

· 基础研究 ·

多西环素通过 MEK/ERK 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞株体外成骨分化

耿佳伟¹, 费小明^{1*}, 汤郁², 李海璐¹, 王丽霞¹

¹江苏大学附属医院血液科, ²风湿科, 江苏 镇江 212000

[摘要] 目的: 研究在体外条件下多西环素(doxycycline, DOX)对前成骨细胞株 MC3T3-E1 成骨分化的影响及可能机制。方法: 在成骨诱导剂体外诱导 MC3T3-E1 细胞株成骨分化条件下, 茜素红染色检测成骨细胞分化; 实时定量 PCR 检测 DOX 对 MC3T3-E1 细胞相关成骨基因 OCN、Runx2 的影响; 用 DOX、MEK 抑制剂(U0126)单独或联合处理 MC3T3-E1 细胞后, Western blot 检测 N-cadherin、p-MEK 及 p-ERK 等蛋白的表达。结果: 在 MC3T3-E1 细胞株体外成骨诱导分化中, 加入 DOX 可以增强茜素红染色阳性率。DOX 上调 MC3T3-E1 细胞相关成骨基因 OCN、Runx2 的表达。DOX 处理 MC3T3-E1 细胞后, 其 N-cadherin 蛋白表达水平下降($P < 0.05$), p-MEK 和 p-ERK 蛋白的表达增加($P < 0.05$)。而 MEK 拮抗剂(U0126)则显著上调 N-cadherin 蛋白表达水平, 同时降低 p-MEK、p-ERK 水平。用 U0126 联合 DOX 处理 MC3T3-E1 细胞后, DOX 对 N-cadherin、p-MEK 和 p-ERK 蛋白水平的影响可被 U0126 拮抗。在 MC3T3-E1 细胞株体外成骨诱导分化中, 同时存在 DOX 和 U0126 时, 茜素红染色阳性率低于单独 DOX 组。结论: DOX 可以促进 MC3T3-E1 细胞株的体外成骨分化; 而 DOX 的这一效应可能是通过 MEK-ERK 信号通路参与完成的。

[关键词] 多发性骨髓瘤; 多西环素; 成骨分化; MC3T3-E1; N-cadherin; MEK/ERK 信号通路

[中图分类号] R733.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)01-001-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20230101

Doxycycline enhances *in vitro* osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via MEK/ERK signaling pathway

GENG Jiawei¹, FEI Xiaoming^{1*}, TANG Yu², LI Hailu¹, WANG Lixia¹

¹Department of Hematology, ²Department of Rheumatology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of doxycycline on *in vitro* osteogenic differentiation of pro-osteoblasts cell line MC3T3-E1 and the possible mechanisms. **Methods:** Alizarin red staining was employed to detect the osteogenic differentiation. Real-time PCR was used to detect the effect of DOX on the expression of OCN and Runx2 in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated with either DOX, MEK inhibitor U0126 alone or in combination, and the levels of N-cadherin, p-MEK and p-ERK were detected by Western blot. **Results:** When DOX was added during osteogenic induction, alizarin red staining positivity of the cultured MC3T3-E1 was significantly enhanced. DOX increased the expression of OCN and Runx2 in MC3T3-E1 cells. Besides, DOX decreased the levels of N-cadherin and increased the level of p-MEK and p-ERK in MC3T3-E1 ($P < 0.05$). On the contrary, MEK antagonist U0126 significantly increased the expression of N-cadherin protein and decreased the levels of p-MEK and p-ERK ($P < 0.05$). When MC3T3-E1 cells were treated with DOX in the presence of MEK inhibitor U0126, the changes in N-cadherin, p-MEK and p-ERK were showed to be reversed comparing with DOX alone. When both U0126 and DOX were present during *in vitro* osteogenic differentiation of MC3T3-E1, alizarin red staining positivity was less observed than that of DOX alone. **Conclusion:** In this study, DOX is showed to enhance the *in vitro* osteogenic differentiation of MC3T3-E1, which is probably associated with MEK/ERK signaling pathway.

[Key words] multiple myeloma; doxycycline; osteogenesis; MC3T3-E1; N-cadherin; MEK/ERK signaling pathway

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(01):001-007, 106]

[基金项目] 江苏省卫生健康委科研课题(H2018084); 江苏省社会发展重点项目(临床前沿技术)课题(BE202068)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: feixiaomingujs@aliyun.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种浆细胞恶性肿瘤,在其发生和发展过程中,骨髓瘤细胞与骨髓微环境的相互作用起到非常重要的作用^[1-2]。成骨细胞作为骨髓微环境中的重要细胞成分之一,在MM中可出现明显的异常^[3]。MM患者成骨细胞的成骨活性下降,而破骨细胞活性亢进是骨髓瘤患者骨骼病变的核心机制^[4-6]。此外,如何纠正MM患者的成骨细胞功能障碍,也是MM领域的研究热点。多西环素(doxycycline, DOX)是一种临床上常用于抗菌治疗的抗生素。本课题组先前发现DOX在体外有抗骨髓瘤细胞增殖的作用^[7-8]。鉴于骨髓微环境中的成骨细胞在MM中的重要作用,本研究拟探索DOX在体外对成骨细胞株MC3T3-E1成骨分化的影响及相应机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠前成骨细胞系(MC3T3-E1细胞,中科院上海细胞库); α -MEM培养基、胎牛血清(FBS)(Gibco公司,美国);多西环素(Sigma公司,美国);MEK抑制剂U0126(MCE公司,美国);CCK-8试剂盒(同仁公司,日本);PCR引物(上海生工生物公司);逆转录试剂盒、SYBR Green试剂盒(Takara公司,日本);引物委托上海生工生物技术有限公司设计并合成。引物序列如下:OCN-F 5'-TGACGAGTTGGCTGACCA-3', OCN-R 5'-AGGGTGCCTGGAGAGGAG-3'; Runx2-F 5'-TTGACCTTTGTCCCAATGC-3', Runx2-R 5'-AGGTTGGAGGCACACATAGG-3'; β -actin-F 5'-CCTGGCACCCAGACAAAT-3', β -actin-R 5'-GGGCCGACTCGTCATAC-3'。兔抗人p-ERK1/2抗体、兔抗人p-MEK抗体、兔抗人GAPDH抗体等(CST公司,美国);BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白上样缓冲液(5 \times)、预染Marker(杭州碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物处理

