·论著·

特异性阻断诱导培养的大鼠破骨样细胞 Atp6i 基因的表达

童培建 肖鲁伟 杜文喜 沈龙祥 季卫锋 潘杰

摘要：目的 筛选具有高效、高特异性地阻断体外诱导培养的大鼠破骨样细胞(osteoclast-like cells, OCL)Atp6i 基因转录产物 mRNA 翻译过程的 siRNA 序列。**方法** 根据大鼠 Atp6i 基因序列设计 2 对 siRNAs(Ⅰ、Ⅱ)序列,转染到各组体外培养第 6 天的 OCL 细胞内,转染组(Ⅰ或者Ⅱ siRNA)T1 组、阴性对照转染组(Ⅲ siRNA)T2 组、转染试剂转染组 T3 组以及空白对照组 T4 组,转染第 24 小时后,RT-PCR 分析 Atp6i mRNA 的表达情况。**结果** Ⅰ号 siRNA 转染后,T1 组中 Atp6i 基因 RT-CR 扩增产物密度值较其他组减少,差异明显($P < 0.01$),相对密度值较其他组也明显减少($P < 0.01$)。**结论** Ⅰ号 siRNA 片段特异性的抑制大鼠 OCL Atp6i mRNA 表达。

关键词： Atp6i 基因；骨髓；破骨样细胞；RNA 干扰；RT-PCR

Specific inhibition expression rat Atp6i gene of the osteoclast-like cells *TONG Peijian, XIAO Luwei, DU Wenxi, et al. Department of Orthopaedics, Chinese Medicine Hospital of Zhejiang, Hangzhou* 310006, China

Abstract: Objective To select highly efficient and highly specific siRNAs, which can block the translation of mRNAs transcripted from Atp6i gene of rats osteoclast-like cells, cultured *in vitro* by inducing. **Methods** On the basis of the rat Atp6i gene sequence, designing 2 pieces of siRNAs(Ⅰ、Ⅱ), then the osteoclasts system are divided into 4 groups: transfection group(Ⅰ siRNA or Ⅱ siRNA) T_1, negative matched control transfection group (Ⅲ siRNA) T_2, reagent transfection group T_3 and blank group T_4. After the osteoclasts system has been induced and cultured for 6 days, above siRNAs are transfected into each group separately. 24 hours after transfecting, to detect the products of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and to analyse the level of the mRNA to the gene Atp6i, the experimental result is summarized. **Results** After the siRNAs are transfected, compared with the other groups, the density of products of RT-PCR the mRNA of the Atp6i gene in T1 group with Ⅰ siRNA is significantly degraded ($P < 0.01$), and the same case with the comparative density($P < 0.01$). **Conclusions** Ⅰ siRNA can high-efficiently inhibit expression to the mRNA of the rat Atp6i gene of osteoclasts.

Key words: Atp6i gene; Bone marrow; Osteoclast-like cells; RNAi; RT-PCR

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种封闭基因表达的有效方法[1,2],它将与目的基因同源的干扰 RNA 片段(small interfering RNAs, siRNA)转染至靶细胞,与细胞内的内切酶形成诱导沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC),RISC 以 siRNA 为模板特异地识别其同源基因 mRNA 并对其进行递进式剪切,形成强有效的瀑布效应,诱导序列特异性的 mRNA 降解,具有高效性和高度特异性等特点,是一种全新的基因治疗手段。我们设计了以破骨细胞 Atp6i 基因为靶标的 siRNA,观察其对破骨细胞 Atp6i 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 盖玻片和骨磨片的制备

用玻璃刀将盖玻片分切成 1 cm × 1 cm 大小,无水乙醇浸泡 2 h,晾干后再浸入硫酸-重铬酸钾清洗液中过夜,充分水洗,蒸馏水超声波清洗 10 min,3 次,自然晾干,高压消毒后备用。取新鲜成年牛股骨皮质骨,用钢锯纵向锯成厚骨片,以角磨机磨薄后以细金刚砂纸磨至约 15 μm 厚,再剪成 5 mm × 5 mm 大小,置 −20℃储存。临用前于三蒸水中超声波清洗

