

脂肪间充质干细胞中Noggin下调能够促进GDF5的表达

刘浩¹, 陆征峰¹, 杨凯¹, 张圣智¹, 汤峰林², 陆森², 丁涛^{2*}

¹无锡市第九人民医院骨科, 江苏 无锡 214000; ²南京医科大学附属无锡人民医院骨科, 江苏 无锡 214000

[摘要] 目的:通过抑制细胞中Noggin的表达,观察其对大鼠脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)中生长分化因子5(growth differentiation factor 5, GDF-5)表达量的影响,探究两者之间的关系。方法:构建GDF5慢病毒过表达载体(Lv-GDF5)及Noggin干扰载体(Lv-Noggin shRNA),根据目的基因的不同,将实验分成4组,分别使用重组慢病毒转染大鼠ADSCs: A组为Lv-EGFP转染ADSCs(空载体病毒转染组);B组为Lv-Noggin shRNA转染ADSCs;C组为Lv-GDF5转染ADSCs;D组为Lv-GDF5+Lv-Noggin shRNA共转染ADSCs。通过实时定量PCR技术和Western blot技术检测转染后14 d GDF5和Noggin的表达量,进行对比分析。并检测软骨基质二型胶原(collagen II, Col-II)mRNA的表达,进行组间比较。结果:实时定量PCR结果显示:转染后14 d, A、B、C、D组GDF5 mRNA表达量呈递增趋势,两两之间比较,除B组与C组之间差异无统计学意义外,其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);各组间Noggin mRNA表达量比较, A组>C组>B组>D组,两两比较,除A组与C组间差异无统计学意义外,其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);Col-II mRNA表达量呈递增趋势,两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot结果显示:转染后14 d, A、B、C、D组GDF5蛋白表达量呈递增趋势,两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);各组间Noggin蛋白表达量比较, A组>C组>B组>D组,两两比较, A组与C组、C组与B组间差异无统计学意义,其余组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:抑制大鼠ADSCs Noggin的表达, GDF5表达量相应增加,两者呈负相关关系。

[关键词] Noggin;脂肪干细胞;生长分化因子5

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)09-1181-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180902

GDF5 expression increased in adipose-derived stem cells by down-regulating Noggin expression

Liu Hao¹, Lu Zhengfeng¹, Yang Kai¹, Zhang Shengzhi¹, Tang Fenglin², Lu Miao², Ding Tao^{2*}

¹Department of Orthopedics, the Ninth People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214000; ²Department of Orthopedics, the Affiliated Wuxi People's Hospital of NMU, Wuxi 214000, China

[Abstract] **Objective:** To explore the influence on expression of growth differentiation factor 5(GDF-5) in adipose-derived stem cells (ADSCs) by inhibiting the expression of Noggin. **Methods:** The recombinant lentivirus vectors of GDF5 gene (Lv-GDF5) and lentivirus vectors carrying Noggin RNAi sequence (Lv-Noggin shRNA) were constructed. ADSCs were divided into four groups: ADSCs in group A were transfected by empty lentivirus (with enhanced green fluorescent protein, Lv-EGFP); ADSCs in group B were transfected by Lv-Noggin shRNA; ADSCs in group C were transfected by Lv-GDF5; ADSCs in group D were co-transfected by Lv-GDF5 and Lv-Noggin shRNA. Then, the expression of GDF5 and Noggin in ADSCs was determined by real-time PCR and Western blot 14 days after transfection. The capacity of cartilage differentiation was detected through collagen type II (Col-II) by RT-PCR. Finally, the expression quantity was contrastly analyzed. **Results:** RT-PCR showed that the expression of GDF5 mRNA and protein increased gradually 14 d after transfection from group A to group D. In comparison between each two groups, except the difference between group B and group C was not statistically significant, differences between the other groups were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of Noggin mRNA and protein increased gradually in group D, B, C and A. In comparison between each two groups, except the difference between group A and group C was not statistically significant, the differences between the other groups were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of Col-II mRNA increased gradually from group A to group D. In comparison between each two groups, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that the expression of GDF5 protein increased gradually from group A to group D 14 d after transfection. In comparison between each two groups, the difference was statistically significant ($P <$

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(2016NJMUZD069)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: drdingtao@163.com

0.05). The expression of Noggin protein decreased gradually in group A, C, B and D. In comparison between each two groups, the differences between group A and group C, as well as group C and group B were not statistically significant, while the differences between the other groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of GDF5 in ADSCs increased by inhibiting the expression of Noggin. A negative correlation between GDF5 and Noggin expression quantity was found.

