

香豆雌酚对去卵巢大鼠成骨细胞 MT1-MMP 和 TIMP-1 基因表达的影响

吴小涛 陈晓钢 许勇 韦继南 蒋赞利 王运涛

摘要:目的 通过观察香豆雌酚(Coumestrol)对去卵巢骨质疏松模型大鼠成骨细胞膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)及其抑制因子TIMP-1(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1)基因表达的作用,探讨香豆雌酚治疗绝经后骨质疏松的可能的分子机制。方法 利用去卵巢大鼠骨质疏松(OVX)模型,观察香豆雌酚对骨密度和骨组织形态计量学参数的影响,行原位杂交检测OVX大鼠胫骨近端成骨细胞中MT1-MMP、TIMP-1 mRNA表达,免疫组化检测骨组织MT1-MMP、TIMP-1蛋白表达。结果 COU组大鼠(经coumestrol处理)第3~5腰椎骨密度(0.165 ± 0.015)较OVX组(0.143 ± 0.014)明显增加,骨小梁体积比(32.7 ± 7.9)厚度(43.3 ± 6.7)和数目(5.5 ± 0.9)分别较OVX组(9.7 ± 3.3)(35.7 ± 8.1)(2.5 ± 0.6)明显升高,COU组骨小梁间隔(165.4 ± 27.1)较OVX组(591.1 ± 113.8)明显减小;COU组成骨细胞MT1-MMP mRNA与蛋白质表达上调,而TIMP-1基因表达无差异。结论 MT1-MMP低表达是发生绝经后骨质疏松的分子机制之一,香豆雌酚可使成骨细胞MT1-MMP基因表达上调,对TIMP-1表达无明显影响。

关键词:骨质疏松;香豆雌酚;成骨细胞;金属蛋白酶

Effects of coumestrol on the expression of MT1-MMP and TIMP-1 in osteoblast of ovariectomized rats

WU Xiaotao, CHEN Xiaogang, XU Yong, et al. Department of Orthopaedics, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To investigate the effect of coumestrol on the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in osteoblast of ovariectomized rats in order to find the possible molecular mechanism of this therapy. **Methods** The adult ovariectomized rat models (OVX) with osteoporosis were used in this study to characterize the changes of BMD and parameters of histomorphometry of bone samples after treatment with coumestrol. In situ hybridization of the proximal tibia bone samples were used to document the synthesis of MT1-MMP and TIMP-1 mRNA, and immunohistochemistry of bone samples were used to characterize the changes of MT1-MMP and TIMP-1 protein.

Results BMD of the lumbar spine (L3-5) increased significantly in COU group (0.165 ± 0.015) compared with OVX group (0.143 ± 0.014). For histomorphometry, there were also significant changes of trabecular volume ratio (32.7 ± 7.9) thickness (43.3 ± 6.7) and numbers (5.5 ± 0.9) in treated group and the parameters of OVX group were (9.7 ± 3.3) (35.7 ± 8.1) (2.5 ± 0.6) respectively. The trabecular interval of COU group (165.4 ± 27.1) decreased sharply than OVX group (591.1 ± 113.8). MT1-MMP mRNA and protein production from Osteoblast showed an increase in treated group; the expression of TIMP-1 mRNA and protein was unaffected. **Conclusion** MT1-MMP plays an important role in the estrogen-deficient bone loss. Coumestrol decreases the bone turnover rates by up-regulating the MT1-MMP expression in osteoblast to prevent and treat osteoporosis.

