

Genistein 对乳腺癌细胞致成骨细胞生物学功能改变的影响

张燕燕 朱国英 顾淑珠 陈晓

中图分类号: R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)07-0506-07

摘要:目的 探讨 Genistein 对乳腺癌细胞致成骨细胞(osteoblast, OB)增殖、分化和矿化功能的影响,观察 Genistein 在乳腺癌骨转移的病理条件下是否能调节 OB 生物学功能。方法 源于大鼠颅盖骨的原代 OB 与 50% 来自人源性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 或 MCF-7 的条件培养基(conditioned medium, CM)共同培养,并加入 5×10^{-7} mol/L (G7)、 5×10^{-8} mol/L (G8)或 5×10^{-9} mol/L (G9)的 Genistein 进行干预。MTT 法观察其对 OB 增殖的影响;PNPP 偶氮法观察其对 OB 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性的影响;茜素红(SARS)进行矿化结节染色并计算面积以观察其对 OB 矿化能力的影响。结果 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞条件培养基可显著抑制 OB 的增殖。用 Genistein 干预 1 d、3 d 和 5 d 后,OB 增值率可有不同程度的提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,乳腺癌细胞条件培养基可明显下调 OB 的 ALP 活性,而用不同浓度的 Genistein 干预后,OB 的 ALP 活性分别较 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞条件培养基组增加 22.7%、32.4%、63.5% 和 27.7%、32.0%、58.3% ($P < 0.05$)。Genistein 还可改善乳腺癌细胞条件培养基对 OB 矿化能力的抑制,增加 OB 形成的矿化结节面积。结论 在乳腺癌骨转移的病理条件下,Genistein 可促进 OB 的增殖、分化和矿化能力,改善乳腺癌细胞对 OB 生物学功能的抑制作用。

关键词: Genistein; 乳腺癌细胞; 成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化结节

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.07.007

Effects of Genistein on changes of osteoblastic biological function induced by breast cancer cells ZHANG Yanyan, ZHU Guoying, GU Shuzhu, et al. Department of Environmental Epidemiology and Bone Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Genistein on changes of osteoblastic proliferation, differentiation and mineralization induced by breast cancer cells, and in order to observe whether Genistein regulates osteoblastic biological function in pathological condition with bone metastasis. **Methods** The osteoblasts harvested from calvaria of Sprague Dawley rats were cultured with 50% conditioned medium collected from two types of human breast cancer lines: MDA-MB-231 and MCF-7, and treated with different concentrations of Genistein: 5×10^{-7} mol/L (G7), 5×10^{-8} mol/L (G8), 5×10^{-9} mol/L (G9). Then the proliferation was analyzed by MTT method, the alkaline phosphatase (ALP) activity was assessed by the p-nitrophenyl phosphate (PNPP) method, and the area of bone nodule formation was observed by alizarin red S (ARS) staining and measured to analyze the mineralization ability. **Results** Conditioned medium from MDA-MB-231 or MCF-7 significantly suppressed osteoblastic proliferation, while the proliferation on day 1, day 3 and day 5 was improved in the different extents when osteoblasts were treated with Genistein. Otherwise, conditioned medium significantly inhibited ALP activity on day 3, while compared with conditioned medium group, different concentrations of Genistein could increase the ALP activity of osteoblasts by 22.7%, 32.4%, 63.5% and 27.7%, 32.0%, 58.3%,

基金项目: 上海市科委科研计划项目(064119512)

作者单位: 200032 上海 复旦大学放射医学研究所环境流行病学与骨毒理研究室

通讯作者: 朱国英, Email: zhugy@shmu.edu.cn

respectively. Genistein also increased the area of bone nodule formation and improved osteoblastic mineralization ability inhibited by conditioned medium. **Conclusion** In pathological condition with bone metastasis, Genistein could promote osteoblastic proliferation, differentiation and mineralization, improve osteoblastic biological function inhibited by breast cancer cells.

