第35卷 第3期
2018年 3月
中国医学物理学杂志
Chinese Journal of Medical Physics
Vol. 35 No.3
March 2018
- 358 -

医学生物物理

NFATc1-ERK5通路介导流体剪切力促进成骨细胞BMP7表达

丁宁[1,2]，闫亮[1,2]，万浪[1,2]，夏亚一[1,2]
1.兰州大学第二医院骨科研究所，甘肃 兰州 730000；2.甘肃省骨关节疾病研究重点实验室，甘肃 兰州 730000

【摘 要】目的：探讨成骨细胞中 NFATc1 与 ERK5 调控关系，并研究流体剪切力（FSS）调节 BMP7 表达的信号通路。方法：实验分为 6 组，即空白组、FSS 组、CsA（Cyclosporin, NFATc1 抑制剂）组、XMD8-92（ERK5 抑制剂）组、FSS+CsA 组、FSS+XMD8-92 组。用 Western Blot 方法检测不同干预条件下 NFATc1、ERK5、p-ERK5 以及 BMP7 蛋白表达水平并进行比较。结果：12 dyn/cm² FSS 作用 45 min 能够显著提高 NFATc1、p-ERK5 在成骨细胞内水平，400 nmol/L CsA 干预 30 min 能够有效抑制 NFATc1 表达量升高以及 ERK5 磷酸化，但 5 μmol/L XMD8-92 作用 1 h 仅能够抑制 ERK5 磷酸化，而对 NFATc1 没有作用。此外，FSS 促进 MC3T3-E1 细胞中 BMP7 表达量升高，CsA 和 XMD8-92 任何一种抑制剂均能显著阻止 BMP7 表达。结论：FSS 在成骨细胞中通过 NFATc1 来调控 ERK5 磷酸化，BMP7 为 ERK5 下游靶点受 NFATc1-ERK5 通路调控。

【关键词】NFATc1；ERK5；BMP7；流体剪切力；成骨细胞

【中图分类号】R35　　　　　　　【文献标志码】A　　　　　　【文章编号】1005-202X(2018)03-0358-06

Increased expression of BMP7 by fluid shear stress mediated through NFATc1-ERK5 pathway

DING Ning[1,2], YAN Liang[1,2], WAN Lang[1,2], XIA Yayi[1,2]
1. Institute of Orthopedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory for Orthopedics of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To discuss the interrelation between nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) and extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5), and explore the fluid shear stress (FSS)-induced signal pathway that regulates the expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP7). **Methods** The experiment was divided into 6 groups, namely control group, FSS group, CsA (Cyclosporin, NFATc1 inhibitor) group, XMD8-92 (ERK5 inhibitor) group, FSS+CsA group, and FSS+XMD8-92 group. Western Blot was applied to access the expression level of NFATc1, ERK5, p-ERK5 and BMP7. **Results** 12 dyn/cm² FSS for 45 min well promoted the level of NFATc1 and p-ERK5 in osteoblasts. 400 nmol/L CsA for 30 min effectively inhibited the expression of NFATc1 and the phosphorylation of ERK5, but 5 μmol/L XMD8-92 for 1 h only blocked the phosphorylation of ERK5, without causing effects on NFATc1. The expression level of BMP7 in MC3T3-E1 cell was promoted by FSS, and either CsA or XMD8-92 significantly inhibited the expression of BMP7. **Conclusion** FSS mediates the phosphorylation of ERK5 in osteoblasts by NFATc1, and BMP7 regarded as downstream target of ERK5 was regulated by NFATc1-ERK5 pathway.

Keywords: nuclear factor of activated T cells c1; extracellular-regulated protein kinase 5; bone morphogenetic protein 7; fluid shear stress; osteoblast

前 言

流体剪切力（Fluid Shear Stress, FSS）作为一种骨组织内普遍存在的机械刺激，时刻影响着骨组织微环境内信号传导及代谢水平[1]。多篇研究已经证实，对成骨细胞加载 FSS 能够通过调控 ERK5（Extracellular-Regulated Protein Kinase 5）磷酸化以促进成骨细胞增殖[2-3]。ERK5 是 MAPK（Mitogen-Activated Protein Kinase）家族中的一员，被发现在多种细胞中参与调控细胞功能[4-6]。我们课题组前期研究表明，成骨细胞中 ERK5 介导 FSS 通过调节细胞周期蛋白 cyclin B1、CDK1 促进增殖[3]，同时 ERK5 在 FSS 作用下，抑制 AKT-FoxO3a-Bim/FasL 通路，最终通过抑制 caspase 通路抑制成骨细胞凋亡[7]。显然 ERK5 接受 FSS 信号对成骨细胞产生正性调控作用。NFATc1（Nuclear Factor of Activated T

