

Y-27632 对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

张磊¹ 龚跃昆² 赵学凌² 周厚俊^{3*}

1. 云南省第一人民医院康复医学科 650032

2. 昆明医科大学第一附属医院骨科 650032

3. 昆明医科大学第一附属医院神经外科 650032

中图分类号: R683 R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1108-04

摘要: 目的 探讨 RhoA/ROCK 通路特异性阻断剂 Y-27632 对小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖及成骨分化的影响。方法 自小鼠股骨、胫骨骨髓腔分离培养小鼠骨髓单个核细胞,流式细胞仪细胞表面标记检测及细胞成骨、成脂、成软骨三系分化鉴定小鼠骨髓单个核细胞。将第 3 代小鼠骨髓间充质干细胞随机分为 2 组,单纯成骨诱导液对照组、Y-27632 干预组。分别于细胞培养后 1d、2d、3d、4d 收集细胞,噻唑蓝(Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)比色法观察 BMSCs 增殖能力;成骨诱导后 7 d、14 d 收集细胞,可见光比色法检测碱性磷酸酶(ALP)变化;成骨诱导后 24h 收集细胞,western blot 法检测 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(Rho associated coiled-coil-containing protein kinases1, ROCK1)的表达。结果 流式细胞术细胞表面标志检测及成骨、成脂、成软骨三系分化鉴定均证实我们所获细胞为 BMSCs。与对照组相比,Y-27632 能促进 BMSCs 增殖,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Y-27632 能降低 ALP 表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Y-27632 能明显阻断 ROCK1 的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Y-27632 阻断 RhoA/ROCK 信号通路可以促进 BMSCs 增殖,抑制 BMSCs 成骨分化。

关键词: 骨髓间充质干细胞; RhoA/ROCK; Y-27632; 成骨分化

Effects of Y-27632 on mouse osteogenesis by bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Lei¹, GONG Yuekun², ZHAO Xueling², ZHOU Houjun³

1. Department of Rehabilitation Medicine, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China

2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

3. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

Corresponding author: ZHOU Houjun, Email: zhouhj1231@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of RhoA/ROCK blocker Y-27632 on the proliferation and osteogenesis of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Bone marrow mononuclear cells were obtained from the bone marrow cavity of the femur and tibia and identified with flow cytometry for detecting cell surface markers and osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation. BMSCs of the passage 3 were randomly divided into 2 groups, control group with osteogenesis induction media only and osteogenesis induction media + Y-27632 group. Proliferation of BMSCs was determined using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay at 1d, 2d, 3d, and 4d. ALP expression was determined with visible light photometric method at 7d and 14d after osteogenic induction. ROCK1 protein expression was detected with Western blotting at 24h after osteogenic induction. **Results** The bone marrow mononuclear cells were identified as BMSCs with flow cytometry and tri-lineage differentiation. Compared with control group, MTT assay showed Y-27632 obviously promoted BMSCs proliferation ($P < 0.05$). Y-27632 also inhibited ALP expression ($P < 0.05$) and the expression of ROCK1 ($P < 0.05$). **Conclusion** Y-27632 promotes proliferation but inhibits osteogenesis of BMSCs by blocking RhoA/ROCK signaling pathway.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; RhoA/ROCK; Y-27632; Osteogenesis

基金项目: 云南省卫计委科研基金(2011WS0033); 西南医科大学校内基金(15041)

* 通讯作者: 周厚俊, Email: zhouhj1231@qq.com

Y-27632 是 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 (Rho associated coiled-coil-containing protein kinases, ROCK) 特异性抑制剂,在生理和病理过程中发挥重要调控作用如细胞生长和变形,肌动蛋白丝重排,细

