

· 论著 ·

Anti-CD11b 单克隆抗体对超高分子聚乙烯磨损颗粒诱导骨溶解作用的研究

杨国曦 朱庆生* 杨重飞*

第四军医大学附属西京医院骨一科, 陕西 西安 710032

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 02-0145-05

摘要: 目的 通过建立小鼠颅骨溶解模型,探究 anti-CD11b 抗体对颗粒诱导骨溶解的作用。方法 取 10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 32 只,平均分为 4 组, A(空白对照组), 切开颅顶皮肤后即缝合,于术后第二天灌胃生理盐水,并尾静脉注射 PBS, B[脾酪氨酸激酶(Spleen tyrosine kinase, Syk)抑制剂组]、C(anti-CD11b 单克隆抗体组)和 D(颗粒组)组于颅骨骨膜外移植 20 μg 超高分子聚乙烯磨损颗粒后缝合, B 组术后第 2 天起以 15 mg/kg 灌胃 Syk 抑制剂, 尾静脉注射 PBS, C 组术后第 2 天起尾静脉注射 anti-CD11b 单克隆抗体, 2 g/kg, 灌胃生理盐水, D 组术后第二天起每日灌胃生理盐水, 尾静脉注射 PBS。两周后颈椎脱臼法处死小鼠,摘眼球取血测血清肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 值,取颅骨做显微 CT 重建并测骨体积分数,取颅骨骨膜进行 western blot 分析。结果 建模小鼠全部存活,空白对照组、anti-CD11b 单克隆抗体组及 Syk 抑制剂组血清 TNF- α 值均低于颗粒组 ($P < 0.05$);空白对照组、anti-CD11b 单克隆抗体组与 Syk 抑制剂组骨体积分数均高于颗粒组 ($P < 0.05$); Syk 抑制剂组及 anti-CD11b 单克隆抗体组 Erk 活性、c-fos 及 NFATc1 表达均低于颗粒组而高于空白对照组 ($P < 0.05$)。结论 Anti-CD11b 单克隆抗体及 Syk 抑制剂均对颗粒诱导骨溶解具有抑制作用, CD11b 分子通过激活 Syk 通路而发挥促破骨细胞分化作用。

关键词: CD11b; 骨溶解; 颗粒

Anti-CD11b antibody can inhibit osteolysis induced by UHMWPE particles

YANG Guoxi, ZHU Qingsheng*, YANG Chongfei*

Orthopedics Department, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: YANG Chongfei, Email: y384537310@126.com; Zhu Qingsheng, Email: y384537310@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of anti-CD11b monoclonal antibody on bone dissolution model. **Methods** 32 10-week-old C57BL/6J female mice were divided into 4 groups with 8 in each group. Control group (A) received sham operation, then was given normal saline by gavage and received tail intravenous injection of PBS; Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor group (B) received 20 μg Ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMWPE) particles implantation onto the calvariae, then was given p505-15, 15 mg/kg by gavage, and received tail intravenous injection of PBS; Anti-CD11b antibody treatment group (C) received 20 μg UHMWPE particles implantation, then received tail intravenous injection of anti-CD11b antibody, 2g/kg, and was given normal saline by gavage; Particle group (D) received 20 μg UHMWPE particles implantation, then was given normal saline by gavage and received tail intravenous injection of PBS. Two weeks later, the blood was used to measure TNF- α , and mouse calvariae were harvested for digital reconstruction using Micro-CT. The skull periosteal were harvested for western blot. **Results** TNF- α levels of group A, B and C were lower than that of group D ($P < 0.05$). Bone volume fraction (BVF) of group A, B and C were higher than that of group D ($P < 0.05$). Erk activity, c-fos and NFATc1 of group B and C were lower than that of group D and higher than that of group A ($P < 0.05$). **Conclusion** Anti-CD11b monoclonal antibody and Syk inhibitor can inhibit particles induced bone dissolution. CD11b can activate its downstream Syk pathway and promote osteoclast differentiation.

