

# 福莫特罗对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化基因表达的影响\*

倪兴泰 余利鹏<sup>△</sup> 韦永中 吴昊

(南京医科大学第一附属医院江苏省人民医院骨科 江苏 南京 210029)

**摘要 目的:**研究  $\beta$  2 肾上腺素能激动剂福莫特罗(Formoterol)对大鼠的体外骨髓间充质干细胞(MMSC)向成骨细胞分化的影响,进而探讨其作用机制。**方法:**取 SD 大鼠的骨髓间充质干细胞,用条件培养液诱导分化后分别加入不同浓度药物,在不同时间点采用 RT-PCR 法检测细胞分化中 Runx2 和 Osterix 的 mRNA 的表达,采用 western blot 法检测细胞中 MEK 和 ERK1/2 的磷酸化。**结果:**在细胞分化早期,加入已知浓度  $10^{-7}$ mol/L 的 Formoterol 可抑制成骨样细胞细胞特异性转录因子 Runx2 mRNA 表达;在细胞分化晚期,浓度  $10^{-7}$ mol/L 的 Formoterol 也可抑制成骨样细胞 Osterix mRNA 表达。在加入浓度  $10^{-7}$ mol/L 的 Formoterol 作用 30min 后,MEK 和 ERK1/2 的蛋白磷酸化表达均下降。**结论:** $\beta$  2 受体激动剂可抑制 MMSC 细胞体外向成骨样细胞的分化,并且可抑制 MEK 和 ERK1/2 磷酸化的表达。

**关键词:** $\beta$  2 肾上腺素能受体激动剂;骨髓间充质干细胞;Osterix ;Runx2;ERK

**中图分类号:** Q95-3, R322.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)04-628-04

## Effects of Formoterol on Differentiation of Rat Osteoblast-like Cells in Vitro\*

NI Xing-tai, YU Li-peng<sup>△</sup>, WEI Yong-zhong, WU Hao

(Department of Orthopaedic, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**ABSTRACT Objective:** To observe the effects of Formoterol ( $\beta$  2-adrenergic receptor-specific agonist) on the differentiation of rat osteoblast-like cells. **Methods:** Osterix and RUNX2 are osteoblast-specific transcriptional factors that are essential for osteoblast differentiation and bone formation. RT-PCR was used to detect the Osterix and RUNX2 genes expressions during the treatment of different drug dose,the expression of P-MEK and P-ERK1/2 were measured by western blot. **Results:** ①The mRNA expression of cells cultured with a concentration of  $10^{-7}$ mol/L of Formoterol are obviously low. ②The protein phosphorylation of ERK and MEK in osteroblasts decreased at 30min treating the cells with Formoterol. **Conclusions:** In the present study, we examined the molecular mechanism of Osterix and RUNX2 gene expression, and found that Formoterol inhibited Osterix and RUNX2 expression in the mouse osteoblast-like cells, Formoterol-induced decrease of Osterix and RUNX2 expression may occurred in dose-dependent manner through the activation of extracellular signal-regulated kinase pathway.

**Key words:**  $\beta$  2-adrenergic receptor-specific agonist;marrow-derived mesenchymal stem cells;Osterix ;Runx2;MEK;ERK

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R322.71 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)04-628-04

### 前言

人体中骨骼存在着骨吸收和骨形成的动态平衡,在正常骨组织中,骨量和骨矿成分始终维持着稳态,成骨细胞和破骨细胞通过相互调控机制,共同完成骨组织的形成和吸收。正常骨矿化的骨量减少将导致骨强度降低,引起骨质疏松,骨质疏松发病的原因有多种,如糖皮质激素或 PTH 增多,绝经期后骨质疏松症等。有动物体内研究发现, $\beta$  受体阻滞剂普萘洛尔可以抑制卵巢切除大鼠的骨丢失<sup>[1]</sup>。一些临床患者的回顾性研究发现, $\beta$  受体阻滞剂的长期应用可以提高 50 岁以上妇女的髋部和前臂的骨密度,降低骨折的发生率<sup>[2]</sup>,有关  $\beta$  2 受体信号对骨代谢的影响也得到日益重视。

由于大剂量使用  $\beta$  2 受体激动剂可使肾中 DPD(脱氧吡啶啉,骨吸收的特异指标)明显增加,故多数学者认为  $\beta$  2 受体信号对骨质影响主要通过增强人和大鼠成熟破骨细胞的骨吸收

