

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.013

衰老程度评价生物学指标在人胚肺二倍体细胞的筛选研究*

聂爱婷¹ 马波² 胡利平¹ 张秀峰¹ 饶旻¹ 聂胜洁^{1Δ}

(1 昆明医科大学法医学院 云南 昆明 650500; 2 云南沃森生物技术股份有限公司 云南 昆明 650106)

摘要 目的:通过在微观结构水平和分子水平检测不同代次人胚肺二倍体细胞衰老相关的指标值,筛选出能够系统性评价人胚肺二倍体细胞衰老程度的生物学指标。**方法:**将 Walvax-2 细胞分成 16 个代次,在倒置显微镜下观察不同代次 Walvax-2 细胞生长情况及形态学变化;在透射电镜下观察不同代次 Walvax-2 细胞生长情况和衰老情况;通过检测 SA-β-gal 染色阳性率,分析不同代次 Walvax-2 细胞 β-半乳糖苷酶的表达水平。**结果:**细胞可传 58 代。倒置显微镜下:随细胞代次的增加,可见颜色逐渐加深,色素积累;透射电子显微镜观察到:P20 到 P43 细胞正常且骨架结构明显,细胞核完整,具有较高的核质比,P44 和 P45 开始出现衰老现象,细胞质色素积聚加深,核膜不同程度内折,P50 和 P55 细胞衰老更加明显;β-半乳糖苷酶的阳性染色率和细胞代龄之间呈显著相关($P < 0.01$)。**结论:**细胞形态学变化,β-半乳糖苷酶阳性率变化与 Walvax-2 细胞代龄增长显著相关,可选择作为 Walvax-2 细胞衰老程度评价的生物学指标。

关键词:细胞衰老;代龄;细胞形态;β-半乳糖苷酶;衰老评价

中图分类号:R-33;R329.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)17-3255-04

The Screening Study of Biological Indicators for Evaluation of the Senescence in Human Embryonic Lung Diploid Cells*

NIE Ai-ting¹, MA Bo², HU Li-ping¹, ZHANG Xiu-feng¹, RAO Min¹, NIE Sheng-jie^{1Δ}

(1 Institute of Forensic, KunMing Medical University, Kunming, Yunnan, 650500, China;

2 Yunnan Walvax biotechnology Limited by Share Ltd, Kunming, Yunnan, 650106, China)

ABSTRACT Objective: To collect the biological indicators of state closely related to cell growth and cell aging, through the microstructure level and molecular level testing parameter values which aging related to human embryo lung diploid cells of different generation times, Screening the biological indicators which can systemic evaluation of aging degree of human embryo lung diploid cell. **Methods:** The Walvax-2 cells were split into 16 generations. The growth and morphological of Walvax - 2 cells from different generations were observed under inverted microscope. Cells from different generations were observed by transmission electron microscope. To analysis the expression level of β-galactosidase enzyme of different generations Walvax - 2 cells by detecting the rate of SA - β- gal staining positive cells. **Results:** Cells can grow to 58 generations, with the increase of cell generation time, visible color deepened gradually, pigment accumulation by the inverted microscope. The transmission electron microscope observed: cell morphology frame structure, and nucleus are normal and intact from P20 to P43, has the high nuclear mass ratio. Senescence cells P44 and P45 start to appear aging phenomenon. The consequences of senescence cells include irregularly shaped nucleus, nuclear membrane in different level fold, nucleolus decrescent, contents increased, endoplasm retinal cavity expansion, the decrease in the number of ribosomes, cytoplasmic pigment deepen and free bubble formation, cell autophagy in cell. Senescence cells more evident in P50 and P55. β-galactosidase enzyme staining positive rate and cell generation is significant correlation ($P < 0.01$). **Conclusion:** Cell morphology and the positive activity of β-galactosidase enzyme were significantly associated with generation growth, it can act as a biological indicator to evaluate the degree of senescence of Walvax-2 cell.

