

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.007

· 基础研究 ·

## 模拟乳腺癌骨转移微环境中 CGRP 对成骨细胞 OPG 和 RANKL 表达影响

杨晨, 赵晖, 姚阳, 王智煜, 陈平\* (上海交通大学附属第六人民医院 肿瘤内科, 上海 200233)

**[摘要]** 目的: 以乳腺癌细胞与成骨细胞共培养模拟乳腺癌骨转移微环境, 观察在此微环境中降钙素基因相关肽( calcitonin gene-related peptide, CGRP)对成骨细胞护骨素( osteoprotegerin, OPG)及细胞核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体( receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL; 又称破骨细胞分化因子)表达的影响。方法: 将转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 或 MDA-MB-435 与成骨细胞 MG63 共培养, 建立模拟乳腺癌骨转移微环境。行 CGRP(  $1 \times 10^8$  mol/L)干预, 应用 RT-PCR 和 Western Blotting 技术检测干预后 OPG 和 RANKL 在 mRNA 和蛋白水平表达的变化。结果: MG63 与 MDA-MB-231 或 MDA-MB-435 共培养环境中, RANKL mRNA 及蛋白水平升高, 而 OPG mRNA 和蛋白水平表达下降; CGRP 处理后, 共培养环境中 RANKL mRNA 及蛋白水平降低, OPG mRNA 和蛋白水平升高(均  $P < 0.05$ )。结论: 乳腺癌细胞能调节成骨细胞 OPG/RANKL 轴的表达, 进而可能促进破骨细胞的活性, 造成溶骨性破坏; CGRP 干预可逆转此调节作用, 在乳腺癌骨转移的治疗中有潜在应用价值。

**[关键词]** 降钙素基因相关肽; 乳腺癌细胞; 成骨细胞; 护骨素; 破骨细胞分化因子

**[中图分类号]** R737.9; R730.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2009)03-0243-05

## Effects of calcitonin gene-related peptide on osteoprotegerin and RANKL expressions in osteoblast cells in bone metastasis microenvironment of breast cancer *in vitro*

YANG Chen, ZHAO Hui, YAO Yang, WANG Zhi-yu, CHEN Ping\* (Department of Oncology, Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in osteoblast cells through an *in vitro* breast cancer cell and osteoblast cell co-culture system. **Methods:** The metastatic breast cancer MDA-MB-231 or MDA-MB-435 cells were co-cultured with osteoblast MG63 cells to establish an *in vitro* microenvironment of bone metastasis of breast cancer. After treated with CGRP(  $1 \times 10^8$  mol/L), OPG and RANKL mRNA and protein expressions in osteoblast MG63 cells were examined by RT-PCR and Western blotting. **Results:** Expression of RANKL in osteoblast MG63 cells was up-regulated at both mRNA and protein levels when osteoblast MG63 cells were co-cultured with breast cancer MDA-MB-231 or MDA-MB-435 cells, while those of OPG in osteoblast MG63 cells were both down-regulated (  $P < 0.05$  ). After treatment with CGRP, expressions of RANKL in osteoblast MG63 cells were down-regulated at both mRNA and protein levels, and the expressions of OPG mRNA and protein were both up-regulated (  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** Breast cancer MDA-MB-231 and MDA-MB-435 cells can promote osteolysis of osteoclast cells via regulating the expression of OPG/RANKL axis in osteoblast cells. CGRP can reverse the osteolysis of osteoblast cells induced by breast cancer cells and may serve as a potential therapeutic agent for treatment of bone metastasis of breast cancer.

