

· 基础研究 ·

TAZ激动剂TM-25659促进人脂肪干细胞成骨的体内外研究

胡佳安^{1,2}, 吴亚平¹, 黄蓉¹, 杨建荣², 王琰玲¹, 朱玉敏^{1*}

¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学口腔医学研究所, 南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探索成骨转录共刺激因子TAZ(Tafazzin)激动剂TM-25659对人脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)在体内外成骨分化和骨形成过程中的生物学作用。方法:分离培养人ADSCs,通过蛋白质免疫印迹、实时定量PCR检测ADSCs成骨、成脂分化及TM-25659干预后不同时间点TAZ的表达变化,茜素红和油红O染色分别验证其成骨和成脂效果;以 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)材料为载体负载成骨诱导和TM-25659预处理后的ADSCs植入裸鼠体内,6周后利用苏木精-伊红染色、Masson三色染色和免疫组织化学染色法检测比较ADSCs体内成骨效果。结果:人ADSCs体外成骨分化过程中TAZ表达上调,而在成脂分化中其表达降低。TM-25659促进ADSCs中TAZ的表达,并增强ADSCs体内成骨及骨生成能力。结论:TAZ是促进ADSCs成骨分化的关键调控因子之一,以TAZ为药物靶点可促进ADSCs的骨再生及修复。

[关键词] 脂肪干细胞;成骨;Hippo通路;TM-25659;TAZ

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)07-971-07

doi:10.7655/NYDXBNS20190705

The TAZ chemical activator TM - 25659 facilitates osteogenic differentiation of human ADSCs *in vitro* and *in vivo*

Hu Jia'an^{1,2}, Wu Yaping¹, Huang Rong¹, Yang Jianrong², Wang Yanling¹, Zhu Yumin^{1*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** The present study aims to determine whether pharmacological activation of the transcriptional coactivator with PDZ-binding motif Tafazzin (TAZ) by chemical TM-25659 can promote osteogenic differentiation and bone formation of adipose-derived stem cells (ADSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Human ADSCs were isolated and expanded *in vitro*. The changing expressions of TAZ during ADSCs differentiation at different time points were measured by Western blot and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (PCR). Alizarin red S and oil red O staining were used to detect osteogenic and adipogenic effects. The ADSCs following initial osteogenic differentiation and TM - 25659 were loaded on scaffold β - tricalcium phosphate (β - TCP) and then subcutaneously implanted into nude mice. Six weeks later, the results of bone formation *in vivo* after implantation of the ADSCs were measured and compared by Hematoxylin-Eosin staining, Masson staining and immunohistochemistry staining. **Results:** TAZ was upregulated during osteogenic differentiation of ADSCs but downregulated during adipogenic differentiation. Pharmacological activation of TAZ by TM-25659 promotes osteogenic differentiation of ADSCs *in vitro*. The transient treatment of ADSCs with TM - 25659 significantly enhances new bone regeneration of ADSCs *in vivo*. **Conclusion:** TAZ is a key mediator for promoting osteogenic differentiation of ADSCs. The pharmacological activation of TAZ in ADSCs might become a feasible treatment for bone regeneration and repair.

[Key words] adipose-derived stem cells; osteogenesis; Hippo signaling pathway; TM-25659; TAZ

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(07):971-977]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(2016NJMU058, 08NMUM059)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:jj10171022@qq.com

对因肿瘤、创伤及先天畸形造成的大范围骨缺损进行骨移植,相较于常规骨替代材料及方法,以干细胞和生物材料为基础的组织工程技术为组织缺损修复提供了新的策略^[1]。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)具有较强增殖能力和多向分化潜能,是当前组织工程和再生医学领域的主力种子细胞之一^[2]。但对ADSCs成骨分化的具体分子机制研究仍处于初始阶段^[3]。成骨转录共刺激因子TAZ(Tafazzin)是近年发现的Hippo信号通路下游的关键效应分子,参与调节细胞增殖与凋亡、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、干细胞的自我更新与分化,并调控组织器官的正常体积及机体内环境的稳态^[4-6]。近年来有研究揭示TAZ是参与骨髓间充质干细胞自我更新和多向分化的新的关键分子^[7-8]。TAZ一方面可作为转录共激活因子与Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)结合从而激活其下游骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)等成骨分子的表达以促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨分化;另一方面,也可与过氧化物增殖子激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activator receptor gamma, PPAR γ)结合,抑制其成脂分化^[8-10]。研究发现,靶向TAZ的小分子药物TM-25659可通过调控TAZ的表达和转录激活活性从而影响MSCs向成骨或成脂方向的分化^[11]。本研究拟通过构建基于ADSCs的生物陶瓷支架材料验证TM-25659在体内促进脂肪干细胞成骨过程中的作用,为骨缺损的再生修复提供新的靶点和策略。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c健康裸鼠由南京大学动物实验中心提供,共12只,体重20.0~25.0 g,8周龄,雌性。所有动物实验均经南京医科大学动物实验管理委员会审核批准。

