结合。通常,FLNA 与 CBF- β 结合形成复合体保存在细胞质中,当 CBF- β 激活后,其与 FLNA 分离而后进入细胞核中。而 KGN 可以与 CBF- β 在细胞质中竞争性结合 FLNA,从而增加 CBF- β 进入细胞核中的量,使其与 DNA 转录因子 RUNX1 结合形成二聚体,而 CBF- β -RUNX1 二聚体可以激活对于促进 MSC 向软骨分化具有重要作用的基因。同时,由于 RUNX2 是骨生成和软骨细胞肥大化的关键因素,而敲除 RUNX2 基因后,可减少骨生成、抑制软骨细胞肥大化、抑制软骨钙化,甚至延缓 OA 的进程^[6]。而 CBF- β -RUNX1 二聚体同时可以抑制 RUNX2 的转录,使其保持在较低水平,从而抑制软骨细胞肥大化,进一步增强成软骨作用。

Ono 等^[7]发现单独使用 KGN 时并不能显著增加软骨细胞的细胞外基质。使用白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)可导致细胞外基质减少,在软骨细胞培养中加入 10 ng/mL IL-1 β ,实验组加入 10 μ mol/L KGN,对照组加入等量 DMSO,共同培养 48 h 后,通过颗粒排阻试验(particle exclusion assay)^[8]证明,加入 KGN 与 IL-1 β 共培养的实验组其细胞外基质破坏更少,这表明 KGN 阻断了 IL-1 β 对于软骨细胞细胞外基质的损害。在使用睾丸透明

质酸酶预处理过的细胞外基质受到破坏的软骨细胞中加入 KGN 后,与对照组相比可见明显的细胞外基质的修复。单独使用 KGN 培养的新生软骨与未加 KGN 培养的新生软骨使用番红精 O 染色发现并无明显区别。使用 IL-1 β 培养的新生软骨其番红精 O 染色明显减弱,而使用 IL-1 β 与 KGN 共同培养者则可见明显抑制 IL-1 β 的作用。单独使用 IL-1 β 可明显促进关节软骨中蛋白聚糖的释放增加,而单独使用 KGN 并不能显著减少关节软骨中蛋白聚糖的释放。当 KGN 与 IL-1 β 共培养时,则能显著抑制 IL-1 β 的作用从而使蛋白聚糖的释放减少。IL-1 β 可促进 G1-ITGE、ADAMTS4 和 ADAMTS5 的释放,而当 KGN 与 IL-1 β 共培养时,可明显抑制 IL-1 β 引起的 G1-ITGE、ADAMTS4 和 ADAMTS5 的释放。CD44 受体在保存及固定糖胺聚糖透明质酸和蛋白聚糖方面具有重要作用,在骨性关节炎的病理过程中,CD44 会被裂解。在加入 IL-1 β 后,CD44 的裂解片段显著堆积,而当 KGN 与 IL-1 β 共同作用时,CD44 的裂解片段则显著减少。此外,单独加入 KGN 后,软骨细胞中的 SMAD1/5/8 的磷酸化作用并未激活,而预先使用 IL-1 β 刺激过后加入与之前同等剂量的 KGN 后,SMAD1 的磷酸化作用显著增强。上述结果表明,KGN 更为主要的作用是阻止软骨的退变,强于其促进软骨修复的作用。相比较而言,其阻止 IL-1 β 对软骨细胞的损伤作用较其自身对于软骨的修复作用更为显著。KGN 的主要作用是阻止 CD44 和蛋白聚糖的降解,而并非促进其合成,当软骨细胞溶解被激活后(通过 IL-1 β 、TNF- α 或 oncostatin M 等),KGN 的该作用就显得极其重要。因此,KGN 的主要作用机制是,通过影响蛋白聚糖酶和 CD44 的溶蛋白性裂解作用,从而保护软骨细胞,抑制其降解退变。

