

健骨颗粒对 ER 表达沉默成骨细胞株 ROS1728 的分化的研究

林煜¹ 肖莉莉¹ 林焱斌¹ 张怡元¹ 黄云梅² 吴银生² 林燕萍^{2*}

1. 厦门大学附属福州第二医院骨科 福建 福州 350007

2. 福建中医药大学 福建 福州 350102

中图分类号: Q95-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 01-0022-05

摘要: 目的 探讨健骨颗粒对成骨细胞中 ER α 介导的 TERT 信号通路的调控作用。方法 采用雌激素受体拮抗剂 ICI182780 (Faslodex) 阻断成骨细胞中雌激素受体 α (ER α) 的表达, 建立 ER 抑制的大鼠成骨细胞株 ROS1728 细胞模型, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测成骨细胞液中碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素 (osteocalcin, BGP)、I 型胶原 (collagen I, Col I) 的含量。采用实时荧光定量 SYBR GREEN 法检测 ERE、ER α 、c-MYC mRNA 的表达。采用 Western Blot 检测 TERT、ER α 、c-MYC 蛋白的表达。结果 ELISA 法检测结果显示: 随着干预时间的延长, 培养液中的 ALP、BGP、Col I 的含量逐渐上升。其中对照组 3 种信号因子的含量最高, 雌激素组次之, 健骨颗粒组再次之, 模型组最低, 各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4 组 TERT、ER α 、c-MYC mRNA 及蛋白表达量情况以对照组的蛋白表达含量最高, 雌激素组次之, 健骨颗粒组再次之, 模型组最低。各组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 雌激素介导 TERT 信号通路及其相关因子与成骨细胞分化的关系密切, 而补肾健脾中药健骨颗粒可通过雌激素介导 TERT 信号通路促进成骨细胞分化。

关键词: 沉默成骨细胞株; 雌激素受体 α ; 端粒酶逆转录酶; 分化

Study of the effect of Strong-bone granules on the differentiation of ROS1728 osteoblasts with silenced ER expression

LIN Yu¹, XIAO Lili¹, LIN Yanbin¹, ZHANG Yiyuan¹, WU Yinsheng², HUANG Yunmei², LIN Yanping^{2*}

1. Department of Orthopedics, Fuzhou No. 2 Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China

2. Bone Disease Research Institute, Integrative Medicine Institute, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian, China.

Corresponding author: LIN Yanping, Email: lyp66@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Strong-bone granules on the regulation of TERT signaling pathway mediated by ER alpha in osteoblasts. **Methods** The estrogen receptor antagonist ICI182780 (Faslodex) was used to inhibit the expression of ER in osteoblasts and to establish the ER-silenced model of rat osteoblast cell line ROS1728. Serum ALP, BGP, and Col I were determined using enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expression of ERE, ER α , and c-MYC was determined using real time quantitative SYBR GREEN assay. The protein expression of ERE, ER α , and c-MYC was detected using Western blotting. **Results** The results of ELISA showed that the content of ALP, BGP, and Col in the culture medium increased gradually with the prolonging of intervention time. The levels were the highest in the control group, then followed in estrogen group, Strong-bone granules group, and the model group, and the difference among the groups was significant ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of TERT, ER alpha, and c-MYC was the highest in the control group, then followed in estrogen group, Strong-bone granules group, and the model group, and the difference among the groups was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The estrogen mediated TERT signaling pathway and its related factors are closely related to the differentiation of osteoblasts. Strong-bone granules promote osteoblast differentiation through estrogen mediated TERT signaling pathway.