DMEM低糖培养基(Gibco公司,美国),含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; Hyclone公司,美国)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青/链霉素。培养条件为5%CO₂的37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱。TAZ激动剂TM-25659由韩国化学技术研究所的JinHeeAhn教授友情提供^[11-12]。将TM-25659溶于二甲基亚砜(DMSO)中作为储存原液;多 β -磷酸三钙[β -tricalcium phosphate, β -TCP; 直径3 mm,厚度2 mm,孔径(500 \pm 150) μm ,上海贝奥路生物材料有限公司];TRIzol(Invitrogen公司,美

国);逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);一抗:骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体、Runx2抗体、GAPDH抗体(Santa Cruz公司,美国),骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)抗体(R&D公司,美国),TAZ抗体(BD Biosciences公司;Cell Signaling Technology公司,美国);二抗:快捷型酶标羊抗鼠IgG聚合物、快捷型酶标羊抗兔IgG聚合物(福州迈新生物技术开发有限公司),过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG、过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(Gibco公司,美国)。除非另有说明,否则其余化学品均购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 方法

1.2.1 人ADSCs的分离和培养

涉及人体受试者的所有方案均经南京医科大学伦理委员会(2016-0156)审查批准。脂肪组织由南京医科大学附属友谊整形外科医院拟进行腹部吸脂术的女性志愿者(29~54岁,平均40岁)提供,一般情况良好,对本次研究相关内容知情同意。获取供者术中取出的脂肪组织,置于含1%双抗的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中洗涤,加入0.075% I型胶原酶,于37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育消化60 min;加入10%胎牛血清使胶原酶失活后,通过离心沉淀基质血管组分(stromal vascular fraction, SVF),吸去水相上清层和上层油层。将细胞沉淀重新悬浮,通过100 μm 过滤器后,接种在培养瓶中,置于含有5%CO₂的恒温培养箱,48 h后每3 d换液1次,待细胞80%~90%融合时进行传代培养。取第3~5代的人ADSCs进行后续实验。

1.2.2 ADSCs体外成骨、成脂诱导分化

将ADSCs以 3×10^5 个/cm²密度铺板,置于培养基中培养2~3 d,待细胞长至90%。成骨诱导组改用成骨培养液(含有50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 抗坏血酸、0.1 mmol/L地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸和10%FBS的低糖DMEM)诱导细胞。分别在诱导后7、14、21 d检测ADSCs成骨分化情况。

成脂诱导组改用成脂培养液(含有1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 吡啶美辛、500 nmol/L IBMX、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素和10%FBS的低糖DMEM)培养。分别在诱导后7、14、21 d检测ADSCs成脂分化情况。

1.2.3 茜素红和油红O染色

体外诱导ADSCs成骨,在指定时间点收获细胞,吸去培养液,加入4%多聚甲醛,室温下固定1 h, PBS洗涤5次,洗涤结束加入1%茜素红染色剂,室温染色15 min。染色结束吸去染色液, PBS洗涤3遍,倒置显微镜观察并拍照。

ADSCs成脂诱导第7天和第14天,使用油红染色试剂盒按说明步骤进行油红O染色以检测脂滴,倒置显微镜下观察比较染色结果。

1.2.4 Western blot 实验

应用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液水浴煮沸,分装后-80℃冰箱储存备用。蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离后常规湿转法转移蛋白至PVDF膜上,在5%脱脂奶粉溶液中封闭后与一抗孵育过夜。次日复温后TBST洗膜、二抗孵育、TBST再次洗涤后加入化学发光液,凝胶电泳成像系统进行图像采集。

