

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.002

骨形态发生蛋白在胶原诱导关节炎小鼠模型中的表达*

刘 强¹, 张莹莹¹, 焦志军¹, 顾金金^{2△}

(1. 江苏大学附属医院检验科/镇江市免疫学重点实验室, 江苏镇江 212001;

2. 江苏省镇江市第一人民医院老年科 212002)

[摘要] **目的** 建立 DBA/1J 小鼠胶原诱导关节炎(CIA 小鼠)模型,初步研究 CIA 小鼠外周血单个核细胞中及病变关节组织中 BMPs 的表达水平。**方法** 利用牛 II 型胶原诱导 DBA/1J 小鼠发生关节炎病理改变;利用荧光定量 PCR 检测发病外周血单个核细胞中及关节组织 BMPs 的 mRNA 的表达水平,利用免疫荧光技术检测关节组织中 BMP9 蛋白表达水平。**结果** 成功建立了 CIA 小鼠模型,检测发现 BMP4 mRNA 和 BMP9 mRNA 在发病的 CIA 小鼠外周血单个核细胞及病变关节组织中表达明显下调($P < 0.05$),荧光免疫技术显示 BMP9 蛋白在 CIA 小鼠病变关节组织中表达明显下调($P = 0.002$)。**结论** 在基因水平 BMP4、9 在 CIA 小鼠外周血单个核细胞中及病变组织中表达明显下调,蛋白水平 BMP9 在 CIA 小鼠病变组织中表达明显下调。

[关键词] 骨形态发生蛋白;聚合酶链反应;CIA 小鼠**[中图分类号]** R392.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0293-03

Expression of bone morphology proteins in mice with collagen-induced arthritis*

Liu Qiang¹, Zhang Yingying¹, Jiao Zhijun¹, Gu Jinjin^{2△}

(1. Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Jiangsu University/Zhenjiang Key Laboratory of Immunology, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China; 2. Department of Gerontology, Zhenjiang First People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China)

[Abstract] **Objective** To establish collagen-induced arthritis (CIA) model used of DBA/1J mouse, a preliminary study of the expression levels of BMPs in mononuclear cells of peripheral blood and the joints tissue of CIA mice. **Methods** We induced DBA/1J mice and developed arthritis pathology by using of bovine type II; then, we detected mRNA and protein expression levels of BMPs by using quantitative PCR and immunohistochemical staining. **Results** We successfully established CIA mouse model. The expression of BMP4 and BMP9 mRNA was significantly down-regulated in peripheral blood mononuclear cells and in the pathogenesis of joint tissues of CIA mice ($P < 0.05$). It showed that BMP9 protein significantly decreased in joint tissues of CIA mice by immunofluorescence technique ($P = 0.002$). **Conclusion** At the genetic level, the expression of BMP4 and BMP9 could be significantly down-regulated in the CIA mouse. At the protein level, BMP9 could be significantly down-regulated in the CIA mouse.

[Key words] bone morphogenetic proteins; polymerase chain reaction; CIA mice

类风湿关节炎(RA)是一种以慢性、进行性、侵袭性关节炎为主要表现的自身免疫性疾病。患者关节组织伴随着炎症细胞的浸润和滑膜细胞的增殖,通过细胞之间的作用和分泌的细胞因子,同时在破骨细胞的参与下形成不同程度的骨破坏,不仅表现为受累关节的骨侵蚀,还表现为全身性的骨质疏松^[1-3]。骨形态发生蛋白(BMPs)是诱导骨再生最为重要细胞因子之一,属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员。研究已证明 BMP(2、4、6、7、9)具有较强的诱导成骨分化的作用,其中 BMP7 可以抑制 CD14⁺ 单核细胞向破骨细胞转化^[4];学者发现 BMP2 所诱导的异位成骨过程中,破骨前体细胞在骨基质行成之前就已出现,可破骨性吸收肥大的软骨,是骨形成调节的关键因素^[5-6]。可见,成骨细胞与破骨细胞的平衡状态对骨形成和重塑至关重要。本研究通过牛 II 型胶原激发 DBA/1J 小鼠发生诱导性关节炎(CIA 小鼠)病理改变,来模拟人 RA 病程。实验通过荧光定量 PCR 和免疫荧光技术检测 BMPs 在 CIA 小鼠外周血单个核细胞及发病关节组织中表达情况,为 RA 骨破坏研究提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 Trizol 试剂(Invitrogen 公司),反转录试剂盒(Promega 公司),SYBR Green I (TaKaRa 公司),Rotor Gene 6000 荧光定量 PCR 仪(Corbett Research 公司),荧光倒置显微镜(Leica 公司 IX71),BMP9 多克隆抗体(Santa 公司),羊抗兔二抗异硫氰酸荧光素(FITC,厚普生物),牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司)。