[Key words] Noggin; adipose-derived stem cells; growth differentiation factor 5

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(09): 1181-1186, 1225]

骨关节炎(osteoarthritis, OA)严重影响中老年人的身体健康和日常生活,其致病机制为软骨细胞的合成与分解代谢紊乱,引起关节软骨渐进性破坏^[1]。所以软骨修复成为治疗OA最重要的方法之一^[2]。

以前临床上治疗软骨缺损多应用软骨细胞移植,但往往因为自身软骨细胞来源有限、异体软骨细胞排斥反应、对供区造成伤害等缺陷而受到限制^[3]。近年来,组织工程学和基因治疗学的发展,为软骨修复带来革命性的希望^[2,4-6]。

体外实验证明,生长分化因子5(growth differentiation factors, GDF5)能够促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向软骨细胞分化,其修饰的成软骨分化受到GDF5的胞外抑制剂Noggin调节^[7-8]。因此只要控制好合适比例的Noggin及GDF5表达,就可以更高效地达到修复软骨、治疗OA的目的。然而目前Noggin及GDF5在软骨形成过程中的相对表达量如何,两者表达量之间存在怎样的关系一直都不清楚。如果两者在体内的表达存在一定联系,就可以通过外源性添加或者减少Noggin,从而间接改变GDF5的表达量,使两者比例达到最佳,从而进一步促进软骨修复和关节形成。基于这个设想,本研究通过组织工程学联合基因治疗学来探究两者之间的变化规律,以期能为软骨修复提供新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

健康成年雄性SD大鼠3只,体重250~300 g,由无锡市人民医院实验动物中心提供。I型胶原酶(Sigma公司,美国);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(HyClone公司,美国); β -甘油磷酸钠、PCR引物(Invitrogen公司,美国);TRIzol、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo公司,美国);SYBR Green PCR Master Mix(江苏同科医药公司);慢病毒表达质粒(北京英茂盛业生物科技有限公

司);GDF-5(A-10)单克隆抗体、Noggin多克隆抗体、 β -actin(Santa Cruz公司,美国)。293FT细胞株由无锡市人民医院实验室冻存。PVDF膜(Millipore公司,美国);ECL发光液(Thermo公司,美国);酶标二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);CO₂培养箱、低温高速离心机(Thermo公司,美国);超净工作台(苏州净化设备工程公司);倒置荧光显微镜(Olympus公司,日本);ABI7500实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)的分离、传代培养

将SD大鼠拉颈处死后,在超净工作台中分离腹腔脂肪组织,用PBS清洗组织3次,并切除肉眼可见的小血管和筋膜。将漂洗、修剪干净的组织剪成1 mm³左右小块。将组织块转移至5 mL离心管中,加入5倍体积的0.1% I型胶原酶溶液,密封离心管。将离心管放入37℃恒温振荡箱中,振荡消化60~90 min,至绝大部分组织消化。用含10%FBS的DMEM等体积中和,1 500 r/min离心10 min后弃去上清。160 mmol/L NH₄Cl裂解红细胞10 min,离心弃去上清。含10%FBS的DMEM重悬细胞,细胞计数,按 2×10^5 个/mL的密度接种于35 cm²的培养瓶内,置于37℃恒温、5% CO₂的饱和湿度培养箱中培养。培养48 h后首次换液,去除未贴壁细胞,以PBS冲洗3次,之后每2~3 d换液1次,约5~7 d左右细胞生长融合至80%~90%时,进行传代培养。

将细胞培养瓶内细胞培养上清用吸管小心吸出,加入1 mL消化液(0.05%胰蛋白酶+0.01% EDTA),置于37℃培养箱中10 min。于显微镜下观察消化的细胞,当细胞变圆,细胞间连接断开时倾去消化液,加入HG-DMEM(含15%FBS)培养基,并吹打分散细胞,基本保证细胞成单个。用细胞计数板计数后,以 5×10^5 个/mL的密度接种于25 mL的培养瓶中,标记为P1,以后视细胞生长情况及时传代,

