DOI:10.16016/j.1000-5404.201607092

钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱδ RNA干扰对下游基因表达及破骨细胞分化的影响

刘娟娟[1],董 伟[1],戚孟春[1],冯晓洁[1],李 任[1],孙 红[2] (063000 河北 唐山,华北理工大学:口腔医学院口腔颌面外科教研室[1],基础医学院病理学教研室[2])

[**摘要**] **目的** 研究钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱδ(Ca^{2+}/Calmodulin dependent kinase Ⅱδ,CaMKⅡδ) RNA干扰对下游基因表达及破骨细胞分化的影响,以证实其在破骨细胞分化中的作用。**方法** 应用慢病毒构建CaMKⅡδ RNA干扰载体,并确定最佳感染复数(multiplicity of infection,MOI)值及转染效率。小鼠RAW264.7细胞分为对照组、空白载体组和干扰组。转染5 d后收获细胞,确定干扰效率;并检测RNA干扰对活化T细胞核因子蛋白c1(NFATc1)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、非受体酪氨酸激酶(c-Src)基因表达及破骨细胞分化的影响。**结果** 成功构建了CaMKⅡδ RNA干扰载体,最佳转染MOI值为30,转染效率可达78%($P<0.05$)。重组病毒对CaMKⅡδ的干扰效率在mRNA水平超过78%,在蛋白水平超过70%($P<0.01$)。CaMKⅡδ RNA干扰显著降低NFATc1、TRAP和c-Src基因,与对照组、空白载体组比较,其mRNA水平下降分别超过了47.8%、43.3% 和48.5%($P<0.05$,$P<0.01$),蛋白相对水平分别超过了61.1%、48.2%和39.6%%($P<0.01$);免疫荧光细胞化学检测也得到相似结果。CaMKⅡδ RNA干扰也显著降低了破骨细胞生成及骨吸收功能;与其他两组比较,干扰组破骨细胞数、牙本质吸收陷窝数目和面积下降分别超过了49.8%、47.6%和61.3%($P<0.01$)。**结论** CaMKⅡδ RNA干扰可显著下调其下游NFATc1、TRAP、c-Src基因表达并抑制破骨细胞分化;CaMKⅡδ在破骨细胞分化中可能发挥关键调控作用。

[**关键词**] 破骨细胞;钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱδ;RNA干扰;活化T细胞核因子蛋白c1;抗酒石酸酸性磷酸酶;非受体酪氨酸激酶

[**中图法分类号**] R322.71; R329.2; R394.2 [**文献标志码**] A

Influence of CaMKⅡδ RNA interference on expression of its downstream molecules and osteoclast differentiation

Liu Juanjuan[1], Dong Wei[1], Qi Mengchun[1], Feng Xiaojie[1], Li Ren[1], Sun Hong[2] ([1]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, [2]Department of Pathology, College of Basic Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of Ca^{2+}/Calmodulin dependent kinase Ⅱδ (CaMKⅡδ) RNA interference on the gene expression of downstream genes and osteoclast differentiation in order to elucidate its role in the differentiation. **Methods** Lentivirus plasmids of recombinant CaMKⅡδRNA interference were constructed, and the best multiplicity of infection (MOI) value and transfection efficiency was determined. Mouse RAW264.7 cells were divided into 3 groups: control group, blank vector group and interference group. In 5 d after virus transfection, the cells were harvested and interference efficiency was determined. Then the effects of CaMKⅡδ RNA interference on the expression of nuclear factor of activated T cells type c1 (NFATc1), tartrate-resistant acid phosphotase (TRAP) and non-receptor tyrosine kinase (also known as SRC proto-oncogene, c-Src), and on osteoclast differentiation were determined. **Results** CaMKⅡ

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81270965);河北省教育厅重点项目(ZD2015005)

[**通信作者**] 戚孟春,电话:(0315)3721508,E-mail:qimengchun@163.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160926.0918.008.html