**[Key words]** calcitonin gene-related peptide( CGRP); breast cancer cell; osteoblast cell; osteoprotegerin( OPG); receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ( RANKL)

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 243-247 ]

**[基金项目]** 上海市市级医院慢性病综合防治项目( No. SHDC12007304 )。Supported by the Comprehensive Prevention and Treatment Project for Chronic Diseases of Shanghai Municipal Hospitals ( No. SHDC12007304 )

**[作者简介]** 杨晨( 1981- ), 男, 江苏省无锡市人, 硕士研究生, 主要从事骨肿瘤防治方面的研究

\* 通讯作者( Corresponding author ). E-mail: chenping714@yahoo.com.cn

降钙素基因相关肽( calcitonin gene-related peptide, CGRP )是一种含 37 个氨基酸的多肽。研究<sup>[1-3]</sup>显示, CGRP 在调节血压和心律以及在心肌梗死的修复、抑制中枢促生长激素的释放、改变机体的疼痛反应等过程中发挥着作用。含 CGRP 的神经纤维在骨膜及骨髓等生长活跃区域均有分布, 释放的 CGRP 与成骨细胞上的 CGRP 受体结合, 参与促进成骨细胞分裂和增殖<sup>[4]</sup>; 另外, 破骨细胞膜上也存在 CGRP 的功能性受体, CGRP 与受体可能直接抑制破骨细胞的增殖。

骨是乳腺癌最为常见的远处转移部位之一。由乳腺癌骨转移所起的骨相关事件( 高钙血症、病理性骨折、骨痛等 )严重影响患者的生活质量及生存期。如何通过药物途径更好地调节肿瘤骨转移过程中造成的骨损伤为临床医学所关注的热点。

相关研究<sup>[5]</sup>发现, 乳腺癌骨转移常常导致成骨细胞和破骨细胞活性失衡, 破骨细胞活性增加, 骨吸收加速导致骨溶解。本研究建立乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 与成骨细胞 MG63 的共培养模型, 模拟体内乳腺癌骨转移微环境, 利用 RT-PCR 及 Western blotting 等方法, 观察乳腺癌细胞与成骨细胞共培养后对破骨调节因子护骨素( osteoprotegerin, OPG )及细胞核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体( receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL; 又称破骨细胞分化因子 ) mRNA 及蛋白的表达, 进而了解 CGRP 对乳腺癌骨转移微环境中骨代谢的影响, 为疾病的治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞及主要试剂

成骨细胞 MG63 购自上海中科院细胞库, 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 购自 ATCC, 本实验室传代培养。人降钙素基因相关肽( hCGRP )购自北京康肽生物科技有限公司。胎牛血清( FBS )购自杭州四季青生物工程材料有限公司。DMEM 高糖培养液( 含青霉素和链霉素各 100

U/ml )购自吉诺生物医药有限公司。TRIZOL 试剂盒购自 Invitrogen 公司, M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒。PCR 扩增试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.2 建立乳腺癌骨转移模拟微环境以及实验分组

将低代培养的 3 种细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 制成细胞悬液。每孔接种  $5 \times 10^5$  个 MG63 细胞于 6 孔板中; 分别加  $5 \times 10^5$  个 MDA-MB-231 或 MDA-MB-435 于其中 2 孔中, 每孔共加含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液 1 ml。单独或共培养 24 h 后, 将培养液换成 1 ml 无血清 DMEM 高糖培养液, 12 h 后换成含 CGRP(  $10^{-8}$  mol/L )的 DMEM 高糖培养液。实验分 6 组, 对照组不加 CGRP, 治疗组加  $1 \times 10^{-8}$  mol/L CGRP。继续培养 48 h 后, 抽提总 RNA 或总蛋白行下一步实验。

### 1.3 RT-PCR 检测 OPG 和 RANKL mRNA 的表达

总 RNA 提取及检测先采用 TRIZOL 试剂盒按操作流程提取细胞总 RNA, 取出少量稀释后测定其浓度和纯度, 调整 RNA 质量浓度为  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

