

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.10.002

· 基础研究 ·

X线辐照对小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1增殖及RANTES表达的影响

卢炜莹¹, 刘萍², 陈嘉伟³, 刘淑英⁴, 徐平平⁵

1. 南方医科大学顺德医院(佛山市顺德区第一人民医院)口腔医学中心, 广东 佛山(528308); 2. 南方医科大学口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州(510280); 3. 南方医科大学珠江医院放疗科, 广东 广州(510280); 4. 南方医科大学口腔医院牙周科, 广东 广州(510280); 5. 南方医科大学口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州(510280)

【摘要】目的 探讨X线辐照对体外培养小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1增殖及其分泌蛋白的影响,为放射性骨损伤的防治提供研究基础。**方法** 取对数生长期的鼠成骨前体细胞MC3T3-E1,按辐照剂量分成0 Gy对照组、2 Gy组、4 Gy组、8 Gy组,使用6 MV直线加速器分别予以相应剂量的X线辐照,观察辐照后细胞形态的改变,CCK-8法检测细胞增殖情况,检测辐照后7 d细胞内碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性;收集各组细胞上清,采用高通量蛋白质芯片技术检测分泌蛋白的表达情况,筛选出放射性损伤特异性的差异蛋白,并通过酶联免疫吸附实验进行验证。**结果** 辐照后MC3T3-E1细胞胞体肿大,细胞核变大。与对照组相比,从3 d开始4 Gy和8 Gy组细胞增殖速度降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且增殖降低呈现辐照剂量依赖性。辐照后培养7 d,各辐照组细胞内ALP活性均比对照组低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,辐照后细胞上清共发现36个差异表达蛋白,其中受激活调节正常T细胞表达和分泌因子(regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted factor, RANTES)含量明显增加,呈剂量依赖性。**结论** 一定剂量的辐照可抑制小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1的增殖;RANTES可能是细胞受放射线辐照损伤后引发的重要信号因子。

【关键词】 辐照; 放射性颌骨骨髓炎; 成骨细胞; MC3T3-E1; 细胞增殖; 蛋白质芯片; 分泌蛋白; RANTES

【中图分类号】 R782.3² **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)10-0621-06 开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 卢炜莹, 刘萍, 陈嘉伟, 等. X线辐照对小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1增殖及RANTES表达的影响[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(10): 621-626.

Effects of X-ray irradiation on proliferation and RANTES expression of the mouse osteogenic precursor cell line MC3T3-E1 LU Weiying¹, LIU Ping², CHEN Jiawei³, LIU Shuying⁴, XU Pingping⁵. 1. Stomatology Center, Shunde Hospital, Southern Medical University (The First People's Hospital of Shunde), Foshan 528308, China; 2. Department of Endodontics, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 3. Department of Radiotherapy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 4. Department of Periodontics, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 5. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: XU Pingping, Email: gdsqykyjk@163.com, Tel: 86-20-34812033

【Abstract】Objective To investigate the effects of X-ray irradiation on the proliferation and protein secretion in vitro in a cultured mouse osteoblast precursor cell line (MC3T3-E1) and to provide a basis for the prevention and treatment of radiation-induced bone injury. **Methods** Mouse osteoblast precursor cells (MC3T3-E1) in the logarithmic growth phase were divided into a 0 Gy control group, 2 Gy group, 4 Gy group and 8 Gy group according to the irradiation dose.

