

阿魏酸抗成骨细胞凋亡作用及其 GPR30 相关性研究

黄天一^{1,2}, 陈婷婷^{1,2}, 崔杰^{1,2}, 李梦雨^{1,2}, 华永庆^{1,2,3}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023; 3. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 观察阿魏酸(FA)对成骨细胞凋亡的影响及其机制,探讨FA对骨质疏松的潜在治疗作用。方法 选择前成骨细胞系 MC3T3-E1, MTT 法观察 FA 对细胞活力的影响;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达;流式细胞术及 DCFH-DA 荧光染色观察活性氧(ROS)水平;免疫荧光法观察叉头框蛋白(Fox)家族 FoxO3a 的核定位;采用 G 蛋白偶联受体 GPR30 特异性拮抗剂 G15 进行干预,观察 FA 效应的变化。结果 FA 在 25~400 μmol/L 范围内对正常细胞无显著影响,但对过氧化氢(H₂O₂)损伤后的细胞活力有促进作用;流式结果表明,FA 可以减少过氧化损伤后的细胞凋亡率和降低 ROS 水平;免疫荧光结果表明,FA 能阻碍氧化应激条件下细胞凋亡和氧化应激相关蛋白 FoxO3a 的核内含量。G15 处理后,FA 引起的抗细胞凋亡、降低 ROS 水平及 FoxO3a 核内含量减少作用均被显著阻断。结论 FA 具有抗成骨细胞凋亡、降低细胞内 ROS 水平、阻止过氧化损伤条件下 FoxO3a 核易位的作用,其机制可能与膜雌激素受体 GPR30 有关。

关键词:阿魏酸;成骨细胞;骨质疏松;雌激素受体;GPR30;FoxO3a

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2020)03-0346-06

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0346

引文格式:黄天一,陈婷婷,崔杰,等.阿魏酸抗成骨细胞凋亡作用及其 GPR30 相关性研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(3):346-351.

Study on the Anti-Apoptosis of Ferulic Acid on Osteoblast and Its Correlation with GPR30

HUANG Tian-yi^{1,2}, CHEN Ting-ting^{1,2}, CUI Jie^{1,2}, LI Meng-yu^{1,2}, HUA Yong-qing^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Jiangsu Key Lab for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing, 210023, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of ferulic acid (FA) on osteoblast apoptosis and its mechanism, and explore the potential therapeutic effects of FA on osteoporosis. **METHODS** The pre-osteoblast cell line MC3T3-E1 was selected. The effect of FA on cell viability was observed by MTT assay. Apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis-related protein Bcl-2 was detected by Western blot. Flow cytometry and DCFH-DA fluorescence staining were performed to observe the reactive oxygen species (ROS) level. The nuclear localization of FoxO3a, one member in the forkhead box (Fox) family, was observed by immunofluorescence. The G protein coupled receptor 30 (GPR30) specific antagonist G15 was used to observe FA effect. **RESULTS** FA showed no significant effect on normal cells in the dose range of 25~400 μmol/L, but promoted the cell viability after hydrogen peroxide injury. Flow results showed that FA could reduce cell apoptosis rate and ROS level after peroxidation injury. Immunofluorescence results indicated that FA could inhibit the apoptosis and the nuclear content of oxidative stress-related protein FoxO3a under peroxidative conditions. After treatment with G15, the effects of FA on decreasing apoptosis, lowering ROS levels, and reducing the content of FoxO3a in the nucleus were significantly blocked. **CONCLUSION** FA shows the ability to resist osteoblast apoptosis, reduce intracellular ROS levels, and prevent FoxO3a nuclear translocation under conditions of peroxidative damage. The mechanism may be related to the membrane estrogen receptor GPR30.