胞周期调控及细胞粘附、外分泌、迁移等^[1-2]。目前有较多研究报道 RhoA/ROCK 信号在细胞分化调控中发挥重要作用。Kamishibahara^[3]报道 Y-27632 通过阻断 RhoA/ROCK 信号能够促进小鼠胚胎干细胞向神经细胞分化。Li^[4]等研究发现 Y-27632 通过阻断 RhoA/ROCK 信号能够促进骨髓间充质干细胞向角质细胞分化, Yamamoto^[5]研究表明 RhoA/ROCK 信号在牙周韧带细胞成骨分化调控中发挥重要作用,显示该信号可能在间充质干细胞成骨分化中发挥调控作用。目前国内有关 RhoA/ROCK 信号通路在间充质干细胞成骨分化中作用报道较少。我们拟观察 RhoA/ROCK 特异性阻断剂 Y-27632 对 BMSCs 成骨分化的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康 3-4 周龄昆明小鼠(体重约 18-20 g,雌雄不限)购于昆明医科大学实验动物中心。Y-27632 购自 Cayman 公司,兔 ROCK1 单克隆抗体购自 Epitomic 公司,兔抗单克隆抗体 GAPDH 购自 abmart 公司,低糖 DMEM 培养基、MTT 购自 Gibco 公司,维生素 C、 β -甘油磷酸钠、地塞米松购自 Sigma 公司,ALP 定量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 小鼠 BMSCs 的分离、培养及鉴定

自小鼠股骨及胫骨骨髓腔分离培养小鼠骨髓单个核细胞,根据既往实验步骤进行^[6]。采用流式细胞术对细胞表面标记进行检测,成骨、成脂肪、成软骨三系分化鉴定小鼠骨髓间充质干细胞,根据既往实验步骤进行^[6]。

1.3 MTT 检测 BMSCs 增殖。

以 1×10^4 个/ml 的密度将第三代 BMSCs 接种于 96 孔板内,每孔 200 μ L。待细胞贴壁后,分别以含有单纯细胞培养液及添加 Y-27632 的细胞培养基对细胞进行培养。既往研究^[7]已经表明 10 μ M 的 Y-27632 能阻断 RhoA/ROCK 信号通路。故在我们实验中选择 10 μ M 的 Y-27632 作为我们的实验浓度。分别于加入 Y-27632 后的 1d、2d、3d 及 4d,弃上清,每孔加入含 5 mg/ml MTT 的培养液 150 μ L,继续孵育 4 h,小心吸弃孔内上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 溶液震荡,待充分溶解后,在酶联免疫检测仪上测量吸收值 OD,测量波长为 490 nm,每组设 6 个复孔,计算其平均 OD 值。

1.4 ALP 定量检测

细胞以 1×10^5 /孔密度接种于 6 孔板中,分别再分组换液培养 7 d、14 d 后收集细胞。培养细胞先用 4% 多聚甲醛液处理 2 min,然后使用 RIPA buffer 裂解液裂解细胞,按照碱性磷酸酶测定试剂盒说明操作,酶标仪设定在 520 nm 波长处进行比色,碱性磷酸酶 ALP 测定结果以金氏 U/100ml 表示。每组设 6 个复孔计算平均值。

1.5 western blot 检测 ROCK1 的表达

细胞培养 24 h 收集细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,收集细胞总蛋白。以 BCA 法测定蛋白浓度,每组取 20 μ g 蛋白,进行电泳转膜,以 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h,加入 ROCK1 一抗(1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:2000)37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。以 Image J 软件对蛋白表达条带进行扫描及光密度值进行定量分析。以内参蛋白灰度值进行校正,目的蛋白表达为目的蛋白与内参蛋白比值。

1.6 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞形态观察

我们课题组前期实验经过流式细胞术对细胞表面标记进行检测及对细胞行成骨、成脂肪、成软骨三系分化鉴定,已证实我们所获细胞为小鼠骨髓间充质干细胞^[6]。传代后的第三代细胞呈现梭形的成纤维细胞样,成骨诱导后,细胞由梭形逐渐变为多角形,14 d 后可见不透光的矿化结节。

2.2 Y-27632 对细胞增殖的影响

MTT 结果显示:与对照组相比,在培养后第 2 天、3 天、4 天,10 μ M 的 Y-27632 能够促进 BMSCs 增殖($P < 0.05$),在培养后的第 1 天,两组增殖率无明显差异($P > 0.05$)。

