

LC 促进人成骨样 MG-63 细胞增殖及相关机制的研究

梁会岭¹ 李正阳² 牛秀琰¹ 王越^{3*} 李培炎⁴ 李灵芝^{5*}

1. 武警后勤学院附属医院,天津 300162
2. 天津市口腔医院正畸科,天津 300000
3. 武警后勤学院病原生物学与免疫学教研室,天津 300309
4. 武警后勤学院检验医学专业本科121队,天津 300309
5. 武警后勤学院药物化学教研室,天津 300309

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016)09-1121-07

摘要: 目的 探讨大黄酸哌嗪雌酚酮(rhein-piperiziny-estrone, LC)对人成骨样 MG-63 细胞增殖活性的影响及其相关分子机制。方法 在原工作基础上,以兼有两种雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型表达的人成骨样 MG-63 细胞为研究对象,分别应用 MTT 法和流式细胞术,观察 LC 对 MG-63 细胞的增殖活性和细胞周期分布的影响。利用前期构建的 ER α 或 ER β 稳定高抑制表达的 MG-63 细胞株,应用免疫印迹技术,对 LC 的作用机制和可能的信号通路进行研究。结果 与对照组相比,LC 可明显促进 MG-63 细胞的增殖活性,该作用具有剂量依赖性;可调节细胞周期分布,使 G1 期细胞比例减少、G2 + S 期细胞比例增加,进而促进细胞生长。进一步研究发现,ER 阻断剂 ICI 182,780 可完全阻断 LC 的促增殖作用,提示 LC 是经 ER 途径对 MG-63 的增殖活性发挥作用的;利用 ER α 或 ER β 高抑制表达的稳定细胞株,证实 LC 的促增殖作用是由 ER α 和 ER β 共同介导的;该作用与 Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt 信号通路的激活密切相关。结论 LC 可经 ER α 和 ER β 共同介导对人成骨细胞的促增殖作用,有望成为治疗绝经后骨质疏松症的新型骨靶向雌激素类药物。

关键词: 大黄酸哌嗪雌酚酮(LC);人成骨细胞;MG-63;增殖;雌激素受体

Molecular mechanism of LC in promoting the proliferation of human osteoblast-like cells MG-63

LIANG Huiling¹, LI Zhengyang², NIU Xiulong¹, WANG Yue³, LI Lingzhi⁴

1. Affiliated Hospital to Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162
 2. Tianjin Stomatology Hospital, Tianjin 300000
 3. Department of Pathogen Biology and Immunology
 4. Department of Pharmaceutical Chemistry, Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China
- Corresponding author: WANG Yue, Email: wy68wy68@yahoo.com.cn; LI Lingzhi, Email: 13682196000@163.com

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of rhein-piperiziny-estrone (LC) on regulating the proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells. **Methods** Based on our previous studies, human osteoblast-like MG-63 cell line expressing endogenous ER α and ER β was selected as the model for this study. The effect of LC on the proliferation and cell cycle distribution of MG-63 cells was studied using MTT assay and FACS technology. MG-63/ER α shRNA, MG-63/ER β shRNA, and MG-63/scrambled shRNA stable cell lines were used to study the related signal pathways with Western blotting assay. **Results** LC increased proliferation of human osteoblastic MG-63 cells by altering cell cycle distribution. Treatment with the ER antagonist ICI 182,780 abolished the above action of LC on MG-63 cells. Using the MG-63/ER α shRNA, MG-63/ER β shRNA, and MG-63/scrambled shRNA stable cell lines, we further demonstrated that the effect of LC on proliferation was mediated by both ER α and ER β . Moreover, we demonstrated that the regulation of osteoblastic proliferation by LC involved Ras/MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. **Conclusion** LC promotes the proliferation of osteoblasts through both ER α and ER β , which may become a new estrogen-targeting drug for the treatment of postmenopausal osteoporosis.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273520, 8147182); 武警后勤学院科学技术研究项目(WHTD201303); 天津市卫生局科技基金(2014KZ046); 国家临床重点专科建设项目(2015BSCD13)

