

· 基础研究 ·

神经生长因子对老年退变性膝骨关节炎疼痛模型的影响

马玉红¹, 张辉², 王兴博², 台会平²

(1. 甘肃省人民医院骨二科, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院创伤外科, 甘肃 兰州 730000)

【摘要】 目的:探讨体外模型评价神经生长因子(nerve growth factor, NGF)抗体在膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)疼痛模型中的作用。方法:选取 30 只 8 周龄雄性 SPF 大鼠,分为空白组 10 只;其余 20 只行右膝关节单碘乙酸(monoiodoacetate, MIA)注射,制备骨性关节炎疼痛模型。造模成功后,再根据干预方法不同分为对照组(生理盐水腹腔注射)、治疗组(抗 NGF 腹腔注射),每组 10 只。所有动物右膝关节进行荧光金(fluorogold, FG)逆行神经示踪剂注射。分别在治疗前,治疗后 1、2 周使用猫道步态分析系统评估步态。治疗后 3 周,从 L₃-L₅ 水平切除右背根神经节(dorsal root ganglia, DRG),进行降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)免疫染色,并计算 DRG 数量。结果:在使用猫道系统的步态分析中,与空白组相比,对照组、治疗组占空比、摆动速度和触地面积比率明显降低($P < 0.05$);与对照组相比,治疗组占空比、摆动速度明显改善($P < 0.05$),触地面积比率与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组中 FG 标记的 DRG 神经元数量高于治疗组和空白组($P < 0.05$);对照组 CGRP 表达上调,与治疗组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:腹腔注射抗 NGF 抗体抑制了步态损伤和 DRG 神经元中 CGRP 的上调。这些发现提示抗神经生长因子治疗可能对治疗膝关节炎疼痛有价值。NGF 可能是治疗 KOA 疼痛的重要靶点。

【关键词】 老年退变; 抗神经生长因子; 膝骨关节炎; 猫道步态分析; 疼痛

中图分类号:R684.3;R681

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.20220975

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of nerve growth factor on elderly degenerative knee osteoarthritis pain

MA Yu-hong¹, ZHANG Hui², WANG Xing-bo², TAI Hui-ping² (1. The Second Department of Orthopaedics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Department of Traumatology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China)

ABSTRACT Objective To explore effect of nerve growth factor (NGF) antibody on knee osteoarthritis (KOA) pain model was evaluated by in vitro model. **Methods** Thirty male SPF rats aged 28-week-old were divided into blank group (10 rats with anesthesia only). The other 20 rats were with monoiodoacetate (MIA) on the right knee joint to establish pain model of OA, and were randomly divided into control group (injected intraperitoneal injection of normal saline) and treatment group (injected anti-NGF) intraperitoneal after successful modeling, and 10 rats in each group. All rats were received retrograde injection of fluorogold (FG) into the right knee joint. Gait was assessed using catwalk gait analysis system before treatment, 1 and 2 weeks after treatment. Three weeks after treatment, right dorsal root ganglia (DRG) were excised on L₄-L₆ level, immunostained for calcitonin gene-related peptide (CGRP), and the number of DRGS was counted. **Results** In terms of gait analysis using cat track system, duty cycle, swing speed and print area ratio in control and treatment group were significantly reduced compared with blank group ($P < 0.05$). Compared with control group, duty cycle and swing speed of treatment group were significantly improved ($P < 0.05$), and there was no significant difference in print area ratio between treatment group and blank group ($P > 0.05$). The number of FG-labeled DRG neurons in control group was significantly higher than that in treatment group and blank group ($P < 0.05$). The expression of CGRP in control group was up-regulated, and differences were statistically significant compared with treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Intraperitoneal injection of anti-NGF antibody inhibited gait injury and upregulation of CGRP in DRG neurons. The results suggest that anti-nerve growth factor therapy may be of value in treating knee pain. NGF may be an important target for the treatment of knee OA pain.