Key words: CD11b; Bone dissolution; Particle

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81301541)

* 通讯作者: 杨重飞, Email: y384537310@126.com

共同通讯作者: 朱庆生, Email: y384537310@126.com

人工关节置换术是本世纪发展最成功的术式之一,然而,无菌性松动造成的术后翻修给患者造成生活质量的下降和经济负担^[1]。作为人体内唯一具

有骨吸收功能的细胞,破骨细胞对骨量的维持以及骨形态的塑造具有非常重要的作用^[2,4]。假体磨损而产生的磨损颗粒可以促进破骨细胞的分化,造成假体周围骨溶解,进一步发展则会引起无菌性松动的发生,并最终导致翻修,因此,研究破骨细胞分化的机制对无菌性松动的预防和治疗具有十分重要的意义。破骨细胞由单核/巨噬细胞分化而来,其分化成熟的过程亦是细胞迁徙和融合的过程,巨噬细胞分化抗原-1 (Macrophage differentiation antigen-1, Mac-1) 分子作为整合素家族的重要一员,除了参与免疫应答和炎症反应,也参与细胞间识别和信号转导^[5]。与 Mac-1 (CD11b/CD18) 分子仅有一个亚基之差的 LFA-1 (CD11a/CD18) 和血管内皮细胞表达的 ICAM-1 (CD54) 的相互作用对破骨细胞的分化具有明显的促进作用^[6-8],而目前尚无 Mac-1 在 RANKL 诱导下破骨细胞导致骨溶解的相关研究,因此,本实验将通过建立超高分子聚乙烯磨损颗粒诱导的小鼠颅骨溶解模型,模拟无菌性松动的发生过程,并探讨 CD11b 分子在颅骨溶解过程中发挥的作用及初步分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

C57BL/6J 清洁级小鼠,10 周龄,由第四军医大学实验动物中心提供。鲎试剂内毒素快速检测试剂盒 (Endosafe, 美国);超高分子聚乙烯 (Ultrahigh molecular weight polyethylene, UHMWPE) 磨损颗粒由德国 ErnstKrendlinger 教授惠赠 (CeridustVP3610, Clariant, Gersthofen, Germany) 50% 的颗粒直径小于 5 μm , 90% 的颗粒直径小于 9 μm , 平均直径为 $1.68 \pm 1.32 \mu\text{m}$;小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (R&D, 美国);anti-CD11b 单克隆抗体 (M1/70, Abcam, 美国), Syk 抑制剂 (P505-15, Selleck, 美国)。显微计算机体层摄影 (General Electric Company, 美国);注射器;常规手术器械 (手术刀、剪血管钳等)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立:术前将 UHMWPE 磨损颗粒用 700 mg/L 乙醇洗涤 24 h,采用鲎检验排除细菌内毒素水平超标,磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍,干燥后用 Co60 照射消毒,并用 PBS 溶液稀释为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 悬浊液。

取 10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 32 只,分为 4 组,每组 8 只,称量体重并做标记。10% 水合氯醛麻醉,经外耳根内侧部连线的中点和眼眶后部连线的

中点之间连线作矢状位切口长约 1.5 cm,暴露额状缝及人字缝间直径约 1 cm 的颅顶骨面积,并保持骨膜完整性。空白对照组 (A) 随即缝合不做任何处理 (假手术组);其余三组以暴露的矢状缝中点为中心,在颅骨骨膜外移植 20 μg UHMWPE 磨损颗粒 (0.5 mL 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的颗粒 PBS 悬浊液),随后间断缝合。术后待小鼠清醒后送入饲养笼中,动物自由摄取食物和水,饲养于清洁动物房中。术后第二天开始进行药物干预:空白对照组 (A) 灌胃生理盐水,37.5 mL/kg,每日两次,并尾静脉注射 PBS, 10 mL/kg,每日 1 次;Syk 抑制剂组 (B) 以灌胃针头灌胃 Syk 抑制剂 (P505-15), 15 mg/kg (浓度为 0.4 mg/mL 的 P505-15 生理盐水溶液),每日两次,并尾静脉注射 PBS, 10 mL/kg,每日 1 次;anti-CD11b 单克隆抗体组尾静脉注射 anti-CD11b 单抗, 2 g/kg^[9] (浓度为 200 mg/mL 的抗体 PBS 溶液),每日 1 次,并灌胃生理盐水,37.5 mL/kg,每日两次;颗粒组 (D) 灌胃生理盐水,37.5 mL/kg,每日两次,并尾静脉注射 PBS, 10 mL/kg,每日 1 次。2 周后,颈椎脱臼法处死小鼠,摘眼球取血,取出颅骨标本。血液离心后用 TNF- α ELISA 试剂盒检测 TNF- α 浓度,颅骨标本进行显微 CT 扫描重建并检测相同部位等面积感兴趣区域 (region of interest, ROI) 的骨体积分数 (bone volume fraction, BVF),若 BVF 值低于空白对照组 ($P < 0.05$),并具备明显的骨溶解征象,则判定为建模成功。