基金项目：浙江省自然科学基金资助项目(Z303656)

作者单位：310006 杭州,浙江省中医院骨科(童培建、肖鲁伟、杜文喜、沈龙祥、季卫锋);山东师范大学生命科学院(潘杰)

通讯作者：童培建,Email:tongpeijian@163.com

10 min,3次,自然晾干,置于超净台中紫外线双面照射各4 h后备用。

1.2 破骨样细胞的诱导培养

选用3~4周龄SD雄性大鼠(购自浙江中医药大学实验动物中心),参照文献[3,4]并加以改进进行细胞培养,具体步骤为:拉颈处死大鼠后用4℃ 75%乙醇溶液浸泡5 min,无菌条件下分离股骨、胫骨,将带完整干骺端的骨干置于4℃ PBS缓冲液中冲洗2次,于超净台内剪断长骨两骺端暴露骨髓腔,然后用5 ml一次性注射器抽取含α-MEM培养基(含20%胎牛血清)冲洗骨髓腔数次至骨干发白为止。用20 ml无菌小烧杯收集冲洗液并用200目筛网过滤两次,收集过滤液放入25 ml培养瓶,在37℃、5% CO_2、饱和湿度下培养1 h后收集细胞悬液,用全培养基[含20%胎牛血清(Gibco)、1×10^{-8} mol/L的1,25-$(OH)_2D_3$(Sigma)、青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml的α-MEM培养基(Gibco)]稀释细胞至1.5×10^6/ml,将细胞悬液加入预置盖玻片或牛骨片的进口6孔细胞培养板。在37℃、5% CO_2、饱和湿度下培养,每2天换液1次,每次换总量的一半。培养过程中,每天定期观察细胞的形态和生长状态。

1.3 siRNA的设计与细胞转染

根据GeneBank Atp6i基因已知序列(基因编号GI:206429)按siRNA序列设计原则[5]:通过NCBI BLASTn程序,最终确认2组(Ⅰ和Ⅱ号)作为本实验所用序列,即这些候补序列只与大鼠Atp6i基因是100%同源;同理,设计一条21nt的阴性对照序列(Ⅲ号),即满足该序列的CG比例含量和片段的全长,又和大鼠Atp6i基因以及其他任何基因的序列保持低同源性,避免阻断Atp6i基因和其他基因的表达水平。siRNA序列如下:Ⅰ靶序列5′-AAT GTT CAC CAT AGG GAA CTG (1479~1499),正义链:5′-UGU UCA CCA UAG GGA ACU GTT,反义链:5′-CAG UUC CCU AUG GUG AAC ATT;Ⅱ靶序列5′-AAT TCT ACA CTG GGA CTG GTT (2471~2491),正义链:5′-UUC UAC ACU GGG ACU GGU UTT,反义链:5′-AAC CAG UCC CAG UGU AGA ATT-3′;Ⅲ (阴性对照) 5′-AAT CAC TAT TAG CAC TGA GTG,正义链:5′-UCA CUA UUA GCA CUG AGU GTT,反义链:5′-CUC UCA GUG CUA AUA GUG ATT。

细胞诱导培养后第6天开始进行siRNA转染实验,采用Advantgene Pri TM转染试剂盒以及GFP-LS 21nt长的RNA标记试剂盒(均为Allele公司产品),分别将上述候选的siRNAs序列片段(Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ号)与GFP-LS共转染入OCL。每次转染包括:转染组1孔(Ⅰ或者Ⅱ siRNA),简称T1组;阴性对照转染组1孔(Ⅲ siRNA),简称T2组;转染试剂转染组1孔(转染时无siRNA),简称T3组以及空白对照组1孔(只加有基本细胞培养基的非转染组)简称T4组。转染2 h后,将所有转染培养基吸出,更换新鲜全培养基。孵育24h后收获细胞进行检测,实验重复3次。

