DOI:10.16016/j.1000-5404.201602089

骨形态发生蛋白9激活PI3K/Akt信号通路抑制退变髓核细胞的炎症反应和凋亡

鲁 花,于 露,甄欢欢,刘汝银,岳宗进 (450002 郑州,河南省中医院脊柱科)

[摘要] **目的** 研究骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9,BMP9)对退变髓核细胞炎症反应和凋亡的影响,并探究其与PI3K/Akt信号通路的关系。**方法** 通过氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation,OGD)培养建立退变髓核细胞模型;重组腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)将BMP9转染入人髓核细胞内(human nucleus pulposus cells,HNPCs),实验共分5组:Control组(正常培养的HNPCs)、OGD组(氧糖剥夺模型)、AAV组(氧糖剥夺模型,转染AAV空载体)、AAV-BMP9组(氧糖剥夺模型,转染AAV-BMP9),AAV-BMP9 + LY294002组(AAV-BMP9组基础上添加PI3K抑制剂LY294002)。免疫荧光方法检测蛋白聚糖(Aggrecan)和Ⅱ型胶原(type Ⅱ collagen,Col2a1)的表达;Western blot检测p-Akt和p-mTOR的蛋白表达;酶联免疫吸附实验检测细胞培养上清液中TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-8的表达;流式细胞术检测细胞的凋亡。**结果** 在氧糖剥夺培养模型中Aggrecan和Col2a1表达明显降低;AAV-BMP9组中p-Akt和p-mTOR的表达明显高于OGD组和AAV组($P<0.05$);此外,AAV-BMP9组HNPCs分泌的TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-8明显减少,细胞凋亡被显著抑制($P<0.05$);LY294002的加入能够显著逆转BMP9的上述效果。**结论** BMP9能够抑制退变HNPCs的炎症反应和凋亡,并且这种作用是通过激活PI3K/Akt信号通路实现的。

[关键词] 骨形态发生蛋白9;炎症反应;细胞凋亡;髓核细胞
[中图法分类号] R341;R363.22;R681.53 [文献标志码] A

BMP9 inhibits inflammatory response and apoptosis of degenerative nucleus pulposus cells through activating PI3K/Akt signaling pathway

Lu Hua, Yu Lu, Zhen Huanhuan, Liu Ruyin, Yue Zongjin (Department of Spinal Surgery, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan Prouince, 450002, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) on inflammatory response and apoptosis of degenerative nucleus pulposus cells and to mechanistically explore its association with PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** The degenerative nucleus pulposus cells were generated by oxygen glucose deprivation (OGD) method. BMP9 gene was transinduced into human nucleus pulposus cells (HNPCs) by recombinant adeno-associated virus (AAV) mediated gene transfer. According to the transfection and treatment, HNPCs were divided into 5 groups: Control group (cultured HNPCs without treatment), OGD group (OGD model), AAV group (OGD + AAV empty vector), AAV-BMP9 group (OGD + AAV-BMP9), and AAV-BMP9 + LY294002 group (OGD + AAV-BMP9 + PI3K inhibitor LY294002). Immunofluorescence staining was used to detect Aggrecan and type Ⅱ collagen (Col2a1). Western blot were performed to detect the protein expression of p-Akt and p-mTOR. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out to measure the levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-8 in the supernatant of medium. Flow cytometry was performed to detect cell apoptosis. **Results** The expression of Aggrecan and Col2a1 was significantly decreased in OGD model. The protein expression of p-Akt and p-mTOR was higher in AAV-BMP9 group than those in OGD and AAV groups ($P<0.05$). In addition, the levels of TNF-α, IL-1β,

[通信作者] 刘汝银,E-mail:s_yanbing@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160516.1351.011.html(2016-05-16)

IL-6 and IL-8 were significantly decreased ($P<0.05$) and cell apoptosis was markedly reduced in HNPCs of AAV-BMP9 group. But, LY294002 treatment significantly reversed the above-mentioned effects induced by BMP9 overexpression in degenerative HNPCs. **Conclusion** BMP9 inhibits the inflammatory response and apoptosis of degenerative HNPCs through activating PI3K/Akt signaling pathway.

