

鶏膝軟骨抽出物はマウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 の増殖を促進する

Chicken knee cartilage extract promotes proliferation of the mouse pre-chondrogenic cell line, ATDC5

及川宝希, 中谷祥恵, 関根凌兵, 古旗賢二*

Tomoki Oikawa, Sachie Nakatani, Ryohei Sekine, Kenji Kobata

要旨

関節軟骨はコンドロイチン硫酸 (CS) やヒアルロン酸 (HA) などの細胞外基質 (ECM) と ECM を産生する軟骨細胞で構成されている。近年、精製した CS および HA が関節機能改善を目的に健康食品などとして利用されている。一方、生体内で各 ECM 成分は相互作用していることが報告されているが、これら ECM 混合物の軟骨細胞に対する影響についてはあまり報告されていない。そこで本研究では、軟骨 ECM として鶏膝軟骨抽出物 (Chicken knee cartilage extract : CKCE) を用いて、CKCE の添加が軟骨細胞の増殖に与える影響を検討した。

CKCE または、CKCE をプロテアーゼもしくはコンドロイチナーゼ処理したものをマウス前駆軟骨細胞株 (ATDC5) に添加し、細胞増殖を WST-1 法を用いて評価した。比較対照としてサメ軟骨由来精製 CS および鶏冠由来精製 HA を用いた。

CKCE 添加は無添加と比較して軟骨細胞増殖を約 1.5 倍に促進した。また、プロテアーゼもしくはコンドロイチナーゼ処理した CKCE の添加も軟骨細胞増殖を同程度促進した。一方、CS、HA およびそれらの酵素処理物は ATDC5 の増殖を促進しなかった。

以上のことから、CKCE には軟骨細胞増殖を促進する成分が含まれ、それは HA および CS とは異なる低分子性の物質である可能性が示された。

Functional Food Research 14 : 70-76, 2018

keywords

鶏膝軟骨抽出物, 軟骨細胞, 細胞増殖, コンドロイチン硫酸, ヒアルロン酸

はじめに

関節軟骨は軟骨細胞と細胞が産生する豊富な細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) で構成されている。軟骨の ECM は、繊維状タンパク質であるコラーゲン (collagen, COL), グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) の一種であるヒアルロン酸 (hyaluronan, HA), プロテオグリカン (proteoglycan, PG) の一種であるアグリカン、種々

の低分子タンパク質、無機物質などから構成されている。アグリカンは 1 本のコアタンパク質に 100 本以上のコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate, CS) およびケラタン硫酸が刷子状に結合した構造である。CS の硫酸基は負電荷を帯びているため、水分子を保持し、物質の移動を調節する機能を有する¹⁾。HA も CS 同様に高い保水能力を持ち、細胞の分化や物質の移動を調節している²⁾。HA はリンクタンパク質を介して複数のアグリカンと複合体を形成している。さら

に、COLが繊維状の網目構造を形成し、その間隙にアグリカンとHAの複合体が存在することで、軟骨組織の抗圧縮力や抗張力が維持されている³⁾。軟骨細胞は細胞外ECMの状況を感じ、必要に応じてECMを産生している。したがって、軟骨のECM構成成分と軟骨細胞は相互作用することで正常な組織を維持している。

近年、CS、HA、COLなどは、水分保持、物質移動の制御、弾性を付与するのみでなく、軟骨の増殖や分化を調節することも明らかになってきた。たとえば、*N*-アセチルガラクトサミンの4位、6位に硫酸基を持つCS-Eや高分子量のHAは、軟骨細胞の分化を促進することが報告されている^{4,5)}。また、COLの加水分解ペプチドであるプロリルヒドロキシプロリンが軟骨細胞分化を調節することが報告されている⁶⁾。

現在、HA、CS、COLなどのECM成分は関節機能の維持を目的とした健康食品素材として広く用いられている。これらを摂取した際の有効性については、科学的な見解の一致は得られていないが、変形性膝関節症(osteoarthritis; OA)患者に対してCS、HAおよびCOLの経口摂取が治療の補助として使用するには有効であるとの報告もある⁷⁻¹¹⁾。これらの作用メカニズムについては、細胞および動物を用いた研究により、いくつか提唱されている。HAは軟骨細胞膜表面に存在するCD44などの受容体に結合し、軟骨細胞のGAG産生を増加させることが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。また、OA患者にCSを摂取させた際、炎症性サイトカインの一つであるIL-1 β を抑制することが報告されている¹⁵⁾。

