

文章编号:1000-5404(2012)16-1617-04

论著

选择性雌激素受体调节剂对 MC3T3-E1 细胞生长分化的调节

何 隽¹, 唐婉容², 吴 恙², 王 璐², 游 涛² (610106 成都, 成都大学医护学院口腔医学教研室¹; 400016 重庆, 重庆医科大学附属口腔医院修复科²)

[摘要] **目的** 探讨选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulator, SERM)——雷洛昔芬对小鼠颅顶成骨细胞 MC3T3-E1 分化的调节及其机制。**方法** 体外培养 MC3T3-E1 细胞, 10^{-7} mol/L 的雷洛昔芬和雌激素受体拮抗剂 ICI-182780 刺激细胞, 另设空白对照组, 24、48、72 h 后检测各指标。MTT 法检测细胞增殖; 微量酶标法检测细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性; 实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测细胞内 β -catenin, 雌激素受体 α 、 β (estrogen receptor α 、 β , ER α 、ER β) mRNA 的表达。**结果** MC3T3-E1 细胞分别加入 10^{-7} mol/L 的雷洛昔芬和 ICI-182780 后, 相对于对照组, 雷洛昔芬处理组的促细胞增殖作用较强, 在 24 h 增殖率最高, 达(55.93 ± 10.88)%; ALP 活性增加, 在 48 h 活性增加率最高, 为(30.881 ± 5.614)%; β -catenin、ER α 和 ER β mRNA 的表达均增高, 有统计学意义($P < 0.05$)。ICI-182780 组的促细胞增殖率、ALP 活性降低; β -catenin、ER α 和 ER β mRNA 的表达均降低, 有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 雷洛昔芬可能通过上调 β -catenin、ER α 和 ER β mRNA 的表达促进 MC3T3-E1 细胞的增殖分化, 而 ICI-182780 则下调 β -catenin、ER α 和 ER β mRNA 的表达抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化。

[关键词] 选择性雌激素受体调节剂; β -catenin; 雌激素受体; MC3T3-E1 细胞; 细胞分化

[中图分类号] R322.71; R962; R977.1

[文献标志码] A

Selective estrogen receptor modulators stimulates growth and differentiation in MC3T3-E1 cells: involvement of ER and Wnt/ β -catenin signals

He Yun¹, Tang Wanrong², Wu Yang², Wan Lu², You Tao² (¹Department of Dentistry, School of Medicine and Nursing, Chengdu University, Chengdu, 610106; ²Department of Prosthodontics, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulation and mechanism of selective estrogen receptor modulator (SERM) raloxifene on the growth and differentiation in MC3T3-E1 cells *in vitro*. **Methods** MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* were treated with raloxifene (10^{-7} mol/L) and estrogen receptor antagonist ICI-182780 (10^{-7} mol/L), respectively, and the MC3T3-E1 cells without treatment were set as control. The cell proliferation was observed by MTT assay, the activity of alkaline phosphatase (ALP) was measured by trace enzyme labeling method, and the expression of β -catenin, estrogen receptor (ER) α and ER β were detected by qRT-PCR. **Results** As compared with those of the control group, the cell proliferation, ALP activity and mRNA expression of β -catenin, ER α and ER β significantly increased in the raloxifene (10^{-7} mol/L) group ($P < 0.05$) and significantly decreased in the ICI-182780 group ($P < 0.05$). The cell proliferation rate was highest (55.93 ± 10.88)% at 24 h, and the ALP activity of increase was highest (30.881 ± 5.614)% at 48 h. **Conclusion** Raloxifene can promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells through up-regulating the mRNA expression of β -catenin, ER α and ER β , while ICI-182780 can inhibit this process through down-regulating the mRNA expression of β -catenin, ER α and ER β .