Key words: Genistein; Breast cancer cells; Osteoblast; Proliferation; Differentiation; Bone nodule formation

乳腺癌居女性恶性肿瘤发病率的第一位,常发生骨、肝脏、肺脏等远处转移,但以骨转移的发生率最高,在尸检中发现有70%以上的乳腺癌死亡患者有确凿的骨转移^[1,2]。骨转移患者由于转移灶骨组织结构的破坏可导致剧烈骨痛、病理性骨折、高钙血症和神经压迫症状等,严重影响患者的生存质量。肿瘤骨转移主要有三种表型:溶骨型、成骨型和混合型。乳腺癌骨转移主要表现为溶骨性损伤作用,其病理表现主要由破骨细胞(osteoclast, OC)介导的骨质溶解和骨结构的损害^[3]。以往的研究热点也主要集中在对OC形成和活性的调控机理上。近年有研究发现,成骨细胞(osteoblast, OB)也可能受到乳腺癌细胞的作用^[4,5]。即除了对OC有影响作用外,乳腺癌细胞还可能影响OB的生物学功能,而骨形成减少和骨降解增加的共同作用,可能加剧乳腺癌骨转移相关的骨丢失。

5,7,4'-三羟基异黄酮(Genistein,又称染料木黄酮或金雀异黄酮)是大豆异黄酮体内代谢的主要活性成分之一。在正常的骨生理条件下,Genistein既可刺激OB促进骨形成,又可调节OC抑制骨吸收^[6]。本研究将源于大鼠颅盖骨的原代OB与来自人源性乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MCF-7的条件培养基(conditioned medium, CM)共同培养,观察乳腺癌细胞对OB生物学功能包括增殖、分化和矿化能力的可能影响,并探讨Genistein在乳腺癌骨转移的病理条件下,是否能同正常的骨生理条件下一样,调节OB生物学功能而缓解乳腺癌骨转移所致的骨丢失。本研究对于指导临床用药,改变临床单纯抑制OC活性的治疗措施和疗效,缓解乳腺癌骨转移时发生的骨丢失有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 24 h内新生SD大鼠,雌雄各半,由复旦大学实验动物科学部提供,合格证号为SCXK(沪)2002-0002。MDA-MB-231和MCF-7人源性乳腺癌细胞系均购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂: Genistein、17 β -雌二醇(17 β -

estradiol, E2)和II型胶原酶购自Sigma公司;MEM、EMEM、Leibovita's L15和胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)和茜素红(S Alizarin Red S, ARS)购自美国Amresco公司;对硝基苯磷酸二钠盐(PNPP)购自Fluka公司;NBT/BCIP染色试剂盒购自华美生物工程公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 主要仪器: CO₂培养箱由德国Heraeus生产;酶标仪由澳大利亚Sunrise生产;倒置相差显微镜由日本Olympus生产;荧光显微镜由日本Nikon生产;Pixera 150CL荧光显微数码成像系统由美国Pixera公司生产;Simple PCI专业图象分析系统由美国Compix公司生产。

1.2 方法

1.2.1 原代OB分离与培养:取24 h内新生SD大鼠头盖骨剪成1 mm × 1 mm小块,用0.25%胰酶37℃消化15 min,再用0.1% II型胶原酶37℃振荡消化60 min,将含细胞的消化液以1000 r/min离心5 min,沉淀细胞用含10% FBS的MEM培养液混悬,将细胞悬液接种于培养瓶,置5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养,24 h后换含10% FBS的MEM培养液,以后每3天换液1次。细胞汇合后传代培养,所用实验细胞均为第2代细胞。OB的鉴定:用倒置相差显微镜观察OB形态,NBT/BCIP染色试剂盒进行细胞ALP染色,显微镜下观察拍照。