cDNA 第一链合成采用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒, 建立  $20 \mu\text{l}$  反应体系, 步骤如下: ( 1 ) Oligo dT  $0.5 \mu\text{g}$ 、总 RNA  $5 \mu\text{g}$ 、加无 RNase  $\text{H}_2\text{O}$  定容至  $12 \mu\text{l}$ ;  $70^\circ\text{C}$  5 min,  $4^\circ\text{C}$  30 s, 离心 5 s; ( 2 ) 加  $5 \times$  RT Buffer  $4 \mu\text{l}$ 、dNTP Mixture( 各  $10 \text{ mmol/l}$  )  $2 \mu\text{l}$ 、RNase 抑制剂  $1 \mu\text{l}$ , 混匀后离心 5 s,  $37^\circ\text{C}$  5 min; ( 3 ) 加 M-MLV 逆转录聚合酶  $1 \mu\text{l}$ , 混合后  $37^\circ\text{C}$  60 min,  $70^\circ\text{C}$  10 min, 即完成 cDNA 第一链的合成。

PCR 所用引物见表 1。PCR 反应体系  $20 \mu\text{l}$ , 取 cDNA  $2 \mu\text{l}$ , 加  $10 \times$  buffer, dNTP  $1 \mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶  $0.5 \mu\text{l}$ , 上下游引物各  $1 \mu\text{l}$ , 超纯水  $12.5 \mu\text{l}$ 。反应条件:  $95^\circ\text{C}$  3 min 预变性;  $94^\circ\text{C}$  60 s 变性;  $\beta$ -actin、OPG 及 RANKL 分别于  $53^\circ\text{C}$ 、 $48^\circ\text{C}$  及  $51^\circ\text{C}$  退火 60 s;  $72^\circ\text{C}$  延长 60 s; 30 个循环,  $72^\circ\text{C}$  10 min 终末延伸。取 PCR 扩增产物  $6 \mu\text{l}$  以 1% 琼脂糖凝胶( 含  $0.5 \text{ mg/ml}$  溴化乙锭 ), 电泳, 紫外光下自显影, 分析条带光密度值, 以待测基因和  $\beta$ -actin 条带强度的比值作为目的基因的相对值。

表 1 PCR 引物  
Tab. 1 Primers of PCR

| Gene           | Fragment length ( bp ) | Sense primer         | Anti-sense primer      |
|----------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| $\beta$ -actin | 350                    | GACCTGACAGACTACCTCAT | AGACAGCACTGTGTTGGCAT   |
| OPG            | 527                    | GGACCACAATGAACAACCT  | TAGCAGGAGACCAAAGAC     |
| RANKL          | 194                    | CCAGCATCAAAATCCCAAGT | CCCCAAAGTATGTTGCATCCTG |

1.4 Western Blotting 检测 OPG 和 RANKL 蛋白的表达

使用 RIPA 裂解细胞抽提总蛋白,BCA 法蛋白定量。转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,添加一抗 ( $\beta$ -actin, 1 : 2 000; OPG, 1 : 200; RANKL,1: 200 )4  $^{\circ}$ C 过夜。0.1% TBST 7 min 洗 3 遍,用 0.1% TBS 稀释相应二抗(1:2 000),室温孵育 1 h,0.1% TBST 7 min 洗 3 遍,ECL 显影,蛋白含量用 OPG/ $\beta$ -actin 及 RANKL/ $\beta$ -actin 灰度比值表示。

1.5 统计学处理

所有实验重复 3 次,计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS10.5 统计软件,采用通用线性模型,行单因素方差分析。

2 结果

2.1 模拟人乳腺癌骨转移微环境中 CGRP 对成骨细胞 OPG 和 RANKL mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 与 MG63 共培养模拟人乳腺癌骨转移微环境,相对于 MG63 单独培养,OPG mRNA 的表达明显减低 ( $P < 0.05$ ),而 RANKL 的 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。CGRP 处理后,与各未处理组比较,RANKL mRNA 的表达下调,而 OPG mRNA 的表达上调 ( $P < 0.05$ );MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 均不表达 RANKL,但痕迹量表达 OPG(图 1、2)。