* 通讯作者: 王越 E-mail: wangyue6808@126.com; 李灵芝 E-mail: 13682196000@163.com

梁会岭 李正阳为共同第一作者

Key words: Rhein-piperiziny-estrone; Human osteoblasts; MG-63; Proliferation; Estrogen receptor

随着人类社会的老龄化,女性绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)已引起人们的广泛重视。雌激素水平的降低是其发生的首要病因^[1]。虽然雌激素替代疗法(estrogen replacement therapy, ERT)可有效减少PMOP的发生率,但同时可增加罹患乳腺癌、子宫内膜癌等恶性肿瘤的风险性。

大黄酸是从传统中药大黄中提取的有效成分,药效学分析表明,具有明显的抗菌、抗肿瘤、利尿、改善糖代谢异常、逆转胰岛素抵抗的作用^[2]。本课题组的前期工作发现,大黄酸具有高亲骨性^[3-4],可抑制破骨细胞形成和骨吸收^[5-6]。因大黄酸的抗肿瘤特性,可降低雌激素类药物产生的致瘤风险;相较而言,大黄酸比四环素^[7]、双磷酸盐(盐)^[8]、小分子杂环类^[9]以及酸性寡肽^[10]等趋骨性较强的化合物更为安全,是用作骨靶向性雌激素类药物的可靠载体。前期工作中,本课题组以大黄酸为载体、以天然雌激素——雌酚酮为母体,合成了大黄酸哌嗪雌酚酮(LC)^[11]。初步研究发现,LC可促进小鼠胚胎长骨的体外生长活性^[12],对去卵巢大鼠具有明显的抗骨质疏松活性,且对二者的子宫内膜无明显的刺激作用^[13]。但是,有关LC对人成骨细胞的作用及其机制研究尚需进一步探讨。

骨吸收的增强与骨质疏松的发展密切相关,而成骨细胞的凋亡是促进骨吸收的重要因素。有研究指出,雌激素类药物可调节成骨细胞的增殖与凋亡^[14-16],是发挥骨保护作用的重要因素。因此,本文在以往工作基础上,以兼有两种ER亚型表达的人成骨样MG-63细胞为研究对象^[17],并利用前期构建的ER α 或ER β 稳定高抑制表达的MG-63细胞株,重点探讨了LC对人成骨细胞增殖活性的影响及相关的分子机制,为LC的抗PMOP治疗的临床应用性提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

雌酚酮购自浙江仙居制药厂;大黄酸购自中国药品生物制品检定所;LC为本室合成;胎牛血清(FBS)为中美合资兰州民海生物工程有限公司产品;DMEM高糖培养基、活性碳处理的FBS(sFBS)为美国GIBCO公司产品;MTT、PI、纯ER阻断剂ICI 182,780为美国Sigma公司产品;BCA蛋白定量试

剂盒、化学发光底物检测试剂盒为美国Pierce公司产品;抗ER α 抗体、抗ER β 抗体、抗 β -actin抗体为美国Santa Cruz公司产品;抗Akt抗体、抗磷酸化ERK、抗磷酸化Akt抗体为美国CST公司产品;抗-ERK抗体为美国BD公司产品;HRP标记的二抗为美国KPL公司产品。

1.2 细胞系和细胞培养

人成骨样细胞系MG-63为美国ATCC公司产品,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。经shRNA技术构建的ER α 或ER β 稳定高抑制表达的MG-63细胞株,由本室前期构建并保存^[18]。上述细胞用含10%FBS的DMEM高糖培养液培养,该培养液含有100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素。