[**Key words**] bone morphogenetic protein 9; inflammatory response; cell apoptosis; nucleus pulposus cells

Corresponding author: Liu Ruyin, E-mail: s_yanbing@126.com

椎间盘突出症是椎间盘退行性疾病之一,伴随着髓核功能的失调和髓核细胞的退变,具有发病率高,患者逐渐年轻化的特点[1]。髓核细胞是髓核的主要组成细胞,属于类软骨细胞,可以分泌蛋白聚糖(aggrecan)和Ⅱ型胶原(type Ⅱ collagen,Col2a1)合成细胞外基质,进而维持髓核的稳态。在体内外多种因素的刺激下,髓核中蛋白聚糖解聚增多,Ⅱ型胶原变性及细胞外基质降解[2]。同时,由于炎症因子的增多,髓核细胞生物功能发生不可逆转的改变,导致椎间盘退行性疾病的发生[3]。髓核细胞凋亡也是椎间盘退行性疾病发生的重要机制。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)属于转化生长因子β超家族的成员,具有诱导成骨分化的生物学效应[4]。有学者证实BMPs能够显著促进髓核细胞的胞外基质合成[5]。体外研究表明,BMP7可显著抑制髓核细胞的凋亡[6]。张健等[7]的研究也证实,BMP7能够促进小鼠髓核细胞的成骨分化,并与Notch信号通路密切相关。然而,对于BMP9在髓核细胞中的作用却少见相关报道。另一方面,研究表明IL-1β和IL-6等炎症因子参与调节多种成骨分化相关信号通路[8-9]。因此,本研究借助重组腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)将BMP9转染入人髓核细胞内,探究BMP9对退变髓核细胞炎症和凋亡的作用,并进一步研究了相关机制,为椎间盘突出症的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

DMEM培养液、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国HyClone公司;Aggrecan和Col2a1抗体及对应荧光二抗购自美国Invitrogen公司;AAV及AAV-BMP9由上海吉玛合成和提供;LY294002和RIPA蛋白裂解液购自美国Sigma公司;人髓核细胞(human nucleus pulposus cells, HNPCs)购自美国ScienCell公司;ELISA试剂盒购自上海联硕生物科技有限公司;总RNA抽提试剂盒、M-MLV逆转录酶和SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ购自大连宝生物工程有限公司;ECL发光试剂盒购自美国Amersham公司;流式细胞术凋亡检测试剂盒购自美国BD Biosciences公司;GAPDH、BMP9、Akt、p-Akt、mTOR和p-mTOR抗体及对应二抗均购自美国Invitrogen公司;引物合成由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 细胞培养和退变模型建立

HNPCs培养在添加10%的胎牛血清的DMEM培养液中,于37 ℃含有5% CO_2的培养箱中连续培养。待细胞生长融合至约占培养皿底面积80%,用胰蛋白酶消化后按照1∶3的比例进行传代培养。为了建立退变HNPCs模型,将HNPCs培养液更换为无血清的无糖DMEM培养液,在1% O_2/94% N2/5% CO_2气体组分中培养12 h,模拟体内椎间盘退变微环境。根据实验分组,LY294002以30 μmol/L的浓度添加到培养液中用来抑制PI3K/Akt信号通路。

1.3 细胞转染及分组

取对数生长期的HNPCs接种于6孔培养板(2×10^5个细胞/孔),待细胞融合至80%,每孔加入病毒原液1.5 mL。24 h后,去除病毒工作液,加入含10% FBS的DMEM培养液继续培养48 h,检测细胞中BMP9的表达水平以验证转染效果。实验分为5组:Control组(正常培养的HNPCs)、OGD组(HNPCs进行氧糖剥夺处理)、AAV组(转染空载体病毒后进行氧糖剥夺处理)、AAV-BMP9组(转染AAV-BMP9后进行氧糖剥夺处理)、AAV-BMP9 + LY294002组(AAV-BMP9组基础上添加PI3K抑制剂LY294002)。