Cells c1）是一种转录因子[8]，在肿瘤细胞[9-10]、内皮细胞[11]等中被证实具有显著促进增殖和分化作用。Atp6v0d2、DC-STAMP[12]、V-ATPase d2[13]、Cathepsin K[14]、TRAP[15]、ITGB3[16]以及TLR通路[17]等均能被NFATc1调控。实验表明NFATc1能够促进肿瘤细胞增殖，并且与ERK1/2和p38等MAPK家族其他成员具有调节关系[10]。目前对于NFATc1的研究大多在成骨细胞外的其他细胞中，而且NFATc1和ERK5关系更不清楚。而Ayse等[18]发现NFATc1在成骨细胞中能够感受细胞外FSS的刺激，这表明NFATc1和ERK5一样能够参与细胞外机械信号传导。BMP7是骨形态发生蛋白（Bone Morphogenetic Protein, BMP）家族中的一员，属于TGF-β超家族[19]，包括BMP7在内的BMP2和BMP4为目前研究较多的成员[20]。BMP7能有效诱导成骨细胞矿化以及软骨细胞分化，起到强化骨质的作用[20]。但对于成骨细胞中BMP7如何被调控的研究很少。根据上述研究现状，我们的实验将研究讨论FSS作用下，NFATc1和ERK5之间调控关系，以及FSS作用下BMP7在成骨细胞中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

α-MEM培养基（Hyclone，美国），胎牛血清（四季青，中国），青霉素-链霉素双抗（碧云天，中国），XMD8-92（TOCRIS bioscience，美国），CsA（美仑生物，中国），PMSF和RIPA（碧云天，中国）。BMP7抗体（bioworld，美国），p-ERK5抗体（Cell Signaling Technology，美国），NFATc1、ERK5抗体（abcam，美国），β-actin抗体、山羊抗兔抗体、山羊抗小鼠抗体（中山金桥，中国）。

1.2 细胞培养

MC3T3-E1细胞购自中国医学科学院细胞库。用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的α-MEM培养基中在37 ℃、5% CO_2条件下进行培养和传代。

1.3 FSS加载

将细胞消化为悬液后，按照$1×10^6$个细胞密度接种于20 mm×50 mm无菌盖玻片上，待细胞贴壁后加入培养基培养。用无血清饥饿处理玻片上的细胞6 h后给予5 μmol/L XMD8-82 1 h、不同浓度CsA 30 min以及不加任何抑制剂等措施干预后，将玻片放入FSS加载系统小室内，给予12 dyn/cm² FSS 45 min。

1.4 Western Blot

加载FSS结束后，用预冷PBS冲洗后用还有1 mmol/L PMSF的RIPA裂解液裂解玻片上的细胞并收集，4 ℃ 14 000 r/min离心20 min后收集上清液，按照比例加入蛋白上样缓冲液煮沸备用。在聚丙烯酰胺凝胶上样孔中加入不同干预组蛋白样品，电泳结束后，贴覆PVDF膜于胶面进行转膜，结束后取出PVDF膜用脱脂奶粉进行封闭，随后一抗孵育过夜，二抗孵育，TBST清洗后滴加显影液进行曝光显影。影像结果用Image Pro Plus 6.0软件量化处理。

1.5 统计学方法

用SPSS 19.0软件进行统计学分析，每组均至少进行3次独立实验收集数据，所有数据用均数±标准差表示，各组间统计使用Oneway ANOVA方法，$P<0.05$为统计学有显著意义。

