论著

文章编号:1000-5404(2013)04-0288-05

OPG/RANKL/RANK系统参与牙槽骨吸收及重建过程作用初探

陈莉丽,黄 玫,雷利红,吴燕岷 (310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院口腔内科)

[摘要] **目的** 初步探讨护骨素OPG、核因子κB受体活化因子配体RANKL、核因子κB活化因子RANK在牙周炎牙槽骨吸收及骨重建过程中的作用。**方法** 对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株RAW264.7实验组进行体外诱导培养,对照组为完全培养基培养;小鼠成骨样细胞株MC3T3-E1实验组采用前期实验收集的骨吸收上清处理,对照组采用完全培养基培养;以免疫荧光等方法检测细胞OPG、RANKL、RANK的表达。30只8周龄雄性SD大鼠建立实验性牙槽骨吸收模型,研究其吸收重建规律。以免疫组化S-P法检测OPG、RANKL、RANK的表达情况。**结果** 实验组MC3T3-E细胞经骨吸收上清处理7 d后,OPG蛋白平均荧光强度为(29.636±5.652),对照组为(15.568±1.229),表达显著上调($P<0.01$);但实验组RANKL蛋白平均荧光强度为(6.806±1.738),对照组为(18.082±2.732),表达被显著抑制($P<0.01$),OPG/RANKL比值在上清处理后高于对照组($P<0.05$)。采用大肠杆菌内毒素E-LPS注射法成功制备大鼠牙槽骨吸收模型。在牙槽骨吸收区域OPG水平较无骨吸收区域有所降低,RANKL的表达则相反。**结论** OPG、RANKL、RANK参与了大鼠实验性骨吸收活动;破骨细胞骨吸收上清可能通过改变OPG与RANKL的比值,从而影响骨重建中骨形成与骨吸收的动态平衡。

[关键词] 成骨细胞;破骨细胞;护骨素;核因子κB受体活化因子配体;核因子κB活化因子;牙周炎动物模型
[中图法分类号] R322.71;R363.25;R781.4 [文献标志码] A

Role of OPG/RANKL/RANK system during alveolar bone resorption and remodeling

Chen Lili, Huang Mei, Lei Lihong, Wu Yanming (Department of Oral Medicine, Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang Province, 310009, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the potential role of a system containing osteoprotegerin (OPG), receptor activator of NF-κB ligand (RANKL), and receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK), also as, OPG/RANKL/RANK system in the resorption and remodeling mechanisms of alveolar bone. **Methods** Mouse RAW264.7 cell line was induced to osteoclasts *in vitro*, and mouse MC3T3-E1 cell line was treated with bone resorption supernatant. The control cells was cultured with regular medium. The expression levels of OPG, RANKL and RANK in the cells was detected by immunofluorescence assay. Thirty 8-week-old male SD rats were used to establish the alveolar bone resorption model with the injection of E-LPS. Immunohistochemical S-P method was used to investigate the expression of OPG, RANKL and RANK in the animal model. **Results** The expression of OPG in MC3T3-E1 cells was up-regulated after 7 days' treatment with bone resorption supernatant than in control cells (29.636±5.652 *vs* 15.568±1.229, $P<0.01$), while, the RANKL expression was down-regulated (6.806±1.738 *vs* 18.082±2.732, $P<0.01$). The ratio of OPG to RANKL was up-regulated too ($P<0.05$). The OPG level in periodontal tissues of rats was decreased compared with the tissue without resorption. But the expression of RANKL was increased. **Conclusion** OPG/RANKL/RANK system is involved in the bone resorption and remodeling. Osteoclast bone absorbent supernatants might affect the ratio of OPG to RANKL by regulating of the differentiation and activity of osteoblast-like cells, and thus regulate the dynamic balance of bone formation and resorption.