1.4 免疫荧光

取对数生长期的HNPCs接种于2.5 cm的免疫荧光培养皿中(1×10^3个细胞/皿),根据实验分组决定是否转染BMP9,转染步骤如上。随后用4%的多聚甲醛在冰上固定过夜,去除多聚甲醛并清洗后分别加入Aggrecan(1∶1 000)和Col2a1(1∶1 500)抗体在4 ℃条件下孵育过夜。去除一抗后紧接着在室温下用对应的荧光二抗(1∶4 000)孵育30 min,随后用激光共聚焦显微镜(奥林巴斯FV1000显微镜)观察并照相。

1.5 实时定量PCR

采用总RNA抽提试剂盒提取各组细胞的总RNA,随后用M-MLV逆转录酶合成cDNA。实时定量

PCR 反应体系(20 μL):SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ混合液 12 μL,cDNA 模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,灭菌蒸馏水 4 μL。反应条件:94 ℃,10 min;40 个循环(95 ℃,30 s;60 ℃,35 s;72 ℃,50 s);72 ℃,延伸 10 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参基因,根据 2-ΔΔCt 计算方法计算基因相对表达水平(表 1)。

表 1 实时定量 PCR 引物

基因	引物序列	产物大小(bp)
BMP9	上游:5′-GGACCCGATGCGGTTAGAG-3′	168
	下游:5′-ATCAAGTGGATGCCCCACAG-3′	
GAPDH	上游:5′-GAATGGGCAGCCGTTAGGAA-3′	137
	下游:5′-AGGAAAAGCATCACCCGGAG-3′	

1.6 Western blot

去除培养液,每孔中加入 2 mL RIPA 裂解液,放置在冰上并不断震荡 10 min,随后用细胞刮收集细胞裂解液,反复吹打后用 Bradford 法检测蛋白的浓度。选取 10 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE(浓缩胶 60 V,分离胶 120 V)后,电转到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,在 4 ℃条件下分别与 BMP9 (1∶1 000)、Akt (1∶1 000)、p-Akt (1∶800)、mTOR (1∶1 000)和 p-mTOR (1∶600)抗体孵育过夜,随后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶3 000)在室温下孵育 2 h,用 ECL 发光系统检测目的条带。蛋白条带用 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度分析,并以 GAPDH 作为内参蛋白,计算蛋白的相对表达量。

1.7 酶联免疫吸附实验

收集细胞培养液,离心后收取上清液,按 1∶100 稀释后加入酶标反应孔中,在 37 ℃条件下孵育 1 h,随后用洗涤液洗涤 3 遍,每次 3 min。每孔加入 100 μL 酶标抗体,再次在 37 ℃条件下孵育 1 h,每孔加入 100 μL TMB-过氧化氢尿素溶液,37 ℃下避光放置 5 min,加入 50 μL 终止液终止反应,测定各孔在波长 450 nm 处的光密值[*D*(450)],并根据标准曲线换算为浓度。

1.8 流式细胞术

HNPCs 用不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)的胰蛋白酶消化后,经 2 000 r/min,5 min 离心用 PBS 重悬洗涤 2 次,加入 500 μL binding buffer 悬浮细胞。随后每管加入 5 μL Annexin V-EGFP 和 5 μL 碘化丙啶(propidiumIodide,PI)混匀后避光反应 15 min,用 FACSCalibur cytometer 流式细胞仪进行检测。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析方法。

2 结果

2.1 氧糖剥夺后 HNPCs Aggrecan 和 Col2a1 表达水平显著降低

HNPCs 经 12 h 无血清无糖低氧处理后,采用免疫荧光检测细胞质中 Aggrecan 和 Col2a1 的表达水平。如图 1 所示,与 Control 组相比,OGD 组细胞质中 Aggrecan 和 Col2a1 的荧光强度显著降低,证明 HNPCs 合成 Aggrecan 和 Col2a1 的能力被无血清无糖低氧处理显著抑制,说明 HNPCs 退变模型建立成功。

