

在酵母中异源表达人破骨细胞钠氢转运蛋白

黄晓斌 仲蕾蕾

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)01-0024-05

摘要: 目的 在酿酒酵母中异源表达人破骨细胞分化成熟潜在因子钠氢转运蛋白 2(HsNHA2), 鉴定其作为盐离子载体转运 Na^+ 的功能, 并对其在细胞中的表达进行初步定位分析。方法 采用高保真 PCR 试剂盒扩增出 HsNHA2; 构建酵母表达载体, 通过电穿孔的方式转入到酿酒酵母菌株中; Western 印迹检测其在酵母菌株的表达; 通过 NaCl 选择压力观察菌株在高盐环境中的生长表型, 并用根皮素抑制 HsNHA2 观察其抗盐功能; 最后用细胞原位荧光染色确定 HsNHA2 在细胞中的表达位置。结果 Western 印迹证实 HsNHA2 在酵母菌株中正常表达; 生长曲线显示 HsNHA2 可使菌株在高盐环境中生长, 根皮素抑制 HsNHA2 表达后菌株不能在 0.2 mol/L NaCl 培养基中生长; 免疫荧光染色初步证明 HsNHA2 表达在细胞膜上。结论 HsNHA2 作为盐离子载体在酵母细胞中主要表达在细胞膜上行使转运 Na^+ 的功能, 以维持细胞正常生长。

关键词: 破骨细胞; 钠氢转运蛋白 2; 酿酒酵母; 生长曲线

Heterogeneous expression of osteoclast HsNHA2 in yeast HUANG Xiaobin, ZHONG Leilei. Institute of Agriculture and Life Science, Chongqing University, Chongqing 400030, China

Corresponding author: HUANG Xiaobin, Email: bmwzzhsh@gmail.com

Abstract: Objective To heterogeneously express HsNHA2, the potential factor for the differentiation and maturation of human osteoclast, in *Saccharomyces cerevisiae*, to identify its function to transport Na^+ as a salt transporter, and to conduct an initial location analysis of its expression in cell. **Methods** HsNHA2 was amplified using the high fidelity PCR kit. The vector expressed in *Saccharomyces cerevisiae* was established and transferred into BW31a using electroporation method. The expression in the strain was measured using Western blotting. The growth curve of the strain in high salty concentration medium was observed through NaCl-dependent pressure. The salt-resistant function was observed using phloretin as an inhibitor for HsNHA2. The location of HsNHA2 expressed in the cell was defined using fluorescent in situ staining. **Results** The results of Western blotting demonstrated that HsNHA2 expressed in BW31a normally. The growth curve showed that BW31a grew in the high-salt concentration medium in the presence of HsNHA2. The growth was inhibited in the 0.2 M NaCl medium when the expression of HsNHA2 was inhibited by phloretin. Immunofluorescence staining demonstrated that HsNHA2 was expressed in the cell membrane. **Conclusion** HsNHA2 is mainly expressed in the cell membrane to transport Na^+ as a salt transporter. It can maintain the normal growth of the cells.

Key words: Osteoclast; human Na^+ - H^+ antiporter 2; *Saccharomyces cerevisiae*; growth curve

破骨细胞的骨吸收作用在哺乳动物的正常骨代谢平衡是必需的, 在骨重建中发挥着重要的作用。在生物体中, 所有细胞都会根据所处的生长环境来不断调节自己, 以求得更好的生长和发育。其中, 钠

离子(Na^+)浓度和钾离子(K^+)浓度就是细胞所调节的对象。根据 Na^+ 、 K^+ 与氢离子(H^+)的浓度梯度, 细胞可通过阳离子转运载体来调节其盐离子浓度和 pH 值, 以满足细胞正常发育。因此, 在生命界所有生物中, 都需要有一个 pH 值依赖的阳离子/质子载体(CPA)来控制细胞内外的离子浓度。这无论是对维持细胞内的 pH 值、细胞容积、离子的吸收转运, 还是在细胞分裂、增殖、迁移、黏附、凋亡等生命

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2011BB1097); 国家自然科学基金资助项目(31100029)