δ RNA interference vector was constructed successfully, with the best MOI value of 30, and transfection efficiency up to 78% ($P<0.05$). The interference efficiency was larger than 78% at mRNA level and 70% at protein level ($P<0.01$). CaMKⅡδ RNA interference significantly decreased the gene expression levels of NFATc1, TRAP and c-Src by 47.8%, 43.3% and 48.5% respectively at mRNA level ($P<0.01$, $P<0.05$), and by 61.1%, 48.2% and 39.6%, respectively at protein level ($P<0.01$), when compared with the other 2 groups. Immunofluorescent cytochemistry obtained similar results. CaMKⅡδ RNA interference also obviouisly decreased osteoclast formation and bone absorption. Compared with the other 2 groups, the number of osteoclasts, and the number and size of absorbed lacunae were reduced by more than 49.8%, 47.6% and 61.3% respectively ($P<0.01$) in the interference group. **Conclusion** CaMKⅡδ RNA interference significantly down-regulates the expression of NFATc1, TRAP and c-Src and inhibits osteoclast differentiation. CaMKⅡδ may play a key role in the process of osteoclast differentiation.

[**Key words**] osteoclasts; Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase Ⅱ delta; RNA interference; nuclear factor of activated T cells type c1; tartrate-resistant acid phosphotase; non-receptor tyrosine kinase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270965) and the Key Project of Hebei Provincial Department of Education (ZD2015005). Corresponding author: Qi Mengchun, Tel: 86-315-3721508, E-mail: qimengchun@163.com

破骨细胞(osteoclast)在牙周炎、骨质疏松、骨肿瘤等许多疾病的骨破坏中发挥着关键作用[1-2]。Ca^{2+}/calmodulin/NFATc1 信号通路对破骨细胞分化至关重要,而钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(Ca^{2+}/Calmodulin dependent kinase Ⅱ,CaMKⅡ)是其中 Ca^{2+} 信号传递的关键分子[3-5]。活化 T 细胞核因子蛋白 c1(nuclear factor of activated T cells type c1,NFATc1)作为破骨细胞重要调节因子,参与许多破骨细胞特异性基因(如 cathepsin K、TRAP、integrinβ3、c-Src)表达的调控。国外学者研究表明,在 CaMKⅡα、β、γ、δ 4 个异构体中,异构体 δ 在破骨细胞分化中表达最高[6],提示其在破骨细胞分化中可能扮演关键角色,但其发挥的作用及可能的分子机制目前尚不清楚。本研究通过对 CaMKⅡδ 进行 RNA 干扰,探索其对下游相关基因表达及破骨细胞分化的影响,以证实 CaMKⅡδ 在破骨细胞分化中的关键作用,揭示破骨细胞分化的分子调控机制,为骨过度吸收性疾病的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

核因子-κB 受体激活因子配体(receptor activatior of nuclear factor kappa B ligand, RANKL),美国 Biovision 公司;小鼠 RAW264.7 细胞株,北京军事医学科学院;α-MEM 培养基,中国四季青公司;兔抗鼠 CaMKⅡδ、NFATc1、TRAP、c-Src 多克隆抗体及 β-actin 单克隆抗,美国 Santa Cruz 公司;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒、异硫氰酸荧光素(FITC)、碘化丙啶(PI),美国 Sigma 公司;PCR 引物,上海生工;激光聚焦显微镜(LSCM),日本 Olympus 公司;PCR 扩增仪,美国 PERKIN ELMER;Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪,美国 Gene company limited。

1.2 CaMKⅡδ 干扰载体构建及转染效率测定

根据 GenBank 数据库 CaMKⅡδ(NM-00102543 8)基因序列并参考文献[7],确定干扰靶点为 5′-TTCTG-GAGAAAGATACCCAGGTGTG-3′;将合成的干扰序列与慢病毒载体 pGCSIL-GFP(green fluorescent protein)连接形成重组干扰载体,并与辅助载体 pHelper 2.0 共转染 293T 细胞进行包装;提取重组病毒液,-80 ℃储存备用。以上实验操作由上海吉凯基因公司完成。