1.2.2 乳腺癌细胞培养和条件培养基收集:MDA-MB-231细胞培养在含10% FBS和1%青霉素/链霉素(P/S)的Leibovita's L15培养液中;MCF-7细胞培养在含10% FBS和1%青霉素/链霉素(P/S)的EMEM培养液中(含1.0 mM丙酮酸钠,0.1 mM非必需氨基酸,1.5g/L NaHCO₃和0.01 mg/ml牛胰岛素等添加剂)。所有细胞均在含5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养。为了从MDA-MB-231和MCF-7细胞中收集条件培养基(conditioned medium, CM),细胞接种在T-175培养瓶中培养至约90%汇合,将瓶中的培养基分别换成20 ml不含血清的Leibovita's L15或EMEM。24小时后,收集条件培养基,1000r/min离心

10 min,混合,等分,在 -20°C 保存待用。对照培养基(vehicle medium, VM)收集过程同条件培养基,但培养瓶中不接种MDA-MB-231和MCF-7细胞。

1.2.3 药物配制及分组: Genistein、 17β -雌二醇:用微量DMSO助溶,配制成浓缩液 -20°C 保存备用,临用前用MEM稀释成所需浓度(DMSO终浓度 $<0.1\%$)。实验共分4组(1)培养基对照组(VM组):50%MEM+50% Leibovita's L15或EMEM(2)条件培养基组(CM组):50%MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基+50%MEM(3)阳性对照组(CM+E2组):50%MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基+50%(MEM+E2); 17β -雌二醇终浓度为 5×10^{-8} mol/L(4)Genistein干预组(CM+G组):50%MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基+50%(MEM+Genistein);Genistein终浓度分别为 5×10^{-7} mol/L(G7)、 5×10^{-8} mol/L(G8)和 5×10^{-9} mol/L(G9)。

1.2.4 OB增殖能力检测(MTT法):将第2代对数生长期细胞以 2.5×10^3 /孔接种于96孔板,每组8复孔。培养24 h后,基质换成实验分组所需基质:VM、CM、CM+E2、CM+G7、CM+G8、CM+G9(详见药物配制及分组)。继续在5% CO_2 、 37°C 的恒温培养箱中培养1 d、3 d和5 d后终止培养。测定前4 h,用PBS冲洗后更换无血清MEM培养液100 μl ,同时加入10 μl 0.5% MTT,培养箱中孵育4 h,加入150 μl 10% SDS 37°C 水浴振荡2 h,冷却至室温后在酶标仪上570nm处测定每孔的吸光度值(A_{570})。

1.2.5 OB碱性磷酸酶活性检测(PNPP偶氮法):细胞接种同OB增殖能力检测。培养24 h后,基质换成实验分组所需基质(同OB增殖能力检测)。继续在5% CO_2 、 37°C 的恒温培养箱中培养72 h后终止培养。弃去培养液,PBS冲洗3次,每孔加入0.05% Triton-x 100 μl 超声裂解。取细胞裂解液50 μl 于 4°C 预冷的96孔板,再加入150 μl 的ALP底物反应液(PNPP-DEA溶液),然后于 37°C 恒温振荡箱中放置30 min,以0.1 mol/L NaOH终止反应,酶标仪在405nm处测定每孔的吸光度OD值(A_{405})。另取4 μl 细胞裂解液,按照BCA法蛋白定量检测试剂盒说明进行蛋白定量检测。ALP活性最终以U/mg蛋白表示。

1.2.6 OB矿化能力检测(ARS法):将第2代对数生长期细胞以 5×10^4 /孔接种于48孔培养板,每组6复孔。培养24 h后,基质换成实验分组所需基质(同OB增殖能力检测)。以后隔天换液,一周后加入矿化诱导液(含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ascorbic Acid和10 mmol/

L Na- β -glycerol-phosphate),第20天用95%乙醇原位固定30 min,0.2%茜素红(ARS)矿化结节染色后,用Pixera 150CL荧光显微数码成像系统拍照保存并用Simple PCI专业图象分析系统计数直径 $>50 \mu\text{m}$ 的矿化结节并计算面积,结果以 mm^2 /孔表示。

