

[文章编号] 1000-1182(2011)03-0306-04

小鼠Dishevelled 2表达质粒的构建及其在RAW264.7细胞中的表达

黄旭¹ 赵鹃² 毛英杰³ 谷志远³

(1.浙江大学医学院附属第一医院 口腔科, 杭州 310003;

2.浙江大学医学院附属口腔医院 修复科; 3.颌面外科, 杭州 310006)

[摘要] 目的 构建小鼠Dishevelled 2(Dvl2)表达质粒,并检测其转染小鼠破骨前体细胞RAW264.7后的表达,为进一步研究Dvl2在破骨细胞分化和骨重建中的作用、筛选调节骨重建潜在靶点奠定基础。方法 根据GenBank小鼠Dvl2 cDNA序列设计两条特异性引物,提取RAW264.7细胞总RNA,以RT-PCR获得Dvl2的开放阅读框(ORF),并将其克隆到真核表达质粒pEZ-M29上,酶切电泳,测序鉴定构建的pEZ-M29/Dvl2质粒。用脂质体介导瞬时转染RAW264.7细胞,通过荧光显微镜观察转染效果,实时定量RT-PCR检测Dvl2基因表达情况。结果 成功构建pEZ-M29/Dvl2表达载体,酶切电泳和测序结果与目的基因相符;转染RAW264.7细胞后48 h,荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白表达;实时定量RT-PCR可见实验组Dvl2基因较对照组强烈过表达。结论 成功构建小鼠Dvl2真核表达质粒pEZ-M29/Dvl2,瞬时转染小鼠破骨前体细胞RAW264.7可显著提高Dvl2的mRNA水平。

[关键词] Dishevelled 2; 表达质粒; RAW264.7细胞; 破骨细胞

[中图分类号] R 782.2 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.03.022

Construction of vectors encoding mouse Dishevelled 2 and its expression in RAW264.7 cells HUANG Xu¹, ZHAO Juan², MAO Ying-jie³, GU Zhi-yuan³. (1. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 2. Dept. of Prosthodontics, The Affiliated Hospital of Stomatology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective** To construct the recombinant vectors that express mouse Dishevelled 2(Dvl2), and to evaluate its expression level in transfected RAW264.7 cells. **Methods** A pair of specific primers were designed according to the mouse Dvl2 cDNA sequence published in GenBank. Total RNA of RAW264.7 cells was extracted, and open reading frame of Dvl2 was obtained by RT-PCR, which was then cloned into pEZ-M29 plasmid. Electrophoresis after macrorestriction and DNA sequence analysis were used to identify the reconstructed plasmids. After transient transfection via liposome, the transfection of RAW264.7 cells was confirmed under a fluorescence microscope, and the expression level of Dvl2 was evaluated by real-time RT-PCR. **Results** The recombinant plasmid containing mouse Dvl2, namely pEZ-M29/Dvl2, was successfully constructed, and confirmed by DNA sequence analysis. After 48 h of transfection, the expression of enhanced green fluorescence protein was observed under a fluorescence microscope, and real-time RT-PCR analysis revealed that the Dvl2 mRNA level was prominently elevated in the transiently transfected RAW264.7 cells. **Conclusion** The recombinant plasmids pEZ-M29/Dvl2 are successfully constructed and can elevate the Dvl2 mRNA level in the transiently transfected RAW264.7 cells, which can be used in further studies aiming at revealing the functional significance of Dvl2 in the osteoclastogenesis.

[Key words] Dishevelled 2; expression plasmid; RAW264.7 cells; osteoclasts

骨重建参与口腔医学的各个方面,如正畸牙的

移动、种植体骨整合界面的形成、牙列缺失后牙槽骨的吸收等。研究骨重建的机理,选择适宜的靶点,一直是口腔医学研究及临床的热点。骨重建中,破骨细胞和成骨细胞不可或缺。破骨细胞功能的过度抑制或破骨细胞缺乏都会影响成骨细胞的骨形成^[1-3]。而恢复破骨细胞的功能,则有助于形成正

[收稿日期] 2010-12-17; [修回日期] 2011-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30700958);浙江省自然科学基金资助项目(Y2100333)