活性实现的,对破骨细胞的研究较多见,而对成骨细胞分化功能研究却鲜有报道,且以往对  $\beta$  受体阻滞剂对骨代谢的影响多是在动物体内实验或临床回顾性研究中得出的结论,而对细胞的独立作用尚缺乏研究<sup>[3]</sup>。本试验采用大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨样细胞作为靶细胞,观察在不同浓度 Formoterol 条件下骨髓间充质干细胞向成骨样细胞分化时特异性基因的表达的改变,探讨其对成骨细胞分化功能的影响。

研究表明几乎所有的胞外信号传导途径都可以影响骨的生物代谢,现已证实特定的外界刺激(如激素、细胞因子以及外力等)可通过 RTK-Ras-MAPK 信号通路途径诱导基因在骨组织中的表达,在促进成骨细胞分化中起重要作用<sup>[4,5]</sup>。本实验通过研究 Formoterol 对 MAPK 途径中关键激酶的影响从而探求起对成骨细胞作用可能的分子机制。

### 1 材料与方法

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30600626)

作者简介:倪兴泰(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:骨质疏松方向

<sup>△</sup>通讯作者:余利鹏 Email:lipeng\_yu@yahoo.com.cn;韦永中,Email:wyy1996202@yahoo.com.cn

(收稿日期:2010-11-12 接受日期:2010-12-08)

1.1 实验动物和试剂

Formoterol (美国 SIGMA 公司), TRIZOL 试剂 (美国 INVITROGEN 公司), 逆转录试剂盒 (大连宝生物公司), Mix 酶 (天根生化科技有限公司), 引物 (美国 INVITROGEN 公司), 琼脂糖 (biowest 公司), 30% 丙烯酰胺 (Acr-Bis 29:1) 紫外可见分光光度计, 全自动酶标仪, PCR 热循环仪 (美国 Bio-Rad 公司), 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), 图象分析软件 ImageJ.

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 大鼠间充质干细胞来源成骨细胞的培养 取 3 周龄 SD 大鼠颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡 10 分钟, 无菌手术取大鼠双侧胫骨和股骨, 去除肌肉等附着组织, PBS 液冲洗后暴露骨髓腔, 用无菌注射器抽取基质培养液 (DMEM/F12) 反复冲洗干骺端, 直至发白, 将抽取液轻轻吹打成单细胞悬液, 将上述单细胞悬液移入 25ml 培养瓶中, 于 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 饱和湿度条件下培养。移入培养液 24 小时后换液。以后每三天换一次。待细胞贴壁汇合达 80% 时, 给与 0.25% 的胰蛋白酶消化, 按照 1:2 比例传代培养。

1.2.2 间充质干细胞的诱导分化 取第 3 代细胞, 按密度 1 × 10<sup>4</sup>/mL 传代后移入六孔板中, 加入条件培养液 (β - 甘油磷酸钠 10mmol/L, 地塞米松 10<sup>-8</sup>mol/L, 维生素 C 50μ g/L) 诱导。

1.2.3 实验分组 向诱导细胞中加入 β 2AdR 激动剂 (Formoterol), 培养细胞按照以下浓度加药: 对照组为 A 组 (加诱导培养液), 加药 B、C、D 组药物浓度分别为 10<sup>-9</sup>mol/L, 10<sup>-8</sup> mol/L, 10<sup>-7</sup>mol/L。

1.2.4 RT-PCR 逆转录反应 吸弃六孔板中培养液, PBS 液冲洗后, 按照 Trizol 试剂说明书提取 RNA, 取 1μ l RNA 溶液, 按照

逆转录说明书加入反应体系, 5 × PrimeScript Buffer 2μ l, PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5μ l, Primer 0.5μ l, Random 6 mers (100μ M) 2μ l, RNaseFreedH<sub>2</sub>O 定容至 10μ l, 于 PCR 热循环仪中反转录, 反应引物 (如表 1) 由 Primer 软件设计合成, 产物 cDNA 于 -20°C 保存。