1.2.5 实时定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

用TRIzol试剂从细胞中分离总RNA,然后利用逆转录试剂盒逆转录为cDNA后进行PCR检测。应用Primer premier 5设计目的基因的上、下游引物,序列如下:TAZ:上游5'-GTTTATGGGACAGTCCGGGAG-3',下游5'-AGTCTAAGGGCTTCGGCTCT-3';ALP:上游5'-TCATGTTCTGGGAGATGGTATG-3',下游5'-GCATTAGCTGATAGGCGATGTCC-3';Runx2:上游5'-TCGCCAGGCTTCATAGCAAA-3',下游5'-GGCCTTGGGTAAGGCAGATT-3';OPN(encoded by SPPI):上游5'-CTTCTCAGCCAAACGCCGA-3',下游5'-CATCTGTTGTGGAGGGGTAGG-3';OCN(encoded by BGLAP):上游5'-TCCTTTGGGGTTTGCCTAC-3',下游5'-CCAGCCTCCAGCACTGTTTA-3';PPAR γ :上游5'-AGCAAACCCCTATTCCATGCT-3',下游5'-CACGGAGCTGATCCCAAAGT-3';GAPDH:上游5'-AGGTGAAGGTCCGAGTCAAC-3',下游5'-AGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'。

1.2.6 ADSCs的体内成骨

ADSCs/ β -TCP支架复合体的构建:ADSCs分别通过成骨培养液和含有25 μ mol/L TM-25659的成骨培养液诱导分化7 d后,消化获得 1×10^6 个/mL的细胞悬浮液,随后接种在多孔结构 β -TCP块[直径3 mm,厚度2 mm,孔径(500 \pm 150) μ m]上。将ADSCs/ β -TCP复合体置于细胞培养箱中4 h以利于细胞附着,然后将复合体移植于裸鼠背部皮下。

手术操作在SPF级动物手术室中进行,取裸鼠12只,3.5%的水合氯醛麻醉后,消毒背部皮肤,于背部中线两侧各做1个4 mm切口,分离出2个皮下植入腔,每个腔内植入1颗支架材料。实验分组如下:①单纯成骨诱导ADSCs+ β -TCP支架(对照组);②TM-25659+成骨诱导ADSCs+ β -TCP支架(实验

组)。6周后处死动物,收获标本用于进一步分析。

1.2.7 苏木精-伊红(HE)染色法和Masson三色染色

所得标本用4%多聚甲醛固定,随后在10%乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA; pH7.4)中脱钙4周,脱水并石蜡包埋切片,用HE染色以及Masson三色染色检测成骨效果。

1.2.8 免疫组织化学染色(immunohistochemical staining, IHC)

对所得标本进行4%多聚甲醛固定,随后在10%乙二胺四乙酸(EDTA, pH7.4)中脱钙4周,常规脱水并石蜡包埋、切片(4 μ m)后,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,经3% H₂O₂封闭10 min灭活内源性过氧化物酶后,应用0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液行抗原修复(pH=6.0, 15 min),经5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭20 min后滴加一抗OCN(1:100)4℃过夜。次日滴加山羊抗兔/鼠二抗、室温孵育20 min, PBS洗涤后用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色。苏木素复染后,常规脱水透明,封片镜检。

1.3 统计学方法

实验中所有定量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组比较时先采用单因素方差分析进行比较,再采用Student-Newman-Keuls(SNK)法进行两两比较;而针对重复测量资料的方差分析用一般线性模型的Repeated Measures过程实现,并用Bonferroni法进行不同时间点的两两比较。采用SPSS 19.0软件进行数据的统计学分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs体外诱导成骨分化过程中TAZ蛋白表达明显增高,而在成脂诱导过程中TAZ蛋白表达显著降低

为了揭示TAZ在ADSCs成骨分化过程中的生物学作用,我们首先分离并培养获得人ADSCs,该细胞表现出典型的梭形纤维细胞样(图1A)。在骨诱导条件下培养ADSCs,茜素红染色显示随着诱导时间的推移可以观察到矿化增加(图1B);而在成脂诱导过程中油红O染色也验证了该细胞具有良好的脂肪形成能力(图1C)。qRT-PCR结果表明在ADSCs成骨诱导过程中TAZ和骨形成标志物Runx2、OPN、OCN和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)mRNA的表达水平显著增加(图1D)。Western blot结果显示,Runx2与TAZ蛋白表达均随