【收稿日期】 2018-12-30; **【修回日期】** 2019-05-20

【基金项目】 广东省科技计划项目(2014A020212239)

【作者简介】 卢炜莹, 硕士, Email: luyi765@qq.com

【通信作者】 徐平平, 博士, Email: gdsqykyjk@163.com, Tel: 86-20-34812033

tion dose. The corresponding dose of X-rays was applied, and the changes in cell morphology after irradiation were observed. Cell proliferation was detected by the CCK-8 method, and alkaline phosphorus was detected at 7 days after irradiation. The alkaline phosphatase (ALP) activity and expression of secreted proteins were detected by high-throughput protein chip technology. The differential expression of proteins due to radiation damage was screened and verified by an ELISA. **Results** After irradiation, the soma and nucleus of MC3T3-E1 cells were enlarged. Compared to the control group, the cell proliferation rates of the 4 Gy and 8 Gy groups were significantly decreased starting at 3 days in culture ($P < 0.05$), and the cell proliferation decreased in a dose-dependent manner. After 7 days of culture, the ALP activity in the cells of each irradiated group was lower than that of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared to the control group, 36 differentially expressed proteins were found in the supernatant after irradiation. Among them, the content of regulated upon activation, normal T cell expression and secreted factor (RANTES) was significantly increased in a dose-dependent manner. **Conclusion** A certain dose of irradiation can inhibit the proliferation of mouse osteoblast precursor cells (MC3T3-E1), and RANTES may be an important signaling factor induced by radiation damage.

【Key words】 irradiation; radioactive osteomyelitis of jaws; osteoblast; MC3T3-E1; cell proliferation; protein chips; secretory protein; regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted factor (RANTES)

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(10): 621-626.

放射治疗作为口腔颌面—头颈肿瘤的常用治疗手段之一,可引起黏膜炎、念珠菌感染、感觉功能障碍、组织纤维化等口腔并发症^[1],其中较严重的是放射性颌骨坏死(osteoradionecrosis of the jaw, ORNJ),发病率为5%~15%^[2],常以慢性坏死及感染为主要特征,临床表现为疼痛、开口受限、功能障碍、瘘管溢脓、病灶经久不愈、死骨暴露,甚至发生病理性骨折^[3-4],严重影响患者的生存质量。目前,ORNJ的发病机制尚不明确,但辐照剂量是较明确的危险因素之一^[5-6]。以往的研究大部分集中在辐照对成骨细胞增殖、分化及成骨相关基因表达的影响上^[7-9],但较少报道辐照对成骨细胞分泌蛋白的影响。因此,本文拟研究辐照对成骨细胞增殖及其分泌蛋白的影响,为放射性骨损伤的防治提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器设备

MC3T3-E1 Subclone 14(中国科学院细胞库); α -MEM培养基(Gibco,美国);胎牛血清(Gibco,美国);CCK-8试剂盒(Dojindo,日本);碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA蛋白定量试剂盒(上海BestBio贝博生物);RANTES ELISA试剂盒(武汉博士德生物有限公司);酶联免疫检测仪(Bio-Tek,美国);Synergy直线加速器(Elekta,瑞典);小鼠细胞因子芯片(编号:GSM-CAA-4000, Raybiotech,美国);荧光扫描仪(InnoScan 300 Microarray Scanner,法国);摇床(上海比朗仪器制造

有限公司);芯片洗板机(Thermo,美国)。

1.2 细胞培养及处理

1.2.1 细胞培养 将MC3T3-E1细胞置于含有10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的 α -MEM培养基中,在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养,每2~3 d更换培养液,0.25%胰蛋白酶消化传代。按每孔以 4×10^4 个细胞数接种于6孔培养板中,直至细胞贴壁达到80%~90%融合,将细胞分成4组:0 Gy对照组、2 Gy组、4 Gy组、8 Gy组。

1.2.2 细胞辐照 以Elekta-synergy直线加速器为放射源,剂量率540 MU/min,在室温条件下分别一次性给予2 Gy,4 Gy,8 Gy剂量照射;对照组同时带进放疗候诊室,但不接受辐照。

1.3 细胞增殖实验

将对照组及辐照组细胞按照每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板中(100 μ L),每组各个时间点分别设置3个复孔,接种细胞周边的孔内加入无菌PBS作为空白对照,置于体积分数为5%CO₂、37℃培养箱中分别培养1、3、5、7 d。避光条件下,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,放入培养箱中继续孵育3 h。将96孔板放入酶联免疫检测仪,在450 nm波长处测定各孔吸光度(OD值)。