1.1.2 实验对象 7 周龄 DBA/1J 雄性小鼠购自南京大学模式动物研究所,CIA 小鼠是利用牛 II 型胶原蛋白诱导 DBA/1J 小鼠发生 RA 病理改变。

1.1.3 实时荧光定量 PCR 引物设计与合成 引物根据 GenBank 中小鼠 BMPs 和 β -actin 基因(NM_007393.3)序列,运用 primer3(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)设计,由 TaKaRa 公司合成,引物信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 CIA 小鼠模型建立 选取 7 周龄 DBA/1J 雄性小鼠分为对照组 10 只和诱导组 20 只,诱导组小鼠于第 0 天,每只小鼠尾部皮内注射牛 II 型胶原(终浓度 1 mg/mL)和完全弗氏佐剂的混合溶液 0.1 mL;第 21 天,尾部皮内注射同等剂量的该乳剂作为激发;对照组小鼠于相同时间仅注射等体积弗氏完全

* 基金项目:国家自然科学基金(81373217);江苏大学 2012 年度医学临床科技发展基金(JLY20120169)。 作者简介:刘强(1985—),主管检验技师,硕士,主要从事 BMPs 信号通路在类风湿关节炎骨破坏中作用研究。 △ 通讯作者,E-mail:gujinjin_free@163.com。

佐剂。1~42 d,隔日记录小鼠发病情况。CIA 小鼠关节炎指数评价:通过测量小鼠足掌厚度和肉眼观察关节红肿部位对小鼠进行炎症指数评分。a:足爪没有红肿为 0 分;b:小趾关节轻微红肿为 1 分;c:趾关节和足趾关节红肿为 2 分;d:踝关节以下足爪肿胀为 3 分;e:包括踝关节在内的全部足爪肿胀为 4 分。各肢体得分相加为该小鼠关节炎总评分。

表 1 BMPs 基因和 β -actin 基因引物信息

Primer name	Primer sequence(5'-3')	Gene (bp)
Mus β -actin Left Primer	CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC	120
Mus β -actin Right Primer	TAGAGGCTTTTACGGATGTC	
Mus BMP2 Left Primer	CCCCAAGACACAGTTCCTTA	169
Mus BMP2 Right Primer	GAGACCGCAGTCCGTCTAAG	
Mus BMP4 Left Primer	TGAGCCTTTCAGCAAGTTT	180
Mus BMP4 Right Primer	CTTCCCGGTCTCAGGTATCA	
Mus BMP6 Left Primer	GAAGGTTGGCTGGAATTTGA	197
Mus BMP6 Right Primer	ACCTCGCTCACCTTGAAGAA	
Mus BMP7 Left Primer	GAAAACAGCAGCAGTGACCA	165
Mus BMP7 Right Primer	GGTGCGTTCATGTAGGAGT	
Mus BMP9 Left Primer	TGAGTCCCATCTCCATCCTC	245
Mus BMP9 Right Primer	ACCCACCAGACACAAGAAGG	