成骨诱导时间延长而显著增加(图1E)。qRT-PCR检测也证实ADSCs成脂诱导过程中PPAR γ mRNA表达水平显著上调,而TAZ mRNA表达明显下调(图1F)。上述结果提示TAZ与人ADSCs的成骨和成脂分化过程密切相关。

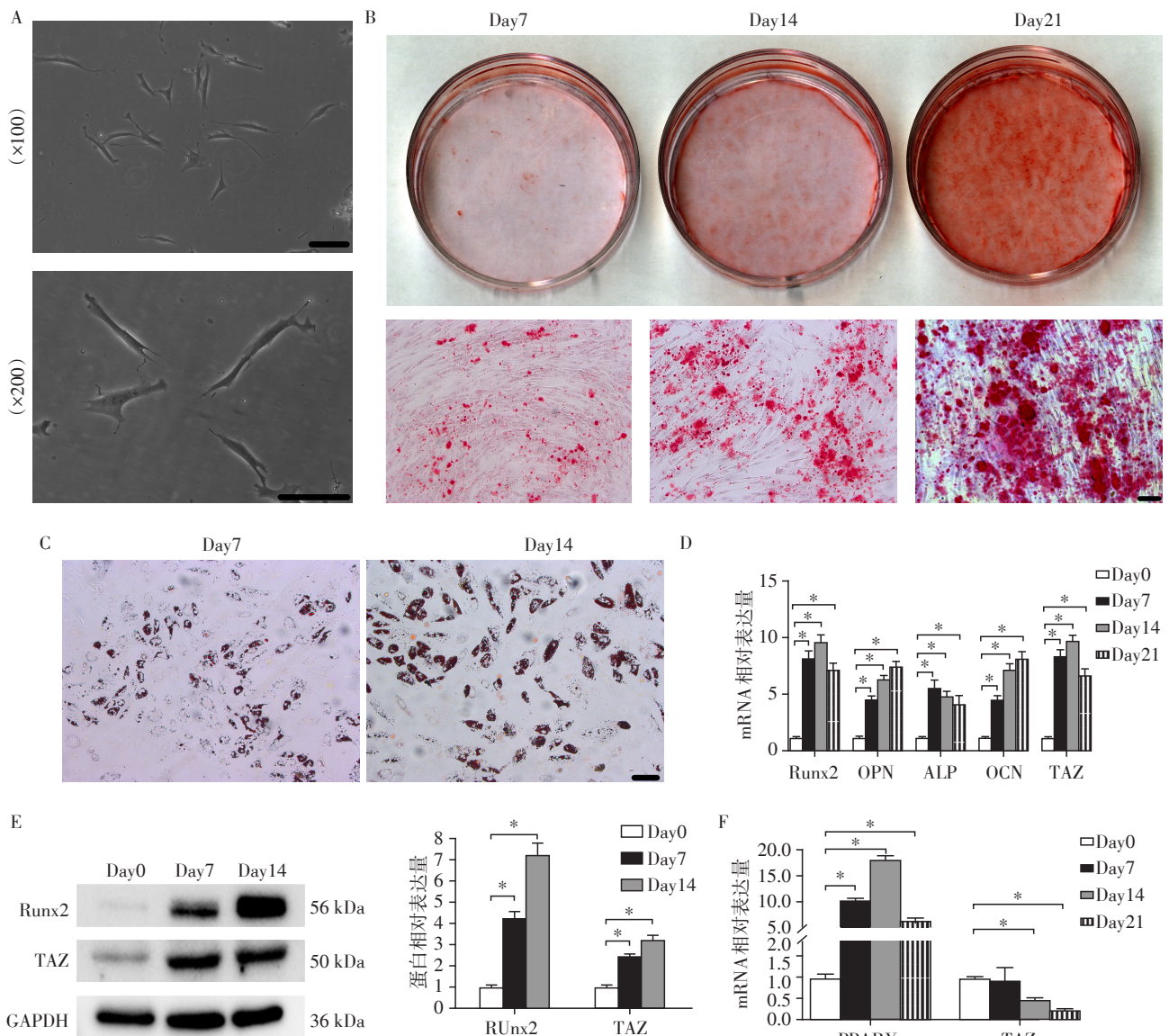
2.2 TM-25659促进ADSCs的体外成骨分化

既已证明人ADSCs在体外诱导成骨分化过程中TAZ蛋白表达明显增高,进一步考虑药物激活TAZ是否能促进ADSCs的成骨分化,我们研究发现ADSCs经TM-25659处理后TAZ蛋白表达随药物浓度升高而增加,并在5、10、25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下趋于稳