KEYWORDS Senile degenerative; Anti-nerve growth factor; Knee osteoarthritis; Monoiodoacetate, CatWalk; Pain

基金项目:中央高校重点科研项目(编号:31920160111);甘肃省自然科学基金资助项目(编号:21JR7RA596)

Fund program:Key Research Projects of Central Universities(No. 31920160111)

通讯作者:台会平 E-mail:287487275@qq.com

Corresponding author:TAI Hui-ping E-mail:287487275@qq.com

膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的慢性退行性疾病,主要表现为关节软骨成分退行性变、滑膜炎、软骨下骨改建和关节肌肉萎缩。KOA 患者常伴有膝关节疼痛,治疗方法有药物治疗、关节内注射透明质酸和手术治疗^[1]。目前对 KOA 疼痛机制的认识还不完全,治疗 KOA 的药物也不完善。作为 KOA 疼痛新靶点研究的一部分,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)不仅在感觉神经系统的维持和发育中起着重要作用^[2-3],也是炎症和伤害性反应的主要因素^[4]。笔者假设抗 NGF 治疗对 KOA 大鼠模型的膝关节疼痛有效。本研究自 2020 年 8 月至 2022 年 3 月通过建立 KOA 疼痛大鼠动物模型,采用猫道步态分析系统和大鼠感觉神经系统免疫组化分析检测,探讨 NGF 抗体与 KOA 疼痛行为之间的联系。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)抗体、胎牛血清、山羊抗 Rabbit Alexa 488 荧光抗体结合物、Neurobasal 培养基(Gibco 公司),单碘乙酸(monoiodoacetate, MIA)、神经元特异性烯醇化酶、邻苯二甲酸二烯丙酯(diallyl Phthalate, DAP),Fluo-3/AM (intracellular calcium fluorescence probe)(Sigma 公司),Neurotacer FG(Biovision 公司),NGF 抗体、胶质纤维酸性蛋白、兔抗 NGF 单克隆抗体、兔抗神经生长因子低亲和力受体抗体(Chemicon 公司),猫道系统(荷兰瓦赫宁根 Noldus 信息技术公司),CKX41 倒置相差生物显微镜、TCP-SP2 激光共聚焦显微镜(BD 公司),超滤离心管(Millipore 公司),流式细胞仪(Olympus 公司)。

1.2 实验动物与分组

选取 8 周龄雄性 SPF 级大鼠 30 只,体重 110~130 g,购自甘肃中医药大学实验动物中心[动物实验合格证号:SYXK(甘)2018-0012]。饲养条件:室温(22±2)℃,相对湿度(60±10)%,灭菌饲料喂养。根据干预方法不同分为空白组(10 只),只麻醉不进行造模;将剩余 20 只大鼠造模,造模 3 周后再分为对照组和治疗组(各 10 只)。分组后 1 周根据干预方法不同,对照组给予无菌生理盐水 10 mg·kg⁻¹ 腹腔注射;治疗组给予抗 NGF 抗体 10 mg·kg⁻¹ 腹腔注射;两组均为一次性给药。动物实验遵循甘肃省人民医院伦理委员会动物操作及处置规范(伦理批号:2022-308)。

1.3 KOA 疼痛模型造模方法

对 SPF 级大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹ 麻醉,严格无菌操作,选择右侧膝关节造模。屈膝成

90°,将 0.2 mg 的 MIA 溶于 25 μl 无菌生理盐水中,用 27 G 针以 50 μl·kg⁻¹ 注入膝关节间隙。3 周后,组织学检查显示大鼠膝关节呈现 OA 样表现^[4],建立 KOA 疼痛模型。注射 MIA 同时,3 组大鼠关节腔内注射 2% 的荧光金(fluorogold, FG)逆行神经示踪剂。