2.2 AAV 转染后 BMP9 表达水平显著升高

AAV 转染 HNPCs 24 h,经正常 DMEM 培养液培养 48 h 之后,建立退变模型,用实时定量 PCR 和 Western blot 检测 BMP9 的表达。如图 2A 所示,AAV-BMP9 组中 BMP9 的 mRNA 表达水平显著高于 OGD 组和 AAV 组($P<0.01$)。Western 条带(图 2B)和其对应的灰度分析结果(图 2C)也证明 BMP9 在蛋白水平过表达。

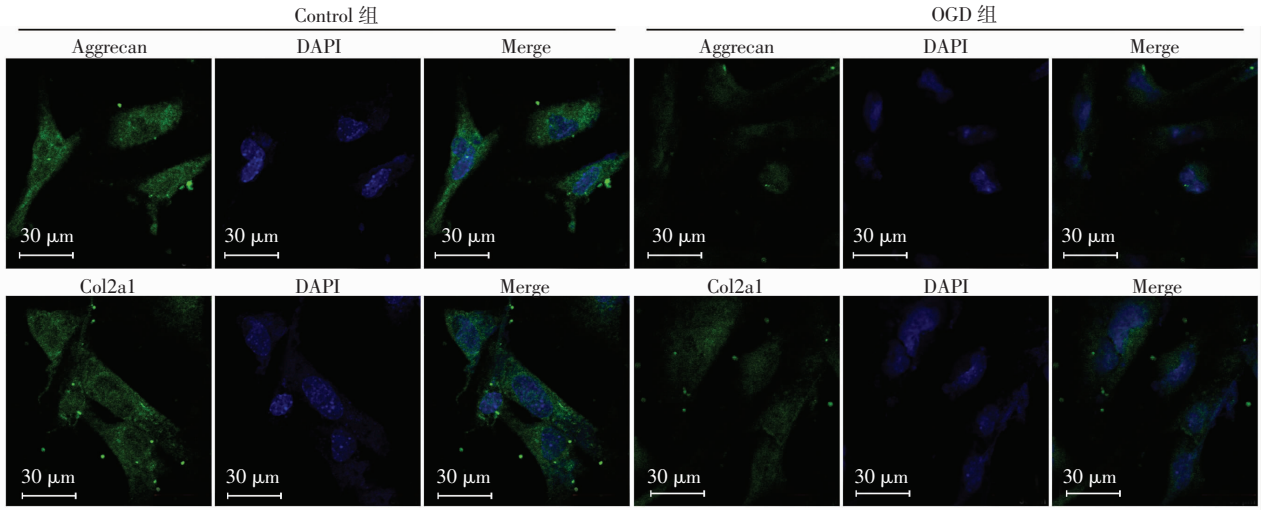
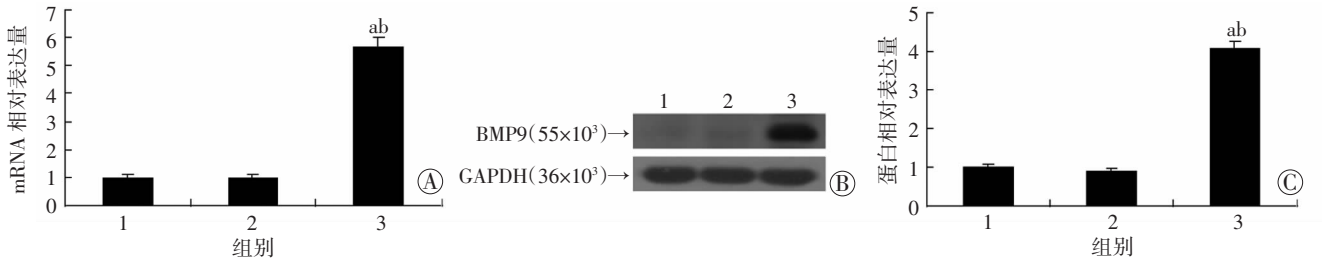
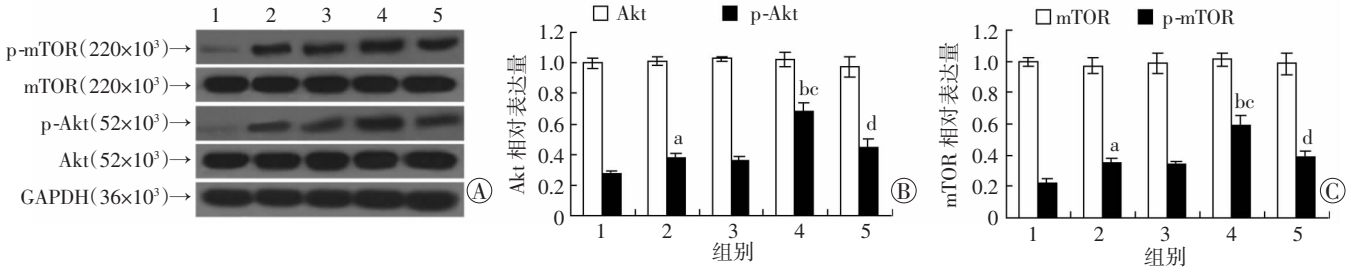