MC3T3-E1细胞用含有10% FBS的 α -MEM培养液培养,取生长状态良好的细胞进行实验。用于实验的DOX浓度为5、10、20、40 mg/L, U0126浓度为5、10 μ mol/L。

1.2.2 CCK-8检测细胞增殖

在96孔板中每孔接种50 μ L的细胞悬液(1×10^5 个/mL),将DOX用培养液配制成所需的浓度,实验组孔加入50 μ L药物;对照组加入50 μ L培养液。在

涡旋振荡器上轻轻摇匀,置于37 $^{\circ}$ C培养箱分别培养1、2、3 d后,取出96孔板,在每孔中加入10 μ L CCK-8试剂,避光孵育约1 h,酶标仪测量在450 nm波长处的吸光值并记录。

1.2.3 Western blot检测蛋白的表达

收集细胞,于冰上裂解,提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。配制分离胶以及浓缩胶,按每个加样孔约30 μ g蛋白量上样。电泳后转膜到孔径为0.45 μ m的PVDF膜上,封闭后将膜放入相应的一抗中,在4 $^{\circ}$ C环境中摇床孵育过夜。洗膜、摇床上孵育二抗,孵育结束洗膜、曝光。用Image J软件进行灰度值分析。

1.2.4 茜素红染色检测成骨

当培养的MC3T3-E1细胞融合度达到80%时,消化并调整细胞浓度 1×10^4 个/mL接种至12孔板中的无菌爬片上,每孔培养体系为1 mL。培养过夜后,不同组别更换培养基,每孔加入1 mL相应培养基。设置阴性对照组(含完全培养基)、诱导组(成骨诱导液)、实验组(含DOX的成骨诱导液)。每3 d更换新鲜的各组培养基。诱导14、21 d时,经4%多聚甲醛固定30 min,茜素红染色检测成骨,日常光线下标本拍照、倒置显微镜下镜检。

1.2.5 实时定量PCR(qPCR)检测基因表达

收集细胞,冰上裂解,用TRIzol提取细胞总RNA,酶标仪上测定浓度。按照试剂盒说明配制逆转录体系,在PCR扩增仪中进行逆转录;转录完后,将合成的cDNA放在冰上冷却。按SYBR Green试剂盒说明书在冰上配制20 μ L反应体系,加入8连管中,在仪器中反应,最后进行数据处理分析。

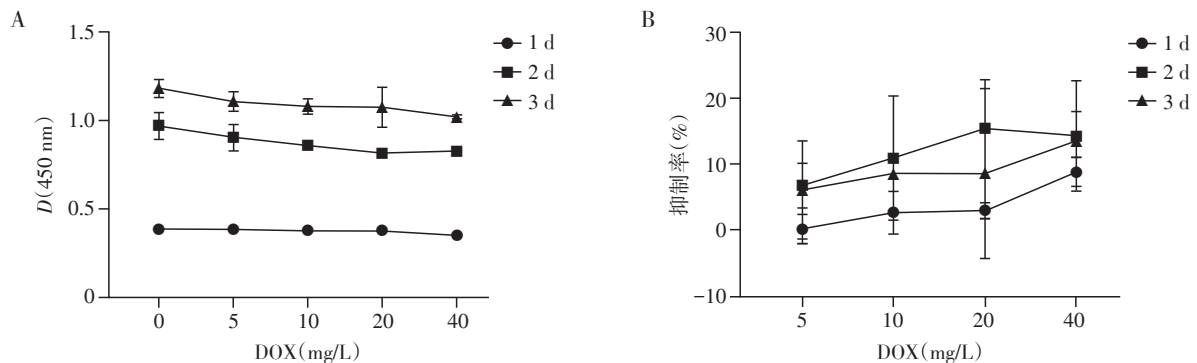
1.3 统计学方法

数据处理、统计分析用GraphPad Prism 5.0软件进行操作;用Image J软件计算蛋白及茜素红染色灰度值。实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据资料符合正态分布(S-W检验),用单因素方差分析方法对各实验组间进行两两比较(Dunnett-*t*检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度DOX对前成骨细胞MC3T3-E1细胞增殖的影响

取生长状态良好的MC3T3-E1细胞,按实验分组处理1、2、3 d,发现与对照组相比,5~40 mg/L的DOX对MC3T3-E1细胞增殖没有明显的抑制作用(图1)。