1.4 检测项目与方法

1.4.1 行为评估 使用猫道系统^[5]对步态进行分析。3 组大鼠分别于治疗前、治疗后 1、2 周被放在黑暗房间的玻璃板上行走 1 次。荧光灯发出的光束穿过玻璃板,当爪子接触玻璃板时,光束向下反射,产生一个清晰明亮的爪印图像。整个跑步过程都用摄像机记录下来。使用 CatWalk 软件采集、压缩和分析数据^[6]。比较 3 组大鼠同侧和对侧后爪的运动比率:(1)占空比(站立占活动时间的百分比=站立时间/规定观察时间×100%)。(2)摆动速度(规定时间摆动爪的频次:摆动次数/摆动时间)。(3)触地面积,完整印刷的足印。

1.4.2 背根神经节神经元标记及检测 按照程序进行相关麻醉、灌注、切片、免疫染色以及免疫反应神经元的观察和评估^[7]。治疗后 3 周,戊巴比妥钠麻醉,切除 L₃-L₅ 水平的右侧背根神经节(dorsal root ganglia, DRG),标本在(0.1 M, pH7.4)4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)中 4℃ 浸泡过夜,后移至含有 20%蔗糖的 PBS(4℃)中 20 h。DRG 在低温恒温器上以 10 μm 的厚度切片,并安装在 POLY-L 赖氨酸包被玻片上。内源性组织过氧化物酶活性通过 0.3% 过氧化氢溶液中浸泡切片 30 min 来猝灭。然后将样品在室温下在包含 0.3% Triton X-100 和 3% 脱脂乳的 0.01 M 的 PBS 的封闭溶液中处理 90 min。在封闭溶液中稀释的 CGRP 兔抗体对切片进行 CGRP 免疫组化处理,并在 4℃ 下培养 20 h。切片用山羊抗 Rabbit Alexa 488 荧光抗体结合物孵育 3 h。30 个 DRG 切片,采用计算网格在×400 放大率下,随机选择 10 个区域,计算所有荧光金标记神经元的数量以及每 0.45 mm² 的荧光金标记和 CGRP 免疫反应神经元的数量。计算 FGRP 标记的 DRG 神经元和 CGRP-IR 标记的 DRG 神经元在所有 FGRP 标记神经元中的比例。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的定量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。占空比、摆动速度和触地面积 3 个猫道变量的同侧和对侧后爪值的比值,采用非重复测量方差分析比较 3 组间 FG 标记 DRG 神经元和 CGRP-IR DRG 神经元的比例。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组行为评估

对照组在治疗前, 治疗后 1、2 周时同侧与对侧后足占空比明显低于空白组 ($P<0.05$)。而治疗组同侧与对侧后足占空比在治疗前较对照组显著降低 ($P<0.05$), 在治疗后 1、2 周时与对照组比较, 其比值显著提高 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组不同时间同侧与对侧占空比值比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of the ratio of ipsilateral and contralateral duty ratio at different time points in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	治疗前	治疗后 1 周	治疗后 2 周
空白组	10	99.24±0.09	95.01±0.03	96.84±0.18
对照组	10	94.01±0.35 ^{a1}	82.75±0.22 ^{a2}	80.44±0.45 ^{a3}
治疗组	10	90.57±0.11 ^{b1*}	94.86±0.78 ^{b2}	96.18±0.65 ^{b3}
F 值		18.273	14.495	2.688
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与空白组比较, ^{a1} $t=20.54, P<0.05$; ^{a2} $t=77.80, P<0.05$; ^{a3} $t=47.57, P<0.05$; 与对照组比较, ^{b1} $t=19.89, P<0.05$; ^{b2} $t=15.69, P<0.05$; ^{b3} $t=26.68, P<0.05$; *与空白组比较, $P<0.05$

