

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.003

文章编号: 1005-8982(2017)26-0013-05

## TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 在 小鼠肝纤维化组织中的表达\*

徐靖宇<sup>1</sup>, 帅张丽<sup>1</sup>, 谢远<sup>2</sup>, 龙从风<sup>2</sup>, 石国庆<sup>1</sup>

(1.遵义医学院附属医院 消化内科, 贵州 遵义 563000; 2.遵义医学院药学院,  
贵州 遵义 563003)

**摘要:目的** 研究四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导小鼠肝纤维化组织中转化生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、骨形态发生蛋白 7 (BMP-7)及 Gremlin 的表达,探讨其在肝纤维化发生机制中的作用。**方法** 雄性 C57 小鼠 40 只,分为实验组和对照组,每组 20 只。实验组给予腹腔注射 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液,10 ml/kg;对照组腹腔注射橄榄油溶液,10 ml/kg,2 次/周,持续 8 周。苏木精-伊红染色后观察肝纤维化程度,免疫组织化学法染色后分析 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 在肝纤维化组织中的表达和分布,实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 检测 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 在正常和纤维化肝组织中 mRNA 和蛋白的表达。**结果** TGF- $\beta_1$  和 Gremlin 在肝纤维化组织中 mRNA 和蛋白表达增强( $P < 0.05$ ),而 BMP-7 在肝纤维化组织中表达降低( $P < 0.05$ )。**结论** TGF- $\beta_1$ 、Gremlin 的表达与肝纤维化呈正相关,BMP-7 与肝纤维化呈负相关( $P < 0.05$ )。Gremlin 可能通过下调 BMP-7 的表达,诱导肝纤维化的发生。

**关键词:** 转化生长因子  $\beta_1$ ; 骨形态发生蛋白 7; Gremlin; 肝纤维化

**中图分类号:** R575.2

**文献标识码:** A

## Expressions of TGF- $\beta_1$ , BMP-7 and Gremlin in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis tissue of mice\*

Jing-yu Xu<sup>1</sup>, Zhang-li Shuai<sup>1</sup>, Yuan Xie<sup>2</sup>, Cong-feng Long<sup>2</sup>, Guo-qing Shi<sup>1</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi,  
Guizhou 563000, China; 2. Department of Physiology, Zunyi Medical College,  
Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To study the expressions of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) and Gremlin in the liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in mice, and to investigate their roles in the pathogenesis of hepatic fibrosis. **Methods** Forty male C57 mice were randomly divided into control group and experimental group. In the experimental group, acute liver injury of mice was induced by intraperitoneal injection of 40% CCl<sub>4</sub> olive oil solution, 10 ml/kg, while the control group was injected with olive oil, twice a week for 8 weeks. After 8 weeks the mice were sacrificed, and the liver tissue was fixed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the degree of liver fibrosis. The expressions and distribution of TGF- $\beta_1$ , BMP-7 and Gremlin in the control and experimental groups were detected through immunohistochemical staining. qR-PCR detecting system and Western blot were utilized for detection of mRNA and protein expressions of TGF- $\beta_1$ , BMP-7 and Gremlin in the normal and fibrotic liver tissues. **Results** In the experimental group, both mRNA and protein expressions of TGF- $\beta_1$  and Gremlin in the liver fibrosis tissue were significantly enhanced ( $P < 0.05$ ). However, the expression of BMP-7

收稿日期: 2016-09-21

\* 基金项目: 贵州省科学技术基金[No: 黔科合 J 字(2012)2359 号]

[通信作者] 石国庆, E-mail: [sgqing973@sina.com](mailto:sgqing973@sina.com); Tel: 13885286069

in the liver fibrosis tissue was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The expression levels of TGF- $\beta_1$  and Gremlin were positively related to hepatic fibrosis, while BMP-7 was negatively correlated to hepatic fibrosis ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** Gremlin may induce the occurrence of liver fibrosis by down-regulation of BMP-7 expression.