作者单位: 400030 重庆, 重庆大学农学与生命科学研究院

通讯作者: 黄晓斌, Email: bmwzzhsh@gmail.com

过程中都是至关重要的。破骨细胞尤其依赖这样的离子载体来维持细胞内外的各种离子浓度。

CPA 这个超家族成员主要催化单价阳离子的转运,包括:Na⁺, H⁺, K⁺, NH₄⁺。整个 CPA 家族包括 CPA1, CPA2 和 NaT-DC (Na⁺-transporting carboxylic acid decarboxylase)三个亚家族^[1-3]。

HsNHA2(钠-氢转运体)在破骨细胞里面是通过影响质子浓度来调节细胞盐离子水平,从而发挥骨吸收作用,进一步调节与离子浓度有关的生理代谢。细胞内外的 pH 值稳定是维持细胞正常功能的前提,细胞内 pH 调节途径主要包括 Na⁺-H⁺ 交换泵(NHE)、Na⁺ 依赖的和 Na⁺ 独立的 Cl⁻-HCO₃⁻ 交换泵、电性的 Na⁺-HCO₃⁻ 共同转运通道、H⁺ 乳酸通道和 H⁺-ATP 酶通道等,其中 NHE 起着非常重要的作用。胞膜 NHE 是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白,属于 CPA1 亚家族。到目前为止,已经有 10 个 NHE 亚型被鉴定。NHE 的功能障碍会引起一些生理病变,包括高血压、癫痫、心律不齐、腹泻、青光眼以及胃肠道病和肾脏以及各种肿瘤等方面的疾病^[4,5]。

但大多数真核生物中的 CPA2 家族成员还不为我们所知。HsNHA2 在维持人类骨代谢平衡中发挥着潜在的功能。本实验拟在酵母菌中异源表达 CPA2 家族的 *HsNHA2* 基因,来对 HsNHA2 各方面功能进行初步鉴定。进一步为骨代谢疾病的病理机理做一深入基础理论研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:盐敏感型酿酒酵母菌株 BW31a (enal-4Δ, nha1Δ), TOP10 感受态大肠杆菌购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 质粒:pCMV6-XL5-HsNHA2 购自 Origene 公司;pNHA1-985, pYES2.1/V5-His-TOPO Vector 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要生化试剂:RNA 酶(Invitrogen);苯甲基磺酰氟 PMSF (Sigma);Taq DNA 聚合酶(Invitrogen);T4DNA 连接酶(NEB);AMV 逆转录酶(Invitrogen);Apa (NEB);XbaI (NEB);1kb DNA Marker(Invitrogen);100bp DNA Ladder(Invitrogen);预染 protein Marker (Invitrogen);高保真 PCR 试剂盒(Invitrogen);普通 PCR 试剂盒(Invitrogen);小量质粒提取试剂盒(QIAGEN);中量质粒提取试剂盒(QIAGEN);PCR 产物回收试剂盒(QIAGEN);快速

DNA 凝胶回收试剂盒(QIAGEN);酵母载体试剂盒(pYES2.1 TOPO TA Expression Kit, Invitrogen);鼠 Anti-V5 抗体(Invitrogen);Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H + L) (Invitrogen);Poly-L-lysine solution (1) (Sigma);Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen);DAPI (Sigma);Zymolyase (Zymo Research) Coverslips (Fisher);兔抗鼠 IgG HRP(Invitrogen)。

1.1.4 HsNHA2 引物:上游:5'-GCCATGGGGGATGAAGATAAAAG-3';下游:5'-AACTTGCACAGAAGTCTCTCC-3'。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制:1) YPD 培养基:采用对盐敏感型酵母菌株 BW31a (enal-4Δ, nha1Δ)作为 HsNHA2 基因表达的宿主细胞,因 BW31a 菌株中固有离子载体基因已被敲出,所以 BW31a 不耐受有盐溶液,甚至不能在很低浓度的盐溶液中生长。为了使 BW31a 菌株正常生长,需要在 YPD 培养基中添加腺嘌呤(Adenine),使其终浓度为 20μg/ml。2) YNB 培养:YNB 培养基是不完全培养基,针对 BW31a 的生长及筛选要求,配制时需要添加腺嘌呤、组氨酸、亮氨酸、色氨酸,使其终浓度为 20μg/ml, pH 值 4.5 左右。