1.2.7 统计学处理:采用SPSS 11.5统计软件,组间比较应用One-way ANOVA分析,数据统计结果均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Genistein对乳腺癌细胞致OB增殖能力改变的影响

与培养基对照组比较,加入50%来自MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基后1 d、3 d和5 d,均对OB增殖率产生明显抑制作用($P < 0.01$)。而用Genistein进行干预1 d、3 d和5 d后,OB增殖率均有不同程度的提高。与条件培养基组比较,除G7在1 d、3 d的OB增殖率有增加但无统计学意义外,G7在5 d,G8和G9在1 d、3 d和5 d的OB增殖率均有明显增加($P < 0.05$)。且这种促进作用同 17β -雌二醇的作用相似,尤其是在5天作用时间点时,各药物组的OB增殖率基本能恢复或超过培养基对照组。详见(图1)。

2.2 Genistein对乳腺癌细胞致OB分化能力改变的影响

进一步分析了Genistein对MDA-MB-231和MCF-7细胞条件培养基致成骨细胞ALP活性的影响。结果表明,加入50%来自MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基后3 d可明显下调OB的ALP活性,其分别较培养基对照组下降49.3%和48.9%($P < 0.01$)。ALP染色阳性反应细胞数也明显减少。用Genistein进行干预后,ALP染色阳性反应细胞数明显增加,OB的ALP活性表达显著提高,不同剂量Genistein作用后OB的ALP活性分别较条件培养基组增加22.7%、32.4%、63.5%和27.7%、32.0%、58.3%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这种促进作用同 17β -雌二醇的作用相似(ALP活性增加46.0%和51.4%)。详见(图2、3)。

2.3 Genistein对乳腺癌细胞致OB矿化能力改变的影响

原代OB加入50%来自MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基,并加入不同浓度Genistein培养20 d后,用茜素红S染色进行分析。结果显示,培养基

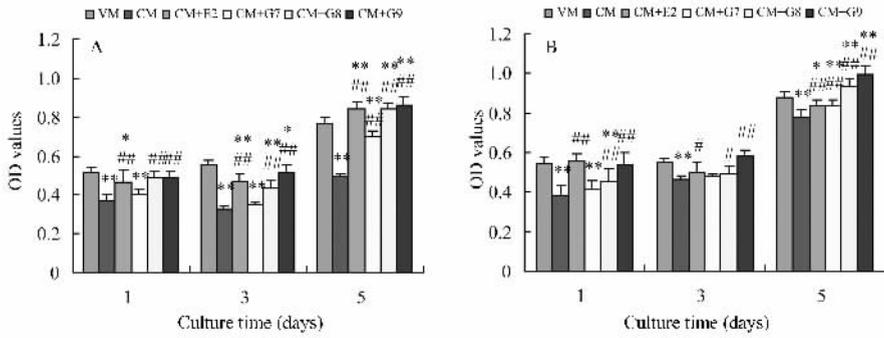


图1 Genistein对乳腺癌细胞致OB增殖能力改变的影响

A: Osteoblasts cultured with 50% MDA-MB-231 conditioned medium; B: Osteoblasts cultured with 50% MCF-7 conditioned medium. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, vs. VM; # $P < 0.01$, # $P < 0.05$, vs. CM. VM: vehicle medium, CM: conditioned medium, CM + E2: 50% conditioned medium plus 50% (MEM + 17β -estradiol), the final concentration of 17β -estradiol was 5×10^{-8} mol/L, CM + G: 50% conditioned medium plus 50% (MEM + genistein), the final concentration of genistein was 5×10^{-7} mol/L (G7), 5×10^{-8} mol/L (G8), 5×10^{-9} mol/L (G9)

