

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0951-05

• 实验研究 •

流体剪切力对 5-氮杂胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的影响

邢宏力, 边云飞, 武卫东, 肖传实

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 流体剪切力; 5-氮杂胞苷; 骨髓间充质干细胞; 心肌样细胞

[摘要] 目的 观察 5-氮杂胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化, 并探讨流体剪切力对诱导过程的影响。方法 贴壁法从大鼠骨髓中分离骨髓间充质干细胞, 进行纯化传代培养, 取第 4 代骨髓间充质干细胞以 3、5、10、15 及 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷分别作用 12、24 及 48 h 用免疫荧光法鉴定分化的心肌样细胞 α -肌动蛋白表达率, 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 为最佳诱导浓度。通过建立流体剪切力模型, 设立以下四组: 不加载流体剪切力组、加载 5 dyn/cm^2 流体剪切力组、加载 15 dyn/cm^2 流体剪切力组和加载 25 dyn/cm^2 流体剪切力组, 作用 24 h 倒置显微镜观察诱导后骨髓间充质干细胞形态的变化, 4 周后逆转录聚合酶链反应测定分化的心肌样细胞心肌钙蛋白 I mRNA 的表达。结果 骨髓间充质干细胞随着传代逐渐变成梭形, 5-氮杂胞苷诱导后骨髓间充质干细胞胞体逐渐增大并伸出细长突起, 部分相邻细胞的突起连接成网, 形态学上表现出向心肌细胞方向转化的特征。免疫荧光显示 α -肌动蛋白表达阳性。经过流体剪切力作用细胞后, 心肌钙蛋白 I 的表达增高, 阳性条带均比未进行力学刺激的细胞表达明显, 以 15 dyn/cm^2 剪切力最明显。但是 25 dyn/cm^2 剪切力作用结果并没有随着力的增大而增大。结论 5-氮杂胞苷可以诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化, 5-氮杂胞苷可联合剪应力诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化, 且诱导效果优于单独使用 5-氮杂胞苷。

[中图分类号] R318

[文献标识码] A

Effect of Fluid Shear Stress on the Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocyte-Like Cells Induced by 5-Azacytidine

XING Hong-Li, BIAN Yun-Fei, WU Wei-Dong and XIAO Chuan-Shi

(Department of Cardiology, the Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Fluid Shear Stress, 5-Azacytidine, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Cardiomyocyte-Like Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of 5-azacytidine on the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) into cardiomyocyte-like cells and explore the role of fluid shear stress. **Methods** BMSC were isolated from rats marrow mononuclear cells by attaching growth. The 4th generation of BMSC were exposed to 3, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine for 12, 24 and 48 hours respectively. 10 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours as best induction concentration was established based on α -actin expression of cardiomyocyte-like cells after 3 weeks by immunofluorescence. The modes of BMSC were divided into four groups: no fluid shear stress group, load 5 dyn/cm^2 fluid shear stress group, load 15 dyn/cm^2 fluid shear stress group and load 25 dyn/cm^2 fluid shear stress group. After 24 hours, the morphology changes of BMSC was observed by inverted microscopy. RT-PCR was used to examine cTnI mRNA expression after 4 weeks later. **Results** BMSC gradually became spindle with the passage. 5-Azacytidine induced BMSC increases cell bodies and extended long thin processes, branching occurs at the protruding end, some of the processes connecting adjacent cells to form a network, showed morphological transformation to the direction of the characteristics of myocardial cells. α -actin was expressed by induction after 3 weeks. Through fluid shear stress mechanical stimulation, cTnI expression increased, positive bands was more significant than no fluid shear stress stimulation cells. It was the most obvious in 15 dyn/cm^2 fluid shear stress group. However, the change of 25 dyn/cm^2 fluid shear stress group was not increased at a positive correlation. **Conclusions** 5-Azacytidine can induce the differentiation of BMSC into cardiomyocyte-like cells. 5-Azacytidine combined with shear stress not only induce the differentiation of BMSC into cardiomyocyte-like cells, but also cause cell differentiation, which seems to have a better effect than only 5-azacytidine.