1.2.2 Western blot 分析:提取各组颅骨骨膜总蛋白。依次进行蛋白定量、电泳、转膜和封闭,分别孵育兔抗小鼠一抗 (1:1 000) 及羊抗兔二抗 (1:5 000) 后, ECL 发光液化学发光并显影。采用 Image J 软件进行扫描定量,计算各条带灰度值,并分别除以内参 β -actin 灰度值,并将对照组设为参照。

2 结果

2.1 小鼠血清 TNF- α 浓度

空白对照组、anti-CD11b 单克隆抗体组及 Syk 抑制剂组血清 TNF- α 值均低于颗粒组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 显微 CT 三维重建

建模小鼠全部存活,平均体重 26.6 g。空白对照组图像可见完整颅骨,未见颅骨溶解迹象;Syk 抑制剂组骨溶解程度较颗粒组轻,只出现小部分缺损;anti-CD11b 单克隆抗体组出现轻微颅骨溶解及骨缺损;颗粒组出现严重颅骨溶解,出现大面积缺损。见

图 1。

表 1 小鼠血清 TNF-α 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Mouse serum TNF-α concentration ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Group)	浓度 (μg/mL) (Concentration: μg/mL)
空白对照组 (Control)	1.025 ± 0.002
Syk 抑制剂组 (Syk inhibitor group)	1.145 ± 0.003 ^{a,b}
Anti-CD11b 单抗治疗组 (Anti-CD11b antibody group)	1.202 ± 0.002 ^{a,b}
颗粒组 (Particles group)	1.478 ± 0.006 ^a

注: ^a: 与空白对照组相比结果具有统计学差异 ($P < 0.05$); ^b: 与颗粒组相比结果具有统计学差异 ($P < 0.05$)

^a: $P < 0.05$ vs control, ^b: $P < 0.05$ vs particles group

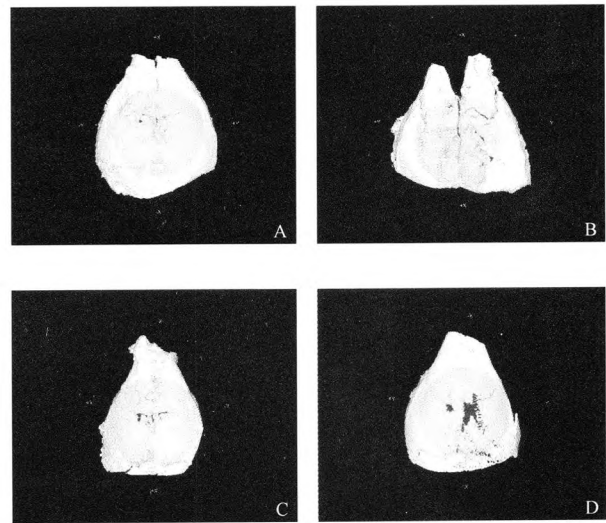


图 1 小鼠颅骨溶解模型显微 CT 三维重建结果 (圆形红色区域为 ROI)

A:空白对照组; B:Syk 抑制剂组; C:Anti-CD11b 单克隆抗体组; D:颗粒组

Fig.1 Micro—CT three-dimensional reconstruction of mouse osteolysis model (red circular area areas refer to ROI)

A:Control, B:Syk inhibitor group, C:Anti-CD11b antibody group, D:Particles group

2.3 小鼠颅骨骨体积分数

颗粒组骨体积分数小于空白对照组 ($P < 0.05$), 可知超高分子聚乙烯颗粒诱导的小鼠颅骨溶解模型建模成功; Syk 抑制剂组、anti-CD11b 单克隆抗体组骨体积分数大于颗粒组 ($P < 0.05$), 可知 Syk 抑制剂及 anti-CD11b 单克隆抗体均对颗粒诱导的颅骨溶解有一定的抑制作用。见表 2。

2.4 western blot 分析

Syk 抑制剂组及 anti-CD11b 单克隆抗体组

Erk 活性、c-fos 及 NFATc1 表达均低于颗粒组而高于空白对照组 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。