分别标记为P2、P3。每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。第3代细胞用于基因转染。

1.2.2 大鼠GDF5过表达载体的构建

收集大鼠ADSCs细胞,抽提RNA,采用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行RT-PCR得到cDNA,以此为模板PCR扩增得到GDF5产物,引物序列为:上游5'-ATGAGACTCCCCAACTCCT-3',下游5'-CTACCTACAGC-CACAAGATTC-3'。GDF5产物片段1488 bp,通过Xba I/EcoR I酶切将GDF5克隆入过表达载体pLV-EGFP-Puro。挑选过表达载体的8个克隆,进行酶切鉴定。

1.2.3 大鼠Noggin shRNA干扰载体构建

针对目的基因Noggin,设计1对shRNA寡核苷酸序列:上游5'-CCGGGAGATCAAAGGGCTGGAG-TTCCTCGAGGAAGTCCAGCCCTTTGATCTCTTTTTG-3';下游5'-AATTCAAAAAGAGATCAAAGGGCTGG-AGTTCCTCGAGGAAGTCCAGCCCTTTGATCTC-3'。shRNA经过退火变为双链,PLKO.1质粒Age I/EcoR I双酶切后将shRNA插入PLKO.1。连接转化后进行测序鉴定。

1.2.4 病毒包装

使用Lipofectamine 2000转染试剂将慢病毒包装辅助质粒PLP1、PLP2、PLP-VSVG混合物与构建的目的质粒共转染至状态良好、处于对数生长期的293FT细胞。转染后1 d更换培养液,转染后48 h收集培养上清进行浓缩。转染后72 h观察转染效率,再次收集培养上清。将上清以3000 r/min离心15 min后,用0.45 μm滤器过滤以去除细胞碎片。由此包装出携带GDF5、Noggin shRNA的重组慢病毒(Lv-GDF5、Lv-Noggin shRNA),分装于-80℃冰箱冻存备用。Lv-EGFP已有备用冻存。

1.2.5 病毒感染及实验分组

实验分为4组,分别为A组(Lv-EGFP对照组)、B组(Lv-Noggin shRNA组)、C组(Lv-GDF5组)、D组(Lv-GDF5+Lv-Noggin shRNA组)。具体方法如下:将状态良好的P3代ADSCs细胞铺6孔板,3×10⁵个/孔,37℃培养过夜;病毒稀释:感染前,从冰箱取出病毒并在冰上缓慢融化,用含终浓度为5 μg/mL polybrene的新鲜培养基准确稀释慢病毒原液;吸去细胞原有培养基,加入1/2体积已稀释慢病毒液,轻轻8字混匀。37℃孵育培养4~6 h后更换新鲜培养液。更换培养液48~72 h,观察荧光表达情况及细胞生长情况并及时换液。以保证细胞良好的生长状态。

1.2.6 实时荧光定量PCR(Real time PCR)检测

各组于转染后14 d收集细胞,抽提RNA,反转录为cDNA,根据检测基因的不同,使用Primer Premier 5.0软件设计相应引物,GDF5基因引物序列:r-GDF5上游5'-TGTCCGATGCTGACAGAAAG-3',r-GDF5下游5'-TCCTTCTCCAAGGCACTGAT-3';r-Noggin上游5'-CCGAGCGAGATCAAAGGG-3',r-Noggin下游5'-TACAGCACCGGGCAGAAGG-3';r-Col II上游5'-AGGGGTACCAGGTTCTCCATC-3',r-Col II下游5'-CTGCTCATCGCCGCGGTCCTA-3'。内参引物序列:r-GAPDH上游5'-TTC AACGGC A CAGTCAAG-3',r-GAPDH下游5'-TGGTCA-CACCCATCACA-3'。

PCR反应体系如下:SYBR Green Master mix (2×)10 μL,引物(10 μmol/L)1 μL,模板(cDNA)1 μL,最后ddH₂O补足至总体积200 μL。混匀后,上机。反应程序为:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火复性30 s,72℃延伸30 s,40个循环。计算各样品C_t值,用相对定量法检测目的基因的表达变化,按照2^{-ΔΔC_t}法对数据进行分析处理。