2.3 Y-27632 阻断 RhoA/ROCK 信号通路 ROCK 表达

Western blot 实验结果显示:细胞培养 24 h 后,与对照组相比,Y-27632 能降低 ROCK1 的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 Y-27632 对 BMSCs 成骨分化中 ALP 表达的影响

成骨诱导分化后 7d、14d 进行 ALP 检测,我们的实验结果显示 10 μ M 的 Y-27632 能够明显抑制成骨分化中 ALP 表达,与对照组相比,差异具有统计

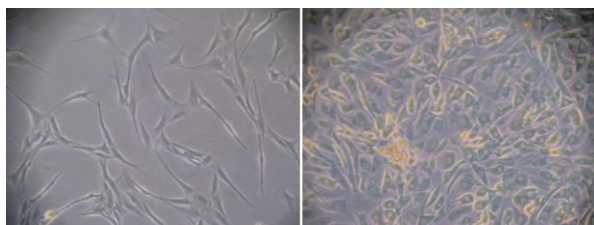


图1-1

图1-2

图 1-1 第三代细胞培养 3d 光镜下观察,细胞呈梭形 (100×);图 1-2 第三代细胞成骨诱导后 14d 光镜下观察,可见矿化结节 (100×)

Fig. 1-1 The third passage BMSCs presented fusiform at third day under light microscopy (100×). **Fig. 1-2** Calcium nodules were seen at the surface of the third passage BMSCs after 14d osteogenic induction under light microscopy (100×)

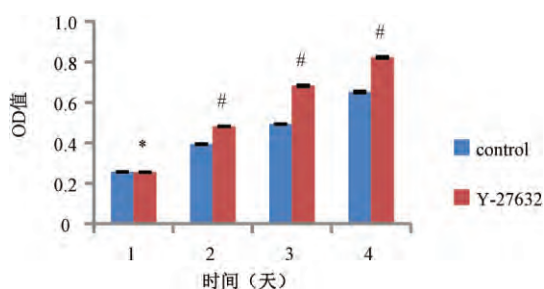


图 2 Y-27632 能够明显促进 BMSCs 增殖。与对照组相比,在培养后的 1 d 差异无统计学意义, * $P > 0.05$; 培养后的 2 d、3 d、4 d 差异具有统计学意义, $P < 0.05$

Fig. 2 Y-27632 promoted BMSCs proliferation obviously. Compared with control group, * $P > 0.05$ at 1d, $P < 0.05$ at 2d, 3d, and 4d.

学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

RhoA 属于 Ras (rat sarcoma, Ras) 超家族的 GTP 酶 (GTPase)。Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 (Rho associated coiled-coil-containing protein kinases, ROCK) 是最早被发现也是研究的最为深入的 Rho 下游底物^[8]。RhoA/ROCK 通路在生理和病理过程中发挥重要调控作用^[1,2,9]。如细胞的生长和变形;肌动蛋白丝重排;MAPK 通路激活;细胞周期调控;基因转录;细胞质分裂及微管多样性调节;细胞黏附;胞内分泌及胞外分泌;细胞迁移和生存等。Y-27632 是 ROCK 高效特异性抑制剂,其与 ROCK 亲和力分别是其与蛋白激酶 C 的 200 倍、肌球蛋白轻

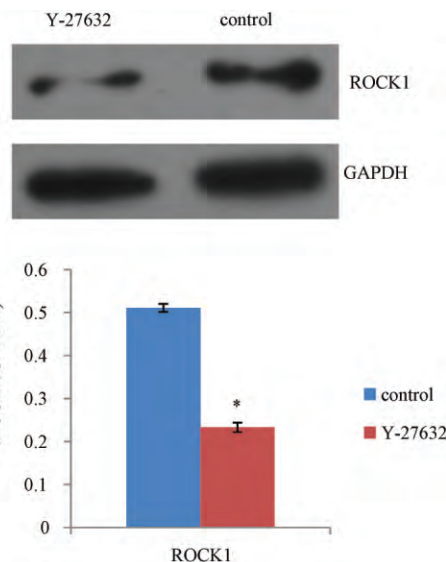


图 3 Western blot 检测 ROCK1 蛋白表达。Y-27632 能明显降低 ROCK1 表达,与对照组相比, * $P < 0.05$

Fig. 3 ROCK1 protein expression detected using Western blotting. Compared with control group, * $P < 0.05$