表 2 小鼠颅骨骨体积分数 (根据 ROI 计算) ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Bone volume fraction of mice skulls (according to ROI) ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Group)	N	骨体积分数 (Bone volume fraction)
空白对照组 (Control)	8	0.1402 ± 0.0012
Syk 抑制剂组 (Syk inhibitor group)	8	0.1135 ± 0.0009 ^{a,b}
Anti-CD11b 单抗治疗组 (Anti-CD11b antibody group)	8	0.0902 ± 0.0010 ^{a,b}
颗粒组 (Particles group)	8	0.0602 ± 0.0008 ^a

注: ^a: 与空白对照组相比结果具有统计学差异 ($P < 0.05$); ^b: 与颗粒组相比结果具有统计学差异 ($P < 0.05$)

^a: $P < 0.05$ vs control, ^b: $P < 0.05$ vs particles group

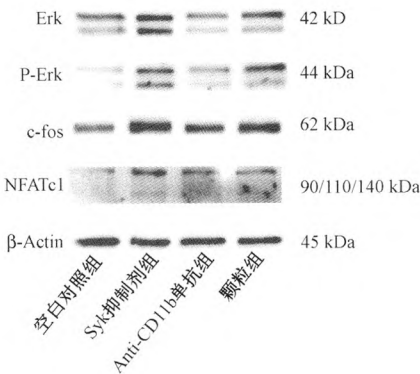


图 2 Western blot 结果

Fig.2 Western blot results

表 3 Western blot 半定量结果

Table 3 Western blot semi-quantitative results

组别 (Group)	P-Erk/Erk	c-fos	NFATc1
空白对照组 (Control)	1	1	1
Syk 抑制剂组 (Syk inhibitor group)	1.12 ± 0.44 ^{a,b}	1.31 ± 0.36 ^{a,b}	1.09 ± 0.36 ^{a,b}
Anti-CD11b 单抗组 (Anti-CD11b antibody group)	1.08 ± 0.23 ^{a,b}	1.19 ± 0.42 ^{a,b}	1.07 ± 0.25 ^{a,b}
颗粒组 (Particles group)	1.22 ± 0.51 ^a	1.43 ± 0.37 ^a	1.16 ± 0.37 ^a

注: ^a: 与空白对照组相比结果具有统计学差异 ($P < 0.05$); ^b: 与颗粒组相比结果具有统计学差异 ($P < 0.05$), Erk: extracellular signal-regulated kinas, 细胞外信号调节激酶, NFATc1: nuclear factor of activated T-cells-1, 活化 T 细胞核因子 1。

^a: $P < 0.05$ vs control, ^b: $P < 0.05$ vs particles group, Erk: extracellular signal-regulated kinas, NFATc1: nuclear factor of activated T-cells-1.

3 讨论

无菌性松动可引起关节置换术后疼痛和功能障碍,并最终导致翻修,是人工关节置换术后最重要的慢性并发症之一^[10]。尽管无菌性松动的发生受多种因素的影响,但磨损颗粒依然是其最重要的起始原因^[11],金属对 UHMWPE 是目前人工关节假体摩擦界面中最主要的一种,所产生的 UHMWPE 磨损颗粒也是临床上最常见的磨损颗粒之一^[10],在无菌性松动的病理发展过程中,磨损颗粒刺激多种细胞因子的分泌,例如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6,进而促进破骨前体细胞的募集、分化、激活和存活,导致假体周围骨溶解的发生^[10],最终降低假体生存率。

CD11b 是构成 Mac-1 分子的两亚基之一^[12-14],而位于破骨前体细胞表面的 Mac-1 分子具有多种功能:第一,介导白细胞与 NK 细胞的游走与渗出;第二,介导白细胞与 NK 细胞对 iC3b 调理的微生物或靶细胞的细胞毒功能;第三,结合胞外多种糖蛋白分子,介导跨膜传导,影响破骨细胞的分化^[15]。在 Mac-1 介导的细胞粘附和信号传导中,CD11b 亚基起到主导作用,而不是另一亚基 CD18^[16],因此推测 anti-CD11b 单克隆抗体可能影响颗粒诱导骨溶解的病理过程。在破骨细胞分化的初期阶段,Mac-1 介导的信号转导在破骨前体细胞分化至抗酒石酸磷酸酶阳性及细胞迁徙到融合阶段都具有非常重要的作用^[17],该分子通过胞浆部分免疫受体酪氨酸激活基序 (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 调节衔接蛋白 DAP (DNAX-activating protein, DNAX 活化蛋白) 12 和 FcR γ (Fc receptor γ , Fc 受体 γ) 传递信号激活 Syk 通路,从而进一步激活 Ca²⁺ 信号,上调 NFATc1 转录因子,促进破骨细胞的形成^[18]。本实验中 anti-CD11b 单克隆抗体组及 Syk 抑制剂组骨体积分数较颗粒组高,说明 anti-CD11b 单克隆抗体及 Syk 抑制剂对颗粒诱导的骨溶解具有抑制作用,而 western blot 结果显示 anti-CD11b 单抗或 Syk 抑制剂处理均导致 Syk 下游 Erk 通路相关蛋白表达下调,说明 CD11b 分子通过激活下游 Syk 通路促进破骨细胞分化。