2 结 果

2.1 FSS活化ERK5

本课题组前期实验结果发现成骨细胞中加载12 dyn/cm² FSS 45 min时，ERK5磷酸化水平会达到高峰[2]，因此本实验同样给予MC3T3-E1细胞12 dyn/cm² FSS 45 min干预。如图1所示，成骨细胞中ERK5与对照组相比被显著磷酸化（$P<0.001$），当细胞在加载FSS前预处理5 μmol/L XMD8-92作用1 h时[3]，ERK5磷酸化水平与单纯加载FSS组相比明显减低（$P<0.001$），并与对照组无差异。显然FSS能够有效活化ERK5为p-ERK5，XMD8-92作为ERK5抑制剂能有效阻断FSS对ERK5的调控作用。

2.2 FSS促进NFATc1表达

给予不同浓度CsA，即200、400、800 nmol/L和1、2 μmol/L后给予FSS，NFATc1表达量随CsA浓度增加逐渐降低（图2），CsA 400 nmol/L 30 min干预对NFATc1的表达有明显抑制（图2，$P<0.01$），因此本实验给予CsA 400 nmol/L浓度进行干预。如图2和图3所示，用12 dyn/cm² FSS处理成骨细胞后，发现NFATc1表达量同样能有明显升高（$P<0.001$），而CsA能显著阻止FSS对NFATc1表达的促进作用（$P<0.001$）。因此可以确定FSS能够提升成骨细胞中NFATc1表达量，而CsA能够很好抑制细胞外FSS的信号传递给NFATc1。

2.3 NFATc1介导FSS活化ERK5

为进一步研究NFATc1和ERK5在FSS信号传导通路中的相互关系，对MC3T3-E1细胞在加载FSS前分别给予XMD8-92和CsA抑制，检测NFATc1和p-ERK5在不同条件下量的变化差异。上述实验已经证实，FSS能提高NFATc1表达以及p-ERK5水平（图1~3，$P<0.001$）。给予CsA后，不仅NFATc1表达量显著降低（图4，$P<0.001$），ERK5磷酸化水平也随之降低（图4，$P<0.001$）。相比之
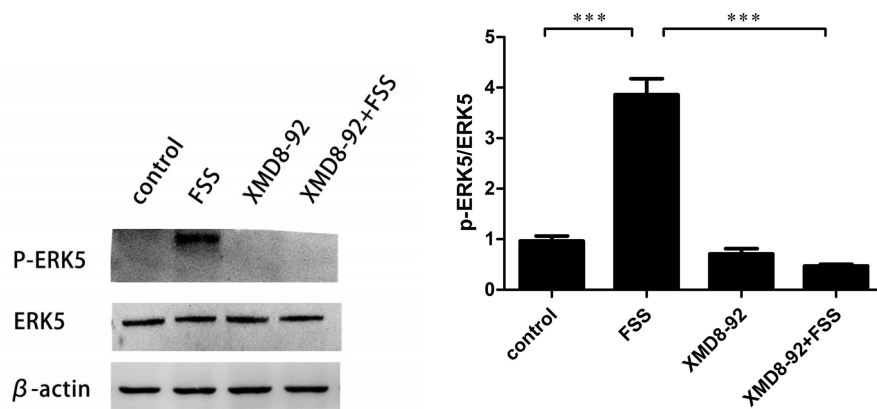
图1 Western Blot检测FSS伴或不伴XMD8−92干预的p−ERK5和ERK5表达（***$P < 0.001$）

Fig. 1 Expression of p−ERK5 and ERK5 intervened by FSS with or without XMD8−92 detected by Western Blot (*$P < 0.001$)**

ERK5: Extracellular-regulated protein kinase 5; FSS: Fluid shear stress
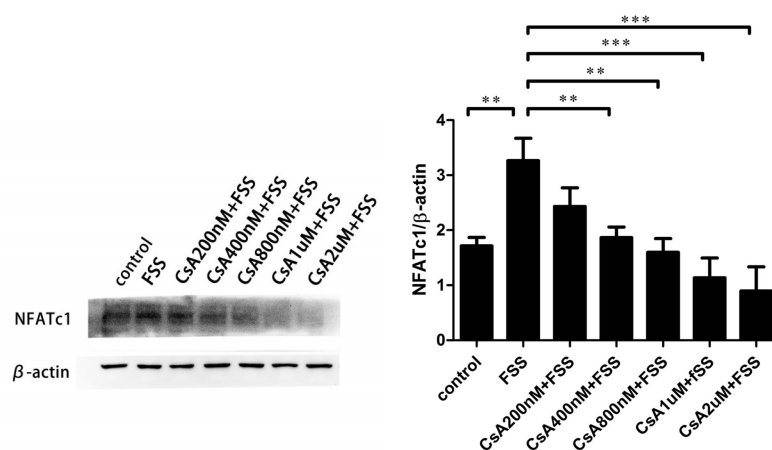