A:生长曲线;B:抑制率曲线;DOX 0 mg/L为对照组(n=3)。

图1 CCK-8法检测DOX对前成骨细胞MC3T3-E1增殖的影响

Figure 1 Effect of DOX on the proliferation of preosteoblastic MC3T3-E1 by CCK-8 assay

2.2 茜素红染色检测DOX对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响

既往Wiśniewska等^[9]发现DOX本身可以直接抑制ALP的活性,对ALP染色有干扰,我们前期实验结果与其报道一致,故本研究不采用ALP染色作为成骨分化标志。MC3T3'-E1细胞株体外成骨诱导过程中,在第14、21天进行茜素红染色,检测成骨分化的效果。在第14天时,肉眼及显微镜下观察茜素红染色3组间没有明显区别(图2A、B)。成骨诱导21 d时,诱导组与实验组均可见明显红染。与诱导组比较,加入DOX的实验组染色更强、钙结节更多($P < 0.05$,图2C~E)。这一结果提示,在体外成骨诱导分化中,DOX可促进MC3T3-E1细胞的成骨分化功能。

2.3 qPCR检测DOX对MC3T3-E1细胞相关成骨基因的影响

MC3T3-E1细胞经成骨诱导21 d后,提取总RNA后利用qPCR检测相关成骨基因OCN、Runx2的相对表达量。与阴性对照组对比,诱导组及10 mg/L DOX实验组,相关成骨基因均上调,说明成骨诱导成功,但诱导组与实验组间比较,无统计学差异(图3),这提示在成骨诱导的21 d,有DOX与无DOX组的OCN和Runx2的mRNA水平无差异。

2.4 DOX处理MC3T3-E1细胞后,N-cadherin、p-MEK、p-ERK蛋白的表达情况

用5、10 mg/L的DOX分别处理MC3T3-E1细胞2 d,Western blot法检测N-cadherin蛋白的表达情况。结果发现,与对照组比较,不同浓度DOX处理MC3T3-E1细胞2 d后,其N-cadherin蛋白表达下降,且差异有统计学意义($P < 0.05$,图4A)。结合DOX对细胞增殖和蛋白表达的影响,后续的成骨及

Western blot实验DOX浓度均选用10 mg/L。随后Western blot法检测p-MEK、p-ERK蛋白水平后发现,与对照组比较,10 mg/L DOX处理2 d后p-MEK、p-ERK蛋白表达上调,且差异具有统计学意义($P < 0.05$,图4B、C)。

2.5 MEK抑制剂U0126处理MC3T3-E1细胞,检测N-cadherin蛋白及相关通路蛋白的表达情况

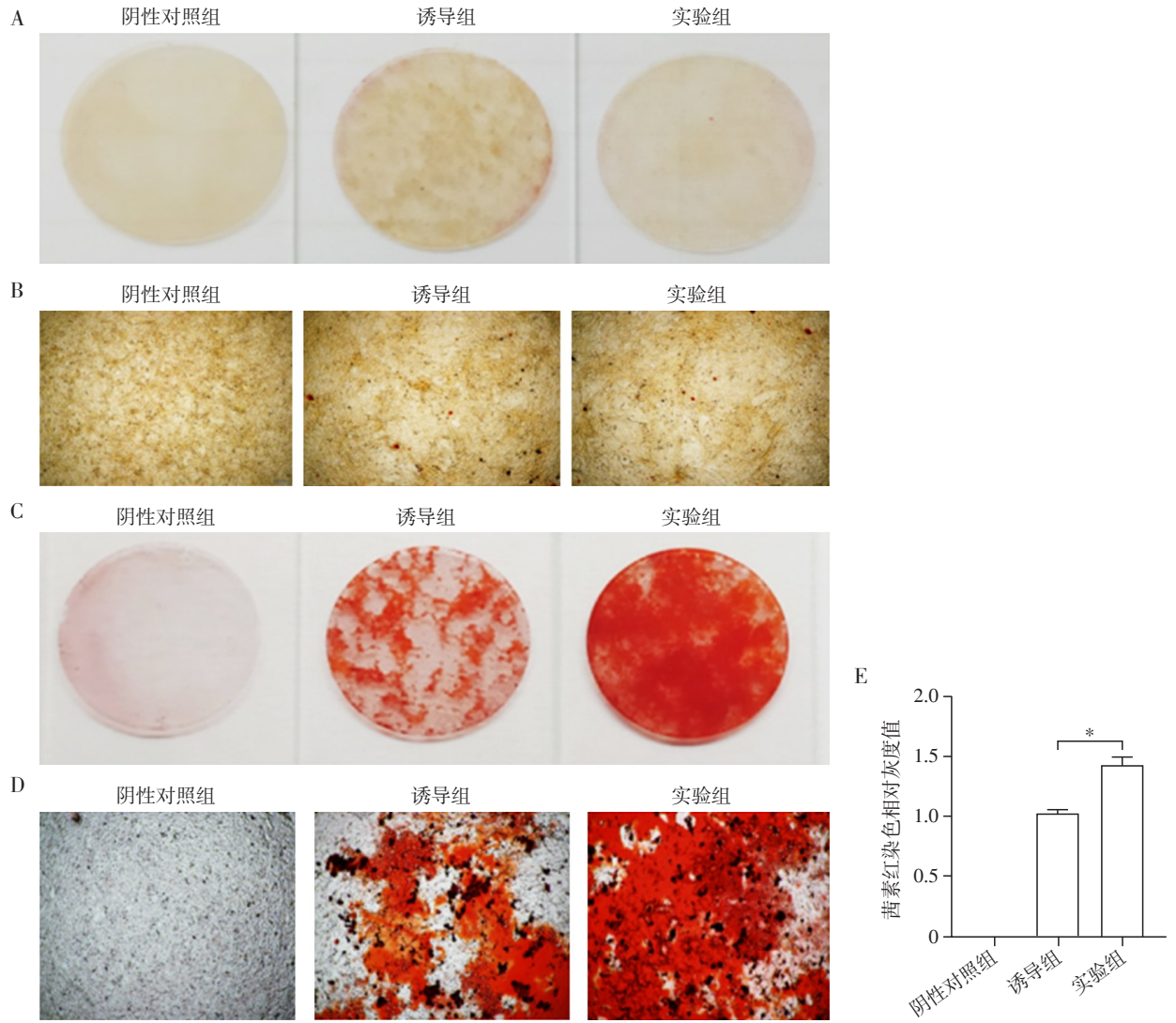
为了进一步探究DOX是否对MEK/ERK通路产生影响。用浓度为5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的MEK的抑制剂U0126处理MC3T3-E1细胞2 d后,Western blot检测N-cadherin、p-ERK、p-MEK表达量。与对照组比较,不同浓度U0126处理2 d后N-cadherin蛋白表达上调($P < 0.05$,图5A);与此同时,p-MEK、p-ERK蛋白表达下降,但5 $\mu\text{mol/L}$ 的U0126对p-ERK的抑制作用更明显($P < 0.05$,图5B、C),故后续实验U0126选用5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.6 U0126联合DOX处理MC3T3-E1细胞,检测相关目的蛋白的表达情况