1.3 MTT法检测细胞增殖活性

取对数生长期的MG-63细胞,常规消化计数,调整细胞浓度为 6×10^4 /mL,每孔100 μ L接种于96孔培养板。细胞贴壁后,更换含1%FBS的高糖DMEM培养基培养24 h使细胞同步化。按1.4分别加入不同药物处理因素,结束培养前4 h,离心(1700 rpm, 10 min),弃上清,避光加入MTT(0.5 mg/mL, PBS配制)100 μ L /孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂继续培养4 h。离心(1700 rpm, 10 min),弃上清,加入0.04N盐酸异丙醇溶液100 μ L /孔,充分震荡至细胞内的蓝紫色结晶充分溶解,酶标仪检测各孔A492值。

1.4 药物处理细胞

为观察LC对MG-63细胞增殖活性的影响,分别以不同终浓度的LC(10、100、1000 nM)、雌酚酮(100 nM)、大黄酸(100 nM)或对照试剂DMSO作用细胞,各组、各浓度均设5个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂继续培养96 h后,常规MTT检测。为观察LC的促增殖作用是否由ER途径介导,取LC作用最明显的剂量(1000 nM),在加入LC之前先加入终浓度为100 μ M的ER阻断剂ICI 182,780,37 $^{\circ}$ C作用30 min,同时设立ICI 182,780对照组。为观察LC的促增殖活性经由哪种ER亚型发挥作用,以本室经shRNA技术构建的ER α 或ER β 稳定高抑制表达的MG-63细胞株为研究对象,经不同终浓度的LC(10、100、1000 nM)或雌酚酮(100 nM)处理后,应用MTT法检测成骨细胞增殖活性的差异。

1.5 流式细胞术检测细胞周期分布

取对数生长期的MG-63细胞,常规消化计数,

调整细胞浓度为 3×10^5 /mL 2 mL/孔接种 6 孔板。培养 24 h 细胞贴壁后, 更换含 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基 培养 24 h 使细胞同步化。加入 1000 nM LC, 分别作用 24 h、48 h、72 h、96 h, 同时设立对照组(不加药物, 加等量培养基), 每组设 3 个复孔。结束培养后, 收集细胞离心(1000 rpm 5 min)。弃上清, 用含 3% FBS 的 PBS 缓冲液洗两次 将细胞悬液逐滴加入到 4℃ 预冷的 70% 乙醇中, 4℃ 固定过夜。离心弃上清, 加入 300 μ L PBS 缓冲液、100 μ L RNase(50 μ g/mL) 37℃ 水浴 30 min。冰上加入终浓度为 0.1% 的 TritonX-100、50 μ g/mL PI 染液及 PBS 缓冲液各 200 μ L 4℃ 避光 40 min。过 400 目筛网成单细胞悬液, 上机检测 结果应用 ModFit LT for Mac V3.0 软件进行分析。

1.6 免疫印迹(Western Blot) 技术检测

取 60 μ g 蛋白 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移至 PVDF 滤膜。滤膜经室温封闭 1 h 后, 与一抗 4℃ 温和震荡过夜 再与 HRP 标记的二抗室温温育 1 h, 漂洗后应用化学发光底物检测试剂盒进行检测。结果应用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件进行分析, 以 β -actin 为内参照, 以靶蛋白/ β -actin 灰度的比值作为蛋白的相对表达丰度, 进行半定量检测。

1.7 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA) 以 $P < 0.05$ 作为判断差别显著性的标准。用 Excel 软件对所获得数据进行分析、处理图表。

2 结果

2.1 LC 可促进 MG-63 的细胞增殖活性

如图 1 所示, LC 和雌酚酮对 MG-63 细胞的增殖活性均具有显著的促进作用。与对照组相比, 100 nM、1000 nM LC 和 10 nM、100 nM 雌酚酮均能显著促进细胞增殖($P < 0.01$); 在 10nM ~ 1000 nM 剂量范围内, LC 的促增殖作用呈剂量依赖性, 雌酚酮的促增殖作用却随剂量的增加而逐渐减弱。大黄酸则以剂量依赖方式显著抑制细胞增殖, 其中, 100 nM 和 1000 nM 的大黄酸可明显抑制细胞($P < 0.01$)。