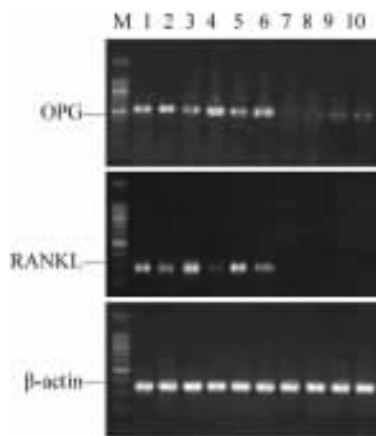


图 1 CGRP 对成骨细胞和乳腺癌细胞共培养体系中成骨细胞 OPG 和 RANKL mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of CGRP on expression of OPG and RANKL mRNA in osteoblast MG63 cells co-cultured with breast cancer MDA-MB-435 or MDA-MB-23 cells

M: DNA Marker; 1: MG63 cells; 2: MG63 + CGRP; 3: MG63 + MDA-MB-231; 4: MG63 + MDA-MB-231 + CGRP; 5: MG63 + MDA-MB-435; 6: MG63 + MDA-MB-435 + CGRP; 7: MDA-MB-231; 8: MDA-MB-231 + CGRP; 9: MDA-MB-435; 10: MDA-MB-435 + CGRP

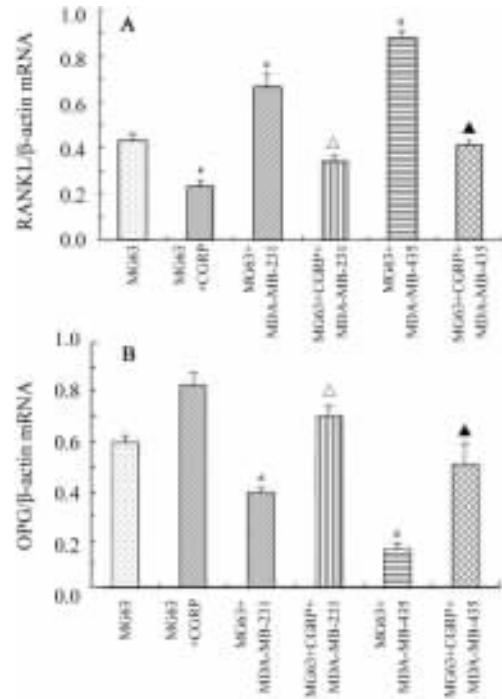


图 2 CGRP 作用下成骨细胞和乳腺癌细胞共培养体系中成骨细胞 RANKL ( A )和 OPG ( B ) mRNA 的表达  
Fig. 2 Expression of RANKL ( A ) and OPG ( B ) mRNA in osteoblast MG63 cells co-cultured with breast cancer MDA-MB-435 or MDA-MB-23 cells treated with CGRP  
\*  $P < 0.05$  vs MG63;  $\Delta P < 0.05$  vs MDA-MB-231 + MG63;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs MDA-MB-435 + MG63

2.2 模拟人乳腺癌骨转移微环境中 CGRP 对成骨细胞 OPG 及 RANKL 蛋白表达的影响

MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 与 MG63 共培养模拟人乳腺癌骨转移微环境中,OPG 的表达降低,RANKL 蛋白表达增加;CGRP 处理组能明显地增加 OPG 蛋白表达,但降低 RANKL 蛋白的表达(均  $P < 0.05$ ,图 3、4)。

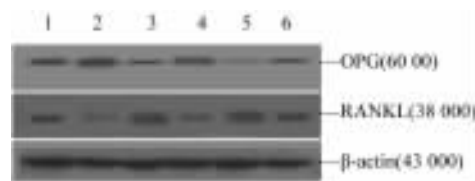


图 3 CGRP 对成骨细胞和乳腺癌细胞共培养体系中成骨细胞 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of CGRP on expression of OPG and RANKL protein in osteoblast MG63 cells co-cultured with breast cancer MDA-MB-435 or MDA-MB-23 cells

1: MG63; 2: MG63 + CGRP; 3: MG63 + MDA-MB-231; 4: MG63 + CGRP + MDA-MB-231; 5: MG63 + MDA-MB-435; 6: MG63 + CGRP + MDA-MB-435