与空白组相比, 对照组在治疗前, 治疗后 1、2 周时, 同侧与对侧后足摆速度比值均明显降低 ($P<0.05$)。治疗组在治疗前与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 治疗后 1、2 周则明显高于对照组 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 各组不同时间同侧与对侧摆动速度比值比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of the ratio of ipsilateral and contralateral swing speed at different time points in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	治疗前	治疗后 1 周	治疗后 2 周
空白组	10	99.24±0.21	98.01±0.09	97.34±0.18
对照组	10	91.01±0.44 ^{a1}	82.08±0.34 ^{a2}	80.44±0.45 ^{a3}
治疗组	10	90.56±0.21 ^{b1*}	97.96±0.70 ^{b2}	96.88±0.35 ^{b3}
F 值		8.688	6.495	9.729
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与空白组比较, ^{a1} $t=23.89, P<0.05$; ^{a2} $t=64.64, P<0.05$; ^{a3} $t=49.02, P<0.05$; 与对照组比较, ^{b1} $t=1.30, P>0.05$; ^{b2} $t=25.68, P<0.05$; ^{b3} $t=32.23, P<0.05$; *与空白组比较, $P<0.05$

与空白组相比, 对照组治疗前, 治疗后 1、2 周时, 同侧和对侧后足印面积值均明显降低 ($P<0.05$); 治疗组在治疗前与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 治疗后 1、2 周明显高于对照组 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组不同时间同侧与对侧触地面积比值比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comprison of the ratio of ipsilateral and coretrateral print area at different time points in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	治疗前	治疗后 1 周	治疗后 2 周
空白组	10	99.78±0.03	99.01±0.64	99.34±0.16
对照组	10	91.01±0.17 ^{a1}	82.75±0.22 ^{a2}	80.44±0.45 ^{a3}
治疗组	10	90.57±0.89 ^{b1*}	98.76±0.78 ^{b2}	98.28±0.15 ^{b3}
F 值		6.244	2.502	1.682
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与空白组比较, ^{a1} $t=73.00, P<0.05$; ^{a2} $t=34.02, P<0.05$; ^{a3} $t=55.48, P<0.05$; 与对照组比较, ^{b1} $t=0.69, P>0.05$; ^{b2} $t=16.83, P<0.05$; ^{b3} $t=56.24, P<0.05$; *与空白组比较, $P<0.05$

2.2 DRG 神经元比较

治疗后 3 周, 3 组 FG 标记的 DRG 神经元显示 FG 从右膝运输到右侧 L₃-L₅ DRG 中, 见图 1。与空白组相比, 对照组 FG 标记/CGRP-IR 神经元在所有 FG 标记神经元中的比例显著增加。治疗组中 CGRP 的表达明显低于对照组 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组治疗后 3 周 DRG 神经元占比比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Comparison of the proportion of DRG neurons in each group at 3 weens after treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	DRG 神经元占比
空白组	10	16.34±0.14
对照组	10	42.44±0.75
治疗组	10	24.28±0.38
F 值		8.102
P 值		<0.05

注: 对照组与空白组比较, $t=48.32, P<0.05$; 治疗组与对照组比较, $t=30.58, P<0.05$

3 讨论

KOA 疼痛是临床上极为常见的骨科多发病, 其临床表现往往差异很大, 且有时疼痛剧烈, 严重影响了患者的生活质量。膝关节退变是疼痛最根本的诱因之一, 但是膝关节退变本身并不是临床干预的依据, 至少在目前无有效的干预措施, 缓解疼痛症状仍是临床治疗的重点。研究认为^[8], NGF 是未成熟神经元的存活因子, 它对所有初级感觉性伤害感受器都是必需的。NGF 的两种受体在介导炎性疼痛的过程中均起到重要作用。有研究证实^[9], NGF 可以促进神经轴突生长, 由于炎症能够导致 NGF 增加, 因此, 能够导致痛觉过敏, 全身注射 NGF 可引起热痛觉过敏和机械性痛觉过敏, 全身注射抗 NGF 抗体可减少神经病理性疼痛动物模型的痛觉超敏和痛觉过敏神。