[作者简介] 黄旭(1977—),男,浙江人,主治医师,硕士

[通讯作者] 赵鹃, Tel: 0571-87217225

常的骨组织结构^[4-5]。破骨细胞和成骨细胞间存在着双向ephrinB2/EphB4膜分子信号耦联,当成熟破骨细胞表面的ephrinB2和成骨前体细胞表面的EphB4相接触时,信号同时、双向传入成骨细胞(正向)和破骨细胞(逆向),正向信号激活成骨细胞的分化,而逆向信号抑制破骨细胞的分化^[6-7]。这项研究结果很好的解释了骨重建转换阶段中,破骨细胞骨吸收停止、活性消失,同时成骨细胞分化、活化,这一关键现象^[6]。这一发现也从信号传导机制解释了采用抑制骨吸收的传统治疗方法有时不能促进骨形成的失败原因,提示了利用破骨细胞促进成骨细胞分化的信号耦联以治疗骨疾病、促进骨整合的新思路以及新靶点,其中,破骨细胞逆向信号传导下游通路中与ephrinB2作用的结构域蛋白质是潜在的作用靶点^[6]。本课题组的最新研究结果,从破骨细胞内表达的多种结构域蛋白质中,筛选出Dishevelled 2(Dvl2)与ephrinB2固有结合,它极可能是参与ephrin-B2/EphB4逆向信号转导的PDZ结构域蛋白质^[8]。但尚需采用实验证实Dvl2在破骨细胞分化中的功能。

本实验根据Dvl2编码区的序列,构建了含CMV启动子和绿色荧光标记蛋白的表达质粒pEZ-M29/Dvl2,通过脂质体将其瞬时转染破骨前体细胞RAW 264.7,通过实时定量PCR的方法鉴定过表达Dvl2的RAW264.7细胞,为深入研究Dvl2在破骨细胞分化中的作用及其在破骨细胞/成骨细胞ephrinB2/EphB4信号耦联中的作用机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pEZ-M29质粒载体(广州复能基因有限公司),*Taq*酶、dNTP、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、DL 2000 DNA Marker、*DH5α*感受态细胞、PrimeScript™ RT reagent Kit和SYBR® Premix Ex *Taq*™ Kit(Takara公司,日本);T4 DNA ligase(Fermentas公司,立陶宛);*Srf*、*EcoR* (NEB公司,美国);250 bp DNA ladder plus和鉴定质粒的PCR引物(上海生工生物工程公司);Annealing Buffer for DNA Oligos(5×)(碧云天公司);0.25%Trypsin & 0.02%EDTA(吉诺生物医药技术有限公司);Hyclone磷酸盐缓冲液(北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司);转染试剂Lipofectamine 2000、RNA抽提试剂TRIZOL(Invitrogen公司,美国);质粒提取试剂盒(Axygen公司,美国);α-MEM培养液和DMEM高糖培养液(Gibco公司,美国);RAW264.7细胞(ATCC TIB-71)。

1.2 Dvl2基因克隆

按TRIZOL试剂说明书操作提取RAW264.7细胞总

RNA,用PrimeScript™ RT reagent Kit逆转录cDNA。从GenBank查询鼠Dishevelled 2(NM_007888),dsh homolog(*Drosophila*)的开放阅读框(open read length, ORF)序列,并设计带酶切位点的PCR引物,设计引物如下:F:GAATTCGGTACCATGGCGGG(下划线标记*EcoR* 酶切位点);R:GCCCCGGGCTCTTCTAC-ATAA(下划线标记*Srf* 酶切位点)。从cDNA中,用RT-PCR反应合成带酶切位点的Dvl2 ORF片段,PCR产物在1.5%的琼脂糖胶上100 V,30 min检测条带。

1.3 酶切

取1 μg的pEZ-M29质粒和PCR目的产物,用*EcoR*和*Srf* 37 °C双酶切2 h,1.5%胶电泳,割胶回收大片的质粒和PCR产物,检测浓度。

1.4 连接反应

在T4 DNA连接酶作用下,PCR产物和质粒回收片段以10:1的量进行连接反应,16 °C连接1 h。

1.5 转化

取1支*DH5α*感受态细胞(每管100 μL,-80 °C保存)于冰上,待溶解后加入10 μL连接液,轻轻旋转以混匀内容物,在冰中放置30 min。将管放到预加温到42 °C的恒温水浴锅中热激90 s。快速将管转移到冰浴中,使细胞冷却2~3 min。每管加900 μL LB培养液,然后将管转移到37 °C摇床上,温育1 h使细菌复苏。取恰当量的转化菌液涂布于LB琼脂平板上。倒置平皿,于恒温培养箱中37 °C培养16 h。

