

尼尔样 1 型生长因子通过促进软骨生成及抗炎作用来治疗骨关节炎的潜力

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3796>

唐小凯, 李伟明

2095-4344.3796

投稿日期: 2020-04-03

送审日期: 2020-04-14

采用日期: 2020-05-13

在线日期: 2020-10-22

中图分类号:

R459.9; R318; R684.3

文章编号:

2095-4344(2021)14-02252-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△ 介绍了 Nell-1 对于骨关节炎治疗的潜在优势, 阐明了其分子机制;

△ Nell-1 能通过抗炎及促软骨再生双重作用来治疗骨关节炎, 为骨关节炎的治疗提供了新的思路及方法。

骨性关节炎发病机制的新见解



Nell-1 的促软骨再生能力及其信号级联

Nell-1 的抗炎作用及其分子信号级联



现阶段 Nell-1 应用于骨关节炎治疗的不足之处



Nell-1 在颅面骨再生、脊柱融合、骨组织工程、肿瘤、神经发育与神经疾病中的临床应用最新进展

主题释义:

骨关节炎: 骨关节炎的发病机制复杂, 涉及到机械、炎症和代谢因素, 最终导致滑膜关节的结构破坏和功能失效。骨关节炎是由于关节组织修复和破坏之间的不平衡而引起的一种主动的动态改变, 而不是通常所描述的被动退行性疾病或所谓的磨损疾病。

Nell-1: 是关节软骨中表达的细胞外基质分子, 同时也是一种新的促软骨形成分子, 在体外可以促进软骨形成细胞及其前体细胞的增殖、分化和成熟, 例如Nell-1能促进兔耳郭软骨细胞形成软骨结节, 促进人骨髓间充质干细胞成软骨分化。已经被证明Nell-1能够在体内驱动骨、软骨组织的分化和生长, 从而对抗骨关节炎出现的软骨破坏。

摘要

背景: 骨关节炎是一种复杂的全关节疾病, 主要影响的关节是膝关节, 其次是手和髋关节, 治疗上主要以缓解疼痛症状为基础, 但令人遗憾的是, 到目前为止还没有有效的药物可以阻止疾病的进展。最近, 一种具有促软骨形成、抗炎、抗脂肪、促血管化等特性的成骨蛋白——尼尔样1型生长因子(Nel-like molecule 1, Nell-1)进入研究人员的视野, 因其具有促软骨生成、抗炎的双功能特性而有希望成为改善骨关节炎病情的药物。

目的: 文章对骨性关节炎发病机制的新见解、Nell-1的促软骨生成能力及其分子级联信号、抗炎作用及其分子机制、现阶段Nell-1应用于骨关节炎治疗的不足之处以及Nell-1临床应用的最新进展作一综述, 为骨关节炎的治疗提供新的思路。

方法: 检索中国知网、PubMed数据库, 中文检索词为“Nell-1、骨关节炎”, 英文检索词为“Osteoarthritis”“Nell-1 AND Osteoarthritis”。

检索时间范围为1995年1月至2020年3月, 主要纳入影响因子>3、与Nell-1和骨关节炎关系紧密的文章, 最后纳入88篇文献进行综述。

结果与结论: 随着人口老龄化和肥胖症的日益增多, 骨关节炎较几十年前更加普遍, 因此造成了更为沉重的家庭和社会经济负担。传统的止痛方法因其不能减少炎症和软骨损伤, 因此都不足以用于根治性治疗。作为临床骨科医生, 充分认识理解骨关节炎的发病机制、疾病的进展及转归, 开展与基因工程、组织构建的生物学技术, 药剂科、分子生物学等多学科的讨论, 可以帮助开发更有效的治疗方案, 最终目的是解除骨关节炎患者的痛苦, 减轻个人及社会的经济负担。虽然对于Nell-1在骨关节炎发病机制中的新兴作用还处于初级研究阶段, 仍然存在缺乏最佳给药途径、分子机制不完全清楚、没有最佳的动物模型等不足, 但其具有抗炎和促进软骨生成的双重效力, 因此治疗骨关节炎具有巨大的潜力。未来的研究应进一步揭示详细的潜在机制, 并优化剂量、方案和给药方法, 将Nell-1对于骨关节炎的治疗潜力转化为临床实践。

关键词: 骨; 关节炎; 软骨; 再生; 抗炎; 因子; 综述

缩略语: 尼尔样1型生长因子: Nel-like molecule 1, Nell-1

Potential of Nel-like molecule 1 to treat osteoarthritis by promoting cartilage formation and anti-inflammatory effects

Tang Xiaokai, Li Weiming

First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Tang Xiaokai, Master candidate, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Li Weiming, MD, Chief physician, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江省哈尔滨市 150001

第一作者: 唐小凯, 男, 1992年生, 四川省中江县人, 汉族, 哈尔滨医科大学在读硕士, 主要从事 Nell-1 促进软骨、骨的再生研究。

通讯作者: 李伟明, 博士, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江省哈尔滨市 150001

<https://orcid.org/0000-0002-8332-4013> (唐小凯)

基金资助: 中国博士后科学基金项目 (2016M601449), 项目负责人: 李伟明

引用本文: 唐小凯, 李伟明. 尼尔样 1 型生长因子通过促进软骨生成及抗炎作用来治疗骨关节炎的潜力 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(14):2252-2258.



Abstract

BACKGROUND: Osteoarthritis is a complex total joint disease. The main affected joint is the knee joint, followed by the hand and hip joints. Treatments for osteoarthritis mainly focus on the relief of pain symptoms. Unfortunately, no drugs can stop the progression of the disease until now. Recently, an osteogenic protein with the characteristics of promoting cartilage formation, anti-inflammatory, anti-fat, and vascularization. Nel-like molecule 1 (Nell-1) has attracted researchers' attentions. Because of its dual functional properties of promoting cartilage production and anti-inflammation, Nell-1 is expected to become a drug for improving the condition of osteoarthritis.

OBJECTIVE: To review the pathogenesis of osteoarthritis, ability of Nell-1 to promote chondrogenesis and its molecular cascade signals, anti-inflammatory effects of Nell-1 and its molecular mechanism, Nell-1's deficiencies in the treatment of osteoarthritis and the latest clinical application of Nell-1, thereby providing new ideas for the treatment of osteoarthritis.

METHODS: CNKI and PubMed were retrieved for articles tightly related to Nell-1 and osteoarthritis with an impact factor > 3 using the keywords of "Nell-1 AND Osteoarthritis," and "Osteoarthritis" in Chinese and English, respectively. The time range for literature retrieval was from January 1995 to March 2020. Finally, 88 articles were included for review.