しかし、これらの報告で用いられたECMは精製された単独成分での作用を示したものが多く、ECM混合物における軟骨細胞への影響については検討されていない。そこで本研究では、ECM混合物が軟骨細胞の増殖および分化に与える影響を鶏膝軟骨抽出物を用いて検討した。

1. 方法

1 | CKCEの調製

鶏膝軟骨抽出物の調製方法はRodriguesらの方法に準じて行った¹⁶⁾。すなわち、鶏膝軟骨4kgを105°C、20分間で高温高圧蒸気処理をした。処理後、鶏膝軟骨の身や脂を除去し、さらに105°C、10分間

の高温高圧蒸気処理を行った。高温高圧処理を行った鶏膝軟骨は、フードプロセッサーを用いてクリーンベンチ内で無菌的に破碎した。破碎した鶏膝軟骨を50 mL容コニカルチューブへ15 mL(軟骨重量:35 g)入れ、滅菌した超純水を20 mL加え攪拌後、24時間、室温で静置した。静置後、13,000 \times g、30分、4°Cの条件で遠心し、油層の上層、水層の中間層、不溶成分の下層の3層に分離した。水層のみを採取後、凍結乾燥器(FD-1000型、東京理化学器械株式会社、東京都、日本)で凍結乾燥したものをCKCEとした。

2 | 低分子化CKCEの調製

(1) プロテアーゼ処理CKCEの調製

CKCEを純水で終濃度10 mg/mLに溶解した。プロテアーゼは*Aspergillus oryzae*由来アマノプロテアーゼA「アマノ」SD(天野エンザイム株式会社、愛知県、日本)(至適温度pH 7.0、至適温度50°C、タンパク質分解力50,000 u/g)を用いた。プロテアーゼを終濃度0.1%となるよう添加し、37°Cで24時間インキュベートした。その後、85°Cで10分間不活化し、凍結乾燥した。対照として、純水をCKCE同様にプロテアーゼ処理後、不活化したサンプルを調製した。

(2) コンドロイチナーゼ処理CKCEの調製

CKCEを純水で終濃度10 mg/mLになるよう溶解した。コンドロイチナーゼ(CSase ABC、シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京都、日本)を終濃度50 mU/mLとなるよう添加し、37°Cで24時間インキュベートした。その後、85°Cで10分間不活化し、凍結乾燥した。対照として、純水をCKCE同様にCSase処理後、不活化したサンプルを調製した。

3 | CKCEの特性評価

(1) アガロース電気泳動

純水で終濃度1000 μ g/mLとなるよう調製したCKCE、およびその酵素処理物を用いた。また、比較対象としてCSおよびHAを用いた。CSはサメ軟骨由来コンドロイチン硫酸ナトリウム(分子量3.1 kDa、ゼリア新薬工業株式会社、東京都、日本)、HAは鶏トサカ由来ヒアルロン酸(分子量100 kDa、キューピー株式会社、東京都、日本)を終濃度1000 μ g/mLで使用した。各サンプル18 μ Lに2 μ Lの6 \times

ローディングバッファー（タカラバイオ株式会社，東京都，日本）を加え，1% アガロースゲル（タカラバイオ株式会社，東京都，日本）を用いて，100 V で25 分間電気泳動を行った。泳動後のゲルは0.05% トルジンブルー染色液（pH 4.1，和光純薬工業株式会社，大阪府，日本）で30 分間染色後，純水を用いて脱色した。次に，アガロースゲルを0.01% Stain-All 染色液（シグマアルドリッチジャパン合同会社，東京都，日本）に入れ暗所で一晩静置し，GAG を染色した。その後，純水で洗浄し，脱色した。

(2) SDS-PAGE

純水で20 mg/mL となるよう調製したCKCE，およびその酵素処理物を用いた。また，比較対象として，1 mg/mL 牛血清アルブミン（Bovine Serum Albumin, BSA）を用いた。各サンプルにLaemmli Sample Buffer（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社，東京都，日本）を等量加えた。そこへ14.2 M β -メルカプトエタノール（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社，東京都，日本）を終濃度5%（710 mM）になるように添加し，20°C，周波数40 kHz の条件で約2～3 分間超音波処理した。95°C で5 分間ボイル後，常温に冷ましたものをサンプルとして用いた。