1.6 阳性克隆筛选及鉴定

挑取平板上长出的单菌落,重悬于10 μL LB培养液中,从中取1 μL做模板进行菌落PCR鉴定。提取质粒,进行酶切和测序鉴定,DNA测序由美国加州浙江大学纳米研究院进行。测序引物:Forward:5'-CCGACAACCACTACCTGA-3',Reverse:5'-GT-GGCACCTTCCAGGGTC-3'。测序正确的,再接种抽提质粒。

1.7 脂质体介导pEZ-M29/Dvl2转染破骨前体细胞RAW264.7

取第3代RAW264.7细胞,进行转染实验。转染前以每孔 4.5×10^5 个细胞将RAW264.7细胞接种于6孔板内,置于37 °C 5%CO₂的培养箱中培养,当细胞融合度达90%时,按照Lipofectamine 2000的说明书进行过表达载体质粒和空载体质粒的转染。简要过程如下:转染前1~2 h换液,弃掉培养基,加入2 mL新鲜完全培养基;将4 μg质粒加入到250 μL不含血清的opti-MEM培养基中,轻柔混匀制成混合物A备用;将10 μL Lipofectamine 2000加入到250 μL不含血清的opti-MEM培养基中,轻柔混匀制成混合物B,室温下放置5 min;将A和B轻柔混匀,室温下静置20 min

后,将混合液加入到接种细胞的孔中,轻轻摇匀,置于37℃ 5%CO₂培养箱中培养(未转染组细胞中加入不含血清的opti-MEM培养基);4~6 h后换成含双抗的完全培养基,置于37℃ 5%CO₂培养箱中继续培养;培养48 h后荧光显微镜下拍照,观察细胞转染情况。同时收集各组细胞,离心沉淀后用于实时定量RT-PCR。

1.8 实时定量RT-PCR测定Dvl2基因的表达变化

收集各组细胞,以TRIZOL试剂提取RAW264.7细胞总RNA,将提取的总RNA用Rnase free的去离子水溶解,-80℃保存。采用PrimeScript™ RT reagent Kit逆转录cDNA,操作方法同前。采用SYBR® Premix Ex Taq™ Kit试剂盒进行实时定量RT-PCR。PCR反应条件:95℃预变性4 min,95℃变性30 s,60℃复性30 s,72℃延伸60 s,循环40次,然后72℃温育10 min。以Beta-actin作为内参。引物均由Takara公司设计合成。Dishevelled 2 sense:5'-GCAGTGT-CACCGATTCCACAA-3'; antisense:5'-CTTTCAT-GATGGAGCCGATGTAGA-3'; Beta-actin sense:5'-

AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3'; antisense:5'-TGCCAACACAGTGCTGTCT-3'。独立重复实验3次,用2^{-ΔΔCt}方法分析所得数据,以比较各组的基因表达。

2 结果

2.1 重组质粒构建

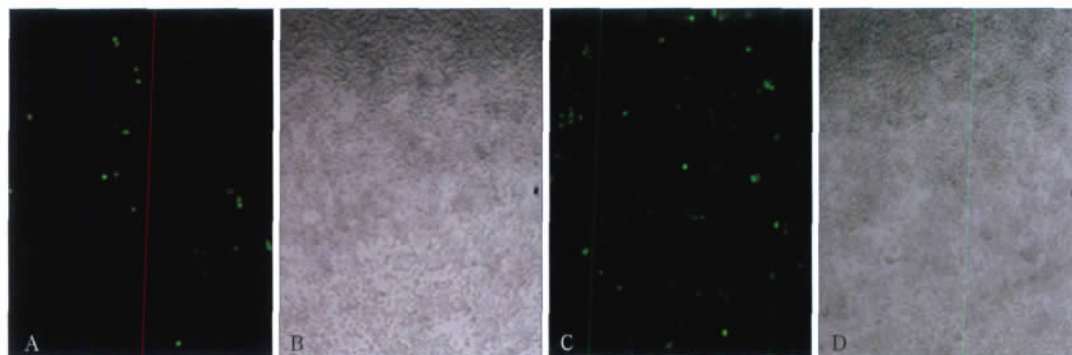
重组质粒pEZ-M29/Dvl2中Dvl2的ORF长度为2 211 bp,载体长度6 131 bp,经EcoR和Srf双酶切后,凝胶电泳显示出相应大小的目的基因片段和载体片段;测序结果显示,重组质粒中目的基因编码序列结果与GenBank中Dvl2序列一致。