[**Key words**] osteoblasts; osteoclasts; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor-kappa B; receptor activator of NF-κB ligand; rat model of periodontitis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271142) and the Project of Public Welfare Technology Application Research of Zhejiang Province (2012C33G2010138). Corresponding author: Wu Yanming, Tel: 86-571-87783607, E-mail: wym731128@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81271142),浙江省公益性技术应用研究计划(2012C33G2010138)
[通信作者] 吴燕岷,电话:(0571)87783607,E-mail:wym731128@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1023.024.html(2012-12-07)

骨代谢是破骨细胞不断降解旧骨和成骨细胞在相同位置上重新构建新骨的有序活动的动态平衡过程，该过程的失调将引发骨代谢性疾病[1]。牙周炎是发生在牙周支持组织的慢性组织破坏性疾病，其标志性特征是牙槽骨吸收，我国人群中的发病率在70%以上[2]。因此，控制牙槽骨吸收，促进牙槽骨的修复和重建，成为治愈牙周炎的关键。本课题组前期实验研究成功构建了体外破骨细胞骨吸收模型，并发现破骨细胞骨吸收活动中的分泌产物具有抑制成骨样细胞增殖、促进分化和钙化成骨的作用[3]，但其中具体的分子机制尚不清楚。

已知核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of NF-κB Ligand, RANKL)是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)配体超家族成员，成骨细胞或骨髓基质细胞表面表达的RANKL或分泌到基质中的RANKL，与破骨细胞前体表面唯一的受体核因子κB活化因子(receptor activator of nuclear factor-kappa B, RANK)结合，将信号传入细胞内，引起破骨细胞前体分化、增殖和成熟[4]。而护骨素(osteoprotegerin, OPG)作为TNF受体超家族成员，能阻断RANK与RANKL的作用[5]。OPG/RANKL/RANK系统是近年被发现的成骨细胞与破骨细胞相互作用的重要途径，其被认为是介导各种物质诱导破骨细胞生成及功能的重要通路，因此骨组织局部微环境中OPG、RANKL或RANK的表达水平，可能是决定破骨或成骨平衡的关键。本研究利用体外细胞培养及实验性大鼠牙槽骨吸收模型对OPG/RANKL/RANK系统在牙周炎牙槽骨吸收及骨重建过程中的作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株RAW264.7(购自中国科学院细胞库)，用含10%胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco, 美国)培养；小鼠成骨样细胞株MC3T3-E1(购自中国科学院细胞库)用含10%胎牛血清的极限必需培养基(α-minimum essential medinm, α-MEM, Gibco, 美国)培养；二者均培养于37 ℃含5% CO_2的培养箱中。每3天换液1次，细胞增殖至对数生长期后，用0.25%胰蛋白酶室温消化后计数备用。

1.2 免疫荧光检测细胞OPG、RANKL、RANK的表达

小鼠MC3T3-E1细胞以3×10^3/孔接种于放置有圆形玻片的24孔板，无血清培养基培养24 h后，实验组采用300 μL前期实验收集的破骨细胞骨吸收上清液[4]和900 μL的α-MEM共培养，对照组用1.2 mLα-MEM完全培养基培养；每组设4个复孔。小鼠RAW264.7细胞2×10^3/孔接种于放置有圆形玻片的24孔板，无血清培养基培养24 h后，实验组用1.2 mL含终浓度为50 μg/L RANKL和50 μg/L小鼠重组巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colonystimulating factor, M-CSF)的DMEM诱导分化，对照组仅加1.2 mLDMEM完全培养基；标准环境下孵育。第7、10天处理细胞，弃去培养液，PBS洗涤后加入2%的多聚甲醛固定细胞，0.1%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)室温透化去交联，1%牛血清白蛋白BSA室温封闭1.5 h。吸出封闭液，在玻片上滴加稀释好的一抗(Santa Cruz公司，美国)30 μL，4 ℃冰箱孵育过夜。次日，避光条件下在盖玻片上滴加二抗(博士德公司，武汉)30 μL，DAPI(Roche公司，瑞士)染核10 min，取载玻片，滴少量抗荧光淬灭封闭剂。完成后激光共聚焦显微镜下观察。每张玻片选5个不同的视野拍照，并计算荧光强度平均值。共聚焦显微镜离线影像浏览软件ZEN 2009 Light Edition导出图片。