1.4 RT-PCR

用TRIzol (Gibco)提取细胞总RNA后检测RNA的浓度和纯度。采用一步法试剂盒(One step RNA PCR Kit,TAKARA),取1 μg总RNA进行靶基因体外反转录以及mRNA表达水平检测。Atp6i基因上游引物P-1:5′-AAG AGC CTA CCG AGG ACG AA-3′,Atp6i下游引物P-2:5′-TGG CAA AGG CAG CGA AGA-3′。RT-PCR反应条件为:50℃反转录30 min合成cDNA,94℃预变性2 min,94℃变性30 s,55℃复性30 s,72℃延伸2 min,变性-复性-延伸循环30次,扩增出243 bp的DNA产物。内参甘油醛3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Gapdh)上游引物G-1:5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′,Gapdh下游引物G-2:5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′,RT-PCR反应条件为:50℃逆转录30 min反转录cDNA,95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃复性30 s,72℃延伸30 s,变性退火延伸循环30次,终循环末72℃延伸10 min,扩增产物为453 bp片段DNA。取PCR扩增产物各5 μl在1.7%琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L溴化乙啶)电泳,用Tanon凝胶扫描自动分析仪对扩增产物进行密度值分析,测出扩增产物密度值,分别计为D_{Atp6i}、D_{Gapdh},目的基因产物与内参产物的密度值的比值D_{Atp6i}/D_{Gapdh}表示Atp6i mRNA的相对含量。

1.5 OCL的鉴定以及转染率

1.5.1 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色:TRAP是酸性磷酸酶(ACP)同功酶6种同工酶(0~5)中的第5型,OC含量最为丰富,通常作为鉴别OC的重要标志。TRAP染色结果显示OC胞浆阳性,呈红色,核呈阴性,非OC细胞染色为阴性。染色方法参考文献[6],判定含2个核以上且TRAP染色阳性者确定为成熟OC细胞。取上述同期实验与OCL共培养6天的玻片进行染色鉴定。

1.5.2 骨吸收功能观察:分别取上述同期OCL共培养的牛骨片,参照文献[6],经2.5%戊二醛溶液室温固定7 min、0.25 mol/L氢氧化铵中超声波清洗5 min ×3次,系列酒精脱水,自然晾干。室温1%甲苯胺

蓝染色3~4 min,双蒸水清洗后,光镜下观察骨片上是否有骨吸收陷窝形成。常规方法制备扫描电子显微镜标本。

1.5.3 荧光显微镜观察转染率:GFP-LS中标记RNA与相同片段长度的siRNA,共同转入细胞内,标记RNA的荧光显色可以证明siRNA的转染效率。随机选择各转染组的细胞作进一步的绿色荧光检测,对每组细胞可以绿色荧光视野和正常视野下,相同细胞区域拍照对比,以及扣除背景的标准化处理,每孔至少比较10个随机选择的转染成功的靶细胞,计算转染效率。

1.6 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件包进行统计。各组数据采用$\bar{x} \pm s$表示,计量资料比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),以$P<0.05$为差异有显著性,$P<0.01$为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 大鼠骨髓细胞诱导分化成OCL形态观察

含诱导剂1,25-$(OH)_2D_3$的大鼠骨髓细胞悬液接种于进口塑料培养板后,2~4 h左右细胞贴壁,倒置显微镜观察,此时贴壁细胞呈圆形、短梭形或三角形,核位于中央,散在分布于瓶底。诱导培养6 d时,在较多小圆形单核细胞之间,可观察到部分体积较大、多核(3~10个)细胞出现,呈大圆形、多角型或半圆形等多种形态,时有细胞突起向外延展出现,细胞贴壁牢固,胞质的密度较低,细胞核或集聚在细胞中央,或散在细胞周边,核内可见1~3个核仁不等。多核细胞周围有较多的小圆形单核细胞募集、融合,其胞质的一部分与多核大细胞有部分连接状形态(图1)。