2.2 重组质粒转染RAW264.7细胞的鉴定

脂质体转染48 h后,荧光显微镜下观察(图1),可见部分细胞表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP),代表转染成功。

2.3 重组质粒转染的RAW264.7细胞的Dvl2 mRNA表达

转染48 h后,即可检测到重组质粒转染组较空质粒转染组Dvl2 mRNA表达水平提高27.5倍(图2)。



A、B: 空质粒转染; C、D: 重组质粒pEZ-M29/Dvl2转染。

图1 重组质粒pEZ-M29/Dvl2转染RAW264.7细胞的形态 荧光显微镜 ×40

Fig 1 Images of pEZ-M29/Dvl2-transfected RAW264.7 cells fluorescence microscope ×40

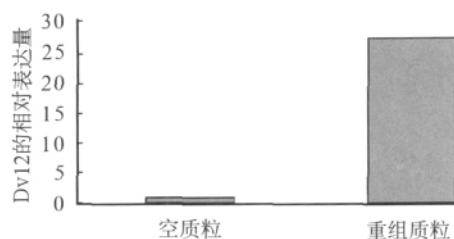


图2 实时定量RT-PCR测定Dvl2在RAW264.7细胞中的表达

Fig 2 Dvl2 mRNA levels of RAW264.7 cells by real-time RT-PCR

3 讨论

为了进一步研究Dvl2蛋白在破骨细胞分化及功能过程中的作用,本文应用基因工程技术及分子生物学的方法,根据GenBank上公布的小鼠Dvl2 cDNA序列设计2条特异性引物,从小鼠RAW264.7细胞株中

提取总RNA,以RT-PCR反应获得编码Dvl2蛋白的ORF读框,并将其克隆到真核表达质粒pEZ-M29上,瞬时转染RAW264.7细胞,荧光显微镜观察显示转染成功,实时定量RT-PCR测定Dvl2基因的表达显著提高,为建立稳定转染破骨前体细胞系打下基础。

本实验根据Dvl2及载体质粒基因结构特点,构建Dvl2基因真核表达质粒。pEZ-M29质粒是6 131 bp大小的质粒,具有以下几方面特点:1)自身携带能发出绿色荧光的EGFP报告基因,在荧光显微镜下,即可观察到绿色荧光,无需任何作用底物或共作用物,直接、简捷、便于检测,检测的灵敏度高;EGFP绿色荧光蛋白本身性质稳定,可在多种异源生物中表达且无细胞毒性;EGFP绿色荧光蛋白基因片段长度较小(约717 bp),易于构建融合蛋白,且融合蛋白仍能保持荧光激发活性,为研究其他基因表达产物的

分布提供了方便。2)含有高效的功能强大的CMV启动子,可以使目的基因在增殖的细胞中稳定表达。3)具有多克隆位点,便于目的基因的插入。4)该载体具有Ampicillin基因,可以采用氨苄霉素来筛选已成功转染了该载体的菌株。5)该载体具有Neomycin基因,可以采用G418药物压力筛选稳定转染了该载体的破骨前体细胞,以便用于Dvl2过表达破骨前体细胞的传代及破骨细胞分化功能研究。

Dvl是一种胞浆蛋白,分为Dvl1、Dvl2和Dvl3,均含有3个保守的蛋白结构域:DIX(Dishevelled-Axin)结构域,PDZ(postsynaptic density protein PSD-95, discs-large, and ZO-1)结构域和DEP(Dsh, Egl10, Pleckstrin)结构域^[9]。Dvl2众所周知的生物学功能是作为Wnt信号通路的关键中间传导分子,参与了上游信号在胞膜、胞浆以及胞核的一系列传导^[10]。Dvl2位于Frizzled/LRP6/G-protein下游、GSK3上游,主要参与3条Wnt信号通路:PDE6-cGMP-Ca²⁺通路,planar cell polarity/convergent extension(PCP/CE)通路和Wnt/ β -catenin经典通路^[9-10]。