1.2.2 构建质粒 pYES2.1-NHA2-V5-His-TOPO:从 Origene 公司购得含有 *HsNHA2* 基因全长 cDNA 的质粒 pCMV6-XL5-*HsNHA2*,此基因启动子是哺乳动物细胞启动子,不能在酵母细胞中诱导表达筛选。从 Invitrogen 购得适合酵母做宿主细胞的空质粒 pYES2.1/V5-His-TOPO,根据这个质粒和 *HsNHA2* 基因来设计引物把 *HsNHA2* 从 pCMV6-XL5-*HsNHA2* 扩增出来,设定好 PCR 程序:94℃ 2min;94℃ 变性 30s,55℃ 退火 45s;68℃ 延伸 2min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 QIAGEN QIAquick® PCR Purification Kit 纯化。然后把 PCR 产物与 pYES2.1/V5-His-TOPO 空载体连接,转化 TOP10 感受态大肠杆菌细胞。得到含 *HsNHA2* 的质粒 pYES2.1-NHA2-V5-His-TOPO。此质粒上 *HsNHA2* 基因可以用半乳糖诱导表达。

1.2.3 质粒提取及酶切分析:质粒初步构建后用 QIAGEN mini Plasmid 试剂盒根据操作指南小量提取质粒,先供酶切分析,然后送测序单位测序。在酶切、测序确认后,做好菌种保存。同时用 QIAGEN® Plasmid Midi Kit 中量提取纯化质粒,以供后续转化之用。

1.2.4 制酵母感受态细胞:把 BW31a 接种到 50ml YPD(添加 Adenine), 30℃ 200 转/min 培养过夜;取出培养过夜的 50ml YPD 菌液, 1500 转/min 4℃ 离心 5min, 放在冰上;然后依次用 40ml、20ml、5ml 冰冷的 1mol/L 山梨醇洗细胞, 1500 转/min 4℃ 离心 5min, 最后把细胞重新悬浮于 200 μ l 冰冷的山梨醇, 分装成 40 μ l 每管待用。本实验室每次用的感受态细胞均为新鲜制备。

1.2.5 电转染酵母细胞:向 40 μ l 制好的酵母感受态细胞中加入 1 μ l (约 0.5 μ g) 质粒 DNA (HsNHA2、空载体、pNHA1-985)。混匀后加入到电转小管, 冰上放置 5min;按照所需电转参数设置好电转仪: V = 1.5kV, 25 μ F, 200 Ohms, 时间持续 4.8s 左右。电转完后, 立刻加入 200 μ l 1mol/L 山梨醇;取 100 μ l 电转完酵母细胞涂到 2% 葡萄糖 YNB 板, 然后 30℃ 培养;48h 后, 酵母克隆慢慢长出。

1.2.6 蛋白免疫印迹:电转染成功得到克隆后, 挑取克隆用 2% 半乳糖 YNB 溶液培养过夜, 充分诱导 HsNHA2 表达。收集好细胞后用 Tris-Glycine SDS Sample Buffer(2 $\times$)处理;95℃ 加热 5min, 使蛋白变性;然后上样跑胶, 转膜后用鼠抗 Anti-V5 (1:1000) 作为第一抗体;4℃ 封闭过夜;用兔抗鼠 IgG HRP(1:500)作为第二抗体。孵育、洗膜后, 加入显影液, 然后在 X-RAY 中曝光。