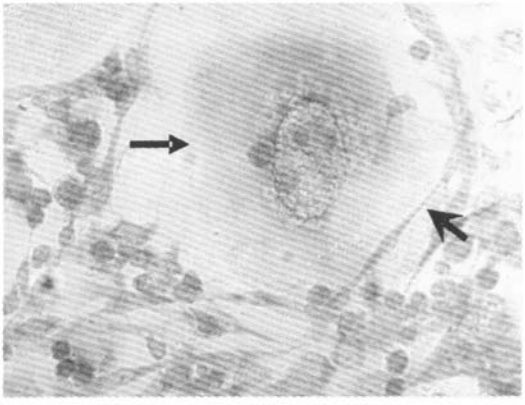

图1 诱导培养后第6天,多核细胞(平尾箭头)周围有较多的小圆形单核细胞聚集、融合,其胞质的一部分与多核细胞有部分连接(燕尾箭头)(Gimsa染色×200)

2.1.1 TRAP染色:TRAP染色是鉴定OC的特异性酶学染色方法。玻片上可见有$TRAP^+$(TRAP染色阳性)的多核细胞零星分布,细胞形体较大,$TRAP^+$的细胞周围可见大量小圆形细胞,颜色棕红色,见图2。

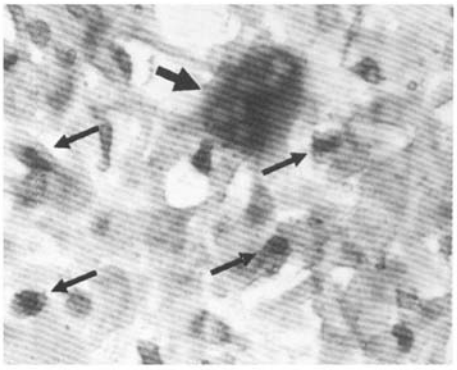

图2 诱导后第6天,TRAP染色阳性的多核细胞(大箭头),其周围可见TRAP染色阳性的圆形小细胞(小箭头)(TRAP染色 ×300)

2.1.2 镜下骨陷窝的形态特点:未经干扰正常诱导第6天的破骨细胞,与之共培养的牛薄骨片上可形成骨吸收陷窝,1%甲苯胺蓝染色呈蓝紫色圆形、椭圆形或腊肠形等多种形态,边界清楚,呈串排列或者孤立出现,扫描电子显微镜照片可见陷窝底面粗糙不平,部分纤维纹路隐约可辨(图3)。

2.2 siRNA转染后OCL的变化

转染后2 h,与转染前相比,除部分体积较大的细胞胞质内有空泡出现外,OCL没有明显的形态改变,荧光显微镜观察发现,部分细胞质内散在有颗粒状荧光染色。转染后24 h,一些体积较大的OC前体细胞和部分小细胞内有较多荧光颗粒,且亮度较2 h明显增强(图4)。200倍光镜下观测10个随机视野中转染细胞与总体细胞比例,计算出各组间转染率(表1),可见各转染组间转染率组间差异无显著性($P>0.05$)。

表1 转染24 h不同转染组间中转染率($\bar{x} \pm s$)

转染组	转染率(%)
T_1	36.09±6.39
T_2	36.53±9.01
T_3	37.15±10.29

注:各组之间比较 $P>0.05$

2.3 转染后OCL特异Atp6i的表达变化

Ⅰ号siRNA转染后,T1组中Atp6i基因RT-PCR扩增产物密度值较其他组减少,差异明显($P<0.01$),内参Gapdh基因扩增产物密度值较其他组差

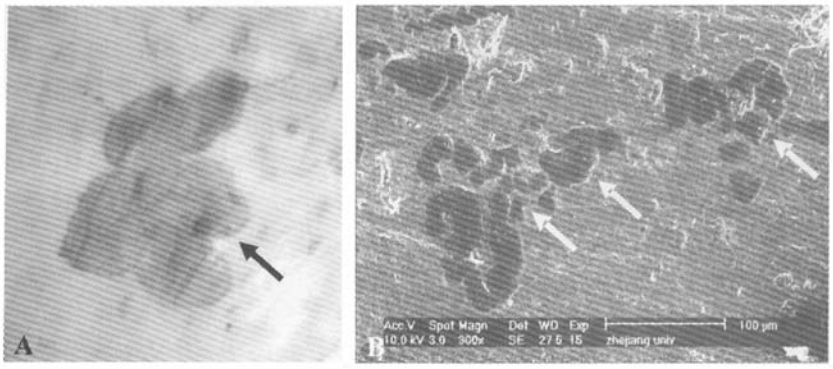

图3 与未干扰正常诱导第6天的破骨细胞共培养的牛骨片照片。A:光学显微镜照片,可观察到较周围骨组织深染的骨陷窝(箭头),为斑片状骨质吸收区,(甲苯胺蓝染色 ×150)。B:扫描电子显微镜照片,骨吸收陷窝呈现呈圆形、椭圆形、花瓣形或不规则形,成串或孤立出现,边界清晰、底面粗糙不平(箭头)(×300)