RESULTS AND CONCLUSION: With the aging of population and increasing of obesity, osteoarthritis is more common than it was a few decades ago, thus leading to a heavier family and socioeconomic burden. Traditional analgesic methods cannot be used as curative treatments because they cannot reduce inflammation and cartilage damage. It is helpful for a clinical orthopedist to develop a more effective treatment protocol by fully understanding the pathogenesis, disease progression and outcome of osteoarthritis, and initiating multidisciplinary discussions involving biological technology, pharmacology, and molecular biology related to genetic engineering and tissue construction. The ultimate goal of an effective treatment protocol is to relieve the suffering of osteoarthritis patients and to reduce the financial burden of individuals and the society. Although the emerging role of Nell-1 in the pathogenesis of osteoarthritis is still in its infancy, there are still some limitations, including a lack of the best route of administration, incomplete understanding of relevant molecular mechanisms, and no optimal animal models. However, Nell-1 has a great potential in the treatment of osteoarthritis as a result of its dual effects of anti-inflammation and promoting cartilage production. Future research should reveal detailed potential mechanisms, and optimize the dosage, regimen, and method of Nell-1 administration, with an attempt to translate Nell-1's therapeutic potential for osteoarthritis into clinical practice.

Key words: bone; arthritis; cartilage; regeneration; anti-inflammation; factor; review

Funding: China Postdoctoral Science Foundation, No. 2016M601449 (to LWM)

How to cite this article: TANG XK, LI WM. Potential of Nel-like molecule 1 to treat osteoarthritis by promoting cartilage formation and anti-inflammatory effects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(14):2252-2258.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种常见的致残性疾病,对于受影响的个人、保健系统以及更广泛的社会经济负担都有着显著的影响^[1-2]。据统计,全世界受骨关节炎影响的总人数达 2.5 亿^[3];在 60 岁以上的人群中,大约有高达 18% 的女性和 10% 的男性受到骨关节炎的影响^[4]。在这一沉重的负担背景下,大多数骨关节炎患者并没有得到适当的治疗^[5]。

指南中最常推荐的药物治疗方法包括扑热息痛和非类固醇抗炎药,但令人遗憾的是,扑热息痛的有效剂量非常小以及安全性问题,使得它作为治疗骨关节炎的单一药物作用不大^[6],而非类固醇抗炎药不能有效控制关节炎的进展^[7]。因此,这些止痛药物都不足以用于根治性治疗^[8]。此外,糖皮质激素存在肌肉、骨骼、心血管和胃肠道系统的多种不良反应,因此其能否作为骨关节炎安全的治疗方法存在着巨大的疑问^[9-10]。更令人失望的是,通过减缓或抑制炎症来延缓类风湿性关节炎进展的抗风湿药物疗效尚未通过全身或局部给药在骨关节炎临床试验中复制^[11]。因此这些传统的药物治疗方法都不是绝佳的治疗方法,很可能是因为这些疗法并不直接治疗软骨破坏,而软骨破坏是骨关节炎的主要原因^[12]。

为了对抗骨关节炎中出现的软骨破坏^[4],最新的骨关节炎疗法正从合成化学物质转向生物分子,特别关注促软骨生长因子^[13-14],其中尼尔样 1 型生长因子 (Nel-like molecule 1, Nell-1) 备受关注。首先 Nell-1 是一种新的促软骨形成分子,在体外可以促进软骨形成细胞及其前体细胞的增殖、分化和成熟^[15-16];其次作为一种在关节软骨中表达的细胞外基质分子^[16],Nell-1 本身就足以在兔膝关节严重的全层软骨下缺损中促进软骨再生,而不形成骨赘^[17]。此外,最近关于关节软骨细胞的研究发现了一个新的 Nell-1 信号级联,即 Nfatc1→Runx3→IHH^[18],这对于 Nell-1 的促软骨生物活性是

必不可少的^[19-20]。

在过去的 20 多年中,科研人员对 Nell-1 在软骨组织的作用进行了大量的研究^[15-20],现将骨性关节炎发病机制的新见解、Nell-1 的促软骨生成能力及其分子信号级联、抗炎作用及其分子机制、Nell-1 应用于骨关节炎治疗的不足之处以及 Nell-1 在临床应用的最新进展进行如下综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 文献检索和筛选要求 选择中国知网、PubMed 数据库,中文检索词为“Nell-1、骨关节炎”,英文检索词为“Osteoarthritis”“Nell-1 AND Osteoarthritis”。检索时间范围为 1995 年 1 月至 2020 年 3 月。

1.2 文献筛选标准 主要纳入影响因子 >3、与 Nell-1 和骨关节炎关系紧密的文章,其中与 Nell 和骨关节炎任意一方关联性不是很密切的或者影响因子低的则被排除在外。

1.3 质量评估及数据的提取 以“Nell-1 AND Osteoarthritis”为主题词检索 3 篇、以“Nell-1”为主题词检索出 99 篇、以“Osteoarthritis”为主题词检索出 88 515 篇,经资料收集者互相评估纳入文献的有效性和适用性,通过阅读文题和摘要进行初步筛选;排除中英文文献重复性研究,以及内容不相关的文献,最后纳入 88 篇文献进行综述。

2 结果 Results

2.1 骨性关节炎发病机制的新见解 骨关节炎是一种完整的关节疾病,涉及透明关节软骨、软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜和关节周围肌肉的结构改变^[21]。骨关节炎的复杂发病机制涉及机械、炎症和代谢因素,最终导致滑膜关节的结构破坏和功能失效。这种疾病是由于关节组织修复和破坏之间的不平衡而引起的一种主动的动态改变,而不是通常所描述的

被动退行性疾病或所谓的磨损疾病^[22]。

在骨关节炎发生发展过程中, 软骨成分发生变化, 软骨失去完整性^[23]。软骨成分变化改变了软骨材料的性质, 增加了其对物理力量破坏的敏感性, 最初侵蚀只出现在表面, 后来伴随更深的软骨裂隙而来的是钙化软骨区的扩张。在试图修复过程中, 肥大的软骨细胞表现出更高的合成活性, 但在此过程中会产生基质降解产物和促炎递质, 从而放松对软骨细胞功能的调节, 并作用于邻近的滑膜, 刺激增殖和促炎反应, 增生的滑膜细胞也会释放促炎产物, 这一过程伴随着组织肥大和血管增多。在软骨下骨中血管生成增多, 并侵入关节软骨深层, 造成软骨下骨改建增加, 这种骨重建和修复也与软骨下骨髓病变的发展有关。软骨内骨化形成关节边缘的骨赘受到炎症生物因素的影响, 但也受到异常关节运动学的影响^[24]。