用5 $\mu\text{mol/L}$ U0126联合10 mg/L DOX处理MC3T3-E1细胞2 d,Western blot法检测N-cadherin、p-MEK和p-ERK蛋白的表达。与DOX单独处理组比较,联合处理组N-cadherin水平较DOX单独处理组升高,且联合处理组p-MEK及p-ERK蛋白表达较单独处理组降低(图6)。

2.7 U0126联合DOX处理MC3T3-E1细胞,茜素红检测MC3T3-E1细胞成骨分化的变化

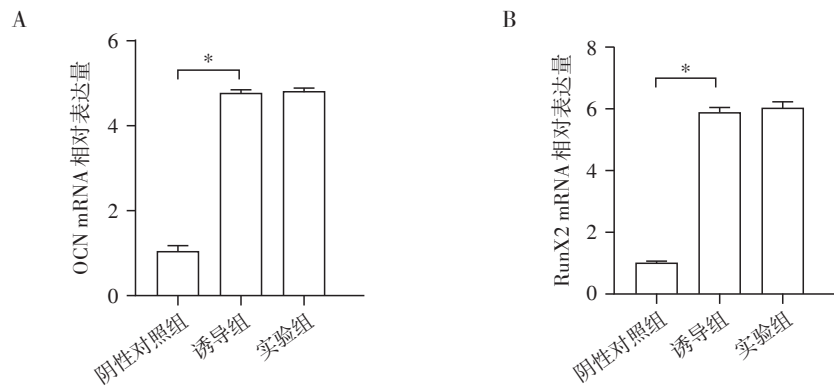
随后的实验探索使用U0126抑制MEK/ERK通路对DOX促进MC3T3-E1细胞成骨分化的作用有何影响。实验共分为5组:①阴性对照组,②阳性成骨对照组,③DOX处理组,④U0126处理组,⑤DOX联合U0126处理组。成骨诱导21 d后,阳性成骨组出



A: 诱导 14 d 的大体改变; B: 诱导 14 d 的显微镜下改变 (× 40); C: 诱导 21 d 的大体改变; D: 诱导 21 d 的显微镜下改变 (× 40); E: 图 D 的统计结果, 两组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图 2 MC3T3-E1 细胞成骨诱导 14、21 d 后茜素红染色