1.2.2 CIA 小鼠发病关节苏木素-伊红(HE)染色 于第 42 天,选取对照组和诱导组(单个关节评分 4 分)小鼠组织各 3 份进行 HE 染色,观察病理改变。

1.2.3 对照组小鼠和诱导组 CIA 小鼠的外周血单个核细胞 cDNA 制备 第 42 天,对照组小鼠及 CIA 组小鼠摘除眼球采血 1.0 mL,加入等量的 Hank's 液,混匀后轻轻加到 Ficoll 液中,1 500 r/min 离心 15 min,轻轻吸出单个核细胞后用磷酸盐

缓冲液(PBS)进行洗涤。再用 Trizol 提取 RNA,并逆转录成 cDNA。

1.2.4 对照组小鼠和诱导组 CIA 小鼠关节组织 cDNA 制备 第 42 天,取对照组小鼠及 CIA 组小鼠(单个关节评分 3 分及以上)踝关节以下组织,剥离皮肤和肌肉后加入 Trizol 进行匀浆,提取组织 RNA 并逆转录成 cDNA。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 以 cDNA 为模板,分别进行 BMP2、4、6、7、9 基因扩增,扩增条件优化为:预变性 95 °C 20 s,变性 95 °C 10 s,退火 56 °C 10 s,延伸 72 °C 20 s,终末延伸 72 °C 1 min,共 40 个循环。所有样品均为 3 个平行管,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析基因相对表达水平。

1.2.6 对照组小鼠和诱导组 CIA 小鼠关节组织中 BMP9 的免疫荧光检测 取对照组小鼠和 CIA 组小鼠(单个关节评分 3 分及以上),分别进行石蜡包埋,先孵育兔抗鼠 BMP9 一抗,再孵育羊抗兔二抗 FITC,最后用荧光显微镜进行观察并采集图片,利用 Image-ProPlus6.0 图像软件分析两组 BMP9 的表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件对资料进行分析。正态计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态计量资料以中位数(4 分位数间距)表示。两组资料符合正态分布且方差齐时用两独立样本 t 检验进行比较,正态分布方差齐采用 t' 检验。两组资料呈非正态分布时采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CIA 小鼠模型的建立 诱导组 16 只 DBA/1J 小鼠经免疫 30 d 后,趾骨关节、掌骨关节开始出现肿胀,42 d 达到高峰(图 1A);对照组 10 只小鼠无发病现象(图 1B)。HE 染色观察,对照组小鼠滑膜组织无增生(图 1C),衬覆 1~2 层滑膜细胞,无炎细胞浸润、血管扩张、血管翳;诱导组 CIA 小鼠关节明显可以看到滑膜组织增生(图 1D),衬覆多层滑膜细胞,血管扩张充血,炎细胞浸润,血管翳出现,骨质被侵蚀。