Key words: ROS1728; ER α ; TERT; Differentiation

基金项目: 国家自然科学基金(81302986); 福建省卫生厅中医课题(wzgs201308); 福州市卫生系统科技项目(2013-S-wq8, 2014-S-w12)

* 通讯作者: 林燕萍, Email: lyp66@126.com

骨质疏松(osteoporosis)是一种常见的与年龄、性激素相关的退行性疾病。机体在达到骨峰值后,随着年龄的增长、性激素水平的降低,成骨细胞活性逐渐降低,而破骨细胞活性相对增强,导致骨吸收大于骨形成,骨量减少。因此,骨质疏松是与衰老密切相关性疾病,而端粒酶在衰老过程中起着关键作用。端粒酶是一种特异的染色体末端转移酶,能以自身 RNA 为模板,合成端粒 DNA 并加到染色体末端,使端粒延长,从而延长细胞的寿命甚至使其永生^[1]。端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)是端粒酶活性的决定因素, TERT 表达与端粒酶活性高度相关,能激活端粒酶抑制端粒 DNA 的消耗^[2]。端粒、端粒酶调节机制与机体雌激素水平的关系十分密切,研究证实,雌激素主要作用于 TERT 基因的启动子,对 TERT 转录水平进行调节而激活端粒酶^[3]。前期研究显示:成人男性和女性骨组织中 TERT、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 均会随着年龄的增加逐渐下降^[4]。而以补肾健脾立法的健骨颗粒,能明显提高大鼠体内雌二醇(estradiol, E₂)水平,促进成骨细胞的增殖和分化,提高细胞的代谢活力,延缓成骨细胞的凋亡,改善骨组织结构,达到防治骨质疏松的目的^[5-8]。因此,本研究拟采用采用补肾健脾中药健骨颗粒干预不同性别不同年龄老年鼠,从雌激素调节 TERT 活性角度探讨健骨颗粒防治骨衰老机制的可能机制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验药物

健骨颗粒由煨狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、山药等药味组成,原药材统一由福建省医药公司提供,福建中医药研究院中试车间负责加工制备,每克颗粒含原生药 2.9 g。

1.2 实验细胞及动物

成骨细胞株 ROS1728(由中科院上海细胞库提供) 3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠 20 只(由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供)用于制备含药血清。

1.3 实验试剂

低糖 DMEM 培养基、小牛血清、青/链霉素(新西兰 Hyclone 公司产品) 细胞碱性磷酸酶(AKP) 染色试剂盒、ALP、BGP、Col I 酶联免疫吸附测试剂盒(上海西唐公司), TRIZOL(MBI Fermentas 公司), PCR 引物(博尚生物技术有限公司), 反转录试剂

盒、SYBR @Premix Ex Taq™ PCR Kit(日本 TaKaRa 公司)。ER α 、TERT、c-MYC 抗体(德国 Calbiochem 公司); β -actin 抗体(美国 Cell Signaling 公司); WesternBreeze(美国 invitrogen 公司); PVDF 膜(Amersham 公司)。

1.4 主要实验仪器

二氧化碳恒温培养箱(BB16/BB5060 型,德国 Heraeus 公司), Olympus 倒置相差显微镜(日本 TKO 光学仪器株式会社), Du650 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司), BT224 半自动生化分析仪(意大利生物技术公司), 9600DNA 扩增仪(美国 PE 生物系统公司), 7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 ER 抑制的大鼠成骨细胞株 ROS1728 细胞模型的建立: 于 37℃、5%的 CO₂ 培养箱中培养。细胞传代 24 h 后加药,药物(ICI182780) 溶解于二甲亚砜(DMSO),终浓度为 1×10^{-5} mol/L。加药 60 h 后取细胞,采用 Western Blot 法检测干预后细胞中 ER α 的表达。

1.5.2 含药血清制备: 取 3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠 30 只,分别喂服健骨颗粒、生理盐水、雌二醇连续灌胃 7 d,于最后 1 次灌胃后 1 h 腹主动脉无菌取血,常温下静置 60 min, 3000 r/min 离心 10 min 后取同组血清混合,再离心 1 次, 56℃ 灭活 30 min, 过滤除菌, -20℃ 保存备用。