1.4 细胞内碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定

将各组细胞接种于6孔培养板,照射后培养7 d检测ALP的变化,每组每次取3个培养孔检测($n = 3$)。根据试剂盒说明书进行操作,酶联免疫检测

仪测定各组 OD 值,最终换算为金氏单位。照射当日定义为 0 d,照射后培养 7 d 进行检测。

1.5 高通量蛋白芯片筛选表达差异蛋白

对照组、辐照组(2 Gy、4 Gy、8 Gy)细胞培养 7 d 后上清液进行检测,筛选出放射性损伤的差异蛋白。

将玻片芯片置于室温干燥 2 h 后每孔加 100 μ L 的样品稀释液,室温摇床上孵育 1 h,封闭定量抗体芯片,吸走缓冲液后添加 80 μ L 的样品到孔中,在摇床上 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。使用芯片洗板机清洗玻片,离心检测抗体混合物小管,加入 1.4 mL 的样品稀释液,混合均匀后再次快速离心。添加 80 μ L 的检测抗体到每孔中,室温摇床上孵育 2 h 后清洗玻片。离心 Cy3-链霉亲和素小管,加入 1.4 mL 的样品稀释液,混合均匀后快速离心。添加 80 μ L 的 Cy3-链霉亲和素到每个孔中,用铝箔纸包住玻片避光孵育,室温摇床上孵育 1 h 后清洗玻片。采用 InnoScan 300 激光扫描仪在激发频率 532 nm 扫描信号。

1.6 ELISA 验证差异蛋白表达水平

根据芯片检测结果中选出符合要求的差异蛋白受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子(regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted factor, RANTES),分别收集辐照后 7 d 对照组、辐照组的细胞上清液,采用 RANTES ELISA 试剂盒进行检测,验证此差异蛋白是否为 MC3T3-E1 细胞接受放射性损伤后释放的特异性因子。

采用双抗体夹心定量 ELISA 检测法,按试剂盒说明书要求准备好样品和试剂,在预包被小鼠

RANTES 抗体的 96 孔板中每孔加样品和标准品各 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 90 min。各孔加生物素标记抗体 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 60 min。1 $\times$ 洗涤缓冲液洗涤 3 次。各孔加亲和素-过氧化物酶复合物 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。1 $\times$ 洗涤缓冲液洗涤 5 次。各孔加入 90 μ L TMB 显色液,37 $^{\circ}$ C 避光反应 20~25 min。各孔加入 100 μ L TMB 终止液,将 96 孔板放入酶联免疫检测仪,在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值。

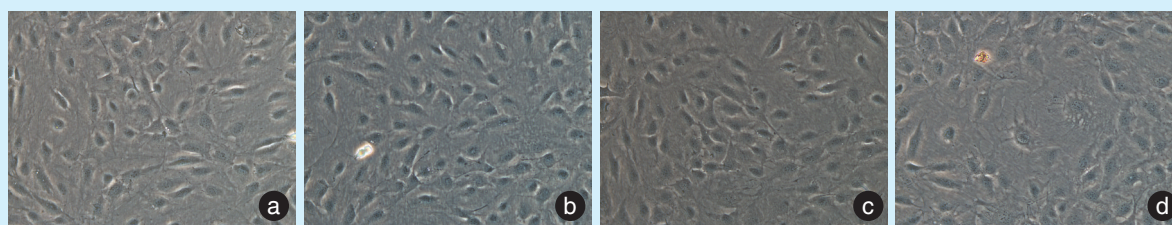
1.7 统计学处理

使用 SPSS 22.0 统计分析软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,4 组间细胞增殖、ALP 活性及 ELISA 的数据比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,则再采用 LSD 显著差异法进行两两比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。4 组间蛋白芯片的原始数据用软件归一化后,选择 Normalization 数据进行分析,采用 Fold-change (表达差异倍数)对任意两组的差异蛋白进行筛选,筛选条件为 Fold Change ≥ 2 且荧光信号 > 500 。

