猪Ⅱ型胶原及胶原肽抗关节炎的研究

刘安军，宋晓娣，郑捷，王子健，杜佳佳，郭晶，王跃猛，韩悦
（天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300457）

摘要：本实验以猪鼻骨为原料，采用盐析法提取天然Ⅱ型胶原蛋白，采用碱性蛋白酶酶解制备胶原肽，并测定胶原蛋白的纯度，分析胶原蛋白及胶原肽的理化性质。通过构建小鼠 CIA 动物模型，研究Ⅱ型胶原蛋白及胶原肽对类风湿性关节炎的作用效果。结果表明，提取所得蛋白的胶原蛋白含量为 82.86%，在紫外波长 230 nm 下有最大吸收峰，280 nm 处几乎无吸收峰，分子量大于 300KD，具备天然Ⅱ型胶原蛋白特征；酶解得胶原肽不含Ⅱ型胶原蛋白，分子量小于 20 KD；Ⅱ型胶原蛋白能够降低小鼠关节指数、降低关节变形率，明显降低小鼠血清中 IL-17、MMP-3 和 TNF-α 水平（$p<0.05$），并能显著提高 T 细胞刺激指数（$P<0.05$），对 B 细胞刺激指数无明显效果（$p>0.05$）；组织病理学显示Ⅱ型胶原蛋白能够减轻关节破坏程度，抑制软骨退化；而胶原肽不具有以上作用。

关键词：Ⅱ型胶原蛋白；胶原肽；类风湿性关节炎；IL-17；MMP-3；TNF-α；淋巴细胞
文章篇号：1673-9078(2014)3-1-6

Mechanism of Porcine Collagen Type Ⅱ and Collagen Peptide on Anti-arthritis

LIU An-jun, SONG Xiao-di, ZHENG Jie, WANG Zi-jian, DU Jia-jia, GUO Jing, WANG Yue-meng, HAN Yue
(Department of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Collagen was extracted from pig cartilage by salting out, and collagen peptide was hydrolyzed by alkaline protease. Collagen purity and the physicochemical properties of collagen and peptide were analyzed. The effect of anti-arthritic was studied by constructing CIA model. 82.86% of collagen was obtained, with molecular weight of more than 300 KD.The maximum absorption peak of UV was at 230 nm, and no obvious absorption peak was observed at 280 nm. Therefore the extracted collagen possessed the characteristics of natural collagen type Ⅱ, while the molecular weight of collagen peptide was less than 20 KD and no collagen type Ⅱ was observed. Collagen type Ⅱ could reduce index score and joint deformation rate, and significantly reduce IL-17, MMP-3 and TNF-α levels. In addition, Collagen type Ⅱ could significantly increase the T cell stimulation index ($P<0.05$), but had no effect on B cell stimulation index ($p>0.05$). Tissue sections showed that Collagen type Ⅱ could reduce destruction of joint and inhibit cartilage degradation. However, no such funcions were found with collagen peptide .

Key words: collagen type Ⅱ; collagen peptide; rheumatoid arthritis; IL-17; MMP-3;TNF-α; immune cell

类风湿性关节炎（RA）是一种慢性、系统性的自身免疫性疾病，主要症状为关节及关节周围组织炎症，并伴随连续性滑膜炎正及关节软骨和骨的破坏。RA 的发病机理难以阐明，病因尚不明确，目前采用的治疗方法不能将其根治，且具有部分毒副作用[1]，在临床治疗上有相当大的弊端。近年来，免疫调节作用类的药物作为治疗 RA 的首选药物倍受青睐，越来越多的学者对新型的类风湿关节炎免疫治疗方法进行了更进一步的研究[2~3]。1993 年美国科学家在 Science 上刊登了采用天然鸡Ⅱ胶原蛋白(CⅡ)治疗RA患者获得显著疗效[4]，这一新疗法引起了世界科学工作者的高度重视。据相关报道，口服牛源和鸡源Ⅱ型胶原蛋白均能使机体产生口服耐受[5]，因为口服胶原蛋白可诱导外周免疫系统产生抗原特异性无反应状态，引起机体对该抗原产生全身性低免疫应答状态，降低炎症细胞数，从而预防关节炎。国外有报道称在类风湿患者体内存在抗Ⅱ型胶原蛋白的自身抗体，该抗体水平含量的高低可表明机体炎症严重的程度[6]。临床研究表明，CⅡ具有一定预防抑制 RA 效果，其疗效与CⅡ来源、剂量等有关[7]。因此，CⅡ预防类风湿性关节炎有待进一步研究。