1.2.5 PCR 反应 取 2μ l RT 反应液加入到下一步的 PCR 反应体系中, Taq PCR MasterMix 12.5μ l, PCR Forward Primer (10μ M) 1 μ l, PCR Reverse Primer (10μ M) 1 μ l, dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 8.5 μ l, 反应条件为 Osterix、GAPDH 预变性 94°C、5min, 变性 94°C、45s, 退火 57°C、45s, 延伸 72°C、60s, 共 25 个循环, 终末延伸 72°C、5min; RUNX2 预变性 94°C、5min, 变性 94°C、45s, 退火 58°C、30s, 延伸 72°C、60s, 共 25 个循环, 终末延伸 72°C、5min。电泳结束后将凝胶成像分析系统成像, 用软件进行灰度值测定, 计算目的基因 / 内参灰度相对比值。

1.2.6 Western Blotting 法 向已加入诱导剂的培养液中加入已知浓度 (10<sup>-7</sup>~10<sup>-9</sup>mol/L) 药物 Formoterol, 加药物作用 30min 后提取蛋白, 采用 western blot 法, GAPDH 作为内参, 检测 MEK 和 ERK 蛋白磷酸化的表达, 显色的 PVDF 膜用胶片曝光, 用 ImageJ 软件进行扫描分析, 用软件进行灰度值测定, 以目的蛋白显色条带与 GAPDH 条带灰度比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

各分组所得实验数据均以均数 ± 标准差 (± S) 表示, 采用统计学软件 SPSS16 进行数据分析, 选用两两比较的 t 检验。p < 0.05 时认为有统计学意义。

表 1 RT-PCR 反应引物

Table 1 Primers used in the RT-PCR experiments

基因名称 (Primer names)	引物序列 (sequences)	长度 (bp)	编号 (BLAST.No)
Runx2	F: 5'-CCATAACGGTCTTCACAAATCCTC-3'	227	NM_053470.1
	R: 5'-ACTTGGTGCTGAGTTCAGGGAG-3'		
Osterix (Osx/Sp7)	F: 5'-CTGGGAAAAGGAGGCACAAAGAA-3'	486	NM_001037632.1
	R: 5'-GGCAAAGTCAGACGGGTAAGTAG-3'		
GAPDH	F: 5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'	251	NM_017008.3
	R: 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3'		

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 mRNA 的表达

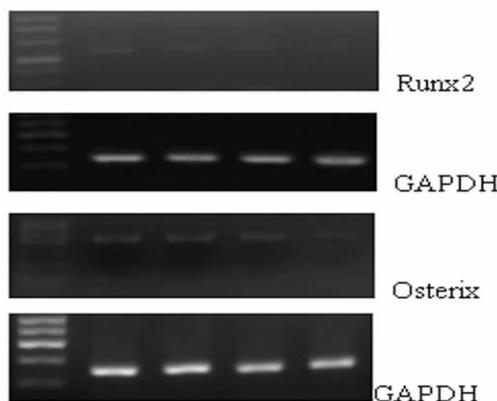


图 1 RT-PCR 检测 Runx2 和 Osterix mRNA 的表达

Figure 1 representative RT-PCR analysis of Runx2 and Osterix

表 2 加入药物 Formoterol (10<sup>-7</sup>~10<sup>-9</sup>mol/L) 3 天后 Runx2 相对表达量 mRNA 的变化, 7 天后 Osterix 相对表达量 mRNA 的变化 (x̄ ± s)  
Table 2 Dose-dependent effects of Formoterol on Runx2 and Osterix mRNA relative expression in osteoblast-like cells (10<sup>-7</sup>~10<sup>-9</sup>mol/L)

Group	对照	10 <sup>-9</sup> mol/L	10 <sup>-8</sup> mol/L	10 <sup>-7</sup> mol/L
Runx2	0.768 ± 0.304	0.560 ± 0.128 ▲	0.501 ± 0.091 ▲	0.390 ± 0.079 ▲
	1.298 ± 0.499	1.139 ± 0.461	0.693 ± 0.335 ▲	0.604 ± 0.473 ▲

Note : ▲ P < 0.05 (10<sup>-9</sup>mol/L ~ 10<sup>-7</sup>mol/L) group compared with control group;

实验 A、B、C、D 四组中, 在加入已知浓度药物 (10<sup>-7</sup>~10<sup>-9</sup>mol/L) 3 天后, 与对照组相比, 加药的 B、C、D 组中 Runx2 的表达量下降明显, 差异具有统计学意义 (p < 0.05), 且随着药物浓度的增加, Runx2 的表达量呈递减下降的趋势。实验 A、B、