2 结果

2.1 辐照后细胞形态改变

MC3T3-E1 细胞辐照后 1 d,倒置相差显微镜下观察,对照组细胞贴壁生长,呈不规则多角形,细胞形态较一致;与对照组相比,2 Gy 及 4 Gy 辐照后细胞形态无明显变化;8 Gy 辐照后,细胞胞体肿大,细胞核变大,细胞贴壁性减退,出现较多漂浮细胞(图 1)。



a: 0 Gy, 细胞呈不规则多角形; b: 2 Gy, 与对照组相比细胞形态无明显变化; c: 4 Gy, 与对照组相比细胞形态无明显变化; d: 8 Gy, 与对照组相比细胞胞体肿大, 细胞核变大。

图 1 经不同剂量辐照后细胞形态改变 $\times 200$

Figure 1 Cell morphology changes after exposure to different radiation doses $\times 200$

2.2 辐照对成骨细胞增殖的影响

细胞分别给予 2 Gy、4 Gy、8 Gy 剂量辐照后与对照组相比,从 3 d 开始 4 Gy 和 8 Gy 组细胞增殖速度降低($P < 0.05$, 表 1),并且这种降低呈现辐照剂

量依赖性。

2.3 辐照对成骨细胞内 ALP 活性的影响

辐照后培养 7 d, 2 Gy 组、4 Gy 组和 8 Gy 组细胞内 ALP 活性均降低,与对照组相比差异均有统

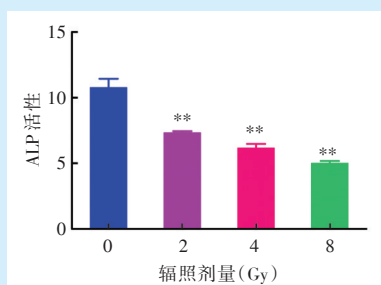
表1 经不同剂量辐照后细胞CCK8实验的OD值

Table 1 The OD value of cells in a CCK8 assay after exposure to different radiation doses

培养时间/d	辐照剂量/Gy				<i>F</i>	<i>P</i>
	0	2	4	8		
1	0.615 ± 0.037	0.680 ± 0.188	0.453 ± 0.037	0.486 ± 0.057	3.338	0.077
3	1.461 ± 0.108	1.453 ± 0.055	1.231 ± 0.082**	1.221 ± 0.058**	8.646	0.007
5	1.904 ± 0.102	1.841 ± 0.052	1.708 ± 0.036**	1.483 ± 0.014**	28.270	< 0.001
7	2.193 ± 0.214	2.172 ± 0.094	2.136 ± 0.080	1.712 ± 0.049**	9.918	0.005

注 与对照组(0 Gy)相比,** $P < 0.01$

计学意义($F = 123.516$, $P < 0.001$, 图2)。



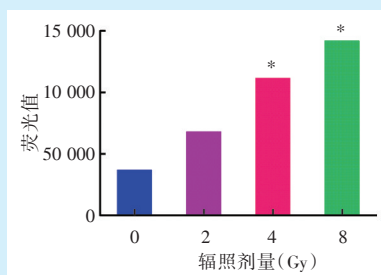
与对照组(0 Gy)相比,** $P < 0.01$

图2 经不同剂量辐照后细胞内ALP活性的比较

Figure 2 Comparison of intracellular ALP activity after exposure to different radiation doses

2.4 细胞上清液中差异蛋白的表达水平

辐照后培养7 d,与对照组比较,2 Gy组、4 Gy组和8 Gy组细胞上清液中蛋白芯片检测共发现36个差异蛋白,其中RANTES蛋白量在辐照组中增多并呈现辐照剂量依赖性(图3)。