定高表达(图2A、B)。Western blot结果证实, TM-25659能显著增强ADSCs体外成骨诱导分化过程中TAZ及骨形成相关蛋白(Runx2、OPN和OCN)的表达(图2C),茜素红染色结果也证实TM-25659能增强ADSCs体外成骨矿化的能力(图2D)。

2.3 TM-25659促进ADSCs的体内骨形成

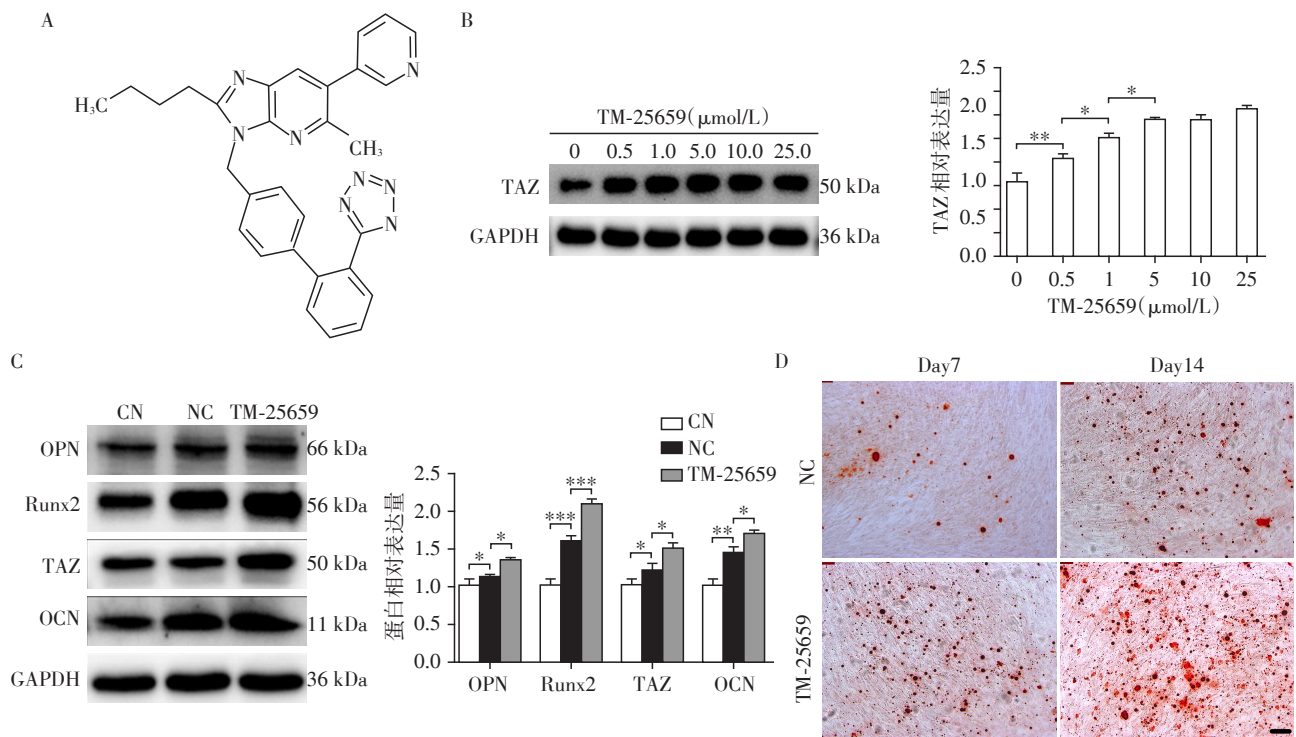
为进一步证实TM-25659促进ADSCs的体内外成骨的效果,我们选用 β -TCP支架负载经TM-25659短暂处理的ADSCs植入裸鼠体内观察成骨效果(图3A)。与单纯成骨诱导培养7 d后进行裸鼠体内移植的ADSCs- β -TCP复合物相对比,加入25 $\mu\text{mol/L}$