应用包装好的重组病毒在感染复数(multiplicity of infection,MOI)值分别为 1、10、30、50 下转染小鼠 RAW264.7 细胞。转染 12 h 后更换新鲜培养基,转染 5 d 后激光共聚焦显微镜(LSCM)下观察;确定转染效率高、细胞状态好的最佳 MOI 值;并根据如下公式确定转染效率:GFP 阳性细胞数/所测细胞总数×100%。

1.3 实验分组

RAW264.7 细胞分为 3 组:对照组、空白载体组和干扰组。细胞接种 24 h 后分别应用空白载体及干扰载体进行转染,12 h 后更换含 50 μg/L RANKL 的 α-MEM 培养基,继续培养 5d 后收获细胞,进行相关检测。

1.4 干扰效率测定

1.4.1 Real-time PCR 检测 TRIzol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA;在 Rotor-Gene3000 荧光定量 PCR 仪上进行变性、退火、延伸;引物序列:CaMKⅡδ(409 bp),正义链 5′-CAGTGGAGCTGTCTGTCGTT-3′,

反义链 5′-GCAGACTACCACGCAACTCA-3′; β-actin (186 bp),正义链 5′-GTTG GAGCAAACATCCCCCA-3′,反义链 5′-CGCGA CCATCCTCCTCTTAG-3′。反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 15 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,40 cylces。分析软件 Rotor-Gene 处理后得数据,计算目的基因 mRNA 相对表达量,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.4.2 Western blot 检测 提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,加入上样缓冲液后,煮沸变性,蛋白上样后,凝胶电泳,转膜,室温封闭 1 h,一抗 4℃ 过夜,二抗 37℃孵育 2 h,ECL 显色仪上显色 1 min。用 Image-Pro Plus 分析软件检测膜上条带光密度值;每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.5 CaMKⅡδ RNA 干扰对 NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达的影响

1.5.1 免疫荧光化学检测 按 2×10^4 个/cm^2 密度接种细胞爬片,再分组处理(同实验 1.3)。细胞收获后,4% 多聚甲醛固定,0.4% 的 Triton X-100 PBS 室温孵育 15 min,多克隆抗体一抗 4 ℃过夜,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 为二抗,37 ℃避光孵育 90 min,碘化丙啶(PI)复染胞核,甘油封片,激光共聚焦显微镜观察,每组检测 3 个细胞爬片,实验重复 3 次。

1.5.2 Real-time PCR 检测 实验方法同 1.4,所用引物见表 1。

表 1 Real-time PCR 使用基因引物

GenBank 号	基因	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
NM_001164112.1	NFATc1	正义链: CTCACCACAGGGCTCACTATG 反义链: TTCTTCCTCCCGATGTCCGT	364
NM_006509946.1	TRAP	正义链: AGATTTGTGGCTGTGGGCGA 反义链: AAGTCAGCGCCCATCGTCTG	116
NM_006499067.2	c-SRc	正义链: ACTGTCACCTCCCCACAAAG 反义链: GACATTCCACCTTCCTCGTGT	154
NM_007393.3	β-actin	正义链: GTTGGAGCAAACATCCCCCA 反义链: CGCGACCATCCTCCTCTTAG	186

1.5.3 Western blot 检测 实验方法同 1.4。

1.6 破骨细胞生成及功能检测

1.6.1 TRAP 染色 按 2×10^4 个/cm^2 密度接种细胞爬片,再分组处理(同实验 1.3)。细胞收获后,按照 TRAP 染色试剂盒说明进行染色。光镜 200 倍下随机选取 6 个视野,计数 $TRAP^+$ 多核细胞数目(胞核≥3 个),取平均值[8]。每组检测 5 个细胞爬片。