与对照组(0 Gy)相比,* Fold-change (表达差异倍数) ≥ 2

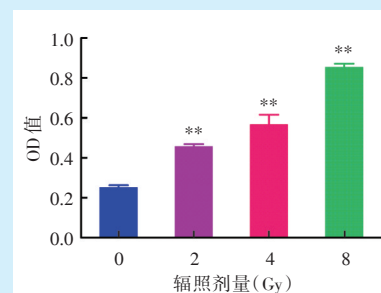
图3 蛋白芯片检测各组细胞上清液中RANTES的表达水平

Figure 3 Expression levels of RANTES in different cell supernatants determined by protein chip technology

2.5 细胞上清液中RANTES表达水平

辐照后培养7 d,2 Gy组、4 Gy组和8 Gy组ELI-

SA检测细胞上清液中RANTES表达量较对照组增加,差异均有统计学意义($F = 242.383$, $P < 0.001$, 图4)。



与对照组(0 Gy)相比,** $P < 0.01$

图4 ELISA检测各组细胞上清液中RANTES的表达水平

Figure 4 Expression levels of RANTES in different cell supernatants determined by ELISA

3 讨论

随着癌症发病率的不断上升,放疗在肿瘤治疗中起着至关重要的作用。文献报道约80%的头颈部肿瘤患者需要接受至少1次放射治疗^[10]。然而,放射治疗后的幸存者可能面临一系列副作用,包括不同程度的放射性骨损伤,如放射性骨质疏松症、放射性骨髓炎、放射性骨折、放射性骨坏死或放射性骨发育紊乱^[11]。电离辐射对骨的有害影响已被证实^[12],动物实验也表明,X线照射可导致骨丧失、骨坏死、骨折和延迟骨愈合^[13]。因此,研究放射性骨损伤的发生机制,制定相应的预防和治疗措施具有重要的意义。

本实验使用小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1,此细胞克隆来源于C57BL/6小鼠颅骨,重复传代培养能维持成骨细胞表型,具有高度ALP活性,在体外可以分化为成骨细胞和骨细胞,形成钙化骨组织和羟基磷灰石矿物沉淀^[14]。MC3T3-E1细胞系已

被证明是探索成骨细胞增殖、成熟和分化的分子机制的可行模型^[9],是研究辐照骨损伤较常用的细胞系。

骨组织受到辐照后发生的并发症具有剂量依赖性,并直接影响细胞活性和增殖能力^[15]。Gal等^[9]研究发现MC3T3-E1细胞受到2 Gy的辐照时与未辐照组的增殖无明显差异,4 Gy组的辐照效应最明显,而超过6 Gy的剂量时细胞表现出显著的辐照毒性和死亡。Dudziak等^[16]通过MTT实验检测辐照对MC3T3-E1细胞增殖的影响,发现辐照后第5天开始4 Gy和8 Gy组细胞增殖明显低于未辐照组,并在第7天时相对增殖差异几乎达到2倍。本研究发现4 Gy和8 Gy的X线辐照抑制了成骨细胞的增殖,这与上述研究结果一致。由此可见,成骨细胞接受电离辐照后,细胞增殖呈现辐照剂量依赖性降低。

碱性磷酸酶是一种膜结合糖蛋白,是成骨细胞分化的早期标志物之一^[17],ALP活性的水平一直被用作成骨细胞分化阶段的一个相对衡量标准。以往有研究发现电离辐照引起成骨细胞的ALP活性呈辐照剂量性增加,并认为电离辐照促进成骨细胞的终末分化^[16]。而Dare等^[8]研究辐照对两种成骨前体细胞的影响,发现400 mGy以下的辐射未引起ROB细胞和MC3T3-E1细胞的ALP活性的改变,而当ROB细胞受到4 000 mGy辐射后9 d和12 d,细胞ALP活性显著抑制,MC3T3-E1细胞在辐射后12 d,ALP活性与对照组相比略为升高,差异均有统计学意义,因此辐射对成骨细胞ALP活性的影响可能受辐射剂量、细胞类型、细胞分化阶段、检测时间等因素综合影响,导致不同研究得出的结果不一致,甚至是相反的结果。本实验中MC3T3-E1细胞分别接受2 Gy、4 Gy和8 Gy辐照后培养7 d,测得细胞内ALP活性较对照组呈辐照剂量依赖性降低,与Gevorgyan等^[7]的结果相似。辐照导致ALP活性降低的原因可能是电离辐照直接抑制细胞分化,或者是通过抑制细胞增殖而导致检测细胞内总的ALP活性降低,或以上两种作用的联合结果。