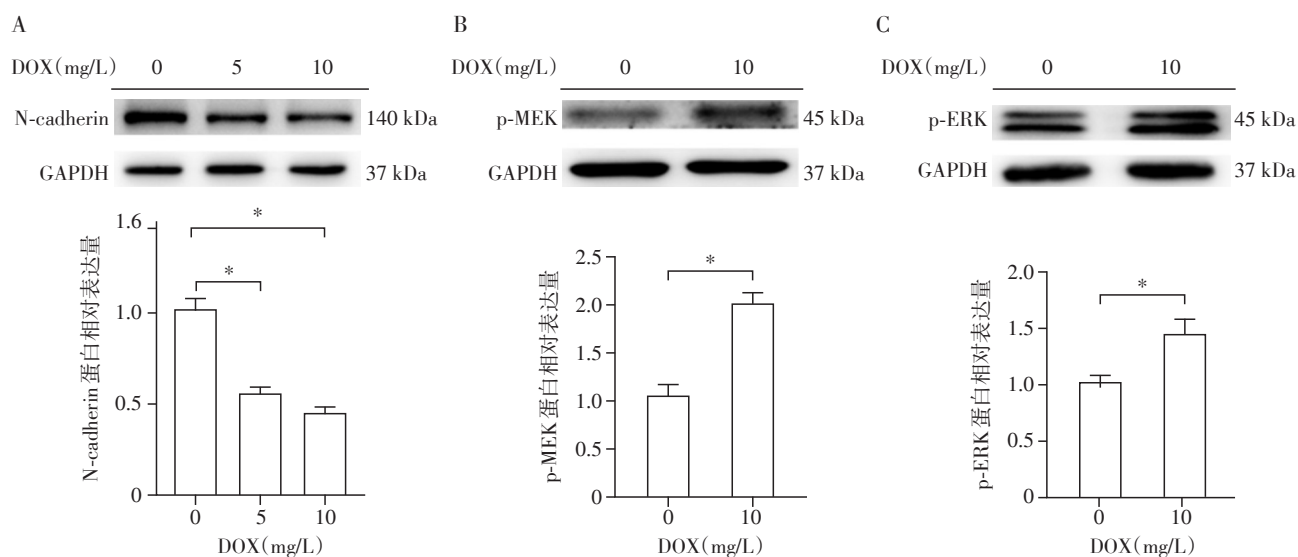
Figure 2 Alizarin red staining of MC3T3-E1 cells after osteogenic induction for 14, 21 days



A: OCN; B: Runx2; 两组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图 3 成骨诱导 21 d 后 qPCR 检测相关成骨基因相对表达量

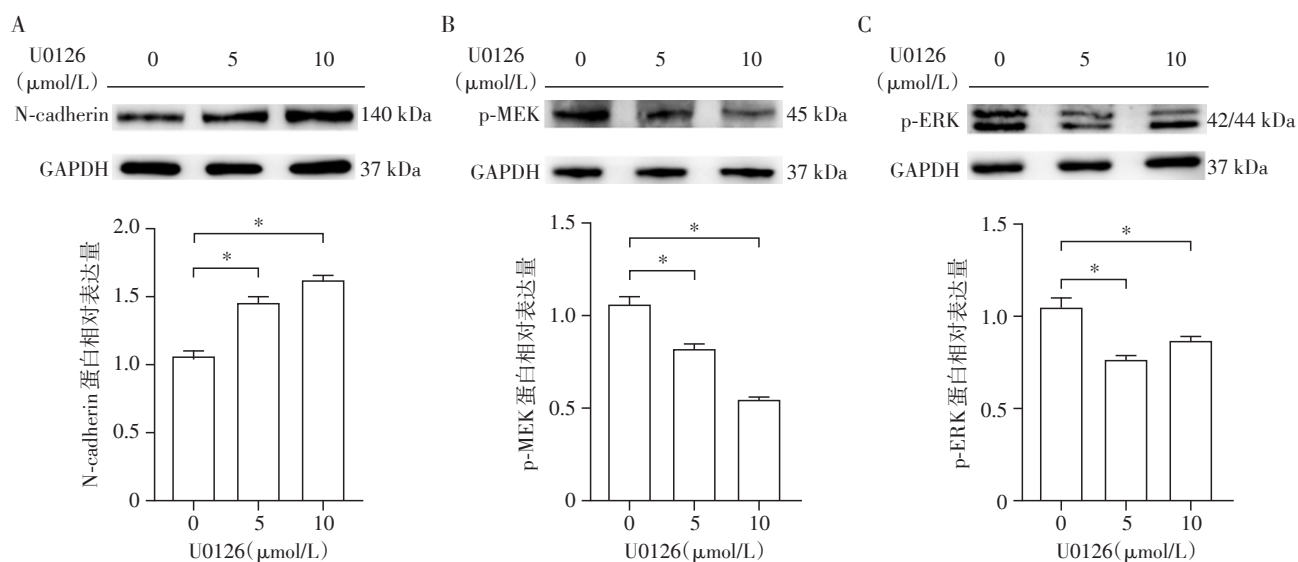
Figure 3 Detection of osteogenic gene levels via qPCR after 21 days of osteogenic induction



A: N-cadherin; B: p-MEK; C: p-ERK; DOX 0 mg/L 为对照组, 两组比较, $P < 0.05$, $n=3$ 。

图4 不同浓度的DOX处理MC3T3-E1细胞2 d后Western blot检测蛋白的表达情况

Figure 4 MC3T3-E1 cells were treated with different concentrations of DOX for 2 days and the expression of the indicated proteins was detected by Western blot



A: N-cadherin的蛋白表达情况及其相对灰度值; B: p-MEK蛋白表达情况及灰度值; C: p-ERK蛋白表达情况及灰度值; U0126 0 μmol/L 为对照组, $P < 0.05$, $n=3$ 。