KEYWORDS: ferulic acid; osteoblast; osteoporosis; estrogen receptor; GPR30; FoxO3a

骨质疏松症(OP)是一种代谢性骨疾病,最终导致骨强度降低和骨折风险增加^[1]。随着人口老龄化

加剧,OP造成的公共卫生负担日益严重^[2],发现新的治疗药物仍是当前亟待解决的问题。成骨细胞介

收稿日期:2019-12-14

基金项目:国家自然科学基金(81473390);江苏省中药资源产业化过程协同创新中心开放课题(ZDXM-2-7);江苏省中药药效与安全性评价重点实验室资助项目(JKLPSE201818);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者:黄天一,女,硕士研究生,E-mail:huangtyjy@163.com

通信作者:华永庆,男,副研究员,主要从事中药内分泌药理研究,E-mail:huayongqing@126.com

导的骨形成,在维持骨稳态中起到关键作用^[3-4]。在 OP 形成过程中,机体内环境改变导致氧化应激(OS)水平增加,使得成骨细胞凋亡增加,骨稳态平衡被打破。因而,降低机体 OS 水平,抗成骨细胞凋亡对维持骨稳态具有重要意义。

阿魏酸(FA)是一种酚酸类成分,是抗 OP 常用中药当归、川芎的有效成分之一。FA 被证实具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种生物活性^[5]。近来研究发现 FA 可以预防卵巢切除大鼠的骨质流失^[6]。当阿魏酸直接作用于成骨细胞时,可促进体外培养大鼠成骨细胞的增殖,显著性增加 ALP 活性和钙化结节的数量^[7],但对其作用机制尚缺乏深入研究。

OP 的发生与雌激素受体(ER)信号通路密切相关^[8]。新型膜雌激素受体 G 蛋白偶联受体 GPR30 因其可介导雌激素的非基因组效应,避免 ER 经典途径的不良反应而受到关注,其在骨代谢疾病中的调控作用也不断得到证明^[9]。中药抗 OP 活性成分槲皮素可以通过 GPR30 抑制破骨细胞的分化^[10], 樱黄素选择性结合 GPR30 活化 MAPK 信号通路,促进成骨细胞增殖分化^[11]。FA 抗成骨细胞凋亡、清除活性氧(ROS)的作用是否与 GPR30 相关仍不清楚。本实验旨在研究 FA 对成骨细胞凋亡的影响,并探讨其与 GPR30 相关的作用机制,为进一步发现 OP 治疗药物奠定基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

MC3T3-E1 细胞购自中国科学院上海细胞库,品系:小鼠颅顶前骨细胞亚克隆 14; FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit I (批号:8072965)购自 BD Pharmingen; Bcl-2 (批号:00062312)、 β -tubulin 兔单克隆抗体(批号:00056545)、FoxO3a 兔单克隆抗体(批号:00055690)均购自 Proteintech 公司; G15(批号:3678/10)购自 TOCRIS 公司;过氧化氢(H_2O_2)购自南京宁试化学试剂有限公司;胎牛血清(批号:1715753)、 α -MEM 培养基(批号:1867733)购自 GBICO 公司;青霉素-链霉素(批号:L40523)购自北京全式金生物科技有限公司;FA(货号:B20007)购自上海源叶生物科技有限公司;ROS 检测试剂盒(货号:S0033)购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.2 实验仪器

Synergy2 型多功能酶标仪(Bio-Tek, 美国); C6 流式细胞仪(BD Accuri, 美国); Chemi Doc TMXRS

+ 数字化凝胶成像工作站(BIO-RAD, 美国); SPX-150 型生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司); M205FA 型体式荧光显微镜(Leica, 德国); MCO-20AIC CO_2 细胞培养箱(三洋, 日本); Observer Z1 活细胞成像分析系统(Zeiss, 德国)。

2 方法

2.1 细胞培养

MC3T3-E1 细胞用含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 α -MEM 完全培养基在 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中进行培养。当细胞长至密度 85% 左右,用含 0.25% EDTA 的胰酶消化,终止消化后,1 000 r/min 条件下离心 3 min,进行传代,培养过程中每 2~3 d 更换培养基。

2.2 MTT 检测细胞活力

2.2.1 FA 对 MC3T3-E1 细胞活力的影响 取处于对数生长期的细胞,消化,以每孔 5 000 个种于 96 孔板中,分为对照组,1、10、25、50、100、200、400 μ mol/L FA 组,每孔加入 100 μ L 培养基孵育 24 h,待细胞贴壁后对照组加入含 0.1% DMSO 的完全培养基,其余组加入相应浓度含药培养基继续孵育 24 h,吸尽上清液,避光每孔加入 200 μ L 单培和 20 μ L 5 mg/mL MTT 溶液,4 h 后吸尽上清,每孔换成 150 μ L DMSO 溶液吹匀,并在 490 nm 处检测吸光度值。