本研究进一步探讨了X线辐照对MC3T3-E1细胞上清液中细胞因子表达的影响。与对照组相比,辐照后细胞上清共发现36个差异表达蛋白,其中RANTES含量增加,呈剂量依赖性。RANTES属于趋化因子CC亚家族成员(CCL5),尽管最初被描述为T细胞特异性表达的,但随后发现其在多种细胞类型中表达,包括嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、成

纤维细胞、肾小管细胞或内皮细胞^[18]。RANTES可作为某些细胞的趋化剂,如单核细胞、T细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞,募集各种免疫细胞到炎症部位并促进T细胞增殖^[19-20]。RANTES的特异性受体属7次跨膜G蛋白偶联受体,包括CCR1、CCR3、CCR4和CCR5。RANTES与受体相结合,诱导丝裂原活化蛋白激酶和调控细胞增殖、迁移、分化等多种细胞功能的其他信号通路的磷酸化^[21],产生多种生物学效应,如炎症应答、细胞防御、信号转导和应激反应等。放射性颌骨坏死是以炎症和坏死为基础的骨及软组织损伤,细胞受到电离辐照后会释放出细胞因子、趋化因子等引起组织的炎症反应,同时,组织重塑和愈合过程的第一步是间充质干细胞的募集,这对于放射性骨组织的再生也是必不可少的,趋化因子在特定造血细胞类型的招募中起着关键作用,其中一些被认为参与了骨重塑的调控。已有研究证实,RANTES能在体外趋化破骨细胞和成骨细胞,提示其在骨重建中起关键作用^[22]。RANTES/CCR1轴还参与骨髓间充质干细胞向骨关节炎软骨的募集^[23],促进人骨髓间充质干细胞的成骨作用,被认为是类风湿关节炎或多发性骨髓瘤等免疫相关疾病中骨重塑的关键调节因子^[24]。Connolly等^[25]发现辐射能在转录水平及蛋白水平上显著上调肿瘤组织内RANTES的表达,且受辐射的炎症性单核细胞表面CCR5增加,放疗可能通过RANTES和CCR5的作用促进髓系细胞向受照射的肿瘤浸润。此外,人肺泡上皮细胞受到辐照后RANTES表达水平升高,敲除CCR4可部分阻断RANTES对肺泡上皮细胞的上皮-间质转换,提示RANTES参与放射性肺损伤的发病过程^[26]。本研究中MC3T3-E1细胞受到辐照后其上清液高表达RANTES,推测RANTES可能是辐射诱导的特异性表达趋化因子,参与放射性骨损伤的发生过程,以及趋化干细胞等其他组织细胞启动修复反应,RANTES可能是辐射骨组织再生早期机制的一部分,有望作为促进辐射损伤骨组织再生的研究靶点,但其具体作用机制仍有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明辐照可降低成骨前体细胞MC3T3-E1的增殖及ALP活性,并发现RANTES可能是成骨细胞受辐照损伤后引发组织趋化、修复等一系列生物过程的关键因子。

参考文献

- [1] Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun R, et al. Common oral compli-