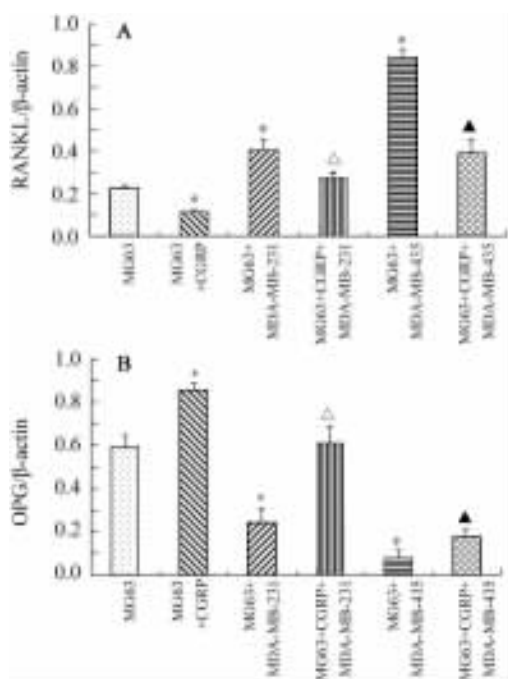


图4 CGRP作用下成骨细胞和乳腺癌细胞共培养体系中成骨细胞 RANKL ( A ) 和 OPG ( B ) 蛋白的表达

Fig.4 Expression of RANKL ( A ) and OPG( B ) protein in osteoblast MG63 cells co-cultured with breast cancer MDA-MB-435 or MDA-MB-23 cells treated with CGRP \* P < 0.05 vs MG63; ^ P < 0.05 vs MDA-MB-231 + MG63; ^ P < 0.05 vs MDA-MB-435 + MG63

### 3 讨论

乳腺癌造成的骨损伤多为溶骨性的改变,其机制涉及乳腺癌细胞抑制成骨细胞成骨活性,促进成骨细胞表达和分泌细胞核因子 κB 受体活化因子配体 ( receptor activator of NF-κB ligand, RANKL; 又称破骨细胞分化因子) 等细胞因子,进而促进破骨前体细胞分化为成熟破骨细胞,发挥骨质吸收作用,从而造成局部骨重吸收增加,重建减少,形成溶骨性病灶,而骨质破坏释放的转化生长因子-β( transforming growth factor-β, TGF-β)、骨形态发生蛋白( bone morphogenetic protein, BMP)等细胞因子又反作用于肿瘤细胞,促进肿瘤细胞的增殖,形成恶性循环<sup>[6]</sup>。由于包括乳腺癌在内的多种肿瘤骨转移的过程中都涉及 RANKL 表达的增高<sup>[5]</sup>,因此调节 RANKL 的表达及作用也就成为打破这一恶性循环,即治疗骨转移癌最关键的一环。

RANKL、RANK、OPG 均为 TNF 超家族中的一员,RANK 是 RANKL 的唯一靶受体;OPG 表达于包

括成骨细胞在内的众多组织,是 RANKL 的受体,可与 RANKL 竞争性结合 RANK<sup>[7]</sup>。

RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 结合后,通过激活核因子( NF-κB)和 c-Fos、c-src、c-Jun N-末端激酶( c-Jun amino-terminal kinase, JNK )、c-myc、钙调磷酸酶( calcineurin )、p38 以及丝氨酸-苏氨酸激酶 Akt/PKB 途径引起破骨细胞内一系列酶促级联反应,使破骨细胞前体分化、存活、融合为成熟破骨细胞,活化并抑制其凋亡<sup>[8]</sup>。RANKL 对破骨细胞的形成,进而促进局部骨质的重吸收,都起到关键性作用<sup>[9-10]</sup>;而 OPG 可阻断 RANKL 与 RANK 结合而抑制破骨细胞前体的分化、存活与融合,抑制成熟破骨细胞活化及骨吸收活性,导致破骨细胞凋亡。RANKL 和 OPG 的比例决定了破骨细胞介导的骨质破坏的发生、程度和过程<sup>[11-12]</sup>。在乳腺癌、肺癌等患者的骨转移病灶中均发现 RANKL/OPG 的表达量升高<sup>[13]</sup>。有研究表明,阻断 RANKL 与 RANK 的作用,可以抑制破骨细胞的成熟,进而防止肿瘤骨转移的发生<sup>[14]</sup>。Kostenuik 等<sup>[15]</sup>的实验表明,人 RANKL 单克隆抗体( denosumab )可以抑制人鼠嵌合型 RANKL 基因重组小鼠的骨重吸收并增加骨密度。

