

β -catenin 在大鼠髋脱位股骨头浅层软骨中的表达及意义

王 彭 宁 波 裴新红 马瑞雪

【摘要】 目的 检测 β -catenin 在大鼠髋脱位股骨头软骨浅层中的动态表达,探讨 β -catenin 与髋脱位关节软骨早期退变以及在不同应力区域表达的关系。**方法** 选取新生 Wistar 大鼠 80 只,随机分成髋脱位组($n=40$)和对照组($n=40$),持续固定 10 d 建立新生大鼠髋脱位模型后去除外固定,分别于鼠龄第 2、4、6、8 周处死、离断髋关节,用于测量组织形态和 β -catenin 免疫组化,应用 qRT-PCR 检测股骨头软骨中 β -catenin 的 mRNA 表达。**结果** ①成功制作髋脱位动物模型,髋臼指数及股骨头指数在不同时段表现出显著差异($P<0.001$)。②髋脱位组镜下可见软骨排列紊乱,后期出现软骨表面裂隙以及溃疡;Mankin 评分早期无显著性差异;于第 4、6、8 周表现出显著差异。股骨头浅层软骨 β -catenin 的表达于第 2 周时实验组明显高于对照组;第 4 周时实验组明显低于对照组;第 6、8 周实验组表达显著增多。髋脱位组中 Mankin 评分与 β -catenin 之间有相关关系。 β -catenin 的 mRNA 表达在不同时段均有显著差异,在对照组中呈现逐渐下降趋势,而在实验组中却逐渐上调。**结论** β -catenin 在髋脱位股骨头浅层软骨的发育和退变中发挥着双向调控作用,可能与异常应力的作用有着密切关系。

【关键词】 蛋白质类/化学;髋脱位;股骨头;大鼠

Expression and significance of β -catenin in the superficial zones of femoral head articular cartilage of DDH. WANG Peng, NING Bo, PEI XIN-hong, et al. Children's Hospital Affiliated With Fudan University, Shanghai, 201102, China

【Abstract】 Objective To explore the roles of β -catenin in the development and early degeneration of the dysplastic hip by examining its expression in superficial zones of femoral head. **Methods** 80 neonatal Wistar rats were randomly divided into developmental dislocation of the hip (DDH) group and control group. The DDH model was induced by fixation of both hips and knees at extension for ten days. The hips were isolated at 2-, 4-, 6-, 8-week-old for gross morphometry and immunochemistry of β -catenin. Meanwhile, mRNA of β -catenin in cartilage of femoral head was extracted and assessed by qRT-PCR. Student's t -tests were used for comparison between two groups, with anova for the relationship between Mankin score and β -catenin expression.

Results first: the model was successfully identified by presentation of coronal anatomical relationship. The acetabular index and femoral head index at DDH group showed much smaller than normal hip joint at each period. Meanwhile, the disorganized chondrocytes and clefts in the superficial zones were observed with high Mankin score at later stages, while the expression of β -catenin was strongly relative to the degrees of degeneration with articular cartilage got close to maturity. Accordingly, the mRNA expression of β -catenin in superficial zone at 2 weeks old was obviously up regulated in DDH group compared to normal cartilage, furthermore, it showed up-regulation again adjacent to maturity. **Conclusion** β -catenin in the superficial zones of cartilage may play dual roles not only in the development but in degeneration of dysplastic hip, and it may be attributed to the influence of the abnormal loading on femoral head.

【Key words】 Proteins/CH; Hip Dislocation; Femur Head; Rats

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.05.0010

作者单位:复旦大学儿科医院骨科(上海市,201102),通讯作者:马瑞雪, E-mail: ruixuema@fudan.edu.cn;基金项目:国家自然科学基金基金课题(编号 30973138)和上海市科委课题(编号 9411963200),作者王彭现在南通瑞慈儿童医院儿外科工作。

发育性髋关节脱位(developmental dislocation of the hip, DDH)是儿童下肢常见关节畸形之一,随着早期筛查工作的开展,DDH 得到及时诊治,通常越早复位,髋臼塑形越理想^[1]。有流行病学调查显示,髋脱位治疗后残余髋关节发育不良或者再脱位,

是骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 的重要致病因素^[2]。DDH 向 OA 演变的机制仍在进一步探讨之中。研究表明, β -catenin 作为 Wnt 信号通路的关键因子之一, 不仅在关节的形成及发育过程中起重要作用, 在骨关节疾病患者关节软骨中的表达也往往升高^[3]。体外实验表明机械应力能够激活成骨细胞中的 Wnt 通路, 导致 β -catenin 表达上调^[4]。发育性髋脱位的髋关节由于长期处于异常生物力学环境中, 关节软骨中 β -catenin 的表达是否受到这种异常生物力学的影响, 尚未见相关报道。作者通过新生大鼠髋脱位动物模型, 观察髋脱位在向早期骨性关节炎演变的过程中, 关节软骨中 β -catenin 在不同时段的动态表达, 为进一步探讨异常应力与 β -catenin 信号通路之间的关系提供参考。

材料与方法

一、材料

实验动物来自复旦大学医学院动物研究所 Wistar 新生大鼠 (SPF 级)。试剂包括: 4% 多聚甲醛; anti- β -catenin (兔抗鼠 Abcam USA); EnvisionTM Detection Kit (DAKO); Trizol reagent (Invitrogen, Paisley, UK); ReverTra[®] Ace qPCR RT kit (TOYOBO, Japan); SYBR Green[®] Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Japan)。软件: Image Pro Plus6.0; ABI PRISM[®] 3730HT Sequence Detection System; SPSS16.0

二、方法

1. 动物模型及分组: 将 80 只新生 Wistar 大鼠随机分成两组: DDH 组 ($n=40$) 和对照组 ($n=40$)。根据赵小明的方法^[5] (图 1A), 对 DDH 组新生大鼠进行双下肢医用橡皮胶带连续固定。10 d 后去除胶带固定使其自由活动。并分别于鼠龄 2 周 ($n=10$)、4 周 ($n=10$)、6 周 ($n=10$)、8 周 ($n=10$) 处死, 离断髋关节, 一部分髋关节用多聚甲醛固定后脱钙制成冠状面标本, 测量髋关节形态 [按图 1B 测量髋臼宽度和深度以及股骨头宽度和深度, 计算髋臼指数 (深度/宽度 $\times 100\%$) 以及股骨头指数 (股骨头软骨厚度/宽度 $\times 100\%$)]^[6]。将标本脱水、透明、石蜡包埋制成切片用于组织化学染色; 另一部分髋关节分离股骨头软骨后用于 mRNA 提取。

2. β -catenin 免疫组织化学: 常规将切片脱蜡至水, PBS 冲洗, 柠檬酸盐及微波进行联合抗原修复, 0.3% 过氧化氢封闭, PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, 羊

血清封闭非特异性抗原, PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, 加入 I 抗 β -catenin (兔抗鼠稀释倍数 1:150), 37 °C 孵育 1 h, 然后 4 °C 过夜, PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, 加入 II 抗 (DAKO), 37 °C 孵育 30 min, PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, 镜下观察, 开始显色即用 PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, 终止显色反应, 最后用苏木精复染, PBS 冲洗 5 min $\times 3$ 次, 晾干后用中性树胶封片, 并在镜下拍片存档。阴性对照用 PBS 代替 I 抗。细胞浆中棕褐色颗粒为 β -catenin 阳性表达。选择 5 张切片, 每张切片选择 5 个不同的视野, 参照改良 Mankin 评分标准 (0 = 正常软骨; 1 = 局部纤维化; 2 = 广泛纤维化; 3 = 软骨裂隙至移行层; 4 = 裂隙至放射层; 5 = 裂隙至钙化层; 6 = 软骨完全丢失)^[7]。并将软骨的病理改变进行分级 (轻度: 0~3; 中度: 4~6; 重度: 7~9; 极重度: 10~12)。应用 IPP6.0 软件将灰度转换成光密度, 半定量计算阳性细胞的棕色颗粒面积 (图 2)。