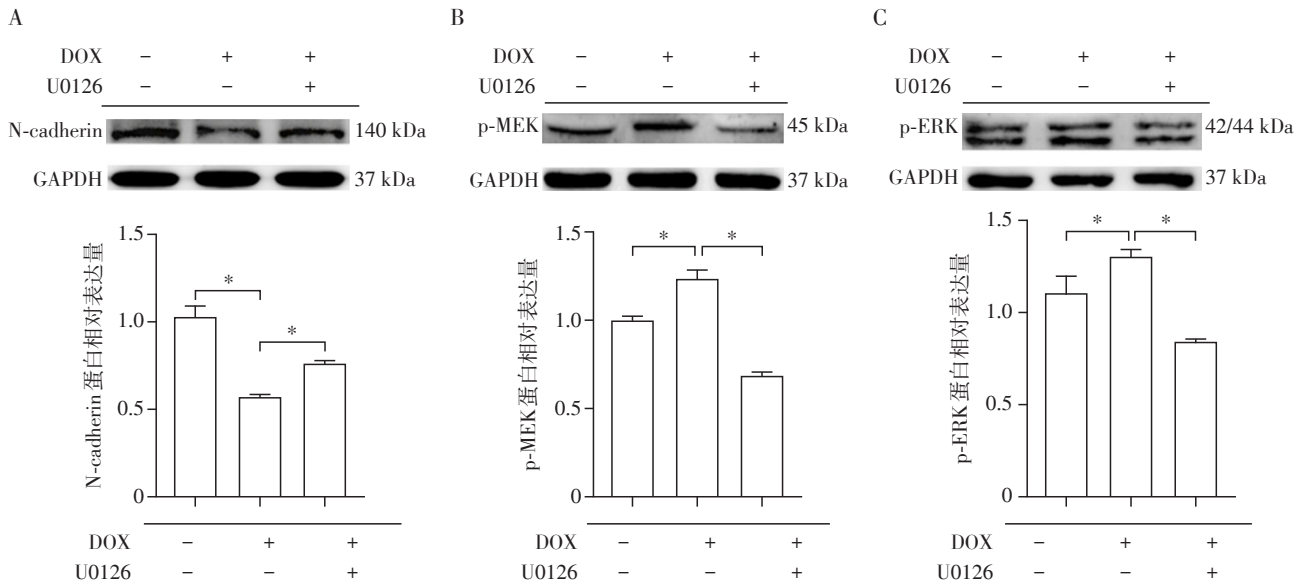
图5 用U0126处理MC3T3-E1细胞后Western blot检测蛋白的表达情况

Figure 5 MC3T3-E1 cells were treated with U0126 for 2 days and the expression of the indicated proteins was detected by Western blot

现较多的红色钙结节, 成不规则片状或散在分布; DOX+U0126组, 红染率低于DOX处理组, 但高于U0126处理组 ($P < 0.05$, 图7)。这一结果提示, MEK/ERK通路参与MC3T3-E1细胞成骨分化的调节, 而DOX通过MEK/ERK通路来调节MC3T3-E1细胞的成骨分化。

3 讨论

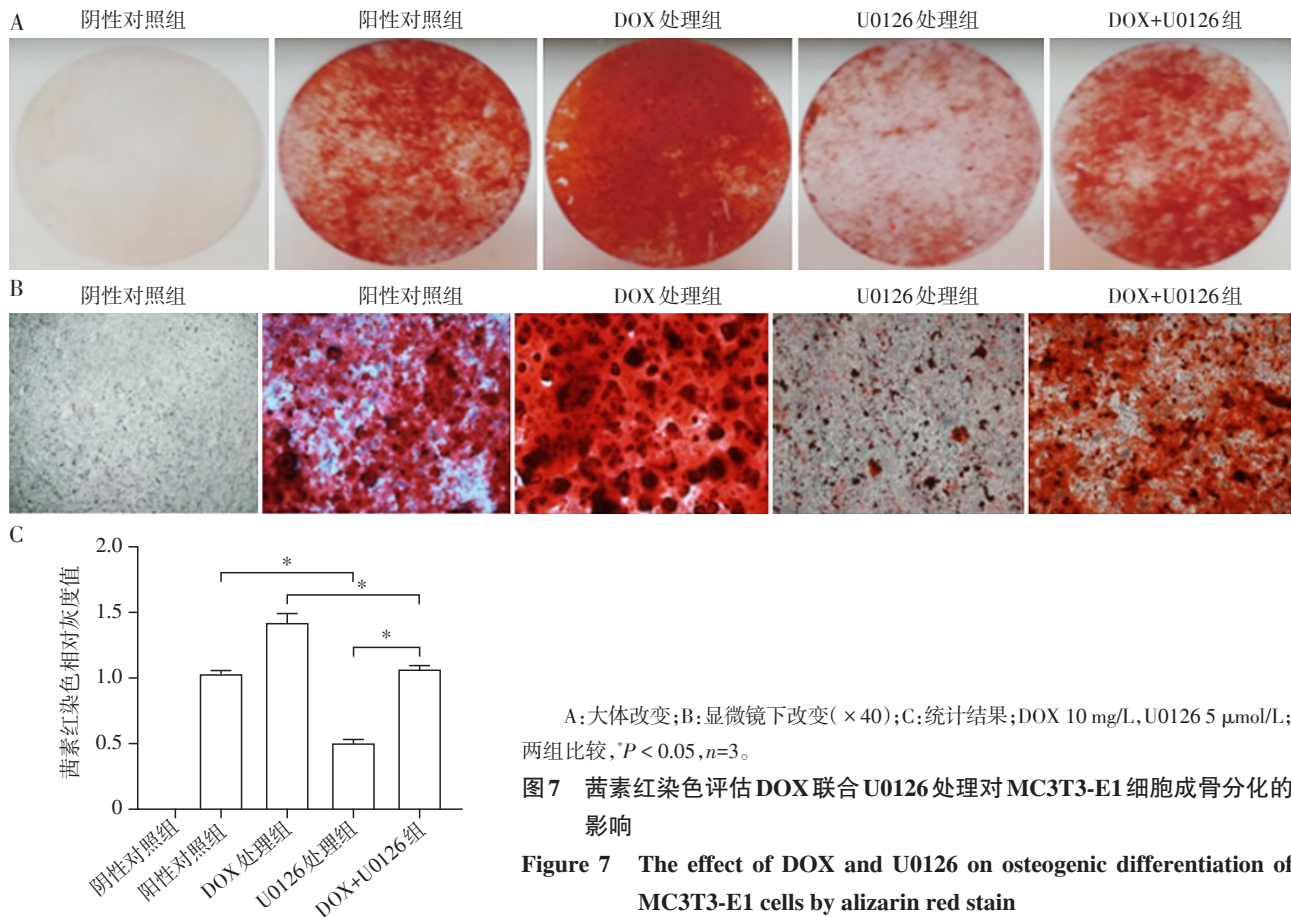
在MM细胞与骨骼微环境的相互作用过程中, 肿瘤细胞可引起微环境中多种细胞和非细胞成分异常, 其中成骨细胞成骨功能和分化的受损尤其明显^[2,10]。即使MM患者经有效治疗后, 成骨细胞等的