TNF- α 是由单核细胞、巨噬细胞以及 T 细胞分泌的一种细胞因子,病原体、内毒素等物质可以刺激该因子的产生。在骨代谢和炎症性骨病中,TNF- α 促进破骨细胞的分化和存活,扮演着十分重要的角色。Christine Lau 等^[19]发现,Syk 通过调控 p38 的磷酸化,参与核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF-

κ B) 转录因子的激活,最终促进 TNF- α 的分泌,在炎症的产生中发挥重要作用。Shinohara H 等^[20]发现依赖双链 RNA 的蛋白激酶 (Double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR) 在 TNF- α 刺激的破骨细胞分化过程中具有十分重要的地位,通过对 RAW264.7 细胞系的研究发现,经 TNF- α 处理后,破骨细胞内 PKR 升高,而 PKR 特异性抑制剂处理破骨前体细胞后,TNF- α 所引起的促破骨细胞分化作用被减弱了,且这种作用是通过降低 NFATc1 而引起的。同时,TNF- α 可以增加破骨前体细胞表面 RANK 的表达,同时激活基质细胞和骨基质脂肪细胞分泌 RANKL^[21],而 RANKL 和 RANK 的相互作用促进了破骨细胞的分化过程^[22, 23],进一步说明 TNF- α 具有促进破骨细胞分化,进而加剧骨溶解的作用。在外界环境所导致的炎症刺激下,一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, iNOS) 和 NO 生成增加,在 TNF- α 刺激下,iNOS 在 mRNA 水平和蛋白质水平均明显上升,同时,在细胞包浆内和培养基中均检测到 NO 升高,Lee SK 等^[24]发现 iNOS 特异性抑制剂可以抑制 TNF- α 对破骨细胞存活的促进作用,同时增加培养基内 NO 浓度可以缓解这种抑制作用,这表明 TNF- α 通过增加破骨细胞内 iNOS 的表达,增加 NO 的产生,进而促进破骨细胞的存活。TNF- α 亦可以通过 Erk1/2 p44 途径诱导破骨前体细胞表面 Mac-1 分子的表达上调,并介导其向慢性炎症反应部位游走^[25],而 Mac-1 的 CD11b 亚基可以通过激活 Syk 通路促进破骨细胞的分化,由此说明 TNF- α 不仅发挥促破骨细胞形成的作用,同时可以上调 CD11b 分子,协同刺激破骨细胞成熟。本实验中,颗粒组小鼠血清 TNF- α 较其余三组升高,提示 UHMWPE 颗粒刺激机体产生了炎症反应,促进骨溶解的发生,而 Syk 抑制剂组及 anti-CD11b 单克隆抗体组小鼠血清 TNF- α 较颗粒组小鼠降低,说明 anti-CD11b 单克隆抗体可以通过下游 Syk 通路抑制 TNF- α 的产生,降低该细胞因子对破骨细胞分化及存活的促进作用,协同 anti-CD11b 抗体本身所发挥的阻碍破骨细胞分化效应,最终共同抑制了磨损颗粒诱导的骨溶解。

综上所述,anti-CD11b 单克隆抗体通过封闭 CD11b 分子,干扰 Syk 通路的激活并降低 TNF- α 的产生,使破骨细胞分化受阻,最终抑制 UHMWPE 磨损颗粒诱导的骨溶解,提示 CD11b 分子或可作为关节置换术后无菌性松动的潜在治疗靶点。