1.6.2 骨吸收陷窝检测 用新鲜离体牙制备厚约 0.2mm 的牙本质磨片,高温高压灭菌,细胞接种密度为 2×10^4 个/cm^2,再分组处理(同实验 1.3)。细胞收获后,扫描电镜(SEM)观察,500 倍下每个磨片上选取 6 个视野,测量吸收陷窝总数目及总面积,取平均值,作为该磨片的吸收陷窝数目及面积[8]。每组检测 5 个牙本质磨片。

1.7 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析,计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示;两组间比较采用 LSD 法;检验水准设为 $\alpha=0.05$。

2 结果

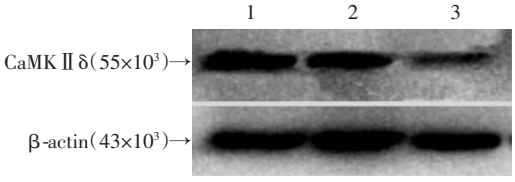
2.1 转染最佳 MOI 值及转染效率

重组干扰载体转染 RAW264.7 细胞 5d 后,当 MOI 值分别为 1、10、30、50 时,转染效率分别为 5.3%、43.6%、78.0% 和 89.4%;随着 MOI 值增加,转染效率逐步增加。MOI 值为 50 时,转染效率虽然最高,但部分细胞出现变形、脱落;故本实验最佳 MOI 值为 30,转染效率为 78.0%($P<0.05$)。

2.2 干扰效率测定

经 Real-time PCR 检测,对照组、空白载体组和干扰组 CaMKⅡδ mRNA 水平分别为(1.094±0.101)、(0.986±0.007)和(0.214±0.004);干扰组较前两组 mRNA 水平分别下降了 80.4% 和 78.3%;即干扰效率 >78%,满足实验要求。

经 Western blot 检测,3 组 CaMKⅡδ 蛋白条带见图 1。对照组、空白载体组和干扰组 CaMKⅡδ 蛋白相对水平(与 β-actin 的比值)分别为 1.052、1.016 和 0.300;干扰组蛋白表达较前两组分别下降了 71.5% 和 70.4%;即蛋白水平干扰效率 >70%,进一步印证 CaMKⅡδ RNA 干扰的有效性。