Key words: Cellular senescence; Generation aging; Cell morphology; β-galactosidase enzyme; Senescence evaluation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3255-04

前言

细胞衰老(cellular senescence)是指细胞在执行生命活动过程中,随着时间的推移,细胞增殖与分化能力和生理功能逐渐发生衰退的变化过程^[1,2]。近几年关于细胞衰老的研究发现,

衰老的细胞在其形态和基因表达等方面发生了一系列特征性的改变,如:衰老相关 β-半乳糖苷酶活性的提高^[3],端粒长度的缩短^[4],细胞周期的改变^[5],基因对蛋白的表达调控^[6]等。但是近几年对于细胞衰老的研究大多集中于衰老过程中的某个环节、某个侧面的机理^[3-6]。目前并没有对细胞衰老系统性的评价,本

* 基金项目:国家科技部 863 计划项目(2014AA021002)

作者简介:聂爱婷(1989-),女,研究生,研究方向:法医物证学研究工作,电话:18487352262, E-mail: 1245524539@qq.com

Δ 通讯作者:聂胜洁,女,博士,教授,研究方向:人类遗传学和法医物证学研究, E-mail: nieshengjie@126.com

(收稿日期:2016-07-19 接受日期:2016-08-15)

实验以 Walvax-2 细胞为研究对象, 分别对 20.25.30.35 至 45.50.55 共 16 个代次, 通过在微观结构水平和分子水平进行检测, 对衰老程度评定指标进行客观的筛选, 比较不同代次人成纤维二倍体细胞衰老相关生化值的区别, 以便于对细胞的衰老程度进行评级, 同时为我国的人胚肺二倍体成纤维细胞的生产应用上评价与决策提供支持和实践依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验组细胞株: Walvax-2 细胞是由沃森生物技术股份有限公司建立的人胚肺二倍体细胞株。Walvax-2 是 2008 年从医院人工流产的一个 3 月龄女性胎儿(家庭无肿瘤史)的肺组织建立的, 总寿命共 58 次分裂。Walvax-2 细胞经反复检定证明其生物学性状达到了制备病毒性疫苗细胞株的国际标准。

细胞培养液的配制: MEM 培养基 0.47; Hank's 甲 1.25 mL, Hank's 乙 0.25 mL; 水解乳蛋白 0.25%; 新生牛血清; Gln (谷氨酰胺) 3%; NaHCO_3 7%; 卡那霉素终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -半乳糖苷酶检测时所用的染色固定液、染色工作液均由上海碧云天生物试剂公司的细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒提供; 10 $\times$ PBS 母液: 氯化钠 80 g, 氯化钾 2 g, 磷酸氢二钠 14.4 g, 磷酸二氢钠 2.4 g, ddH_2O 定容至 1L。

倒置显微镜、透射电镜、光学显微镜均购自日本 OLYMPUS; 超净工作台购自美国 BIOLOGICAL。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 为了区分开不同代次细胞之间的明显区别, 将 Walvax-2 细胞每隔 5 代进行检测, 分为 P20、P25、P30、P35-P45(35 代到 45 代共 11 个代次)、P50 和 P55 共 16 个代次进行检测, 其中 38 代为国家规定生产最末代次(《中华人民共和国药典》2010 年版), 对其前后进行详细检测, 以对比国家规定的可用代次人二倍体细胞和不可用代次之间的差别; 除 55 代 Walvax-2 细胞因生长过于缓慢, 培养 96 h 后进行检测外。其余不同代次的 Walvax-2 细胞均为培养 72 h 后进行检测。

1.2.2 细胞基本形态观察 将培养至 72 h 的不同代次 Walvax-2 细胞直接放在倒置显微镜下进行观察细胞的生长情况和细胞形态学变化。在透射电镜下观察时需要收集培养好的细胞, 1500 rpm 离心细胞 15 min, 将培养液除尽, 加入 2 mL 的细胞电镜固定液。放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 待收集全部所需代次的细胞后, 由昆明医科大学电子显微镜研究室进行检测, 提交检测报告。

1.2.3 β -半乳糖苷酶检测 离心收集不同代次 Walvax-2 细胞至 1.5 mL 离心管内, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min 后离心, 吸除细胞固定液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 3 min, 洗涤结束后离心, 吸除 PBS, 每管加入 0.5 mL 至 1 mL 染色工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。取部分染色后的细胞, 滴加到 96 孔板内, 普通光学显微镜下观察计数。

1.3 统计学分析

将 β -半乳糖苷酶染色阳性率结果直接计数, 并且与细胞代次之间进行相关双变量的 Pearson 检验。

2 结果

2.1 Walvax-2 细胞的形态学观察结果

不同代次 Walvax-2 细胞倒置显微镜下观察如下:

P20 到 P45 代次形态单细胞贴壁生长, 生长状态良好且生长迅速, 48 h 即呈汇合状态, 细胞充分伸展, 典型长梭状, 为致密单层, 年轻态细胞甚至出现致密多层(图 1); 在一些地方形成汇流状, 细胞折光性好(图 2)。细胞聚拢后, 紧密排列, 呈编织状走行, 存在交叉重叠生长现象。细胞核呈椭圆形, 无异常的核分裂情况, 胞内颗粒少, 无空泡, 膜清晰, 符合二倍体成纤维细胞特性。年轻代次的细胞变化不明显, 但是随细胞代次的增加, 可见细胞颜色逐渐加深, 色素积累, P50 代次形态细胞排列不规则, 形状偏扁, 体积缩小、颜色加深, 边界不清, 形态不规则, 贴壁生长的细胞间出现空隙, 镜下可见少许圆缩细胞(图 3); P55 代次形态贴壁生长的细胞已经散乱, 细胞主要为不规则型伴少量梭型, 细胞间空隙多, 距离远, 细胞间的接触消失, 细胞圆缩数大量增加, 少许数量圆缩细胞成不规则形, 细胞内部结构不清楚, 成批的细胞出现脱落, 离壁飘起的现象(图 4)。

2.2 透射电镜下末代细胞出现凋亡特征

不同代次 Walvax-2 细胞透射电子显微镜观察如下:

P20 到 P43 代次形态(图 5, 图 6) 细胞体积均正常且骨架结构明显, 可见明显的细胞器。细胞膜微绒毛均匀分布; 细胞质基质中分散存在着大量纤细的微丝和微管; 可见丰富的排列有序的粗面内质网, 核糖体丰富; 细胞质中线粒体均匀分布; 细胞核完整, 核膜光滑, 具有较高的核质比。P44 和 P45 代次形态(图 7, 图 8) 细胞开始出现衰老现象, 观察到胞质凋亡小体。细胞核形状不规则; 微丝和微管数量减少, 出现断裂; 内质网膜腔膨胀扩大, 核糖体数量减少; 细胞质色素积聚加深, 有空泡形成; 线粒体数量减少且结构肿胀, 空泡化; 核膜不同程度内折, 核仁变小, 核内容物增多, 细胞中出现自噬体; 细胞膜微绒毛数量增加, 呈现凝胶相。P50 和 P55 代次形态(图 9, 图 10) 细胞衰老明显, 大量细胞变形, 体积增大; 细胞膜完整性遭到破坏; 细胞质色素积聚加深, 微丝和微管崩解, 可见大量空泡形成; 内质网与线粒体崩解; 自噬体数量增加; 细胞核模糊不清, 出现内陷和断裂现象, 核仁固缩甚至消失, 核染色质加深。出现凋亡期细胞, 细胞体积变小, 微绒毛消失, 核膜核仁破碎, 凋亡小体数量增多。

2.3 β -半乳糖苷酶检测结果

β -半乳糖苷酶染色阳性细胞为胞体内出现蓝色颗粒状细胞(图 11, 图 12), 阴性细胞为透明状态。其染色阳性率为检测结果。直线相关分析结果(图 13, 图 14)显示: β -半乳糖苷酶染色的阳性率和细胞年龄之间呈显著相关($P < 0.01$)。由此说明, 这种增强与 Walvax-2 细胞的衰老和增殖能力的下降相关, 可反映不同代次 Walvax-2 细胞的衰老程度。

3 讨论

目前, 人们对细胞的观察研究多采用扫描电镜、倒置显微镜等^[7-9], 其能观察到细胞的形状、大小, 细胞表面的微绒毛突起, 核形态, 核仁是否明显, 细胞丰富的细胞器等^[10]。但是这些方法多用来观察单个或多个细胞的整体外形和内部结构, 而对细胞膜超微结构及细胞骨架的研究则有不足之处, 而它们在细胞间的信号转导和物质交换以及支撑细胞和定向分化等方面具有关键的作用^[11], 故研究细胞膜表面超微结构及不同分化时间段细胞骨架的变化具有极为重要的意义。

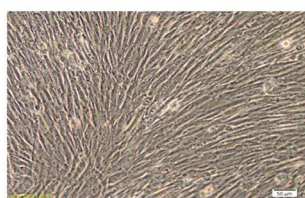


图 1 25 代 Walvax-2 细胞(200×)