1.2.7 Western blot检测

用RIPA裂解液冰上裂解细胞30 min,12000 r/min 4℃离心10 min后取上清。加适量上样缓冲液,沸水中煮5 min制备好蛋白样品。经12%SDS-PAGE 100 V恒压电泳,250 mA恒流湿转膜90 min,将蛋白转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉溶液封闭1 h后分别加GDF-5(1:500)、Noggin(1:500)或β-actin(1:5000)抗体,4℃孵育过夜;TBST洗3次,加上辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000),室温下孵育1 h,TBST洗4次后进行ECL显色发光。X线胶片用Image J软件进行分析,以灰度值的比值作相对量分析。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检验;检验水准α=0.05。

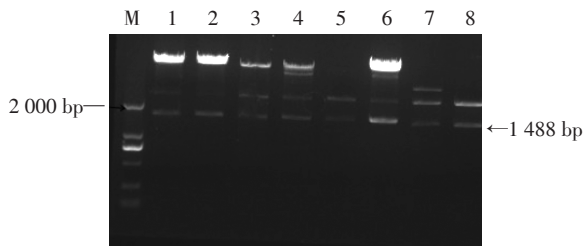
2 结果

2.1 大鼠GDF5过表达载体的构建

鉴定图谱如图1所示,结果显示1、2、3、4、6均成功插入目的片段GDF5,后续实验选用pLV-EGFP-Puro-GDF5-6。

2.2 大鼠Noggin shRNA干扰载体的构建

通过序列比对,确认序列与GenBank中的序列完全一致,干扰载体构建成功(图2)。



1、2、3、4、6: 阳性克隆;5、7、8: 阴性克隆;M: Marker。

图1 8个过表达载体克隆的酶切鉴定图谱

Figure 1 Enzyme identification of 8 overexpression vector clones

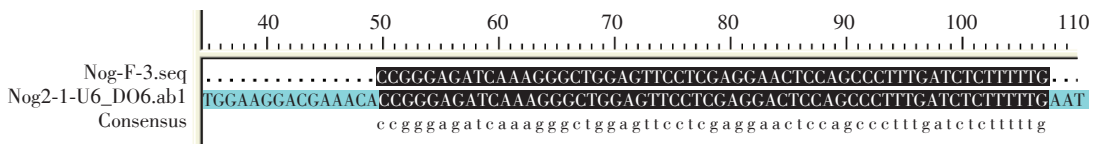
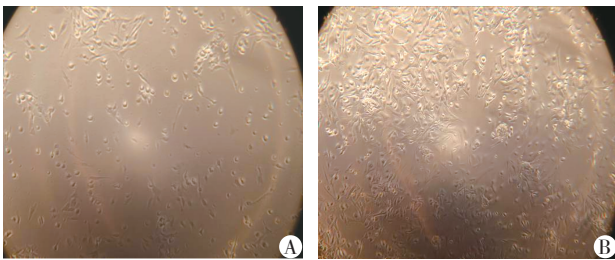


图2 Noggin shRNA 测序结果

Figure 2 Sequencing result of Noggin shRNA



A: 原代 ADSCs; B: P3 代 ADSCs。

图3 倒置相差显微镜观察 ADSCs 的生长情况(×100)

Figure 3 Growth of ADSCs observed under inverted phase contrast microscope(×100)

2.3 大鼠 ADSCs 细胞形态学观察

原代培养的 ADSCs 24 h 左右即可观察到细胞开始贴壁,呈梭形、圆形或椭圆形。传代细胞 2 h 即可贴壁、生长迅速,多数为类成纤维细胞,圆形细胞逐渐减少。观察至第 3 代时,发现细胞形态特征无明显变化(图 3)。

2.4 转染效率观察

转染后 72 h 荧光倒置显微镜观察示,各组 ADSCs 荧光阳性细胞比率均高达 90% 以上;倒置相差显微镜观察示各组细胞生长状态均良好。说明重组慢病

毒转染效率高,外源基因可有效表达(图 4)。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测

转染后 14 d, A、B、C、D 组 GDF5 mRNA 表达量呈递增趋势,两两之间比较,除 B 组与 C 组之间无统计学差异外,其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 1, 图 5A); 各组间 Noggin mRNA 表达量比较, A 组 > C 组 > B 组 > D 组, 两两比较, 除 A 组与 C 组间无统计学差异外, 其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 1, 图 5A)。Col- II mRNA 表达量在组间呈递增趋势, 两两比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 1, 图 5B)。