2.2 LC 可调节 MG-63 的细胞周期分布, 进而促进细胞生长

根据 MTT 的实验结果, 我们选择 1000 nM 的 LC 处理 MG-63 细胞, 分别作用 24 h、48 h、72 h 或 96 h 后, 应用流式细胞仪测定细胞周期的分布情

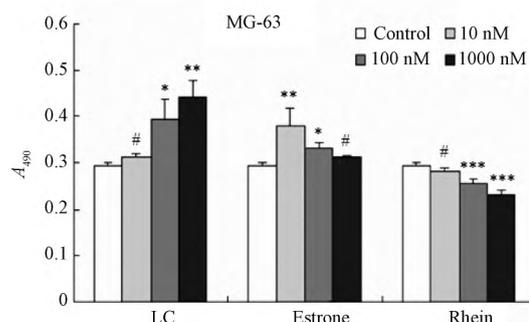


图 1 LC 对 MG-63 细胞增殖活性的调节作用

Fig. 1 Regulation of proliferation in human osteoblastic MG-63 cells by LC. # $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with vehicle control

况。由图 2 所示, 与对照组相比, 各 LC 处理组 G1 期细胞比例均明显减少, 其中, 对照组为 85.56%, 24 h、48 h、72 h、96 h LC 处理组分别为 79.00%、72.08%、65.66%、50.84%; 各 LC 处理组 G2 + S 期细胞比例均明显增加, 其中, 对照组为 14.44%, 24 h、48 h、72 h、96 h LC 处理组分别为 21.00%、27.92%、34.34%、49.16%。上述结果提示 LC 可调控 MG-63 细胞的细胞周期, 使 G1 期细胞比例减少、G2 + S 期细胞比例增加, 进而促进细胞的生长。

2.3 LC 可经 ER 途径对 MG-63 的增殖水平发挥促进作用

雌激素主要通过识别并结合骨组织(成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞)上的 ER, 来调节骨代谢。为了观察 LC 的促增殖作用是否经 ER 途径介导, 在加入 LC 前 30 min, 先用 ER 阻断剂 ICI 182,780 (100 μ M) 处理 MG-63 细胞。如图 3 所示, ICI 182,780 可以完全阻断 LC 的促增殖作用, 提示 LC 是经 ER 途径对 MG-63 的增殖活性发挥作用的。

2.4 LC 对 MG-63 的促增殖作用是由 ER α 和 ER β 共同介导的

ER 属于核受体超家族成员, 主要包括 ER α 、ER β 两种亚型。为了观察 LC 主要通过哪种 ER 亚型发挥作用, 我们采用脂质体法分别将 pGenesil-ER α -shRNA、pGenesil-ER β -shRNA 或相应的对照载体 pGenesil-scramble-shRNA 转染至 MG-63 细胞, 进一步筛选出 ER α 或 ER β 抑制表达的稳定细胞株, 细胞分别为 MG-63/ER α shRNA、MG-63/ER β shRNA、MG-63/scrambled shRNA。应用 MTT 法检测不同浓度 LC (0、10、100、1000 nM) 和雌酚酮 (100 nM) 对各稳定表达株的细胞增殖活性的影响。如图