图2 Western Blot检测不同剂量CsA干预的NFATc1表达（** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$）

Fig.2 Expression of NFATc1 intervened by different dose of CsA detected by Western Blot ($P < 0.01$, ***$P < 0.001$)**
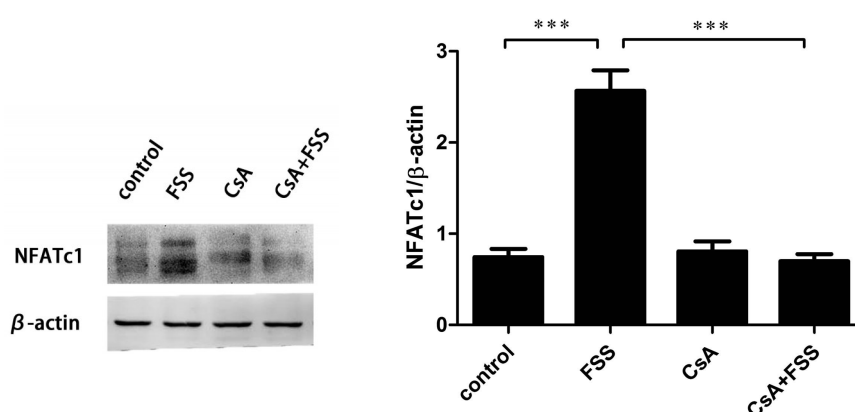

图3 Western Blot检测FSS伴或不伴CsA干预的NFATc1表达（***$P < 0.001$）

Fig.3 Expression of NFATc1 intervened by FSS with or without CsA detected by Western Blot (*$P < 0.001$)**

下，给予XMD8-92干预，仅有p-ERK5水平降低（图4，$P < 0.001$），而NFATc1表达量并没有被XMD8-92影响。上述结果显示，抑制NFATc1表达的同时能够抑制ERK5活化，但对于ERK5的抑制却对NFATc1的表达没有影响。这样可以得出NFATc1在FSS作用成骨细胞信号通路中是ERK5上游因子，NFATc1介导FSS活化ERK5。
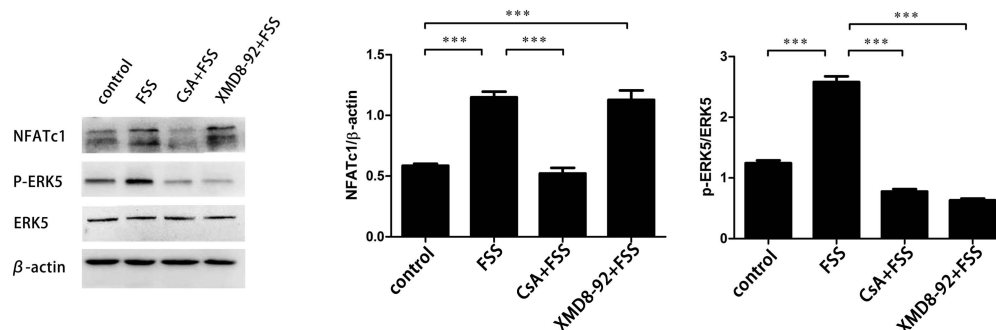
图4　Western Blot检测FSS伴或不伴CsA或XMD8−92干预的NFATc1、p−ERK5和ERK5表达（*** *P*＜0.001）

Fig.4 Expression of NFATc1, p−ERK5 and ERK5 intervened by FSS with or without CsA or XMD8−92 detected by Western Blot (*** *P* < 0.001)