1.3 大鼠牙槽骨吸收模型建立

选用30只清洁二级，8周龄SD大鼠，雄性，体质量(200±20) g(购自浙江大学实验动物中心)，浙江大学附属第二医院动物中心常规饲养；参照唐琪[6]的方法，在SD大鼠的左上第1磨牙颊侧正中龈下注射含20 g/L的大肠杆菌内毒素(Escherichia coli lipopolysaccharide, E-LPS)的生理盐水50 μL作为实验组，右侧相同位置注射等量生理盐水作为对照组。间隔48 h注射1次，共注射4次。分别于LPS注射停止后1、4、8、12、16、20、25、30、35、40 d($n=3$)乙醚麻醉，颈椎脱位处死大鼠，取上颌牙体牙周组织联合标本，常规制作组织切片。

1.4 抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色

左、右上颌牙体牙周组织联合标本以10%乙二胺四乙酸EDTA(上海生工，上海)4℃脱钙20~30 d后脱水、石蜡包埋。将组织蜡块做颊、舌向连续切片，5 μm厚，以第一磨牙牙冠及两个牙根出现为标志开始收集组织切片。每个标本取3张切片，常规脱蜡水化，按TRAP检测试剂盒(Sigma公司，美国)步骤操作。

1.5 破骨细胞计数

活性破骨细胞鉴定标准：细胞质红色，细胞核蓝色，胞体与牙槽骨表面直接接触[6]。在100倍倒置相差显微镜下计数牙体牙周联合标本，根周围固有牙槽骨表面的活性破骨细胞个数，计数重复3次。

1.6 大鼠牙槽骨吸收动物模型中OPG、RANKL、RANK的检测

牙体牙周联合标本制作石蜡切片后，脱蜡水化，EDTA抗原修复，内源性过氧化酶阻断，5%牛血清白蛋白BSA封闭，分别加入稀释好的一抗(Santa Cruz公司，美国)浓度为1∶100效价，室温孵育2 h后，加二抗，DAB显色液(迈新生物技术公司，福州)显色，苏木精复染，常规脱水，中性树脂封片。生物摄像显微镜/数码相机(德国，Carl-zeiss Axiostar plus型/佳能powershot G10)观察，摄片。以PBS代替一抗作空白对照，步骤同上述各步。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析，所得数据以$\bar{x}\pm s$表示。计量资料经方差齐性检验方差齐后，实验组间采用单因素方差分析进行比较，实验组与对应阴性对照组组间两两比较采用t检验。

2 结果

2.1 免疫荧光OPG、RANKL、RANK检测结果

RAW264.7细胞在M-CSF和RANKL诱导下第7、10天可见多核巨细胞(图1)，第7、10天实验组RANK的平均荧光强

度为(76.311±16.457)、(81.281±16.063),对照组 RANK 的平均荧光强度为(63.079±10.432)、(65.321±1.746),差异不显著($P>0.05$)。因此,RAW264.7 细胞分化为成熟破骨细胞前后 RANK 表达无明显变化。破骨细胞骨吸收上清作用第 7 天后,实验组 MC3T3-E1 细胞表面表达的 OPG 平均荧光强度高于对照组($P<0.01$)(图 2、表 1),而 RANKL 蛋白平均荧光强度值低于对照组($P<0.01$)(图 3、表 1),OPG/RANKL 比值高于对照组($P<0.05$);上清作用第 10 天后,实验组的 RANKL 蛋白平均荧光强度值低于对照组($P<0.05$),OPG/RANKL 比值高于对照组($P<0.05$)(表 1)。