三、 β -catenin 的 qRT-PCR

将离断髋关节的股骨头软骨锐性剥离后在液氮中研磨并用 Trizol 提取总 RNA, RNA 的浓度通过分光光度计测量 OD_{260/280} 获得 RNA 的纯度; 并通过琼脂糖电泳了解 RNA 的完整性。然后将 1 μ g 样品加热 65 °C 共 5 min, 并快速在冰上冷却, 然后配成 20 μ L 体系 (5xRT 缓冲液 (4 μ L), RT Enzyme Mix (1 μ L), 引物 Mix (1 μ L $\times 2$), 灭酶用水加至 20 μ L), 按照 ReverTra Ace qPCR RT kit 试剂盒的说明步骤 (37 °C 下孵育 15 min, 然后 98 °C 下 5 min) 逆转录合成 cDNA 并终止反应。cDNA 产物通过分光光度计测 OD_{260/280} 获得 cDNA 的纯度; 然后取 5 μ L 的 cDNA 按照 SYBR Green[®] Realtime PCR Master Mix kit 试剂盒说明书程序配成 50 μ L 体系 (5 μ L cDNA (100 ng), 2 μ L $\times 2$ 引物 (10 μ M), 25 μ L of SYBR Green[®] Realtime PCR Master Mix, and 16 μ L 灭酶用水) 进行扩增。以 β -actin 作为内参。引物序列: β -catenin 上游 (5'-3'): GCAATCAGGAAAG-CAAGCTC; 下游 (5'-3') TCAGCACTCTGCTTGTG-GTC; β -actin 上游 (5'-3'): GGAGATTACTGCCCTG-GCTCCTA; 下游 (5'-3'): GACTCATCGTACTCCT-GCTTGCTG。结果用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 表示。

四、统计学处理

应用 SPSS16.0 统计学软件, 采用非配对独立样本 t 检验进行统计学分析; 对于 DDH 组 Mankin 评分与 β -catenin 表达之间的关系采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大体形态观察

冠状面标本证实模型制作成功(图 1C),制模率 36/40(90.0%)。股骨头变形变小,髋臼变浅,臼内有软组织填充,DDH 组髋臼指数明显变小(表 1),股骨头宽度也发生类似变化(表 2)。

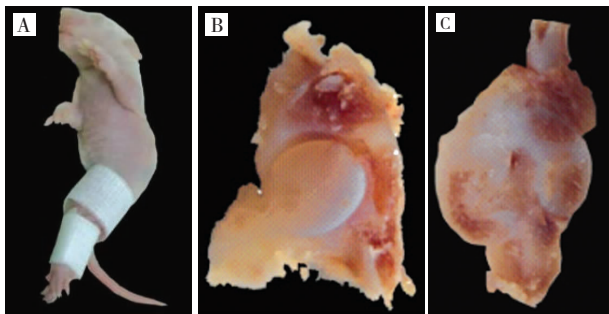


图 1 髋脱位的模型制作以及剖面形态观察。A 为模型制作的方法;B 为正常髋关节在冠状面上的解剖关系;C 为模型髋关节在冠状面上的异常解剖关系(* 代表股骨头,* 代表髋臼)

表 1 不同时段髋臼指数的差异($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照组	31.5 \pm 1.81	41.4 \pm 2.21	47.4 \pm 1.90	50.0 \pm 1.91
DDH 组	20.7 \pm 1.96	28.9 \pm 1.72	38.6 \pm 1.50	23.8 \pm 2.37
<i>t</i> 值	7.01	7.74	6.28	14.9
<i>P</i> 值	0.002 *	0.001 **	0.003 *	0.000 **

注: * $P < 0.005$, ** $P < 0.001$

表 2 不同时段股骨头指数的差异($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照组	99.1 \pm 1.5	97.5 \pm 2.4	97.1 \pm 1.8	95.1 \pm 2.6
DDH 组	85.5 \pm 2.11	84.9 \pm 0.15	73.9 \pm 0.30	54.5 \pm 3.41
<i>t</i> 值	3.15	6.41	3.89	7.43
<i>P</i> 值	0.025 *	0.001 **	0.018 *	0.002 **

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

二、组织形态学观察

第 2 周:对照组软骨浅层 β -catenin 低表达(图 2A),而实验组浅层 β -catenin 表达明显增多(图 2A'),但细胞数目显著减少,软骨表层光滑,未见有裂隙或者纤维化。第 4 周:对照组软骨 β -catenin 表达明显增加(图 2B),而实验组软骨细胞局部聚集成簇,总体细胞增多,没有出现平行结构,部分区域软骨细胞丢失,细胞外基质淡染,表面无纤维化或裂隙形成,且 β -catenin 明显低表达(图 2B');第 6 周:对照组软骨浅层 β -catenin 表达明显降低,而深层肥大软骨细胞中的表达持续增高(图 2C);实验组软骨表面出现纤维化改变,细胞成簇,浅层和移行层中