[收稿日期] 2010-09-28

[修回日期] 2010-12-09

[作者简介] 邢宏力, 硕士研究生。边云飞, 副教授。通讯作者肖传实, 教授, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail为 ganxibaozhongxi@ sina.com。

冠心病、风心病、心肌病等各种原因使心肌细胞数量相对或绝对减少,患者病死率增加。骨髓间充质干细胞(BMSC)在适当的刺激下可以分化为成骨细胞、脂肪细胞和心肌细胞^[1],但是干细胞向心肌细胞的诱导效率和细胞数量低。研究表明力学因素在细胞的生长、分化、迁移、基因表达、合成蛋白及其凋亡中发挥重要的作用^[2,3]。流体剪切力加载装置基本原理是利用流动的培养液对附着于培养基质上的细胞产生一定的剪切力。平行平板流动腔(PPFC)是最常用的一种流体剪切力加载装置,目前已成为人们研究离体细胞生物力学特性的重要方法之一。本研究主要探讨在适当的流体剪切力干预下能否使大鼠 BMSC 向心肌样细胞分化的能力增强,为干细胞移植治疗终末期心肌疾病提供基础理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

低糖 DMEM 培养基(Hyclone公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),5-氮杂胞苷(Sigma公司),兔抗鼠心肌 α -肌动蛋白和 RBITC 标记羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 流体剪切力加载装置的设计

有机玻璃板和硅胶垫(太原市煤炭化学研究所提供)、BT100-1F/YZ1515X 型蠕动泵以及聚四氟乙烯硅胶管(保定兰格恒流泵有限公司)。流体剪切力加载装置见图 1。本研究装置在 Frangos 等^[4,6]的研究基础上改良设计而成。根据所需剪切力大小,流动腔宽度、长度及高度分别为 80 mm、30 mm 及 3 mm,满足长度 \geq 高度,宽度 \geq 高度的条件。流动腔宽度过小会降低流室高宽之比,从而影响管壁效应。流动腔长度增加后,可增加细胞的附着数量,但会增加流动腔中液体的压差,导致所受流体剪切力不均匀。 $\tau = 6\eta Q / wh^2$ 式中: τ 为剪切力(dyn/cm^2), η 为循环液粘度(mPa), Q 为循环液流量(mL/min), w 为流室宽度(cm), h 为流室高度(cm)。实验中流动腔的尺寸 $w = 3 \text{ cm}$, $h = 0.3 \text{ cm}$,公式中 $\eta \leq 75 \text{ mPa}$ 由中国石化山西太原分公司测得。

1.3 骨髓间充质干细胞的分离、纯化及传代培养

用 10% 血清 MDM 培养基反复冲洗骨髓腔,200 目筛过滤杂质,以 2000 r/min 离心 10 min 弃上清,加入 3 mL 培养基将沉淀吹打均匀,按照 1:1 的体积沿着管壁加在 Percoll 分离界面上,以 2000 r/min 离心 15 min 吸出两层液面交界处细胞层,并

用 PBS 液洗涤 2 次后转入 50 mL 培养瓶,37℃,5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后首次换液,以后每 3 天换液一次。待细胞长至瓶底 80%,0.25% 胰蛋白酶 1:1 消化传代。

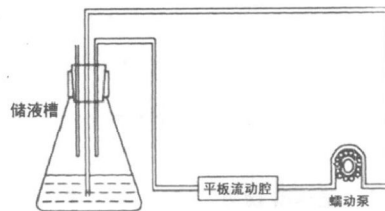


图 1 流体剪切力加载装置

1.4 免疫荧光检测 α -肌动蛋白的表达

取第 4 代 BMSC,接种于 12 孔板中,设 3、5、10、15 及 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 5-氮杂胞苷诱导,分别诱导干预 12 h、24 h 及 48 h 每个浓度下设 3 个复孔。根据上述诱导时间,移弃含有 5-氮杂胞苷的培养液,换入新的培养液进行培养。3 周后取出玻片置入湿盒中,滴加兔抗鼠心肌 α -肌动蛋白一抗,4℃过夜,PBS 充分冲洗,加入 RBITC 标记羊抗兔二抗,室温下避光孵育 30 min 。在倒置荧光显微镜下拍照,每孔随机取 3 个非重叠视野,在 200 倍视野下计数荧光激发下阳性细胞数和光镜下细胞总数,计算每孔的诱导率:诱导率 = 阳性细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。根据诱导率选择最佳诱导条件。