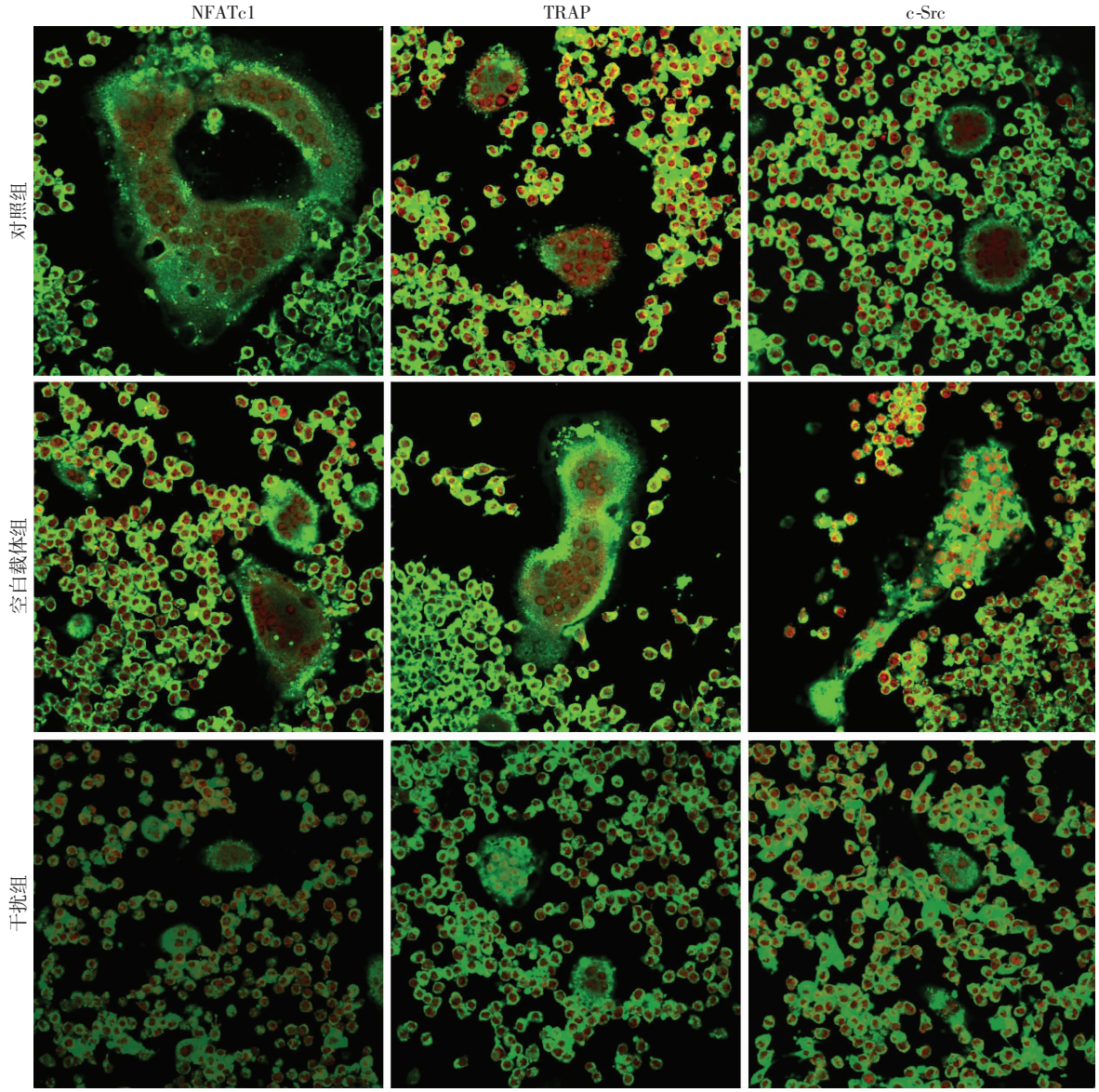


1:对照组;2:空白载体组;3:干扰组

图 1 Western blot 检测 3 组细胞中 CaMKⅡδ 蛋白表达

2.2 CaMKⅡδ RNA 干扰对下游因子 NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达的影响

2.2.1 经免疫荧光细胞化学检测 NFATc1、TRAP、c-Src 在对照组和空白载体组中均呈强阳性表达,而在干扰组中表达明显较弱(图 2)。上述结果说明,CaMKⅡδ RNA 干扰显著抑制了破骨细胞分化中 NFATc1、TRAP、c-Src 的蛋白表达。



FITC 标记靶蛋白(绿色);PI 标记细胞核(红色)

图 2　免疫荧光细胞化学检测 NFATc1、TRAP、c-Src 在 3 组破骨细胞中表达　(LSCM ×400)

2.2.2　Real-time PCR 检测　3 组细胞 NFATc1、TRAP、c-Src mRNA 水平差异有统计学意义($P<0.01$,表 2);其中干扰组 NFATc1、TRAP、c-Src 基因 mRNA 水平较对照组分别下降了 53.3%、49.1% 和 54.6%,较空白载体组分别下降了 47.8%、43.3% 和 48.5%。上述结果说明,CaMKⅡδ RNA 干扰显著下调了下游因子 NFATc1、TRAP、c-Src mRNA 水平。

表 2　3 组细胞 NFATc1、TRAP 和 c-Src mRNA 水平定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	NFATc1	TRAP	c-Src
对照组	1.101 ±0.104[a]	1.097 ±0.102[a]	1.114 ±0.120[a]
空白载体组	0.985 ±0.005[a]	0.984 ±0.004[a]	0.983 ±0.004[a]
干扰组	0.514 ±0.014	0.558 ±0.006	0.506 ±0.003