1.5.3 分组: 将 ER 抑制的大鼠成骨细胞株 ROS1728 细胞以 1×10^5 /mL 传代接种于培养皿、培养瓶或培养板中,加入不含小牛血清的单纯 DMEM 培养基,饥饿 24 h,使细胞同步化于 G₀ 或 G₁ 期,对照组为正常 ROS1728 细胞加入最佳浓度的生理盐水血清,模型组为 ER 抑制的 ROS1728 细胞模型,药物刺激组在 ER 抑制的 ROS1728 细胞加入最佳浓度的健骨颗粒颗粒含药血清,雌激素组在 ER 抑制的 ROS1728 细胞加入最佳浓度的雌二醇含药血清。

1.5.4 成骨细胞分泌 ALP、BGP、Col I 的测定: 分别按各试剂盒说明书。

1.5.5 实时荧光定量 SYBR GREEN 法检测 ERE、ER α 、c-MYC、P53、Pot1、NF- κ BmRNA 的表达: 收集连续培养 3d 细胞,采用实时荧光相对定量 SYBR GREEN 法检测。ERE 引物: ERE 引物序列: 上游引物 F: 5' -AAGGAGCACCTCTCAAACC-3', 下游引物 R: 5' -AAATGGACTACAGCCGCTT-3', 产物长度: 189bp; ER α 引物序列: 上游引物 F: 5' -

ACCTCAAGATGTGCCACTC-3', 下游引物 R: 5'-TGCTCTCTCCAAACCAGAC-3', 产物长度: 197bp; c-MYC 的引物序列: 上游引物 F: 5'-CTGATGAAGGAACCTCTGAGTT-3' 下游引物 R: 5'-CTGACAGTTGATGCGAGTG-3', 产物长度: 189bp; 内参 β -actin 引物: 上游 5'-AGGCTGTGTTGTCCCTGTA3', 下游 5'-ATGTCACGCACGATTTCC3', 产物长度 193bp。采用 Trizol 法提取总 RNA, 抽提后的 RNA 加入溴酚蓝进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果通过凝胶图像分析系统对条带进行分析; 检验 RNA 无降解, 测定 RNA 的吸光度值, 计算出 RNA 的浓度, 在根据浓度计算出体积后取 RNA 500ng 按试剂盒步骤进行反转录。反转录后在 ABI7500 上按照试剂说明进行 mRNA 扩增, 得到扩增曲线与 CT 值。将得到的各组目的基因及 β -actin 基因的值分别代入各自的标准曲线, 换算出各自的起始模板量。以 β -actin 作为参比基因对所有样品进行 RNA 校正, 用待测基因的定量结果除以 β -actin 定量结果即可得到校正值。以阴性对照组 mRNA 的表达量作为“1”, 再根据校正值计算出其他各组的相对量, 进行组间相对量的比较。

1.5.6 Western Blot 检测 TERT、ER α 、c-MYC 蛋白的表达: 提取细胞的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 以每泳道 30 μ g 蛋白上样, 进行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移将胶上蛋白转印至 PVDF 膜。膜以封闭液室温封闭 30 min。将与目的蛋白融合表达的标签抗体 1:5000 稀释, 封闭膜 1 h。每次 40 mL 洗液漂洗膜 6 次, 即: 1 min 2 次; 20 min 2 次; 5 min 2 次。然后将碱性磷酸酶标记的二抗室温封闭膜 30 min, 然后如前洗膜。将 AP 化学发光底物与膜室温下孵育反应 5 min, 暗室中压 X 片曝光、显影。应用 Phoretix 1D 生物电泳图象分析系统分析胶片中的目的条带, 计算机自动读取并记录每条带的光密度值。

1.6 统计学处理

所得实验数据运用 SPSS 13.0 软件包处理分析, 参数值用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间比较先采用 F 检验, 而后进行 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Western Blot 检测 ER 抑制的大鼠成骨细胞株 ROS1728 细胞模型的是否建立