[Key words] selective estrogen receptor modulator; β -catenin; estrogen receptor; MC3T3-E1 cells; cell differentiation

Supported by the Project of Science and Technology Commission of Yubei District, Chongqing ([2011]32). Corresponding author: Wu Yang, E-mail: tangwrhuzq@163.com

骨质疏松症是绝经后妇女的常见病, 与体内雌激素水平降低有关^[1]。雷洛昔芬(raloxifene, RLX)作为

一种第2代选择性雌激素受体调节剂, 对某些组织(如骨骼)具有雌激素样作用, 对另一些组织(如乳腺、子宫内膜)具有抗雌激素样作用^[2]。与雌激素替代疗法相比, 雷洛昔芬既能治疗骨质疏松症, 又可显著降低患乳腺癌、子宫内膜癌的风险性, 因而成为防治绝经后

[基金项目] 重庆市渝北区科委课题(渝北财教[2011]32号)

[通信作者] 吴 恙, E-mail: tangwrhuzq@163.com

骨质疏松较为理想的药物。Wnt 信号在骨质疏松方面的研究已受到广泛的关注,目前被认为在成骨分化与骨量调节方面具有重要的作用。对于庞大的 Wnt 信号系统来说,β-catenin 是介导 Wnt 信号通路从细胞膜至细胞质再进细胞核传递路径的枢纽分子^[3-4]。雷洛昔芬是否可以通过此途径刺激成骨细胞的增殖和分化,具体的作用机制仍不十分清楚。本实验将雷洛昔芬和雌激素受体拮抗剂 ICI-182780 分别作用于 MC3T3-E1 细胞,观察它们对细胞增殖和 ALP 碱性磷酸酶(alkaliphosphatase, ALP)活性的影响,同时采用 qRT-PCR 方法观察细胞株中 β-catenin、雌激素受体 α、β(estrogen receptor α, β, ERα, ERβ)的表达情况,探讨 Wnt/β-catenin 通路是否参与选择性雌激素受体调节剂对成骨细胞增殖的作用过程。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及试剂

MC3T3-E1 细胞株购自中国科学院细胞库,雷洛昔芬和 ICI-182780 均购自美国 Santa 公司,DMSO(美国 Sigma 公司),MTT(美国 Sigma 公司),碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成),RNA 抽提试剂盒(北京百泰克),cDNA 一链合成试剂盒(MBI),2 × PCR master mix(康为世纪),2 × SYBR real-time PCR premixture(北京百泰克),引物合成由北京三博远志生物技术有限公司完成,α-MEM 培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司)。

1.2 仪器

超净工作台(苏净集团安泰公司),CO₂细胞培养箱(上海易亮医疗公司),倒置显微镜(尼康),冷冻离心机(HEMNL 生产),蛋白核酸分析仪(瑞典安玛西亚公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),酶标仪(奥地利 TECAN)。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 小鼠颅顶前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中常规培养,每 2 天换液 1 次,每 4~5 天传代 1 次。

1.3.2 MTT 法测细胞增殖 取对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,0.25% 胰酶消化后离心,PBS 清洗、离心、重悬后细胞计数,接种于 96 孔板中,细胞数为 4 × 10³/孔,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内孵育 8 h 使细胞贴壁后,用不同的培养液分组培养:①对照组:仅加培养液;②雷洛昔芬组:加入含 10⁻⁷ mol/L 雷洛昔芬的培养液;③ICI-182780 组:加入含 10⁻⁷ mol/L ICI-182780 的培养液。每组设 5 个复孔,另设调零孔。继续培养 24、48、72 h 检测吸光度值,终止反应。每孔加入 MTT(5 g/L)20 μl,继续孵育 4 h 后,弃上清。每孔加 DMSO 150 μl,振荡 10 min,使结晶物充分溶解显色后,在酶标仪 490 nm 波长处测定各孔的吸光度值 [D(490)]。