骨关节炎通常被描述为一种具有广泛潜在途径的异质性疾病, 这会导致相似的关节破坏结果^[25]。HUNTER等^[26]认为骨关节炎是一种综合征, 而不是一种单一的疾病。每一种常见的骨关节炎危险因素都可能激发不同的机制途径导致骨关节炎, 因此促进老年人骨关节炎发展的介质可能与促进年轻人或肥胖者关节损伤后发生骨关节炎的介质不同。根据特定的病理过程提出了一些分层方法来划分不同的机制亚群, 包括炎症成分增加^[27]、超负荷^[28]、代谢改变^[29]、细胞衰老^[30], 这些机制可能是重叠的, 需要进一步验证。

2.2 Nell-1 的促软骨再生能力及其信号级联

2.2.1 Nell-1 的促软骨生成能力 软骨细胞对于关节软骨结构支持、代谢活动和维持功能具有重要作用^[31]。软骨生成是一个动态的细胞过程, 这一过程包括间充质细胞凝聚、软骨前体细胞增殖、软骨细胞分化和软骨形成这几个复杂阶段。这些阶段的进展是由复杂的分化途径介导的, 该途径涉及各种细胞外基质和转录因子的协调表达, 以及生长因子和细胞因子的调节。Nell-1 是关节软骨中表达的细胞外基质分子, 同时也是一种新的促软骨形成分子, 在体外可以促进软骨形成细胞及其前体细胞的增殖、分化和成熟^[15-16], 例如 Nell-1 能促进兔耳郭软骨细胞形成软骨结节^[32], 促进人骨髓间充质干细胞成软骨分化^[33]。已经被证明 Nell-1 能够在体内驱动骨、软骨组织的分化和生长^[34-35], 例如将 Nell-1 加入壳聚糖纳米粒并嵌入海藻酸钠水凝胶中, 植入新西兰大白兔股骨髁软骨缺损, 结果显示含有 Nell-1 的海藻酸钠填充缺损明显改善软骨再生^[17], 经 Nell-1 修饰的骨髓间充质干细胞促进了山羊髌突关节软骨和软骨下骨的修复^[36]。这些研究揭示并证实了 Nell-1 在软骨形成发育和成熟中的重要调控作用。

此外, OEGEMA等^[37]研究发现钙化软骨在关节软骨中保持相对恒定, 因为钙化软骨内的软骨细胞在成年期通常保持静止。LI等^[18]进一步研究发现关节内注射 Nell-1 导致对照组和 Nell 基因敲除小鼠胫骨平台的钙化软骨层中度增厚。重要的是, Nell-1 诱导的钙化软骨扩张并不伴随明显的透明软骨减少。这些在钙化的关节软骨中观察到 Nell-1 刺激的软骨再生, 说明 Nell-1 用于治疗骨关节炎有预期的益处。

LI等^[38]研究展现了生长因子 Nell-1 的软骨形成潜力, 进而证明了它在各种动物模型中是有效的。Nell-1 功能丧失会导致细胞外基质蛋白的基因表达减少^[39], 例如 Nell-1 基因敲除小鼠表现出矮小和早熟、骨质疏松、发育迟缓、次级骨化中心矿化减少等特点^[40], 以及 Nell-1 基因敲除小鼠不能在围产期存活, 肋骨明显变形和变短, 椎体椎间隙压缩, 软骨基质减少^[41]。所有这些发现揭示了 Nell-1 在小鼠软骨细胞分化、成熟和再生过程中的重要作用。

Nell-1 的促软骨形成能力以及关节软骨细胞再生对于骨关节炎治疗的重要性, 为 Nell-1 成为一种新的改善骨关节炎药物提供了可能性。

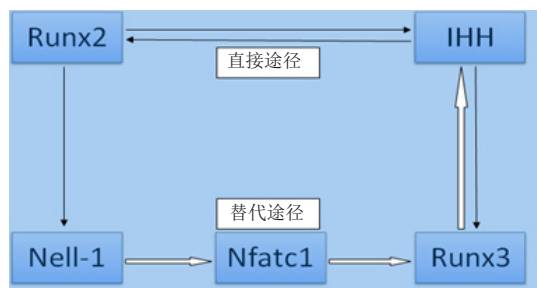
2.2.2 Nell-1 促软骨再生的分子信号级联 KIM等^[42]研究表明 Runx2 不仅调控软骨细胞成熟, 而且还参与软骨形成的启动。尽管 Runx2 能够直接与 IHH 启动子结合来刺激 IHH-Gli 通路^[43], 这是诱导软骨细胞分化和成熟的信号途径^[44], 但 CHEN等^[45]研究结果显示 Runx2 的核内输入和 DNA 结合功能不足以促进软骨细胞的分化。另外, LEE等^[32]表示 Nell-1 是一种分泌性的细胞外基质分子, 在软骨细胞的分化和成熟过程中也起着关键作用。LI等^[15]研究显示 Runx2 敲除小鼠软骨细胞中 Nell-1 mRNA 的表达水平仅为 WT 对照组的一半。此外, 小鼠软骨细胞过度表达 Runx2 之后显著刺激 Nell-1 mRNA 的表达, 并呈病毒剂量依赖性。在不同 Nell-1 基因型的小鼠软骨细胞中, Runx2 mRNA 的表达保持在相似的水平。这些结果表明软骨细胞中 Runx2 调节 Nell-1 的表达, 而 Nell-1 不改变 Runx2 的表达。虽然 Nell-1 的表达高度依赖于 Runx2, 但 Nell-1 的前软骨形成功能在 Runx2 敲除小鼠中持续存在, 表明了管理软骨形成的 Runx2→Nell-1 调控网络的复杂性, 特别是 Nell-1 至少部分通过不依赖于 Runx2 的核输入和 DNA 结合功能的另一条途径促进软骨形成。

那 Nell-1 是通过何种途径促进软骨形成的呢? 检测 Runx2 的下游功能调节因子 Nell-1^[15], 是否也通过 IHH 信号通路发挥作用, 展示其前软骨形成特性, 对于辨别这 2 种调节因子的相互作用至关重要。YOSHIDA等^[44]研究结果表明, 在发育后期 Runx2 基因敲除小鼠四肢近端(股骨和肱骨)的软骨细胞肥大被完全阻断, 但四肢远端(桡骨、腓骨和胫骨)的软骨细胞分化仅轻微障碍。然而, Runx2 和 Runx3 的双敲除导致整个骨骼中完全没有肥大的软骨细胞。此外, Runx3 敲除小鼠在发育过程中软骨细胞成熟略有延迟, 但在新生期大体骨骼发育正常。这些现象表明, Runx3 是软骨细胞完全分化和成熟所必需的^[46]。此外, 新生小鼠软骨细胞中 IHH 的表达仅在 Runx2 敲除新生小鼠中部分降低, 而在年龄匹配的 Runx2 和 Runx3 同时敲除的动物中检测不到^[44], 这一发现表明, 除了 Runx2 之外, Runx3 还可以有效地调节软骨细胞中 IHH 的表达。Nell-1 招募了一条绕过 Runx2-IHH 启动子结合的替代途径, 以刺激 IHH 信号并显示前软骨活性。