2.2.2 FA 对 H_2O_2 诱导后的细胞活力的影响

细胞种植密度为每孔 10^4 个,分为对照组, H_2O_2 组,0.1、1、10、25、50、100、200、400 μ mol/L FA 组,每孔加入 100 μ L 培养基孵育 24 h。除对照组外,每组换成含 400 μ mol/L H_2O_2 的培养基,4 h 后换成相应浓度含药培养基,重复上述操作。

2.3 流式及荧光图片采集

MC3T3-E1 细胞种于 60 mm \times 15 mm 培养皿中,分为对照组、 H_2O_2 组和给药组,待细胞密度为 60% 左右时,加入 400 μ mol/L H_2O_2 诱导细胞损伤,4 h 后换成含药培养基。24 h 后对细胞进行以下处理。

2.3.1 细胞凋亡检测 用 800 μ L 不含 EDTA 的胰酶消化 4 min,同体积完全培养基终止消化后,用 1 mL D-hanks 清洗细胞,1 000 r/min 条件下离心 3 min,弃去上清液,按照 Annexin : PI : 结合液 = 25 : 25 : 500 的条件对细胞进行染色,常温孵育 20 min 后即可上机处理。

2.3.2 ROS 流式检测 采用含 0.25% EDTA 的

胰酶消化 30 s, 终止消化后用 D-hanks 清洗细胞, 1 000 r/min 条件下离心 3 min, 弃去上清液, 加入 DCFH-DA : D-hanks = 1 : 1 000 的工作液进行染色, 37 °C 孵育 30 min 后, D-hanks 清洗细胞 2 遍, 并最终加入 400 μL D-hanks 上机处理。

2.3.3 ROS 荧光采集 用 D-hanks 对皿内进行清洗, 加入 DCFA-DA : D-hanks = 1 : 1 000 的工作液进行染色, 37 °C 孵育 30 min 后, D-hanks 清洗细胞, 在波长 488 nm 下活细胞成像进行图像采集。

2.4 Western blot 分析

MC3T3-E1 细胞以每孔 3×10^5 个种于 6 孔板中, 分为对照组、 H_2O_2 组和给药组, 待细胞密度为 60% 左右时, 加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导细胞损伤, 4 h 后换成含药培养基。24 h 后将细胞按照 BCA 法蛋白提取试剂盒说明书进行处理。Western blot 法在恒流 40 mA 的条件下电泳 90 min, 恒压 100 V 的条件下转膜 90 min, 5% BSA 封闭 1 h, 一抗过夜, 再孵育 1 h 二抗。检测 Bcl-2 的表达, 并选取 β -tubulin 作为内参。

2.5 免疫荧光检测

MC3T3-E1 细胞以每孔 4×10^4 个种于放有玻片的 12 孔板中, 分为对照组、 H_2O_2 组、FA 给药组和 G15 拮抗剂组, 待细胞密度为 60% 左右时, 加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导细胞损伤, 4 h 后换成含药培养基(对照组、 H_2O_2 组为完全培养基, 给药组为含 50 $\mu\text{mol/L}$ FA 的完全培养基, 抑制剂组为含 50 $\mu\text{mol/L}$ FA 和 100 nmol/L G15 的完全培养基)。24 h 后将玻片取出置于干净的 12 孔板中, PBS 洗涤附着的培养基, 甲醇固定后用 2% Triton 破膜 15 min, 1.5% BSA 封闭后一抗过夜, 第 2 天回收一抗, IgG-FITC 避光孵育 1 h 后 PBS 清洗, 采用 DAPI 对细胞核进行染色, PBS 洗涤残余染液后在激发波长 488、370 nm 条件下用活细胞工作站进行图像采集, 并用 Image J 软件进行数据分析。

2.6 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 进行数据统计, 采用 one-way ANOVA 分析比较各组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。流式结果用 FlowJo 软件处理, 荧光采集结果用 Image J 软件分析。