Lubricin 是一种具有软骨保护作用的黏液糖蛋白,它是关节软骨表层的特异性标志。随着患者年龄的增大或体外实验中细胞培养周期的延长,软骨细胞分泌 lubricin 的能力显著降低^[9]。在 BMSC 中加入适当的细胞因子,如转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)-2/7/13 等,可促进 BMSC 分化为软骨细胞并维持合成和分泌 lubricin 的能力^[9-11]。Liu 等^[12] 为了测定

KGN、TGF- β 1 和 MMP-7 对于促进 BMSC 向软骨细胞分化后分泌 lubricin 的能力进行了体外实验,实验设计分为 4 组:同时加入 TGF- β 1、BMP-7 和 KGN [(T+B+K)组];单独加入 KGN (K 组);同时加入 KGN 和 TGF- β 1 [(T+K)组];同时加入 BMP-7 和 KGN [(B+K)组]。结果显示,GAG 相对定量测定结果显示(T+B+K)组含量最高,几乎达到了对照组的 4 倍,其余各组与对照组相比也有轻微的升高,但各组间差异无统计学意义。ELISA 测定 lubricin 相对定量表达结果显示,在细胞内,4 组的 lubricin 含量均显著增高,较对照组增加至 4~6 倍,其中(T+B+K)组含量最高,且与其余组差异有统计学意义。而在细胞外,同样的,(T+B+K)组 lubricin 含量最高,而其余组的改变并不是十分显著,其中 K 组和(B+K)组 lubricin 含量轻微增高,而(T+K)组增高并不明显。免疫荧光染色分析显示,与其余组相比,(T+B+K)组的荧光反应最强。通过 RT-PCR 测定显示,与对照组相比,4 组的 lubricin 相关 mRNA 表达也显著增加,其中以(T+B+K)组最为明显,增加到对照组的 30 倍,K 组、(T+K)组、(B+K)组分别增加至对照组的 3、4、12 倍,这表明 KGN 与 TGF- β 1、BMP-7 具有协同作用,三者联用可进一步促进 lubricin 合成。4 组的蛋白聚糖相关 mRNA 也显著增加,而 adamts5、c-Myc、Nrf2 表达则显著降低。

微骨折术是一种常见的治疗全层软骨缺损的手段,它通过钻孔使 BMSC 达到缺损部位从而进行修复^[13-14]。然而,许多研究证明微骨折术的长期疗效并不理想,尤其是对于老年患者来说^[15]。Xu 等^[16] 对 24 只成年雌性大白兔进行膝关节微骨折术建模,将其分为 2 组,每组 12 只,实验组每周进行关节内注射 KGN,对照组注射等量 DMSO,于 4 周和 12 周时分别处死每组 6 只模型。随后进行大体评估(以 International Cartilage Repair Society scoring system 评分)、组织学评估(以 modified O'Driscoll histology scoring system 评分)和免疫组化分析。结果显示,4 周时,实验组的软骨缺损处已修复覆盖了超过 50%,而对照组只观察到少量纤维组织形成。12 周时,实验组的软骨缺损处几乎已完全修复,与周围的正常软骨界限模糊,而对照组的纤维样再生组织只覆盖了缺损处大约 80%。大体评分显

示:实验组(10.0 ± 1.1)分,对照组(7.8 ± 1.3)分($P < 0.05$)。组织学分析显示对照组几乎未形成透明软骨样组织;4 周时,甲苯胺蓝染色显示,在软骨缺损处对照组仅形成了少量纤维样组织;12 周时,甲苯胺蓝染色和番红精 O 染色显示,对照组软骨缺损处的修复组织与周围的正常软骨存在着明显的界限,软骨下骨形成极少,修复组织排列紊乱,亦无潮标形成。而实验组在 4 周时形成了更多的透明软骨样组织,12 周时其修复组织与周围正常软骨的界限已十分模糊,其软骨下骨形成良好,组织排列有序,亦有几乎完整的潮标形成。组织学评分显示:实验组(18.5 ± 4.2)分,对照组(8.3 ± 4.6)分($P < 0.01$)。免疫组化:加入 KGN 的实验组生成了较多的 II 型胶原和较少的 I 型胶原,对照组几乎未生成 II 型胶原而生成了较多的 I 型胶原。这表明,在软骨缺损处注射 KGN 能显著增强关节软骨的再生作用。