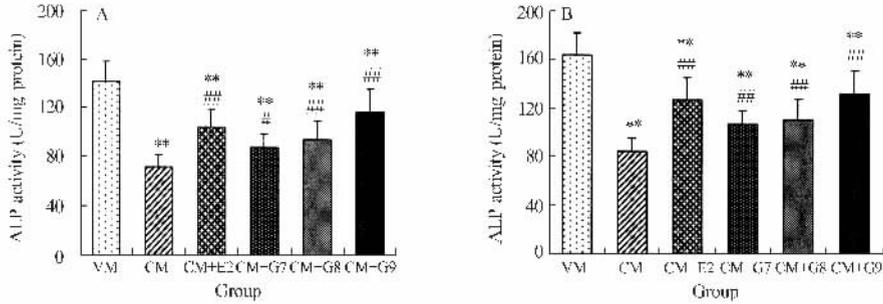


图2 Genistein对乳腺癌细胞致OB分化能力改变的影响

A: Osteoblasts cultured with 50% MDA-MB-231 conditioned medium; B: Osteoblasts cultured with 50% MCF-7 conditioned medium. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, vs. VM; # $P < 0.01$, # $P < 0.05$, vs. CM

对照组细胞中可见到大小不一、形态各异的红色矿化结节形成。但用50%来自MDA-MB-231或MCF-7细胞条件培养基培养OB的矿化结节形成面积明显减小,与培养基对照组比较,OB矿化能力抑制明显($P < 0.05$)。用Genistein进行干预后,矿化结节形成面积均有不同程度的增加,但与条件培养基组比较,差异无统计学意义。详见(表1和图4)。

表1 Genistein对乳腺癌细胞致OB矿化能力改变的影响

Group	Area of bone nodules (mm ²) / dish	
	MDA-MB-231	MCF-7
VM	0.316 ± 0.141	0.365 ± 0.136
CM	0.054 ± 0.036 **	0.127 ± 0.047 *
CM + E2	0.093 ± 0.050 **	0.259 ± 0.192
CM + G7	0.105 ± 0.088 **	0.234 ± 0.116
CM + G8	0.082 ± 0.097 **	0.226 ± 0.167
CM + G9	0.078 ± 0.049 **	0.203 ± 0.173

注: All values are presented as mean ± SD of 6 experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, vs. VM

3 讨论

乳腺癌骨转移主要表现为溶骨性的损伤作用,以往的研究也多集中于探讨乳腺癌细胞如何调节OC活性,旨在找到能抑制OC活性的方法,以缓解或治愈骨丢失。但单纯抑制OC活性并不能完全阻止溶骨性损伤的进展,如双膦酸盐能用于阻断OC的活性,有助于遏止病变过程,但不能使骨恢复自愈能力^[7]。表明在乳腺癌骨转移中骨量的丢失不仅是乳腺癌细胞激活OC的作用,可能也包括OB功能的改变^[4,5]。有研究报道乳腺癌细胞可诱导OB的凋亡和/或干扰正常OB的功能。Mastro等^[8]用MDA-MB-231、MDA-MB-435两种乳腺癌细胞和hFOB1.19成骨细胞共培养发现乳腺癌细胞可增加OB的凋亡。Mercer等^[9]用来自于MDA-MB-231细胞的条件培养基和MC3T3-E1成骨细胞共培养也发现乳腺癌细胞可改变OB的形态和黏附特性,阻断OB的正常