1.2.7 酵母生长表型鉴定:① 固体培养基上生长:在电转 HsNHA2、空载体(阴性对照)、pNHA1-985(阳性对照)后, 把这三类 BW31a 菌株分别在固体培养板上接菌生长, 观察其克隆抗盐生长表型异同。按如下步骤操作:配制不同浓度 NaCl 的 2% 半乳糖 YNB 琼脂板;用 YPD 培养过夜后, 低速离心, 重悬于 2% 半乳糖 YNB 中, 调其浓度, 使其浓度处于相同状态(大约 OD600 值在 1.8);然后每突变克隆滴 6 孔, 按 10 倍稀释倍数每孔滴加 3 μ l, 滴加完待板干后, 放于 30℃ 培养, 大概 4d 后能对比出抗盐生长差异。② 液体培养基上生长曲线的测定:对电转后的 BW31a 菌在不同盐浓度 YNB 中进行生长曲线的测定。在用 YPD 培养过夜后, 低速离心, 重悬于 YNB 中, 测其 OD600 值, 分别加入到 10ml 不同盐浓度的 2% 半乳糖 YNB 中, 使其初始浓度处于相同状态(大约 OD600 值在 0.05), 然后每 12h 测其 OD600 值一次, 整个历程 72h, 根据所测 OD600 值做生长曲线。

1.2.8 根皮素(Phloretin)抑制实验:分别配制 100 μ mol/L、200 μ mol/L、300 μ mol/L、500 μ mol/L、700 μ mol/L 不同浓度的根皮素 YNB 液体培养基;分

两个组, 一个组不含 NaCl, 另一个组含 0.2mol/L NaCl, 接菌后做生长曲线观察根皮素抑制 HsNHA2 情况。

1.2.9 细胞免疫荧光染色:按下面操作步骤做细胞原位免疫荧光染色分析:首先接种 BW31a 酵母菌到 2ml YPD(腺嘌呤 20 μ g/ml)中, 200 转/min 30℃ 摇床中生长过夜;接种 5 μ l 过夜培养液到 5ml 2% 半乳糖 YNB 中, 200 转/min 30℃ 摇床中生长约 12h 到对数生长期;向培养基中直接加入 600 μ l of 37% 甲醛, 固定细胞, 30℃ 放置 30min;取出 1.5ml 固定好的细胞放入 EP 管中, 5000 转/min 快速离心 1min;用 0.1mol/L 磷酸钾 pH 6.5 洗三次;加入 25 μ l 1mol/L DTT, 30℃ 放置 10min;加入 2 μ l zymolyase(5 单位)和 5 μ l B-mercaptoethanol 于 37℃ 放置 60min, 使酵母细胞壁充分裂解;准备盖玻片:向每块盖玻片上滴加 25 μ l 0.1% polylysine, 室温放置 10min, 水冲洗一遍晾干;加入 300 μ l P 溶液, 混匀;滴加 25 μ l 细胞液到盖玻片上, 室温放置 10min, 吸去多余溶液;浸入冰甲醇 6min, 吸干, 加入冰丙酮 30sec, 晾干;用 PBS-BSA 洗一遍, 然后用 PBS-BSA 封闭 30 minutes;吸干后加入适量 Anti-V5 (1:2500), 4℃ 过夜;PBS-BSA 洗三遍, 5min/遍;加入二抗(Alexa 488, 1:500), 室温 4h;PBS-BSA 洗三遍, PBS 洗一遍;加入适量 DAPI, DAPI 1:1000 in 1X PBS(0.1 μ g/ml), 室温 10min;吸干, 用 PBS 洗三遍, 空气晾干;浸入 antifade 溶液数秒, 吸去多余溶液;把载有细胞的盖玻片倒扣到载玻片上, 用指甲油封好边缘。共聚焦显微镜拍照。

2 结果

2.1 半乳糖可诱导酵母 BW31a 异源表达 HsNHA2
首先把 HsNHA2 克隆进 pYES2.1/V5-His TOPO TA 酵母质粒载体, 在 GAL1 启动子的控制下, HsNHA2 基因可以被 GAL1 诱导表达, 表达出来的蛋白产物是 HsNHA2 与 V5 标签的融合蛋白, 可用抗 V5 的抗体检测 HsNHA2 的表达情况, HsNHA 表达蛋白与 V5 融合之后在 60 KDa 左右。用 pNHA1-985 GFP(表达酵母自身的 NHA1 载体蛋白)作为阳性对照;用 pYES2.1/V5-His TOPO TA 空载体做完阴性对照。构建好的质粒载体通过电穿孔的方法转入对盐敏感的 BW31a (ena1-4 Δ nha1 Δ)酵母菌株, 此菌株缺少离子载体(Ena1-4 Na⁺-ATPases and Nha1 Na⁺/H⁺ antiporter)。用半乳糖诱导后, 通过 Western 检测到 HsNHA2 在 BW31a 中有所表达。可