Wnt信号通路广泛参与了各种骨组织活动,包括胚胎骨骼成型、胎儿骨骼发育以及成年骨重建^[11-12]。Wnt/ β -catenin信号通路可以通过多种机制促进骨形成从而影响骨量,其中,Dvl2作为Wnt信号通路的关键分子,在老年人骨中mRNA水平的降低反映出Wnt信号通路的减弱,由此造成骨量的减少;但是在骨关节炎患者中,Dvl2 mRNA表达水平反而升高^[13-14]。目前,大多数研究都是针对成骨细胞中Wnt通路及Dvl2对其分化的促进作用以及对破骨细胞分化的间接促进作用,例如,有文献报道,Wnt对成骨细胞的作用受细胞分化程度的影响,即Wnt可以刺激早期成骨细胞的分化,但是抑制成熟成骨细胞的矿化能力,另外,成骨细胞的分化抑制内源性Wnt信号传导,并且影响多种Wnt信号通路相关基因的表达^[15]。再如,成骨细胞中,甲状旁腺激素受体(parathyroid hormone receptor, PTHR)通过直接结合Dvl2激活 β -catenin及其下游通路(不通过Wnt),直接促进成骨细胞分化,并间接促进破骨细胞分化^[16]。但是,鲜有破骨细胞中Dvl2表达及直接参与破骨细胞分化及功能的研究报道。

ephrinB2/EphB4是最新报道的骨重建转化阶段的重要信号耦联^[6-7],本课题组的最新研究进展提示破骨细胞内Dvl2与ephrinB2固有结合,它极可能是参与ephrinB2/EphB4逆向信号转导的PDZ结构域蛋白质^[8]。生物化学方面的研究表明,Dvl2可以与EphB受体或ephrinB配体固有结合为复合体,受上游分子刺激后,与EphB或ephrinB分离,作为其下游分子传

递信号^[17]。在视网膜前体细胞、神经干细胞等细胞中,ephrinB可经由Dvl2介导的PCP/CE通路及其下游的Rho GTPase通路或c-Jnk通路产生一系列生物活动,特别是细胞骨架蛋白的改变和细胞移动^[18]。众所周知,活化破骨细胞的细胞骨架改变和细胞移动对其功能活动非常重要。但是在破骨细胞中,ephrinB2/EphB4与Dvl2之间的结合是否具有生物学意义,它们的结合是否具有与其在视网膜前体细胞和神经干细胞中相似的功能作用,即是否影响细胞骨架中F-actin蛋白及细胞移动,尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(2): 76-81.
- [2] Martin TJ. Does bone resorption inhibition affect the anabolic response to parathyroid hormone[J]. Trends Endocrinol Metab, 2004, 15(2): 49-50.
- [3] Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures[J]. J Clin Invest, 2008, 118(2): 421-428.
- [4] Dai XM, Zong XH, Akhter MP, et al. Osteoclast deficiency results in disorganized matrix, reduced mineralization, and abnormal osteoblast behavior in developing bone[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(9): 1441-1451.
- [5] Sakagami N, Amizuka N, Li M, et al. Reduced osteoblastic population and defective mineralization in osteopetrotic(op/op) mice[J]. Micon, 2005, 36(7/8): 688-695.
- [6] Mundy GR, Elefteriou F. Boning up on ephrin signaling[J]. Cell, 2006, 126(3): 441-443.
- [7] Zhao C, Irie N, Takada Y, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis[J]. Cell Metab, 2006, 4(2): 111-121.
- [8] Mao Y, Huang X, Zhao J, et al. Preliminary identification of potential PDZ-domain proteins downstream of ephrin B2 during osteoclast differentiation of RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(5): 669-677.
- [9] Malbon CC, Wang HY. Dishevelled: A mobile scaffold catalyzing development[J]. Curr Top Dev Biol, 2006, 72: 153-166.
- [10] Yokoyama N, Malbon CC. Dishevelled-2 docks and activates Src in a Wnt-dependent manner[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 24): 4439-4451.
- [11] Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(3): 151-158.
- [12] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1202-1209.
- [13] Sánchez-Sabaté E, Alvarez L, Gil-Garay E, et al. Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(8): 1106-1114.