猪鼻软骨主要由Ⅱ型胶原蛋白和软骨多糖构成。目前对Ⅱ型胶原蛋白抗关节炎功能研究主要集中在鸡

收稿日期：2013-10-22

作者简介：刘安军（1963-），男，博士，教授，主要从事天然产物提取与作用机理研究

通讯作者：宋晓娣（1989-），女，硕士，主要从事蛋白提取与功能食品研究

软骨Ⅱ型胶原蛋白上，对猪软骨Ⅱ型胶原蛋白防治RA 效果研究较少。本研究以猪鼻软骨为原料提取天然Ⅱ型胶原蛋白，并以碱性蛋白酶酶解制备胶原肽。通过构建小鼠CIA动物模型探讨Ⅱ型胶原蛋白及胶原肽对 RA 的预防作用。本文的研究内容具有一定的实用价值和应用前景，旨在为RA 预防治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

猪鼻骨，购于市场。

1.1.2 试验用动物

雌性昆明小鼠 40 只，体重为 20±2 g，购自天津山川红有限公司，SCXK（津）0004032。

1.1.3 试剂

弗氏完全佐剂、ConA、LPS、MTT、L-羟脯氨酸、苏木精、醇溶性伊红，美国 sigma 公司；1L-17、IL-10、MMP-3、TNF-α 试剂盒，上海森雄科技实业有限公司；碱性蛋白酶，天津奥诺科技发展有限公司；石蜡，上海标本模型厂；其他试剂为国产分析纯，天津江天试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

酶标仪，Thermo Electron，美国；紫外扫描仪，DXYGF22A，北京；组织切片机，LEICA，浙江；台式离心机，TGL-16C，上海；垂直电泳槽，DYCZ2，上海；凝胶成像仪，Bio-rad，美国；激光共聚焦显微镜，Nikon，日本。

1.3 方法

1.3.1 Ⅱ型胶原蛋白的提取及胶原肽的制备

猪鼻软骨去除杂质后粉碎冷冻干燥成猪软骨粉。将软骨粉末包好浸泡于乙醚中，8 h 后于 20 ℃温度下烘干去脂肪。后于 1.5 mol/L NaCl 中浸泡去除软骨中的杂蛋白等。将处理好的骨粉在 2.5 mol/L NaCl 常温下浸泡 30 h，盐析获得沉淀经冷冻干燥即为Ⅱ型胶原蛋白。

取Ⅱ型胶原蛋白，按照 4%的加酶量加入碱性蛋白酶，料液比为 1:50（*m/V*），pH 为 9，温度 55 ℃，震荡酶解 4 h。酶解结束后，加热微沸灭酶。用 80%乙醇醇沉除酶，4 ℃下静置过夜，离心弃去沉淀取上清液，于旋转蒸发仪内 40 ℃旋蒸除去乙醇，酶解液冻干后获得胶原肽。

1.3.2 胶原含量测定

准确称取 10 mg 样品加入 10 mL 浓硫酸于具塞平地烧瓶中，置于 100 ℃烘箱分解 24 h 后，蒸馏水定容至 100 mL，即为待测液。以 L-羟脯氨酸为标准品，按照羟脯氨酸法[8]绘制标准曲线，测定羟脯氨酸含量。根据公式 1 换算成胶原蛋白含量。

$$\text{胶原纯度}=\frac{CVF}{m_0\times 1000}\times 100\% \quad (1)$$

注：C 为羟脯氨酸浓度（μg/mL）；V 为 100 mL；m_0-样品质量（mg）；F 为 11.1 换算系数。

1.3.3 紫外光谱（UV-VIS）分析

取适量Ⅱ型胶原蛋白，用 0.5 mol/L 冰乙酸配制成 2 mg/mL 的待测液，于 200~400 nm 波长范围内进行紫外扫描，分辨率为 1 nm，并根据吸光度绘制紫外光谱图。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳分析

采用垂直电泳进行试验。分别配制 2 mg/mL 的胶原蛋白和胶原肽待测溶液（上样缓冲液做溶剂），沸水浴内加热 4 min，冷却离心备用。采用 7%丙烯酰胺对胶原蛋白进行电泳分析，12%丙烯酰胺对胶原肽进行分析。考马斯亮蓝染色，甲醇-乙酸脱色液进行脱色。