- cations of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(12): 2918-2931.
- [2] Costa DA, Costa TP, Netto EC, et al. New perspectives on the conservative management of osteoradionecrosis of the mandible: a literature review[J]. *Head Neck*, 2016, 38(11): 1708-1716.
 - [3] Dekker H, Bravenboer N, Van Dijk D, et al. The irradiated human mandible: a quantitative study on bone vascularity[J]. *Oral Oncol*, 2018, 87: 126-130.
 - [4] Sathasivam HP, Davies GR, Boyd NM. Predictive factors for osteoradionecrosis of the Jaws: a retrospective study[J]. *Head Neck*, 2018, 40(1): 46-54.
 - [5] Pereira IF, Firmino RT, Meira HC, et al. Osteoradionecrosis prevalence and associated factors: a ten years retrospective study[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2018, 23(6): e633-e638.
 - [6] 何悦, 李晓光. 放射性颌骨坏死的防治[J]. *口腔疾病防治*, 2019, 27(3): 143-152.
 - [7] Gevorgyan A, Sukhu B, Alman BA, et al. Radiation effects and radioprotection in MC3T3-E1 mouse calvarial osteoblastic cells[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 122(4): 1025-1035.
 - [8] Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, et al. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells[J]. *J Dent Res*, 1997, 76(2): 658-664.
 - [9] Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, et al. Radiation effects on osteoblasts in vitro - a potential role in osteoradionecrosis[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 126(9): 1124-1128.
 - [10] Strojan P, Hutcheson KA, Eisbruch AA, et al. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 59: 79-92.
 - [11] Zhang J, Qiu XY, Xi KD, et al. Therapeutic ionizing radiation induced bone loss: a review of *in vivo* and *in vitro* findings[J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 59(6): 509-522.
 - [12] Rahman N, Khan R, Badshah S. Effect of x-rays and gamma radiations on the bone mechanical properties: literature review[J]. *Cell Tissue Bank*, 2018, 19(4): 457-472.
 - [13] Michel G, Blery P, Pilet P, et al. Micro-CT analysis of Radiation-Induced osteopenia and bone hypovascularization in rat[J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 97(1): 62-68.
 - [14] Kunimatsu R, Gunji H, Tsuka Y, et al. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts[J]. *Lasers Med Sci*, 2018, 33(5): 959-966.
 - [15] Limirio P, Soares P, Emi E, et al. Ionizing radiation and bone quality: time-dependent effects[J]. *Radiat Oncol*, 2019, 14(1): 15.
 - [16] Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 106(5): 1049-1061.
 - [17] 张静, 朱双喜, 彭伟, 等. 犬上颌窦黏膜干细胞的培养和成骨性能的鉴定[J]. *口腔疾病防治*, 2018, 26(7): 422-427.
 - [18] Levy JA. The unexpected pleiotropic activities of RANTES[J]. *J Immunol*, 2009, 182(7): 3945-3946.
 - [19] Chen MX, Yang XQ, Yang M, et al. Identification of a novel biomarker-CCL5 using antibody microarray for colorectal cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(5): 1033-1037.
 - [20] Ishiuchi Y, Sato H, Komatsu N, et al. Identification of CCL5/RANTES as a novel contraction-reducible myokine in mouse skeletal muscle[J]. *Cytokine*, 2018, 108: 17-23.
 - [21] Chen R, Lee WY, Zhang XH, et al. Epigenetic modification of the CCL5/CCR1/ERK axis enhances glioma targeting in dedifferentiation-reprogrammed BMSCs[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(3): 743-757.
 - [22] Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, et al. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: Role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(5): 2324-2335.
 - [23] Lu L, Zhang X, Zhang M, et al. RANTES and SDF-1 are keys in cell-based therapy of TMJ osteoarthritis[J]. *J Dent Res*, 2015, 94(11, SI): 1601-1609.
 - [24] Cordova LA, Loi F, Lin TH, et al. CCL2, CCL5, and IGF-1 participate in the immunomodulation of osteogenesis during M1/M2 transition in vitro[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(11): 3069-3076.
 - [25] Connolly KA, Belt BA, Figueroa NM, et al. Increasing the efficacy of radiotherapy by modulating the CCR2/CCR5 chemokine axes [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86522-86535.
 - [26] Zhong Y, Lin Z, Lu J, et al. CCL2-CCL5/CCR4 contributed to radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of HPAEpiC cells via the ERK signaling pathways[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 733-743.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)



官网



公众号