表达明显增加,细胞数目也相对增多(图 2C');第 8 周:对照组 β -catenin 表达很弱(图 2D),实验组软骨表层出现溃疡,但软骨细胞相对较多,移行层软骨陷窝内出现细胞丢失(图 2D')。形态学 Mankin 评分(表 3)在第 2 周无显著差异($P > 0.05$),而在第 4、6、8 周时表现出显著性差异($P = 0.000$)。Mankin 评分与 β -catenin 表达有明确相关关系(表 4)。

三、 β -catenin 在浅层软骨不同时段不同区域的表达

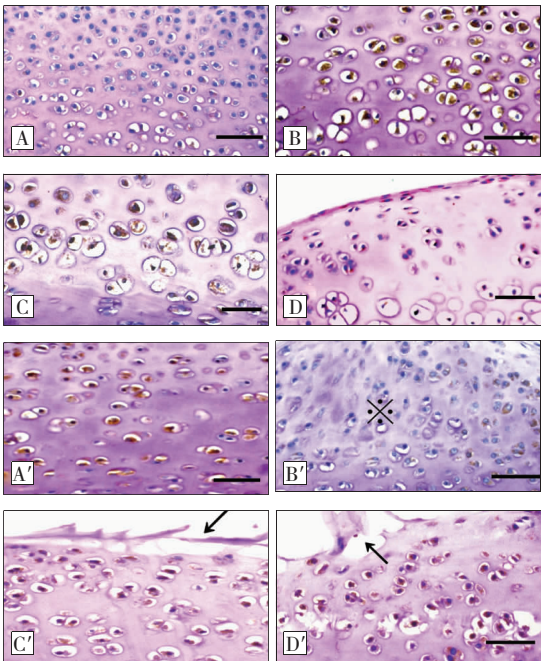


图 2 β -catenin 在不同时段的表达(400 \times)。A~D 为正常对照的髋关节在第 2、4、6、8 周的股骨头浅层软骨;A'~D' 为相应时段的 DDH 组;(图 B' 中 \times 表示细胞外基质淡染;图 C' 中 \surd 表示浅层软骨纤维化;图 D' 中 \wedge 表示浅层溃疡、裂隙)

表 3 两组不同时段 Mankin 评分的差异($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照组	1.02 \pm 0.82	1.51 \pm 0.58	1.54 \pm 0.58	2.25 \pm 0.51
DDH 组	1.42 \pm 0.55	5.84 \pm 0.84	9.20 \pm 1.32	12.6 \pm 1.14
<i>t</i> 值	-0.882	-8.7	-10.8	-16.7
<i>P</i> 值	0.407	0.000 **	0.000 **	0.000 **

注: ** $P < 0.001$

表 4 Mankin 评分与 β -catenin 表达之间的关系($\bar{x} \pm s$)

Mankin score	β -catenin
轻度(0~3 分)	552 \pm 30.7
中度(4~6 分)	263 \pm 28.1
重度(7~9 分)	324 \pm 44.9
极重度(10~12)	509 \pm 60.9

对照组 β -catenin 的 mRNA 表达(1.05 \pm 0.05)

在第 2 周明显低于 DDH 组 (1.42 ± 0.05), $P < 0.01$; 在第 4 周大鼠股骨头软骨中的表达 (5.58 ± 0.85) 明显高于 DDH 组 (1.85 ± 0.46), 随着发育成熟, 对照组 β -catenin 的表达明显低于 DDH 组 ($P < 0.01$, 表 5)。

表 5 不同时段 β -catenin 的 mRNA 表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照组	1.05 ± 0.05	1.85 ± 0.46	0.31 ± 0.06	0.41 ± 0.03
DDH 组	1.42 ± 0.05	2.95 ± 0.58	5.58 ± 0.85	14.8 ± 0.60
<i>t</i> 值	-8.578	6.747	-7.726	-41.1
<i>P</i> 值	0.001**	0.003**	0.002**	0.000**