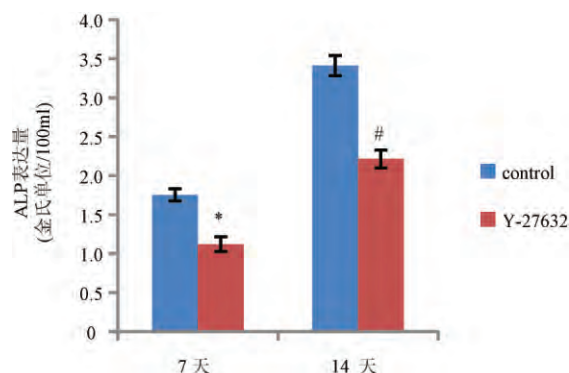


图 4 Y-27632 对 BMSCs ALP 表达的影响。与对照组相比,成骨诱导 7 d 后, * $P < 0.05$; 成骨诱导 14 d 后, $P < 0.05$

Fig. 4 The effect of Y-27632 on ALP expression of BMSCs. Compared with control group, * $P < 0.05$ at 7d after osteogenic induction, $P < 0.05$ at 14d after osteogenic induction

链激酶的 2000 倍^[10]。近来有不少研究表明 RhoA/ROCK 信号通路可能在细胞分化中发挥重要调控作用。Liu 与 Kamishibahara^[3,11] 等人研究发现 Y-27632 能够通过阻断 ROCK 通路促进间充质干细胞向神经细胞分化,显示出 Y-27632 在神经再生研究及应用潜力。近来也有研究表明 RhoA/ROCK 信号通路可能在间充质干细胞成骨分化中发挥调控作

用,Yao 与 Seo 等人通过调整细胞培养接种密度^[12,13],激活 RhoA/ROCK 信号通路能促进细胞成骨分化。Xu 与 Yamamoto 等人给予培养细胞施加适当的机械应力^[5,14],激活 RhoA/ROCK 信号通路,改变细胞形状可促进细胞的成骨分化。碱性磷酸酶是干细胞成骨分化中重要的成骨标志性酶,是骨形成过程中必需的酶。前体成骨细胞和过渡型成骨细胞均能分泌 ALP,ALP 能促进钙在胶原上沉积,完成基质矿化过程^[15],因此 ALP 可作为细胞成骨分化早期标志物。目前国内有关 RhoA/ROCK 信号通路跟细胞成骨分化关系的报道较少。我们实验研究表明,成骨培养基中添加 Y-27632 能够明显降低细胞成骨分化过程中 ALP 表达,表明 Y-27632 能够干扰间充质干细胞的成骨分化。且我们的 Western blot 实验也表明在单纯成骨培养条件下,ROCK 在细胞内正常表达,说明 RhoA/ROCK 信号对于间充质干细胞成骨分化是必要的,10 μ M 的 Y-27632 处理 24h 后,细胞 ROCK 蛋白表达明显降低。我们的研究结果与前述相关文献研究结果一致:表明 Y-27632 能够阻断 ROCK 表达,抑制间充质干细胞的成骨分化。