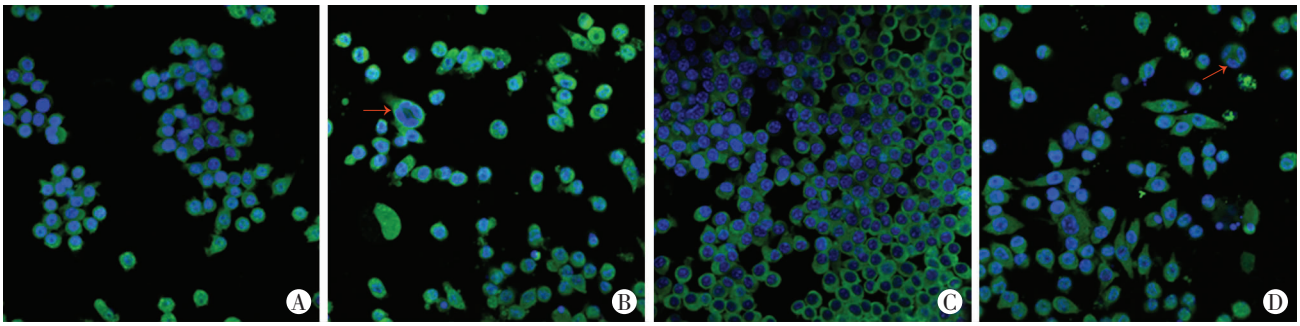
2.2 实验性牙槽骨吸收动物模型的建立

牙体牙周组织联合标本常规制作组织切片,并进行 TRAP 染色。观察结果发现各实验组均可见大量细胞质红染,内有棕黄色颗粒,核蓝、多核的破骨细胞,骨吸收陷窝牙槽骨缘亦可见红染。镜下 20 d 组破骨细胞数及骨吸收活动比 1、4、12、30 d 组明显(图 4B~F)。对照组未见明显异常或阳性染色,实验组 TRAP 破骨细胞计数明显高于对照组;在 E-LPS 注射后第 20 天时破骨细胞数量最多,明显高于其他各组;20 d 后破骨细胞数量开始减少(表 2)。

表 1 破骨细胞共培养上清液作用后各组小鼠 MC3T3-E1 细胞的 OPG 和 RANKL 荧光强度比较 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

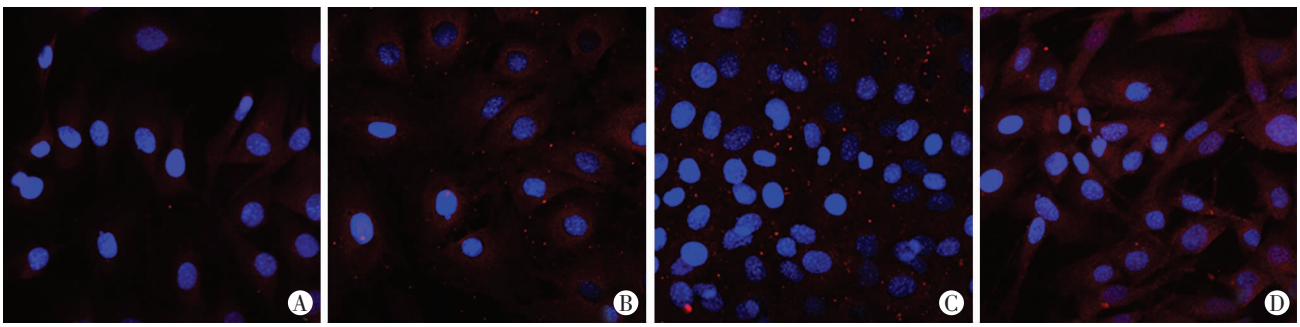
组别	OPG		RANKL		OPG/RANKL	
	7 d	10 d	7 d	10 d	7 d	10 d
对照组	15.568±1.229	16.171±1.764	18.082±2.732	17.594±4.738	0.877±0.166	0.916±0.248
实验组	29.636±5.652[b]	19.796±2.927	6.806±1.738[b]	8.861±3.814[a]	4.571±1.326[a]	2.560±1.153[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较