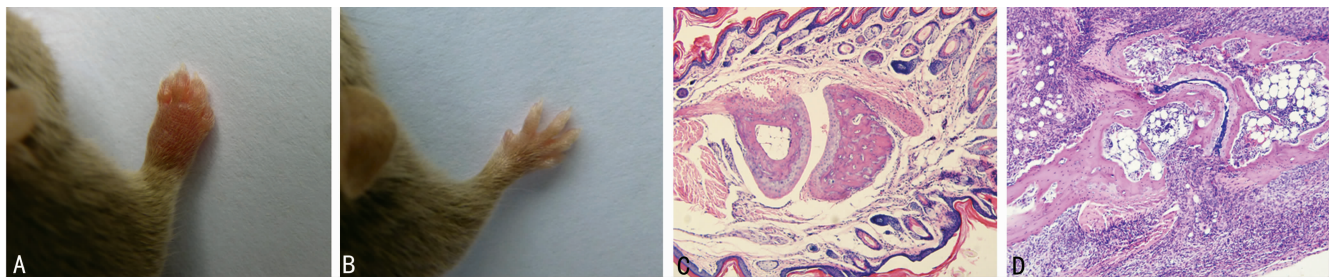


图 1 CIA 小鼠 RA 组织 HE 染色结果

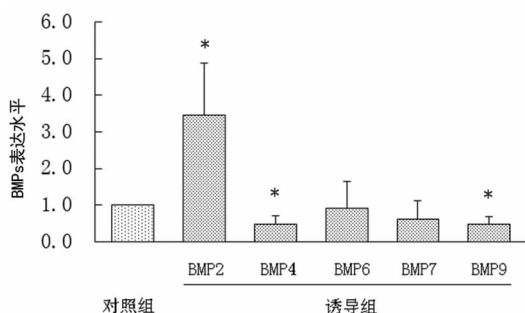
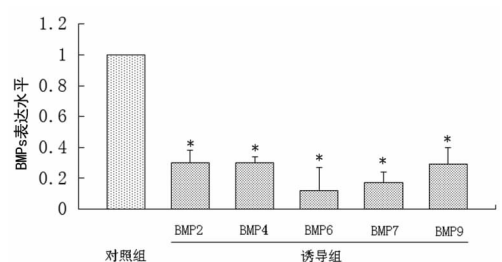


图 2 BMPs 在 CIA 小鼠外周血单个核细胞中表达情况



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 BMPs 在 CIA 小鼠发病组织中表达情况

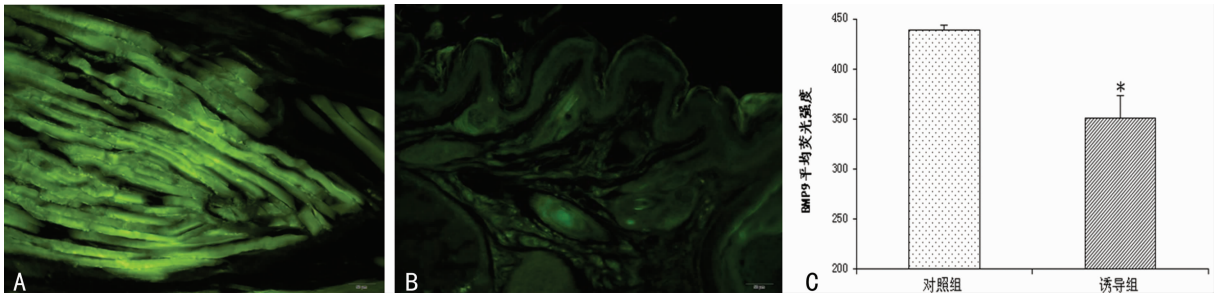
2.2 BMPs 在 CIA 小鼠外周血单个核细胞中的表达 利用荧

光定量 PCR 检测对照组和诱导组小鼠外周血单个核细胞,诱导组 CIA 小鼠中 BMP2 与对照组比相对表达水平为 $3.03 \pm 1.42 (P = 0.024)$, BMP4 和 BMP9 相对表达水平分别为 0.47 ± 0.24 、 $0.48 \pm 0.21 (P = 0.013, 0.012)$, BMP6 和 BMP7 表达差异无统计学意义,分别为 0.92 ± 0.74 、 $0.62 \pm 0.51 (P = 0.703, 0.071)$, 见图 2。

2.3 BMPs 在 CIA 小鼠发病关节组织中的表达 在对照组和诱导组(CIA 小鼠)中分别采用荧光定量 PCR 检测 BMPs mRNA 的表达情况。由图 3 可知,与对照组比,BMP2 在诱导组相对表达水平为 $0.31 \pm 0.08 (P < 0.01)$, BMP4 在诱导组相对表

达水平为 $0.30 \pm 0.04 (P = 0.001)$, BMP6 在诱导组相对表达水平为 $0.12 \pm 0.15 (P = 0.001)$, BMP7 在诱导组相对表达水平为 $0.17 \pm 0.07 (P < 0.01)$, BMP9 在诱导组相对表达水平为 $0.29 \pm 0.11 (P = 0.008)$ 。