Fig.1 Walvax-2 cell of P25

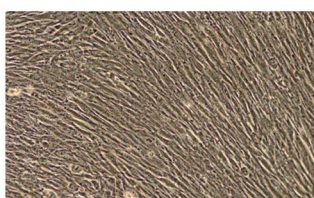


图 2 35 代 Walvax-2 细胞(200×)

Fig.2 Walvax-2 cell of P35

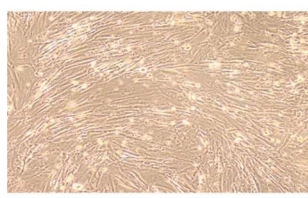


图 3 50 代 Walvax-2 细胞(200×)

Fig.3 Walvax-2 cell of P50

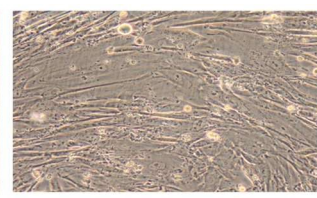


图 4 55 代 Walvax-2 细胞(200×)

Fig.4 Walvax-2 cell of P55

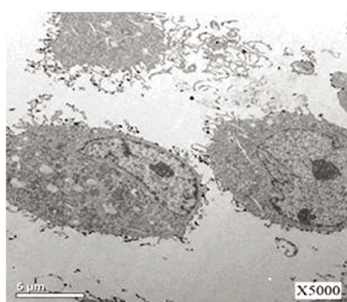


图 5 25 代 Walvax-2 细胞(5000×)

Fig.5 Walvax-2 cell of P25

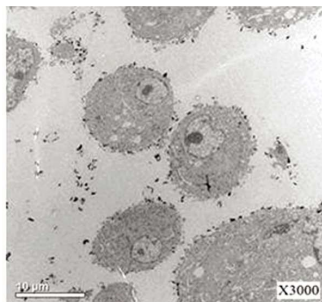


图 6 37 代 Walvax-2 细胞(5000×)

Fig.6 Walvax-2 cell of P37

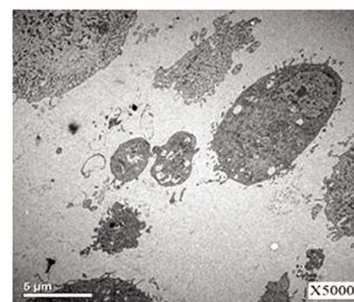


图 7 44 代 Walvax-2 细胞(5000×)

Fig.7 Walvax-2 cell of P44

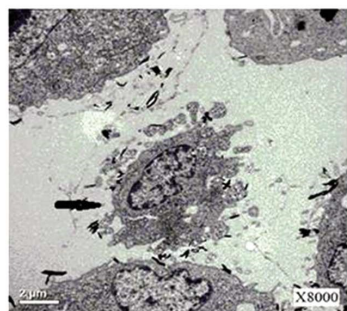


图 8 45 代 Walvax-2 细胞(5000×)

Fig.8 Walvax-2 cell of P45

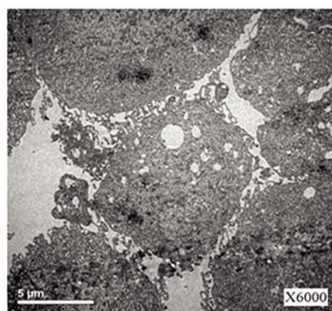


图 9 50 代 Walvax-2 细胞(5000×)

Fig.9 Walvax-2 cell of P50



图 10 55 代 Walvax-2 细胞(5000×)

Fig.10 Walvax-2 cell of P55



图 11 25 代 Walvax-2 细胞(6.3×)

Fig.11 Walvax-2 cell of P25

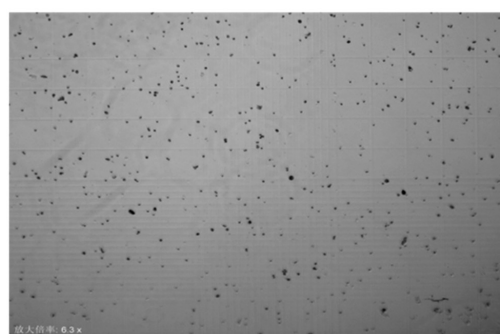


图 12 40 代 Walvax-2 细胞(6.3×)

Fig.12 Walvax-2 cell of P40

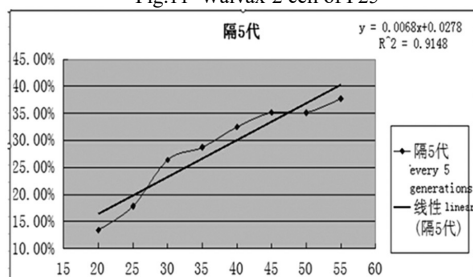


图 13 Walvax-2 细胞 20 代至 55 代

Fig.13 Walvax-2 cells from 20 to 55 generations

Note: The horizontal coordinate is the cell generation, and the vertical coordinate is the positive rate of beta-gal staining.