用 ICI182780 干预 ROS1728 细胞后, Western

blot 分析目的蛋白的表达发现: 模型组 ER α 表达呈阴性, 而正常 ROS1728 细胞表达呈阳性, 组间比较均有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 1)。

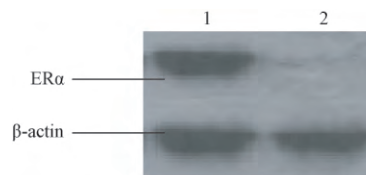


图 1 各组 ER α 蛋白表达

1-正常 ROS1728 细胞组; 2-模型组

Fig. 1 Expression of ER protein in each group

2.2 不同浓度含药血清促成骨细胞增殖

AlamarBlue 检测绘制成骨细胞增殖曲线图, 生理盐水血清组细胞随血清浓度增加增殖速度改变不明显, 当浓度达到 50% 时, 细胞增殖明显降低; 健骨颗粒血清组细胞随血清浓度增加而增殖加快, 并在含药血清浓度为 20% 时增殖速度最快; 雌激素血清组细胞随血清浓度增加而增殖加快, 并在含药血清浓度为 35% 时增殖速度最快; 两组与同浓度生理盐水血清组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 随后随着血清浓度继续增加, 其增殖速度下降 (见图 2)。因此确定 20% 健骨颗粒血清、35% 雌激素血清组为促成骨细胞增殖最佳浓度。

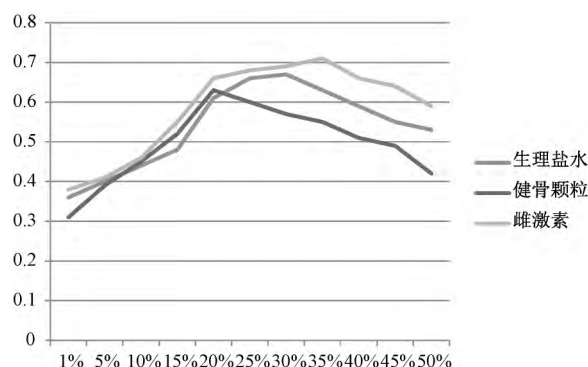


图 2 不同浓度不同组别血清对 ROS1728 增殖的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of serum on the proliferation of ROS1728 cells

2.3 细胞培养液中 ALP、BGP、Col I 等信号因子的表达

采用不同血清干预成骨细胞后, ELISA 法分析细胞液中的 ALP、BGP、Col I 发现: 随着干预时间的延长, 培养液中的三种信号因子的含量逐渐上升, 各组内不同天数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而组间比较显示: 对照组 3 种信号因子的水平最高, 雌激素组次之, 健骨颗粒组再次之, 模型组最低, 各

组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。(见表 1-3)

表 1 4 组成骨细胞培养液中 ALP 的含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 4 Content of ALP in osteoblast culture medium in the 4 groups ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

干预时间	2d	4d	6d
模型组	0.738 ± 0.118 ^{bed}	0.754 ± 0.225 ^{bed}	0.782 ± 0.338 ^{bed}
健骨颗粒组	1.637 ± 0.088 ^{acd}	1.914 ± 0.025 ^{ad}	2.112 ± 0.068 ^{ad}
雌激素组	2.038 ± 0.118 ^{abd}	2.114 ± 0.085 ^{ad}	2.212 ± 0.138 ^{ad}
对照组	3.019 ± 0.276 ^{abc}	3.225 ± 0.046 ^{abc}	3.351 ± 0.055 ^{abc}

注:与同期模型组比较,^a $P < 0.05$;与同期健骨颗粒组比较,^b $P < 0.05$;与同期雌激素组比较,^c $P < 0.05$;与同期对照组比较,^d $P < 0.05$

表 2 4 组成骨细胞培养液中 BGP 的含量 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Table 2 Content of BGP in osteoblast culture medium in the 4 groups ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