图 1 免疫荧光检测各组细胞质中 Aggrecan 和 Col2a1 的表达水平



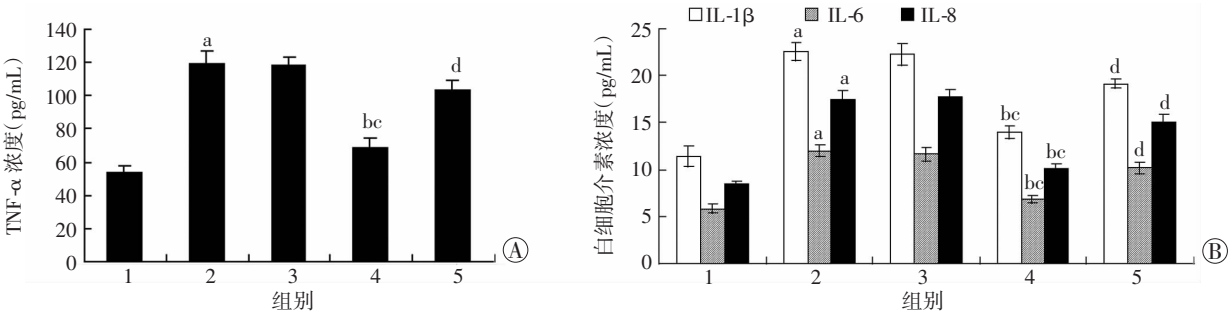
1:OGD 组;2:AAV 组;3:AAV-BMP9 组 A:实时定量 PCR 检测各组 BMP9 mRNA 相对表达量;B:Western blot 检测结果;C:各组 BMP9 蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与 OGD 组比较;b:$P<0.01$,与 AAV 组比较

图 2 各组 AAV 转染 HNPCs 后 BMP9 表达水平



1:Control 组;2:OGD 组;3:AAV 组;4:AAV-BMP9 组;5:AAV-BMP9 + LY294002 组 a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 OGD 组比较;c:$P<0.05$,与 AAV 组比较;d:$P<0.05$,与 AAV-BMP9 组比较;A:Western blot 检测结果;B、C:Akt 和 mTOR 蛋白半定量结果

图 3 Western blot 检测各组转染 BMP9 后 Akt 和 mTOR 表达水平



1:Control 组;2:OGD 组;3:AAV 组;4:AAV-BMP9 组;5:AAV-BMP9 + LY294002 组 A:酶联免疫吸附检测 TNF-α 表达水平;B:酶联免疫吸附检测 IL-1β、IL-6 和 IL-8 表达水平 a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 OGD 组比较;c:$P<0.05$,与 AAV 组比较;d:$P<0.05$,与 AAV-BMP9 组比较

图 4 酶联免疫吸附检测各组 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-8 的表达水平

2.3 BMP9 的过表达激活了 PI3K/Akt 信号通路

在退变 HNPCs 模型中转染 BMP9,Western blot 检测结果显示,BMP9 的过表达显著提高了 p-Akt 和 p-mTOR 的蛋白表达水平,与 OGD 组或 AAV 组相比差异有统计学意义($P<0.05$,图 3)。此外,LY294002 的加入显著逆转了 BMP9 对信号通路的激活效果($P<0.05$)。