**Keywords:** TGF- $\beta_1$ ; BMP-7; Gremlin; hepatic fibrosis

肝纤维化发生的关键是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的激活,产生大量间质胶原,导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积<sup>[1]</sup>。目前认为,转化生长因子  $\beta_1$ (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )是 HSC 激活最重要的细胞因子<sup>[2]</sup>。研究发现,骨形态发生蛋白 7 (Bone morphogenetic protein 7, BMP-7)和 BMP 拮抗蛋白 Gremlin 参与肝纤维化的发生<sup>[3-4]</sup>,但其作用机制仍不清楚。本文通过研究四氯化碳 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 的表达,进一步探讨其在肝纤维化发生、发展中的作用及其相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57 小鼠,体质量 20 ~ 40 g,由重庆第三军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-2016。正常喂养,自由饮水,自然采光,室温 15 ~ 25℃,实验前适应环境 1 周。

### 1.2 主要药品与试剂

CCl<sub>4</sub>(济南云翔化工有限公司),橄榄油(上海阿拉丁试剂公司),Gremlin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),BMP-7 和 TGF- $\beta_1$  多克隆抗体(美国 Abcam 公司),RIPA 蛋白裂解液(北京索莱宝生物科技公司),BCA 蛋白定量试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司),蛋白分子 Marker、Trans Zol Up、逆转录试剂盒及 PCR 扩增酶均购自北京全式金公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物模型复制** 健康雄性 C57 小鼠 40 只,随机分为对照组和实验组,每组 20 只,实验组给予腹腔注射 50% CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液,10 ml/kg,2 次/周,模型复制 8 周;对照组腹腔注射橄榄油溶液,10 ml/kg。8 周后处死动物,剖腹取肝组织 2 块,用甲醛固定、石蜡包埋备用。其余肝组织于 -80℃ 冰箱保存备用。

**1.3.2 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色** 石蜡包埋的小鼠肝脏标本连续切片,厚 4  $\mu$ m,常规脱蜡至水;苏木精溶液染色数分钟,酸水和氨水中分色各数秒钟,流水冲洗 1 h 后入蒸馏水片刻,70%和 90%酒精中脱水各 10 min,伊红

染色液染色 2 ~ 3 min,纯酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

**1.3.3 免疫组织化学法染色** 石蜡包埋的小鼠肝脏标本连续切片,厚 4  $\mu$ m,常规脱蜡至水;3%过氧化氢溶液室温培育 10 min 以封闭非特异性抗原,抗原修复;PBS 液冲洗 3 次,3 min/次;滴加一抗,置 37℃ 温箱孵育 1 h;PBS 液冲洗 3 次,3 min/次;滴加二抗,置 37℃ 温箱孵育 30 min;PBS 液冲洗 3 次,3 min/次;滴加 DAB 显色剂(1 : 50),1 ~ 2 min;自来水冲洗,苏木素复染;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。随机选择 5 个视野,使用 Image J 分析视野下的阳性部位面积,然后取平均值。

**1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)** 采用 qRT-PCR 检测小鼠正常肝组织和肝纤维化组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin mRNA 的表达。取小鼠肝组织剪碎、研磨、离心,按 Trizol 试剂盒说明书抽取总 RNA。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l,扩增条件:95℃ 预变性 3 min,60℃ 变性 30 s,共 40 个循环;65℃ 退火 10 s,65℃ 延伸 10 s,共 61 个循环,每次 PCR 反应均以无菌双蒸水代替 cDNA 模板作为阴性对照。扩增后的产物在 4℃ 用于 PCR 琼脂凝胶电泳。所有引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

**1.3.5 Western blot 检测** 采用 Western blot 检测小鼠正常肝组织和肝纤维化组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 蛋白的表达,取小鼠肝组织剪碎,经匀浆、裂解、离心,提取蛋白质,然后经电泳、转膜、封闭,分

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
Gremlin	正向:5'-CGCCATCCCTCGCCTTACAA-3'	160
	反向:5'-CGAGACCCGGGCATTGAGC-3'	
BMP-7	正向:5'-AACGCCACCAACCACGCCAT-3'	224
	反向:5'-GGAAAGGTGTGGCCCCGAA-3'	
TGF- $\beta_1$	正向:5'-ATTGGCCAGCATCCATCTCTTG-3'	296
	反向:5'-GTGCAGGATGCATTGCTGAC-3'	
$\beta$ -actin	正向:5'-CATCGTCCACCGCAAATG-3'	121
	反向:5'-TGTCACCTTCTCCGTTCCA-3'	