3 结果

3.1 FA 对 H_2O_2 诱导后 MC3T3-E1 细胞活力的影响

在正常状态下, 与对照组相比, 不同浓度(1、10、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$) FA 对 MC3T3-E1 细胞活力并无显著影响(图 1)。在过氧化损伤状态下, 与对照组相比, H_2O_2 组细胞活力明显降低($P < 0.05$), 25、50、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ FA 组细胞活力较 H_2O_2 组显著升高($P < 0.05 \sim 0.01$)(图 2), 且 100 $\mu\text{mol/L}$ FA 组升高趋势最为明显。

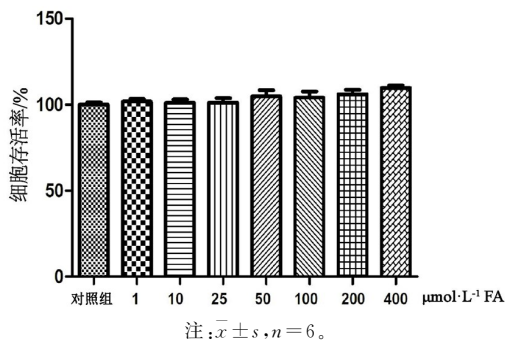


图 1 FA 对 MC3T3-E1 细胞的影响

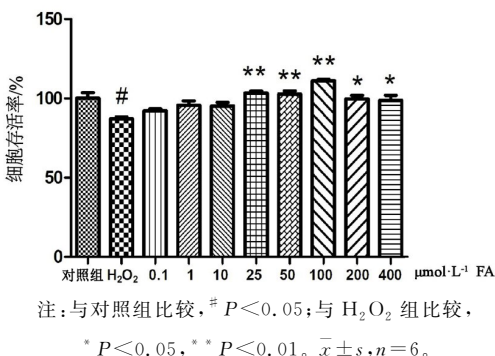
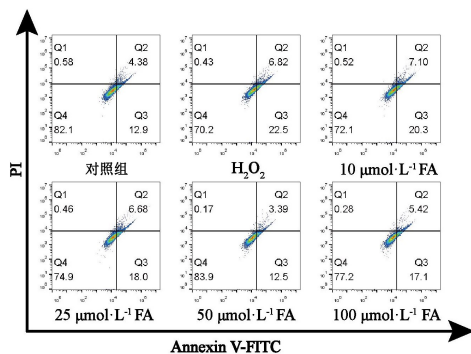
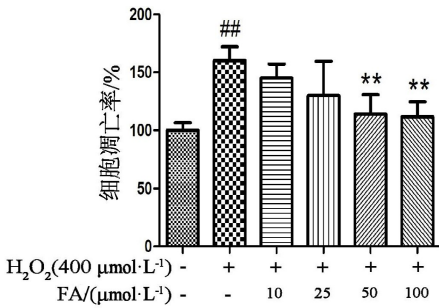


图 2 FA 对 H_2O_2 损伤后 MC3T3-E1 细胞的影响

3.2 FA 对 H_2O_2 诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡率的影响

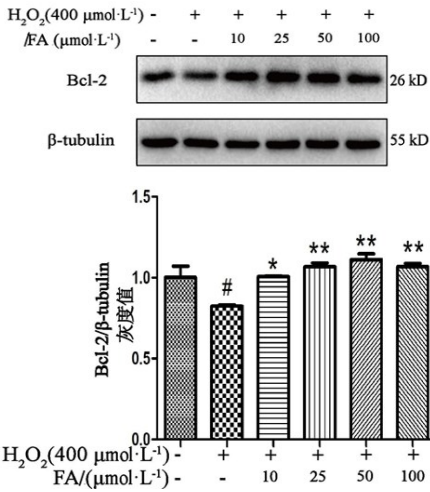
结果发现 H_2O_2 能造成 MC3T3-E1 细胞凋亡率增加, 而 FA 干预后, 较 H_2O_2 组显著降低(图 3)。Western blot 结果表明, 与 H_2O_2 组相比, 10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ FA 均能不同程度地促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达($P < 0.05 \sim 0.01$)(图 4)。结果表明 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ FA 具有较为稳定的抗 MC3T3-E1 细胞凋亡能力。