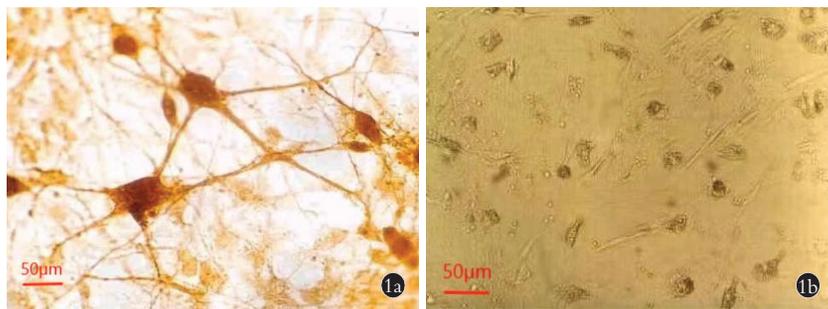


图 1 治疗后 3 周 DRG 神经元组织学观察 1a. 代表性的 DRG 神经元免疫组化染色($\times 400$) 1b. FG 和 CGRP 双重标记的 DRG 神经元免疫组化染色($\times 200$)

Fig.1 Histological observation of DRG neurons at 3 weeks after treatment 1a. Representative DRG neurons immunohistochemical staining ($\times 400$) 1b. Both FG and CGRP labeled DRG neurons immunohistochemical staining($\times 200$)

而退变膝关节中炎症介质的含量远远高于正常组织,炎症也是 OA 疼痛的促进因素之一。

3.1 关于 KOA 模型

KOA 的基础研究得到了一些动物模型的发展,包括前交叉韧带横断模型^[10]、内侧半月板失稳模型^[11]、大鼠医学半月板撕裂模型^[12]、生长分化因子-5 缺乏小鼠^[13]和 MIA 注射模型^[14-16]。有研究表明,MIA 注射模型会导致进行性关节损伤,其特征被认为与 OA 相似^[17-19],并具有明显的疼痛相关行为。尽管包括医学半月板模型在内的动物模型似乎更接近人类 OA 中发现的解剖病理学,但 MIA 注射模型在评估膝关节疼痛方面更为优越。据报道,向膝关节注射 MIA 可通过抑制糖酵解引起关节病变,从而靶向无血管软骨并导致软骨细胞死亡^[20]。MIA 治疗的膝关节在 4 d 内出现行为障碍,在 4 周内出现 OA 组织学改变。因此,本研究使用 MIA 注射模型作为 KOA 模型的制备方法。

3.2 关于膝关节疼痛行为

有作者使用 von-Frey 测试报道膝关节疼痛模型表现出机械性痛觉超敏^[21]。此外,SHELTON 等^[22]报道了 NGF 诱导的自身免疫性关节炎机械性痛觉超敏。因此,用 von-Frey 试验评估膝关节疼痛似乎适合用动物模型进行基础研究。然而,这些膝关节疼痛模型是否能模拟临床情况存在疑问,因为 KOA 患者通常不会反映他们的足部机械性痛觉超敏。近年来,步态分析的研究主要集中在行为学研究,以评估疼痛行为。猫道系统最初是为了评估运动功能而开发的^[23-24],近年来,该系统已应用于实际生产中评估疼痛相关行为的各种模型,如机械性痛觉超敏模型^[25]。近几年猫道系统也用于评估与膝关节疼痛相关的行为^[26]。因此,本研究比较了 3 组中同侧和对侧后爪占空比、摆动速度和触地面积这 3 个变量的比率,以评估抗 NGF 治疗的效果。