Key words: Osteoporosis; Coumestrol; Osteoblasts; MMP

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是老年女性的一种常见病、多发病。雌激素

水平的下降或缺乏是导致PMOP的重要因素之一。成骨细胞作为雌激素作用的重要靶细胞,可分泌多种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs),后者在骨重建的各环节中发挥调控作用。雌激素替代治疗(estrogen replacement treatment ERT)是经典的

防治绝经后骨质疏松症的治疗方法,但由于其具有较多的副作用,在临床上的长期应用中还存在着较多的禁忌症和疑虑。植物雌激素新近被提出用于骨质疏松症的药物治疗。香豆雌酚(Coumestrol)是香豆素的典型代表,其化学结构与 17β -雌二醇相似,都含有多个羟基,可以与雌激素受体(ER)结合,且在植物雌激素中Coumestrol与ER的亲合力最大,但由于Coumestrol结构上不含有甾环结构和具有对ER的选择性,其对生殖系统的副作用弱于雌激素,因此,作为植物雌激素的一种,Coumestrol对骨代谢的作用值得关注^[1-3]。我们利用去卵巢大鼠骨质疏松模型,观察了香豆雌酚对去卵巢大鼠胫骨成骨细胞中MT1-MMP及其抑制因子TIMP-1表达水平的改变,旨在探讨PMOP的防治中香豆雌酚作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

36只6月龄雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠(东南大学实验动物中心提供,合格证号:05042209),重量(246 ± 25.3)g。随机分为去卵巢模型组(ovariectomized,OVX),香豆雌酚组(coumestrol group, COU), 17β -雌二醇组(17β -estradiol, E_2)和假手术组(sham group, SHAM),每组各9只。只行手术不切除卵巢为SHAM组;其余大鼠均行双侧卵巢切除,其中不予药物处理为OVX组;COU组、ERT组大鼠于术后每日分别予以coumestrol(美国Sigma公司)、 E_2 (南京建成生物试剂公司)各 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 灌胃^[4]。术后继续饲养16周,分别于处死前14d和前4d在大鼠腹腔内注射0.5%钙黄绿素 $0.1 \text{ ml}/100 \text{ g}$ 体重,最后用3%戊巴比妥 $0.1 \text{ ml}/100 \text{ g}$ 体重麻醉后,颈椎脱臼处死大鼠^[5]。

1.2 骨标本塑料包埋及切片处理

取大鼠右侧胫骨近端1/3,剔除周围肌肉结缔组织。将骨组织置于4%多聚甲醛溶液(pH 7.4,含0.1%DEPG)中固定24h,其后在 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ PBS缓冲液(pH 7.4)浸洗12h。脱水程序为70%乙醇2d,95%乙醇2d,100%乙醇2d,二甲苯2d。接着,标本依次在塑料聚合液I液、II液、III液中各浸润3d^[6]。以上固定、脱水和浸润过程均在 4°C 环境中进行。其后,将 $400 \mu\text{L}$ N,N-二甲基-对苯甲胺(N,N-dimethyl-p-toluidine)(Sigma公司)加入到100ml预冷(4°C) III液中,搅拌数分钟后,迅速倒入20ml玻璃包埋瓶中,再放骨标本。用 CO_2 排空包埋瓶中氧

气,密封瓶塞后,置于 -20°C 冰箱中低温聚合3d。之后,将组织块修成 $2.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 大小,暴露骨组织面。重型切片机(HM 360,德国Zeiss公司)沿胫骨纵向非连续切片,普通切片厚 $4 \mu\text{m}$,荧光观察切片厚 $10 \mu\text{m}$ 。切片贴附于明胶-铬矾处理过的载玻片, 37°C 烤36h后备用。

1.3 骨密度(BMD)分析与骨组织形态计量学参数测量

大鼠处死前用扇形束DEXA骨密度仪(美国Epsonlyco公司)及所附小动物梯级标准模型和分析软件行腰椎扫描,自动分析得出大鼠各腰椎(L_{3-5})的BMD,仪器精密度(CV)为0.46%。

骨标本切片用TCS-SP型激光扫描共聚焦显微镜(LSCM,德国Leica公司)观察钙黄绿素的荧光标记。应用随机附带软件进行图像测量分析骨计量学静态和动态指标。静态指标包括骨小梁面积百分率、骨小梁厚度、骨小梁数目以及骨小梁间隔,动态指标包括骨形成率、矿物质沉积率和标记百分数。以上指标均采用国际通用的标准骨组织形态计量学术语命名和计算^[7]。