1.3.5 试验分组及模型构建

40 只昆明小鼠，普通饲料喂养 1 周后，随机分为 4 组。Ⅱ型胶原蛋白和胶原肽溶于蒸馏水，按照 100 mg/(kg·d)的剂量计算给药量。空白组和模型组每天灌胃同等量的蒸馏水。给药灌胃两周后，构建 CIA 动物模型，于造模第 1 d 和造模后第 21 d 在模型组和给药各组小鼠右后足底分别注射 0.1 mL 乳剂（2 mg/mL 胶原蛋白的浓度为与弗氏完全佐剂等体积混合，4 ℃下乳化过夜），空白组不做处理。

1.3.6 关节指标的测定

造模后用游标卡尺每天测量小鼠足底厚度，观察关节炎的发生情况。并根据五级评分法计算小鼠关节指数变化，与正常小鼠比较，1 分为厚度增加 0~0.1 cm、轻度红肿；2 分为厚度增加 0.1~0.2 cm、中度红肿；3 分为厚度增加 0.2~0.3 cm、中重度红肿；4 分为厚度增加 0.3 cm 以上、重度红肿、关节变形。根据公式 2 计算小鼠关节变形率。

$$\text{关节变形率}=\frac{\text{组内关节变形小鼠数量}}{\text{该组小鼠总数}} \quad (2)$$

1.3.7 关节组织形态学观察

模型建立完成 14 d 后，小鼠眼球取血，麻醉后断颈处死。取小鼠足部关节于 3.7%醇溶液中固定 3 h，10%盐酸福尔马林溶液脱钙 14 h，流水过夜。脱水后石蜡包埋，组织切片（厚度为 10 μm），进行 HE 染色。染色后，于显微镜下观察组织形态。

1.3.8 血清指标的测定

模型建立完成 14 d 后，小鼠眼球取血，麻醉后断颈处死，测定血清中 IL-17、1L-10、MMP-3 和 TNF-α 含量。四个指标均采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定。

数据分析：实验数据以均数±标准偏差表示；组间差异的比较采用软件 spss19.0 进行统计分析。检验水平为 P<0.05 时为显出差异，具有统计学意义。

1.3.9 淋巴细胞增殖能力测定

模型建立完成 14 d 后，小鼠眼球取血，麻醉后断颈处死。于无菌操作台内，无菌取脾，研磨后裂解红细胞，制备成脾细胞悬液，（1×10^7 cells/mL）。每孔加入细胞悬液 100 μL。T 细胞转化试验中，试验孔加入 ConA（10 μg/mL）100 μL/well；对照孔加入 RPMI1640 完全培养液 100 μL/well。于 5% CO_2 培养箱内 37 ℃培养 44 h，离心弃上清液，加入 MTT（5 mg/mL）20 μL/well，培养 4 h，离心弃上清液。加入 DMSO 150 μL/well，混匀静置 20 min，于 570 nm 读数。B 细胞转化试验将 ConA 替换成 LPS（20 μg/mL），其余步骤同 T 细胞转化试验。按照公式 3 计算刺激指数。

$$\text{刺激指数}\ (SI)=\frac{\text{试验孔吸光度}}{\text{对照孔吸光度}} \tag{3}$$

数据分析：实验数据以均数±标准偏差表示；组间差异的比较采用软件 spss19.0 进行统计分析。检验水平为 P<0.05 时为显出差异，具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 胶原含量测定结果

按照上述方法测定标准曲线如图 1 所示，测得样品中羟脯氨酸含量，按照公式 1 计算得样品胶原含量为 82.86%。

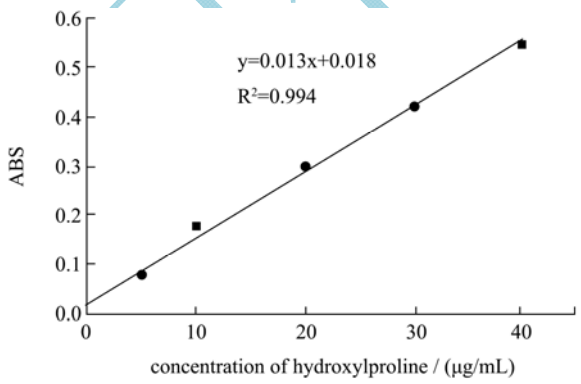


图 1 羟脯氨酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of hydroxylproline

2.2 紫外全波长扫描结果

如图 2 所示，样品在 230 nm 处有最大吸收峰，这是蛋白质酰胺键的特征吸收峰，说明结构中含有胶原链的 CO-、COOH-、-NH 等生色基团；在 280 nm 下基本没有吸收峰，说明样品中芳香族氨基酸含量较低，符合胶原蛋白的氨基酸组成。