干预时间	2 d	4 d	6 d
模型组	1.174 ± 0.132 ^{bed}	1.226 ± 0.206 ^{bed}	1.382 ± 0.343 ^{bed}
健骨颗粒组	1.839 ± 0.058 ^{acd}	2.244 ± 0.104 ^{ad}	2.653 ± 0.118 ^{ad}
雌激素组	2.019 ± 0.098 ^{abd}	2.414 ± 0.073 ^{ad}	2.812 ± 0.178 ^{ad}
对照组	3.323 ± 0.107 ^{ab}	3.532 ± 0.086 ^{ab}	3.831 ± 0.173 ^{ab}

注:与同期模型组比较,^a $P < 0.05$;与同期健骨颗粒组比较,^b $P < 0.05$;与同期雌激素组比较,^c $P < 0.05$;与同期对照组比较,^d $P < 0.05$

表 3 4 组成骨细胞培养液中 Col I 的含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 3 Content of Col I in osteoblast culture medium in the 4 groups ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

干预时间	2d	4d	6d
模型组	2.542 ± 0.232 ^{bed}	3.226 ± 0.606 ^{bed}	5.382 ± 1.321 ^{bed}
健骨颗粒组	3.839 ± 0.738 ^{ad}	7.244 ± 1.147 ^{ad}	12.653 ± 0.928 ^{acd}
雌激素组	4.019 ± 1.098 ^{ad}	7.414 ± 0.873 ^{ad}	15.812 ± 1.378 ^{abd}
对照组	6.323 ± 0.907 ^{abc}	13.532 ± 0.943 ^{abc}	20.831 ± 1.277 ^{abc}

注:与同期模型组比较,^a $P < 0.05$;与同期健骨颗粒组比较,^b $P < 0.05$;与同期雌激素组比较,^c $P < 0.05$;与同期对照组比较,^d $P < 0.05$

2.4 各组细胞中 ERE、ER α 、c-MYC 基因表达

qPCR 结果表明:健骨颗粒组及雌激素组的 ERE、ER α 、c-MYC 的 RNA 的表达均高于模型组,但低于对照组,且雌激素组的 ERE、ER α 、c-MYC 表达高于健骨颗粒组,各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (见表 4)。

表 4 各组细胞中 ERE、ER α 、c-MYC 的 mRNA 的表达结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 mRNA expression of ERE, ER, and c-MYC in the cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	ERE	ER α	c-MYC
模型组	0.518 ± 0.012 ^{bed}	0.563 ± 0.033 ^{bed}	0.424 ± 0.021 ^{bed}
健骨颗粒组	1.883 ± 0.021 ^{acd}	2.121 ± 0.031 ^{acd}	1.849 ± 0.034 ^{acd}
雌激素组	2.234 ± 0.027 ^{abd}	2.821 ± 0.061 ^{abd}	2.779 ± 0.041 ^{abd}
对照组	3.083 ± 0.028 ^{abc}	3.421 ± 0.043 ^{abc}	2.849 ± 0.034 ^{abc}

注:^a与模型组比较, $P < 0.01$;^b与健骨颗粒组比较, $P < 0.01$;^c与雌激素组比较, $P < 0.01$;^d与对照组比较, $P < 0.01$

2.5 各组细胞中 TERT、ER α 、c-MYC 蛋白表达

4 组 TERT、ER α 、c-MYC 蛋白表达量情况以对照组的蛋白表达含量最高,雌激素组次之,健骨颗粒组再次之,模型组最低。各组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$) (详见图 3)。