BMSCs 增殖受到多种因素影响,我们的 MTT 研究表明 Y-27632 能够明显促进 BMSCs 增殖,这与 Pilti^[16]等人的研究一致。通过蛋白组学分析及划痕实验他们发现 1 μ M 与 10 μ M Y-27632 均能促进包皮成纤维细胞增殖,他们通过蛋白组学分析及实时定量 PCR 技术显示 Y-27632 促进增殖的效应可能是缘于其阻断 ROCK 通路而上调与细胞粘附有关的膜联蛋白、钙蛋白酶、14-3-3 蛋白、黏着斑蛋白、埃兹蛋白表达,下调纤连蛋白有关。Nakamura^[17]等人通过 BrdU 实验及总 DNA 分析研究也发现 10 μ M Y-27632 能够促进间充质干细胞的增殖,他们认为这是由于 Y-27632 通过阻断 ROCK 信号通路,减少黏着斑形成,降低细胞收缩力,阻止细胞分离有关。Yu^[18]等人研究表明 Y-27632 通过激活脊髓星形胶质细胞 ERK 信号通路,促进细胞周期从 G0/G1 期进入 S 期,从而促进脊髓星形胶质细胞增殖。而王新鲁^[19]等人通过 MTT 检测发现 30 μ M 与 45 μ M Y-27632 能够抑制 C3H10T1/2 细胞的增殖,Wang^[20]等通过 MTT 研究也发现 10 μ M、20 μ M、40 μ M 的 Y-27632 能够明显抑制舌头鳞状细胞癌 Tca8113 与 CAL-27 细胞株的增殖。我们推测可能有以下两点因素导致不同文献中关于 Y-27632 对细胞增殖能力影响有不同和相反的结果报道:首先,不同浓度的 Y-27632 对细胞增殖有不同的作用;其次,相同浓度

的 Y-27632 对不同细胞的增殖影响可能不一样。最后除了 ROCK 信号通路外,可能还有其他信号通路参与 Y-27632 对细胞增殖的调控。确切的原因还有待进一步进行实验验证。

我们实验结果表明,Y-27632 能够明显抑制 RhoA/ROCK 通路中 ROCK1 表达,促进间充质干细胞增殖,抑制间充质干细胞成骨分化。这为我们在骨组织工程研究中如何促进目的细胞成骨分化提供更多思路。但这只是我们初步研究结果,下一步还需要对不同浓度 Y-27632 对 BMSCs 增殖作用进行研究,进一步对成骨分化中 RhoA/ROCK 信号通路中更多关键及下游分子表达进行研究,进一步明确 Rho/ROCK 信号通路对细胞成骨分化影响的机制。

【参 考 文 献】

- [1] Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 2005, 280(12): 11448-57.
- [2] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002, 420(6916): 629-35.
- [3] Kamishibahara Y, Kawaguchi H, Shimizu N. Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neurosci Lett* 2016, 615: 44-49.
- [4] Li Z, Han S, Wang X, et al. Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium. *Stem Cell Res Ther* 2015, 6: 17.
- [5] Yamamoto T, Ugawa Y, Yamashiro K, et al. Osteogenic differentiation regulated by Rho-kinase in periodontal ligament cells. *Differentiation* 2014, 88(2-3): 33-41.
- [6] 张磊, 赵学凌, 李彪, 等. 二甲基乙二酰基甘氨酸对小鼠骨髓间充质干细胞缺血清凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志* 2013, 19(1): 21-25.
Zhang L, Zhao XL, Li B, et al. Effects of dimethylglycine on the apoptosis induced by serum deprivation and expression of Bcl-2/Bax in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Osteoporosis* 2013, 19(1): 21-25.
- [7] Ni XQ, Zhu JH, Yao NH, et al. Statins suppress glucose-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression by regulating RhoA and nuclear factor- κ B activities in cardiac microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 2013, 238(1): 37-46.
- [8] Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, et al. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem* 1996, 271(38): 23022-23028.

(下转第 1127 页)