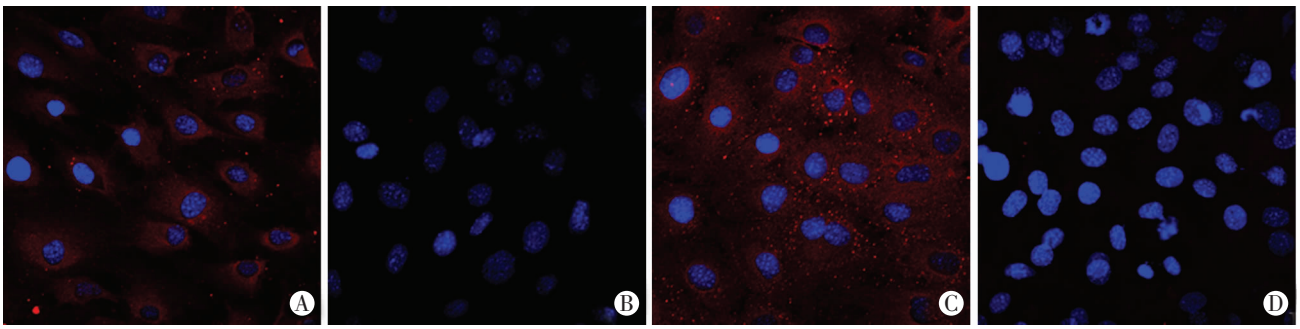
A、C:分别为对照组细胞培养第 7、10 天;B、D:分别为实验组细胞经 M-CSF 和 RANKL 诱导第 7、10 天(↑:示多核巨细胞;绿色示 FITC 标记 RANK,蓝色示 DAPI 标记细胞核)

图 1 免疫荧光检测各组小鼠 RAW264.7 细胞 RANK 的表达 (FITC ×400)



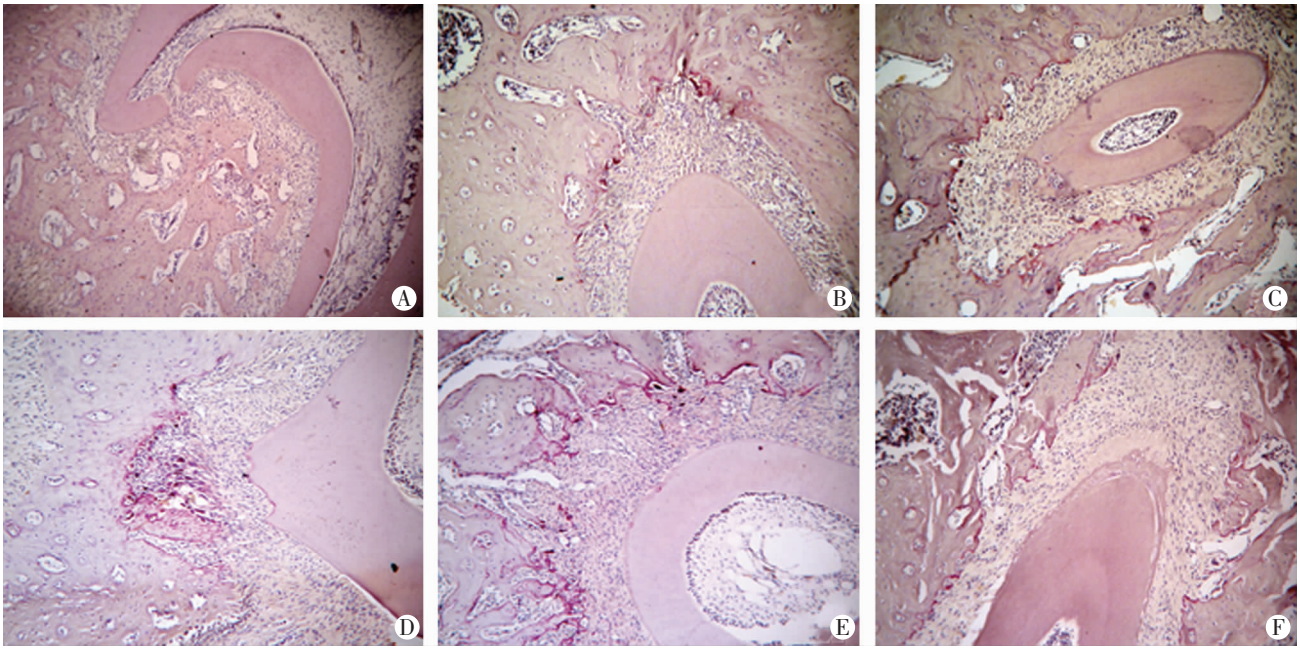
A、C:分别为对照组细胞培养第 7、10 天;B、D:分别为实验组细胞加破骨细胞吸收上清作用第 7、10 天(红色示 PE 标记 OPG,蓝色示 DAPI 标记细胞核)