注:Q1. 坏死细胞;Q2. 晚期凋亡细胞;Q3. 早期凋亡细胞;Q4. 活细胞。与对照组比较, #[#] $P < 0.01$;与 H₂O₂ 组比较, ** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 4$ 。

图 3 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响



注:与对照组比较, # $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 4 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞抗凋亡蛋白的影响

3.3 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞 ROS 的影响

流式结果显示,与对照组相比,H₂O₂ 组 ROS 水平明显升高,25、50 μmol/L FA 干预后 MC3T3-E1 细胞内 ROS 含量明显下降(图 5)。活性氧荧光图像采集数据分析结果表明不同浓度 FA 能显著清除细胞内 H₂O₂ 刺激下异常升高的 ROS ($P < 0.05 \sim 0.01$),且 25、50 μmol/L FA 效果较为显著(图 6),为了实验结果更为稳定,采用 50 μmol/L FA 进行后续实验。

3.4 GPR30 对 FA 抗凋亡和抗氧化作用的影响

流式结果表明,GPR30 特异性抑制剂 G15 单用对 MC3T3-E1 细胞凋亡并无明显影响(图 7A),FA 组较 H₂O₂ 组细胞凋亡率显著降低,100 nmol/L G15 组细胞凋亡率较 FA 组明显升高(图 7B) ($P < 0.01$),这表明 G15 对 FA 抗凋亡能力有抑制作用。ROS 流式结果显示,G15 组较 FA 组细胞内 ROS

水平明显升高 ($P < 0.01$) (图 8),与荧光采集结果所呈现的相同(图 9),说明 G15 对 FA 抗 OS 能力有抑制作用。提示 GPR30 可能是 FA 发挥抗氧化和抗凋亡作用的关键影响因素。

3.5 GPR30 干预 FA 对 OS 状态下 FoxO3a 的核易位的影响

免疫荧光结果显示,H₂O₂ 组 FoxO3a 在细胞核内的含量较对照组增加,50 μmol/L FA 干预后 FoxO3a 在细胞核内含量较 H₂O₂ 组明显减少(图 10),说明 FA 可以阻止过氧化损伤后 FoxO3a 的核易位;给予 100 nmol/L G15 之后,相较于 50 μmol/L FA 组 FoxO3a 的核易位明显增多,说明在 G15 作用下 FA 阻碍 FoxO3a 核易位的能力明显降低。表明 FA 可能通过 GPR30 影响 FoxO3a 的核易位。

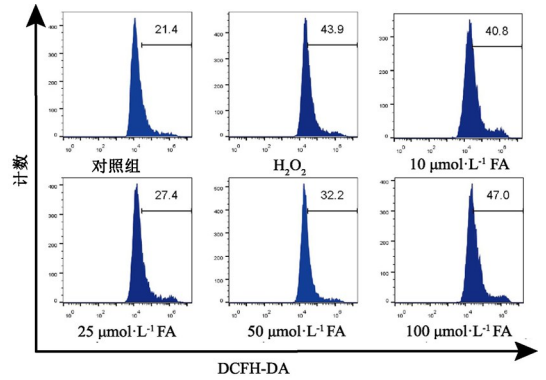
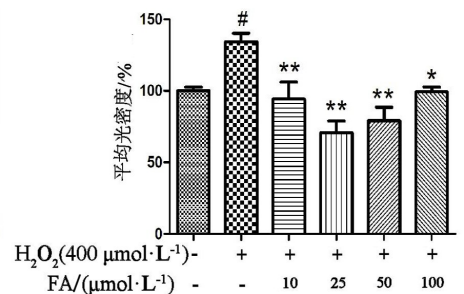
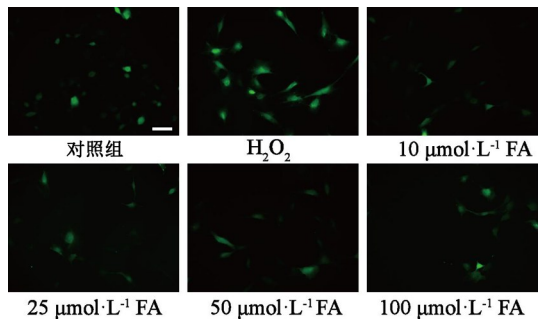
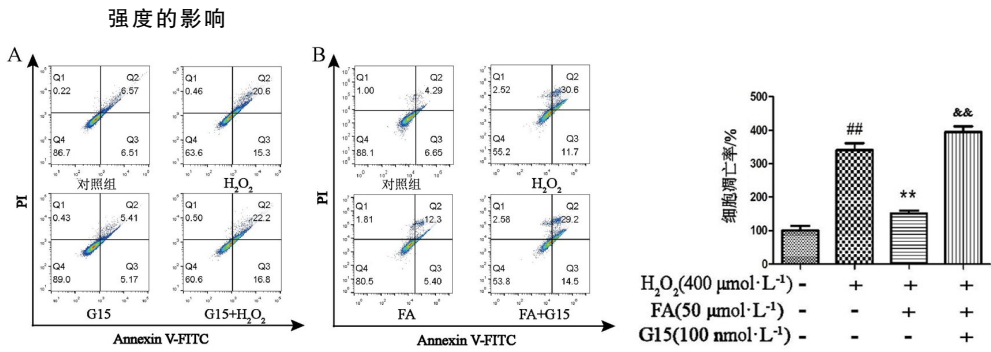