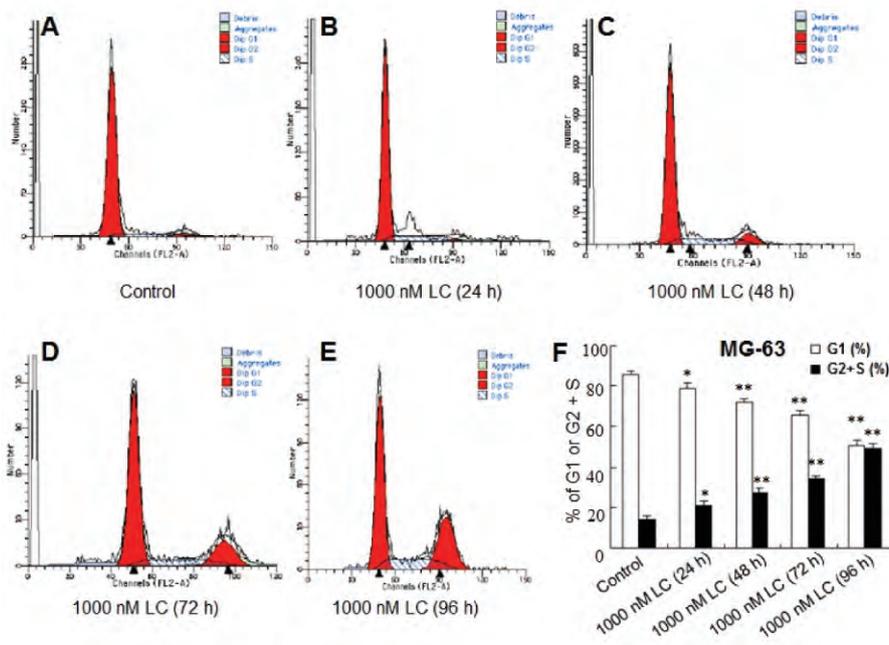


图2 LC对MG-63细胞周期的调节作用

Fig. 2 Regulation of cell cycle distribution in human osteoblastic MG-63 cells by LC.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle control.

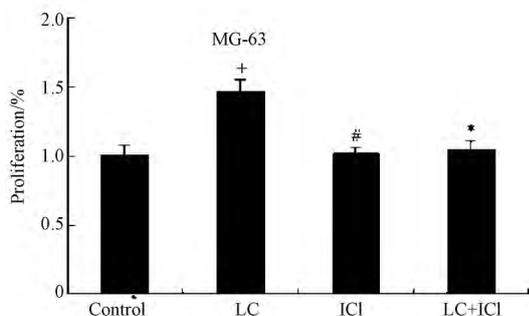


图3 ICI 182 780 阻断 LC 对 MG-63 细胞的促增殖作用

Fig. 3 The ER antagonist ICI 182 780 blocked the LC-enhanced proliferation of human osteoblastic MG-63 cells. [#] $P > 0.05$, ⁺ $P < 0.001$ compared with vehicle control; ^{*} $P < 0.001$ compared with LC alone.

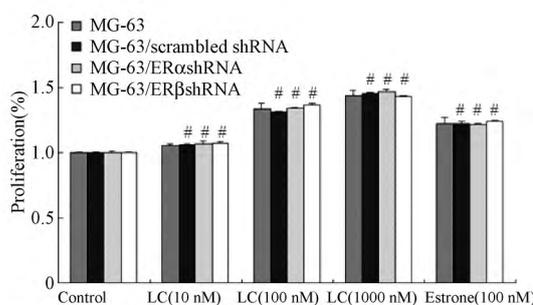


图4 LC对MG-63/scrambled shRNA、MG-63/ER α shRNA、MG-63/ER β shRNA细胞增殖活性的影响

Fig. 4 Effect of LC on the proliferation in MG-63/scrambled shRNA, MG-63/ER α shRNA and MG-63/ER β shRNA cells. [#] $P > 0.05$ compared with parental MG-63 cells.