注: ** $P < 0.005$

讨 论

建立髋脱位动物模型主要是通过改变髋关节的体位, 从而使髋关节受到异常生物力学的作用而导致髋关节发育异常。近期有学者通过新生大鼠模拟襁褓体位固定, 发现也能成功制作髋脱位模型^[5]。因此, 本实验采用新生大鼠襁褓体位固定创建髋脱位模型动态观察髋脱位向骨关节炎演变以及关节软骨的相关实验研究。

评价髋脱位动物模型制作是否成功主要依靠影像学检查, 如髋臼指数、Sharp 角、中心-边缘角、髋臼覆盖率等。由于新生大鼠股骨头软骨尚未骨化, 髋关节体积小, 无法在 X 线、Micro-CT 上显影, 给髋关节的形态测量带来不便。因此, 选择一个合适的测量方法以及观察指标对于了解髋脱位的演变过程十分重要。冠状面的髋关节标本既可以直观观察股骨头和髋臼的相应解剖关系判断模型是否制作成功, 并且通过拍照存档借助软件测量相关髋关节形态学参数。Heyman CH 的方法为本试验测量髋脱位的关节形态改变提供了很好的依据^[6]。

尽管髋脱位的病因目前仍未清楚, 但有多项研究表明, 婴儿出生时髋臼深度相对变浅, 髋关节处于不稳定状态^[8,9]。如果受到外力作用, 很容易发生髋关节脱位。因此, 襁褓位作为髋脱位发病的高危因素成为制作动物模型的理论基础^[10]。维持髋关节稳定的解剖学因素是髋臼直径、深度和股骨头的比例。从本研究结果来看, 早期解除外固定后, 髋关节再次获得发育的机会, 第 2、4 周龄段股骨头以及髋臼指数逐渐增长; 但由于股骨头未能获得复位, 所以髋关节持续受到异常生物力学的作用, 进而影响髋关节继续发育。到了第 6、8 周阶段, 与第 4 周相

比, 两者之间显著不匹配, 而根据 Harris H^[11] 头臼同心是髋关节发育的先决条件, 髋臼和股骨头发育显然遇到停滞, 在此阶段关节软骨出现不可逆退行性改变。临床已经证实如果尽早使髋关节获得复位, 而动物实验发现髋关节能否获得复位并逆转关节软骨退行性改变, 与动物模型年龄、固定持续时间以及方式有密切关系。研究发现固定时间越短, 软骨逆转恢复的可能性越大^[12]。而动物的年龄直接影响到关节软骨的生物力学特性。

β -catenin 是经典 Wnt 通路中的关键蛋白, 在软骨细胞形成、分化和细胞外基质代谢过程中发挥着重要的调控作用, 但对于不同时期、不同部位软骨细胞的调控作用大不相同。 β -catenin 在关节形成过程中起着关键性作用。Guo 发现在滑膜关节的早期形成阶段, β -catenin 的蛋白表达水平以及转录活性明显上调, 如果将软骨细胞中 β -catenin 基因敲除后, 关节分化出现阻滞^[13]。然而, β -catenin 在成熟软骨细胞中的表达却相反。Zhu M 有条件的激活成熟软骨细胞的 β -catenin 基因, 发现软骨分化提前, 并出现了骨关节炎样改变^[14]。Blom AB 在检测人类关节炎的关节软骨和滑膜中, 也发现 β -catenin 表达明显上调^[3]。Tamamura Y 研究发现, 在非成熟软骨细胞中激活 β -catenin 能够阻止软骨发育成熟, 抑制蛋白多糖以及 II 型胶原等细胞外基质的表达, 而在成熟软骨细胞中激活 β -catenin 却更容易刺激软骨肥大分化, 从而表达 MMP-13、VEGF 等促进基质矿化的标志物^[15]。因此, β -catenin 在骨关节炎的发展过程中的作用越来越受到人们重视。 β -catenin 信号通路可以通过刺激细胞外基质代谢基因的表达和软骨细胞的活性而导致关节发生退变^[16]。