图 5 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞 ROS 的影响



注:与对照组比较, # $P < 0.05$;与 H₂O₂ 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$, 比例尺 = 100 μm。

图 6 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞 ROS 荧光



注:与对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 H₂O₂ 组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与 FA 组比较, ^{&&} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 7 G15 单用(A)和 G15 与 FA 联用(B)对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

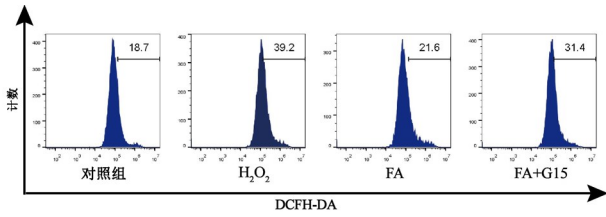
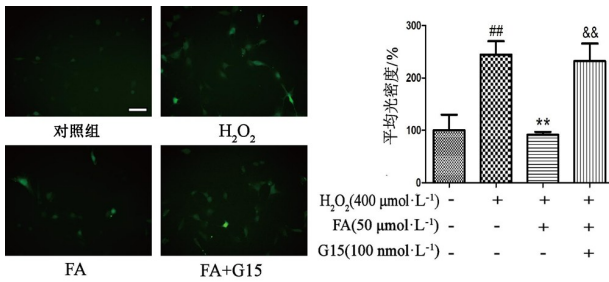
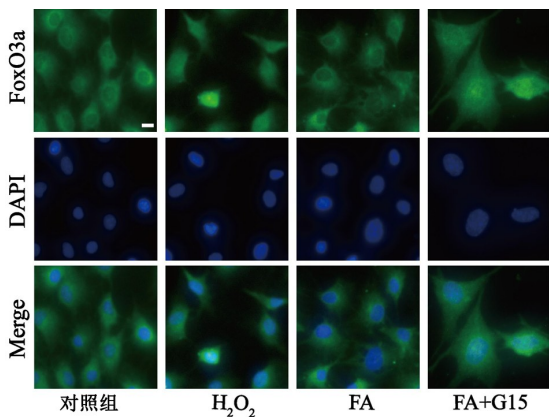


图 8 G15 干预下 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞 ROS 的影响



注:与对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 H₂O₂ 组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与 FA 组比较, ^{&&} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$, 比例尺 = 100 μm。

图 9 G15 干预下 FA 对 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 细胞 ROS 荧光强度的影响



注:比例尺 = 100 μm。

图 10 G15 干预下 FA 对 FoxO3a 蛋白核易位的影响

4 讨论

骨稳态依赖于骨形成和骨吸收之间的动态平衡,当骨形成速率低于骨吸收速率时可引发 OP。

在 OP 患者中,女性发病率远高于男性^[12],这可能与女性绝经后雌激素骤降有关。雌激素缺乏会降低机体对 OS 的防御能力并加速骨骼的衰老^[13]。OS 是由 ROS 过量引起的氧化还原失衡,研究表明,细胞中 ROS 水平升高会通过各种分子级联激活 Bcl-2、Bax 等凋亡相关蛋白的表达,最终介导细胞凋亡^[14]。在成骨细胞中,OS 通过抑制成骨细胞前体细胞成熟,降低成骨细胞分化率,并诱导其凋亡^[15]。可见,雌激素缺乏引起的 OS 是骨形成抑制的关键影响因素。