细胞增殖率 = [处理组 D(490)值 - 对照组 D(490)值]/对

照组 D(490)值 × 100%

细胞抑制率 = [对照组 D(490)值 - 处理组 D(490)值]/对照组 D(490)值 × 100%。

1.3.3 微量酶标法测细胞的 ALP 活性 分组同 1.3.2,以细胞数 4 × 10³/孔的接种于 96 孔板,2 组给药,1 组空白对照,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 72 h,每 24 小时取细胞培养上清液采用微量酶标法操作,每组设 3 个复孔,另设酚标准孔和调零孔。具体步骤如下:5 μl 细胞培养上清液,与 50 μl 缓冲液和 50 μl 基质液混匀,37 °C 水浴 15 min,再加显色剂 150 μl 立即混匀,于酶标仪 520 nm 波长下测定各孔的吸光度值 [D(520)],记录结果。ALP 活性增加率和抑制率的计算公式与 MTT 增殖率和抑制率的计算公式相同。

1.3.4 qRT-PCR 检测 β-catenin、ERα 和 ERβ 的表达 MC3T3-E1 细胞以 3 × 10⁵/ml 接种于 75 ml 的培养瓶,继续培养 8 h 后加入药物,分组同 1.3.2,分别于 24、48、72 h 后收集各组细胞,按照试剂盒说明抽提细胞内总 RNA,并用蛋白核酸分析仪测定 RNA 溶液的浓度和纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳可见清晰的 18 S、28 S 两条带。取 1 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA。然后,采用 SYBR Green real-time PCR 试剂盒对目的基因进行定量检测,分别取 1 μl cDNA,上游和下游 Primer 各 1 μl,2 × Premix 12.5 μl,灭菌蒸馏水 9.5 μl,反应体系 25 μl。反应条件:95 °C 2 min,95 °C 15 s,退火 15 s(表 1),72 °C 延伸 40 s,40 个循环。PCR 扩增 β-catenin、ERα、ERβ,以 β-actin 为内参,通过计算阈值 Ct 值评估 mRNA 水平,Ct 值用 β-actin 标化,采用双 DELT 法(2^{-ΔΔCt})相对定量进行计算。2^{-ΔΔCt} 是实验组目的基因的表达相对于对照组的倍数,ΔΔCt = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}。

表 1 基因序列及其引物

基因	引物	序列(5'→3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)
β-catenin	上游	CCATCAGCAGACTGCATAATCT	59	122
	下游	AGCCAAGAATTTACGTTTGT		
ERα	上游	CGCCTTCTACAGTCTAAT	55	257
	下游	GGTCTTGTCAATGGTGC		
ERβ	上游	CTTGGTACAGTACCCCTTAC	55	250
	下游	GTATCGCGTCACTTTCCTTT		
β-actin	上游	TGGAATCCTGTGGCATCATGAAAC	59	373
	下游	TAAAACGCGACTCAGTAACAGCTCCG		

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,均数间的两两比较采用 SNK-q 检验,MTT 增殖率或抑制率的不同时间的比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,ERα 和 ERβ 同一药物、同一时间点的 qRT-PCR 结果比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 MC3T3-E1 细胞增殖

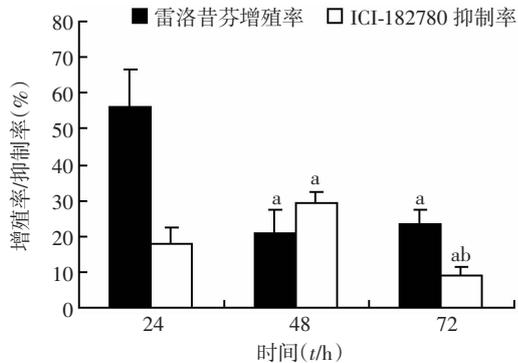
各组的细胞增殖结果见表 2。雷洛昔芬组 MTT 测试结果高于其余 2 组,而 ICI-182780 的增殖结果在 3 组中最低,表明雷洛昔芬可促进细胞增殖,ICI-182780 则抑制细胞增殖,差异有统计学意义(P < 0.05)。从图 1 可见,雷洛昔芬促细胞增殖的