那 Nell-1 与 Runx3 的关系是什么呢? Runx2 敲除小鼠模型中 Nell-1 缺乏导致小鼠软骨细胞 Runx3 mRNA 和 Runx3 蛋白在新生小鼠股骨增殖区、肥大区的表达显著降低。短期给

予 Nell-1 不仅增加了小鼠成软骨 ATDC5 细胞系和小鼠原代软骨细胞中 Runx3 的表达,而且还诱导了 Runx2 敲除小鼠软骨细胞中 Runx3 信号转导,表现为 Runx3 和 Runx3 下游靶基因 Acan30 的转录上调,以及 Runx3 核积累的增加。此外,巨细胞病毒驱动的 Nell-1 过表达重建了新生 Runx2 敲除小鼠股骨中 Runx3 的强烈染色。因此,至少在 Runx2 敲除小鼠模型中,Runx3 被确定为 Nell-1 的下游靶点^[19]。

还有研究发现,Runx3 不是 Nell-1 调控软骨形成过程中的早期反应基因之一^[47]。Li 等^[20]研究首先筛选连接 Nell-1→Runx3 信号转导的关键转录因子,再利用 RNA 干扰技术进一步验证了这些发现,最后用染色质免疫沉淀方法识别 Nell-1 诱导的关键转录因子在 Runx3 启动子上的结合位点,结果成功地确定并从功能上证实了 Nfatc1 是连接 Nell-1 和 Runx3 的关键转录因子。Nfatc1 是 Nell-1 早期反应靶点,通过与 Runx3-833-810 区域的启动子结合而上调 Runx3 的表达,从而激活 Runx3-IHH 信号转导级联,诱导软骨细胞分化成熟。综上所述,除了固有的 Runx2→IHH 信号转导级联诱导软骨分化成熟外,Nell-1 还通过 Runx2→Nell-1→Nfatc1→Runx3→IHH 信号转导级联诱导软骨分化成熟,见图 1,从而表现出促进损伤关节软骨愈合的能力。



图注:黑色细箭头代表既定的知识:已知 Runx2 直接结合 IHH 启动子并刺激软骨细胞中 IHH 的表达,IHH 在软骨形成过程中上调 Runx2 和 Runx3 的表达。白色粗箭头显示了当前研究中确定的结论:Nell-1 作为 Runx2 的下游因子,通过 Nfatc1 和 Runx3 诱导 IHH 信号转导,且 Runx3 不依赖于 Runx2 的表达

图 1 | 软骨形成中直接和替代途径 Runx2-IHH 调控图

2.3 Nell-1 的抗炎作用及其分子信号级联

2.3.1 Nell-1 的抗炎作用 Li 等^[18]发现在关节炎关节软骨病变中 Nell-1 的表达较低,Nell-1 单倍体功能不全易发生骨关节炎样病理改变,并伴有促炎症细胞因子水平增加。关节软骨细胞局部分泌促炎症细胞因子,包括白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子可以激活其自身分泌环^[48],这对骨关节炎的发生和发展至关重要^[49];这些促炎症细胞因子的调节作用至少部分独立于滑膜和免疫细胞的调节作用^[50]。白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 是骨关节炎进展过程中促进细胞外基质降解的主要促炎症细胞因子^[51]。白细胞介素 1 β 等促炎症细胞因子可以在体外诱导关节软骨细胞发生骨关节炎样的生物学变化^[50]。ALLEN 等^[52]证实啮齿动物膝关节中白细胞介素 1 β 的局部升高已被证明能诱发骨关节炎样症状,进一步阐明了促炎症细胞因子与骨关节炎的相关性。

软骨细胞是分泌 Nell-1 的细胞来源^[19]。软骨细胞功能

失衡可由外界刺激(如炎症细胞因子的存在)诱导,从而导致退行性疾病(如骨关节炎)的进展。SHEN 等^[53]通过体内股骨嵌合模型,首次表明 Nell-1 具有抗炎特性,其能够降低促炎标志物肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 水平。LI 等^[18]最近的一项研究显示关节内注射白细胞介素 1 β 可引起 Nell-1 缺失小鼠膝关节比对照组更严重的炎症和软骨退化,在 Nell-1 给药后明显恢复。此外,外源性 Nell-1 显著减轻了对照组和 Nell-1 敲除小鼠膝关节的炎症反应和关节软骨损伤。通过使用 Nell-1 敲除小鼠模型,证明了 Nell-1 除了先前表现出的促软骨生成作用外,还进一步阐明了具有抗炎作用,以保护关节软骨免受骨关节炎进展的影响,以及关节炎关节软骨中促炎标志物和 Nell-1 之间存在负相关,Nell-1 缺乏可以加速和加重骨关节炎的进展。

综上所述,Nell-1 至少可以部分减轻白细胞介素 1 β 等炎症因子刺激引起的软骨源性细胞外基质降解和炎症反应。当 Nell-1 被研究并用于治疗骨质疏松症时,全身给药和化学修饰显著延长了它的半衰期和在肌肉骨骼系统中的分布^[54]。因此,从有效性和安全性的角度来看,Nell-1 有希望作为一种新的和有前途的骨关节炎治疗候选药物的潜力,以应对未满足的骨关节炎治疗需求^[14]。

2.3.2 Nell-1 抗炎作用的分子机制 到目前为止,用于软骨形成的 Nell-1 下游效应器中,对 Nfatc1 和 Nfatc2 的研究是最多的。Nfatc1 和 Nfatc2 都被发现在维持软骨健康和抑制自发性骨性关节炎方面发挥重要作用^[55]。Nfatc2 敲除小鼠在 12-24 个月时发生骨关节炎^[56],但是给予钙调神经磷酸酶可降低骨关节炎的严重程度^[57],给予糖原合成酶激酶 3 β 可诱导小鼠骨关节炎^[58],以及还发现白细胞介素 1 β 可诱导原代成人关节软骨细胞中 Nfatc1 的表达^[59],这些观察结果与先前报道的 Nfatc 分子的抗关节炎作用不同^[60]。目前对 Nfatc 蛋白在关节炎中的作用尚不清楚。