2.4　FSS通过NFATc1-ERK5调控BMP7表达

为进一步研究成骨细胞中BMP7表达的调控通路，对成骨细胞进行FSS处理后发现BMP7蛋白表达量与对照组相比显著提升（图5，*P*<0.001），这与之前实验结果相符合。而在加载FSS前分别给予CsA和XMD8-92干预的两组中，BMP7表达量均与FSS组相比明显降低（图5，*P*<0.001），而与对照组水平近似。显然，BMP7能被FSS促进表达，抑制NFATc1和ERK5任何一个均能使BMP7的表达量减低，则BMP7为NFATc1和ERK5共同的下游效应因子，因此BMP7接受FSS的正性调节过程受NFATc1-ERK5信号通路调控。
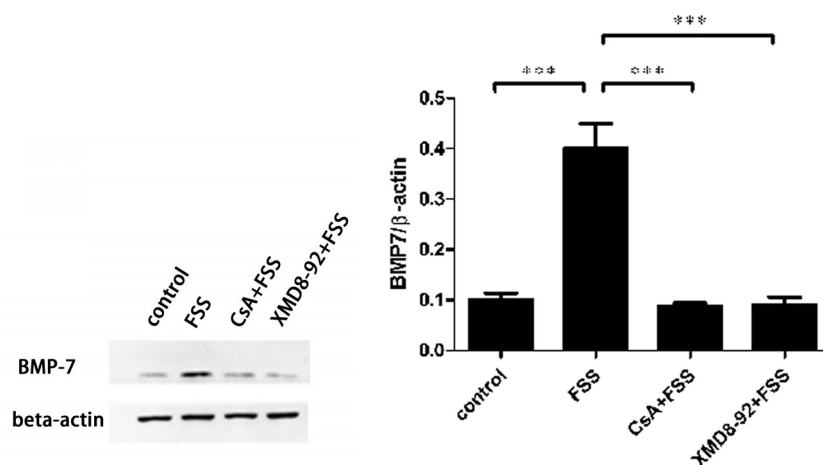

图5　Western Blot检测FSS伴或不伴CsA或XMD8−92干预的BMP7表达（****P*＜0.001）

Fig.5 Expression of BMP7 intervened by FSS with or without CsA or XMD8−92 detected by Western Blot (****P*＜0.001)

BMP7: Bone morphogenetic protein 7

3　讨　论

ERK5是介导FSS刺激成骨细胞增殖过程中的关键因子[21]，同时NFATc1能够在肿瘤细胞[10]、平滑肌细胞[22]及破骨细胞[12]等中起到促进增殖、分化以及功能发挥的作用，但对NFATc1和ERK5相互关系以及成骨细胞中的作用目前没有研究。而且BMP7是影响成骨功能的重要因子，然而对于其在成骨细胞中受调控机制报道很少[19]。本实验证实，FSS作为一种影响骨组织关键性的机械性因素，能够促进成骨细胞中NFATc1表达，并首次提出FSS通过NFATc1调节ERK5磷酸化活化，而BMP7的表达受FSS作用升高可接受NFATc1-ERK5通路调控。

骨组织内微孔中的液体在压力形变驱动下流动，产生对骨组织面的剪切应力，研究表明生理剂量FSS强度为0.8~3.0 Pa（N/m²），12 dyn/cm²的FSS为中等大小[23]，前期研究结果显示12 dyn/cm²对成骨细胞中ERK5具有明显激活作用[2, 21]，这也符合生理条件下FSS的效应。

ERK5是MAPK家族中的一员，在细胞中普遍存在，参与细胞周期进程、增殖以及凋亡过程。研究表明，ERK5参与细胞周期G1向S期转化，同时参与调控cyclin D1等与细胞周期相关的蛋白表达[24]。研究发现，ERK5能够促进COX-2在成骨细胞中表达，而