作用随着时间的变化而降低,24 h增殖率最高,达到(55.93 ± 10.88)%,而ICI-182780对细胞生长的抑制作用在48 h达到峰值,随后下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 3组不同时间细胞增殖结果 [$D(490), n=3, \bar{x} \pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.095 ± 0.018	0.180 ± 0.024	0.223 ± 0.030
雷洛昔芬组	0.145 ± 0.018 ^a	0.212 ± 0.014 ^a	0.284 ± 0.014 ^a
ICI-182780组	0.078 ± 0.013 ^a	0.129 ± 0.020 ^a	0.209 ± 0.014 ^a

a: $P < 0.05$,与对照组相同时间比较



a: $P < 0.05$,与对应24 h比较;b: $P < 0.05$,与对应48 h比较

图1 MTT法测不同时间雷洛昔芬增殖率和ICI-182780抑制率的变化

2.2 ALP活性的变化

各组不同时间的ALP活性结果见表3。相对于对照组,雷洛昔芬组ALP活性增高,而ICI-182780组的ALP活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。雷洛昔芬增加了ALP活性,并在48 h活性增加率最高,为(30.881 ± 5.614)%,随后增加率下降,72 h与24 h无统计学差异($P > 0.05$)。ICI-182780抑制了ALP的活性,但在时间上活性抑制率变化不大,3个时间段比较无统计学差异($P > 0.05$)。

表3 3组不同时间细胞ALP活性变化(金氏单位/100 ml, $n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	10.395 ± 0.948	21.954 ± 0.853	29.566 ± 1.129
雷洛昔芬组	12.015 ± 1.113 ^a	28.416 ± 1.219 ^a	34.121 ± 0.956 ^a
ICI-182780组	9.049 ± 0.966 ^a	18.449 ± 0.664 ^a	25.398 ± 0.638 ^a

a: $P < 0.05$,与对照组相同时间比较

2.3 qRT-PCR检测β-catenin、ERα和ERβ mRNA的表达水平

对照组不同时间的细胞β-catenin、ERα和ERβ mRNA的相对表达水平均为1。雷洛昔芬组β-catenin、ERα和ERβ mRNA的表达水平均较对照组增高,而ICI-182780组β-catenin、ERα和ERβ mRNA的表达水平较对照组降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。雷洛昔芬组β-catenin mRNA表达48 h表达增高,72 h与48 h相比,无统计学差异($P > 0.05$),ICI-182780组24 h与48 h β-catenin mRNA表达变化不大($P > 0.05$),72 h β-catenin表达较24、48 h降低($P < 0.05$)。雷洛昔芬组和ICI-182780组ERα和ERβ mRNA的表达,均在48 h表达增高/降低,72 h与48 h相比,无统计学差异($P > 0.05$)。在同一药物相同时间组里,ERα和ERβ mRNA的表达差异量,除ICI-182780 72 h组外,均无明显差异($P > 0.05$)。见表4。

表4 2组不同时间细胞β-catenin、ERα和ERβ mRNA的相对表达水平 ($2^{-\Delta\Delta Ct}, n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	β-catenin	ERα	ERβ
雷洛昔芬组	24 h	1.231 ± 0.066	2.552 ± 0.130	2.499 ± 0.072
	48 h	1.542 ± 0.053 ^a	3.025 ± 0.141 ^a	2.993 ± 0.075 ^a
	72 h	1.483 ± 0.047 ^a	2.876 ± 0.070 ^a	2.935 ± 0.060 ^a
ICI-182780组	24 h	0.793 ± 0.043	0.458 ± 0.042	0.646 ± 0.092
	48 h	0.719 ± 0.024	0.296 ± 0.020 ^a	0.354 ± 0.033 ^a
	72 h	0.609 ± 0.056 ^{ab}	0.300 ± 0.017 ^a	0.398 ± 0.006 ^{ac}

a: $P < 0.05$,与同组24 h比较;b: $P < 0.05$,与同组48 h比较;

c: $P < 0.05$,与同组ERα比较

3 讨论

选择性雌激素受体调节剂药是一类人工合成的非甾体化合物,其作用具有组织特异性,在某些部位(如肿瘤)起到阻断雌激素受体的作用,而在其他部位(如骨骼)则起到刺激雌激素受体的作用。雷洛昔芬(RLX)是非类固醇类,苯噻吩化合物,属第2代SERMs,是第1个被批准用于预防和治疗绝经后骨质疏松的SERMs^[5]。ICI-182780(Faslodex)属于甾体类纯抗雌激素剂,为17β-雌二醇的7α-取代衍生物,能下调雌激素受体水平,无雌激素激动活性。