A: 原代人ADSCs分离及培养(P0); B: ADSCs成骨诱导第7、14、21天茜素红染色结果($\times 100$); C: ADSCs成脂诱导第7天和第14天油红O染色结果($\times 100$); D、E: ADSCs成骨诱导促进TAZ和成骨标志物表达(qRT-PCR、Western blot); F: ADSCs成脂诱导促进PPAR γ 表达。两组比较, $^*P < 0.001(n=3)$ 。

图1 TAZ在人ADSCs成骨、成脂分化过程中的表达

Figure 1 TAZ is upregulated during osteogenesis while it is downregulated during adipogenesis in human ADSCs



A: TM-25659 分子结构式; B: TM-25659 浓度梯度下 24 h 后 ADSCs TAZ 蛋白表达变化; C: ADSCs 成骨诱导下加入 TM-25659 (25 μmol/L) 7 d 后骨相关指标及 TAZ 蛋白表达变化 (CN: 空白对照组, NC: 单纯成骨诱导组, TM-25659: 成骨诱导+TM-25659 组); D: ADSCs 成骨诱导下加入 TM-25659 (25 μmol/L) 诱导 7、14 d, 茜素红染色 (×100)。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 TM-25659 促进 ADSCs 体外成骨分化

Figure 2 TM-25659 promotes osteogenic differentiation of ADSCs *in vitro*

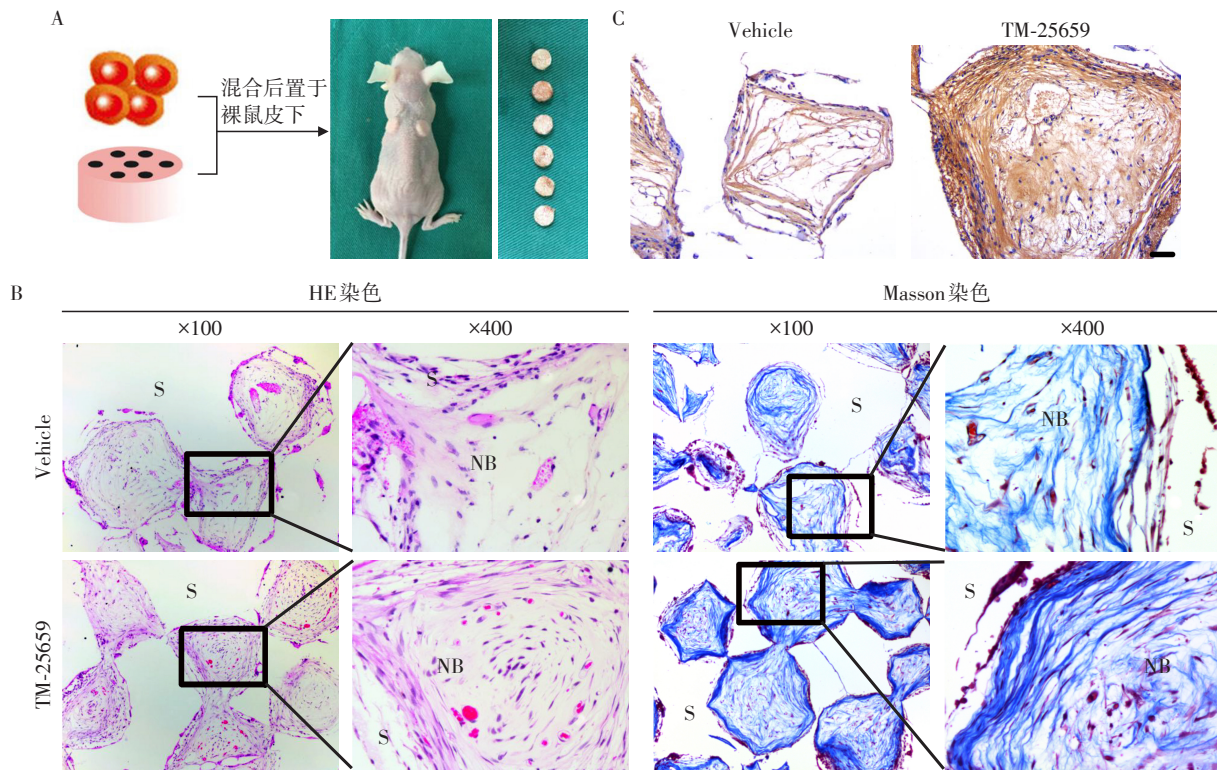
TM-25659 的处理组 HE 染色和 Masson 染色结果均表现出更明显的新骨形成 (图 3B), OCN 免疫组织化学染色结果也证实了 TM-25659 诱导组 ADSCs 材料复合物体内成骨过程中, 骨形成相关蛋白 OCN 表达量显著高于单纯成骨诱导组 (图 3C)。上述结果提示 TM-25659 具有促进 ADSCs 体内成骨分化和骨形成的作用。