以看出在半乳糖诱导下,含 pYES2.1-NHA2-V5-His-TOPO 的 BW31a 菌株可以正常表达出 HsNHA,而含空载体 pYES2.1-V5-His-TOPO 的 BW31a 菌株无表达(图 1)。

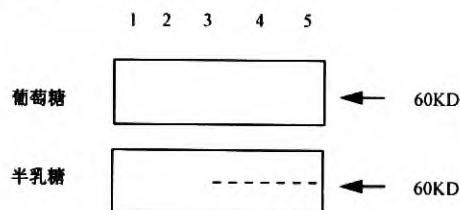


图 1 酵母 BW31a 异源表达 HsNHA2 情况

“1 泳道”为空载体的 BW31a 阴性对照;“2,3,4,5 泳道”为含 pYES2.1-NHA2-V5-His-TOPO 的 BW31a 菌株四个重复

2.2 半乳糖诱导酵母 BW31a 异源表达 HsNHA2 后可在 0.4mol/L NaCl 固体 YNB 培养基上生长

为了证实 HsNHA2 的转盐功能,把成功转入 HsNHA2 的 BW31a 在不同盐浓度(0~0.4mol/L)的 2% 半乳糖 YNB 平板上生长,2% 葡萄糖 YNB 平板作为对照。结果显示,所有的菌株在没有盐的 2% 半乳糖 YNB 和 2% 葡萄糖 YNB 平板中都同样的生长。说明充分表达 HsNHA2 对细胞没有毒性。但当放在 0.4mol/L NaCl 的半乳糖 YNB 板上生长时,只有表达有 HsNHA2 的细胞和阳性对照才能抗盐生长(图 2),这说明 NHA2 有离子转运功能,能使 BW31a 菌株恢复抗盐功能。但与阳性对照比较起来,长势稍差,这是因为阳性对照带有酵母自身的离子载体,而转进去的 HsNHA2 是人源离子载体。

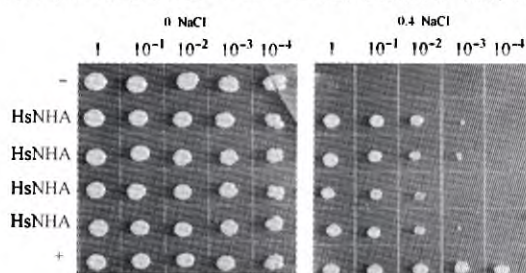


图 2 酵母菌株分别在 0 mol/L、0.4 mol/L NaCl 固体 YNB 培养基上生长情况

注:“-”为空载体菌株作为阴性对照;“HsNHA2”为含 HsNHA2 的 BW31a 菌株,共四个重复;“+”为含酵母本身离子载体 NHA1-985 的 BW31a 菌株,作为阳性对照

2.3 异源表达 HsNHA2 后,BW31a 可在 0.6 mol/L NaCl 液体 YNB 培养基中的生长

为了鉴定异源表达的 HsNHA2 的 BW31a 能耐盐生长,我们也用液体培养基做生长曲线验证。在无盐的 2% 半乳糖 YNB 培养中,阴性对照、

HsNHA2、阳性对照表现出同样的生长状况。但在加有 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 的 2% 半乳糖 YNB 中,生长速度就大大不同,转染空载体的细胞(阴性对照)生长非常慢;转染 HsNHA2 的细胞生长快,虽然还没有带酵母自身 NHA1(阳性对照)的细胞生长迅速(图 3)。这些结果说明 HsNHA2 的表达在 BW31a 细胞中能发挥起离子载体的功能。