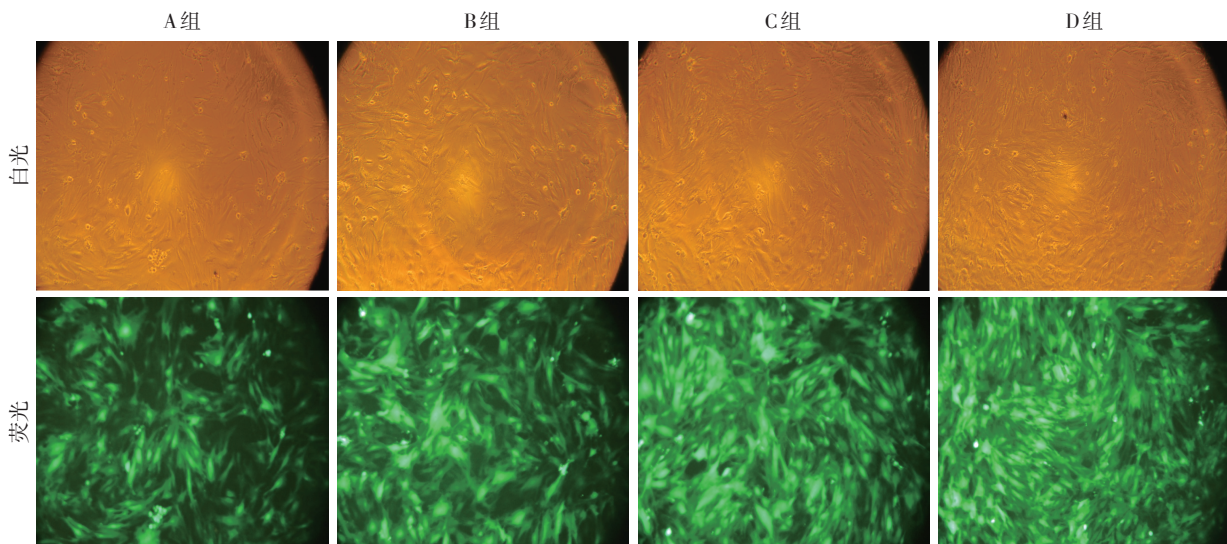


图4 转染后 72 h 各组 ADSCs 形态观察及荧光表达情况(×100)

Figure 4 Cell morphology and fluorescent expression of ADSCs 72 h after transfection(×100)

表1 实时定量PCR检测各组细胞GDF5、Noggin、Col-II mRNA相对表达量

Table 1 Expression quantity of GDF5, Noggin and Col-II mRNA in each group detected by real-time PCR

指标	A组	B组	C组	D组	F值	P值
GDF5	1.00 ± 0.23	2.12 ± 0.07	2.35 ± 0.08	5.02 ± 0.27	255.16	<0.05
Noggin	1.00 ± 0.07	0.49 ± 0.03	0.94 ± 0.04	0.33 ± 0.04	160.10	<0.05
Col-II	1.00 ± 0.18	1.65 ± 0.33	3.70 ± 0.19	4.50 ± 0.33	152.74	<0.05