1.5 剪切力作用后细胞形态功能观察

将 4 代生长活跃的 BMSC 以 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 5-氮杂胞苷作用 24 h 后,再接种在已处理好的载玻片上置于 10% 胎牛血清低糖 DMEM 培养基中生长。超净台上将细胞载玻片置于平行平板流动腔中固定,然后平行平板流动腔、锥形瓶以及部分聚四氟乙烯管一同置于 37℃、5% CO_2 孵箱中。根据剪切力公式 $\tau = 6\eta Q / wh^2$,通过改变循环液的流量来改变剪切力的大小。设立四组:①不加载流体剪切力组;②加载 5 dyn/cm^2 流体剪切力组;③加载 15 dyn/cm^2 流体剪切力组;④加载 25 dyn/cm^2 流体剪切力组。作用 24 h 通过倒置显微镜观察流体剪切力诱导后 BMSC 形态变化,4 周后免疫荧光法鉴定心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 蛋白的阳性表达率。

1.6 RT-PCR 检测心肌肌钙蛋白 I 表达

4 周后用 RT-PCR 检测流体剪切力加载后 BMSC 和 5-氮杂胞苷独立作用的 BMSC 中 cTnI mRNA 的表达,以 GAPDH 为内参照。GAPDH 引物序列:

正义 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3', 反义 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3', 扩增产物 307 bp。cTnI 引物序列: 正义 5'-ACG TGG AAG CAA AAG TCA CC-3', 反义 5'-CCT CCT TCT TCA CCT GCT TG-3', 扩增产物 201 bp。反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。

1.7 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较以 LSD 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC 生长情况

原代培养 10 天时细胞呈扁平多角形, 成集落生长趋势。传代细胞逐渐伸展呈长梭形, 排列具有方向性。

2.2 诱导后细胞的形态学特点

5-氮杂胞苷诱导后细胞体积及细胞核增大, 伸出大小不同的突起, 类似于心肌样细胞生长 (图 2)。

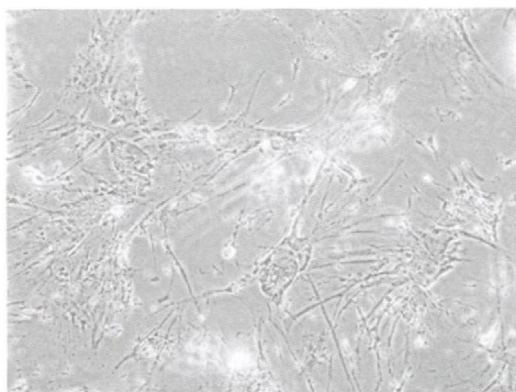


图 2 诱导后细胞的形态 ($\times 200$)

2.3 α -肌动蛋白的表达

第 4 代 BMSC 用 5-氮杂胞苷诱导后 α -肌动蛋白阳性表达 (图 3), 未用 5-氮杂胞苷诱导的 BMSC 均未见阳性细胞。20 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷诱导干预 12 h 后, 细胞几乎全部死亡。因此 20 $\mu\text{mol/L}$ 不计入统计范围。10 $\mu\text{mol/L}$ 诱导 24 h 的心肌样细胞转化率最高, 与其他组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 1)。

2.4 细胞受到流体剪切力后的形态学特点

细胞间隙增宽, 形态变长, 细胞沿流动腔长轴方向伸长, 随着力增大越发明显, 细胞排列接近平行或平行于力的方向。不同流体剪切力作用 4 周后, 免疫荧光鉴定 cTnI 阳性表达率, 各组间 cTnI 阳性表

达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 2 和图 4)。

表 1 不同浓度 5-氮杂胞苷诱导不同时间后 α -actin 的诱导率 ($\bar{x} \pm s$)