2 KGN 对腱-骨愈合的作用

肌腱连接骨与肌肉的部位称为腱骨接点^[17],其结构分别由肌腱、纤维软骨、骨构成^[18-19]。这其中,纤维软骨结构可作为减震器减少传递至肌腱的力量,而一旦腱骨接点损伤,机体自身难以在肌腱与骨的连接部位形成纤维软骨,而通常只能形成瘢痕愈合^[20-21],并且手术修补重建的效果并不理想,难以达到损伤前的水平。Zhang 等^[22]研究发现,在细胞实验中,BMSC 和髌腱干/祖细胞(patellar tendon stem/progenitor cell, PTSC)在加入各种不同浓度的 KGN($1 \text{ nmol/L} \sim 5 \text{ } \mu\text{mol/L}$)后细胞增殖能力均显著增强(通过细胞群体倍增时间测定),软骨形成标志物蛋白聚糖、II 型胶原和 SOX-9 均明显增加,其中以加入 $5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 的 KGN 组最为明显,而番红精 O 和阿新蓝染色也证明了这一点。这表明 KGN 可以促进兔的 BMSC 和 PTSC 增殖以及增强成软骨分化能力,并具有剂量依赖性。在动物实验中,Zhang 等设计了 2 种动物模型,在第 1 种动物模型中,在小鼠跟腱的腱骨接点处造成直径 1 mm 的损伤,而后分别在造模当天以及术后的 2、4、7、12 d 实验组注射 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 的 $100 \text{ } \mu\text{mol/L}$ KGN,对照组注射等量生理盐水。结果显示,在损伤处实验组形成了更加完整和成熟的软骨样组织,组织学分析显示,实

验组中几乎 90% 的组织呈番红精 O 染色阳性,而对照组则几乎无阳性染色。在第 2 种动物模型中,不造成损伤,在对照组的髌腱处注射 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 生理盐水,而实验组注射 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 的 $100 \text{ } \mu\text{mol/L}$ KGN。结果显示,实验组出现了明显的变化,其髌腱表面覆盖有一层薄膜样结缔组织,并伴有新生血管形成,组织化学染色进一步证实了实验组生成了大量的蛋白聚糖。这表明,KGN 对于促进腱-骨愈合具有显著的作用。

3 KGN 与壳聚糖(chitosan, CHI)结合后的作用

关节腔内注射药物对比其他方法有以下优势:局部浓度较高,总体药物剂量较低,可避免系统性不良反应以及较少的药物相互作用^[23]。关节腔内注射药物的疗效主要取决于药物释放系统的效能,常见的关节腔内药物释放系统包括脂质体^[24-25]、水凝胶^[26]、纳米粒子^[27]和微粒^[28]等,其可以帮助药物在关节腔内维持更长时间并缓慢释放。CHI 因其生物降解性、生物相容性以及较好的可溶性在药物释放系统中得到广泛研究^[29]。CHI-KGN 是将 KGN 与 CHI 结合,以加强疏水性的 KGN 的水溶性和生物相容性,以期增强其疗效。Kang 等^[30]将 KGN 分别与低相对分子质量 CHI 和中相对分子质量 CHI 结合,即纳米粒子 CHI-KGN (CHI-KGN NPs)和微粒 CHI-KGN (CHI-KGN MPs),在体外释放实验中,CHI-KGN NPs 和 CHI-KGN MPs 均表现出持续性释放,而 CHI-KGN MPs 较 CHI-KGN NPs 释放了更多的 KGN,这表明 CHI-KGN 微粒的大小影响了 KGN 的释放率。在体外成软骨分化实验中,使用 BMSC 进行软骨小球培养,共分为 4 组:CHI-KGN NPs 组、CHI-KGN MPs 组、单纯 KGN 组、空白对照组。结果显示,CHI-KGN NPs 组和 CHI-KGN MPs 组的 GAG 含量显著增加,尤以 CHI-KGN NPs 组为甚,是单纯 KGN 组和空白对照组的 2 倍。番红精 O 和阿新蓝染色显示 CHI-KGN NPs 组反应最强,提示其蛋白聚糖合成增加。RT-qPCR 结果显示,CHI-KGN NPs 组、CHI-KGN MPs 组和单纯 KGN 组的 COL2A1 和 aggrecan 表达较空白对照组均显著增加,以 CHI-KGN NPs 组增加最为显著,这表明 3 组均有促进 BMSC 向软骨细胞分化的作用,其中 CHI-KGN NPs 组作用最强。在动物实验中,荧光成像显示 CHI-KGN 在小鼠体内存在