国外在临床上开展了RLX治疗绝经后骨质疏松症效果的随访观察研究,与对照组相比,长期服用RLX,可降低骨转换率、增加骨密度、抑制骨吸收^[6-7]。Olivier等^[8]研究结果显示RLX可以抑制MC3T3-E1的凋亡。以往研究表明,RLX具有直接刺激成骨细胞的功能,可促进成骨细胞的增殖、分化,调节骨形成、骨吸收和骨再建^[9-10]。同样有实验证实,加入ICI-182780后,成骨细胞的增殖作用被抑制。国内外的许多学者研究均表明,RLX的作用在 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ mol/L浓度范围内与浓度成剂量相关,并且高浓度组(10^{-7} mol/L)对成骨细胞的刺激更为明显,因而我们的实验选择了RLX和ICI-182780的 10^{-7} mol/L浓度,结果显示,雷洛昔芬组的MTT和ALP测定结果最高,对照组居中,ICI-182780组最低($P < 0.05$),表明RLX可促进体外培养的MC3T3-E1细胞的增殖和分化,ALP活性增加,并且我们分别测了24、48、72 h的MTT和ALP的值,结果还显示,RLX的这种促MC3T3-E1增殖的作用在24 h达到峰值,随后下降,对MC3T3-E1分化的影响则是在48 h改变率最高。而ICI-182780则抑制了细胞的增殖和分化。

雌激素受体是核受体超家族成员之一,包括ERα、ERβ两种类型,SERMs通过与ER两种亚型结合而发挥生物学作用^[11]。近年研究表明,除了与雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)直接结合的经典途径外,ER还可激活其他通路,如AP-1效应元件^[12],或与其他细胞内信号通路相互影响。

本实验设计分别给予 MC3T3-E1 细胞以 10^{-7} mol/L 的雷洛昔芬和 ICI-182780, 在不同的时间点测定 β -catenin、ER α 和 ER β mRNA 的表达水平。从 qRT-PCR 的结果可以看出, 通过与 ER 的特异性结合, 上调了 ER α 和 ER β 的基因表达, 发挥雌激素样作用, 而 ICI-182780 则下调了 ER α 和 ER β 的基因表达, 从而发挥抗雌激素作用。两种药物对 ER 基因表达的效应随着时间的增加而增加, 但 48 h 与 72 h 无明显的差异。另外, 关于两受体亚型中哪一型在骨组织中优势表达, 目前尚无一致报道。近年来一系列针对 ER α 和 ER β 基因敲除的动物实验研究表明, ER α 和 ER β 两者共同参与雌激素的骨保护效应, 其中 ER α 为主要介导者, ER β 与之存在着竞争互补的辅助关系^[13]。结合本实验, 雷洛昔芬组和 ICI-182780 组在同一时间段 ER α 和 ER β mRNA 的表达量差异不明显, 说明 RLX 和 ICI-182780 同 ER α 和 ER β 结合的亲和力都高, 在基因水平上无明显的优势表达亚型, 至于两亚型在蛋白水平上是否有差异, 则需进一步研究。

Wnt/ β -catenin 信号通路在调节成骨活性及骨细胞功能方面发挥了重要作用, 该通路的相关基因被认为与骨质疏松密切相关。 β -catenin 在成骨细胞中有广泛的表达, 是经典 Wnt 信号通路的关键中介。在体外实验的研究中发现, 敲除鼠成骨细胞 β -catenin, 导致骨钙素表达的推迟与减少, 同时也降低了成骨细胞的矿化^[14]。Chung 等^[15]通过使用雷诺昔芬治疗绝经后骨质疏松, 发现血液中 sclerostin 的浓度明显降低, 而 sclerostin 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的传导。根据 β -catenin 基因的定量结果可以看出, RLX 促进了 β -catenin 基因的表达, 但是同 ER α 和 ER β 的 mRNA 表达增加相比, β -catenin 的 mRNA 表达只是略有增加, 在时间效应上同 ER 的表达规律一样, 仍是随着时间的增加而增加, 48 h 与 72 h 无明显的差异。认为 RLX 在启动 ER 通路的同时可以促进 Wnt 通路的信号传递, 但仍以经典的 ERE 途径为主。由此可见, Wnt 信号通路和 ER 通路之间存在复杂的信号传递和相互作用, 具体的机制尚需进一步研究。