12% Mini-PROTEAN® TGXTM Gels（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社，東京都，日本）に各サンプルを10 μ L ずつアプライした。10×Tris/Glycine/SDS Buffer（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社，東京都，日本）下で200V，約30～35 分泳動を行った。泳動後，ゲルをクマシーブリリアントブルー（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社，東京都，日本）染色液で30 分間振盪させ，染色した。染色したゲルは，純水で洗浄し，脱色した。

4 | 細胞培養

軟骨細胞はマウス前駆軟骨細胞株のATDC5（理科学研究所，茨城，日本）を用いた。D-MEM/F12（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社，東京都，日本）培地に5% ウシ胎児血清（FBS，株式会社ニチレイバイオサイエンス，東京都，日本），100 μ g/mL ペニシリン G カリウム 20 万単位（明治製菓ファルマ株式会社，東京都，日本），50 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン（明治製菓ファルマ株式会社，東京都，日本），50 μ g/mL 硫酸カナマイシン（明

治製菓ファルマ株式会社，東京都，日本）を添加し培養した。

CKCE，およびその酵素処理物は終濃度を100 および1000 μ g/mL に調製したものを用いた。また，終濃度1000 μ g/mL のCS およびHA を比較対象として用いた。

5 | WST-1 法

ATDC5 を96 wellplate に 5×10^3 cells/well ずつ播種した。24 時間後，終濃度1000 μ g/mL CS およびHA，終濃度100 μ g/mL および1000 μ g/mL CKCE，終濃度100 μ g/mL および1000 μ g/mL CKCE の酵素処理物を添加した。サンプル添加日を0 日目とし，4 日後に全群の培地を10% テトラゾリウム塩（WST-1，ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社，バーゼル，スイス）含有培地に交換した。WST-1 試薬添加から5 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて440 nm の吸光度を測定した。

6 | 細胞数計測

ATDC5 を3.5 cm dish に 1.5×10^5 cells/dish ずつ播種した。24 時間後，終濃度1000 μ g/mL のCKCE を添加した。サンプル添加日を0 日目とし，4 日後にAcridine orange/Propidium Iodide stain（株式会社エル・エム・エス，東京都，日本）を用い核の蛍光染色を行い，自動蛍光細胞計数装置（LUNA-FL，株式会社エル・エム・エス，東京都，日本）を用いて細胞数を計測した。

7 | ALP 活性染色

ATDC5 を96-well plate に 5×10^3 cells/well となるように播種した。播種から1 日後に終濃度100 μ g/mL および1000 μ g/mL CKCE，終濃度1000 μ g/mL CS，終濃度1000 μ g/mL HA を添加した。サンプル添加日を0 日目として，4 日間細胞培養を行った。細胞培養後，培地を取り除き20% ホルマリン溶液（和光純薬工業株式会社，大阪府，日本）で20 分間固定後，水洗した。その後，基質溶液存在下で37°C・10 分間インキュベートし，ALP により基質から生成されたアゾ色素を ALP 活性の指標とした。基質溶液として，10 mM NAPHTHOL AS-BI PHOSPHATE（シグマアルドリッチジャパン合同会社，東京都，日

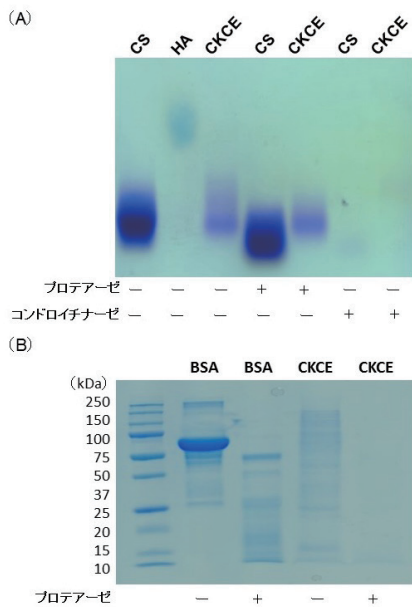


図1 CKCE および低分子化 CKCE の分子量分布
(A) アガロース電気泳動 (B) SDS-PAGE.