2.4 BMP9 的过表达显著降低了退变 HNPCs 中炎症因子的水平

酶联免疫吸附实验结果显示(图 4),OGD 组中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-8 的水平显著升高,与 Control 组相比差异有统计学意义($P<0.01$);AAV-BMP9 组中炎症因子的水平显著下降($P<0.05$);AAV-BMP9 + LY294002 组中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-8 的水平显著高于 AAV-BMP9 组($P<0.05$)。上述结果说明 BMP9 的过表达显著抑制了退变 HNPCs 的炎症反应。

2.5 BMP9 的过表达显著抑制了退变 HNPCs 的凋亡

流式细胞术检测结果显示,与正常培养的 HNPCs 的凋亡率(3.67 ± 1.04)% 相比,退变 HNPCs 的凋亡率(25.67 ± 0.97)% 显著升高($P<0.01$);BMP9 的过表达能够显著降低退变 HNPCs 的凋亡率(9.02 ± 0.78)%;相反,LY294002 的加入使细胞凋亡率骤然升高(19.50 ± 1.26)%,逆转了 BMP9 过表达对细胞的保护效果(图 5)。

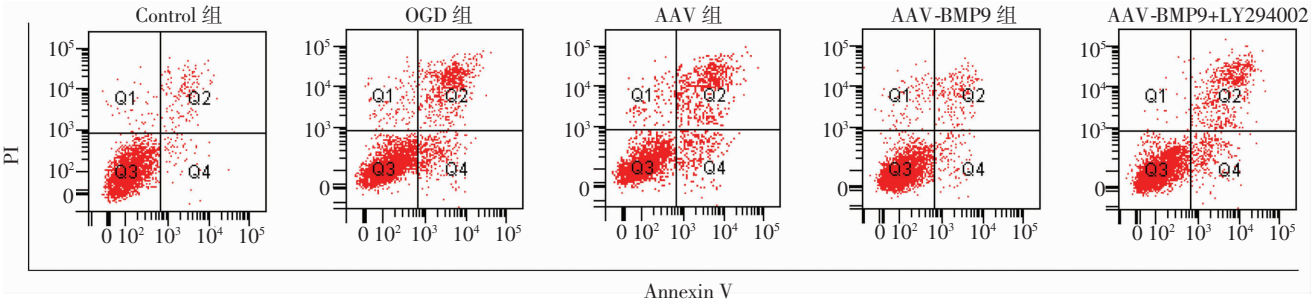


图 5 流式细胞术检测各组细胞凋亡率变化

3 讨论

BMP 家族属于 TGFβ 超家族的一员,在胚胎发育和骨形成方面发挥着重要的作用。大量研究表明 BMP 家族的成员——BMP-2 和 BMP-7 能够促进骨发生[4-5,10],但是家族其他成员在骨形成中的潜在作用尚不清楚。体内动物实验表明,在间充质干细胞中,BMP9 诱导骨分化的能力强于 BMP2 和 BMP7(BMP2 和 BMP7 经常被用于骨缺陷相关疾病的治疗)[10]。因而本实验初步验证了 BMP9 在退变髓核细胞中的作用。本研究通过腺相关病毒介导的基因转染技术,成功地将 BMP9 导入 HNPCs 中。基因表达分析结果显示,转染后 BMP9 的表达水平显著升高,且在退变 HNPCs 模型中,Aggrecan 和 Col2a1 的表达显著减少,说明该模型有效地模拟了椎间盘退变的微环境。在后续实验中我们发现,BMP9 的过表达能够有效地抑制退变 HNPCs 的炎症反应和凋亡,保护 HNPCs 免受退变微环境的进一步损害。本实验研究成果为椎间盘退行性疾病的治疗提供了新的思路和理论依据。