C、D 四组中,在加入已知浓度药物( $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{mol/L}$ )7天后,与对照组相比,加药的 C、D 组中 Osterix 的表达量明显下降,差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),且随着药物浓度的增加,Osterix 的表达量呈递减下降的趋势。(见表 2)

### 2.2 Western Blotting 法检测蛋白 ERK 及 MEK 磷酸化的表达

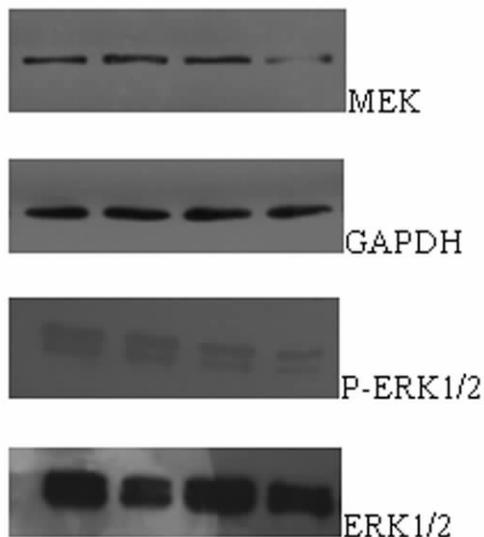


图 2 Western Blotting 法检测蛋白 ERK 及 MEK 磷酸化的表达

Figure 2 A representative Western Blotting analysis of ERK and MEK phosphorylation

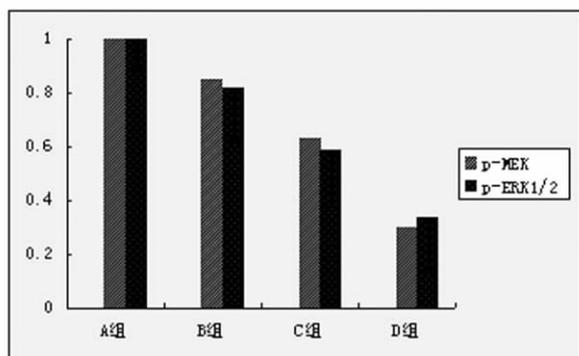


表 3 Formoterol 对 ERK 及 MEK 磷酸化的表达的影响

Table 3 Effects of Formoterol on ERK and MEK phosphorylation in osteoblast-like cells.

在实验 A、B、C、D 四组中,分别加入已知浓度药物 Formoterol( $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{mol/L}$ )30min 后检测蛋白 MEK 及 ERK1/2 磷酸化的改变,与对照组相比,可见 B、C、D 组 MEK 及 ERK1/2 磷酸化的表达量均有下降,差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),D 组中蛋白 MEK 磷酸化表达较 B、C 组明显下降( $p < 0.05$ )。(见图 3)

### 3 讨论

目前关于  $\beta 2$  受体信号的一些研究表明在人的成骨细胞和破骨细胞上均存在  $\beta 2$  受体,其具体机制为通过调控下丘脑外周交感神经系统途径,作用于成骨细胞表面的  $\beta 2$  受体,从而影响骨组织代谢<sup>[9]</sup>。对于  $\beta 2$  受体激动剂对成骨细胞作用现

在有两种观点,某些研究发现  $\beta 2$  受体激动剂可通过 cAMP/PKA 途径,促进原癌 c-fos 基因表达,从而促进骨组织合成<sup>[7]</sup>,但现阶段多数文献认为  $\beta 2$  受体激动剂可以直接抑制成骨细胞的成骨活性,同时促进破骨细胞的骨吸收活性,临床研究表明超常规量使用  $\beta 2$  受体激动剂可使成人髌骨和股骨骨折的风险明显增加<sup>[8]</sup>,动物试验中大剂量使用  $\beta 2$  受体激动剂沙丁胺醇使成鼠骨骼中骨皮质和骨小梁的结构发生明显改变(骨小梁变薄且数量减少),而且研究也发现一定剂量  $\beta 2$  受体激动剂的使用可以使骨骼中的 BMD (bone mineral density)和 BMC(bone mineral content)指数明显下降<sup>[9]</sup>。 $\beta 2$  肾上腺素能受体激动剂可抑制体外成骨样细胞的功能和细胞增殖,而阻滞剂对成骨样细胞功能和增殖的影响与其浓度有关<sup>[10]</sup>。为了解  $\beta 2$  受体激动剂对成骨细胞分化的影响,探讨其在骨质疏松疾病中的作用机制,我们进行活体外药物细胞试验,研究福莫特罗(Formoterol)对体外大鼠的骨髓间充质干细胞(MMSC)对成骨细胞分化的影响。