a:$P<0.01$,与干扰组比较

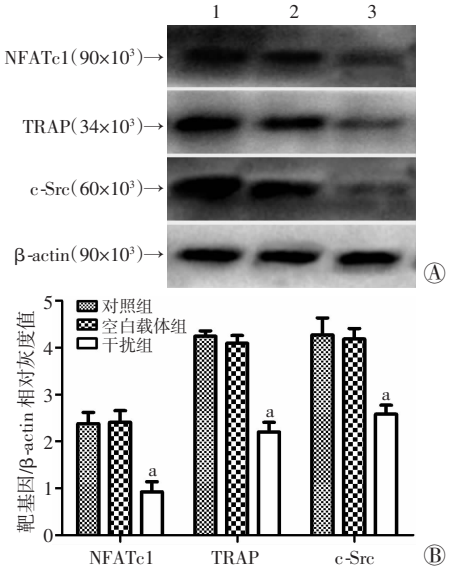
2.2.3　Western blot 检测　3 组细胞 NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白条带见图 3A。干扰组 NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白相对水平(与 β-actin 比值)显著低于前两组(图 3B);较对照组分别下降了 61.1%、48.2% 和 39.6%($P<0.01$),较空载载体组分别下降了 61.6%、46.3%、38.3%($P<0.01$);而对照组与空白载体组间则无统计学差异($P>0.05$)。上述结果提示,CaMKⅡδ RNA 干扰显著下调了破骨细胞分化中 NFATc1、TRAP、c-Src 的蛋白表达。

2.3　CaMKⅡδ RNA 干扰对破骨细胞分化和骨吸收的影响

经 TRAP 染色,3 组细胞均有 $TRAP^+$ 多核破骨细胞产生(图 4);但干扰组破骨细胞数目较对照组和空

白载体组显著减少($P<0.01$,表3),分别下降了52.8%和49.3%。上述结果提示,CaMKⅡδ RNA干扰显著抑制了破骨细胞分化。

扫描电镜观察,可见3组细胞均有牙本质吸收陷窝形成(图4);但干扰组牙本质吸收陷窝数目和面积较对照组和空白载体组显著减少($P<0.01$,表3),其中吸收陷窝数目分别下降了55.68%和53.3%,吸收陷窝面积分别下降了60.2%和57.7%。上述结果提示,CaMKⅡδ RNA干扰可显著抑制破骨细胞骨吸收功能。



A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果　1:对照组;2:空白载体组;3:干扰组　a:$P<0.01$,与对照组、空白载体组比较

图3　Western blot检测3组细胞NFATc1、TRAP、c-Src蛋白的表达

表3　3组破骨细胞计数及牙本质磨片吸收陷窝定量分析($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	破骨细胞数(个)	吸收陷窝计数(个)	吸收陷窝面积(μm^2)
对照组	31.3±3.2[a]	34.4±4.3[a]	10152.8±210.6[a]
空白载体组	28.6±1.5[a]	33.4±4.0[a]	10112.5±519.4[a]
干扰组	15.7±1.5	18.0±4.6	3928.4±115.5

a:$P<0.01$,与干扰组比较

3　讨论

破骨细胞生成相关信号通路研究近年来取得了许多进展,其中Ca^{2+}/Calmodulin /NFATc1信号通路的发现是一个重要突破[3-5,9]。CaMKⅡ是该信号通路中Ca^{2+}信号传递的关键分子。

CaMKⅡ有α、β、γ、δ 4个异构体。国外研究表明,异构体δ在破骨细胞分化中作用可能最为关键。Chang等[7]研究发现,在破骨细胞分化初期,CaMKⅡδ表达上升,其特异性siRNA可显著抑制破骨细胞生成。Yao等[6]研究也发现在4个异构体中,只有CaMKⅡδ在破骨细胞分化中呈高水平表达,且mRNA变化和蛋白相一致。本课题组前期研究也证实,CaMKⅡδ在破骨细胞形成的不同阶段呈时间依赖性持表达增强,其mRNA和蛋白表达趋势一致;因此推断CaMKⅡδ可能在破骨细胞分化信号调控中发挥着重要作用。