Exponential formula: $y = 0.0068x + 0.0278$ R^2 value is: 0.9148

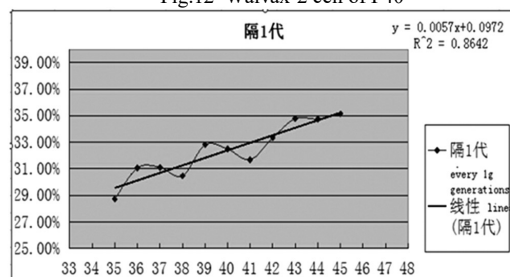


图 14 Walvax-2 细胞 35 代至 45 代

Fig.14 Walvax-2 cells from 35 to 45 generations

Note: The horizontal coordinate is the cell generation, and the vertical coordinate is the positive rate of beta-gal staining.

Exponential formula: $y = 0.0057x + 0.0972$ R^2 value is: 0.8642

通过显微镜观察细胞的生长情况是最简单,便捷的方法^[12],从 Walvax-2 细胞接种到生长至 72 小时后,应用显微镜跟踪观察细胞的发育情况。Walvax-2 细胞在显微镜下从 P50 开始出现衰老现象,细胞生长缓慢,排列不规则,形成致密单层时间增加,细胞培养液在第二天就开始出现浑浊现象。相对与年轻代次的体积变大、颜色加深,细胞延伸性降低,且边界不清,形态不规则,贴壁生长的细胞间出现空隙,未消化观察镜下可见少许圆缩细胞,可能是构成细胞支架微丝的收缩蛋白受到一定程度的损伤。P55 贴壁生长的细胞已经散乱,细胞培养液中可见成批的细胞出现脱落,离壁飘起的现象。胰酶消化后的细胞观察发现完整细胞极少,而视野下见大量细胞碎片,证明细胞已经发生凋亡和原发性坏死,也有可能存在细胞凋亡后的继发性坏死,即“二次坏死”^[13]。单纯的显微镜观察年轻代次和较年轻代次之间(P20 到 P50)无明显区别,但年轻代次细胞和衰老代次细胞之间有明显差别,说明显微镜观察分析适合区分年轻代次和衰老代次的区别,其结果有助于评价细胞的衰老程度。

电子显微镜经过七十多年的发展已广泛应用于各科研、医学领域,对科研的发展及疾病的治疗做出了极为重要的贡献^[14]。透射电子显微镜可以看到在光学显微镜下无法看清的小于 0.2 μm 的超微结构,透射电子显微镜技术的发展和运用,不仅揭示了生物细胞中各种细胞器的超微平面和立体结构,而且做到了对生物大分子,特别是核酸、蛋白质、酶等在超微结构中的准确定位、定性^[15]。衰老的过程中也会出现细胞凋亡,在衰老的成纤维细胞中可高表达凝溶胶蛋白,这种肌动调节蛋白依赖钙离子的调节,可使细胞对抗凋亡^[16]。P44 后随着细胞倍增次数的增加,细胞凋亡也开始频繁发生,增龄的过程中,内源性凋亡途径开始活跃,线粒体数量逐渐减少且结构肿胀化,说明线粒体功能逐渐紊乱,可能进入以线粒体为核心的线粒体途径凋亡,导致二倍体成纤维细胞凋亡速度加快,细胞损伤修复能力降低。透射电子显微镜观察得出:Walvax-2 衰老细胞与年轻细胞的区分点在 P44,从 P44 开始出现典型的细胞衰老现象,即凋亡小体的出现,细胞衰老表现就是细胞凋亡的发生,可见细胞通过出芽的方式形成了许多的凋亡小体,细胞进入程序性死亡。同时细胞膜微绒毛增多,呈现凝胶相。细胞质基质中维持细胞骨架结构的微丝和微管开始分散、崩解,导致细胞变形、体积增大,随着细胞代龄的增加细胞质色素积聚加深,从 P44 到 P55 的有空泡出现到大量空泡形成,细胞核膜内折程度加大,核仁逐渐变小,染色体固缩化。机体内细胞凋亡可清除多余或者受损的细胞,维持机体自身组织稳态。Walvax-2 衰老细胞中出现的细胞凋亡可能是细胞为维持自身生长环境稳定,进入了凋亡调节以保持其生长环境稳定,可能衰老细胞自我保护的一种情况。