研究<sup>[4,16]</sup>证实,每个成骨细胞有 3 000 ~ 3 500 个 CGRP 受体,CGRP 与成骨细胞结合,促进成骨细胞分裂。Ballica<sup>[17]</sup>发现,在特异性成骨启动子的作用下过表达 CGRP 的转基因小鼠因为骨形成速度的提高而表现为骨量的增加。Schinke<sup>[18]</sup>发现,CGRP 基因表达缺陷而 CT 表达正常小鼠由于骨形成的下降表现为严重的骨质疏松。Ishizuka<sup>[19]</sup>研究显示,CGRP 可直接抑制去甲肾上腺素或 RANKL 诱导骨髓细胞形成破骨细胞,提示 CGRP 是骨形成和重吸收的重要调节因子,但其具体的作用机制,目前仍不清楚。

在共培养环境中,乳腺癌细胞本身并不能代替成骨细胞促进破骨细胞的生长<sup>[20]</sup>。本实验通过建立乳腺癌细胞与成骨细胞体外共培养体系,部分模拟乳腺癌骨转移环境。乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 与成骨细胞 MG63 共培养 6 周后,生长良好,与 Thomas 的实验<sup>[20]</sup>相一致。本实验结果显示,MDA-MB-231 以及 MDA-MB-435 不表达 RANKL,仅表达痕量 OPG,而 CGRP 的作用对 OPG 的表达没有影响。在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 细胞体外共培养条件下,MG63 细胞 RANKL 的表达增加,OPG 的表达下降,提示乳腺癌细胞可通过调节成骨细胞表达骨代谢因子,促进破骨细胞的活性,加速骨吸收,诱导溶骨性骨损伤。

实验<sup>[21]</sup>表明, CGRP 在  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 浓度下能最大限度提高细胞内 cAMP 的浓度, 并能通过依赖及不依赖 cAMP 的方式最大程度地引起 MG63 细胞内钙离子浓度升高<sup>[22]</sup>。因此在本实验选择  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 浓度的 CGRP 行干预实验, 观察 CGRP 对单独培养及共培养条件下破骨调节蛋白 OPG 及 RANKL 的调节作用。在 CGRP 作用于 MG63 细胞后, 发现其可抑制 RANKL 的表达, 促进 OPG 基因的表达, 提示 CGRP 可通过成骨细胞抑制破骨细胞的活性, 进而抑制局部骨的重吸收。在成骨细胞与乳腺癌细胞体外共培养条件下, CGRP 的干预, 同样可以抑制 RANKL 的表达, 促进 OPG 的表达。这表明 CGRP 能通过调节 RANKL/OPG 的表达抑制破骨细胞的活性, 并且可能逆转乳腺癌细胞对破骨细胞的促进作用。