别用 Gremlin (1 : 100)、BMP-7 (1 : 200)、TGF- $\beta_1$  (1 : 400)、 $\beta$ -actin(1 : 5 000)4℃孵育过夜,二抗(1 : 5 000)室温 1 h,ECL 曝光显影,用 Quantity One 软件对印迹条带进行灰度测定。以  $\beta$ -actin 表达水平作为内参。

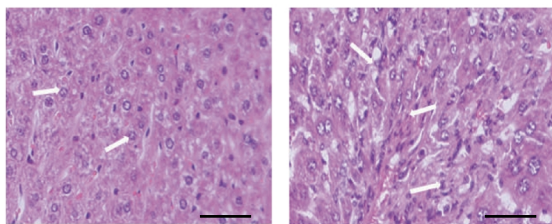
#### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肝组织病理观察

HE 染色证明 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化模型复制成功。镜检观察显示,对照组小鼠肝脏无异常病理改变,肝细胞排列整齐,结构清晰,大小均匀,且细胞核位于细胞中央,细胞无坏死,水肿,无炎症细胞浸润(见图 1A);实验组小鼠肝脏炎症明显,肝细胞广泛变性坏死,细胞肿胀,汇管区大量纤维组织增生,伴大量炎症细胞浸润(见图 1B)。



A 对照组 B 实验组

图 1 两组小鼠肝脏组织病理形态改变  
(HE 染色,标尺 50  $\mu$ m)

### 2.2 两组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 蛋白表达

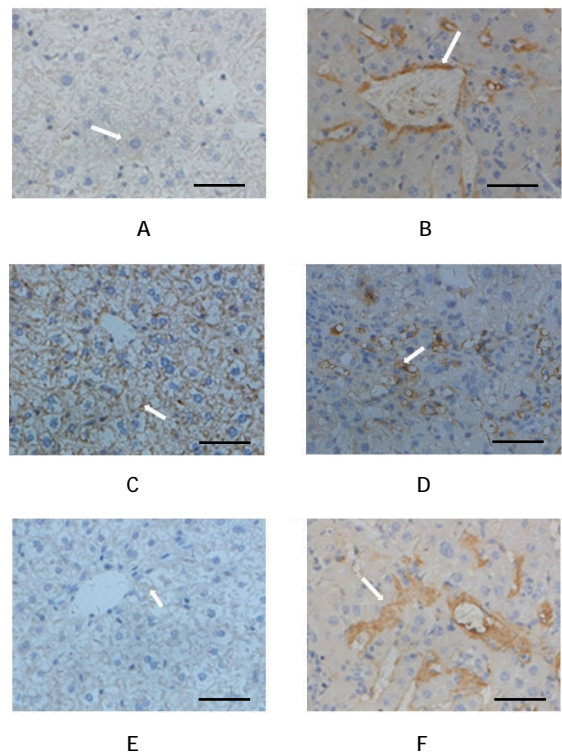
TGF- $\beta_1$  在对照组小鼠肝组织中呈弱表达,在实验组中表达增强( $P < 0.05$ );Gremlin 在对照组小鼠肝组织中无表达,在实验组中表达增强( $P < 0.05$ ),在细胞胞质和胞膜均有表达;而 BMP-7 在对照组小鼠肝组织中表达较强,在实验组中表达减弱( $P < 0.05$ )。见表 2 和图 2。

### 2.3 两组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 和 Gremlin mRNA 的表达

实验组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达量为(1.733  $\pm$  0.120),对照组为(1.006  $\pm$  0.0433),两组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达水平比较,经  $t$  检验,差异有统计学意义( $t = 5.500, P = 0.005$ ),实验组较对照组升高。实验组小鼠肝组织中 Gremlin mRNA

表 2 两组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 蛋白表达的比较 ( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

组别	TGF- $\beta_1$	BMP-7	Gremlin
对照组	0.053 $\pm$ 0.006	4.275 $\pm$ 0.635	0.072 $\pm$ 0.071
实验组	3.131 $\pm$ 0.327	1.025 $\pm$ 0.136	3.375 $\pm$ 0.221
$t$ 值	4.132	4.423	4.578
$P$ 值	0.014	0.011	0.010