在调控成骨细胞分化成熟和影响其功能的转录因子中 Runx2 和 Osterix 发挥了重要作用,是各种激素、局部及外部调控因子调控成骨细胞分化的关键位点<sup>[11]</sup>,因此检测转录因子的变化对了解药物对成骨细胞分化影响有重要意义。Osterix 是目前发现的调控骨骼发育的最直接的转录因子,缺失 Osterix 小鼠的间质干细胞会完全丧失向成骨细胞分化的能力,目前认为 Runx2 可以在成骨细胞分化的起始阶段触发骨基质蛋白的形成,Runx 2 与 Osterix 结合后可上调 Osterix 的启动子活性,但 Runx2 同时又会使其维持在较早期的阶段而阻止成骨细胞的进一步分化,因此 Runx 2 可提供大量的未成熟成骨细胞,而成骨细胞的最终分化成熟则需要 Osterix 的作用,实验表明,七天后 Osterix 可以诱导干细胞先经历一个双向或多向潜能的分化阶段从而最终分化为成骨细胞<sup>[12]</sup>。通过本实验证实,加入已知浓度药物  $\beta 2$ AdR 激动剂 (Formoterol) ( $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{mol/L}$ )3 天后,检测细胞中特异性转录因子 Runx2 的 mRNA 表达,与对照组相比,加药组 Runx2 的表达量下降,在 B、C、D 组中差异明显,且具有统计学意义( $p < 0.05$ )。在加入已知浓度药物  $\beta 2$ AdR 激动剂 (Formoterol) ( $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{mol/L}$ )7 天后检测发现 Osterix 的表达下降,在 C、D 组中,差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。随着 Formoterol 浓度的增加,细胞中 Runx2 和 Osterix 的 mRNA 表达减低,表明 MMSC 向成骨细胞分化受抑制,Formoterol 可以通过下调 Runx2 和 Osterix 的表达而抑制 MMSC 的成骨分化。

$\beta 2$  受体激动剂对成骨细胞分化调控具体机制尚不清楚,实验证明外界刺激可通过胞外信号传导途径诱导影响成骨细胞生长和分化,改变胞内关键调节因子如 c-fos 等的 mRNA 水平,从而在正常发育和骨疾病中对成骨细胞和破骨细胞系产生影响。影响成骨细胞特异性基因表达的胞内信号通路具体调控机理至今尚不十分清楚,外界刺激可通过诱导影响成骨细胞生长和分化,如某些细胞因子在影响成骨细胞分化和骨生长和重塑中可以通过 RTK — Ras-MAPK 信号通路途径影响成骨细胞增殖,促进成骨细胞分化。也有实验证实液体流动刺激可以通过 RTK — Ras-MAPK 信号通路对成骨细胞 collagen type I, RUNX2 等产生作用<sup>[13]</sup>, $\beta 2$  受体激动剂是否通过影响这一信号

通路从而发挥调控 RUNX2 等转录因子的作用有待实验证实。在外界刺激信号传递到细胞核内过程中,MAPK 通路包含一系列磷酸化级联反应,涉及 3 种关键激酶:c-Raf(MAPK 激酶激酶),MEK(MAPK 激酶)和 ERK(也称胞外信号调节激酶 extracellular signal regulated kinase, ERK)。ERK 是信号从细胞表面转入细胞核内部的重要传递者,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其激活需要分子中特定苏氨酸残基和酪氨酸残基同时被磷酸化。MEK 属于少有的双重特异性激酶,使酪氨酸和苏氨酸两个调节位点磷酸化而激活 ERK,并将其转移到胞核而磷酸化转录因子等多种底物来调节相关基因表达,进而参与细胞生长、分裂、迁移、代谢、凋亡等多种生理过程<sup>[14]</sup>。c-Raf 是 Ras 下游的重要效应器之一,为 Ras 信号进入 MAPK 通路的桥梁。本实验我们观察  $\beta 2$  受体激动剂对 ERK 磷酸化的表达的影响。在加入已知浓度药物( $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{mol/L}$ )30min 后,与对照组相比,加药组 MEK 及 ERK 磷酸化的表达量均下降,差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),在  $10^{-7} \text{mol/L}$  组中,D 组中蛋白 MEK 磷酸化表达较 B、C 组明显下降,结果表明在特定浓度条件下福莫特罗可抑制蛋白 MEK 和 ERK 磷酸化的表达。