- Chinese.
- [14] Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1068: 173-179.
- [15] Guo YS, Sun Z, Ma J, et al. 17 β -Estradiol inhibits ER stress induced apoptosis through promotion of TF II-1-dependent Grp78 induction in osteoblasts. *Lab Invest*, 2014, 94(8): 906-916.
- [16] Chen JR, Haley RL, Hidestrand M, et al. Estradiol protects against ethanol-induced bone loss by inhibiting up-regulation of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in osteoblasts. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(3): 1182-1190.
- [17] 孙中洋, 李东韬, 赵学武, 等. 成骨细胞体外培养模型的研究进展. *中国骨质疏松杂志* 2015, 21(6): 733-736, 748.
Sun Zhongyang, Li Dongtao, Zhao Xuewu, et al. Advance in the development of osteoblast culture models in vitro. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21(6): 733-736. in Chinese.
- [18] Wang Y, Li LZ, Zhang YL, et al. LC, a novel estrone-rhein hybrid compound, concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and interleukin-6 production by human osteoblastic cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 337(1-2): 43-51.
- [19] Schiff R, Massarweh S, Shou J, et al. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1 Pt 2): 447S-54S.
- [20] Wang C, Meng MX, Tang XL, et al. The proliferation, differentiation, and mineralization effects of puerarin on osteoblast in vitro. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(6): 436-442.
- [21] 崔莹, 冯正平. 抗骨质疏松药物的研究进展. *中国骨质疏松杂志* 2015, 21(3): 367-371.
Cui Ying, Feng Zhengping. Research progress of anti-osteoporosis drugs. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21(3): 367-371. in Chinese.
- [22] Kallio A, Guo T, Lamminen E, et al. Estrogen and the selective estrogen receptor modulator (SERM) protection against cell death in estrogen receptor alpha and beta expressing U2OS cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 289(1-2): 38-48.
- [23] Chow SK, Leung KS, Qin L, et al. Callus formation is related to the expression ratios of estrogen receptors- α and - β in ovariectomy-induced osteoporotic fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2014, 134(10): 1405-1416.
- [24] Schiff R, Massarweh SA, Shou J, et al. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56 (Suppl 1): 10-20.

(收稿日期: 2016-03-27; 修回日期: 2016-05-18)

(上接第 1111 页)

- [9] Narumiya S, Ocegüera-Yanez F, Yasuda S. A new look at Rho GTPases in cell cycle: role in kinetochore-microtubule attachment. *Cell Cycle*, 2004, 3(7): 855-7.
- [10] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 1997, 389(6654): 990-994.
- [11] Liu X, Zhang Z, Yan X, et al. The Rho kinase inhibitor Y-27632 facilitates the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mol Histol*, 2014, 45(6): 707-714.
- [12] Yao X, Peng R, Ding J. Effects of aspect ratios of stem cells on lineage commitments with and without induction media. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 930-939.
- [13] Seo CH, Jeong H, Feng Y, et al. Micropit surfaces designed for accelerating osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells via enhancing focal adhesion and actin polymerization. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2245-2252.
- [14] Xu B, Song G, Ju Y, et al. RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 2012, 227(6): 2722-2729.
- [15] Mutaglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Cell Sci*, 2000, 113: 1161-1166.
- [16] Piltti J, Varjosalo M, Qu C, et al. Rho-kinase inhibitor Y-27632 increases cellular proliferation and migration in human foreskin fibroblast cells. *Proteomics*, 2015, 15(17): 2953-2965.
- [17] Nakamura K, Yoshimura A, Kaneko T, et al. ROCK inhibitor Y-27632 maintains the proliferation of confluent human mesenchymal stem cells. *J Periodontol Res*, 2014, 49(3): 363-370.
- [18] Yu Z, Liu M, Fu P, et al. ROCK inhibition with Y27632 promotes the proliferation and cell cycle progression of cultured astrocyte from spinal cord. *Neurochem Int*, 2012, 61(7): 1114-1120.
- [19] 王新鲁, 姬云涛, 屈长青. Rho 激酶抑制剂 Y-27632 对 C3H10T1/2 细胞增殖与成脂分化的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报* 2013, 29(7): 661-666.
Wang XL, Ji YT, Qu CQ. Effect of Rho kinases inhibitor Y-27632 on proliferation and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cell C3H10T1/2. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29(7): 661-666.
- [20] Wang ZM, Yang DS, Liu J, et al. ROCK inhibitor Y-27632 inhibits the growth, migration, and invasion of Tca8113 and CAL-27 cells in tongue squamous cell carcinoma. *Tumor Biol*, 2015, Epub ahead of print.

(收稿日期: 2016-04-17; 修回日期: 2016-06-20)