4所示与对照组相比,LC和雌酚酮对各组细胞均具有促增殖作用,但该作用在野生型MG-63细胞、MG-63/scrambled shRNA细胞、MG-63/ER α shRNA细胞和MG-63/ER β shRNA细胞间无显著差异($P > 0.05$)。上述结果提示,LC对ER受体的两种亚型具有相似的亲和力,其对MG-63的促增殖作用是由ER α 和ER β 共同介导的。

2.5 LC对MG-63的促增殖作用与Ras/MEK/

ERK、PI3K/Akt信号通路激活有关

有研究指出^[19]雌激素对小鼠成骨细胞生长的促进作用,主要是通过非基因组作用机制,即激活Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt信号通路,进而控制细胞的增殖、分化及凋亡。如图5所示,LC和雌酚酮可显著促进ERK和Akt的磷酸化水平;用25和50 μ M PD98059(MEK1/2抑制剂)、或100和200 nM wortmannin(PI3K抑制剂)预先处理MG-63细胞30

min后,可显著阻断LC和雌酚酮对ERK和Akt的激活作用。MTT结果显示(如图6所示),PD98059和wortmannin均可明显阻断LC的促增殖作用($P < 0.05$),以50 μM PD98059和200 nM wortmannin的阻断作用最为显著($P < 0.01$)。上述结果表明,LC可通过激活Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt信号通路,发挥对MG-63细胞的促增殖作用。

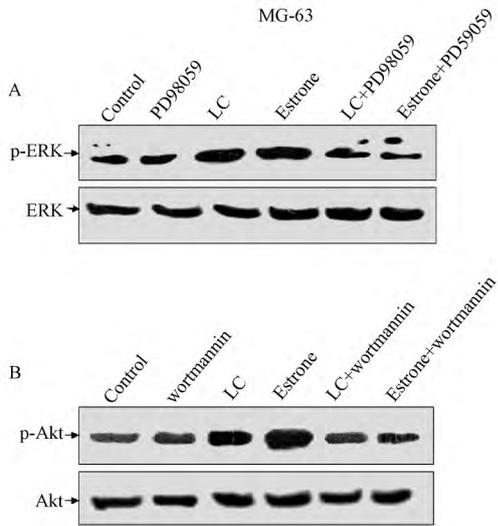


图5 LC对MG-63细胞Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt信号通路的激活作用

Fig. 5 Activation of Ras/MEK/ERK and PI3K/Akt signaling in human osteoblastic MG-63 cells by LC.

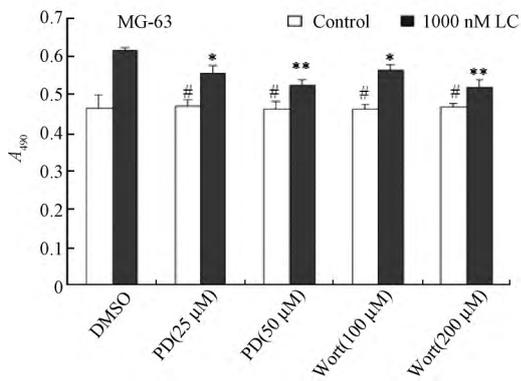


图6 PD98059和wortmannin阻断LC对MG-63细胞的促增殖作用

Fig. 6 PD98059 and wortmannin blocked the LC-enhanced proliferation of human osteoblastic MG-63 cells. # $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle control.)

3 讨论

本课题组的前期工作中,人工合成了新型骨靶向雌激素LC,其目的在于增强雌激素类药物的骨靶向性治疗作用,同时利用大黄酸的促肿瘤细胞凋亡活性,规避雌激素替代疗法的致癌风险性。我们的前期研究已发现,LC能显著促进原代大鼠成骨细胞的增殖。本文的实验结果表明,LC和雌酚酮对人成骨样细胞MG-63同样具有显著的促增殖作用;在10 nM~1000 nM剂量范围内,二者的有效浓度不同,其中LC在1000 nM的作用最为显著,而雌酚酮的最有效浓度为10nM。出现上述结果的可能原因有两方面,一是雌酚酮与大黄酸偶联构成LC以后,雌酚酮本身的分子构型改变,部分影响了其与ER的结合能力;二是LC化合物中的大黄酸具有抑制成骨细胞增殖的作用,也在一定程度上影响了LC的量效。