2.4 免疫荧光检测 CIA 小鼠肿胀关节组织中 BMP9 的蛋白表达 免疫荧光检测 CIA 小鼠发病趾关节组织中 BMP9 的蛋白表达,用 Image-Pro Plus 图像分析软件对免疫荧光图片上平均荧光密度进行分析,结果显示 BMP9 在诱导组 CIA 小鼠表达明显低于对照组 ($P = 0.002$),见图 4。



A: 对照组($\times 200$); B: CIA 小鼠发病组($\times 200$); C: 两组的 BMP9 平均荧光强度比较。* : $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 4 BMP9 在 CIA 小鼠发病关节组织中表达情况

3 讨 论

RA 是以慢性多关节滑膜炎,骨及软骨破坏为主要特征的全身性自身免疫性疾病,主要影响四肢关节的功能。RA 的发生、发展受多条信号通路的调节,其中 TGF- β 是一条重要通路。BMPs 是 TGF- β 超家族成员之一,对组织的生长发育有着重要的作用,在组织的损伤修复平衡中起着一定的调节作用。BMPs 对不同种类细胞的增殖、分化、黏附、迁移和凋亡起着重要调节作用,在 RA 患者滑膜中证实了 BMPs 的存在^[7-8]。CIA 小鼠是近年来研究 RA 病理机制的较为理想动物模型,主要表现为关节红肿,多发性关节炎,严重时致关节畸形并伴有炎性细胞浸润。本实验通过牛 II 型胶原诱导 DBA/1J 小鼠发病,发病率较高,另外 4 只小鼠因为个体差异或注射效果差而未发病。发病的 CIA 小鼠表现为滑膜组织增生,衬覆多层滑膜细胞,血管扩张充血,炎细胞浸润,血管翳出现,骨质被侵蚀等病理变化,类似于人 RA 的临床病理改变^[9-10]。

在 CIA 小鼠外周血单个核细胞中 BMPs 表达谱发生不同程度改变,BMP2 表达明显上调,同时 BMP4 和 BMP9 表达明显下调。接下来检测病变关节组织中的 BMPs,5 种 BMPs 均表达明显下调,其中 BMP4 和 BMP9 与外周血检测结果一致。其中 BMP2 在外周血单个核细胞中表达与其在病变关节组织中表达存在明显差异,推测其原因:(1)产生部位和产生细胞不同,外周血中主要由单个核细胞(主要是淋巴细胞和单核细胞产生),病变关节组织中主要由巨噬细胞样滑膜细胞和成纤维样滑膜细胞产生;(2)细胞因子相互作用呈复杂网络性,具体产生机制需要进一步研究证实。依据现有报道 BMPs 可协同 TGF- β 促进 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞分化,可见 BMPs 在病变关节中的表达减少,导致 T 细胞分化减弱,不能有效抑制免疫反应,进一步发展局部关节受到炎症侵蚀破坏^[11-12]。BMP9 是近年来研究较热的 BMPs,其在成骨分化诱导上起着重要作用,早期可以促使成骨标志物碱性磷酸酶增高^[13-15],为进一步证实 BMP9 表达情况,利用免疫荧光技术检测关节组织中 BMP9 的蛋白水平,发现发病关节组织中 BMP9 表达明显下调与其基因水平变化一致。由此推测 BMP9 的下调改变可能促进了

CIA 小鼠关节骨破坏的发生、发展,与学者 Lories 研究结论:在小鼠体内上调 BMPs 信号通路可保护软骨免受炎症侵蚀一致^[16]。由此可见 BMPs 信号通路可能是治疗关节炎骨破坏新的靶点。

综合以上实验结果,本研究证实了 BMPs 在胶原诱导关节炎发生、发展过程中存在表达谱的改变,其中 BMP9 表达明显下调,这为进一步研究其作用机制提供实验和理论基础。