3.3 关于感觉神经系统中 CGRP 的上调

先前通过免疫组织化学和逆行追踪相结合的方法评估感觉神经系统中与疼痛相关的神经肽(如 CGRP 和 P 物质)的上调来评估潜在的疼痛样状态,而不是评估疼痛行为。CGRP-IR DRG 神经元是 NGF 依赖性 DRG 神经元,参与炎症相关的疼痛感知^[27],表明 CGRP 是炎症性疼痛的标志物。以前曾有过报道向膝关节注射 MIA 可诱导 DRGs 中 CGRP 的上调。这些结果表明,接受 MIA 膝关节注射组

的动物处于膝关节疼痛状态。

3.4 抗 NGF 改善 KOA 疼痛的作用机制

本研究将 NGF 作为治疗 KOA 疼痛的靶点,这正是基于 MIA 注射诱导炎症细胞因子的上调,还诱导膝关节 NGF 的上调。一些基础和临床研究报道了抗 NGF 治疗 KOA 疼痛的疗效^[28-29]。NGF 在关节结构中产生并在正常和 OA 滑膜组织中表达,但在滑膜炎症中增加,尤其是在滑膜组织暴露于包括 TNF- α 在内的炎症细胞因子时^[30]。因此,KOA 性细胞因子的上调促进了 NGF 的产生,从而诱导感觉神经系统 CGRP 的上调和慢性炎症或神经病理性疼痛状态,NGF 注入 KOA 关节导致步态障碍。这些发现表明炎症性细胞因子包括 TNF 可能只在疼痛状态下产生,但 NGF 可能在 KOA 患者疼痛状态的维持和发展中发挥作用。因此,NGF 可能是治疗 KOA 疼痛的重要靶点。本研究膝关节注射 MIA 可导致小鼠步态损伤及 DRG 神经元 CGRP 上调,而腹腔注射抗 NGF 抗体可抑制 DRG 神经元步态损伤和 CGRP 的上调。全身注射抗 NGF 抗体可改善这种步态障碍,并改善 DRG 神经元神经肽的表达。这些发现表明抗 NGF 治疗在 KOA 疼痛的治疗中可能有效。

3.5 本研究的局限性

KOA 病因复杂,关节软骨退变病程漫长,临床干预治疗种类繁多,疗效不一。本研究未设阳性对照,对比目前临床指南推荐的一线用药包括非甾体抗炎药对 KOA 疼痛的疗效。其次,本研究仅仅评估了一次性注射抗 NGF 抗体的疗效。今后,有必要对重复注射治疗膝关节疼痛的效果进行评估。第三,未评估膝关节的组织病理学结果,有待进一步完善。

参考文献

- [1] 张洪美. 膝关节关节炎的规范诊治与阶梯治疗[J]. 中国骨伤, 2019,32(5):391-395.