3 讨论

Hippo 信号通路最早发现于果蝇, 在动物中高度保守, 对组织再生及干细胞分化调节具有重要作用 [7-8, 13]。研究证实, TAZ 作为转录共激活因子激活 Runx2 的同时会抑制 PPAR γ 依赖的转录, 是间充质干细胞向成骨分化以及促进体内骨形成的关键效应分子 [8, 14]。例如, Wnt3a 或表儿茶素没食子酸酯通过蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1) 介导的 TAZ 去磷酸化从而发生核转位, 以增强 C3H10T1/2 细胞和骨髓间充质干细胞的成骨分化 [15-17]。本研究揭示, TAZ 是人 ADSCs 成骨分化过程中的关键效应分子, 如成骨分化期间表达增加, 并且抑制了 ADSCs 的脂肪分化, 如诱导脂肪形成分化过程中 TAZ 表达

显著降低。TAZ 对不同来源的 MSCs 成骨分化起到明显的促进作用, 为骨缺损修复和再生的临床转化奠定了前期基础。研究证实多种化学或生物活性化合物, 如 TM-25659、表儿茶素没食子酸酯、佛波酯 A、IbS900838、山奈酚和依沙吡啶可作为 TAZ 激活剂, 在不同的细胞类型中产生 TAZ 所介导的相应生物学效应 [11, 16, 18-21]。因此, 对 TAZ 进行药物干预可能成为控制 MSCs 命运的一种有前途的方法。

TM-25659 是在 3T3-L1 脂肪祖细胞中筛选 TAZ 定位强化因子时发现的, 在 C3H10T1/2 和 3T3-L1 细胞中抑制脂肪细胞的分化, 通过增强 TAZ 核向转位并促进其向成骨细胞分化 [11]。当用 TM-25659 处理饲喂高脂膳食的小鼠后, 小鼠表现出脂肪增长下降及骨损失减少。另外, 给骨质损失模型鼠口服 TM-25659, 骨密度得到部分增加, 成骨作用增强 [22]。为了进一步发掘 TM-25659 的促成骨作用潜力, 我们利用人 ADSCs 作为细胞模型来测试 TM-25659 是否影响其成骨分化并促进骨再生。结果证实加入 TM-25659 的细胞矿化和成骨标志物表达明显增加, 且 TAZ 的表达水平也显著升高, 证明 TM-25659 在体外可有效促进 ADSCs 的成骨分化。因此, 本研究与先



A: 基于ADSCs的生物陶瓷材料裸鼠体内移植实验示意图; B: ADSCs经成骨诱导和加入TM-25659预处理的成骨诱导7 d后植入体内6周的标准HE染色和Masson染色结果(S: 支架; NB: 新骨); C: 骨钙素(OCN)免疫组织化学染色($\times 100$)。

图3 TM-25659促进ADSCs体内骨形成

Figure 3 TM-25659 promotes bone formation of ADSCs *in vivo*

前的研究均表明, TM-25659是TAZ的化学激活剂, 可通过增加其表达水平来调控TAZ介导的生物学功能, 而与特定细胞类型无关^[18]。荷载ADSCs的多孔结构 β -TCP复合材料被皮下移植时, TM-25659预处理能显著促进新骨形成。当然, 不能完全排除TAZ以外的其他不明中介分子也可能是与TM-25659增强间充质干细胞成骨分化的分子机制相关的因素^[23]。TM-25659体内递送的最佳方式和剂量有待于进一步研究与优化。

综上所述, 本研究发现TAZ促进ADSCs成骨分化, 抑制成脂分化; 并且进一步揭示TM-25659化学激活TAZ可促进其转录, 有效地促进ADSCs的体内/外成骨分化和骨再生。我们推测通过靶向TAZ的药物干预可能成为促进骨再生修复、减少骨丧失的潜在策略之一。