1.4 原位杂交

地高辛标记的MT1-MMP和TIMP-1寡核苷酸探针及检测试剂盒由南京建成生物试剂公司设计和提供。其中MT1-MMP序列:5'-GAGTG CCTGA CCCTG GTGCC TTGAT CAGTG GTGCT-3', 5'-AGGCT CCGAG AAATG CAGTC TATCT TGATC GATTC-3'。TIMP-1序列:5'-ACCAC CTTAT AGCAG CGTTA TGAGA TCAAG ATGAC-3', 5'-CACAG GTCCC ACAAC CGCAG CGAGG AGTTT CTCAT-3'。切片脱塑水化,行预处理,杂交(探针浓度为 $3 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $37^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 杂交18h),杂交后处理,AEC显色。用省去探针的杂交液代替探针作阴性对照,用已知的阳性片作阳性对照。

1.5 免疫组化

切片脱塑水化,用3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性后,置于 $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ 的枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中抗原微波修复15min;山羊抗血清封闭10min,其后分别滴加兔抗MT1-MMP(1:20)和TIMP-1(1:30)多克隆抗体 $30 \mu\text{L}$ (美国Sigma公司) 4°C 孵育过夜。接着滴加生物素化的山羊抗兔IgG(二抗)室温下孵育30min, $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ PBS冲洗;SABC室温下孵育30min, $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ PBS冲洗;AEC显色,苏木素复染,水溶性封片剂封片。用正常胎盘组织作阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。成骨细胞胞浆呈红色为阳性细胞,在200高倍镜视野下计数阳性

染色的成骨细胞数和整张切片的成骨细胞数,两者比值为阳性表达百分数^[8]。

1.6 统计学处理

用 SPSS 11.0 软件包进行统计分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用方差分析,两均数用 *t* 检验。

2 结果

2.1 BMD 和骨组织形态计量学

OVX 组大鼠 L₃₋₅ BMD 与 SHAM 组比较显著减少 ($P < 0.05$), COU 组较 OVX 组 BMD 明显升高 ($P < 0.05$),但 COU 组较 E₂ 组 BMD 降低,两者间差异有显著性 ($P < 0.05$)。在骨形态计量学静态指标中,OVX 组大鼠骨小梁体积百分比较 SHAM 组下降 12% ($P < 0.05$),骨小梁厚度降低、数目减少以及间隔增宽与 COU 组比较差异有显著性,而 COU 组与

E₂ 组差异无显著性。动态指标分析结果显示 OVX 组骨形成率、矿物质沉积率和标记百分数较 SHAM 组、COU 组明显上升 ($P < 0.05$)。以上结果表明本实验 6 月龄大鼠去卵巢手术后 16 周有明显的松质骨丢失,伴骨形成加速,骨转换率增加,呈 PMOP 动物模型的特点;COU 组骨转换率与 SHAM 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。(见表 1~2)。

表 1 大鼠腰椎 BMD 测定结果 ($\bar{x} \pm s$, g/cm², n = 9)

组别	L ₃	L ₄	L ₅
OVX 组	0.142 ± 0.012	0.144 ± 0.013	0.145 ± 0.017
SHAM 组	0.169 ± 0.016	0.173 ± 0.017	0.172 ± 0.018
COU 组	0.162 ± 0.014	0.167 ± 0.012	0.166 ± 0.015
E ₂ 组	0.171 ± 0.015	0.175 ± 0.016	0.175 ± 0.019

注:与 SHAM 组比较, $P_{OVX} < 0.05$; 与 OVX 组比较, $P_{COU} < 0.05$; 与 E₂ 组比较, $P_{COU} < 0.05$

表 2 大鼠胫骨近端骨计量学测定结果 ($\bar{x} \pm s$, n = 9)