雌激素是具有广泛生物活性的类固醇激素。传统认为,雌激素通过其受体 ER α 和 ER β 介导下游信号通路发挥抗 OP 作用^[16],但是该途径的激活会导致乳腺癌和子宫内膜增生等副作用^[17]。近年来研究发现位于细胞膜上的雌激素受体亚型 GPR30 具有重要的骨保护作用^[18]。GPR30 敲除后大鼠骨骼生长被显著抑制^[19],GPR30 特异性激动剂 G1 可以增加大鼠骨密度,并可避免雌二醇引起的子宫上皮细胞增殖^[20],子宫质量增加^[21]。不同于传统的 ER α 和 ER β ,GPR30 主要位于细胞膜上,通过非基因组效应快速激活细胞内的第二信号系统,激活 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路并引起下游反应^[22],而非通过传统认识的雌激素效应元件发挥作用。这提示,通过特异性激活 GPR30 途径可能可以避免传统雌激素替代疗法因激活 ER α 引起的子宫内膜增生等副作用。而中药中广泛存在着与 GPR30 通路相关的活性成分^[23-25]。这些研究表明 GPR30 可能是中药活性成分干预成骨细胞存活和凋亡的重要调控因子。

在前成骨细胞中,FoxO3 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,在增殖、分化成熟和骨基质矿化等方面扮演着十分重要的角色。有研究证实,ROS 积累后,FoxOs 易位至细胞核,与 TCF 竞争性结合

β -catenin, 最终减少成骨细胞的增殖与分化^[26]。GPR30 对 OS 具有重要的调控作用^[27]。雌激素通过 GPR30 介导 FoxO3 的失活^[28]。最新研究表明, FoxO3 进入细胞核后,可下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,并上调促凋亡基因 Bim 的表达,最终引起细胞凋亡^[29-30]。本研究表明 FA 可通过 GPR30 干预 OS 状态下的 FoxO3a 核易位,进而发挥抗凋亡作用。

综上所述,FA 具有抗成骨细胞凋亡和降低 ROS 水平的作用,并可阻碍过氧化损伤后 FoxO3a 的核易位,其机制可能与 GPR30 有关。本研究提出 FA 可能通过激活 GPR30 抗成骨细胞凋亡,这提示其可能在治疗 OP 中发挥作用。本研究为阐明中药活性成分抗骨质疏松作用机制提供新的思路,为临床寻找新的 OP 治疗药物奠定了基础。

参考文献:

[1] LU SY, WANG CY, JIN Y, et al. The osteogenesis-promoting effects of alpha-lipoic acid against glucocorticoid-induced osteoporosis through the NOX4, NF-kappaB, JNK and PI₃K/AKT pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3331.

[2] THAYER SW, STOLSHEK BS, GOMEZ REY G, et al. Impact of osteoporosis on high-cost chronic diseases[J]. *Value Health*, 2014, 17(1): 43-50.

[3] CORRADO A, SANPAOLO ER, DI BELLO S, et al. Osteoblast as a target of anti-osteoporotic treatment[J]. *Postgrad Med*, 2017, 129(8): 858-865.

[4] MARUOTTI N, CORRADO A, CANTATORE FP. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(11): 2957-2963.

[5] SZWAJGIER D, BOROWIEC K, PUSTELNIAK K. The neuroprotective effects of phenolic acids, molecular mechanism of action[J]. *Nutrients*, 2017, 9(5): E477.

[6] SASSA S, KIKUCHI T, SHINODA H, et al. Preventive effect of ferulic acid on bone loss in ovariectomized rats[J]. *In Vivo*, 2003, 17(3): 277-280.

[7] 高建林, 陈珺, 李兵, 等. 阿魏酸对体外培养的成骨细胞增殖、分化和矿化功能的影响[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(10): 1479-1480.