细胞周期测定是研究细胞增殖动力学的一种快速而准确的方法。体外研究证实^[20],植物雌激素葛根素可促进成骨细胞的增殖,使G2+S期细胞比例显著增加。本文实验结果表明,与对照组相比,LC可使G1期细胞比例明显减少,G2+S期细胞比例明显增加,提示LC通过调控成骨细胞的细胞周期的分布,来促进成骨细胞的生长。

LC作为一种防治PMOP的全新合成药物,其发挥作用的机制与其母体雌酚酮是否存在差异尚不明,因此,本文进一步探讨了LC对人成骨细胞发挥促增殖作用的可能的分子机制。

雌激素通过骨组织(成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞)上的ER来发挥对骨代谢的保护作用,该作用与雌激素对ER的亲合力及ER亚型分布密切相关。ER属于核受体超家族成员,主要包括ER α 和ER β 两种亚型,二者的N端差异可导致它们对不同配体的亲和力和反应能力有所不同,从而引发不同的生物学效应。雌激素参与骨代谢的相关研究表明,选择性ER调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERMs)对骨的保护作用主要由ER β 介导^[21]。本文的实验结果表明,ER阻断剂ICI 182,780可完全阻断LC的促增殖作用,证实LC的促增殖作用是ER途径依赖的。采用RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)对MG-63细胞中的ER α 、ER β 基因分别进行沉默,筛选出ER α 或ER β 高抑制表达的稳定细胞株以后,进一步研究发现,LC可经ER α 和ER β 来共同介导促增殖的活性作用。

Kallio 等^[22]对 ER α ⁻ER β ⁻的人骨肉瘤细胞 U2OS 的研究结果与本文相似,在过表达 ER α 或 ER β 后,17 β -雌二醇可对其可发挥相似的抗凋亡活性,证明雌激素可通过 ER α 和 ER β 共同发挥骨保护作用。这表明 LC 与 ER 具有亲和性,其骨靶向作用与 ER 的表达丰度有关,但不受 ER 亚型分布的影响^[23]。

ER 包括核受体和膜受体两种。一方面雌激素可由核受体 ER 通过经典的、长效基因组机制发挥作用;另一方面,雌激素可由膜受体 ER 通过快速的、短效非基因组机制发挥作用。膜型 ER 活化后,可激活有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等信号通路,进而调节细胞的增殖与凋亡。Schiff 等证实^[23-24],雌激素对小鼠成骨细胞生长的促进作用,主要是通过膜受体的非基因组机制完成,即激活 Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt 信号通路,进而控制细胞的增殖、分化及凋亡。我们的前期研究结果证实,LC 可通过 ER 的经典基因组机制,即 ERE 基因转录途径发挥作用^[18]。本文的研究结果进一步表明,LC 和雌酚酮可显著促进 ERK 和 Akt 的磷酸化水平;MAPK 特异性信号阻断剂 (ERK 抑制剂 PD98059) 和 wortmannin (PI3K 抑制剂) 可显著抑制 LC 和雌酚酮对 ERK 和 Akt 的激活作用、阻断 LC 的促增殖作用。这说明,LC 可通过激活与细胞生长相关的 Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt 信号通路,发挥对 MG-63 细胞的促增殖作用。

总之,本文结果显示,LC 对人成骨细胞具有明显的促增殖作用,该作用可由 ER 的两种亚型共同介导。因此,作为一种新型骨靶向雌激素,LC 在女性绝经后骨质疏松症的临床治疗方面,具有广阔的应用前景。