*: Fisher 四格表确切概率法P值。

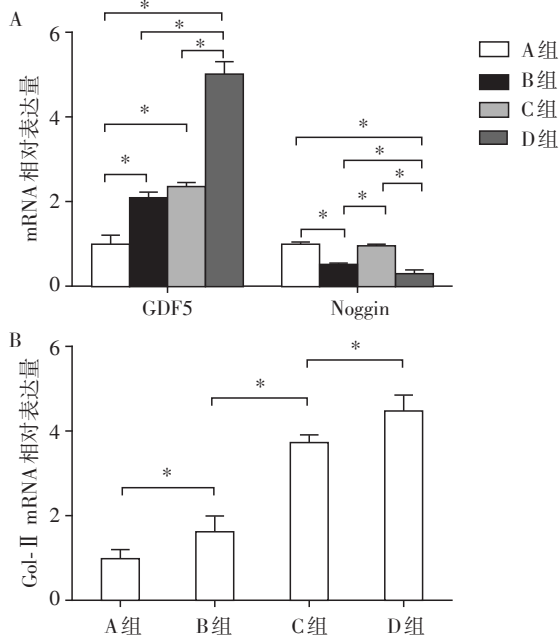


图5 实时定量PCR检测各组细胞GDF5、Noggin和Col-II mRNA相对表达量。A:实时定量PCR检测各组细胞GDF5及Noggin mRNA相对表达量;B:实时定量PCR检测各组细胞Col-II mRNA相对表达量。两组比较,*P < 0.05。

Figure 5 Expression of GDF5, Noggin and Col-II mRNA in each group detected by real-time PCR

2.6 Western blot检测

转染后14 d, A、B、C、D组GDF5蛋白表达量呈递增趋势,两两之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图6A,表2);各组间Noggin蛋白表达量比较,A组>C组>B组>D组,两两比较,A组与C组间、C组与B组间差异无统计学意义,其余组间差异均有统计学意义($P < 0.05$,图6B、表2)。

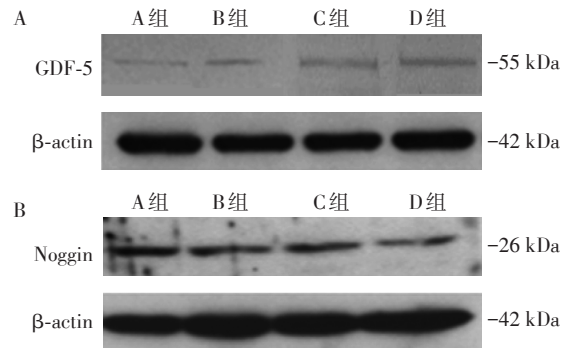


图6 Western blot检测各组细胞GDF5和Noggin蛋白表达情况。A: Western blot检测各组细胞GDF5蛋白表达情况;B: Western blot检测各组细胞Noggin蛋白表达情况。

Figure 6 Expression of GDF5 and Noggin protein in each group by Western blot

3 讨论

OA是临床上一种十分常见的中老年疾病,其临床特点主要为关节软骨进行性破坏、软骨下骨硬化及骨赘形成,关节软骨磨损会破坏关节平衡,从而引起严重的关节功能障碍^[9]。

关节软骨无血管、神经支配及淋巴液供应,对创伤、炎症的反应主要由软骨细胞和滑膜分泌的细胞因子所介导^[10]。关节软骨自行修复的能力相当有限,促进其再生的诸多方法(如自体软骨细胞移植等)均无法取得令人满意的效果,故关节软骨损伤的修复一直都是困扰骨科临床医生的一大难题。研究表明,关节软骨损伤修复过程主要是通过各种因子诱导MSCs分化形成软骨细胞^[11]。其中GDF5是最重要的细胞因子之一^[12],在软骨形成早期和关节

表2 Western blot检测各组细胞GDF5及Noggin蛋白相对表达量

Table 2 Expression quantity of GDF5 and Noggin protein in each group by Western blot

指标	A组	B组	C组	D组	F值	P值
GDF5	25.42 ± 0.66	32.47 ± 1.36	38.44 ± 1.46	54.54 ± 0.46	401.08	<0.05
Noggin	63.56 ± 0.45	61.70 ± 0.79	62.55 ± 0.93	51.90 ± 0.03	207.74	<0.05

发育过程中发挥了关键调控作用,它通过促进软骨细胞增殖,从而进一步促进软骨发育和成熟^[13],这为关节软骨的修复提供了一个新途径。

GDF5 是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族的新成员,在软骨形成和关节腔形成中具有显著作用^[14-16]。研究显示,GDF5 在软骨发育初期能促进 MSCs 聚集和软骨方向分化,在软骨发育后期能显著刺激软骨细胞增殖。GDF5 促进软骨细胞分化的作用已达成共识,但是有研究发现,GDF5 调控的成软骨分化还受其细胞外拮抗剂 Noggin 所调节,两者相互作用,保持平衡^[17]。只有两者维持适当比例,才能有效促进机体关节发育。