组别	OVX 组	SHAM 组	COU 组	E ₂ 组
骨小梁体积比* (%)	9.7 ± 3.3	21.7 ± 4.6	32.7 ± 7.9	33.4 ± 7.7
骨小梁厚度* (μm)	35.7 ± 8.1	43.8 ± 6.8	43.3 ± 6.7	43.9 ± 8.0
骨小梁数目* (个/mm)	2.5 ± 0.6	4.4 ± 0.5	5.5 ± 0.9	5.6 ± 1.2
骨小梁间隔* (μm)	591.1 ± 113.8	252.3 ± 39.4	165.4 ± 27.1	170.1 ± 32.3
骨形成率** (%)	607.3 ± 272.4	284.7 ± 148.8	278.9 ± 84.4	209.4 ± 83.1
矿物质沉积率** (μm/d)	1.9 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.2
标记百分数** (%)	21.9 ± 7.3	15.9 ± 4.2	15.6 ± 4.1	11.3 ± 3.1

注:与 SHAM 组比较,* $P_{OVX} < 0.05$; 与 OVX 组比较, $P_{COU} < 0.05$; 与 SHAM 组比较,** $P_{COU} > 0.05$

2.2 原位杂交与免疫组化

OVX 组与 COU 组相比,表达 MT1-MMP mRNA 和蛋白的成骨细胞数目差异有显著性 ($P < 0.05$),但表达 TIMP-1 的成骨细胞阳性率无明显改变,见表 3。除成骨细胞外,部分衬里细胞和骨髓腔中一些散在单核细胞中也有 MT1-MMP 和 TIMP-1 的阳性表达。

表 3 不同处理组 MMT-MMP 和 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, %, n = 9)

组别	MT1-MMP*		TIMP-1**	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
OVX 组	14.8 ± 3.6	16.0 ± 4.1	23.9 ± 4.7	24.5 ± 5.8
SHAM 组	21.5 ± 3.1	23.3 ± 2.7	21.6 ± 3.2	24.6 ± 4.3
COU 组	34.9 ± 4.2	37.0 ± 5.3	23.7 ± 5.4	24.4 ± 4.3
E ₂ 组	36.4 ± 5.5	39.0 ± 6.2	22.1 ± 5.9	22.9 ± 3.2

注:与 SHAM 组比较,* $P_{OVX} < 0.05$; 与 OVX 组比较, $P_{COU} < 0.05$; 与 OVX 比较,** $P_{COU} > 0.05$

3 讨论

绝经后骨质疏松症(Postmenopaus osteoporosis ,

PMOP)是指绝经后妇女由于体内卵巢功能低下,雌激素明显减少,骨偶联过程失衡,导致骨量减少,骨强度降低,骨脆性增加,易于发生骨折的代谢性骨病。雌激素替代治疗是经典的防治绝经后骨质疏松性疾病的治疗方法,此疗法对减少绝经后的快速骨丢失,降低骨折发生率,缓解骨质疏松症造成的疼痛,改善更年期症状均有肯定的效果。但是,以雌二醇为代表的雌激素在靶细胞中的代谢产物 4-羟基雌酮和 16 α -羟基雌酮可与染色体 DNA 结合使其损伤并进行错误修复,从而使雌激素靶组织肿瘤的发生率增高,与雌激素对靶细胞的促增殖作用相结合增加了乳腺癌及子宫内膜癌的发生率^[9]。植物雌激素(phytoestrogen)是一种由植物来源的非甾体类雌激素物质,属于选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators , SERMs),主要包括香豆素类、异黄酮类和木酚素类。Coumestrol 是香豆素的典型代表,其化学结构与 17 β -雌二醇相似,都含有多个羟基,可以与 ER 结合,具有雌激素样作用,但由

于 Coumestrol 结构上不含有甾环结构和具有对雌激素受体的选择性, Coumestrol 在保留雌激素治疗作用的同时, 去除其治疗中的副反应, 尤其是指对抗雌激素对子宫内膜、乳腺组织的刺激。因此, Coumestrol 的研究与开发为更年期综合征与绝经后骨质疏松的防治提供了新的思路。