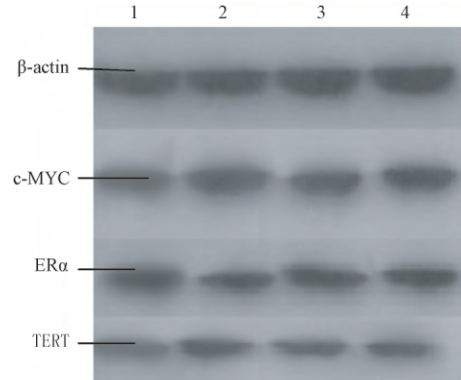


图 3 各组 TERT、ER α 、c-MYC 蛋白表达

1-模型组 2-健骨颗粒组 3-雌激素组 4-对照组

Fig. 3 Expression of TERT, ER, and c-MYC protein in each group

3 讨论

端粒酶是一种具有特殊逆转录酶活性的核糖核蛋白复合物,能保证染色体结构的稳定性和完整性、防止细胞的衰老和凋亡。而 TERT 是端粒酶起作用的关键结构,可通过逆转录端粒酶 RNA 模板序列,合成端粒 DNA 重复序列并添加到染色体末端,从而延长端粒长度。在 TERT 启动子序列上有两个雌激素反应元件(ERE)通过雌激素受体 α (ER α) 结合 TERT 基因启动子区域的 ERE 激活 TERT mRNA 的转录进行^[9-11]。在表达 ER 的细胞中,雌激素可与胞质内的 ER 结合,通过 ERE 直接激活端粒酶逆转录酶的表达^[12]。此外在增龄性衰老过程中,TNF- α 基因表达和活性的抑制也与衰老具有时间相关性:TNF- α 可通过端粒酶依赖机制,直接损伤 DNA 导致的端粒紊乱,降低端粒酶的活性导致端粒损伤来诱导细胞衰老、凋亡^[13];另外 TNF- α 可以通过诱导与 NF- κ B 结合的 TERT 蛋白,由细胞浆转移到细胞核来调节端粒酶的活性。NF- κ B 被 TNF- α 激活后,调节其下游的靶点 TERT,抑制其活性^[14,15]。因此随着衰老、性腺功能降低,体内雌激素水平的下降导致 TERT 水平的降低,使骨组织中 ER 表达阳性的成骨细胞功能衰退,骨形成低于骨吸收,从而导致骨质疏松的发生。本实验采用 ER α 特异性抑制剂

ICI182780 阻断 ROS1728 细胞 ER α 表达后,模型组 TERT、ER α 、c-MYCmRNA 及蛋白表达量均显著低于对照组 ($P < 0.05$),同时模型组细胞中 ALP、BGP、Col I 的含量也低于对照组,表明 ER 介导的 TERT 信号通路与成骨细胞功能衰退密切相关。

补肾健脾中药健骨颗粒是针对骨质疏松“肾亏脾虚”的病机特点,以“肾主骨”、“补先后天”理论为组方原则,选用煨狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、山药等药物。方中煨狗骨味甘,性温,功能补益肝肾、活血通络;淫羊藿味辛甘,性温,与煨狗骨共奏补肾益精、强筋健骨之效。山茱萸味酸涩,性微温,酸涩主水,温能助阳,故能柔润助阴,补益肝肾,滋养精血而助元阳之不足,进一步增强煨狗骨、淫羊藿之补肾益精。党参、山药健脾益气,使气血生化有源,气旺则精足,精足则髓充,髓充则骨养,为肾中精气的充养提供来源。诸药合用,可通过补肾健脾,达到强筋壮骨之目的。在使用健骨颗粒含药血清后,随着干预时间的延长,培养液中的 ALP、BGP、Col I 的含量逐渐上升。其中对照组 3 种信号因子的含量最高,雌激素组次之,健骨颗粒组再次之,模型组最低 ($P < 0.05$)。4 组 TERT、ER α 、c-MYCmRNA 及蛋白表达量情况以对照组的蛋白表达含量最高,雌激素组次之,健骨颗粒组再次之,模型组最低 ($P < 0.05$)。提示健骨颗粒通过补肾健脾,调节机体雌激素水平,提高成骨细胞 ER α 的表达,从而使 TERT 表达增强,提升了成骨细胞活性和功能,抑制成骨细胞的凋亡,促进骨重建过程中骨形成量的增加。