β -半乳糖苷酶主要位于溶酶体,其酶活的最适条件为 pH4.2~pH4.6,但是在中性的条件下无法检测到其活性^[17]。当细胞发生衰老时,溶酶体增多、膨胀, β -半乳糖苷酶在溶酶体中明显蓄积。Dimri 等(1995)^[18]首次提出了一种鉴别衰老细胞的标志酶,衰老相关 β -半乳糖苷酶,在衰老成纤维细胞和角质形成细胞均表达此酶,而休眠细胞和终末分化细胞则缺乏,永生细胞检测不到 β -半乳糖苷酶的活性^[19]。老年皮肤中的 β -半乳糖苷酶染色的阳性率明显高于年轻的个体^[20],由此提示这种 β -

半乳糖苷酶是一种很好的可用于体内外衰老的生物学标志。随着细胞代龄的增加,在透射电镜下观察到蓄积在溶酶体中的 β -半乳糖苷酶增多,细胞形态越差。本实验对 Walvax-2 细胞从 P20 到 P55 每隔 5 代进行一次 β -半乳糖苷酶活性的检测,随着细胞代龄的增加, β -半乳糖苷酶活性显著增强,且这种增强与 Walvax-2 细胞增值能力的丧失和细胞衰老表现型的出现相平行, β -半乳糖苷酶染色的阳性率和细胞代龄之间呈显著相关($P<0.01$)。应用衰老相关 β -半乳糖苷酶检测细胞老化程度的研究具有重要的生物学意义,同时能为系统性的评价细胞衰老程度评价提供可靠的依据。

综上所述,细胞形态学变化, β -半乳糖苷酶阳性率变化与 Walvax-2 细胞代龄增长显著相关,可选择作为 Walvax-2 细胞衰老程度评价的生物学指标。

参考文献(References)

- [1] Salama R, Sadaie M, Hoare M, et al. Cellular senescence and its effector programs[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(2): 99-114
- [2] Young AR, Narita M, Narita M. Cell senescence as both a dynamic and a static phenotype[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 965: 1-13
- [3] 张文娟, 纪卫东, 杨淋清, 等. 人胚肺成纤维细胞复制性衰老及过氧化氢诱导的早衰研究[J]. *卫生研究*, 2009, 38(2): 139-143
- [4] 刘俊平. 衰老及相关疾病细胞分子机制研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(3): 215-230
- [5] Singh R, Kalra RS, Hasan K, et al. Molecular characterization of co-laborator of ARF (CARF) as a DNA damage response and cell cycle checkpoint regulatory protein [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 322(2): 324-334
- [6] Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, et al. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 26: 89-95
- [7] 马晓艳. 中学开展显微镜观察细胞骨架实验的探究分析[J]. *教学仪器与实验*, 2014, 30(08): 8-9
- [8] Woodward JD, Wepf RA. Macromolecular 3D SEM reconstruction strategies: signal to noise ratio and resolution [J]. *Ultramicroscopy*, 2014, 144: 43-49
- [9] Neupane B, Jin T, Mellor L F, et al. Continuous-Wave Stimulated Emission Depletion Microscope for Imaging Actin Cytoskeleton in Fixed and Live Cells[J]. *Sensors(Basel)*, 2015, 15(9): 24178-24190
- [10] 赵劲民, 秦义武. 种子细胞的培养、鉴定及诱导与支架材料的制备: 第二十届全国中西医结合骨伤科学术研讨会、第二届中国医师协会中西医结合医师分会骨伤科学术年会、第十九届浙江省中西医结合骨伤科专业委员会学术年会, 中国浙江杭州, 2013[C].