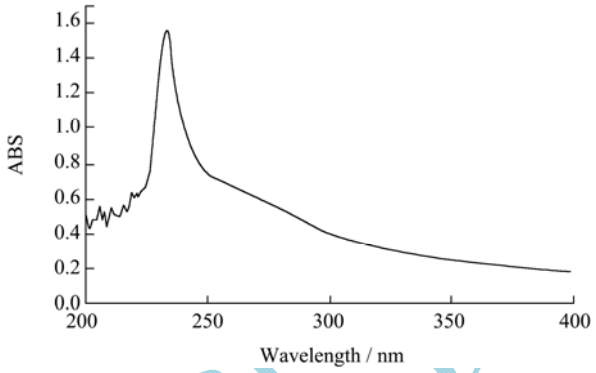


图 2 Ⅱ型胶原蛋白紫外全波长扫描图

Fig.2 UV spectrum of type Ⅱ collagen

2.3 Ⅱ型胶原蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Ⅱ型胶原蛋白的三股螺旋结构是有三条相同的 α1 链构成的，如图 3 所示，样品含有 α1 链和它的聚合链 β 链。α1 链的分子量为约 150 KD，β 链分子量大于 220 KD。图谱上未出现其他条带，说明该蛋白中不含有其它杂质纯度较高，且无小分子降解物。SDS-PAGE 结果符合天然Ⅱ型胶原蛋白性质。

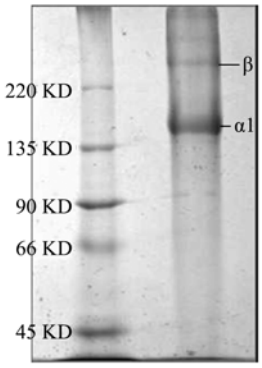


图 3 Ⅱ型胶原蛋白 SDS-PAGE 的电泳图

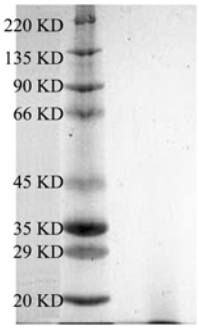
Fig.3 SDS-PAGE of collagen from type Ⅱ collagen

注：A：蛋白 maker 标准品，B：Ⅱ型胶原蛋白。

2.4 胶原多肽 SDS-PAGE 电泳分析结果

如图 4 所示，酶解获得的胶原多肽在图谱中无明显条带，说明在碱性蛋白酶的作用下胶原蛋白三股螺旋结构破坏，α1 链降解为低分子量的胶原多肽，分子量小于 20 KD。

2.5 小鼠关节指数评分结果



A B

图 4 胶原多肽 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE of collagen peptide