A: N-cadherin; B: p-MEK; C: p-ERK; DOX 0 mg/L为对照组, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图6 Western blot检测U0126联合DOX处理的MC3T3-E1细胞中相关目的蛋白表达

Figure 6 Expression of the indicated proteins was detected by Western blot in MC3T3-E1 cells treated with U0126 combination with DOX



A: 大体改变; B: 显微镜下改变($\times 40$); C: 统计结果; DOX 10 mg/L, U0126 5 $\mu\text{mol/L}$; 两组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图7 茜素红染色评估DOX联合U0126处理对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响

Figure 7 The effect of DOX and U0126 on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by alizarin red stain

异常仍然存在,并且这些异常与MM细胞的耐药和复发密切相关^[4,6,11]。因此,成骨细胞的异常,不但

与MM骨骼病变相关,也与MM细胞的生存、耐药等有密切关系。正因为如此,MM骨骼病变的机制和

干预方法是MM基础和临床研究的重要方向。

本研究结果提示DOX促进前成骨细胞株MC3T3-E1的体外成骨分化,并且对其N-cadherin的表达也有影响。既往研究报道DOX有一定的抗实体肿瘤、抑制血管生成等作用^[12-13]。另外,也有研究报道DOX促进人和大鼠成骨细胞的增生和矿物质沉积,有正性成骨作用^[14-15],这与本研究结果类似。除了作用成骨细胞,DOX还可以通过其他机制来影响骨骼生成。例如动物实验发现,DOX可以抑制基质金属蛋白酶,减轻骨关节炎^[16]。此外,DOX可以抑制大鼠的破骨细胞活性,有助于减少破骨细胞溶骨亢进引起骨骼破坏^[17]。在乳腺癌骨转移时,DOX可以抑制转移灶局部破骨细胞活性及数量,改善溶骨性病变^[18]。上述结果提示,DOX可以通过多种机制阻止骨骼破坏,是一个潜在的治疗MM骨骼病变的药物。

Gomes等^[15]研究发现,DOX可以作用于Wnt信号通路,进而影响成骨细胞的分化。而本研究发现,DOX也可通过MEK/ERK信号通路影响MC3T3-E1细胞的成骨分化。多项研究发现,MEK/ERK信号通路参与成骨细胞的成骨分化的调节^[19-21],这与本研究观察到DOX对MEK/ERK信号通路的影响及茜素红染色的结果相一致。除了参与成骨分化调节之外,有研究报道MEK/ERK信号通路对成骨细胞的黏附、迁移等细胞行为也有调节作用^[22]。本研究还发现,DOX可以下调MC3T3-E1细胞株N-cadherin的表达,并且MEK/ERK信号通路参与DOX对N-cadherin下调的作用。既往研究报道N-cadherin可以与Wnt受体结合,竞争性抑制Wnt/ β -Catenin信号通路的激活,干扰成骨细胞的成骨分化^[23]。有意思的是,N-cadherin表达变化后,反过来还会对PI3K/Akt、MEK/ERK和Wnt/ β -catenin信号通路产生影响^[24-25]。所以,上述研究提示DOX处理MC3T3-E1细胞株后,可以通过MEK/ERK通路下调N-cadherin表达,而N-cadherin水平变化后,反过来也可能参与对MEK/ERK信号通路的上调作用。

综上所述,本研究以MC3T3-E1细胞株为对象证实,DOX可以促进其成骨分化,并且下调其N-cadherin蛋白水平。另外初步的机制研究发现,MEK/ERK信号通路在DOX对MC3T3-E1细胞株成骨分化和N-cadherin表达的影响中起到重要作用。这提示DOX不仅可以直接杀伤MM细胞^[7-8],还可能同时通过对骨微环境中成骨细胞的调节作用影响MM的病理生理过程。DOX对骨微环境的影响有待