图 2 免疫荧光检测各组小鼠 MC3T3-E1 细胞 OPG 的表达 (PE ×400)



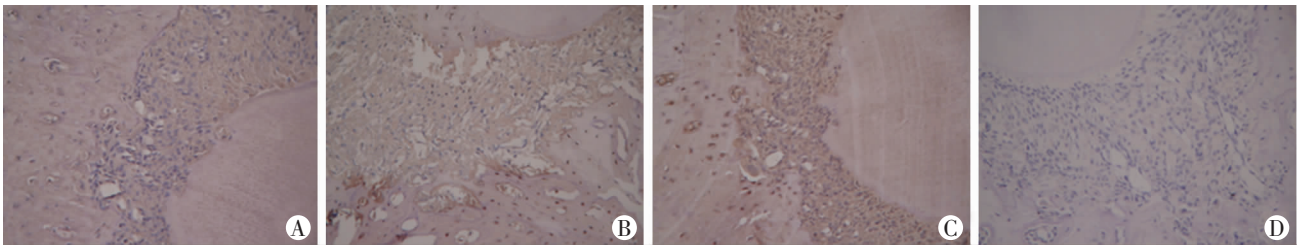
A、C:分别为对照组细胞培养第 7、10 天;B、D:分别为实验组细胞加破骨细胞吸收上清作用第 7、10 天(红色示 SABC-Cy3 标记 RANKL,蓝色示 DAPI 标记细胞核)

图 3 免疫荧光检测各组小鼠 MC3T3-E1 细胞 RANKL 的表达 (SABC ×400)



A:对照组;B~F:分别为实验1、4、12、20、30 d组

图4 各组SD大鼠牙体牙周组织联合标本组织学观察结果 (TRAP ×200)



A:实验组OPG;B:实验组RANK;C:实验组RANKL;D:PBS为一抗的空白对照

图5 免疫组化检测各组SD大鼠牙体牙周联合标本中OPG、RANK、RANKL的表达 (S-P ×200)

2.3 实验性大鼠牙槽骨模型吸收-重建规律

牙槽骨吸收过程中各时间段牙槽骨吸收陷窝及破骨细胞数量等表征破骨活动存在一定规律(表2)。注射部位牙槽骨即可出现明显的破骨细胞聚集及牙槽骨吸收(图4),随着时间的推移,破骨活动增加,在注射停止后20 d内,牙槽骨的骨吸收作用、破骨活动呈现上升趋势。20 d后破骨细胞数目逐渐减少。

表2 各组大鼠牙槽骨吸收模型吸收-重建过程破骨细胞计数结果

(个,$n=9$,$\bar{x}\pm s$)