注：A：蛋白 maker 标准品，B：胶原多肽。

表 1 关节指数评分表

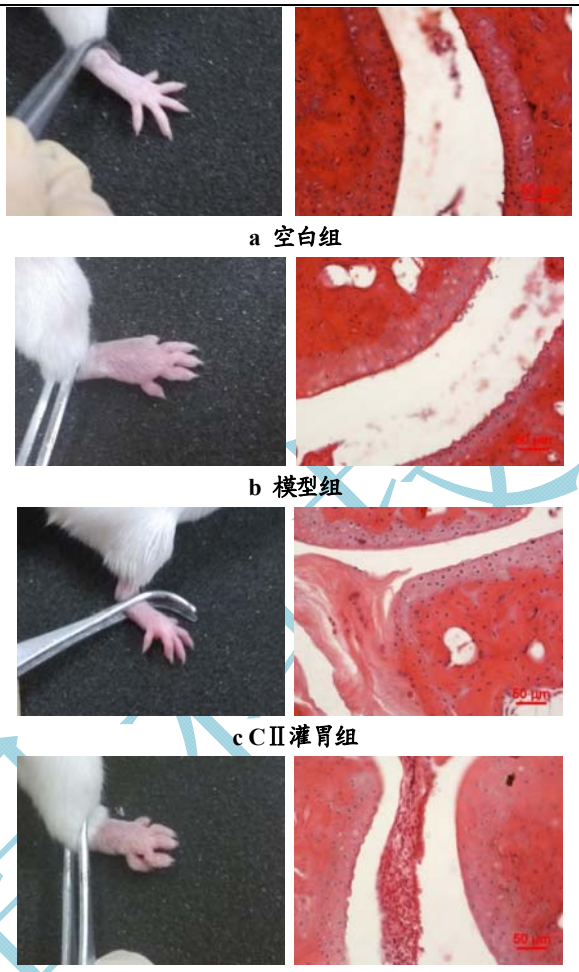
Table 1 Arthritis index score

组别	致炎天数/d						关节变形率/%
	0	7	14	21	28	35	
空白组	0	0	0	0	0	0	0
模型组	0	4	4	3	4	3	85
CⅡ灌胃组	0	2	1	1	2	1	30
CP 灌胃组	0	4	4	3	4	3	70

表 1 中显示，空白组小鼠关节指数为 0，未出现类风湿性关节炎患病现象，小鼠关节未发生变形现象，其他三组小鼠关节指数均有所增加，存在不同程度的类风湿性关节炎症状。模型组和胶原肽（CP）灌胃组小鼠的关节指数和关节变形率明显高于Ⅱ型胶原蛋白（CⅡ）灌胃组。从表观症状上看，胶原肽对小鼠类风湿性关节炎的预防及抑制作用交差，经酶解后获得的胶原多肽对类风湿性关节炎不具有预防抑制效果；天然Ⅱ型胶原蛋白在可以预防小鼠类风湿性关炎的发生，对类风湿性关节炎有抑制作用，同时能够显著降低发病过程中关节的变形率。

2.6 Ⅱ型胶原蛋白及胶原肽对小鼠组织病理学变化的影响

HE 染色结果如图 5 所示，空白组小鼠关节软骨层较厚，关节表面平滑，软骨细胞呈圆形，未出现细胞变形；模型组小鼠关节软骨层变薄、退化，关节表面出现凹凸不平，关节面被侵蚀，部分软骨细胞出现变形现象（呈梭状）；CⅡ灌胃组小鼠关节表面平滑，软骨细胞未出现明显变形现象，关节软骨层存在一定程度上的退化现象，但退化程度明显低于模型组；CP 灌胃组小鼠关节关节软骨表面出现凹凸不平的现象，关节面被侵蚀，软骨层出现一定程度上的退化，部分小鼠关节腔内出现软组织增生侵入现象。



a 空白组

b 模型组

c CⅡ灌胃组

d CP 灌胃组

图 5 足关节切片 HE 染色结果（4×）

Fig.5 Results of ankle stained with HE

2.7 Ⅱ型胶原蛋白及胶原肽对小鼠血清 IL-17、MMP-3、TNF-α 含量的影响

表 2 小鼠血清 IL-17、MMP-3、TNF-α 含量

Table 2 The concentration of IL-17, MMP-3 and TNF-αin blood serum

组别	n	IL-17/(pg/mL)	MMP-3/(μg/L)	TNF-α/(ng/mL)
空白组	10	56.13±6.88	20.91±1.81	47.55±3.2
模型组	10	112.57±2.61**	25.53±0.84*	58.98±4.0*
CⅡ灌胃组	10	79.41±4.73$^{\Delta}$	20.55±1.34$^{\Delta\Delta}$	48.09±3.31$^{\Delta}$
CP 灌胃组	10	102.58±2.48**	23.07±0.96*	58.66±4.63*

注：*P<0.05，**P<0.01 与空白组相比；ΔP<0.05，ΔΔP<0.01 与模型组相比。

从表 2 中可以看出，CⅡ灌胃组小鼠 IL-17 水平明显低于模型组（P<0.05），与空白组无差异；模型组和 CP 灌胃组小鼠 IL-17 水平均显著高于空白组（P<0.01）。CⅡ灌胃组小鼠 MMP-3 水平明显低于模型组（P<0.01），与空白组无差异；模型组和 CP 灌胃

组小鼠 IL-17 水平均显著高于空白组（P<0.05）。CⅡ灌胃组小鼠 TNF-α 水平明显低于模型组（P<0.05），与空白组无差异；模型组和 CP 灌胃组小鼠 IL-17 水平均显著高于空白组（P<0.05）。