PI3K/Akt 通路是重要的抗凋亡信号通路,PI3K 通过磷酸化的方式激活 Akt 和 mTOR,从而激活或者抑制下游靶蛋白发挥调节作用。研究表明,PI3K/Akt 信号通路会促进成骨细胞 MC3T3-E1 分化[11]。在骨关节炎软骨细胞及神经细胞中,炎症因子 IL-1β 可激活 PI3K/Akt 通路[12]。在 OGD 条件下,IL-6 等细胞因子的水平及 p-Akt 和 p-mTOR 的磷酸化水平升高。Kaneshiro 等[9]的研究证明了这一现象,即 IL-6 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路负向调节成骨分化。另一方面,PI3K/Akt 通路的激活又可抑制炎症反应[13]。本研究证明 BMP9 的过表达显著提高了 p-Akt 和 p-mTOR 的磷酸化水平,激活了 PI3K/Akt 通路,降低了炎症因子的水平。虽然近期的两项研究表明在胃癌组织及乳腺癌细胞系中,BMP9 水平下降且 BMP9 过表达会抑制 PI3K/Akt 通路,促进细胞凋亡[14-15]。但是也有研究表明,在鼠胚胎成纤维细胞及脂肪前体细胞中,BMP9 过表达会激活 PI3K/Akt 通路[16-17],说明在不同的细胞系中 BMP9 对 PI3K/Akt 信号通路的影响不同。LY294002 是 PI3K 特异性的蛋白激酶抑制剂,被广泛用于 PI3K/Akt 信号通路的研究中。我们发现,LY294002 加入 HNPCs 培养液中,显著抑制了 PI3K/Akt 通路相关效应分子的表达,并且 LY294002 能够逆转 BMP9 对退变 HNPCs 的保护作用,促进 HNPCs 的炎症反应和凋亡。据此推测,BMP9 的过表达对 HNPCs 的保护很有可能是通过激活 PI3K/Akt 通路实现的。上述结果共同证明 BMP9 通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制退变 HNPCs 的炎症反应和凋亡。

髓核细胞是髓核中的主要细胞类型,能够合成并分泌大量蛋白多糖和 Col2a1,并相互交联形成弹性胶状的黏液样基质,维持腰椎间盘的正常生理功能[18]。有研究报道髓核细胞在椎间盘退行性疾病的治疗中发挥了重要作用。Pratsinis 等[19]报道多种生长因子在体内和体外均可促进髓核细胞的增殖和合成作用,提高髓核细胞的分泌能力。Okuma 等[20]证实将体外培养的髓核细胞注入发生退变的兔纤维环内,能够显著减缓椎间盘的退变程度。此外,也有研究将髓核细胞和多种来源的干细胞共培养,发现髓核细胞可以促进干细胞的类髓核样分化[21]。从这些研究中可以看出,髓核细胞功能的恢复对于椎间盘退行性疾病的治疗具有重要意义。本研究证实 BMP9 的过表达可以显著改善退变模型中 HNPCs 的状态,减少应激状态下的炎症反应和凋亡。近期的研究表明,将 BMP 与其他生长因子联合或联合两种不同的 BMP(如 BMP2 和 BMP7 联合)的基因疗法可更有效地促进骨形成[22],提示 BMP9 可以为椎间盘突出等疾病的治疗提供新的方向。

综上所述,本研究表明人为转染 BMP9 的过表达 AAV,可以有效地保护退变状态的 HNPCs,为椎间盘突出等疾病的治疗提供新的参考方向和理论依据。

参考文献:

[1] Ding F, Shao Z W, Xiong L M. Cell death in intervertebral

disc degeneration[J]. Apoptosis, 2013, 18(7): 777 - 785. DOI: 10.1007/ s10495-013-0839-1

[2] Vo N V, Hartman R A, Yurube T, *et al*. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration[J]. Spine J, 2013, 13(3): 331 - 341. DOI: 10.1016/j. spinee.2012.02.027

[3] Maidhof R, Jacobsen T, Papatheodorou A, *et al*. Inflammation induces irreversible biophysical changes in isolated nucleus pulposus cells[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99621. DOI: 10.1371/journal.pone.0099621

[4] Monsoro-Burq A H, Duprez D, Watanabe Y, *et al*. The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development[J]. Development, 1996, 122(11): 3607 - 3616.