研究表明,CaMKⅡ与Ca^{2+}/Calmodulin结合后,获得两个特性[4]:(1)对Calmodulin的亲和力提高1000倍;(2)CaMKⅡ在无Calmodulin时仍具备部分酶的活性。因而,CaMKⅡ在破骨细胞分化过程中可能发

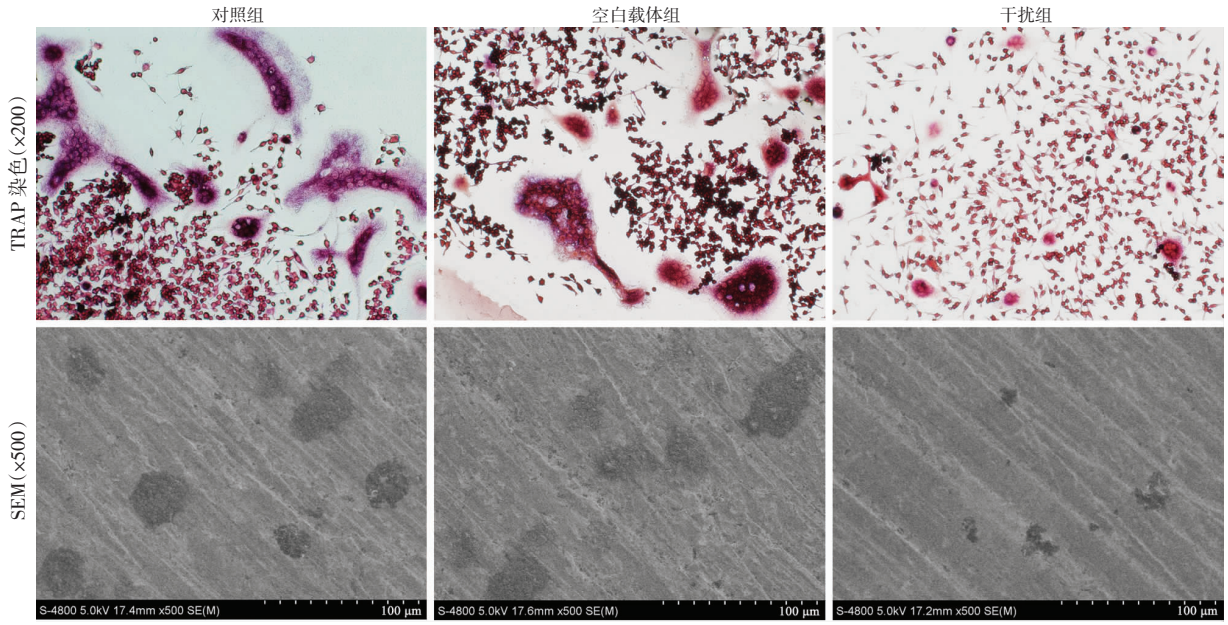


图4　3组破骨细胞生成及牙本质吸收陷窝检测结果

挥重要作用。本课题组前期研究发现,唑来膦酸可以时间依赖性抑制破骨细胞内 Ca^{2+} 震荡(oscillation),并下调 CaMKⅡ基因表达及蛋白活性[8];提示 CaMKⅡ参与了唑啉膦酸对破骨细胞分化的抑制。

CaMKⅡδ在破骨细胞分化中到底发挥怎样的作用,目前还知之甚少。为此,本实验采用 RNA 干扰技术,特异性沉默 CaMKⅡδ基因,以探讨其对破骨细胞生成的调控作用及涉及的下游信号分子。实验结果显示,CaMKⅡδ RAN 干扰可明显抑制破骨细胞生成及骨吸收功能,使破骨细胞生成下降超过了 49.8%,骨吸收陷窝数目下降超过了 47.6%。上述结果提示,CaMKⅡδ在破骨细胞分化调控中作用极为关键。