A: 对照组肝组织中 TGF- $\beta_1$  蛋白的表达;B: 实验组肝组织中 TGF- $\beta_1$  蛋白的表达;C: 对照组肝组织中 BMP-7 蛋白的表达;D: 实验组肝组织中 BMP-7 蛋白的表达;E: 对照组肝组织中 Gremlin 蛋白的表达;F: 实验组肝组织中 Gremlin 蛋白的表达

图 2 两组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 蛋白的表达 (免疫组织化学法染色,标尺 50  $\mu$ m)

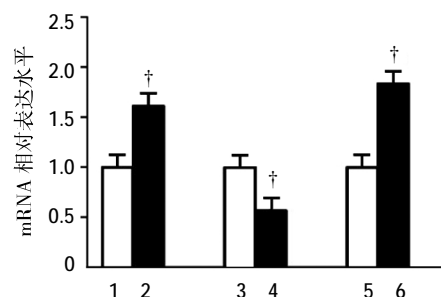
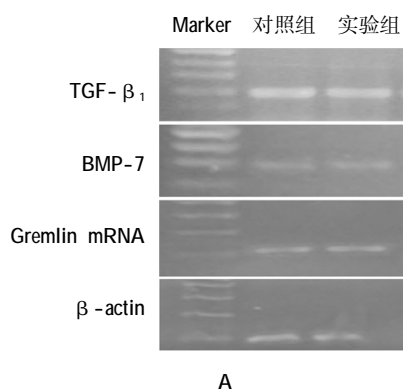
表达量为(1.950  $\pm$  0.180),对照组为(1.021  $\pm$  0.051),两组小鼠肝组织中 Gremlin mRNA 表达水平比较,经  $t$  检验,差异有统计学意义( $t = 5.019, P = 0.007$ ),实验组较对照组升高。实验组小鼠肝组织中 BMP-7 mRNA 表达量为(0.533  $\pm$  0.120),对照组为(1.055  $\pm$  0.063),两组小鼠肝组织中 BMP-7 mRNA 表达水平比较,经  $t$  检验,差异有统计学意义( $t = 3.500, P = 0.024$ ),实验组低于对照组。见图 3。

### 2.4 两组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 蛋白表达的 Western blot 结果

实验组小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  蛋白相对表达量

为(1.610 ± 0.201),对照组为(1.012 ± 0.058),两组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达水平比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义(*t*=2.916, *P*=0.043),实验组较对照组升高。实验组小鼠肝组织中 Gremlin 蛋白相对表达量为(1.833 ± 0.260),对照组为(1.008 ± 0.058),两组小鼠肝组织中 Gremlin 蛋白表达水平比较,经 *t*

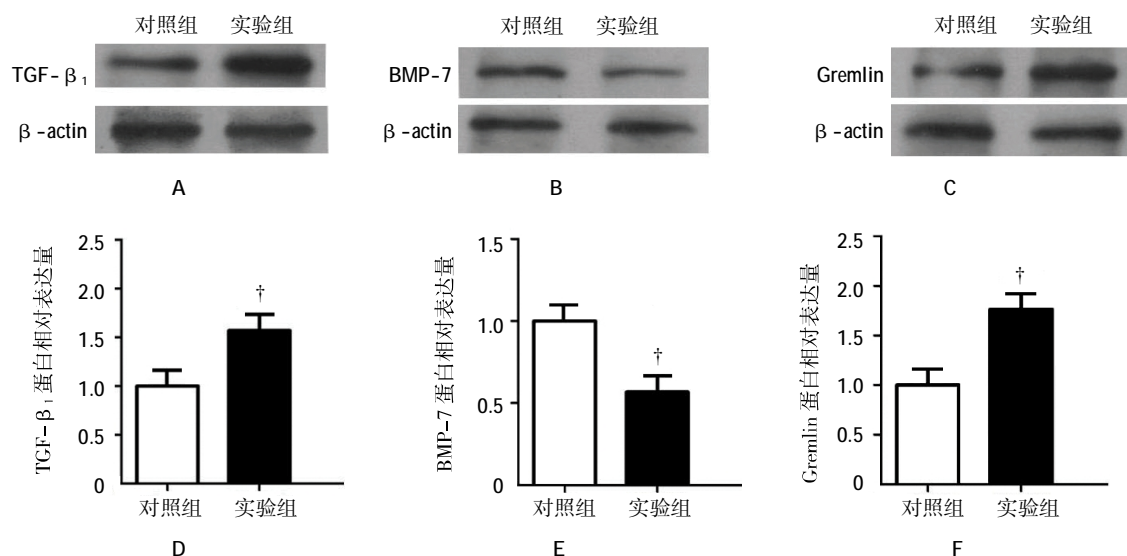
检验,差异有统计学意义(*t*=3.125, *P*=0.035),实验组较对照组升高。实验组小鼠肝组织中 BMP-7 蛋白相对表达量为(0.567 ± 0.120),对照组为(1.021 ± 0.050),两组小鼠肝组织中 BMP-7 蛋白 A 表达水平比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义(*t*=3.250, *P*=