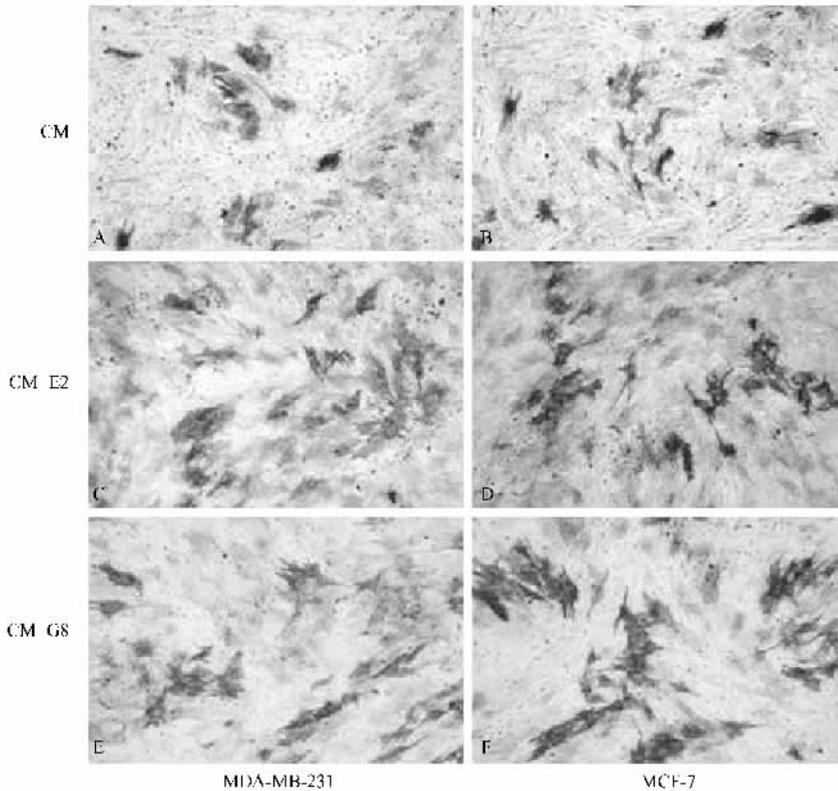


图3 Genistein对乳腺癌细胞致OB分化能力改变的影响(ALP染色, $\times 100$)

Alkaline phosphatase activity of cells cultured with 50% MDA-MB-231 conditioned medium(A), 50% MCF-7 conditioned medium(B), 50% MDA-MB-231 conditioned medium and 50% (MEM + E2)(C), 50% MCF-7 conditioned medium and 50% (MEM + E2)(D), 50% MDA-MB-231 conditioned medium and 50% (MEM + G8)(E), 50% MCF-7 conditioned medium and 50% (MEM + G8)(F)

分化过程,抑制骨的形成。本研究探讨了两种不同转移特性的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 的条件培养基对 OB 生物学功能的影响作用。结果证实了来自人类转移性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的条件培养基可明显抑制 OB 的增殖和分化,表现为 OB 的增殖率、ALP 活性明显下降,矿化结节形成面积明显减小。且 MCF-7 乳腺癌细胞的条件培养基也对 OB 的生物学功能有明显影响作用。而 MCF-7 乳腺癌细胞的侵袭性很弱,通常不发生骨转移,其对 OB 生物学功能的影响作用尚不明确。

乳腺癌骨转移尤其是多发性骨转移临床处理十分棘手,需多种方法联合治疗,其中激素替代疗法、选择性雌激素受体调节剂、双磷酸盐多用来抑制骨吸收,阻止骨丢失。虽然在治疗乳腺癌及骨转移的过程中达到了一定的治疗效果,但显示均有潜在副作用。如激素替代疗法可增加脑卒中、肺动脉栓塞和乳腺癌的发病率^[10,11],他莫西酚可增加子宫内膜

癌的发病率而雷洛西酚则可促进潮热和心血管疾病的发生^[12],近年有研究报道长期应用双磷酸盐可导致颌骨坏死^[13]。鉴于此,寻找更加安全的选择性雌激素受体调节剂及雌激素的天然替代品在乳腺癌辅助治疗和预防骨转移的应用方面受到广泛关注。Genistein 是植物雌激素的重要活性成分,与 17β -雌二醇结构相似,可选择性激活 $ER\beta$,通过酚环和雌激素受体结合产生雌激素样效应,但无增加乳腺癌、子宫内膜癌等发病危险性的负面作用,还可表现出抗氧化、抗肿瘤、降低心血管疾病发生的危险性、缓解妇女更年期综合征、提高免疫功能、抗炎等有益作用,被认为是一种天然选择性雌激素受体调节剂 (SERM)^[14,15]。