了3周以上的时间。实验采用切断小鼠的前交叉韧带来建造骨关节炎模型^[28],分为5组:空白对照组、磷酸盐缓冲液(PBS)组、单纯 KGN 组、CHI-KGN NPs 组和 CHI-KGN MPs 组。实验中除空白对照组外分别在第6周、第9周向小鼠关节腔内注射 PBS、单纯 KGN、CHI-KGN NPs 和 CHI-KGN MPs,14周时处死小鼠。结果显示,注射 CHI-KGN 的两组较其他组有明显的软骨再生,其 OARSI 评分^[31](骨关节炎病理学评分,反映骨关节炎的程度)也显著低于其他组,而 CHI-KGN NPs 组与 CHI-KGN MPs 组之间则无明显差别。番红精 O 染色和免疫组化结果也显示,CHI-KGN NPs 组与 CHI-KGN MPs 组蛋白聚糖表达显著增加。这表明,在动物体内与 GHI 结合的 KGN 成软骨能力得到了进一步的增强。

4 总结与展望

随着组织工程的进一步发展,修复乃至再生软骨并非遥不可及,KGN 并不是第1种被用于促进干细胞分化的人工合成小分子,还有许多其他的小分子被应用于各个领域来调节基因转录、影响细胞分化等。这些小分子对于某些特定的组织来说可能非常有用,比如软骨、神经组织这些难以移植的组织。对于 KGN,未来可以研究的方向包括:(1)不同来源的干细胞在加入 KGN 后成软骨能力的比较;(2) KGN 在成软骨方面与其他细胞因子是否存在协同作用。目前,小分子化合物的研究仍然十分热门,这给我们提供了许多新的方向,在不久的将来或许它将成为一种新的治疗方式。

[参考文献]

- [1] Goldring M B, Goldring S R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192: 230-237.
- [2] Johnson K, Zhu S, Tremblay M S, Payette J N, Wang J, Bouchez L C, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair[J]. Science, 2012, 336: 717-721.
- [3] Smith G N Jr. The role of collagenolytic matrix metalloproteinases in the loss of articular cartilage in osteoarthritis[J]. Front Biosci, 2006, 11: 3081-3095.
- [4] Rutgers M, Saris D B, Dhert W J, Creemers L B. Response to: cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, *in vitro* effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection-authors' reply[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12: 411.
- [5] Lohmander L S, Saxne T, Heinegård D K. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 1994, 53: 8-13.
- [6] Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54: 2462-2470.
- [7] Ono Y, Ishizuka S, Knudson C B, Knudson W. Chondroprotective effect of kartogenin on CD44-mediated functions in articular cartilage and chondrocytes[J]. Cartilage, 2014, 5: 172-180.
- [8] Jiang H, Peterson R S, Wang W, Bartnik E, Knudson C B, Knudson W. A requirement for the CD44 cytoplasmic domain for hyaluronan binding, pericellular matrix assembly, and receptor-mediated endocytosis in COS-7 cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 10531-10538.
- [9] Bao J P, Chen W P, Wu L D. Lubricin: a novel potential biotherapeutic approaches for the treatment of osteoarthritis[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 2879-2885.
- [10] Jones A R, Flannery C R. Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines[J]. Eur Cell Mater, 2007, 13: 40-45.
- [11] Oshin A O, Stewart M. The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair[J]. Vet Comp Orthop Traumatol, 2007, 20: 151-158.
- [12] Liu C, Ma X, Li T, Zhang Q. Kartogenin, transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-7 coordinately enhance lubricin accumulation in bone-derived mesenchymal stem cells[J]. Cell Biol Int, 2015, 39: 1026-1035.
- [13] Mithoefer K, McAdams T, Williams R J, Kreuz P C, Mandelbaum B R. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis[J]. Am J Sports Med, 2009, 37: 2053-2063.