综上所述, 乳腺癌细胞能调节成骨细胞 OPG/RANKL 轴的表达, 进而可能促进破骨细胞的活性, 造成溶骨性破坏; 而 CGRP 则干预 OPG/RANKL 轴, 有可能逆转乳腺癌细胞的促溶骨作用, 从而有望成为治疗乳腺癌骨转移潜在的制剂之一。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Durham PL. Inhibition of calcitonin gene-related peptide function: a promising strategy for treating migraine[ J ]. *Headache*, 2008, 48( 8 ): 1269-1275.
- [ 2 ] Zhu A, Kaunitz J. Gastrointestinal mucosal defense[ J ]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2008, 10( 6 ): 548-554.
- [ 3 ] Lacka K, Czyzyk A. Hormones and the cardiovascular system[ J ]. *Endokrynol Pol*, 2008, 59( 5 ): 420-432.
- [ 4 ] Irie K, Hara-Irie F, Ozawa H, *et al*. Calcitonin gene-related peptide ( CGRP )-containing nerve fibers in bone tissue and their involvement in bone remodeling[ J ]. *Microsc Res Tech*, 2002, 58( 2 ): 85-90.
- [ 5 ] Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis[ J ]. *N Engl J Med*, 2004, 350( 16 ): 1655-1664.
- [ 6 ] Virk MS, Lieberman JR. Tumor metastasis to bone[ J ]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9( Suppl 1 ): S5.
- [ 7 ] Clark J, Vagenas P, Panesar M, *et al*. What does tumor necrosis factor excess do to the immune system long term[ J ]? *Ann Rheum Dis*, 2005, 64( Suppl 4 ): 70-76.
- [ 8 ] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin[ J ]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9( Suppl 1 ): S1.
- [ 9 ] Fuller K, Wong B, Fox S, *et al*. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts[ J ]. *J Exp Med*, 1998, 188( 5 ): 997-1001.
- [ 10 ] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, *et al*. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis[ J ]. *Nature*, 1999, 397( 6717 ): 315-323.
- [ 11 ] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al*. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification[ J ]. *Genes Dev*, 1998, 12( 9 ): 1260-1268.
- [ 12 ] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling[ J ]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473( 2 ): 139-146.
- [ 13 ] Mountzios G, Dimopoulos MA, Bamias A, *et al*. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ( RANKL )/osteoprotegerin ( OPG ) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton[ J ]. *Acta Oncol*, 2007, 46( 2 ): 221-229.
- [ 14 ] Ando K, Mori K, Redini F, *et al*. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology[ J ]. *Curr Drug Discov Technol*, 2008, 5( 3 ): 263-268.
- [ 15 ] Kostenuik P, Nguyen H, McCabe J, *et al*. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases bone density in knock-in mice that express chimeric ( murine/human ) RANKL\* [ J ]. *J Bone Miner Res*, 2008, [ Epub ahead of print ]
- [ 16 ] Kawase T, Burns DM. Calcitonin gene-related peptide stimulates potassium efflux through adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and produces membrane hyperpolarization in osteoblastic UMR106 cells[ J ]. *Endocrinology*, 1998, 139( 8 ): 3492-3502.
- [ 17 ] Ballica R, Valentijn K, Khachatryan A, *et al*. Targeted expression of calcitonin gene-related peptide to osteoblasts increases bone density in mice[ J ]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14( 7 ): 1067-1074.
- [ 18 ] Schinke T, Liese S, Priemel M, *et al*. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide[ J ]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19( 12 ): 2049-2056.
- [ 19 ] Ishizuka K, Hirukawa K, Nakamura H, *et al*. Inhibitory effect of CGRP on osteoclast formation by mouse bone marrow cells treated with isoproterenol[ J ]. *Neurosci Lett*, 2005, 379( 1 ): 47-51.
- [ 20 ] Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, *et al*. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation[ J ]. *Endocrinology*, 1999, 140( 10 ): 4451-4458.
- [ 21 ] Kawase T, Okuda K, Burns DM. Immature osteoblastic MG63 cells possess two calcitonin gene-related peptide receptor subtypes that respond differently to [ Cys( Acn ) ( 2, 7 ) ] calcitonin gene-related peptide and CGRP( 8-37 ) [ J ]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289( 4 ): C811-818.
- [ 22 ] Burns DM, Stehno-Bittel L, Kawase T. Calcitonin gene-related peptide elevates calcium and polarizes membrane potential in MG-63 cells by both cAMP-independent and -dependent mechanisms [ J ]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287( 2 ): C457-467.

[ 收稿日期 ] 2009 - 02 - 24

[ 修回日期 ] 2009 - 04 - 19

[ 本文编辑 ] 韩丹