成骨细胞是骨代谢的主要功能细胞,可通过快速增殖、基质成熟和矿化三个阶段促进骨的形成。基质成熟可通过分泌 ALP 来检测,矿化过程则以矿化结节形成为标志^[16]。在正常的骨生理条件下,

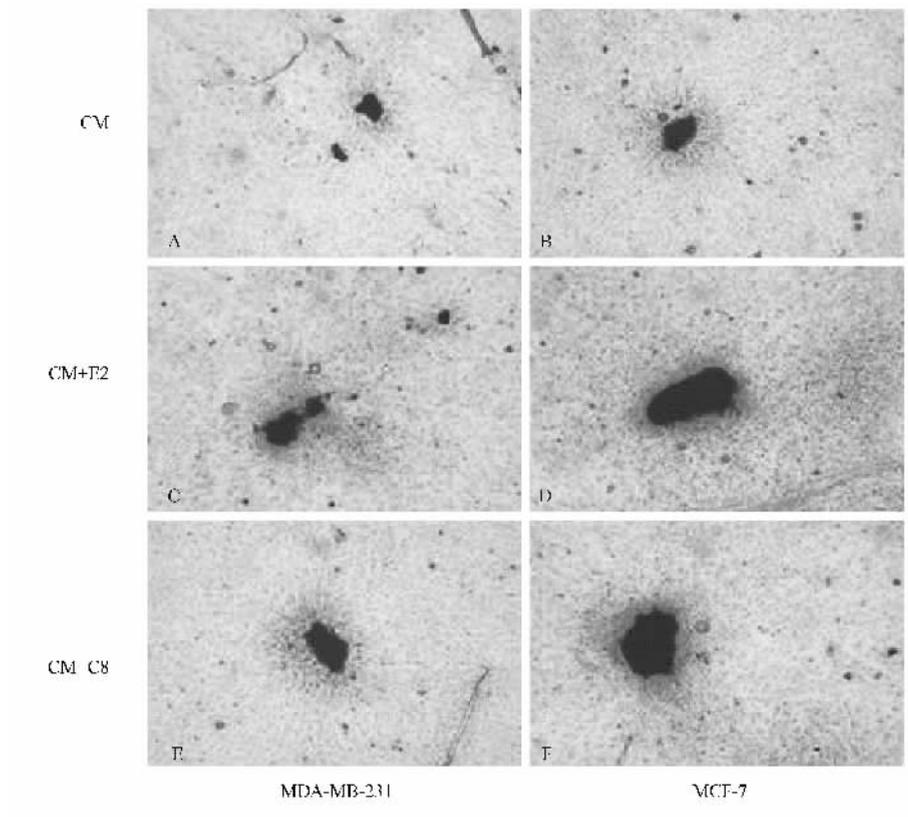


图4 Genistein对乳腺癌细胞致OB矿化能力改变的影响(茜素红S染色, $\times 100$)
Osteoblasts were cultured with 50% MDA-MB-231 conditioned medium(A), 50% MCF-7 conditioned medium(B), 50% MDA-MB-231 conditioned medium and 50% (MEM + E2)(C), 50% MCF-7 conditioned medium and 50% (MEM + E2)(D), 50% MDA-MB-231 conditioned medium and 50% (MEM + G8)(E), 50% MCF-7 conditioned medium and 50% (MEM + G8)(F) for 20 days and stained by the Alizarin Red S method

Genistein可提高成骨细胞S期和M/G2期细胞的分布比例,提高细胞周期蛋白D和E蛋白质的表达,显著提高OB的增殖能力^[17]。也可增加OB的ALP活性,提高OB的分化能力^[18,19],及增加骨钙蛋白的释放和OB矿化结节的形成^[20,21]。本研究用乳腺癌细胞条件培养基和OB共同培养模拟乳腺癌骨转移的病理条件,用不同浓度Genistein进行干预。结果显示,与条件培养基组相比,Genistein可不同程度的提高OB的增值率、ALP活性及增加矿化结节形成面积,且这种促进作用同 17β -雌二醇的作用相似。表明在乳腺癌骨转移的病理条件下,Genistein仍可促进OB的增殖、分化和矿化能力,不同程度的改善乳腺癌细胞对OB生物学功能的抑制作用。