- [14] Mithoefer K, Williams R J 3rd, Warren R F, Potter H G, Spock C R, Jones E C, et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87: 1911-1920.
- [15] Von Keudell A, Atzwanger J, Forstner R, Resch H, Hoffelner T, Mayer M. Radiological evaluation of cartilage after microfracture treatment: a long-term follow-up study[J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81: 1618-1624.
- [16] Xu X, Shi D, Shen Y, Xu Z, Dai J, Chen D, et al. Full-thickness cartilage defects are repaired via a microfracture technique and intraarticular injection of the small-molecule compound kartogenin[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 20.
- [17] Benjamin M, Toumi H, Ralphs J R, Bydder G, Best T M, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load[J]. *J Anatomy*, 2006, 208: 471-490.
- [18] Hibino N, Hamada Y, Saiyo K, Yukata K, Sano T, Yasui N. Callus formation during healing of the repaired tendon-bone junction. A rat experimental model[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2007, 89: 1539-1544.
- [19] Raspanti M, Stocchi R, De Pasquale V, Martini D, Montanari C, Ruggeri A. Structure and ultrastructure of the bone/ligament junction [J]. *Ital J Anat Embryol*, 1996, 101: 97-105.
- [20] Lu H, Qin L, Lee K, Wong W, Chan K, Leung K. Healing compared between bone to tendon and cartilage to tendon in a partial inferior patellectomy model in rabbits[J]. *Clin J Sport Med*, 2008, 18: 62-69.
- [21] Galatz L M, Sandell L J, Rothermich S Y, Das R, Mastny A, Havlioglu N, et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24: 541-550.
- [22] Zhang J, Wang J H. Kartogenin induces cartilage-like tissue formation in tendon-bone junction [J]. *Bone Res*, 2014, 2: pii: 14008.
- [23] Kang M L, Im G I. Drug delivery systems for intra-articular treatment of osteoarthritis[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11: 269-282.
- [24] Dong J, Jiang D, Wang Z, Wu G, Miao L, Huang L. Intra-articular delivery of liposomal celecoxib-hyaluronate combination for the treatment of osteoarthritis in rabbit model[J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(1/2): 285-290.
- [25] Elron-Gross I, Glucksam Y, Margalit R. Liposomal dexamethasone-diclofenac combinations for local osteoarthritis treatment[J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(1/2): 84-91.
- [26] Hui J H, Chan S W, Li J, Goh J C, Li L, Ren X F, et al. Intra-articular delivery of chondroitin sulfate for the treatment of joint defects in rabbit model[J]. *J Mol Histol*, 2007, 38: 483-489.
- [27] Whitmire R E, Wilson D S, Singh A, Levenston M E, Murthy N, García A J. Self-assembling nanoparticles for intra-articular delivery of anti-inflammatory proteins [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 7665-7675.
- [28] Ko J Y, Choi Y J, Jeong G J, Im G I. Sulfuraphane-PLGA microspheres for the intra-articular treatment of osteoarthritis[J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 5359-5368.
- [29] Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirou T, Gu W, et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications [J]. *Mar Drugs*, 2010, 8: 1962-1987.
- [30] Kang M L, Ko J Y, Kim J E, Im G I. Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 9984-9994.
- [31] Pritzker K P, Gay S, Jimenez S A, Ostergaard K, Pelletier J P, Revell P A, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2006, 14: 13-29.

[本文编辑] 商素芳