2.8 Ⅱ型胶原蛋白及胶原肽对小鼠淋巴细胞增殖能力影响

表 3 淋巴细胞增殖试验结果

Table 3 Result of lymphocyte proliferation

组别	T 细胞刺激指数	B 细胞刺激指数
空白组	1.522±0.135	1.518±0.298
模型组	0.509±0.037**	0.913±0.104*
CⅡ灌胃组	1.133±0.072Δ	1.140±0.076
CP 灌胃组	0.822±0.163*	0.995±0.098

注：*P<0.05，**P<0.01 与空白组相比；ΔP<0.05，ΔΔP<0.01 与模型组相比。

由表 3 可以看出，CⅡ灌胃组小鼠 T 细胞刺激指数显著高于模型组小鼠（p<0.05），与空白组无差异；CP 灌胃组小鼠 T 细胞刺激指明显低于空白组（p<0.05），与模型组无差异；空白组和模型组小鼠 T 细胞刺激指数存在极显著差异（P<0.01）。由表 3 可以看出，空白组小鼠 B 细胞刺激指数显著高于模型组小鼠（p<0.05），其余各组间均无显著差异。

3 结论

3.1 文献[9]报道，胶原蛋白在 230 nm 处有特征吸收峰，280 nm 处吸收峰较少，含芳香族氨基酸较少，猪膝软骨Ⅱ型胶原蛋白 α1 链分子量为 120 KD，Ⅱ型胶原单链为 α1 链。本研究提取的猪Ⅱ型胶原蛋白的紫外吸收光谱和 SDS-PAGE 电泳结果与文献基本一致。

3.2 本实验观察小鼠注射弗氏完全佐剂乳剂后的 1 d 会出现足部红肿发热，关节明显肿胀 4~7 d 肿胀度达到峰值，且出现关节变形现象。结果表明口服Ⅱ型胶原蛋白可以降低关节指数，减少关节变形率。组织病理学结果显示，口服Ⅱ型胶原蛋白可以抑制软骨层退化，保护软骨层不被侵蚀。实验结论说明口服Ⅱ型胶原蛋白起到了预防类风湿性关节炎的作用。

3.3 IL-17 主要由 Th17 细胞分泌，Th17 的分化 IL-6、IL-21 和 IL-23 相关[10~11]，它参与炎症反应、自身免疫病等疾病的发展过程，与许多炎症反应和自身免疫性疾病的发生有关[12]。同时，IL-17 促进滑膜组织中 IL-6 的合成和胶原的破坏，抑制胶原合成，造成软骨破坏。TNF-α 主要由单核巨噬细胞产生，具有与 IL-1 相同的炎症作用，能上调滑膜细胞和内皮细胞表达 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素。RA 病人血液和滑液中存在大量 TNF-α，滑膜组织中巨噬细胞和内皮细胞能表达抗原性 TNF-α，且血清和滑液中 TNF-α 水平与临床 RA 病情相关[13]。研究表明[14]，TNF-α 过表达可致小鼠发生严重关节炎，抑制 TNF-α 可以阻止其发生，阻断 TNF-α 活性的药物可以改善 RA 临床症状。基质金属酶（MMPs）是由类风湿关节炎早期形成的血管翳中的成纤维细胞释放的，它是导致关节病理损伤的重要因素。在 MMPs 中，MMP-3 是降解软骨作用中最关键的酶，外来信息必须首先激活 MMP-3 才能活化其他 MMPs 发挥降解作用。MMP-3 在 RA 发病机制中的作用是促使增生的滑膜组织向关节软骨面生长并侵蚀关节软骨，同时 MMP-3 与骨侵蚀关系密切[15]。实验结果表明通过摄入Ⅱ型胶原蛋白能够降低小鼠体内 IL-17、MMP-3 和 TNF-α 水平，缓解体内炎症反应，缓解关节软骨组织损伤预防软骨破坏，降低类风湿性关节炎的发病程度。淋巴细胞增殖反应是反应机体免疫状态的重要指标。其中，T 细胞刺激指数反应细胞免疫能力，B 细胞刺激指数反应体液免疫能力。结果表明Ⅱ型胶原蛋白对细胞免疫和体液免疫功能均有恢复作用，这表明Ⅱ型胶原蛋白能够恢复机体免疫功能。此外，从 RA 患病程度与淋巴细胞转化结果上看，T 淋巴细胞在此疾病中起主要作用，这可能与 T 细胞分化的细胞亚群介导的免疫反应相关。