参考文献

- [1] Ochi S, Shinohara M, Sato K, et al. Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(27): 11394-11399.
- [2] Kotake S, Yago T, Kawamoto M, et al. Human receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) induces osteoclastogenesis of primates in vitro [J]. In Vitro Cell Dev Bio Anim, 2012, 48(9): 593-598.
- [3] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [4] Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(8): 1544-1552.
- [5] Zheng Y, Wang L, Zhang X, et al. BMP2/7 heterodimer can modulate all cellular events of the in-vitro rankl-mediated osteoclastogenesis respectively in different dose-patterns [J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(5/6): 621-630.
- [6] Lysdahl H, Baatrup A, Foldager CB, et al. Preconditioning human mesenchymal Stem cells with a low concentration of BMP2 stimulates proliferation and osteogenic differentiation in vitro [J]. Biores Open Access, 2014, 3(6): 278-285.
- [7] Bramlage CP, Häupl T, Kaps C, et al. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 (下转第 298 页)

临床应用相比,目前关于天麻素的镇痛作用及其机制的实验研究不多。张怡评等^[12]研究表明小鼠灌胃给药,不同剂量天麻素和天麻苷元能显著提高热伤害刺激致痛小鼠的痛阈,明显抑制醋酸引起的小鼠扭体反应,提示天麻素和天麻苷元有镇痛作用。郑卫红等^[13]研究显示天麻素可以减轻长春新碱诱导的大鼠化疗疼痛反应,使其痛阈明显增高,且镇痛效果与天麻素的剂量有关,大剂量时效果更明显。最近有研究报道腹腔注射不同剂量天麻素对神经痛具有镇痛作用^[14]。在培养的大鼠三叉神经节细胞上,中浓度的天麻素(5、10 mmol/L)可能通过 ERK1/2 途径降低痛觉信息的传入和整合^[15]。