抑制 ERK5 后，CREB 和 NFA-κB 活化同样受到抑制[25]，显然 ERK5 对于成骨细胞正性调控具有十分重要的意义。NFATc1 是 NFAT 转录因子家族中的一员，包括 NFATc1、NFATc2、NFATc3、NFATc4 和 NFAT5，能够参与信号转导通路或直接与 DNA 结合转录多种因子，存在于多种细胞中并对其增殖、分化以及功能发挥起着重要作用[11, 16]，但对成骨细胞少有涉及，而且探究 NFATc1 与机械外力刺激的报道也很少。本研究证实成骨细胞中 NFATc1 能够接受细胞外 FSS 传导的信号，而且在 FSS 作用下 NFATc1 表达升高，这与之前的报道相符合。而 NFATc1 与 ERK5 关系的研究目前还没有，仅少数几篇文章探讨 NFATc1 与 MAPK 家族其他成员间的关系。2016 年，Xu 等[10]实验证实 NFATc1 促进卵巢癌细胞增殖是通过活化 ERK1/2 和 p38 实现的，显然 NFATc1 调控 ERK1/2 和 p38，NFATc1 是 ERK1/2 和 p38 的上游因子。但也有研究发现破骨细胞中 NFATc1 能被 p38 调控[26]，而且 ERK1/2 抑制剂 PD98059 能阻碍 NFATc1 表达[27]，这表明 NFATc1 为 p38 和 ERK1/2 因子的下游。目前对于 NFATc1 与 ERK1/2 和 p38 之间的调控关系存在矛盾，可能是由于细胞种类或者实验条件等因素引起。本实验对于 NFATc1 和 ERK5 之间关系的研究是一种很好的补充，首次提出成骨细胞中 FSS 作用下 ERK5 受 NFATc1 调控。

BMP7 是成骨细胞功能发挥的关键效应因子，能够反应成骨细胞功能状态，对骨和软骨形成和再生有重要作用[20]。之前的实验发现 ERK5 可以参与调控 BMP7mRNA 表达升高[28]，本实验也进一步证实在蛋白水平，ERK5 接受 FSS 刺激能够提高 BMP7 表达水平。同时也发现 BMP7 能够接受 NFATc1 调节，进一步提出 BMP7 的表达受 NFATc1 调控的 ERK5 调节，通过 NFATc1-ERK5 信号通路在细胞外 FSS 作用下表达升高。本实验丰富了成骨作用分子机制，为预防及对抗骨质疏松提供理论基础。此外，如前所述 NFATc1 是一种转录因子，能参与转录调节多种蛋白，是否存在 NFATc1 调控的其他通路影响 BMP7 表达还有待进一步研究。

综上所述，本实验表明 NFATc1 接受 FSS 刺激并使其表达量升高，同时 NFATc1 介导 FSS 对 ERK5 活化，FSS 通过 NFATc1 调控 ERK5。另外 BMP7 在成骨细胞中可通过 NFATc1-ERK5 信号通路接受 FSS 刺激从而表达升高。

【参考文献】

[1] THOMPSOM W R, RUBIN C T, RUBIN J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone[J]. Gene, 2012, 503(2): 179-193.

[2] LI P, MA Y C, SHENG X Y, et al. Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2): 321-327.

[3] ZHANG B, GENG B, WANG J, et al. Fluid shear stress promotes osteoblast proliferation *via* the the Gαq-ERK5 signaling pathway[J]. Connect Tissue Res, 2016, 57(4): 299-306.

[4] NURIA L M, NEREA A V, LLUIS F, et al. Extracellular signal regulated kinase 5 mediates signals triggered by the novel tumor promoter palytoxin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 53(7): 253-261.

[5] PEREZ M D, FINEGAN K G, PARAMO B, et al. The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs)[J]. Cell Signal, 2012, 24(12): 2360-2368.

[6] WANG X, PESAKHOV S, WENG A, et al. ERK 5/MAPK pathway has a major role in 1alpha, 25-(OH)$_2$ vitamin D3-induced terminal differentiation of myeloid leukemia cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 144(Pt A): 223-227.

[7] GENG B, ZHANG B, WANG J, et al. Fluid shear stress suppresses TNF-α-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways[J]. Exp Cell Res, 2016, 343(2): 208-217.

[8] HIROSHI T, SUNHWA K, TAKAKO K, 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.

[9] PAN M G, XIONG Y, CHEN F. NFAT gene family in inflammation and cancer[J]. Curr Mol Med, 2013, 13(4): 543-554.

[10] XU W W, GU J J, REN Q L, et al. NFATC1 promotes cell growth and tumorigenesis in ovarian cancer up-regulating c-Myc through ERK1/2/p38 MAPK signal pathway[J]. Tumor Biol, 2016, 37(4): 4493-4500.

[11] JOHNSON E N, LEE Y M, SANDER T L, et al. NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(3): 1686-1692.

[12] KIM K, LEE S H, HA KIM J, et al. NFATc1 induces osteoclast fusion *via* up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(1): 176-185.