1: 对照组 TGF-β<sub>1</sub>; 2: 实验组 TGF-β<sub>1</sub>; 3: 对照组 BMP-7; 4: 实验组 BMP-7; 5: 对照组 Gremlin; 6: 实验组 Gremlin

A: TGF-β<sub>1</sub>, BMP-7 及 Gremlin 扩增结果; B: 两组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub>, BMP-7 及 Gremlin mRNA 的表达比较。† 与对照组比较, *P* < 0.05

图 3 两组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub>, BMP-7 及 Gremlin mRNA 的表达



A: 两组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白的表达; B: 两组小鼠肝组织中 BMP-7 蛋白的表达; C: 两组小鼠肝组织中 Gremlin 蛋白的表达; D: 两组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的比较; E: 两组小鼠肝组织中 BMP-7 蛋白表达的比较; F: 两组小鼠肝组织中 Gremlin 蛋白表达的比较。† 与对照组比较, *P* < 0.05

图 4 两组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub>, BMP-7 及 Gremlin 蛋白的表达 (Western blot)

0.031), 实验组低于对照组。见图 4。

### 3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病损伤的共同结果,也是各种慢性肝病向肝硬化发展的重要中间环节<sup>[9]</sup>。目前研究认为,肝纤维化形成的重要诱因是肝组织损伤后分泌大量的促肝纤维化细胞因子,该促肝纤维化因子表达增强,最终诱导肝纤维化发生,但其具体机

制仍不清楚。

TGF-β<sub>1</sub> 分泌增多是诱发肝纤维化的一个重要诱因,肝脏中的 TGF-β<sub>1</sub> 合成主要通过自分泌和旁分泌 2 种方式。文献报道, TGF-β<sub>1</sub> 在肝纤维化时含量高,并促使成纤维细胞的活化、增生级表型转化<sup>[6]</sup>。本研究结果发现, CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化模型中 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 和蛋白表达均增高。在肝纤维化形成过程中大量 TGF-β<sub>1</sub> 在胞外被激活,并与活化的