LI 等^[20]研究表明 Nfatc1 通过激活 IHH 信号通路介导 Nell-1 促软骨再生中起重要作用。Nfatc1 和 Runx1 是软骨细胞中响应 Nell-1 的主要基因。AINI 等^[61]研究结果显示 Runx1 和 Nfatc1 在关节炎条件下都是炎症的负调节因子。LI 等^[18]建立了稳定的 Nfatc1 敲除小鼠 ATDC5 细胞和 Runx1 敲除小鼠 ATDC5 细胞来验证。通过进一步研究发现:在与干扰 ATDC5 细胞相同的级别上,Nell-1 的抗炎作用在 Nfatc1 敲除小鼠 ATDC5 细胞中是保守的;相反,Runx1 敲除小鼠中几乎完全消除了 Nell-1 在 ATDC5 细胞中的抗炎生物活性。关节内注射 Nell-1 上调了小鼠膝关节软骨中的 Runx1 蛋白,而不受白细胞介素 1 β 刺激的影响,也不受 Nell-1 单倍体不足的影响。综上所述,这些数据表明:Nell-1 在软骨细胞中是通过关键下游介质 Runx1 的介导来发挥抗炎生物活性的,而不是 NFATc1。

2.4 现阶段 Nell-1 在应用于骨关节炎治疗的不足之处 第一:以往实验使用的重复关节内注射和体外培养策略显然不是临床治疗的最佳给药途径。在 Nell-1 应用于临床之前,需要对 Nell-1 的给药剂量、治疗方案以及给药途径进行进一

步优化。KWAK 等^[62]研究表明 Nell-1 在体内的半衰期只有 5.5 h, 因此还需要开发合适的递送载体和 / 或化学修饰 (如聚乙二醇化) 来保护 Nell-1 免受内源性酶消化, 从而延长其在体内的生物效力。第二: 目前的发现证明了 Nell-1 和 Runx2 之间相互作用的复杂性。除了 Runx3→IHH 途径外, 调控软骨分化的 Runx2 和 Nell-1 的确切相互作用在很大程度上仍不清楚。研究表明 Nell-1 不能调节软骨细胞中 Runx2 的表达, 但 Nell-1 是否调节 Runx2 的翻译后修饰, 如磷酸化^[63], 还没有确定。虽然非规范的 wnts (例如 wnt5a) 通过 G 蛋白偶联受体激活细胞内钙释放来诱导早期软骨形成, 但 wnt5a 也可以通过刺激磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B 而起到抑制软骨细胞肥大的作用。在软骨形成调控中, Runx2 也是典型和非典型 Wnt 通路的关键分子, 提示其在软骨形成的功能调控中可能是多条信号通路的汇合点。鉴于 Nell-1 已被认为是典型 Wnt 信号通路在成骨过程中的一种新的激活剂^[64], 推测 Nell-1 在调控 Runx2 下游软骨形成中的作用也可能是通过 IHH 和 Wnt 信号通路之间的复杂串扰而发生的。因此, 需要进一步的研究来解释这种复杂的相互作用, 以全面了解 Nell-1 在软骨形成中的重要作用。第三: 从现已发表的文献来看, 目前依然没有动物模型被用作骨关节炎的黄金标准^[65]。在目前的研究中, 自然发生的骨关节炎模型最能代表人类原发性骨关节炎, 而化学诱导的模型用来模拟人类继发性骨关节炎, 以证明 Nell-1 作为改善骨关节炎病情的重要性。化学诱导的骨关节炎模型是阐明遗传和分子发病机制和确定药物治疗靶点的首选模型, 因为它们与创伤后骨关节炎没有相关性^[66]。从临床角度来看, Nell-1 的抗关节炎效果应该在创伤后骨关节炎模型中得到进一步证实, 因为创伤后骨关节炎占有症状性骨关节炎病例的 12%^[67]。例如, 前十字韧带横断术模型是最早也是最常用的模拟创伤后骨关节炎的外科模型^[66]。与小鼠等小动物相比, 大型动物在解剖学和生物力学上与人类有更多相似之处^[65]。特别值得一提的是, 山羊的膝盖在解剖学上与人类的膝盖最相似^[68], 因此, 山羊前十字韧带横断术模型可能有助于验证 Nell-1 的抗关节炎效力, 并提供更多临床相关数据。此外骨关节炎在女性中的发生率明显更高^[66], 所以性别和生殖状况的影响也应该在未来的研究中进行评估。第四: 目前的研究对 Nell-1→Runx1→IL-1β 功能轴的理解不完整。首先, 从 Nell-1 到 Runx1 的信号转导在很大程度上是未知的, 这可能是由于对 Nell-1 的特异性细胞表面受体、相关蛋白和下游激活物的了解有限。Nell-1 通过不同的细胞表面受体或辅助受体以依赖于细胞类型和发育阶段的方式提供其功能^[69]。同时, Runx1 在关节炎中的具体作用机制尚不清楚^[70]。此外, 骨关节炎是一种全关节的疾病, 涉及关节软骨、软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜和关节周围肌肉的结构改变^[71], 因此还应评估 Nell-1 对附近滑膜和免疫细胞的影响, 以充分阐明 Nell-1 在骨关节炎治疗中的益处。

2.5 Nell-1 在临床应用的最新进展

2.5.1 Nell-1 在颅面骨再生中的应用进展 Nell-1 在小鼠模型中具有与骨形态发生蛋白类似的成骨能力, 并且还可能与骨

形态发生蛋白协同作用, 促进质量更好的局部骨形成^[72]。最近, 一项临床前研究将 pDNA-Nell-1 与骨髓间充质干细胞和三维打印生物活性玻璃 / 壳聚糖纳米复合材料联合应用于恒河猴牙槽骨再生, 显著促进了牙槽骨的再生, 而且再生的新骨组织在质量上与正常骨非常接近^[73]。

2.5.2 Nell-1 在脊柱融合中的应用进展 脱钙骨基质传递的 Nell-1 对脊柱融合的影响已经在大鼠和绵羊模型中得到了广泛的验证^[72]。联合应用 Nell-1 蛋白和入血管周围干细胞可以显著提高骨质疏松大鼠的脊柱融合率^[74]。值得注意的是, 在非人灵长类动物模型中给予 Nell-1 剂量为 1.7 g/L 的情况下, 术后 3 个月的融合率为 100%, 没有不良反应^[75]。NELL-1 刚刚获得人类研究伦理委员会批准, 成为澳大利亚一项多中心试点临床试验的首个中心, 以评估 Nell-1 和脱钙骨基质对成年退行性椎间盘疾病患者的安全性和有效性。