3.4 本研究表明，口服天然Ⅱ型胶原蛋白对类风湿性关节炎具有一定治疗预防的效果，胶原肽不具抗关节炎作用。这可能与Ⅱ型胶原蛋白的三股螺旋结构有关，三股螺旋结构被破坏后的胶原不具有免疫调节性。同时，天然猪软骨Ⅱ型胶原蛋白是一类预防类风湿性关节炎的新物质，可用于抗关节炎功能食品的开发，本文为今后开发相关功能食品提供了理论依据。

参考文献

[1] 张义浜.类风湿关节炎发病机制及其治疗方法研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(Suppl 2):88-90
Zhang Y B. Research Progress on the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis method [J]. Journal of cellular and molecular immunology, 2005, 21(Suppl 2): 88-90

[2] Ruderman E M. Current and future pharmaceutical therapy for rheumatoid arthritis [J]. Current pharmaceutical design, 2005, 11(5): 671-684

[3] Hider S L, Buckley C, Silman A J, et al. Factors influencing response to disease modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis [J]. J. Rheumatol, 2005, 32(1): 11-16

[4] Barnett M L, Combitchi D, Trentham D E. A pilot trial of oral

type II collagen in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis [J]. Arthritis & Rheumatism, 1996, 39(4): 623-628

[5] Schellekens GA, Visser H, De-Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies reocognizing a cyclic citrullinated peptide [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43: 155-163

[6] Cook A D, Rowley M J, Mackay I R, et al. Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression [J]. Arthritis & Rheumatism, 1996, 39(10): 1720-1727

[7] 姜旭淦.鸡CⅡ的分离提取、生物学特性分析及其口服耐受对类风湿性关节炎干预的研究[D].镇江:江苏大学,2011
Jiang X G, Purification, biological characteristics of chicken type Ⅱcollagen and interference in rheumatoid arthritis by oral tolerance [D]. Zhenjiang: Jiangsu university, 2011

[8] 段宙位,申铉日,陈秀明,等.罗非鱼尾胶原蛋白的提取与鉴定[J].食品科学,2012,33(6):59-64
Duan Z W, Shen X R, Chen X M, et al. Extraction and identification of collagen from tilapia tail [J]. Food chemistry, 2012, 33(6): 59-64

[9] 宁志刚,王富友,崔运利,等.可溶性猪软骨Ⅱ型胶原蛋白的提取与鉴定[J].重庆医学,2011,40(10):954-958
Ning Z G, Wang F Y, Cui Y L, et al. Isolation and identification of soluble collagen type Ⅱ from porcine articular cartilage [J]. Chongqing physic., 2011, 40(10): 954-958

[10] Yang L, Anderson D E, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are requiredfor differentiation of human T (H) 17 cells [J]. Nature, 2008, 454: 350-352

[11] Manel N, Unutmaz D, Littman D R. Thedifferentiation of humanT(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor gammar [J]. Nat Immunol, 2008, 9: 641-649

[12] 唐碧霞,张烜,唐福林.IL-17 与自身免疫性疾病关系的研究进展[J].基础医学与临床,2008,28,(1):94-97
Tang B X, Zhang X, Tang F L. Relationship between IL-17 and autoimmune diseases [J]. Basic & Clinical medicine, 2008, 28(1): 94-97

[13] 成冰燕,王占元.细胞因子与类风湿性关节炎治疗的研究进展[J].药学实践杂志, 2000,18,(3):143-144
Cheng B Y, Wang Z Y. Research progress of cytokine and rheumatoid arthritis treatment [J]. Journal of pharmaceutical practice, 2000, 18(3): 143-144

[14] Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interliulin-1 receptor antagonist [J]. Semin Arthritis Rheurn 2001, 30(Suppl 2): 1-6

[15] 董奕裕,张新根,陆建良,等.早期类风湿性关节炎患者血清Ⅰ型胶原吡啶交联终肽、基质金属酶-3 等指标的检测及意义[J].检验医学,2013,5,(28):400-403
Dong Y Y, Zhang X G, Lu J L, et al. Detection and significance of serum cross-linked carboxyterminal telopeptide region of type Ⅰ collagen and matrix metalloproteinase enzyme-3 in patients with early rheumatoid arthritis [J]. Laboratory medicine, 2013, 5(28): 400-403