ZHANG H M. Standardized diagnosis-therapy and stepwise treat-

- ment for knee osteoarthritis[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2019, 32(5):391-395. Chinese.
- [2] NAKAWAKI M, UCHIDA K, MIYAGI M, et al. Sequential CCL2 expression profile after disc injury in mice[J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(4):895-901.
- [3] NAKAWAKI M, UCHIDA K, MIYAGI M, et al. Changes in nerve growth factor expression and macrophage phenotype following intervertebral disc injury in mice[J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(8):1798-1804.
- [4] KAWAKUBO A, UCHIDA K, MIYAGI M, et al. Investigation of resident and recruited macrophages following disc injury in mice[J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(8):1703-1709.
- [5] HAMERS F P, LANKHORST A J, VAN LAAR T J, et al. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries[J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(2):187-201.
- [6] MIYAGI M, ISHIKAWA T, KAMODA H, et al. Assessment of gait in a rat model of myofascial inflammation using the CatWalk system[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(21):1760-1764.
- [7] MIYAGI M, ISHIKAWA T, ORITA S, et al. Disk injury in rats produces persistent increases in pain-related neuropeptides in dorsal root Ganglia and spinal cord glia but only transient increases in inflammatory mediators: pathomechanism of chronic diskogenic low back pain[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(26):2260-2266.
- [8] SILVA M J, HOLGUIN N. Aging aggravates intervertebral disc degeneration by regulating transcription factors toward chondrogenesis[J]. *FASEB J*, 2020, 34(2):1970-1982.
- [9] PURMESSUR D, FREEMONT A J, HOYLAND J A. Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4):R99.
- [10] MURAMATSU Y, SASHO T, SAITO M, et al. Preventive effects of hyaluronan from deterioration of gait parameters in surgically induced mice osteoarthritic knee model[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(6):831-835.
- [11] SEKIGUCHI H, INOUE G, SHOJI S, et al. Expression of nerve growth factor in the callus during fracture healing in a fracture model in aged mice[J]. *Biomed Mater Eng*, 2022, 33(2):131-137.
- [12] DAANS M, LUYTEN F P, LORIES R J U. GDF5 deficiency in mice is associated with instability-driven joint damage, gait and subchondral bone changes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1):208-213.
- [13] ABAEI M, SAGAR D R, STOCKLEY E G, et al. Neural correlates of hyperalgesia in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain[J]. *Mol Pain*, 2016, 12:1744806916642445.
- [14] UCHIDA K, TAKANO S, TAKATA K, et al. Differential synovial CGRP/RAMP1 expression in men and women with knee osteoarthritis[J]. *Cureus*, 2021, 13(6):e15483.
- [15] GUZMAN R E, EVANS M G, BOVE S, et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis[J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31(6):619-624.
- [16] ORITA S, ISHIKAWA T, MIYAGI M, et al. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2011, 12:134.
- [17] KIMMERLING K A, GOMOLL A H, FARR J, et al. Amniotic suspension allograft modulates inflammation in a rat pain model of osteoarthritis[J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(5):1141-1149.
- [18] HAWKER G A. Osteoarthritis is a serious disease[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 Suppl 120(5):3-6.
- [19] CHARLIER E, DEROYER C, CIREGIA F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis(OA)[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165:49-65.
- [20] YOKOZEKI Y, UCHIDA K, KAWAKUBO A, et al. TGF- β regulates nerve growth factor expression in a mouse intervertebral disc injury model[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1):634.
- [21] MARIJNISSEN A C, VAN ROERMUND P M, TEKOPPELE J M, et al. The canine 'groove' model, compared with the ACLT model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(2):145-155.
- [22] SHELTON D L, ZELLER J, HO W H, et al. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis[J]. *Pain*, 2005, 116(1/2):8-16.
- [23] CENDELÍN J, VOLLER J, VOŽEH F. Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration[J]. *Behav Brain Res*, 2010, 210(1):8-15.
- [24] CHUANG C S, SU H L, CHENG F C, et al. Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease[J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17(1):9.
- [25] VRINTEN D H, HAMERS F F T. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing[J]. *Pain*, 2003, 102(1/2):203-209.
- [26] BÄRMANN J, WALTER H L, PIKHOVYCH A, et al. An analysis of the CatWalk XT and a composite score to assess neurofunctional deficits after photothrombosis in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2021, 751:135811.
- [27] TAKANO S, UCHIDA K, ITAKURA M, et al. Transforming growth factor- β stimulates nerve growth factor production in osteoarthritic synovium[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2019, 20(1):204.
- [28] ISHIKAWA G, KOYA Y, TANAKA H, et al. Long-term analgesic effect of a single dose of anti-NGF antibody on pain during motion without notable suppression of joint edema and lesion in a rat model of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(6):925-932.
- [29] SCHNITZER T J, MARKS J A. A systematic review of the efficacy and general safety of antibodies to NGF in the treatment of OA of the hip or knee[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2015, 23:S8-S17.
- [30] TAKANO S, UCHIDA K, MIYAGI M, et al. Nerve growth factor regulation by TNF- α and IL-1 β in synovial macrophages and fibroblasts in osteoarthritic mice[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016:5706359.

(收稿日期:2022-11-02 本文编辑:朱嘉)