本) および 1 mM FASTRED VIORET LB SALT (シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京都, 日本) を 0.05 M 2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol (AMP, ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) に溶解したものを用いた。染色した細胞は, 画像解析ソフトウェア Image J (National Institutes of Health) を用いて数値化後に染色強度を比較した。

II. 結果

1 | CKCE の特性評価

アガロースゲル電気泳動の結果を図 1A に示した。1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CS はゲルの下部に検出され, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA はゲルの上部に検出された。CKCE は CS の検出位置近くに検出された。CKCE をプロテアーゼ処理すると, わずかにバンドの検出位置が低分子側に移動し, バンド濃度も減少した。一方, コンドロイチナーゼ処理した CS および CKCE のバンドは消失した。

SDS-PAGE の結果を図 1B に示した。CKCE は分子量マーカーの 250-25 kDa 付近にかけて複数種のバンドが検出された。また, プロテアーゼ処理することで, ゲル上のバンドが消失した。

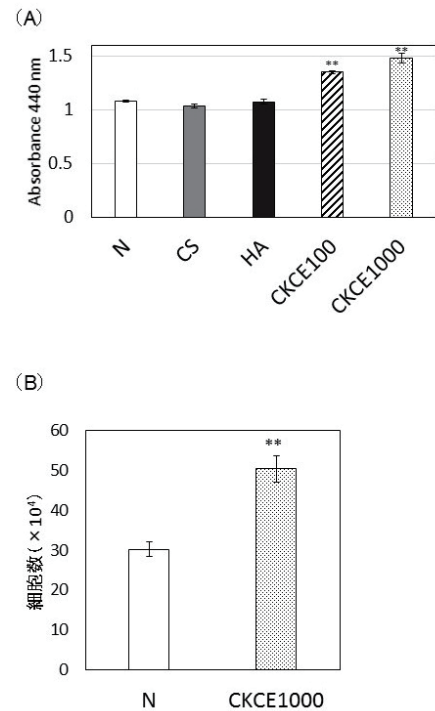


図2 CKCE が軟骨細胞の増殖に与える影響

- (A) WST-1 法, Means \pm S.E Dunnett's test
** $p < 0.01$ vs C (n=4).
(B) 細胞計測法, Means \pm S.E. Student *t* test. vs N (n=3)

2 | CKCE が軟骨細胞の増殖に与える影響

通常培養した Control (C) 群と比較して CS および HA は細胞増殖に影響を与えなかった。一方, CKCE は細胞増殖を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 1.3 倍, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 1.5 倍に有意に促進した (図 2A)。また, 細胞計測装置で測定した結果においても, CKCE 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は N と比較して細胞増殖を約 1.6 倍に有意に促進した (図 2B)。

CKCE のプロテアーゼ処理群は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のどちらの濃度も酵素未処理の CKCE と同等の増殖活性を示した (図 3)。同様に, CKCE のコンドロイチナーゼ処理群は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のどちらの濃度も酵素未処理の CKCE と同等の増殖活性を示した (図 4)。

3 | CKCE が分化に与える影響

CKCE が軟骨細胞の ALP 活性に与える影響を検討した結果, C 群と比較して, CS および HA は ALP 活性染色強度をそれぞれ約 1/5 倍, 2/5 倍と有意に低下させた。一方, CKCE は ALP 活性染色強度に影響を与えなかった (図 5)。

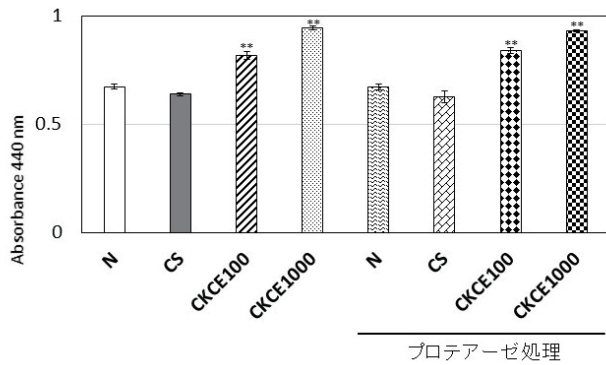


図3 CKCEのプロテアーゼ処理が軟骨細胞の増殖に与える影響
Means \pm S.E Dunnett's test ** $p < 0.01$ vs C (n=4)

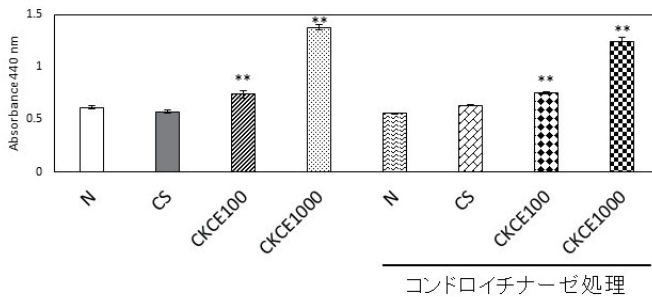


図4 CKCEのコンドロイチナーゼ処理が軟骨細胞の増殖に与える影響
Means \pm S.E Dunnett's test ** $p < 0.01$ vs C (n=4)