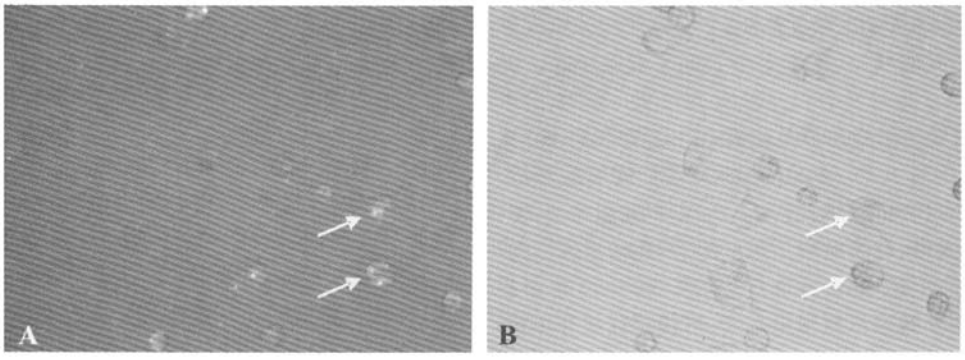

图4 SiRNAs转染后24 h,可观察到破骨细胞前体细胞呈现荧光标记阳性(A,箭头)。B:与A图对应部位的明视野照片(×200)

异不明显($P>0.05$),而且相对密度值较其他组明显减少($P<0.01$),而T_2、T_3与T_4之间Atp6i、Gapdh基因扩增产物密度值以及相对密度值无明显差异($P>0.05$),1.7%琼脂糖凝胶电泳如(图5),说明通过RNAi技术将外源性Ⅰ号siRNA片段转入OCL内,特异性的降解了Atp6i的mRNA(表2)。

表2 Ⅰ号siRNA不同转染组间RT-PCR产物密度值($\bar{x}\pm s$)

group	密度值		相对密度值
	Atp6i	Gapdh	Atp6i/Gapdh
T_1	4732.67±4341.28△▲	76397.94±33572.21	0.0707±0.0594△▲
T_2	10121.50±5403.21	87580.39±36875.84	0.1191±0.0524
T_3	9582.00±6218.91	84183.33±34851.09	0.1147±0.0560
T_4	8328.17±4466.42	72162.33±32695.85	0.1162±0.0289

注:T之间组比较△ $P<0.05$,▲ $P<0.01$

Ⅱ号siRNA转染后,T_1组中Atp6i基因RT-PCR扩增产物密度值较其他组差异不明显($P>0.05$),内参Gapdh基因扩增产物密度值较其他组、相对密度值较其他组亦无明显差异($P>0.05$),1.7%琼脂糖凝胶电泳如(图6),说明通过RNAi技术将外源性Ⅱ号siRNA片段转入OCL内,没有特异性的降解Atp6i的mRNA(表3)。