NFATc1 作为破骨细胞的主要调节基因,参与许多破骨细胞特异性基因表达的调控,包括 cathepsin K、TRAP、integrinβ3、c-Src、DC-STAMP(dendritic cell-specific transmembra-ne protein)、Atp6v0d2 等,对破骨细胞分化及骨吸收功能至关重要[3-4,9-10]。NFATc1 及上述基因表达异常会导致破骨细胞生成及功能严重障碍[11]。本研究发现,CaMKⅡδ RAN 干扰可显著降低破骨细胞分化中 NFATc1、TRAP、c-Src 蛋白和 mRNA 水平,从而说明 CaMKⅡδ对破骨细胞生成的抑制可能是通过调控 NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达来发挥作用。

然而,CaMKⅡδ是通过下游哪些信号分子来调控 NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达,从而影响破骨细胞生成的,目前尚存在争议。Chang 等[7]认为,CaMKⅡ与 CaMKⅣ一样[5],是通过 cAMP 反应元件结合蛋白信号通路来发挥作用;Yao 等[6]和 Park-Min 等[12]一致认为,CaMKⅡ是通过 MEK-ERK 信号通路来发挥作用。鉴于此,CaMKⅡδ下游信号调控通路,尚待进一步研究探讨。本研究证实,CaMKⅡδ RNA 干扰可有效抑制破骨细胞生成,并下调下游分子 NFATc1、TRAP、c-Src 基因表达;CaMKⅡδ可能通过影响上述基因表达发挥对破骨细胞分化的关键调控作用。

参考文献:

[1] Cho Y A, Jue S S, Bae W J, *et al*. PIN1 inhibition suppresses osteoclast differentiation and inflammatory responses[J]. J Dent Res, 2015, 94(2): 371-380. DOI: 10.1177/002203451456 3335

[2] Yavropoulou M P, Yovos J G. Osteoclastogenesis-current knowledge and future perspectives[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2008, 8(3): 204-216.

[3] Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca^{2+}-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation[J]. Immunol Rev, 2009, 231(1): 241-256. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00821.x

[4] Zhang L, McKenna M A, Said-Al-Naief N, *et al*. Osteoclastogenesis: the role of calcium and calmodulin[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2005, 15(1): 1-13. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.v15.i1.10

[5] Sato K, Suematsu A, Nakashima T, *et al*. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway[J]. Nat Med, 2006, 12(12): 1410-1416. DOI: 10.1038/nm1515

[6] Yao C H, Zhang P, Zhang L. Differential protein and mRNA expression of CaMKs during osteoclastogenesis and its functional implications[J]. Biochem Cell Biol, 2012, 90(4): 532-539. DOI: 10.1139/o2012-002

[7] Chang E J, Ha J, Huang H, *et al*. The JNK-dependent CaMK pathway restrains the reversion of committed cells during Osteoclast differentiation[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 15): 2555-2564. DOI: 10.1242/jcs.028217

[8] 李鹏, 林珏杉, 张鹏, 等. 唑来膦酸对破骨细胞分化中钙调蛋白和钙调蛋白依赖性激酶Ⅱ基因表达的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2013, 48(11): 694-698. DOI: 10.3760/cma.j.1ssn.1002-0098.2013.11.012

[9] Seales E C, Micoli K J, McDonald J M. Calmodulin is a critical regulator of osteoclast differentiation, function, and survival[J]. J Cell Biochem, 2006, 97(1): 45-55. DOI: 10.1002/jcb.20659

[10] Zhao Q, Wang X, Liu Y, *et al*. NFATc1: Functions in osteoclasts[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(5): 576-579. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.018

[11] Takayanagi H, Kim S, Koga T, *et al*. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts[J]. Dev Cell, 2002, 3(6): 889-901. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00369-6

[12] Park-Min K H, Ji J D, Antoniv T, *et al*. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression[J]. J Immunol, 2009, 183(4): 2444-2455. DOI: 10.4049/jimmunol.0804165

(**收稿**:2016-07-13;**修回**:2016-09-20)

(编辑 张 维)