Noggin 是机体骨骼系统发育的重要调控基因。Noggin 突变可引起软骨过多和关节形成障碍。Noggin 突变造成的关节发育缺陷与其对 GDF5 的拮抗作用有关,当 Noggin 蛋白缺乏时,关节形成部位无法拮抗 GDF5 的生物活性,从而影响关节发育^[18]。因此,正常关节形成需要适当比例的 GDF5 及 Noggin,一旦两者失衡则会引起关节发育缺陷。

为了探究 GDF5 和 Noggin 在关节发育过程中的关系,本研究通过分别构建慢病毒过表达载体 Lv-GDF5 及干扰载体 Lv-Noggin shRNA,将重组慢病毒分成 4 组转染大鼠 ADSCs,通过实时定量 PCR 和 Western blot 技术检测各组转染后细胞 GDF5 和 Noggin 的相对表达量。结果显示,A、B、C、D 各组的 GDF5 表达量呈现递增趋势,A、B 组之间比较,C、D 组之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明当抑制了细胞 Noggin 表达后,可以反馈性地引起 GDF5 表达增强。而且即使在 GDF5 高表达的情况下,两者协同作用依然存在,下调 Noggin 仍然可以起到上调 GDF5 的效果。另外通过实时定量 PCR 检测发现,软骨细胞外基质的重要成分 Col- II 在各组间表达呈现递增趋势,与 GDF5 的表达趋势一致。这一结果说明随着 ADSCs 表达 GDF5 的增加,其向软骨细胞分化的效率越高,软骨生成能力越强。各组间 Noggin 表达量相比较,B 组显著高于 D 组,说明当细胞中 GDF5 表达增加后,可引起 Noggin 表达量的下降。因此可以认为,GDF5 和 Noggin 的表达量在一定范围内呈负相关。利用这个关系,就可以通过体外干扰或增强 Noggin 的表达来调控体内 GDF5 的表达,使两者比例达到最佳,从而更高效地促进关节软骨修复。

根据本研究结果,理论上可以通过取长补短、双管齐下的方法,在上调 GDF5 的同时下调 Noggin,

以此大大提高软骨分化的速度及程度,并且可以缩短基因转染的时间并减少所需生长因子的剂量。但是 GDF5 与 Noggin 相互作用,促进软骨修复这类研究目前仍仅限于实验室,离临床应用还有很长一段距离。生物因子和体内环境的相互作用还需要进一步研究,以便利用控释技术使细胞因子在最佳时间以最佳剂量作用于软骨损伤的修复过程。因此,临床上使用基因工程和组织工程治疗关节退行性疾病仍面临着巨大挑战,任重而道远。

[参考文献]

- [1] 朱辰蕾,惠宇坚,张翔海,等. 烟碱对膝骨关节炎模型大鼠的保护作用及机制研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2014,34(2):129-134
- [2] 丁 朋,桂鉴超,徐 扬,等. uCTX-II 在早期骨关节炎诊断及治疗评估中的应用价值研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(8):1131-1135
- [3] Oussedik S, Tsitskaris K, Parker D. Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review [J]. Arthroscopy, 2015, 31(4):732-744
- [4] Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, et al. Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2015, 10(2):121-131
- [5] Gugjoo MB, Amarpal, Sharma GT, et al. Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds [J]. Indian J Med Res, 2016, 144(3):339-347
- [6] 庄 超,王黎明,徐 燕,等. 骨髓间充质干细胞治疗早期骨性关节炎的实验研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2008,28(12):1578-1583
- [7] Schwaerzer GK, Hiepen C, Schrewe H, et al. New insights into the molecular mechanism of multiple synostoses syndrome (SYNS): mutation within the GDF5 knuckle epitope causes noggin - resistance [J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(2):429-442
- [8] Degenkolbe E, Schwarz C, Ott CE, et al. Improved bone defect healing by a superagonistic GDF5 variant derived from a patient with multiple synostoses syndrome [J]. Bone, 2015, 73(19):111-119
- [9] Stubbs B, Hurley M, Smith T. What are the factors that influence physical activity participation in adults with knee and hip osteoarthritis? A systematic review of physical activity correlates[J]. Clin Rehabil, 2015, 29(1):80-94
- [10] 李建柱,李宽新,郭二鹏,等. β -catenin 在 SD 大鼠骨关节炎滑膜组织中的表达及意义[J]. 南京医科大学学报