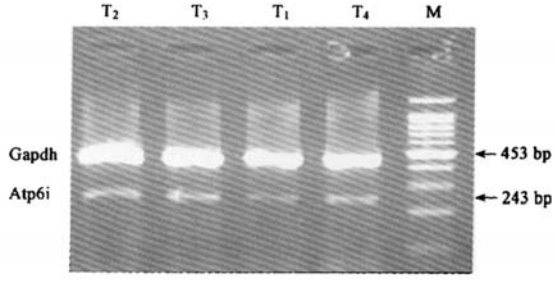

图5 Ⅰ号siRNA转染后24h,各组RT-PCR产物,转染组Atp6i基因mRNA表达降低

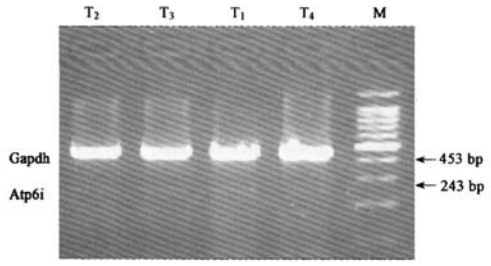

图 6 Ⅱ号 siRNA 转染后 24h,各组 RT-PCR 产物,各转染组间 Atp6i 基因 mRNA 表达变化不明显

表 3 Ⅱ号 siRNA 不同转染组间 RT-PCR 产物密度值($\bar{x} \pm s$)

group	密度值		相对密度值
	Atp6i	Gapdh	Atp6i/Gapdh
T_1	13158.50 ± 4883.31	82479.72 ± 37343.27	0.2092 ± 0.1856
T_2	12618.22 ± 8380.28	75633.11 ± 25016.86	0.2001 ± 0.1980
T_3	13326.22 ± 8970.25	81135.78 ± 28596.02	0.2050 ± 0.2131
T_4	11408.28 ± 6873.33	90309.89 ± 37193.79	0.1723 ± 0.1855

注:T 之间组比较 $P > 0.05$

3 讨论

OC 是高度分化的多核巨细胞,直接参与骨吸收,是骨组织吸收的主要功能细胞。目前,多数学者认为 OC 来源于单核/巨噬细胞前体细胞[7,8]。破骨细胞、巨噬细胞、单核细胞共同来源于同一造血前体细胞—粒巨噬细胞集落形成单位。本实验结果与文献报道[3,9]一致,骨髓细胞在 1,25(OH)$_2$D$_3$ 的作用下,可分化为 OCL,TRAP$^+$ 且在骨片上形成吸收陷窝,具有与 OC 类似的生物学活性。

Atp6i 基因表达产物为分子量 116 kDa 的蛋白,是 OC 空泡型质子泵(空泡型氢离子三磷酸腺苷转运酶 Vacuolar H$^+$-translocatiing,ATP-ase,简称 V-ATPase)跨膜部分之一,V-ATPase 活化后将 H$^+$ 分泌到细胞外而完成骨吸收功能。李亦平等[10,11]首次克隆了小鼠 Atp6i 基因,并制备出该基因缺失的小鼠,该小鼠的 OC 数目正常,可附着在骨上,但不能形成吸收陷窝;破骨样多核细胞不能形成细胞外酸化腔,也不能使骨去矿物化;OC 失去细胞外酸化功能,使小鼠出现严重的骨质硬化。表明 Atp6i 对 OC 发挥骨吸收功能是必需的。

特定环境中机体内 OC 功能异常过度活跃,出现异常骨吸收,在骨质疏松症、Paget 病、风湿性关节炎的关节破坏、骨巨细胞瘤生长及骨肿瘤侵润等骨科疾病,以及牙周病等口腔疾病中是普遍存在的病理变化。临床上应用雌激素、降钙素、二磷酸盐等药物来抑制 OC 分化、在骨质吸收部位的聚集、骨吸收功能,取得了较为满意的疗效。但是这些药物的毒副作用一直困扰着我们,且对 OC 骨吸收的关键基因 Atp6i 表达的影响缺乏特异性。目前,针对 OC V-ATPase 的抑制剂有 Bafilomycin A1、SB 242784、FR 177995、FR 167356 等[12],但是这些抑制剂存在着不同程度的抑制效率低下、对 Atp6i 特异性差等不足。基因敲除的实验方法虽然能特异性地使靶基因丧失功能,但也有缺陷,由于 Atp6i 基因缺失小鼠[11]存活时间短,牙齿发育不全,骨骼短小、骨皮质薄而脆并患有严重的骨硬化症,不能作为研究异常骨吸收的理想实验模型,由此可知长期的基因抑制会导致以上的结果。故针对 OC V-ATPase 开发新的高特异性、高效率的抑制剂是为临床药物研究的热点问题之一。