- [5] MM Guerrini, H Takayanagi. The immune system, bone and RANKL [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 561: 118-123
- [6] K Kanazawa, A Kudo. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20 (11): 2053-2060
- [7] S. Harada, N. Takahashi, Control of bone resorption by RANKL-RANK system[J]. Clin Calcium, 2011, 21(10): 1121-1130
- [8] F Cosman, DB Crittenden, JD Adachi, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016, 375(16): 1532-1543
- [9] H Yuan, H Qian, S Liu, et al. Therapeutic role of a vaccine targeting RANKL and TNF-alpha on collagen-induced arthritis [J]. Biomaterials, 2012, 33(32): 8177-8185
- [10] M Yuce, N Ullah, H Budak, et al. Trends in aptamer selection methods and applications[J]. Analyst, 2015, 140(16): 5379-5399
- [11] C Tuerk, L Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510
- [12] O Kadioglu, AH Malczyk, HJ Greten, et al. Aptamers as a novel tool for diagnostics and therapy [J]. Invest New Drugs, 2015, 33 (2): 513-520
- [13] CM Mattice, MC DeRosa. Status and Prospects of Aptamers as Drug Components[J]. BioDrugs, 2015, 29(3): 151-165
- [14] A Mathew, T Maekawa, D Sakthikumar, et al. Aptamers in targeted nanotherapy[J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(12): 1102-1114
- [15] X Liu, X Zhang. Aptamer-based technology for food analysis [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175(1): 603-624
- [16] M Famulok, G Mayer. Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology [J]. Chem Biol, 2014, 21(9): 1055-1058
- [17] KT Shum, C Chan, CM Leung, et al. Identification of a DNA aptamer that inhibits sclerostin's antagonistic effect on Wnt signalling [J]. Biochem J, 2011, 434(3): 493-501
- [18] MC Walsh, Y Choi. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity[J]. Bone, and Beyond, Front Immunol, 2014, 5: 511
- [19] BF Boyce, Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions[J]. J Dent Res, 2013, 92(10): 860-867
- [20] T Wada, T Nakashima, N Hiroshi, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(1): 17-25
- [21] SR Cummings, J San Martin, MR McClung, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis [J]. N Engl J Med, 2009, 361(8): 756-765
- [22] MR Smith, B Egerdie, N Hernandez Toriz, et al. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(8): 745-755
- [23] C Oelkrug, U Sack, A Boldt, et al. Antibody- and aptamer-strategies for GvHD prevention[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(1): 11-20

(上接第 3258 页)

- Zhao Jin-min, Qin Yi-wu. Seed cells in culture identification and inducing and preparation of scaffold materials of: the 20th National Traditional Chinese medicine and Western medicine combined with orthopedic academic seminar, the second session of the Chinese Medical Association of traditional Chinese medicine and Western medicine combined with Doctor Association orthopedics surgery annual meeting, the nineteenth session of Zhejiang Province in western medicine combined with orthopedics Professional Committee of academic annual meeting, Hangzhou, Zhejiang Province, China. 2013[C].
- [11] Schiffhauer ES, Luo T, Mohan K, et al. Mechanoaccumulative Elements of the Mammalian Actin Cytoskeleton [J]. Curr Biol, 2005, S0960-9822(16)30329-3
 - [12] 谢雅婷, 显微镜细胞特征提取及识别[D], 2012, 湘潭大学: 77
Xie Ya-ting, A microscope cell feature extraction and recognition[D], 2012, Xiangtan University: 77
 - [13] Xie X, Shan W, Timothy W, et al. Genistein promotes cell death of ethanol-stressed HeLa cells through the continuation of apoptosis or secondary necrosis[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 63
 - [14] Volkmann N. Putting structure into context: fitting of atomic models into electron microscopic and electron tomographic reconstructions [J]. Curr Opin Cell Biol, 2012, 24(1): 141-147
 - [15] Chee SW. Studying localized corrosion using liquid cell transmission electron microscopy [J]. Chem Commun (Camb), 2015, 51 (1): 168-171
 - [16] Sherwood CL, Daines MO, Price TJ, et al. A highly potent agonist to protease-activated receptor-2 reveals apical activation of the airway epithelium resulting in Ca^{2+} -regulated ion conductance[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(8): C718-26
 - [17] Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence [J]. Cell, 2003, 113(6): 703-716
 - [18] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-9367
 - [19] Tao Q, Lü B, Qiao B, et al. Characterization of growth and proliferation in a telomerase-immortalized ameloblastoma cell line [J]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2009, 44(8): 474-478
 - [20] Tao Q, Lv B, Qiao B, et al. Immortalization of ameloblastoma cells via reactivation of telomerase function: Phenotypic and molecular characteristics[J]. Oral Oncol, 2009, 45(12): 239-244