时间	3 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	15 $\mu\text{mol/L}$
12 h	0	1.455 \pm 0.121	8.977 \pm 0.421	3.703 \pm 0.318
24 h	0.039 \pm 0.045	4.319 \pm 0.271	40.493 \pm 1.630 ^a	5.011 \pm 0.166
48 h	0.006 \pm 0.003	0.982 \pm 0.215	9.504 \pm 0.135	1.580 \pm 0.418

a 为 $P < 0.01$ 与其他组比较。

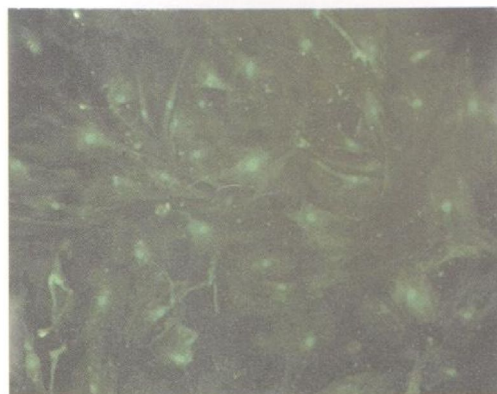


图 3 诱导后 α -肌动蛋白表达阳性 ($\times 200$)

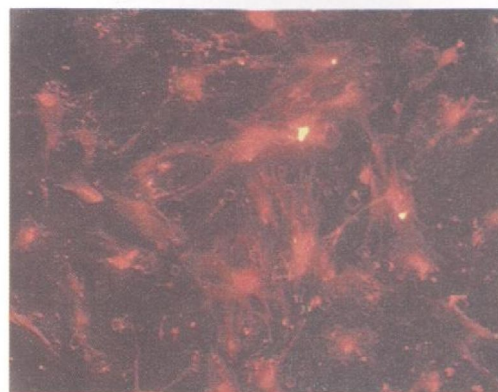


图 4 剪切力诱导后 cTnI 阳性表达 ($\times 200$)

表 2 不同剪切力作用 4 周 cTnI 的阳性表达率 ($\bar{x} \pm s$)

剪切力	cTnI 表达率
0 dyn/cm^2	30.466% \pm 1.492%
5 dyn/cm^2	35.182% \pm 1.310%
15 dyn/cm^2	42.190% \pm 1.892% ^a
25 dyn/cm^2	38.46% \pm 1.520%

a 为 $P < 0.05$ 与其他组比较。

2.5 cTnI mRNA 的表达

5-氮杂胞苷诱导后 4 周, 各组 cTnI 均有阳性表达, 但 5 dyn/cm^2 、15 dyn/cm^2 组阳性条带强于空白对照组, 其中 15 dyn/cm^2 组阳性条带最明显。表明经过 5-氮杂胞苷诱导后的 BMSC 经适当的流体剪切

力干预后可以促进其向心肌样细胞分化(图 5-7)。

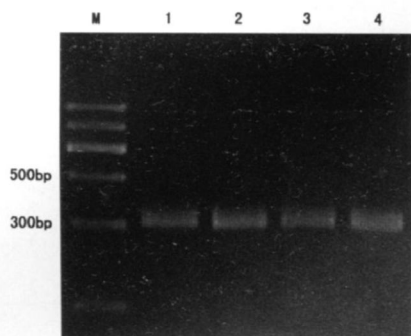


图 5. 干预后的细胞 GAPDH 阳性表达 M 为 marker, 1 为未加流体剪切力组, 2 为 5 dyn/cm² 流体剪切力组, 3 为 15 dyn/cm² 流体剪切力组, 4 为 25 dyn/cm² 流体剪切力组。

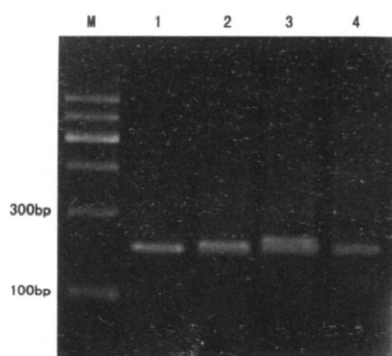


图 6. 干预后的细胞 cTnI 阳性表达 M 为 marker, 1 为未加流体剪切力组, 2 为 5 dyn/cm² 流体剪切力组, 3 为 15 dyn/cm² 流体剪切力组, 4 为 25 dyn/cm² 流体剪切力组。