有关天麻素对神经痛的中枢镇痛作用的实验研究迄今为止尚较少报道。本实验研究结果表明左侧坐骨神经结扎大鼠伏核注射天麻素引起双侧后爪缩爪潜伏期延长,提示天麻素在大鼠伏核对神经痛具有重要的镇痛作用,但有关天麻素对神经痛的中枢镇痛机制目前仍不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 429(1/3): 23-37.
- Finnerup NB, Jensen TS. Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain—a critical analysis[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(2): 107-115.
- Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(2): 95-106.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence based recommendations[J]. *Pain*, 2007, 132(3): 237-251.
- Yang XD, Zhu J, Yang R, et al. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*[J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(2): 180-186.
- Gu XL, Yu LC. Involvement of opioid receptors in oxytocin-induced antinociception in the nucleus accumbens of rats[J]. *J Pain*, 2007, 8(1): 85-90.
- Xu SL, Li J, Zhang JJ, et al. Antinociceptive effects of galanin in the nucleus accumbens of rats[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 520(1): 43-46.
- Yang Y, Zhang Y, Li XH, et al. Involvements of galanin and its receptors in antinociception in nucleus accumbens of rats with inflammatory pain[J]. *Neurosci Res*, 2015, 97(8): 20-25.
- Duan H, Zhang Y, Zhang XM, et al. Antinociceptive roles of galanin receptor1 in nucleus accumbens of rats in a model of neuropathic pain[J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(10): 1542-1551.
- 吕国平,王春芹,蔡中琴. 天麻素注射液的药理及临床研究[J]. *中草药*, 2002, 33(5): U003-U004.
- 郭学廷,聂永霞. 天麻素治疗偏头痛的近期疗效[J]. *实用全科医学*, 2011, 9(4): 579, 591.
- 张怡评,林丽聪,吴春敏. 天麻素与天麻苷元的镇痛作用研究[J]. *福建中医学院学报*, 2006, 16(6): 30-31.
- 郑卫红,张金芝,郑世玲. 天麻素对化疗痛大鼠的作用及其在脊髓水平的作用机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 6(3): 444-446.
- 徐敏,刘勇军,闵闯,等. 天麻素对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及其机制研究[J]. *临床医学工程*, 2014, 21(7): 837-839.
- Luo GG, Fan WJ, Yuan XY, et al. The pharmacological mechanism of gastrodin on calcitonin gene-related peptide of cultured rat trigeminal ganglion[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2011, 46(12): 1451-1456.
- Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 429(1/3): 23-37.
- Finnerup NB, Jensen TS. Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain—a critical analysis[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(2): 107-115.
- Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(2): 95-106.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence based recommendations[J]. *Pain*, 2007, 132(3): 237-251.
- Yang XD, Zhu J, Yang R, et al. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*[J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(2): 180-186.
- Gu XL, Yu LC. Involvement of opioid receptors in oxytocin-induced antinociception in the nucleus accumbens of rats[J]. *J Pain*, 2007, 8(1): 85-90.
- Xu SL, Li J, Zhang JJ, et al. Antinociceptive effects of galanin in the nucleus accumbens of rats[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 520(1): 43-46.
- Yang Y, Zhang Y, Li XH, et al. Involvements of galanin and its receptors in antinociception in nucleus accumbens of rats with inflammatory pain[J]. *Neurosci Res*, 2015, 97(8): 20-25.
- Duan H, Zhang Y, Zhang XM, et al. Antinociceptive roles of galanin receptor1 in nucleus accumbens of rats in a model of neuropathic pain[J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(10): 1542-1551.
- 吕国平,王春芹,蔡中琴. 天麻素注射液的药理及临床研究[J]. *中草药*, 2002, 33(5): U003-U004.
- 郭学廷,聂永霞. 天麻素治疗偏头痛的近期疗效[J]. *实用全科医学*, 2011, 9(4): 579, 591.
- 张怡评,林丽聪,吴春敏. 天麻素与天麻苷元的镇痛作用研究[J]. *福建中医学院学报*, 2006, 16(6): 30-31.
- 郑卫红,张金芝,郑世玲. 天麻素对化疗痛大鼠的作用及其在脊髓水平的作用机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 6(3): 444-446.
- 徐敏,刘勇军,闵闯,等. 天麻素对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及其机制研究[J]. *临床医学工程*, 2014, 21(7): 837-839.
- Luo GG, Fan WJ, Yuan XY, et al. The pharmacological mechanism of gastrodin on calcitonin gene-related peptide of cultured rat trigeminal ganglion[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2011, 46(12): 1451-1456.

(收稿日期:2015-08-08 修回日期:2015-10-16)

(上接第 295 页)

- and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(3): R58.
- Williams JC, Maitra S, Anderson MJ, et al. BMP-7 and bone regeneration: evaluation of dose-response in a rodent segmental defect model[J]. *J Orthop Trauma*, 2015, 29(9): e336-341.
- Lories RJ, Matthys P, de Vlam K, et al. Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoprosperiostitis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(5): 595-598.
- Wang XQ, Peng YP, Liu Z, et al. Roles of tyrosine hydroxylase expressed by CD4+ T cell subsets in collagen type II-induced arthritis[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2014, 30(5): 390-394.
- Lu L, Ma J, Wang X, et al. Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(1): 142-152.
- Mellado U, Martinez-Muñoz L, Cascio G, et al. T cell mi-

- gration in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 384.
- Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience[J]. *Injury*, 2008, 39(Suppl 2): S83-90.
- Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, et al. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study[J]. *Spine J*, 2008, 8(3): 457-465.
- Li XL, Liu YB, Ma EG, et al. Synergistic effect of BMP9 and TGF-β in the proliferation and differentiation of osteoblasts[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 7605-7615.
- Lories RJ, Daans M, Matthys P, et al. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(6): 1736-1746.

(收稿日期:2015-08-08 修回日期:2015-10-16)