[13] FENG H T, CHENG T, JAMES H S, et al. Myocyte enhancer factor 2 and microphthalmia-associated transcription factor cooperate with NFATc1 to transactivate the V-ATPase D$_2$ promoter during RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(21): 14667-14676.

[14] DRAKE F H, DODDS R A, JAMES I E, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts[J]. J Biol Chem, 1996, 271(21): 12511-12516.

[15] NOBUMITSE S, YOSHITAKA Y, YOSHIAKI D, et al. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264. 7 cells [J]. Int J Mol Med, 2008, 21(3): 291-296.

[16] ISHIYAMA K, YASHIRO T, NAKANO N, et al. Involvement of PU.1 in NFATc1 promoter function in osteoclast development[J]. Allergol Int, 2015, 64(3): 241-247.

[17] ZHANG P, LIU J Z, XU Q G, et al. TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by porphyromonas gingivalis through differential induction of NFATc1 and NF-kappaB[J]. J Biol Chem, 2011, 286(27): 24159-24169.

[18] AYSE B A, STEPHENIE L, DAEWON K, et al. Nuclear factor of activated T cell mediates proinflammatory gene expression in response to mechanotransduction[J]. Ann NY Acad Sci, 2007, 1117(1): 138-142.

［19］EICHNER A, BROCK J, HELDIN C H, et al. Bone morphogenetic protein-7 (OP1) and transforming growth factor-beta1 modulate 1, 25 (OH)$_2$-vitamin D3-induced differentiation of human osteoblasts［J］. Exp Cell Res, 2002, 275(1): 132-142.

［20］HANKENSON K D, GAGNE K, SHAUGHNESSY M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration ［J］. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 94: 3-12.

［21］LI P, MA Y C, SHEN H L, et al. Cytoskeletal reorganization mediates fluid shear stress-induced ERK5 activation in osteoblastic cells［J］. Cell Biol Int, 2012, 36(3): 229-236.

［22］VENKATESH K S, NIKHLESH K S, SANJAY K, et al. Nuclear factor of activated T cells c1 mediates p21-activated kinase 1 activation in the modulation of chemokine-induced human aortic smooth muscle cell F-actin stress fiber formation, migration, and proliferation and injury-induced vascular wall remodeling［J］. J Biol Chem, 2013, 288 (30): 22150-22162.

［23］BRAND R A, STANFORD C M, NICOLELLA D P. Primary adult human bone cells do not respond to tissue (continuum) level strains ［J］. J Orthop Sci, 2001, 6(3): 295-301.

［24］张成俊, 夏亚一, 王常德, 等. 流体切应力促成骨细胞通过细胞周期 G1/S调控点机制的研究［J］. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(17): 1338-1343.

ZHANG C J, XIA Y Y, WANG C D, et al. Fluid stress with multiple mechanisms to enhance the cell cycle progression of osteoblastic cells from G$_1$ to S phase［J］. Orthopedic Journal of China, 2009, 17(17): 1338-1343.

［25］JIANG J, ZHAO L G, TENG Y J, et al. ERK5 signalling pathway is essential for fluid shear stress-induced COX-2 gene expression in MC3T3-E1 osteoblast［J］. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1-2): 237-243.

［26］MATSUMOTO M, KPGAWA M, WADA S, et al. Essential role of p38 mitogen- activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1［J］. J Biol Chem, 2004, 279(44): 45969-45979.

［27］JU H O, JAE Y L, SWUNG H J, et al. Insulin enhances RANKL-induced osteoclastogenesis *via* ERK1 2 activation and induction of NFATc1 and Atp6v0d2［J］. Cell Signal, 2015, 27(12): 2325-2331.

［28］滕元君, 赵良功, 陈少龙, 等. ERK5信号通路介导流体剪切力对成 骨细胞BMP2/BMP7mRNA表达的影响［J］. 中国医学物理学杂志, 2014, 31(1): 4691-4698.

TENG Y J, ZHAO L G, CHEN S L, et al. Fluid shear stress regulates BMP2/BMP4 mRNA expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells *via* ERK5 signaling pathway［J］. Chinese Journal of Medical Physics, 2014, 31(1): 4691-4698.

（编辑：陈丽霞）