时间	实验组	对照组
1 d	6.50 ± 1.29^{ab}	0.20 ± 0.45
4 d	6.33 ± 0.58^{ab}	0.33 ± 0.58
8 d	7.38 ± 1.49^{ab}	0.33 ± 0.58
12 d	9.00 ± 2.65^{ab}	0.67 ± 0.58
16 d	9.75 ± 0.96^{ab}	0.60 ± 0.55
20 d	11.55 ± 2.22^{a}	0.67 ± 0.58
25 d	8.50 ± 1.85^{ab}	0.58 ± 0.55
30 d	6.55 ± 2.65^{ab}	0.40 ± 0.55
35 d	2.67 ± 1.16^{ab}	0.75 ± 0.50
40 d	1.67 ± 1.53^{ab}	0.65 ± 0.50

a:$P<0.05$,与对照组比较; b:$P<0.05$,与20 d组比较

2.4 牙槽骨吸收模型中OPG、RANKL、RANK的表达

大鼠牙周组织可见广泛表达的OPG蛋白阳性颗粒(棕色),与无骨吸收区域比较在牙槽骨吸收区域OPG表达较少(图5A);RANK在牙周组织中有广泛表达(棕色颗粒),但在牙槽骨吸收区域、破骨细胞表面RANK表达量明显增加,染色极深(图5B);骨吸收区域成骨细胞RANKL特征性高表达(图5C)。

3 讨论

已知OPG是TNF受体超家族成员,是一种缺乏疏水跨膜序列的可溶性分泌型糖蛋白;RANKL属于TNF配体超家族成员,是骨保护素配体,通过与破骨前体细胞膜上的RANK结合可促进破骨细胞分化抑制其凋亡[7]。OPG可竞争结合RANK,阻断RANKL与RANK作用,从而抑制破骨细胞分化和骨吸收功能[8]。大量研究[7-9]证实,OPG/RANKL/RANK系统是破骨细胞分化成熟的主要调节机制。本研究中我们利用前期实验,通过诱导RAW264.7与牛股骨骨膜片共培养成功建立了骨吸收体外细胞模型[3],收集骨吸收上清液,作用于成骨样细胞MC3T3-E1,细胞免疫荧光结果显示该细胞在破骨细胞骨吸收上清的处理下,第7天和

第10天RANKL的表达均被抑制,第7天OPG的表达上调,尽管第10天OPG表达与对照组相比差异无统计学意义,但是第7天和第10天OPG/RANKL的比值均是上调的。有研究表明在骨重建的调节中许多上游的系统和局部激素和因子,在破骨细胞表面缺乏相应的受体,它们最终通过影响下游细胞因子RANKL或OPG的表达来调节OPG/RANKL的比例,从而调控骨代谢[9]。例如色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor PEDF)[10]、脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)[11]能通过促进OPG的表达抑制RANKL的表达,上调OPG/RANKL的比值,从而促进成骨。相反的白细胞介素-17(IL-17)[12]、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factorα, TNF-α)[13]、甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)[14]等可通过促进RANKL的表达,来促进破骨细胞的分化和功能。由此推测破骨细胞骨吸收过程中可能产生某些因子能通过影响成骨细胞的分化和功能来改变OPG/RANKL的比值从而调控骨偶联过程。在体内,这一调节,可能使骨吸收向骨形成的方向转变,使吸收的骨陷窝重新形成新骨。