关节软骨浅层由于独特的细胞形态以及生物力学、生物化学特性以致其在维持关节功能方面有着重要意义^[17]。浅层软骨中含有软骨干细胞或者祖细胞, 在关节软骨的自我更新以及维持功能上发挥重要作用^[18]。本实验观察到去除外固定的早期阶段, DDH 组中股骨头软骨浅层的 β -catenin 表达明显增强, 且其 mRNA 的表达也明显上调, 推测与去除关节固定后软骨细胞在短时间内对异常应力释放的反应有关, 而随着关节的继续发育, 正常关节软骨中 β -catenin 的表达逐渐增加, 当关节发育接近成熟时, β -catenin 的表达几乎不易检测出; 而在实验组, 第 4 周阶段的关节软骨不仅形态失常, 而且软骨细胞外基质淡染, β -catenin 的表达较弱, 当关节软骨出现早期骨关节炎样改变时, β -catenin 的蛋白表达以及 mR-

NA 转录水平得到明显上调;这与既往研究结果基本一致^[12]。Koyama E 发现在浅层软骨细胞中 β -catenin 的表达特别高,短暂的刺激会诱导浅层软骨变厚,而消除 β -catenin 基因后导致浅层软骨细胞丢失^[19],Yasuhara R 进一步发现 β -catenin 信号通路在调控关节浅层软骨的表型表达以及细胞增殖等方面起着关键作用^[20]。

本研究结果未能观察到髋脱位去除外固定后恢复正常的解剖关系,但提示 β -catenin 信号通路在髋脱位的关节软骨发育和退变过程中可能起着双向调控作用。关于髋脱位的异常生物力学特性以及激活的 β -catenin 信号通路之间是怎样导致关节早期退行性变,尚待进一步的探讨。

参 考 文 献

- Kim HT, Kim JI, Yoo CI. Acetabular development after closed reduction of developmental dislocation of the hip [J]. *J Pediatr Orthop*, 2000, 20(6): 701-708.
- Jacobsen S, Sonne-Holm S. Hip dysplasia: a significant risk factor for the development of hip osteoarthritis [J]. A cross-sectional survey. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(2): 211-218.
- Blom AB, Brockbank SM, Van Lent PL, et al. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(2): 501-512.
- Hens JR, Wilson KM, Dann P, et al. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(7): 1103-1113.
- Zhao XM, Wang EB, Li JJ, et al. Developmental changes of acetabular cartilage complex: an experimental study of a straight-leg swaddle model of newborn rats [J]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*, 2009, 11(10): 836-840.
- Heyman CH, Herndon CH. Legg-Perthes disease; a method for the measurement of the roentgenographic result [J]. *The Journal of bone and joint surgery American volume*, 1950, 32(A:4): 767-778.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1971, 53(3): 523-537.
- Ralis Z, McKibbin B. Changes in shape of the human hip

- joint during its development and their relation to its stability [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1973, 55(4): 780-785.
- Lee MC, Ebersson CP. Growth and development of the child's hip [J]. *Orthop Clin North Am*, 2006, 37(2): 119-132.
- Kremli MK, Alshahid AH, Khoshhal KI, et al. The pattern of developmental dysplasia of the hip [J]. *Saudi Med J*, 2003, 24(10): 1118-1120.
- Harris NH, Lloyd-Roberts GC, Gallien R. Acetabular development in congenital dislocation of the hip. With special reference to the indications for acetabuloplasty and pelvic or femoral realignment osteotomy [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1975, 57(1): 46-52.
- Ando A, Suda H, Hagiwara Y, et al. Reversibility of immobilization-induced articular cartilage degeneration after remobilization in rat knee joints [J]. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2011, 224(2): 77-85.
- Guo X, Day TF, Jiang X, et al. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(19): 2404-2417.
- Zhu M, Tang D, Wu Q, et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(1): 12-21.
- Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, et al. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 19185-19195.
- Yuasa T, Otani T, Koike T, et al. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration [J]. *Lab Invest*, 2008, 88(3): 264-274.
- Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2005, 75(3): 237-248.
- Hattori S, Oxford C, Reddi AH. Identification of superficial zone articular chondrocyte stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(1): 99-103.
- Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, et al. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis [J]. *Dev Biol*, 2008, 316(1): 62-73.
- Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, et al. Roles of beta-catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells [J]. *Lab Invest*, 1991(12): 1739-1752.