凋亡进入不可逆阶段,常被作为细胞凋亡中期和晚期的检测指标^[8]。TUNEL法是运用分子生物学原理结合形态学特征检测细胞内DNA断裂后形成的原位凋亡细胞技术,是细胞凋亡晚期的经典检测方法^[9]。

本实验免疫组织化学染色结果显示:与对照组相比,实验组大鼠牙龈上皮内Bcl-2和Caspase-3蛋白阳性表达范围和表达密度发生明显变化,这种变化具有部位特异性,在颊侧附着龈近膜龈联合处Bcl-2蛋白阳性表达明显增加,Caspase-3蛋白阳性表达明显减少。实验组大鼠牙龈上皮钉突少或无的部位,棘细胞层厚度一般无变化,而颗粒细胞层略增厚,此处Bcl-2蛋白阳性表达少或无,Caspase-3蛋白阳性表达分布不均匀,但比对照组略减少。而在牙龈上皮钉突伸长增宽部位,除颗粒细胞层增厚以外,往往伴有棘细胞层明显增厚现象,这与Wondimu等^[10]和Bulut等^[11]研究发现相似。此处Bcl-2蛋白阳性表达明显增多,上方颗粒细胞层中Caspase-3阳性表达明显减少。

本实验统计学结果同样表明:与对照组相比较,实验组大鼠牙龈上皮内凋亡相关蛋白Bcl-2蛋白的表达上调,Caspase-3蛋白的表达和细胞凋亡指数下调,各组数值在实验组和对照组间均有显著差异,且颊侧较舌侧差异更为明显,这与本课题组前期实验结果相同^[12]。推测:CsP可以通过抑制牙龈上皮细胞凋亡活动而导致大鼠牙龈上皮增厚,并且抑制凋亡的机制可能存在部位差异。CsP可能通过抑制牙龈上皮钉突处Bcl-2蛋白的表达而抑制线粒体凋亡途径,从而使该处牙龈上皮增厚,而牙龈上皮其他部位增厚可能由于启动其他信号而导致Caspase-3蛋白表达发生变化而抑制凋亡。但是CsP对大鼠牙龈上皮部位差异性影响的真正机制尚需深入研究。

[参考文献]

[1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2008 :145.

MENG Huan-xin. Periodontology [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008 :145.

[2] 刘培红, 马肃. 环孢素诱导牙龈上皮细胞增生的机制[J]. 国际口腔医学杂志, 2009, 36(1) 81-83.

LIU Pei-hong, MA Su. Pathogenesis of Cyclosporin-induced gingival epithelial hyperplasia[J]. Int J Stomatol, 2009, 36(1) 81-83.

[3] Shimizu Y, Kataoka M, Seto H, et al. Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis[J]. J Periodontol, 2002, 73(8) 861-867.

[4] Niimi A, Tohnai I, Kaneda T, et al. Immunohistochemical analysis of effect of cyclosporin A on gingival epithelium[J]. J Oral Pathol Med, 1990, 19(9) 397-403.

[5] Buduneli N, Buduneli E, Cinar S, et al. Immunohistochemical evaluation of ki-67 expression and apoptosis in cyclosporin A-induced gingival overgrowth[J]. J Periodontol, 2007, 78(2) 282-289.

[6] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4) 239-257.

[7] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 281(5381) :1322-1326.

[8] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15 269-290.

[9] 詹启敏. 分子肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005 :403-425. ZHAN Qi-min. Molecular oncology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005 :403-425.

[10] Wondimu B, Reinholt FP, Modeer T. Sterologic study of cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patient[J]. Eur J Oral Sci, 1995, 103(4) :199-206.

[11] Bulut S, Uslu H, Ozdemir BH, et al. Analysis of proliferative activity in oral gingival epithelium in immunosuppressive medication induced gingival overgrowth[J]. Head Face Med, 2006, 2 :13.

[12] 刘培红, 马肃, 刘薇婷. 环孢素对大鼠牙龈组织形态影响的定量分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(6) :599-602.

LIU Pei-hong, MA Su, LIU Wei-ting. Quantitative analysis the effect of Cyclosporin on gingival tissue modality of rats[J]. West China J Stomatol, 2009, 27(6) :599-602.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第309页)

[14] Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: Differential expression and genetic association study[J]. Osteoporos Int, 2010, 21(1) :109-118.

[15] Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, et al. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2) :568-579.

[16] Romero G, Sneddon WB, Yang Y, et al. Parathyroid hormone receptor directly interacts with dishevelled to regulate beta-Cate-

nin signaling and osteoclastogenesis[J]. J Biol Chem, 2010, 285 (19) :14756-14763.

[17] Lee HS, Mood K, Battu G, et al. Fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of ephrinB1 modulates its interaction with Dishevelled[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(1) :124-133.

[18] Rohn JL, Baum B. Actin and cellular architecture at a glance[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 2) :155-158.

(本文编辑 汤亚玲)