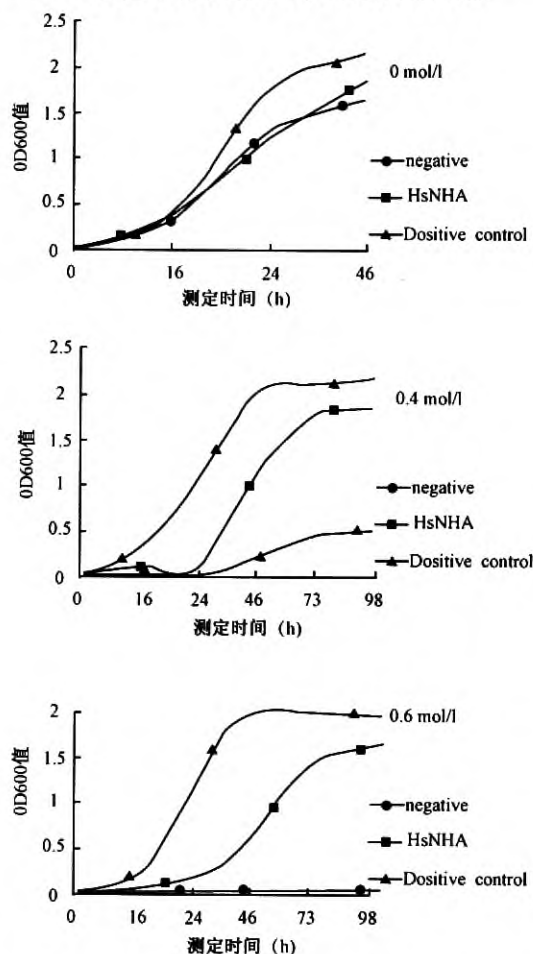


图 3 HsNHA2、阴性对照、阳性对照在不同 NaCl 浓度(0 mol/L、0.4 mol/L、0.6 mol/L)的 YNB 培养基中生长曲线

2.4 根皮素(Phloretin)抑制 HsNHA2 载体功能

已经有其它研究组人员报道根皮素在很大程度上会抑制 NHE 的功能^[6]。我们发现根皮素也可以抑制 HsNHA2 的功能,如图 4 所示,根皮素(100 μmol/L)就可完全使 BW31a 不能在 0.2 mol/L NaCl 中不能生长。但是在没有 NaCl 的 YNB 中却没有抑制作用。这说明根皮素很特异地抑制 HsNHA2 功能。

2.5 HsNHA2 表达于细胞膜上发挥离子转运功能

为了弄清楚 HsNHA2 被诱导表达后在细胞中的所处的位置,我们分别对葡萄糖 YNB 培养基和半乳

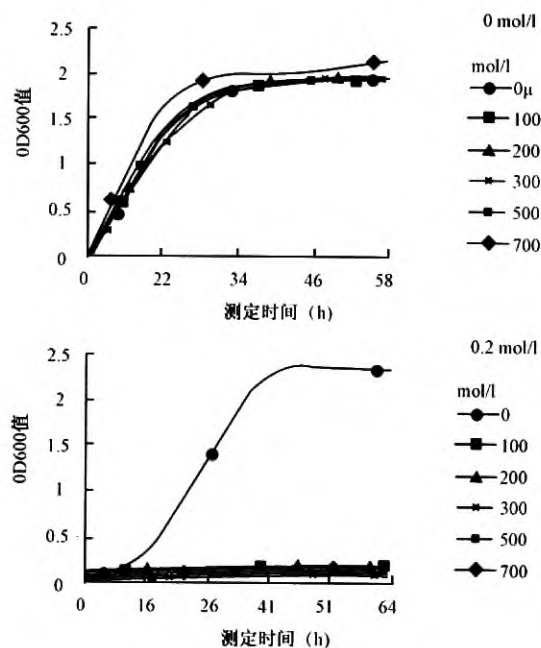


图4 根皮素抑制 HsNHA2 功能

糖 YNB 培养基培养的转 HsNHA2 BW31a 进行细胞免疫荧光杂交染色,来定位 HsNHA2。结果显示 HsNHA2 诱导表达后,都定位于细胞膜上发挥作用(见图5)。