HSC 等细胞膜上特异受体 I、II 结合,继而激活 Smads,介导胞内信号转导,促使 ECM 等目的基因转录并高表达,导致纤维化形成<sup>[7]</sup>。同时本实验结果进一步发现,在 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化组织中 BMP-7 的核酸及蛋白表达降低。BMP-7 是一种分泌性多功能蛋白,是 TGF- $\beta$  超家族成员,在胚胎的发生、发育,组织及细胞的分化、增生等方面都发挥重要作用<sup>[8]</sup>。激活 BMP-7 能够阻断 TGF- $\beta_1$  的信号通路,抑制纤维细胞上皮细胞间质化,逆转 TGF- $\beta_1$  的促肝纤维细胞纤维化<sup>[9]</sup>。BMP-7 对肝脏有一定保护作用,该保护不仅取决于自身,也与在肝纤维形成过程中 BMP-7 激动剂和拮抗剂的平衡有关,TGF- $\beta_1$  和 BMP-7 在肝纤维化的过程中相互拮抗。研究证实,TGF- $\beta$  诱导上皮间质转化主要由于激活 Smad-2/3 发挥作用的过程中,BMP-7 也通过激活 Smad-1/5/8 的磷酸化,抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的作用<sup>[10]</sup>。目前,BMP-7/Smads 信号通路是公认的抑制肝纤维化形成过程中的重要信号通路,但是 TGF- $\beta_1$  本身并非 BMP-7 受体的配体,不具备调节 BMP-7 表达及其相关的信号传导的作用。有文献指出,TGF- $\beta_1$  是通过调节其下游信号因子 Gremlin,并拮抗 BMP-7 的表达及活性,促使肝纤维化的形成<sup>[11]</sup>。Gremlin 是一种分泌型蛋白,Gremlin 基因最早从爪蟾中枢神经脊中克隆出来,主要存在于细胞内质网和高尔基体管腔中,也存在于细胞表面,以非共价键形式与细胞膜相连<sup>[12]</sup>。在成骨细胞分化过程中,Gremlin 作为 BMP 的拮抗剂在成骨细胞中表达,具有拮抗 BMP 对成骨细胞分化的功能<sup>[13]</sup>。免疫共沉淀发现 Gremlin 可以与 BMP2、BMP4、BMP7 等直接相互作用<sup>[14]</sup>。本实验结果证实,在 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化组织中 Gremlin 的核酸及蛋白表达升高,与 TGF- $\beta_1$  表达呈正相关,该结果提示 TGF- $\beta_1$  可以正向促进 Gremlin 的表达,拮抗 BMP-7 的抗纤维化作用。

综上所述,本研究通过 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型,同时检测 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 在小鼠肝纤维化和正常小鼠肝组织中的表达。结果显示,TGF- $\beta_1$  和 Gremlin 在纤维化肝组织中的 mRNA 和蛋白表达均增强,而 BMP-7 在纤维化肝组织中的 mRNA 和蛋白表达均减弱。说明 TGF- $\beta_1$ 、BMP-7 及 Gremlin 与肝纤维化的发生、发展密切相关,其机制可能是 TGF- $\beta_1$  在肝纤维化组织中过表达,进而激活其下游的信号因子 Gremlin,活化的 Gremlin 进一

步拮抗 BMP-7 的生理功能,抑制 BMP-7/Smad 信号通路,从而诱导肝纤维化的发生。

#### 参 考 文 献:

- [1] MOREIRA R K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(11): 1728-1734.
- [2] DOOLEY S, DIJKE P T. TGF- $\beta$  in progression of liver disease[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 245-256.
- [3] YANG T, CHEN S L, LU X J, et al. Bone morphogenetic protein 7 suppresses the progression of hepatic fibrosis and regulates the expression of gremlin and transforming growth factor  $\beta_1$  [J]. Mol Med Rep, 2012, 6(1): 246-252.
- [4] GUIMEI M, BADDOUR N, ELKAFASH D, et al. Gremlin in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C: an immunohistochemical and PCR study of human liver biopsies[J]. BMC Res Notes, 2012, 5: 390.
- [5] Ramón Bataller and David A. Brenner liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.
- [6] CHEN Y L, LV J, YE X L, et al. Sorafenib inhibits transforming growth factor  $\beta_1$ -mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes[J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1708-1718.
- [7] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- $\beta$ /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(3): 157-167.
- [8] WANG L P, DONG J Z, XIONG L J, et al. BMP-7 attenuates liver fibrosis via regulation of epidermal growth factor receptor[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 3537-3547.
- [9] ZHAO Y L, ZHU R T, SUN Y L. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis[J]. Biomed Rep, 2016, 4(3): 269-274.
- [10] HASEBE T, TANAKA H, SAWADA K, et al. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model[J]. J Gastroenterol, 2017, 52: 341-351.
- [11] ZHAO X K, CHENG M L, WU R M, et al. Effect of Danshao Huaxian capsule on Gremlin and bone morphogenetic protein-7 expression in hepatic fibrosis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(40): 14875-14883.
- [12] HSU D R, ECONOMIDES A N, WANG X, et al. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities[J]. Mol Cell, 1998, 1(5): 673-683.
- [13] GAZZERRO E, PEREIRA R C, JORGETTI V, et al. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia[J]. Endocrinology, 2005, 146: 655-665.
- [14] MERINO R, RODRIGUEZ-LEON J, MACIAS D, et al. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb[J]. Development, 1999, 126(23): 5515-5522.