[8] ZAIDI M. Skeletal remodeling in health and disease[J]. *Nat Med*, 2007, 13(7): 791-801.

[9] LIN XZ, LI L, WU SL, et al. Activation of GPR30 promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells: An implication in osteoporosis[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(11): 1751-1759.

[10] MASUHARA M, TSUKAHARA T, TOMITA K, et al. A relation between osteoclastogenesis inhibition and membrane-type estrogen receptor GPR30[J]. *Biochem Biophys Res*, 2016, 8: 389-394.

[11] KHAN K, PAL S, YADAV M, et al. Prunetin signals via G-protein-coupled receptor, GPR30(GPER1); Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated activation of MAPK signaling induces Runx2 expression in osteoblasts to promote bone regeneration[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1491-1501.

[12] 张智海, 张智若, 刘忠厚, 等. 中国大陆地区以 -2.0 OSD 为诊断标准的骨质疏松症发病率回顾性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(1): 1-8.

[13] SHI CM, WU J, YAN QQ, et al. Bone marrow ablation demon-

strates that estrogen plays an important role in osteogenesis and bone turnover via an antioxidative mechanism[J]. *Bone*, 2015, 79: 94-104.

[14] ZHOU H, YANG JJ, XIN T, et al. Exendin-4 protects adipose-derived mesenchymal stem cells from apoptosis induced by hydrogen peroxide through the PI3K/Akt-Sfrp2 pathways[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 77: 363-375.

[15] 王秉义, 潘剑. 丹参素拮抗氧化应激所致骨质疏松并通过 PI₃k/Akt 通路减少成骨细胞的凋亡[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(1): 1-5, 11.

[16] WU G, XU RY, ZHANG P, et al. Estrogen regulates stemness and senescence of bone marrow stromal cells to prevent osteoporosis via ER β -SATB2 pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4194-4204.

[17] ROBINSON DR, WU YM, VATS P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1446-1451.

[18] HEINO TJ, CHAGIN AS, SÄVENDAHL L. The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone[J]. *J Endocrinol*, 2008, 197(2): R1-R6.

[19] MÅRTENSSON UE, SALEHI SA, WINDAHL S, et al. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(2): 687-698.

[20] GAO F, MA XH, OSTMANN AB, et al. GPR30 activation opposes estrogen-dependent uterine growth via inhibition of stromal ERK1/2 and estrogen receptor alpha (ER α) phosphorylation signals[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1434-1447.

[21] NELSON HD, HUMPHREY LL, NYGREN P, et al. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review[J]. *JAMA*, 2002, 288(7): 872-881.

[22] PROSSNITZ ER, SKLAR LA, OPREA TI, et al. GPR30: A novel therapeutic target in estrogen-related disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29(3): 116-123.

[23] QIAO C, YE WJ, LI S, et al. Icarin modulates mitochondrial function and apoptosis in high glucose-induced glomerular podocytes through G protein-coupled estrogen receptors[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 473: 146-155.

[24] SHANG DD, LI Z, ZHU ZX, et al. Baicalein suppresses 17- β -estradiol-induced migration, adhesion and invasion of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor 30 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 2077-2085.

[25] YANG F, LIN ZW, HUANG TY, et al. Ligustilide, a major bioactive component of *Angelica sinensis*, promotes bone formation via the GPR30/EGFR pathway[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6991.

[26] ALMEIDA M, HAN L, MARTIN-MILLAN M, et al. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(37): 27298-27305.

[27] DE FRANCESCO EM, ROCCA C, SCAVELLO F, et al. Protective role of GPER agonist G-1 on cardiotoxicity induced by doxorubicin[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(7): 1640-1649.

[28] ZEKAS E, PROSSNITZ ER. Estrogen-mediated inactivation of FOXO3a by the G protein-coupled estrogen receptor GPER[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 702.

[29] DONG HQ, YE X, ZHONG L, et al. Role of FOXO₃ activated by HIV-1 tat in HIV-associated neurocognitive disorder neuronal apoptosis[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 44.

[30] 林紫微, 杨菲, 黄天一, 等. 芍药苷干预成骨细胞凋亡抗骨质疏松作用研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(4): 426-431.

(编辑: 杨蕊敏)