【参 考 文 献】

- [1] 吴海洋,索欢,王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 241-244.
Wu Haiyang, Suo Huan, Wang Ping. The clinical progress in the treatment of postmenopausal osteoporosis using traditional Chinese medicine. Chin J Osteoporos, 2015, 21(2): 241-244. in Chinese.
- [2] Zhou YX, Xia W, Yue W, et al. Rhein: A Review of Pharmacological Activities. Evid Based Complement Alternat Med, Epub 2015 22.
- [3] 崔颖,李灵芝,朱江. HPLC 法测定小鼠骨中大黄酸浓度. 中国新药杂志, 2008, 13(17): 1154-1156.
Cui Ying, Li Lingzhi, Zhu Jiang. Determination of rhein in mouse bone by HPLC. Chin J New Drugs, 2008, 13(17): 1154-1156. in Chinese.
- [4] 张丽,崔颖,李灵芝. 大黄蒽醌类化合物的羟磷灰石吸附性能研究. 武警医学院学报, 2008, 17(12): 1048-1050.
Zhang Li, Cui Ying, Li Lingzhi. Research on absorbance ability of radix anthraquinone compounds by hydroxyapatite. Acta Academiae Medicinae CPAF, 2008, 17(12): 1048-1050. in Chinese.
- [5] 王霖,毛昱嘉,王文杰. 双醋瑞因对破骨细胞性骨破坏的抑制作用及机制. 药学学报, 2006, 41(6): 555-560.
Wang Lin, Mao Yujie, Wang Wenjie. Inhibitory effect of diacerein on osteoclastic bone destruction and its possible mechanism of action. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006, 41(6): 555-560. in Chinese.
- [6] Boileau C, Tat SK, Pelletier JP, et al. Diacerein inhibits the synthesis of resorptive enzymes and reduces osteoclastic differentiation/survival in osteoarthritic subchondral bone: a possible mechanism for a protective effect against subchondral bone remodelling. Arthritis Res Ther, 2008, 10(3): R71.
- [7] Neale JR, Richter NB, Merten KE, et al. Bone selective effect of an estradiol conjugate with a novel tetracycline-derived bone-targeting agent. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(3): 680-683.
- [8] Tsushima N, Yabuki M, Harada H, et al. Tissue distribution and pharmacological potential of SM-16896, a novel oestrogen-bisphosphonate hybrid compound. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(1): 27-37.
- [9] Willson TM, Charifson PS, Baxter AD, et al. Bone targeted drugs 1: identification of heterocycles with hydroxyapatite affinity. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6(9): 1043-1046.
- [10] Yokogawa K, Toshima K, Yamoto K, et al. Pharmacokinetic advantage of an intranasal preparation of a novel anti-osteoporosis drug, L-Asp-hexapeptide-conjugated estradiol. Biol Pharm Bull, 2006, 29(6): 1229-1233.
- [11] 李灵芝,崔颖,张永亮,等. 大黄蒽醌衍生物及其制备方法以及该衍生物为活性成分的药物组合物. 中国专利, 2004, ZL10094131.7.
Li Lingzhi, Cui Ying, Zhang Yongliang, et al. Preparative methods of radix anthraquinone derivatives and active components of these derivatives-based drug combination. Chinese Patent, 2004, ZL10094131.7.
- [12] 李灵芝,崔勇,崔颖,等. 大黄酸-雌激素偶联物的合成及其药理学活性. 中国药科大学学报, 2007, 38(1): 6-11.
Li Lingzhi, Cui Yong, Cui Ying, et al. Synthesis and pharmacological activities of a series of estrogen-rhein hybrid compounds. Journal of China Pharmaceutical University, 2007, 38(1): 6-11. in Chinese.
- [13] 张岭,金鑫,李灵芝,等. 新型骨靶向雌激素大黄酸-雌酮抗骨质疏松活性研究. 武警医学院学报, 2010, 19(11): 841-843.
Zhang Ling, Jin Xin, Li Lingzhi, et al. Effects of rhein-estrone on bone mineral density and uterus in ovariectomized rats. Acta Academiae Medicinae CPAF, 2010, 19(11): 841-843. in Chinese.

- 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. 17β -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)