本研究从体外细胞实验方面证实了在乳腺癌骨转移的病理条件下,Genistein同样能对OB生物学功能起到明显的促进作用,表现为提高OB的增殖能力、上调OB的ALP活性、促进OB矿化结节形成。

本研究结果证明了Genistein既能有效抑制OC活性,又能刺激OB活性,可为临床乳腺癌骨转移的辅助治疗提供一个新的干预思路。但要寻找到能有效预防和治疗肿瘤骨转移时骨丢失的新途径,尚需进行大量的体内外实验。

【参考文献】

- [1] Parkin DM. International variation. *Oncogene*, 2004, 23(2):6329-6340.
- [2] Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20):6243s-6249s.
- [3] Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*, 2004, 350(16):1655-1664.
- [4] Mercer RR, Mastro AM. Cytokines secreted by bone-metastatic breast cancer cells alter the expression pattern of f-actin and reduce focal adhesion plaques in osteoblasts through PI3K. *Exp Cell Resear*, 2005, 310(2):270-281.
- [5] Phadke PA, Mercer RR, Harms JF, et al. Kinetics of metastatic breast cancer cell trafficking in bone. *Clin Cancer Res*, 2006, 12

- (5):1431-1440.
- [6] Paulsen RC, Kruger MC. Soy phytoestrogens: impact on postmenopausal bone loss and mechanisms of action. *Nutr Rev*, 2008, 66(7):359-374.
- [7] Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN, et al. Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases-Long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer*, 2000, 88(5):1082-1090.
- [8] Mastro AM, Gay CV, Welch DR, et al. Breast cancer cells induce osteoblast apoptosis: a possible contributor to bone degradation. *J Cell Biochem*, 2004, 9(2):265-276.
- [9] Mercer RR, Miyasaka C, Mastro AM. Metastatic breast cancer cells suppress osteoblast adhesion and differentiation. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(5):427-435.
- [10] Sare GM, Gray LJ, Bath PMW. Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: a meta-analysis. *Eur Heart J*, 2008, 29(16):2031-2041.
- [11] Corrao G, Zambon A, Conti V, et al. Menopause hormone replacement therapy and cancer risk: an Italian record linkage investigation. *Ann Oncol*, 2008, 19(1):150-155.
- [12] Palacios S. The future of the new selective estrogen receptor modulators. *Menopause Int*, 2007, 13(1):27-34.
- [13] Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006, 102:433-441.
- [14] McCarty MF. Isoflavones made simple-genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Med Hypotheses*, 2006, 66(6):1093-1114.
- [15] 刘葵, 张恩娟. 大豆异黄酮的药理作用及临床应用研究进展. *中国药房*, 2006, 17(1):67-69.
- [16] 廖二元, 谭利华. 代谢性骨病学. 北京:人民卫生出版社, 2003:16-26.
- [17] 余增丽. 金雀异黄酮对成骨细胞增殖的影响及其可能的分子生物学机制. *中华老年医学杂志*, 2005, 24(9):645-647.
- [18] Pan W, Quarles DL, Song LH, et al. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem*, 2005, 94(2):307-316.
- [19] Liao QC, Xiao ZS, Qin YF, et al. Genistein stimulates osteoblastic differentiation via p38 MAPK-Cbfa1 pathway in bone marrow culture. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(10):1597-1602.
- [20] Chang H, Jin TY, Jin WF, et al. Modulation of isoflavones on bone-nodule formation in rat calvaria osteoblasts in vitro. *Biomed Environ Sci*, 2003, 16(1):83-89.
- [21] Uchiyama S, Yamaguchi M. Genistein and zinc synergistically enhance gene expression and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med*, 2007, 19(2):213-220.

(收稿日期:2008-03-12)