[5] Than K D, Rahman S U, Vanaman M J, *et al*. Bone morphogenetic proteins and degenerative disk disease[J]. Neurosurgery, 2012, 70(4): 996 - 1002. DOI: 10.1227/NEU.0b013e318235d65f

[6] 余灏涛, 徐义春, 王其友, 等. 骨形态发生蛋白7通过PI3K/Akt通路可抑制人髓核细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(24): 3821 - 3828. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2014.24.009

[7] 张健. BMP-7对胚胎小鼠髓核细胞成骨分化和Notch信号表达的影响[D]: 重庆:重庆医科大学, 2014.

[8] Roberts S, Butler R C. Inflammatory mediators as potential therapeutic targets in the spine[J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4(2): 257 - 266. DOI: 10.2174/1568010053586372

[9] Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, *et al*. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways *in vitro*[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32(4): 378 - 392. DOI: 10.1007/ s00774-013-0514-1

[10] Kang Q, Sun M H, Cheng H, *et al*. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. Gene Ther, 2004, 11(17): 1312 - 1320. DOI: 10.1038/sj.gt.3302298

[11] Gu Y X, Du J, Si M S, *et al*. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(3): 748 - 754. DOI: 10.1002/jbm.a.34377

[12] Wang C, Zeng L, Zhang T, *et al*. Tenuigenin Prevents IL-1beta-induced Inflammation in Human Osteoarthritis Chondrocytes by Suppressing PI3K/AKT/NF-kappaB Signaling Pathway[J]. Inflammation, 2016, 39(2): 807 - 812. DOI: 10.1007/s10753-016-0309-3

[13] Rong R, Xijun X. Erythropoietin pretreatment suppresses inflammation by activating the PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(2): 413 - 418. DOI: 10.3892/etm.2015.2534

[14] Duan L, Ye L, Wu R, *et al*. Inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in BMP9-mediated tumor-suppressive effects in gastric cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(6): 1080 - 1089. DOI: 10.1002/jcb.25063

[15] Ren W, Liu Y, Wan S, *et al*. BMP9 inhibits proliferation and metastasis of HER2-positive SK-BR-3 breast cancer cells through ERK1/2 and PI3K/AKT pathways[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96816. DOI: 10.1371/journal.pone.0096816

[16] Huang J, Yuan S X, Wang D X, *et al*. The role of COX-2 in mediating the effect of PTEN on BMP9 induced osteogenic differentiation in mouse embryonic fibroblasts[J]. Biomaterials, 2014, 35(36): 9649 - 9659. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.016

[17] Liu Y, Liu Y, Zhang R, *et al*. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/beta-catenin signaling pathways[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 47: 47 - 56. DOI: 10. 1016/j.biocel.2013.11.018

[18] Jiang W, Zhang X, Hao J, *et al*. SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells[J]. Sci Rep, 2014, 4: 7456. DOI: 10.1038/srep07456

[19] Pratsinis H, Kletsas D. Growth factors in intervertebral disc homeostasis[J]. Connect Tissue Res, 2008, 49(3): 273 - 276. DOI: 10. 1080/03008200802147951

[20] Okuma M, Mochida J, Nishimura K, *et al*. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an *in vitro* and *in vivo* experimental study[J]. J Orthop Res, 2000, 18(6): 988 - 997. DOI: 10.1002/jor.1100180620

[21] Lehmann T P, Filipiak K, Juzwa W, *et al*. Co-culture of human nucleus pulposus cells with multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow reveals formation of tunnelling nanotubes[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(2): 574 - 582. DOI: 10.3892/mmr.2013.1821

[22] Kaito T, Johnson J, Ellerman J, *et al*. Synergistic effect of bone morphogenetic proteins 2 and 7 by *ex vivo* gene therapy in a rat spinal fusion model[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(17): 1612 - 1619. DOI: 10.2106/jbjs.l.01396

(**收稿**:2016-02-25;**修回**:2016-05-09)

(编辑 张 维)