【参考文献】

- [1] Vince KG. The problem total knee replacement: systematic, comprehensive and efficient evaluation. *Bone Joint J.* 2014;96-B:105-11.
- [2] Zhao H, Liu X, Zou H, et al. Osteoprotegerin induces podosome disassembly in osteoclasts through calcium, ERK, and p38 MAPK signaling pathways. *Cytokine.* 2015;71:199-206.
- [3] Hwang SY, Putney JW, Jr. Calcium signaling in osteoclasts. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813:979-83.
- [4] Li P, Liu C, Hu M, et al. Fluid flow-induced calcium response in osteoclasts: signaling pathways. *Ann Biomed Eng.* 2014;42:1250-60.
- [5] New drugs and dosage forms. *Am J Health Syst Pharm.* 2015;72:2002.
- [6] Okada Y, Morimoto I, Ura K, et al. Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$, PTH and IL-1 α -induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr J.* 2002;49:483-95.
- [7] Tani-Ishii N, Penninger JM, Matsumoto G, et al. The role of LFA-1 in osteoclast development induced by co-cultures of mouse bone marrow cells and MC3T3-G2/PA6 cells. *J Periodontal Res.* 2002;37:184-91.
- [8] Garcia-Palacios V, Chung HY, Choi SJ, et al. Eosinophil chemotactic factor-L (ECF-L) enhances osteoclast formation by increasing in osteoclast precursors expression of LFA-1 and ICAM-1. *Bone.* 2007;40:316-22.
- [9] Kurlander RJ, Hall J. Comparison of intravenous gamma globulin and a monoclonal anti-Fc receptor antibody as inhibitors of immune clearance in vivo in mice. *J Clin Invest.* 1986;77:2010-8.
- [10] Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, et al. The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res.* 2002;20:1-8.
- [11] Jiang Y, Jia T, Wooley PH, et al. Current research in the pathogenesis of aseptic implant loosening associated with particulate wear debris. *Acta Orthop Belg.* 2013;79:1-9.
- [12] Silveira AA, Dominical VM, Lazarini M, et al. Simvastatin abrogates inflamed neutrophil adhesive properties, in association with the inhibition of Mac-1 integrin expression and modulation of Rho kinase activity. *Inflamm Res.* 2013;62:127-32.
- [13] Li N, Mao D, Lu S, et al. Distinct binding affinities of Mac-1 and LFA-1 in neutrophil activation. *J Immunol.* 2013;190:4371-81.
- [14] Zhou H, Liao J, Aloor J, et al. CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses. *J Immunol.* 2013;190:115-25.
- [15] Rosetti F, Mayadas TN. The many faces of Mac-1 in autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2016;269:175-93.
- [16] Ross GD. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunol Res.* 2002;25:219-27.
- [17] Hayashi H, Nakahama K, Sato T, et al. The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *FEBS Lett.* 2008;582:3243-8.
- [18] Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca $^{2+}$ -NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev.* 2009;231:241-56.
- [19] Wang X, Lau C, Wiehler S, et al. Syk is downstream of intercellular adhesion molecule-1 and mediates human rhinovirus activation of p38 MAPK in airway epithelial cells. *J Immunol.* 2006;177:6859-70.
- [20] Shinohara H, Teramachi J, Okamura H, et al. Double Stranded RNA-Dependent Protein Kinase is Necessary for TNF-alpha-Induced Osteoclast Formation In Vitro and In Vivo. *J Cell Biochem.* 2015;116:1957-67.
- [21] Goto H, Hozumi A, Osaki M, et al. Primary human bone marrow adipocytes support TNF-alpha-induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Cytokine.* 2011;56:662-8.
- [22] Kitaura H, Kimura K, Ishida M, et al. Immunological reaction in TNF-alpha-mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:181849.
- [23] Zhao YM, Ge LH, Grigoriadis AE. Effect of TNF-alpha on murine osteoclast differentiation. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2005;37:433-5.
- [24] Lee SK, Huang H, Lee SW, et al. Involvement of iNOS-dependent NO production in the stimulation of osteoclast survival by TNF-alpha. *Exp Cell Res.* 2004;298:359-68.
- [25] 王链链 郭晓英. 破骨细胞分化过程中的信号通路及信号因子的研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(6):742-746.
Wang Lianlian, Guo Xiaoying. The research progress of signaling pathways and factors involved in osteoclast differentiation. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2015, 21(6):742-746. (In Chinese)

(收稿日期: 2016-10-11;修回日期:2016-11-05)