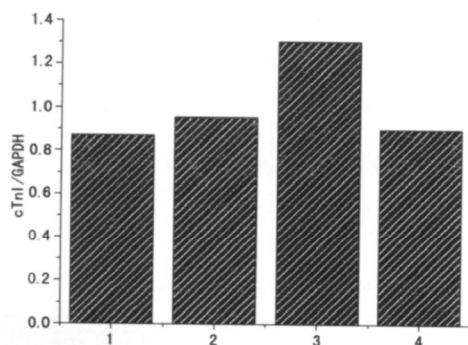


图 7. 各组光密度值比较 1 为未加流体剪切力组, 2 为 5 dyn/cm² 流体剪切力组, 3 为 15 dyn/cm² 流体剪切力组, 4 为 25 dyn/cm² 流体剪切力组。

3 讨论

冠心病、风心病、心肌病等各种原因使心肌细胞数量相对或绝对减少, 能有效获取替代心肌细胞的种子细胞尤为重要。BMSC 是骨髓细胞培养时的贴壁细胞, 具有多能性, 体内外均可向多种组织细胞分化。间质干细胞移植给人体或动物时具有很好的免疫耐受性, 在组织中的分化与局部微环境有

关^[7]。BMSC 具有容易分离培养、多向分化能力^[8]、免疫排斥反应小^[9]的特点, 是组织工程常用种子细胞。BMSC 在适当的刺激下可以分化为成骨细胞、脂肪细胞和心肌细胞。虽可成功诱导 BMSC 向心肌细胞分化, 质和量都不能和体内相比。目前体外用于 BMSC 向心肌细胞分化的化学试剂主要是 5-氮杂胞苷, 是一种嘧啶类去甲基化化疗药物, 有一定的细胞毒性。已有研究报道 5-氮杂胞苷可以诱导 BMSC 分化为心肌细胞^[10]。Rangappa 等^[11]利用 5-氮杂胞苷诱导 BMSC 向心肌细胞分化, 3 周后发现诱导后的细胞出现了自发性搏动。本研究中, 免疫荧光显示 cTnI α 肌动蛋白呈阳性表达, 但是诱导的细胞没有观察到自发性搏动, 可能由于心肌搏动需要复杂的电生理和特定的内环境。我们将在下一步研究中模拟心肌细胞微环境, 比如给予剪切力刺激, 并检测更多的功能性指标来观察诱导后心肌细胞的功能是否可以完全替代正常心肌细胞。经过 5-氮杂胞苷诱导的心肌细胞有一定的功能。但是否分化为具有生理功能的心肌细胞, 尚需进一步研究。本研究根据 5-氮杂胞苷的不同作用时间和浓度来设定实验分组。根据倒置相差显微镜和荧光显微镜显示, 3 μ mol/L 5-氮杂胞苷诱导后, 细胞形态几乎无改变, 免疫荧光为阴性; 20 μ mol/L 5-氮杂胞苷诱导细胞 12 h 后, 细胞几乎全部死亡。根据本研究结果, 10 μ mol/L 诱导干预 24 h 为最佳条件。大多数学者认为间充质干细胞基因序列中的肌源性调控因子被甲基化, 5-氮杂胞苷的去甲基化作用使该区域去甲基化, 从而启动了干细胞向心肌细胞分化^[12]。A tchley 等^[13]发现, 在用 5-氮杂胞苷诱导一周后, 发现有 MyoD1 表达, 该基因是干细胞向肌细胞分化的启动因子。目前已有的研究显示力学因素在细胞的生长、分化、迁移、基因表达、合成蛋白和凋亡中发挥重要的作用^[2, 3]。干细胞是一种力学敏感性细胞, 流体剪切力对间充质干细胞的生长、分化起重要的作用^[14], 在流体剪切力的作用下, BMSC 分化为内皮细胞的效果就更为明显^[15]。外力刺激细胞或组织引起的相关变化是通过一定的途径, 把细胞外力学刺激信号转移至细胞内, 从而引起相关的基因表达改变。常见的途径主要包括: 细胞外基质-跨膜整合素-细胞骨架、细胞膜蛋白、氧自由基途径等。整合素也可作用于中间丝, 中间丝可以将力学信号传向细胞核, 使细胞核形态发生变化, 这种变化可能是造成基因表达改变的机制之一^[16]。Riddle 等^[17]利用流体切应力对间充质干细胞干预时, 发现胞内钙离子浓度与流体振动频率呈正相关。因此剪应力可能