(下转第 1225 页)

- World J Cardiol,2015,7(12):843-860
- [7] Vegter EL, Van Der Meer P, De Windt LJ, et al. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy [J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(5): 457-468
- [8] Busch A, Eken SM, Maegdefessel L. Prospective and therapeutic screening value of non-coding RNA as biomarkers in cardiovascular disease [J]. Ann Transl Med, 2016, 4(12): 236
- [9] Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, et al. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy [J]. Circulation, 2002, 105(4): 431-437
- [10] Beqqali A, Bollen IA, Rasmussen TB, et al. A mutation in the glutamate-rich region of RNA-binding motif protein 20 causes dilated cardiomyopathy through missplicing of titin and impaired Frank-Starling mechanism [J]. Cardiovasc Res, 2016, 112(1): 452-463
- [11] Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease [J]. Physiol Genomics, 2007, 31(3): 367-373
- [12] Sucharov C, Bristow MR, Port JD. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(2): 185-192
- [13] Zhu HT, Hasan AM, Liu RB, et al. Serum microRNA profiles as prognostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45637-45648
- [14] Sisic L, Vallboehmer D, Stoecklein NH, et al. Serum microRNA profiles as prognostic or predictive markers in the multimodality treatment of patients with gastric cancer [J]. Oncol Lett, 2015, 10(2): 869-874
- [15] Molasy M, Walczak A, Szaflik J, et al. MicroRNAs in glaucoma and neurodegenerative diseases [J]. J Hum Genet, 2017, 62(1): 105-112
- [16] Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, et al. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(6): 614-619
- [17] Stauffer BL, Russell G, Nunley K, et al. miRNA expression in pediatric failing human heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 57(4): 43-46
- [18] Leptidis S, El Azzouzi H, Lok SI, et al. A deep sequencing approach to uncover the miRNOME in the human heart [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57800
- [19] Marques FZ, Vizi D, Khammy O, et al. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart [J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(8): 1000-1008
- [20] Murach KA, Micromnas MJ. Heart failure and aging: potential interactions with skeletal muscle [J]. Heart Fail Rev, 2017, 22(2): 209-218
- [21] Pilbrow AP, Cordeddu L, Cameron VA, et al. Circulating miR-323-3p and miR-652: candidate markers for the presence and progression of acute coronary syndromes [J]. Int J Cardiol, 2014, 176(2): 375-385
- [收稿日期] 2017-04-20

(上接第1186页)

- (自然科学版), 2015, 35(2): 155-159
- [11] Caldwell KL, Wang J. Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration [J]. Osteoarthritis Cartil, 2015, 23(3): 351-362
- [12] Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, et al. TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells [J]. Stem Cells, 2015, 33(3): 762-773
- [13] Shtafif B, Dror N, Bar-Maisels M, et al. Growth without growth hormone: can growth and differentiation factor 5 be the mediator? [J]. Growth Factors, 2015, 33(4): 309-318
- [14] Han C, Ren Y, Jia Y, et al. The effective mode of growth and differentiation factor-5 in promoting the chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells [J]. Cell Tissue Bank, 2016, 17(1): 105-115
- [15] Liu J, Saito K, Maruya Y, et al. Mutant GDF5 enhances ameloblast differentiation via accelerated BMP2-induced Smad1/5/8 phosphorylation [J]. Sci Rep, 2016, 6(6): 23670
- [16] Wu G, Cui Y, Wang YT, et al. Repair of cartilage defects in BMSCs via CDMP1 gene transfection [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(1): 291-301
- [17] Uyguner ZO, Kocaoğlu M, Toksoy G, et al. Novel indel mutation in the GDF5 gene is associated with brachydactyly type C in a four-generation Turkish family [J]. Mol Syndromol, 2014, 5(2): 81-86
- [18] Stafford DA, Monica SD, Harland RM. Follistatin interacts with Noggin in the development of the axial skeleton [J]. Mech Dev, 2014, 131(10): 78-85
- [收稿日期] 2017-06-11