[参考文献]

[1] Tang D, Tare RS, Yang LY, et al. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2016, 83:363-382
[2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from

human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2):211-228
[3] 陈犹白, 陈聪慧, Qixu Z, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2016, 11(2):126-134
[4] Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6):783-803
[5] Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of hippo pathway regulation[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1):1-17
[6] 朱亚宁, 吴健, 孙苏安, 等. 食管癌中TAZ蛋白的表达及其临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(4):497-499, 504
[7] Byun MR, Jeong H, Bae SJ, et al. TAZ is required for the osteogenic and anti-adipogenic activities of kaempferol[J]. *Bone*, 2012, 50(1):364-372
[8] Hong JH, Hwang ES, McManus MT, et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Science*, 2005, 309(5737):1074-1078
[9] Cui CB, Cooper LF, Yang X, et al. Transcriptional coactivation of bone-specific transcription factor Cbfa1 by TAZ[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(3):1004-1013
[10] 刘浩, 陆征峰, 杨凯, 等. 脂肪间充质干细胞中Nog-

- gin下调能够促进GDF5的表达[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(9):1181-1186,1225
- [11] Jang EJ, Jeong H, Kang JO, et al. TM-25659 enhances osteogenic differentiation and suppresses adipogenic differentiation by modulating the transcriptional co-activator TAZ[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(5):1584-1594
- [12] Choi SH, Lee KR, Woo JC, et al. Determination of a novel TAZ modulator, 2-butyl-5-methyl-6-(pyridine-3-yl)-3-[2'-(1H-tetrazole-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-3H imidazo[4,5-b]pyridine (TM-25659) in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 63:47-52
- [13] Ramos A, Camargo FD. The Hippo signaling pathway and stem cell biology[J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(7):339-346
- [14] Yang JY, Cho SW, An JH, et al. Osteoblast-targeted overexpression of TAZ increases bone mass in vivo[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56585
- [15] Byun MR, Hwang JH, Kim AR, et al. Canonical Wnt signaling activates TAZ through PP1A during osteogenic differentiation[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(6):854-863
- [16] Byun MR, Sung MK, Kim AR, et al. (-)-Epicatechingallate (ECG) stimulates osteoblast differentiation via Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)-mediated transcriptional activation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(14):9926-9935
- [17] Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, et al. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling[J]. *Cell*, 2012, 151(7):1443-1456
- [18] Byun MR, Kim AR, Hwang JH, et al. Phorbaketal A stimulates osteoblast differentiation through TAZ mediated Runx2 activation[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(8):1086-1092
- [19] Kawano S, Maruyama J, Nagashima S, et al. A cell-based screening for TAZ activators identifies ethacridine, a widely used antiseptic and abortifacient, as a compound that promotes dephosphorylation of TAZ and inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 cells[J]. *J Biochem*, 2015, 158(5):413-423
- [20] Yang Z, Nakagawa K, Sarkar A, et al. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in a muscle injury model[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(9):1607-1621
- [21] Hong D, Chen HX, Xue Y, et al. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 116(1-2):86-92
- [22] 门通,朴善花,滕春波. Hippo信号通路转录效应因子TAZ/YAP对间充质干细胞分化的调控[J]. *遗传*, 2013, (11):1283-1290
- [23] Jung JG, Yi SA, Choi SE, et al. TM-25659-induced activation of FGF21 level decreases insulin resistance and inflammation in skeletal muscle via GCN2 pathways[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(12):1037-1043
- [收稿日期] 2018-11-29

(上接第959页)

- [J]. *Nature*, 1996, 383(6602):710-713
- [16] Sajan MP, Ivey RA, Lee MC, et al. Hepatic insulin resistance in ob/ob mice involves increases in ceramide, aPKC activity, and selective impairment of Akt-dependent FoxO1 phosphorylation[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(1):70-80
- [17] Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology[J]. *J Neurochem*, 2005, 93(1):105-117
- [18] Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , Tau, and α -synuclein[J]. *Science*, 2015, 349(6248):1255-555
- [19] Wood H. Alzheimer disease: Is p-Tau the missing link between insulin resistance and AD? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(12):706
- [20] Zhang Y, Huang NQ, Yan F, et al. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 β as a potential link[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 339:57-65
- [收稿日期] 2018-09-18