牙周炎动物模型在人牙周炎基础和临床研究中有十分重要的作用。牙周病原菌产生的LPS是引起牙槽骨吸收的主要因子,可直接和间接导致牙槽骨吸收[15]。大肠杆菌的E-LPS与牙周主要致病菌牙龈卟啉单胞菌的LPS同属脂多糖类,致病性相似,且市场上有成品出售,适合用于制备牙槽骨吸收动物模型。本研究参照唐琪等[16]的方法,采用大肠杆菌E-LPS局部注射于大鼠龈下建立牙槽骨吸收动物模型。结果显示:采用E-LPS龈下局部注射可以建立有效且持久的牙槽骨吸收模型;完成四次注射后,注射部位牙槽骨即可出现明显的破骨细胞聚集及牙槽骨吸收,随着时间的推移,破骨活动增加,在注射停止后20 d内,破骨细胞数目及骨吸收活动呈上升趋势。20 d后破骨细胞数目逐渐下降,表明破骨活动减弱,提示骨重建的开始。免疫组化结果可见,实验大鼠在牙槽骨吸收活动活跃的区域,RANKL在成骨细胞及基质细胞中有表达,RANK在破骨细胞或破骨细胞前体细胞表面有表达,牙槽骨吸收区域OPG表达较无骨吸收区域有所降低。由此可见,OPG与RANKL的表达程度可作为衡量牙槽骨吸收活动严重情况的客观指标。即骨吸收活跃区域,成骨细胞表面高表达RANKL,破骨细胞或破骨前体细胞高表达RANK,RANKL与RANK结合激活破骨细胞活化,从而活跃破骨活动。同时,OPG表达减少,说明成骨活动受到抑制。这也证实了OPG/RANKL/RANK系统在牙槽骨吸收机制中起到重要的作用。

综上所述,通过调节机体的OPG/RANKL/RANK系统,进而调控牙周局部骨组织的代谢,为控制牙槽骨吸收和提高牙周修复再生的治疗效果、研制牙周炎防治新药提供了新的研究途径。

参考文献:

[1] Yonezawa T, Hasegawa S, Asai M, *et al*. Harmine, a β-carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption *in vitro* and *in vivo*[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 650(2/3): 511-518.

[2] 孟焕新. 牙周病学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 100-109.

[3] 陈莉丽, 王凯, 章洁, 等. 破骨细胞骨吸收上清液对成骨活动影响的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2012, 47(1): 32-37.

[4] Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, *et al*. TRAF family member-associated NF-κB activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation [J]. J Biol Chem, 2012, 287(34): 29114-29124.

[5] Hou J M, Xue Y, Lin Q M. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats *via* OPG/RANKL/RANK pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(10): 1277-1284.

[6] Umezu A, Kaneko N, Toyama Y, *et al*. Appearance of osteoelasts by injections of lipoposaccharides in rat periodontal tissue [J]. J Periedontal Res, 1989, 24(6): 378-383.

[7] 叶超群, 纪树荣, 钟兴明. RANKL-RANK-OPG骨调节轴[J]. 首都体育学院学报, 2006, 18(6): 61-64.

[8] Crotti T, Smith M D, Hirsch R, *et al*. Receptor activator NF KappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis[J]. J Periodontal Res, 2003, 38(4): 380-387.

[9] Hofbauer L C, Heufelder A E. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases[J]. Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(7): 2355-2363.

[10] Akiyama T, Dass C R, Shinoda Y, *et al*. PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 789-794.

[11] Wang Y D, Wang L, Li D J, *et al*. Dehydroepiandrosterone inhibited the bone resorption through the upregulation of OPG/RANKL[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(1): 41-45.

[12] Van-Bezooijen R L, Papapoulos S E, Lowik C W. Effect of interleukin-17 on nitric oxide production and osteoclastic bone resorption: is there dependency on nuclear factor-kappaB and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK)/RANK ligand signaling? [J]. Bone, 2001, 28(4): 378-386.

[13] Trouvin A P, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss [J]. Clin Interv Aging, 2010(5): 345-354.

[14] Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, *et al*. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population [J]. Bone, 2003, 32(6): 681-686.

[15] Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, *et al*. Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis [J]. J Pharmacol Sci, 2012, 119(4): 390-394.

[16] 唐琪, 王仁飞, 陈莉丽. 实验性牙槽骨吸收动物模型的建立[J]. 浙江实用医学, 2008, 13(1): 11-12, 25.

(**收稿**:2012-10-20;**修回**:2012-11-20)

(编辑 栾 嘉)