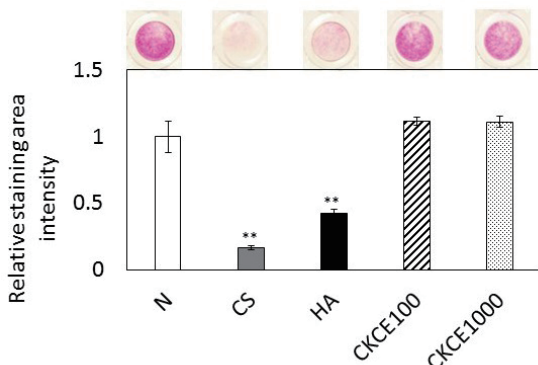


図5 CKCEが軟骨細胞のアルカリフォスファターゼ活性に与える影響
Means \pm S.E Dunnett's test ** $p < 0.01$ vs C (n=4)

III. 考察

CSやHAはともに関節軟骨の細胞外基質構成成分であるが、現在、市販で使用されているCSおよびHAは各々精製されて使用されているものが多い。本研究では、CS、HAおよびCSなど複数のECM成分を含む鶏膝軟骨抽出物を用いて、軟骨細胞に与える影響をCSおよびHAと比較した。

アガロースゲル電気泳動の結果、CSおよびHA 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と比較してECM混合物であるCKCE 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で染色強度が薄かったことから、CKCE

中に含まれるCSおよびHAの濃度は1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ よりかなり薄いと考えられた。また、CKCEのバンド検出位置はCSと比較して、わずかにHA側にバンドが検出されたことから、CSに他のECM成分が結合した構造を有している可能性が考えられた。また、SDS-PAGEの結果、CKCEは高圧加熱処理後も250–15 kDaの範囲の複数のタンパク質が含まれることが明らかになった。また、CKCEは0.1%プロテアーゼ処理を行うとCBB法で検出可能なバンドが消失することを確認した。

本実験においてCKCEは軟骨細胞の増殖を促進させる成分が含まれることを明らかにした。本実験においてCSおよびHAは軟骨細胞の増殖に影響を与えなかった(図2)。また、コラーゲン加水分解物やそのペプチドであるプロリルヒドロキシプロリンやプロリルヒドロキシグリシンなどは軟骨細胞の増殖に影響を与えないこと⁶⁾から、CKCEは精製されたCS、HAおよびコラーゲン加水分解物とは異なる活性を示すことを明らかにした。

CKCEはプロテアーゼ処理およびコンドロイチナーゼ処理後も軟骨細胞に対する増殖活性を維持した。したがって、CKCEの軟骨細胞の増殖活性成分は高分子のタンパク質や多糖類以外の成分である可能性が示唆された。しかし、プロテアーゼやCSaseによって分解されない成分の可能性もあるため、

今後は限外ろ過やゲルろ過など他の手法を用いた詳細な検討が必要である。また、Rodrigues EDらは鶏軟骨抽出物中にヘキスロン酸などが含まれていることを報告している¹⁶⁾。今後はヘキスロン酸などのオリゴ糖の増殖活性を評価することを検討する必要がある。

CSおよびHAは軟骨細胞のALP活性を抑制した(図5)。我々はCSが軟骨細胞のALP活性を直接阻害することをすでに報告している¹⁷⁾。CKCEに含まれるCS濃度が低かったことから(図1A)、CKCEは本実験濃度においてALP活性を阻害しなかったと

考えられる。また、CS、HA および CKCE が軟骨細胞の ALP 活性に与える影響が異なったことから、CKCE は CS および HA とは異なる活性を有することを明らかにした。

本研究において CKCE には軟骨細胞の増殖を促進させる成分が含まれることを明らかにした。近年、鶏胸骨抽出物から生成された栄養補助食品が OA 患者の症状を緩和することが報告されている¹⁸⁾。本研究の結果、軟骨抽出物を用いることで、従来利用されてきた CS、HA、COL などとは異なる活性が期待できることを明らかにした。今後は、CKCE の軟骨細胞の増殖に対する詳細なメカニズムを検討すると同時に、CKCE 中に含まれる軟骨増殖促進成分を同定する必要がある。