金属基质蛋白酶(MMPs)是多种锌离子依赖性酶组成的能降解细胞外基质蛋白的酶系家族, 至今包括 17 个成员。膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)是最近发现的一种由成骨细胞表达的 MMP, 可降解活性肿瘤坏死因子- α (TNF- α)成无活性的小片段, 在骨吸收的调控中起重要作用^[8]。近年报道 17 β -雌二醇可诱导成骨细胞 MT1-MMP 表达, 提示绝经后雌激素不足可减少成骨样细胞 MT1-MMP 表达^[10]。

为了探讨雌激素缺乏性骨量丢失的病理机制, 我们对 6 月龄去卵巢骨质疏松模型大鼠进行了 16 周的观察研究。通过骨形态计量学分析表明, OVX 组大鼠与 SHAM 组相比, 骨代谢的静态学指标如骨小梁数目、骨小梁体积百分比分别下降了 1.9 个/mm 和 12%, 骨小梁间隔则由 252.3 μ m 上升至 591.1 μ m, 提示 OVX 大鼠胫骨近端骨量大量丢失。同时, 骨代谢动力学参数如骨形成率、矿物质沉积率和标记百分数分别升高 422.6%、0.7 μ m/d 和 6.0%, 说明 OVX 大鼠骨代谢活跃, 处于高骨转换状态, 而 COU 组、E₂ 组大鼠则能有效地抑制因卵巢切除所造成的骨计量学参数的改变。

骨组织的 TNF- α 主要由成骨细胞、基质细胞和单核细胞产生, 以 26000 前体蛋白形式由细胞膜进一步裂解为 17000 成熟蛋白, 向细胞外分泌。TNF- α 对骨代谢的影响是通过影响破骨细胞的增殖、分化、融合及成熟来介导的。TNF- α 刺激巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-6 的分泌, 后者促进破骨祖细胞的增殖; 还可通过前列腺素(PG) E₂ 诱导 RANKL 的表达并降低 OPG 的表达, 促进破骨细胞前体分化及成熟破骨细胞的功能, 从而使骨吸收增强。MT1-MMP 的重要功能为降解 TNF- α 。D'Ortho 等^[11]发现 MT1-MMP 首先将 26000 TNF- α 前体蛋白裂解为 17000 的 TNF- α 成熟蛋白, 然后迅速将其分解为 13000 的无活性小分子物质。因此, MT1-MMP 可通过降解 TNF- α 在骨吸收过程中起抑制作用。绝经后雌激素减少, MT1-MMP 表达也减少, 对 TNF- α 的降解作用减弱, TNF- α 刺激形成的破骨细胞和活性破骨细胞增多, 致骨吸

收和骨量丢失加速, 成为导致 PMOP 的因素之一。原位杂交及免疫组化结果表明: OVX 大鼠成骨细胞 MT1-MMP mRNA 与蛋白质表达下调; 香豆雌酚诱导体外培养成骨细胞 MT1-MMP 表达。香豆雌酚增强成骨细胞 MT1-MMP 表达, 从而使表达于成骨细胞、基质细胞和单核细胞膜表面和细胞外的 TNF- α 被 MT1-MMP 降解增多, 导致骨组织中 TNF- α 减少, 从而抑制了骨吸收。

TIMPs 为 MMPs 特异性抑制因子, 已经确认的 4 个相关蛋白包括 TIMP-1、2、3、4。TIMP-1 是 MMPs 活性的主要调节者, 受多种生长因子和细胞因子调节; 其 C 端肽链可以与 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-16 按 1:1 比例结合成高亲和力的酶聚合体, 使 MMP 无法与胶原相结合, 从而抑制了它们的酶解活性^[12]。本实验发现 COU 组与 OVX 组相比, 成骨细胞中 TIMP-1 的表达水平无明显改变, 提示香豆雌酚、17 β -雌二醇对 TIMP-1 mRNA 无明显调节作用, 可能是因为 TIMP-1 并非 MT1-MMP 的特异性抑制剂。