2.5.3 Nell-1 在骨组织工程中的应用进展 骨形态发生蛋白 2 在当前骨科手术中的应用越来越广泛。然而, 骨形态发生蛋白 2 在临床应用中的不良反应也引起了该领域的广泛关注。例如: 大剂量骨形态发生蛋白 2 诱导的大骨块具有成熟的骨边缘和充满主要脂肪骨髓组织的中心腔^[76]。Nell-1 已经被证明具有抗脂肪生成作用, 并且当 Nell-1 与骨形态发生蛋白结合时, Nell-1 可以逆转骨形态发生蛋白的促脂肪作用, 以提高再生骨的质量; 在股骨模型中, Nell-1 还可以抑制骨形态发生蛋白 2 诱导的炎症^[77]。此外, Nell-1 还可在骨再生早期刺激血管生成, 并促进间充质干细胞迁移^[78], 见表 1。

表 1 | Nell-1 和骨形态发生蛋白 2 在骨再生中的应用比较

项目	Nell-1	骨形态发生蛋白 2
骨形成	促进	促进
软骨形成	促进	促进
脂肪形成	抑制	促进
炎症	抑制	促进
间充质干细胞迁移	促进	-
内皮细胞迁移	促进	促进
血管生成	促进	促进
肿瘤形成	尚不完全清楚	促进
异位骨形成	无	有
破骨细胞活化	抑制	促进
趋化性	-	促进

2.5.4 Nell-1 在肿瘤中的应用进展 Nell-1 的高甲基化在胃癌以及 Barrett 食管中已被证实^[79-80]。此外, 在霍奇金淋巴瘤和肾细胞癌中发现 Nell-1 表达缺失^[81-82]。相反, 在横纹肌肉瘤中发现了 Nell-1 的过度表达^[83]。值得注意的是, 在所有类型的骨肿瘤和软骨形成肿瘤中也检测到了 Nell-1 的表达。在良性骨肿瘤中, Nell-1 呈强而弥漫的染色; 在骨肉瘤中, Nell-1 染色相对减少, 肿瘤间差异较大^[84]。此外, Nell-1 的表达并没有因软骨形成肿瘤的类型和分级而显著变化^[85]。这些 Nell-1 表达与肿瘤组织的关系使得 Nell-1 在肿瘤发生中的作用没有定论。然而, Nell-1 增加了 95-D 肺癌干细胞的化疗敏感性并抑制肾细胞癌细胞迁移和黏附^[82, 86]。因此, 需要进一步确定 Nell-1 与恶性肿瘤相关的功能特性, 特别是它在促进人类骨肉瘤患者切除后骨再生方面的利弊。

2.5.5 Nell-1 在神经发育与神经疾病中的应用进展 LI 等^[69] 研究发现 Nell-1 在神经母细胞瘤细胞系、胶质母细胞瘤细胞系和成人脑中表达; 新近发现 Nell-1 单核苷酸多态性与孤独症^[69]、双相情感障碍以及抑郁症的关系^[87-88], 进一步强调了 Nell-1 在神经系统中的潜在重要性。因此, 预计 Nell-1 在神经科学和神经细胞生物学领域的研究将取得重大进展。

3 结语 Conclusion

随着人口老龄化和肥胖症的日益增多, 骨关节炎较几十年前更加普遍, 因此造成了更为沉重的家庭和社会经济负担。传统的止痛方法因其不能减少炎症和软骨损伤, 因此都不足以用于根治性治疗。作为临床骨科医生, 充分认识理解骨关节炎的发病机制、疾病的进展及转归, 开展与基因工程、组织构建的生物学技术, 药剂科、分子生物学等多学科的讨论, 可以帮助开发更有效的治疗方案, 最终目的是解除骨关节炎患者的痛苦, 减轻个人及社会的经济负担。虽然对于 Nell-1 在骨关节炎发病机制中的新兴作用还处于初级阶段, 仍然存在缺乏最佳给药途径, 分子机制不完全清楚, 没有最佳的动物模型等不足, 但其具有抗炎和促进软骨生成的双重效力, 这 2 点是目前骨关节炎治疗药物都缺乏的, 因此其具有巨大的潜力来治疗骨关节炎, 以控制骨关节炎的进展。未来的研究应进一步揭示详细的潜在机制, 并优化剂量、方案和给药方法, 将 Nell-1 对于骨关节炎的治疗潜力转化为临床实践。

作者贡献: 唐小凯负责综述构思设计, 李伟明负责文章写作校对, 唐小凯参与文献收集、分析总结, 李伟明负责项目指导。全体作者都阅读并同意最终的文本。

经费支持: 该文章接受了“中国博士后科学基金项目 (2016M601449)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] PRIETO-ALHAMBRA D, JUDGE A, JAVAID MK, et al. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1659-1664.
- [2] HUNTER DJ, SCHOFIELD D, CALLANDER E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10(7):437-441.
- [3] MARCUS DM. Pharmacologic interventions for knee osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 2015;162(9):672.
- [4] INTERNATIONAL ORS. Osteoarthritis: A serious disease. Osteoarthritis Research Society International. 2016:1-103.
- [5] RUNCIMAN WB, HUNT TD, HANNAFORD NA, et al. CareTrack: assessing the appropriateness of health care delivery in Australia. *Med J Aust*. 2012;197(2):100-105.