从基因水平间断地抑制 Atp6i 基因的表达,借以纠正功能过度活跃的 OC 到正常的状态,RNAi 技术完全可以实现这个设想。siRNA 可在哺乳动物细胞组织内引起基因短时间封闭作用,能在低于反义核苷酸几个数量级的浓度下,使靶基因降至极低水平甚至完全"敲除"[2,13]。2001 年 Elbashir 等[14]首次报道 siRNAs 在哺乳动物体外培养细胞内成功诱导基因特异阻抑以后,siRNA 是否可应用于人类疾病的治疗受到了广泛的关注。2005 年 Bai XC 等[15]通过体外诱导培养 OC 并利用 siRNA 研究小鼠 CREB1 和人 HSF 2 基因对 OC 形成的作用和功能取得成功。

本实验以体外诱导的大鼠 OC 为研究对象,以 RNAi 技术为手段,以编码大鼠 OC 质子泵的 Atp6i 的基因转录产物(mRNA)为靶点,从 3 组体外合成的候补序列中,筛选出具有高特异性、高效抑制大鼠破骨细胞 Atp6i 基因转录产物的 siRNA 序列,目的 mRNA 被降解的同时发现骨吸收功能下降,陷窝数目减少(未发表数据)。

OC 是骨吸收的功能细胞,其功能异常导致骨改建平衡失调,是多种代谢性骨病的病理基础,Atp6i-siRNA 的应用可以高特异性、高效的抑制体外培养的 OC 的骨吸收功能,进而可以有效的纠正绝对或者相对旺盛的骨吸收功能状态,达到恢复骨吸收、重建动态平衡。可以防治如骨质疏松症、Paget's 病、激素性股骨头坏死、风湿性关节炎、肿瘤、牙周病等疾病,因此,Atp6i-siRNA 的应用为今后进一步开展动物体内研究及尝试在分子水平上治疗 OC 骨吸收代谢疾病提供了重要的参考依据,具有广阔的临床应用前景。

【参考文献】

[1] Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference new hope for a highly specific cancer treatment. Cancer Cell,2002,2:167-168.

[2] Brummelkamp TR. A system for stable expression of short interfering RNAs inmammalian cells. Science, 2002, 29(5567):550-553.

[3] 李铁军,于世凤,王晓敏.1,25-二羟基维生素 D_3 对小鼠骨髓细胞形成破骨细胞样细胞及其骨吸收效应的影响.中国骨质疏松杂志,2000,6(3):12-15.

[4] Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology, 1988, 122:1473-1482.

[5] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small linterfering RNAs. Methods, 2002,26:199-213.

[6] 于明香,金慰芳,王洪复.破骨细胞体外培养生存数的观察于鳗鱼降钙素的影响.中国骨质疏松杂志,1996,2(4):13-15.

[7] Blair HC, Athanasou NA. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. Histol Histopathol, 2004,19(1):189-199.

[8] Stenbeck G, Horton MA. Endocytic trafficking in actively resorbing osteoclasts. J Cell Sci, 2004,29:117(Pt 6):827-836.

[9] Knrihara N, ChPnu C. Identification of commited mononuclear precursons for osteoclasting like cells formed in long term human marrow cullures. Endocrinology, 1990, 126:2733-2741.

[10] Li YP, Chen W, Stashenko P. Molecular cloning and characterization of a putative novel human osteoclast-specific 116-KDa vacuolar proton pump subunit. Biochem Biophys Res Comm, 1996, 218:813-821.

[11] Li YP, Chen W, Liang, Y, et al. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. Nature Genet, 1999, 23:447-451.

[12] Niikura K, Takeshita N, Takano M. A vacuolar ATPase inhibitor, FR167356, prevents bone resorption in ovariectomized rats with high potency and specificity: potential for clinical application. J Bone Miner Res, 2005,20(9):1579-1588.

[13] Yu JA. RNA interference by expression of short-interferinRNAs and haipin RNAs inmammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9):6047-6052.

[14] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature,2001, 411:494-498.

[15] Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. J Biol Chem, 2005, 280(17):17497-17506.

(收稿日期:2006-03-09)