综上所述, 骨质疏松症已成为广泛关注的公众健康问题, 患骨质疏松症的妇女骨折的发生率增加, 极大地影响了她们的生活质量^[16]。SERMs 的出现为绝经后骨质疏松的治疗提供了一个新的选择, 随着雷诺昔芬在临床上应用越来越广泛, 对其细胞及分子作用机制的研究也逐步深入。我们观察了 SERMs 对 β -catenin 基因表达的影响, 说明雷诺昔芬可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路来引起骨的改建, 为探讨 SERMs 治疗骨质疏松的机制, 也为下一步关于成骨细胞响应机械

力学刺激和 SERMs 共同作用的分子机制研究提供了一定的依据。

参考文献:

- [1] Notelovitz M. Estrogen therapy and osteoporosis: principles & practice [J]. *Am J Med Sci*, 1997, 313(1): 2-12.
- [2] Hansdotir H. Raloxifene for older women: a review of the literature [J]. *Clin Interv Aging*, 2008, 3(1): 45-50.
- [3] MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [4] Chen Y, Whetstone H C, Youn A, et al. β -catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(1): 526-533.
- [5] Gennari L, Merlotti D, Valleggi F, et al. Selective estrogen receptor modulators for postmenopausal osteoporosis: current state of development [J]. *Drugs Aging*, 2007, 24(5): 361-379.
- [6] Recker R R, Mitlak B H, Ni X, et al. Long-term raloxifene for postmenopausal osteoporosis [J]. *Curr Med Res Opin*, 2011, 27(9): 1755-1761.
- [7] Kanis J A, Johansson H, Oden A, et al. A meta-analysis of the efficacy of raloxifene on all clinical and vertebral fractures and its dependency on FRAX [J]. *Bone*, 2010, 47(4): 729-735.
- [8] Olivier S, Fillet M, Malaise M, et al. Sodium nitroprusside-induced osteoblast apoptosis is mediated by long chain ceramide and is decreased by raloxifene [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(6): 891-901.
- [9] Taranta A, Brama M, Teti A, et al. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro [J]. *Bone*, 2002, 30(2): 368-376.
- [10] Sliwinski L, Folwarczna J, Nowinska B, et al. A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system [J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(2): 261-270.
- [11] Paulmurugan R, Tamrazi A, Massoud T F, et al. *In vitro* and *in vivo* molecular imaging of estrogen receptor α and β homo- and heterodimerization: exploration of new modes of receptor regulation [J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(12): 2029-2040.
- [12] Jain D, Koh J T. A mutant selective anti-estrogen is a pure antagonist on EREs and AP-1 response elements [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(17): 5258-5261.
- [13] Lindberg M K, Weihua Z, Andersson N, et al. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice [J]. *J Endocrinol*, 2002, 174(2): 167-178.
- [14] Holmen S L, Zylstra C R, Mukherjee A, et al. Essential role of β -catenin in postnatal bone acquisition [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21162-21168.
- [15] Chung Y E, Lee S H, Lee S Y, et al. Long-term treatment with raloxifene, but not bisphosphonates, reduces circulating sclerostin levels in postmenopausal women [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(4): 1235-1243.
- [16] Jagtap V R, Ganu J V, Nagane N S. BMD and Serum Intact Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis Women [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2011, 26(1): 70-73.

(收稿:2012-01-14;修回:2012-04-17)

(编辑 汪勤俭)