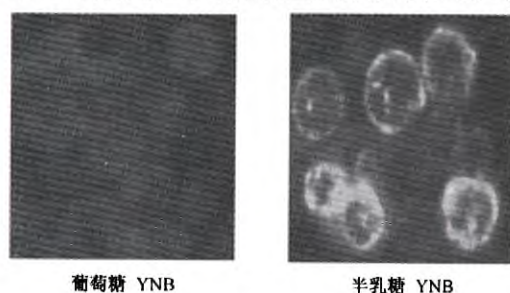


图5 HsNHA BW31a 免疫荧光染色

蓝色:DAPI 细胞核染色;绿色:Alexa Fluor 488 F(ab')染色

3 讨论

已有研究证明,在正常的破骨细胞中,所有的骨吸收作用都可能会因为质子泵和阳离子/质子载体被阻断后而消失^[7],这说明了负责阳离子/质子通道的分子是很密切地与破骨细胞功能和骨吸收有关,最后影响着整个骨平衡的作用。HsNHA2 作为阳离子/质子载体的一种,属于 CPA2 家族成员,也是通过转运钠离子质子来调节细胞内部微环境,从而影响整个机体发育。

本实验在酵母菌中异源表达 CPA2 家族的 HsNHA2 基因,对 HsNHA2 在作为盐离子载体转运 Na⁺ 方面做了初步鉴定。生长曲线实验验证在酵母

BW31a 上异源表达 HsNHA2 能使 BW31a 部分恢复抗盐功能,因酵母 BW31a 菌株本身缺少离子通道蛋白,对盐异常敏感,不能在含盐溶液下生长。在电转 HsNHA2 后,经过半乳糖诱导,可表达 HsNHA2,使其获得部分离子转运功能,对盐敏感下降,能在低盐浓度溶液下生长。说明真核 CPA2 家族成员 HsNHA2 虽然与 CPA1 家族成员 NHE 1-10 氨基酸序列不一样,但一样有着钠氢转运作用,维持着细胞内正常的酸碱浓度。

根皮素已经早被报道作为水通道 Aquaporin 9 (AQP9) 的特异性抑制物,AQE 是一种能加强膜上水的渗透性,而且可以上调 RANKL 来诱导的破骨细胞前体^[8]。但这些结果都不能在体内证明,因为 AQP 敲出小鼠与野生型小鼠有相似的破骨细胞数量、密度和结构。表明 AQP 对体内破骨细胞成熟并不是必须的。从我们的实验结果来看,载体抑制剂根皮素也强烈地抑制 HsNHA2 的功能,推测在破骨细胞中,根皮素可能也会一部分通过抑制 HsNHA2 的功能而进一步来影响破骨细胞分化。

HsNHA2 作为一种破骨细胞潜在的成熟分化因子,在维持人类骨代谢平衡中发挥着潜在的功能,对于人类各种骨代谢疾病治疗也有着潜在的作用,这还有待于做进一步深入的研究。

【参考文献】

- [1] Brett CL, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288 (2): C223-239.
- [2] Ritter M, Fuerst J, Woll E, et al. Na⁺/H⁺ exchangers: linking osmotic disequilibrium to modified cell function. *Cell Physiol Biochem*, 2001, 11(1): 1-18.
- [3] Slepov ER, Rainey JK, Sykes BD, et al. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J*, 2007, 401(3), 623-633.
- [4] Zachos NC, Tse CM, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu Rev Physiol*, 2005, 67: 411-413.
- [5] Orlowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Arch*, 2004, 447 (5): 549-565.
- [6] Xiang M, Feng M, Muend S, et al. A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(47): 18677-18681.
- [7] Del Fattore A, Peruzzi B, Rucci N, et al. Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *J Med Genet*, 2006, 43(4): 315-325.
- [8] Aharon R, Bar-Shavit Z. Involvement of aquaporin 9 in osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 2006, 281(28): 19305-19309.

(收稿日期: 2011-08-15)

在酵母中异源表达人破骨细胞钠氢转运蛋白

作者: [黄晓斌](#), [仲蕾蕾](#), [HUANG Xiaobin](#), [ZHONG Leilei](#)
作者单位: [重庆大学农学及生命科学研究院, 重庆, 400030](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2012, 18(1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201201007.aspx