进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] MICHELS T C, PETERSEN K E. Multiple myeloma: diagnosis and treatment[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 95(6): 373-383
- [2] BRIGLE K, ROGERS B. Pathobiology and diagnosis of multiple myeloma[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2017, 33(3): 225-236
- [3] 翟妮, 王昌敏. 多发性骨髓瘤骨病发病机制的研究进展[J]. *新疆医学*, 2019, 49(10): 1033-1036
- [4] EVANGELOS T, IOANNIS N S, MARIA G, et al. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside[J]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(1): 7
- [5] LENTZSCH S, EHRLICH L A, ROODMAN G D. Pathophysiology of multiple myeloma bone disease[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, 21(6): 1035-1049
- [6] YEN C H, HSU C M, HSIAO S Y, et al. Pathogenic mechanisms of myeloma bone disease and possible roles for NRF2[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): E6723
- [7] 颜玲玲, 费小明, 汤郁, 等. 多西环素对人多发性骨髓瘤细胞增殖的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2017, 27(3): 239-242
- [8] 李海璐, 费小明, 汤郁, 等. 多西环素对骨髓瘤细胞株H929内源性凋亡的影响及其作用机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2022, 30(2): 441-448
- [9] WIŚNIEWSKA I E, GAWLIK Z. The effect of doxycycline upon alkaline phosphatase activity in rat kidney (quantitative study using the interferometric technique)[J]. *Folia Histochem Cytochem*, 1982, 20(3-4): 157-162
- [10] ROODMAN G D. Osteoblast function in myeloma[J]. *Bone*, 2010, 48(1): 135-140
- [11] LANDGREN O, ISKANDER K. Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes[J]. *J Intern Med*, 2017, 281(4): 365-382
- [12] CLEMENS D L, DURYEE M J, SARMIENTO C, et al. Novel antioxidant properties of doxycycline[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): E4078
- [13] MARKOWSKA A, KAYSIEWICZ J, MARKOWSKA J, et al. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(13): 1549-1554
- [14] SOUSA G P, HELENA F M. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells

(下转第106页)

- brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy [J]. PNAS, 2018, 115(4):E610-E619
- [45] QIU W, HU Y, ANDERSEN T E, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19(TNFRSF19) regulates differentiation fate of human mesenchymal (stromal) stem cells through canonical Wnt signaling and C/EBP [J]. J Biol Chem, 2010, 285(19):14438-14449
- [46] PEI Y F, LIU L, LIU T L, et al. Joint association analysis identified 18 new loci for bone mineral density[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(6):1086-1094
- [47] WU H, WHITFIELD T W, GORDON J A, et al. Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis [J]. Genome Biol, 2014, 15(3):R52
- [48] FAFILEK B, KRAUSOVA M, VOJTECHOVA M, et al. Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells[J]. Gastroenterology, 2012, 144(2):381-391
- [49] SCHUTGENS F, ROOKMAAKER M B, BLOKZIJL F, et al. Troy/TNFRSF19 marks epithelial progenitor cells during mouse kidney development that continue to contribute to turnover in adult kidney [J]. PNAS, 2017, 114(52):E11190-E11198
- [50] LIM Y C, KIM H, LIM S M, et al. Genetic analysis of a novel antioxidant multi-target iron chelator, M30 protecting against chemotherapy-induced alopecia in mice [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):149
- [51] JOHANNA P, MARJA P, BARKER P A, et al. Edar and Troy signalling pathways act redundantly to regulate initiation of hair follicle development [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(21):3380-3391

[收稿日期] 2022-07-20

(责任编辑:蒋莉)

(上接第7页)

- [J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(3):251-259
- [15] GOMES K D N, ALVES A P N N, DUTRA P G P, et al. Doxycycline induces bone repair and changes in Wnt signalling[J]. Int J Oral Sci, 2017, 9(3):158-166
- [16] NGANVONGPANIT K, POTHACHAROEN P, SUWANKONG N, et al. The effect of doxycycline on canine hip osteoarthritis: design of a 6-months clinical trial[J]. J Vet Sci, 2009, 10(3):239-247
- [17] DE FIGUEIREDO F A T, SHIMANO R C, ERVOLINO E, et al. Doxycycline reduces osteopenia in female rats [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):15316
- [18] ZEINA S, GURMIT S. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis[J]. Anti Cancer Drugs, 2003, 14(10):773-778
- [19] LI Y S, VAN LEEUWEN J, et al. ERK activation and alpha v beta 3 integrin signaling through Shc recruitment in response to mechanical stimulation in human osteoblasts [J]. J Cell Biochem, 2002, 87(1):85-92
- [20] WANG N, LI Y, LI Z, et al. Sal B targets TAZ to facilitate osteogenesis and reduce adipogenesis through MEK-ERK pathway[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5):3683-3695
- [21] WANG F S, WANG C J, SHEEN-CHEN S M, et al. Super-oxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors [J]. J Biol Chem, 2002, 277(13):10931-10937
- [22] LAI C F, CHAUDHARY L, FAUSTO A, et al. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(17):14443-14450
- [23] HAÏ E, LAPLANTINE E, GEOFFROY V, et al. N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(4):953-964
- [24] XU L, MENG F, NI M, et al. N-cadherin regulates osteogenesis and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3):2533-2539
- [25] HAÏ E, NOURAUD A, MARIE P J. N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling [J]. PLoS One, 2009, 4(12):e8284

[收稿日期] 2022-07-14

(责任编辑:蒋莉)