成为一种诱导 BMSC 向心肌样细胞分化的新方法,但采用外加的流体剪切力,模拟体内的流体切应力,未见文献报道。

本研究通过密度梯度离心后贴壁培养获取 BMSC,利用平行平板流动腔最常用的一种流体剪切力加载装置,取第 4 代 BMSC 以 $10 \mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷作用 24 h,分别加载 5 dyn/cm^2 、 15 dyn/cm^2 、 25 dyn/cm^2 的流体剪切力作用 24 h,细胞胞体增大,胞核明显,细胞伸展方向与流动方向大致平行,同时发现随着剪切力的增大,细胞密度降低,提示剪切力越大,细胞脱落越严重。5-氮杂胞苷与流体剪切力联合作用后, cTnI 的表达增强,阳性条带均比单独应用 5-氮杂胞苷的细胞表达明显,以 15 dyn/cm^2 流体剪切力最明显。但是 25 dyn/cm^2 流体剪切力的结果并没有随着力的增大而呈正相关变化,推测可能是过大的力学刺激引发细胞骨架断裂^[18]、细胞毒性^[19]有关。

综上所述,本研究通过密度梯度离心后贴壁培养获取 BMSC,在 5-氮杂胞苷诱导的同时以剪应力装置平行平板流动腔对 BMSC 施加剪应力,通过对心肌样细胞标记物及基因的鉴定,证明 5-氮杂胞苷可与不同大小的剪应力联合诱导 BMSC 向心肌样细胞分化,为临床干细胞应用和组织工程学提供基础实验依据。

[参考文献]

- [1] Taigen T, DeW indt LJ, Lin HW. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000 **97** (3): 1 196-201.
- [2] Friedl G, Schmidt H, Rehak I et al. Undifferentiated human mesenchymal stem cells are highly sensitive to mechanical strain transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007 **15** (11): 1 293-300.
- [3] 崔晓萍, 应大君, 李黔宁. 流体剪切力调节内皮细胞组织因子表达的初步探讨 [J]. *医用生物力学*, 2005 **20** (4): 212-215.
- [4] Huo B, Lu XL, Hung CT, et al. Fluid flow induced calcium response in bone cell network [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2008 **1** (1): 58-66.
- [5] Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1988 **32** (8): 1 053-060.
- [6] 田少华, 王海昌. 剪应力和血管内皮生长因子诱导骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009 **17** (5): 379-382.
- [7] 蒋小英, 高广道, 王新风, 等. 骨髓干细胞向心肌细胞分化的研究现状 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004 **12** (1): 103-105.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999 **284** (5411): 143-147.
- [9] Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2001 **27** (3): 235-239.
- [10] Antonitis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, et al. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2008 **56** (2): 77-82.
- [11] Rangappa S, Wechsler AS. Cyclic stretch of adult human mesenchymal stem cells induces expression of early cardiac and neuronal genes [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004 **3** (1): 177.
- [12] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. *Artif Organs*, 2001 **25** (3): 187-193.
- [13] Atchley WR, Fitch WM, Bronner-Fraser M. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1994 **91** (24): 11 522-526.
- [14] Glosso JP, Carmell SH. Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cells. Differential gene expression of IL1 β and MAP3K8 in MAPK signaling [J]. *Gene Expression Patterns*, 2009 **9** (5): 381-388.
- [15] 方利君, 付小兵, 孙同柱, 等. 骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的实验研究 [J]. *中华烧伤杂志*, 2003 **19** (1): 22-24.
- [16] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct [J]. *Circ Res*, 2002 **90** (2): 223-230.
- [17] Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, et al. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006 **290** (3): 776-784.
- [18] 戚孟春, 胡静, 邹淑娟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞和颅骨成骨细胞在张应力下细胞骨架的改变 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2005 **23** (2): 110-113.
- [19] Yamamoto N, Fukuda K, Matsushita T, et al. Cyclic tensile stretch stimulates the release of reactive oxygen species from osteoblast-like cells [J]. *Calcif Tissue Int*, 2005 **76** (6): 433-438.

(此文编辑 文玉珊)