- [6] DA COSTA BR, REICHENBACH S, KELLER N, et al. RETRACTED: Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis. *Lancet*. 2016;387(10033):2093-2105.
- [7] SCOTT DL. CHAPTER 70 – Arthritis in the Elderly. *Brocklehurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology (SEVENTH EDITION)*, 2010:566-576.
- [8] APPLETON CT. Osteoarthritis year in review 2017: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(3):296-303.
- [9] COOPER C, BARDIN T, BRANDI ML, et al. Balancing benefits and risks of glucocorticoids in rheumatic diseases and other inflammatory joint disorders: new insights from emerging data. An expert consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Aging Clin Exp Res*. 2016; 28(1):1-16.
- [10] MAZZIOTTI G, ANGELI A, BILEZIKIAN JP, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(4):144-149.
- [11] CHEVALIER X, RAVAUD P, MAHEU E, et al. Adalimumab in patients with hand osteoarthritis refractory to analgesics and NSAIDs: a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(9):1697-1705.
- [12] VAN LAAR M, PERGOLIZZI JV JR, MELLINGHOFF HU, et al. Pain treatment in arthritis-related pain: beyond NSAIDs. *Open Rheumatol J*. 2012;6:320-330.
- [13] LI C, ZOU M, ZHENG Z. Current medication for osteoarthritis. *Acta Scientific Orthopaedics*. 2018;1:9-12.
- [14] LI C, ZHENG Z. What's the future of osteoarthritis treatment. *Acta Scientific Orthopaedics*. 2018;1:1-2.
- [15] LI C, JIANG J, ZHENG Z, et al. Neural EGFL-Like 1 Is a Downstream Regulator of Runt-Related Transcription Factor 2 in Chondrogenic Differentiation and Maturation. *Am J Pathol*. 2017;187(5):963-972.
- [16] LI CS, ZHANG X, PÉAULT B, et al. Accelerated Chondrogenic Differentiation of Human Perivascular Stem Cells with NELL-1. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(3-4):272-285.
- [17] SIU RK, ZARA JN, HOU Y, et al. NELL-1 promotes cartilage regeneration in an in vivo rabbit model. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(3-4):252-261.
- [18] LI C, ZHENG Z, HA P, et al. Neural EGFL like 1 as a potential pro-chondrogenic, anti-inflammatory dual-functional disease-modifying osteoarthritis drug. *Biomaterials*. 2020;226:119541.
- [19] LI C, ZHENG Z, JIANG J, et al. Neural EGFL-Like 1 Regulates Cartilage Maturation through Runt-Related Transcription Factor 3-Mediated Indian Hedgehog Signaling. *Am J Pathol*. 2018;188(2):392-403.
- [20] LI C, ZHENG Z, ZHANG X, et al. Nfatc1 Is a Functional Transcriptional Factor Mediating Nell-1-Induced Runx3 Upregulation in Chondrocytes. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):168.
- [21] MARTEL-PELLETIER J, BARR AJ, CICUTTINI FM, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16072.
- [22] FU K, ROBBINS SR, MCDOUGALL JJ. Osteoarthritis: the genesis of pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(suppl_4):iv43-iv50.
- [23] LOESER RF, COLLINS JA, DIEKMANN BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(7):412-420.
- [24] HSIA AW, EMAMI AJ, TARKE FD, et al. Osteophytes and fracture calluses share developmental milestones and are diminished by unloading. *J Orthop Res*. 2018;36(2):699-710.
- [25] DEVEZA LA, LOESER RF. Is osteoarthritis one disease or a collection of many? *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(suppl_4):iv34-iv42.
- [26] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRA S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393 (10182):1745-1759.
- [27] SCANZELLO CR. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(1):79-85.
- [28] BIERMA-ZEINSTRA SM, VAN MIDDELKOOP M. Osteoarthritis: In search of phenotypes. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(12):705-706.
- [29] COURTIES A, SELLAM J, BERENBAUM F. Metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(2):214-222.
- [30] JEON OH, KIM C, LABERGE RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med*. 2017;23(6):775-781.
- [31] AKKIRAJU H, NOHE A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J Dev Biol*. 2015;3(4):177-192.
- [32] LEE M, SIU RK, TING K, et al. Effect of Nell-1 delivery on chondrocyte proliferation and cartilaginous extracellular matrix deposition. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(5):1791-1800.
- [33] WANG C, HOU W, GUO X, et al. Two-phase electrospinning to incorporate growth factors loaded chitosan nanoparticles into electrospun fibrous scaffolds for bioactivity retention and cartilage regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;79:507-515.
- [34] LI W, ZARA JN, SIU RK, et al. Nell-1 enhances bone regeneration in a rat critical-sized femoral segmental defect model. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(2):580-587.