本实验结果显示  $\beta 2$  受体激动剂可抑制 MMSC 细胞体外向成骨样细胞分化,并且可抑制 MEK 和 ERK1/2 磷酸化的表达,这使我们对  $\beta 2$  受体激动剂影响成骨细胞分化的认识更加丰富,为进一步了解  $\beta 2$  受体激动剂影响骨质改变的分子学机制,治疗骨质疏松提供了理论依据,为骨质疏松的治疗提供新的可能途径,但  $\beta 2$  受体激动剂对成骨细胞分化作用的具体分子学通路仍不清楚, $\beta 2$  受体激动剂是否是通过 c-fos 基因最终影响成骨细胞分化,特定浓度的  $\beta 2$  受体抑制剂改善骨丢失是否是通过影响成骨细胞功能性的改变发挥作用,这些都需后期的实验研究来验证。

#### 参考文献(References)

[1] Eleftheriou F, Ahn JD, Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART[J]. Nature, 2005,343(7032):514-520

[2] 冬梅,毕力夫.瘦素与骨质疏松症研究现状[J].中国骨质疏松杂志,2007,13(10):739-742  
Dong mei, Bi li-fu. Current status of study on osteoporosis and leptin [J]. Chin J Osteoporos, 2007,13(10):739-742(In Chinese)

[3] 杨向东,余利鹏,韦永中.福莫特罗和 ICI118551 对大鼠成熟破骨细胞骨吸收功能的影响[J].中国骨质疏松杂志,2010,16(4):274-277  
Yang xiang-dong, Yu li-peng, Wei yong-zhong. The effects of Formoterol and ICI118551 on rat osteoclast in vitro [J]. Chinese Journal

of Osteoporosis, 2010,16(4):274-277(In Chinese)

[4] Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor- $\beta$  in bone formation[J]. J Cell Biochem, 1994,7,55(3):350-357

[5] Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, et al. Transforming growth factor- $\beta$  gene family members and bone [J]. Endocr Rev, 1994, 2,15(1):27-39

[6] Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass[J]. Cell, 2000,1,100(2):197-207

[7] Kellenberger S, Muller K, Richener H, et al. Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors[J]. Bone, 1998,5,22(5):471-478

[8] Pouwels S, Bracke M, et al. Use of beta-2 agonists and risk of hip/femur fracture: a population-based case-control study [J]. Pharmacoevidiol Drug Saf, 2007, 6,6(6):612-619.

[9] Chang TK, Huang CH, et al. Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2010,8,11(1):185

[10] 胡安全,余利鹏,韦永中.福莫特罗和 ICI118551 对大鼠骨髓间充质干细胞来源的成骨样细胞功能的影响 [J]. 南京医科大学学报, 2009,26(6):784-789  
Hu an-quan, Yu li-peng, Wei yong-zhong. The effects of Formoterol and ICI118551 on rat osteoblast-like cells in vitro induced from marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2009,26(6):784-789(In Chinese)

[11] Tu Q, Valverde P, Chen J. Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,5,341(4):1257-1265

[12] 孙冬梅,刘中博,赵岩等.Runx2 参与调控 Osterix 启动子活性及其基因表达[J].生物化学与生物物理进展,2006,33(10):957-964  
Sun dong-mei, Liu zhong-bo, Zhao yan. Runx2 is Involved in Regulating Osterix Promoter Activity and Gene Expression.[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics,2006,33(10):957-964(In Chinese)

[13] You J, Reilly GC, Zhen X, et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts[J]. J Biol Chem, 2001,4,276(16):13365-13371.

[14] Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, et al. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway[J]. Biochem, 2005,12,392(Pt2):249-261