◆文献

- 1) Chandran PL, Horkay F. Aggrecan, an unusual polyelectrolyte : review of solution behavior and physiological implications. *Acta Biomater.* 2012 ; 8(1) : 3-12.
- 2) Matsumoto K. The role of hyaluronan in cartilage. 軟骨でのヒアルロン酸の役割 : Trends in glycoscience and Glycotechnology ; 2010, 22(124) : 57-67.
- 3) Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int.* 2014 ; 2014 : 648459.
- 4) Kawamura D, Funakoshi T, Mizumoto S, Sugahara K, Iwasaki N. Sulfation patterns of exogenous chondroitin sulfate affect chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Orthop Sci.* 2014 ; 19(6) : 1028-35.
- 5) Sato E, Ando T, Ichikawa J, Okita G, Sato N, Wako M, et al. High molecular weight hyaluronic acid increases the differentiation potential of the murine chondrocytic ATDC5 cell line. *J Orthop Res.* 2014 ; 32(12) : 1619-27.
- 6) Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009 ; 17(12) : 1620-7.
- 7) Singh JA, Noorbaloochi S, MacDonald R, Maxwell LJ. Chondroitin for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 ; 1 : CD005614.
- 8) Owens S, Wagner P, Vangness CT. Recent advances in glucosamine and chondroitin supplementation. *J Knee Surg.* 2004 ; 17(4) : 185-93.
- 9) Bottegoni C, Muzzarelli RA, Giovannini F, Busilacchi A, Gigante A. Oral chondroprotection with nutraceuticals made of chondroitin sulphate plus glucosamine sulphate in osteoarthritis. *Carbohydr Polym.* 2014 ; 109 : 126-38.
- 10) Altman RD. Status of hyaluronan supplementation therapy in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2003 ; 5(1) : 7-14.
- 11) Lugo JP, Saiyed ZM, Lau FC, Molina JP, Pakdaman MN, Shamie AN, et al. Undenatured type II collagen (UC-II®) for joint support : a randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013 ; 10(1) : 48.
- 12) Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M. Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol.* 1999 ; 179(2) : 142-8.
- 13) Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res.* 1997 ; 12(10) : 1657-63.
- 14) Hua Q, Knudson CB, Knudson W. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci.* 1993 ; 106 (Pt 1) : 365-75.
- 15) Henrotin Y, Mathy M, Sanchez C, Lambert C. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis : from in vitro studies to clinical recommendations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2010 ; 2(6) : 335-48.
- 16) Rodrigues ED, Pimentel ER, Mourão PA, Gomes L. Distribution of small proteoglycans and glycosaminoglycans in humerus-related articular cartilage of chickens. *Braz J Med Biol Res.* 2005 ; 38(3) : 381-90.
- 17) Kudo T, Nakatani S, Kakizaki M, Arai A, Ishida K, Wada M, et al. Supplemented Chondroitin Sulfate and Hyaluronic Acid Suppress Mineralization of the Chondrogenic Cell Line, ATDC5, via Direct Inhibition of Alkaline Phosphatase. *Biol Pharm Bull.* 2017 ; 40(12) : 2075-80.
- 18) Schauss AG, Stenehjem J, Park J, Endres JR, Clewell A. Effect of the novel low molecular weight hydrolyzed chicken sternal cartilage extract, BioCell Collagen, on improving osteoarthritis-related symptoms : a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem.* 2012 ; 60(16) : 4096-101.

Abstract

Extracellular matrices (ECM) are abundant in articular cartilage and are composed of structural molecules such as chondroitin sulfate (CS), hyaluronic acid (HA), and collagen (COL). In recent years, purified CS and HA have been sometimes used in health foods for improving joint function. Although these molecules interact with one another and function intravitaly, research on the influence of ECM complex on chondrocytes is limited. In this paper, we investigated the *in vitro* effect of adding chicken knee cartilage extract (CKCE) on the proliferation of chondrocytes.

Mouse pre-chondrogenic cell line, ATDC5 was cultured with CKCE or CKCE treated with either protease or chondroitinase, and the cell proliferation was evaluated by the WST-1 assay. The CS purified from shark cartilage and HA purified from cockscomb chicken were used as the control groups.

The chondrocyte proliferation was 1.5 times higher in the group with CKCE than in the group without CKCE. Additionally, protease- or chondroitinase-treated CKCE induced a similar increase in chondrocyte proliferation. Conversely, CS, HA, and their enzyme-treated products did not have any effect on ATDC5 proliferation.

These results indicate that low-molecular weight components different from HA and CS, which are protease- or chondroitinase-resistant, promotes the chondrocyte proliferation.