- [35] SIU RK, LU SS, LI W, et al. Nell-1 protein promotes bone formation in a sheep spinal fusion model. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(7-8):1123-1135.
- [36] ZHU S, ZHANG B, MAN C, et al. NEL-like molecule-1-modified bone marrow mesenchymal stem cells/poly lactic-co-glycolic acid composite improves repair of large osteochondral defects in mandibular condyle. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(6):743-750.
- [37] OEGEMA TR JR, CARPENTER RJ, HOFMEISTER F, et al. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech*. 1997;37(4):324-332.
- [38] LI W, LEE M, WHANG J, et al. Delivery of lyophilized Nell-1 in a rat spinal fusion model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2861-2870.
- [39] PAN J, ZHOU X, LI W, et al. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J Orthop Res*. 2009;27(10):1347-1352.
- [40] QI H, KIM JK, HA P, et al. Inactivation of Nell-1 in Chondrocytes Significantly Impedes Appendicular Skeletogenesis. *J Bone Miner Res*. 2019;34(3):533-546.
- [41] DESAI J, SHANNON ME, JOHNSON MD, et al. Nell1-deficient mice have reduced expression of extracellular matrix proteins causing cranial and vertebral defects. *Hum Mol Genet*. 2006;15(8):1329-1341.
- [42] KIM EJ, CHO SW, SHIN JO, et al. Ihh and Runx2/Runx3 signaling interact to coordinate early chondrogenesis: a mouse model. *PLoS One*. 2013; 8(2):e55296.
- [43] KIM IS, OTTO F, ZABEL B, et al. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev*. 1999;80(2):159-170.
- [44] YOSHIDA CA, YAMAMOTO H, FUJITA T, et al. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*. 2004;18(8):952-963.
- [45] CHEN H, GHORI-JAVED FY, RASHID H, et al. Runx2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation. *J Bone Miner Res*. 2014;29(12):2653-2665.
- [46] WIGNER NA, SOUNG DO Y, EINHORN TA, et al. Functional role of Runx3 in the regulation of aggrecan expression during cartilage development. *J Cell Physiol*. 2013;228(11):2232-2242.
- [47] CHEN W, ZHANG X, SIU RK, et al. Nfatc2 is a primary response gene of Nell-1 regulating chondrogenesis in ATDC5 cells. *J Bone Miner Res*. 2011;26(6):1230-1241.
- [48] SOKOLOVE J, LEPUS CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013;5(2):77-94.
- [49] PEARSON MJ, HERNDLER-BRANDSTETTER D, TARIQ MA, et al. IL-6 secretion in osteoarthritis patients is mediated by chondrocyte-synovial fibroblast cross-talk and is enhanced by obesity. *Sci Rep*. 2017; 7(1):3451.
- [50] GOLDRING MB, OTERO M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-478.
- [51] WANG M, SAMPSON ER, JIN H, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):R5.
- [52] ALLEN KD, ADAMS SB JR, MATA BA, et al. Gait and behavior in an IL1 β -mediated model of rat knee arthritis and effects of an IL1 antagonist. *J Orthop Res*. 2011;29(5):694-703.
- [53] SHEN J, JAMES AW, ZARA JN, et al. BMP2-induced inflammation can be suppressed by the osteoinductive growth factor NELL-1. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(21-22):2390-2401.
- [54] JAMES AW, SHEN J, ZHANG X, et al. NELL-1 in the treatment of osteoporotic bone loss. *Nat Commun*. 2015;6:7362.
- [55] BEIER F. NFATs are good for your cartilage! *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(7):893-895.
- [56] WANG J, GARDNER BM, LU Q, et al. Transcription factor Nfat1 deficiency causes osteoarthritis through dysfunction of adult articular chondrocytes. *J Pathol*. 2009;219(2):163-172.
- [57] YOO SA, PARK BH, YOON HJ, et al. Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2299-2311.
- [58] MICLEA RL, SIEBELT M, FINOS L, et al. Inhibition of Gsk3 β in cartilage induces osteoarthritic features through activation of the canonical Wnt signaling pathway. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(11):1363-1372.
- [59] YAYKASLI KO, OOHASHI T, HIROHATA S, et al. ADAMTS9 activation by interleukin 1 beta via NFATc1 in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. *Mol Cell Biochem*. 2009;323(1-2):69-79.
- [60] GREENBLATT MB, RITTER SY, WRIGHT J, et al. NFATc1 and NFATc2 repress spontaneous osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(49):19914-19919.
- [61] AINI H, ITAKA K, FUJISAWA A, et al. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep*. 2016;6:18743.
- [62] KWAK JH, ZHANG Y, PARK J, et al. Pharmacokinetics and osteogenic potential of PEGylated NELL-1 in vivo after systemic administration. *Biomaterials*. 2015;57:73-83.
- [63] VIMALRAJ S, ARUMUGAM B, MIRANDA PJ, et al. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:202-208.
- [64] SHEN J, JAMES AW, ZHANG X, et al. Novel Wnt Regulator NEL-Like Molecule-1 Antagonizes Adipogenesis and Augments Osteogenesis Induced by Bone Morphogenetic Protein 2. *Am J Pathol*. 2016;186(2):419-434.
- [65] GREGORY MH, CAPITO N, KUROKI K, et al. A review of translational animal models for knee osteoarthritis. *Arthritis*. 2012;2012:764621.
- [66] KUYINU EL, NARAYANAN G, NAIR LS, et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*. 2016;11:19.
- [67] PUNZI L, GALOZZI P, LUISETTO R, et al. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. *RMD Open*. 2016;2(2):e000279.
- [68] PROFFEN BL, MCELFFRESH M, FLEMING BC, et al. A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *Knee*. 2012;19(4):493-499.
- [69] LI C, ZHENG Z, HA P, et al. Neurexin Superfamily Cell Membrane Receptor Contactin-Associated Protein Like-4 (Cntnap4) Is Involved in Neural EGFL-Like 1 (Nell-1)-Responsive Osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 2018;33(10):1813-1825.
- [70] LEE YH, BAE SC, KIM JH, et al. Meta-analysis of SLC22A4 and RUNX1 polymorphisms : Associations with rheumatoid arthritis susceptibility. *Z Rheumatol*. 2015;74(4):351-358.
- [71] BRANDT KD, RADIN EL, DIEPPE PA, et al. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(10):1261-1264.
- [72] ZHANG X, ZARA J, SIU RK, et al. The role of NELL-1, a growth factor associated with craniosynostosis, in promoting bone regeneration. *Version 2. J Dent Res*. 2010;89(9):865-878.
- [73] ZHANG J, CHEN Y, XU J, et al. Tissue engineering using 3D printed nano-bioactive glass loaded with NELL1 gene for repairing alveolar bone defects. *Regen Biomater*. 2018;5(4):213-220.
- [74] LEE S, ZHANG X, SHEN J, et al. Brief Report: Human Perivascular Stem Cells and Nel-Like Protein-1 Synergistically Enhance Spinal Fusion in Osteoporotic Rats. *Stem Cells*. 2015;33(10):3158-3163.
- [75] JAMES AW, SHEN J, TSUEI R, et al. NELL-1 induces Sca-1+ mesenchymal progenitor cell expansion in models of bone maintenance and repair. *JCI Insight*. 2017;2(12):e92573.
- [76] JAMES AW, LACHAUD G, SHEN J, et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016; 22(4):284-297.
- [77] PAKVASA M, ALVERDY A, MOSTAFA S, et al. Neural EGF-like protein 1 (NELL-1): Signaling crosstalk in mesenchymal stem cells and applications in regenerative medicine. *Version 2. Genes Dis*. 2017;4(3):127-137.
- [78] FAHMY-GARCIA S, VAN DRIEL M, WITTE-BUOMA J, et al. NELL-1, HMGB1, and CCN2 Enhance Migration and Vasculogenesis, But Not Osteogenic Differentiation Compared to BMP2. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(3-4):207-218.
- [79] GAO C, ZHANG Q, KONG D, et al. MALDI-TOF Mass Array Analysis of Nell-1 Promoter Methylation Patterns in Human Gastric Cancer. *Biomed Res Int*. 2015;2015:136941.
- [80] WANG Z, KAMBHAMPATI S, CHENG Y, et al. Methylation Biomarker Panel Performance in EsophagaCap Cytology Samples for Diagnosing Barrett's Esophagus: A Prospective Validation Study. *Clin Cancer Res*. 2019;25(7):2127-2135.
- [81] SLOVAK ML, BEDELL V, HSU YH, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(10):3443-3454.
- [82] NAKAMURA R, OYAMA T, TAJIRI R, et al. Expression and regulatory effects on cancer cell behavior of NELL1 and NELL2 in human renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2015;106(5):656-664.
- [83] TOMBOLAN L, POLI E, MARTINI P, et al. NELL1, whose high expression correlates with negative outcomes, has different methylation patterns in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Oncotarget*. 2017;8(20):33086-33099.
- [84] SHEN J, LACHAUD G, KHADARIAN K, et al. NELL-1 expression in benign and malignant bone tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 460(2):368-374.
- [85] SHEN J, LACHAUD G, SHRESTHA S, et al. NELL-1 expression in tumors of cartilage. *J Orthop*. 2015;12(Suppl 2):S223-229.
- [86] ZHAI Y, WEI R, SHA S, et al. Effect of NELL1 on lung cancer stem-like cell differentiation. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1817-1826.
- [87] MATHIEU F, ETAIN B, DIZIER MH, et al. Genetics of emotional reactivity in bipolar disorders. *J Affect Disord*. 2015;188:101-106.
- [88] LIN E, KUO PH, LIU YL, et al. A Deep Learning Approach for Predicting Antidepressant Response in Major Depression Using Clinical and Genetic Biomarkers. *Front Psychiatry*. 2018;9:290.