总之,健骨颗粒是通过影响雌激素介导的 TERT 及其相关因子的变化,从而促进成骨细胞分化及延缓细胞凋亡,是有效防治绝经后骨质疏松症的一个重要环节。

【参 考 文 献】

- [1] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997, 90 (4): 785-795.
- [2] Wei L L, Gao K, Lu P Q, et al. Mesenchymal stem cells from chinese guizhou minipig by hTERT gene transfection. *Transplantation Pro* 2008, 40: 547-550.
- [3] Hosoi T, Inoue Y, Nakatsu K, et al. TERT attenuated ER stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447 (2): 378-382.
- [4] 林煜, 张怡元, 吴银生, 等. 肾主骨理论与雌激素介导的骨组织端粒酶逆转录酶增龄性变化之关系研究. *中华中医药杂志*, 2015, 30(4): 1066-1070.
- [5] Lin Y, Zhang YY, Wu YS, et al. The relationship between kidneys governing bone and estrogen-mediated bone tissue telomerase reverse transcriptase aging changes. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2015, 30(4): 1066-1070.
- [5] 林煜, 卢天祥, 吴银生, 等. 健骨颗粒含药血清与成骨细胞整合素/黏着斑激酶信号通路相关因子的表达. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(46): 8625-8630.
- [6] Lin Y, Lu TX, Wu YS, et al. A study on the relationship of the factors of integrin signal transduction /FAK and the role of Jiangu granula intervention. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2010, 14(46): 8625-8630.
- [6] 林煜, 卢天祥, 吴银生, 等. 健骨颗粒促进成骨细胞增殖的分子机制. *中国组织工程研究*, 2013, 17(15): 2677-2684.
- [7] Lin Y, Lu TX, Wu YS, et al. Molecular mechanism by which Jiangu granules promote osteoblast proliferation. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2013, 17(15): 2677-2684.
- [7] 林煜, 卢天祥, 吴银生, 等. 健骨颗粒对成骨细胞分化影响的实验研究. *中华中医药杂志*, 2012, 27(1): 162-165.
- [8] Lin Y, Lu TX, Wu YS, et al. Experimental study of the effect of Jiangu granula on osteoblast in differentiation. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2012, 27(1): 162-165.
- [8] 杨文亮, 林燕萍. 健骨颗粒对大鼠成骨细胞雌激素受体表达的影响. *福建中医学院学报*, 2009, 19(5): 31-34.
- [9] Yang WL, Lin YP. Effect of Jiangu granula on the expression of estrogen receptor in rat osteoblasts. *Journal of Fujian College of Traditional Chinese Medicine* 2009, 19(5): 31-34.
- [9] Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu, Ras or Raf. *Mol Cell Biol* 2004, 24(1): 25-35.
- [10] Zhang F, Cheng D, Wang S, et al. Human specific regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Genes (Basel)*, 2016, 7(7): pii: E30.
- [11] Cen J, Zhang H, Liu Y, et al. Anti-aging effect of estrogen on telomerase activity in ovariectomized rats—animal model for menopause. *Gynecol Endocrinol* 2015, 31(7): 582-585.
- [12] Milvia S, Nimona S, Fontemaggi G, et al. Induction of hTERT Expression and Telomerase Activity by Estrogens in Human Ovary Epithelium Cells. *Mol Cell Biol* 2000, 20(11): 3764-3771.
- [13] Miyazaki Y, Yoshida N, Nozaki T, et al. Telomerase activity in the occurrence and progression of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*, 2015, 57(4): 295-303.
- [14] Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in the Pathophysiology of Human Multiple Myeloma: Therapeutic Applications. *Oncogene*, 2001, 20(33): 4519-4527.
- [15] Zhihua Z, Miaomiao S, Jianping Y, et al. Research for the influence of telomerase inhibitors on myeloma cell and therapy. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(5): 1641-1644.

(收稿日期: 2016-06-29; 修回日期: 2016-07-22)