实验中发现骨小梁表面的部分衬里细胞中也有 MT1-MMP 和 TIMP-1 的阳性表达。Uchida M 等^[13]认为衬里细胞与成骨细胞具有同源性, 是成骨细胞处于静止期的形态表现, 因此衬里细胞中表达的 MMPs 可能也参与了骨重建的过程。此外, 在骨髓腔中的少量单核细胞也有 MT1-MMP 和 TIMP-1 的阳性表达。上述细胞的性质还不清楚, 可能是多能间充质细胞向成骨细胞分化中的一些前体细胞或祖细胞, 已初具成骨细胞的表型特征。

本实验研究表明, 因雌激素水平下降, 导致其对成骨细胞 MT1-MMP mRNA 表达的促进作用减弱, 同时对骨吸收刺激因子 TNF- α 的抑制作用降低, 骨重建过度激活, 骨转换率增加, 骨量丢失增加, 该途径可能是绝经后骨质疏松发病的又一重要机制。成骨细胞可分泌多种 MMP、TIMP, 应对其作全面检测, 以清楚了解骨吸收机制, 探索治疗 PMOP 的最佳方法。严继承等^[14]报道部分雌激素对细胞间隙连接通讯(gap functional intercellular communication, GJIC)有一定的影响, 而 GJIC 功能与肿瘤的关系十分密切, 且与肿瘤的恶性化程度相关, 大部分肿瘤细胞 GJIC 减弱甚至完全消失。所以 Coumestrol 对成骨细胞是否具有毒性作用以及其用于治疗 PMOP 时的剂量依赖关系, 将是我们今后研究工作的重要内容。

【参 考 文 献】

[1] Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of the phytoestrogen

- coumestrol on RANK-ligand-induced differentiation of osteoclasts. *Toxicology*, 2004, 203: 211-220.
- [2] Ganry O. Phytoestrogen and breast cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, 2002, 11: 519-522.
- [3] Morrissey C, Waisson RW. Phytoestrogens and prostate cancer. *Curr Drug Targets*, 2003, 4(3): 231-241.
- [4] Dang ZC, Lowik C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone, Vol 16, Issue 5. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2005, 16(5): 207-213.
- [5] Kanno, Sanae, Hirano, et al. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology*, 2004, 196: 137-145.
- [6] Liao EY, Luo XH, Wang WB, et al. Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. *Endocr Res*, 2003, (29): 23-42.
- [7] Editor. Histomorphometric terminology, appendix D. *Calcif Tissue Int*, 1998, 62: 8-9.
- [8] 廖慧娟, 廖二元, 罗湘杭, 等. MT1-MMP、MMP-2 和 TIMP-2 基因在去卵巢大鼠成骨细胞中的表达. *中华老年医学杂志*, 2003, 24(12): 738-742.
- [9] Sheman SP. Preventing and treating osteoporosis strategies at the millennium. *Am NY Acad Sci*, 2001, 12(949): 188-197.
- [10] Liao EY, Luo XH, Deng XG, et al. Effects of 17 β -estradiol on the expression of membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human osteoblastic MG-63 cell cultures. *J Endocrinol Invest*, 2001, 24(11): 876-881.
- [11] D'Ortho MP, Will H, Atkinson S, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, 1997, 751-757.
- [12] Aicher WK, Alexander D, Haas C, et al. Transcription factor early growth response 1 activity up-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts. *J Arthritis Rheum*, 2003, 46(2): 348-359.
- [13] Uchida M, Yamato H, Nagai Y, et al. Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metalloproteinase-13 *in vivo*. *J Bone Miner Metab*, 2001, 19(4): 207-212.
- [14] 严继承, 郑季彦, 郑一凡, 等. 几种植物雌激素对细胞间隙连接通讯的影响. *中华预防医学杂志*, 2005, 39(2): 126-129.

(收稿日期: 2007-03-30)