

研究论文

雌激素受体 α 36参与淫羊藿素对MG63细胞的促增殖和抗凋亡作用刘伟¹, 罗自强², 任璐¹, 孙玫¹, 姚菊琴¹, 王井霞¹, 王尊¹, 唐四元^{1,*}¹中南大学湘雅护理学院, 长沙 410000; ²中南大学基础医学院, 长沙 410000

摘要: 淫羊藿素能够显著改善绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP), 其作用机制尚未阐明。本研究旨在探讨雌激素受体 α 36 (estrogen receptor α 36, ER α 36)在淫羊藿素对成骨细胞促增殖和抗凋亡中的作用及其下游信号转导机制。通过转染shRNA载体构建ER α 36敲减的人成骨肉瘤MG63细胞模型, 用CCK-8检测细胞增殖情况, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 用Western blot检测细胞内ERK和AKT信号通路的激活情况。结果显示, ER α 36敲减后, 淫羊藿素对MG63细胞的促增殖和抗凋亡作用显著减弱; 淫羊藿素可上调MG63细胞内ERK及AKT磷酸化水平, 该作用可被ER α 36敲减取消; U0126 (ERK信号通路阻断剂)和LY294002 (AKT信号通路阻断剂)分别预处理后, 淫羊藿素对MG63细胞的促增殖作用均显著减弱; U0126预处理后, 淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用显著减弱; 而给予LY294002预处理后, 淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用无明显变化。以上结果提示, 淫羊藿素通过ER α 36及其下游的ERK及AKT信号通路发挥了对成骨细胞的促增殖和抗凋亡作用。

关键词: 骨质疏松; 雌激素受体 α 36; 淫羊藿素; 成骨细胞**中图分类号:** R589ER α 36 is involved in the proliferation promotion and anti-apoptosis effects of icaritin on MG63 cellsLIU Wei¹, LUO Zi-Qiang², REN Lu¹, SUN Mei¹, YAO Ju-Qin¹, WANG Jing-Xia¹, WANG Zun¹, TANG Si-Yuan^{1,*}¹Xiangya Nursing School, Central South University, Changsha 410000, China; ²School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410000, China

Abstract: The mechanism for icaritin to improve postmenopausal osteoporosis (PMOP) has not been clarified. The aim of this study was to investigate the role of estrogen receptor α 36 (ER α 36) in the proliferation promotion and anti-apoptosis effects of icaritin on osteoblasts and the underlying mechanism of downstream signal transduction. The ER α 36 knockdown human osteosarcoma MG63 cell model was constructed by transfection of shRNA vector. Cell proliferation was detected by CCK-8, the apoptosis was detected by flow cytometry, and the activation of ERK and AKT signaling pathways was detected by Western blot. The results showed that the effects of icaritin on the proliferation and apoptosis of MG63 cells were significantly decreased after ER α 36 knockdown, and icaritin could up-regulate the levels of ERK and AKT phosphorylation in MG63 cells, which could be reduced by ER α 36 knockdown. The effect of icaritin on the proliferation of MG63 cells was significantly decreased by pretreating the cells with U0126 (an ERK signaling pathway blocker) and LY294002 (an AKT signaling pathway blocker), respectively. Furthermore, anti-apoptotic effect of icaritin on MG63 cells was significantly decreased after the cells were pretreated with U0126, but not with LY294002. These results suggest that icaritin exerts proliferation promotion and anti-apoptosis effects on osteoblasts through ER α 36 and its downstream ERK and AKT signaling pathways.

Key words: osteoporosis; estrogen receptor α 36; icaritin; osteoblast

Received 2018-05-12 Accepted 2018-08-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81370974, 81500056), the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (No. 2016JJ182), the Open-End Fund for the Valuable and Precision Instrument of Central South University (No. CSUZYC201735, CSUZYC201740) and the Fund for the Key Laboratory of Hunan Province, China (No. 2017TP1004).

*Corresponding author. Tel: +86-731-82650263; E-mail: sytang263@outlook.com

骨质疏松症是全身性的骨量减少,伴有骨微结构改变以致骨脆性增加,容易发生骨折的疾病。其病理特点是骨矿含量和基质成分等比例的减少,骨皮质变薄,骨小梁减少、变细^[1]。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是最常见的一种原发性骨质疏松症,其后果与其他类型的骨质疏松症相同,即骨痛、骨折以及由骨折引起的合并症,是老年妇女病残率与病死率增加的重要原因之一^[2,3]。

淫羊藿是治疗骨质疏松的中医方剂中使用频率最高的中草药之一,大量动物实验与人体临床实验表明,淫羊藿能够显著改善雌激素缺乏导致的骨质疏松^[4,5]。对淫羊藿的有效成分和抗骨质疏松作用机制的研究是近年来骨质疏松研究领域的一个热点。淫羊藿素是淫羊藿苷(淫羊藿中最主要的活性成分)的体内代谢产物^[6]。研究表明,淫羊藿素同样具有较强的抗骨质疏松活性,能够促进成骨细胞的增殖和分化,同时能够抑制破骨细胞的分化,然而其作用机制还远未阐明^[7,8]。

雌激素受体 α 36(estrogen receptor α 36, ER α 36)是ER α 66的变异剪接体,缺乏ER α 66的转录功能区(AF-1, AF-2),保留了DNA结合区、二聚化功能区和部分配体结合区,且其C末端27个氨基酸残基为ER α 36所特有,取代了ER α 66的C末端的178个氨基酸残基^[9]。不同于ER α 66介导雌激素的核转录效应,ER α 36表达于细胞膜和细胞质,介导非经典的雌激素膜受体信号途径,雌激素能够通过ER α 36快速激活下游的ERK和AKT信号通路^[10,11]。近期有研究表明,ER α 36在绝经后妇女骨组织中的表达水平与骨密度呈正相关,并且ER α 36介导了绝经后妇女体内低浓度雌激素的骨保护作用^[12]。

以往研究表明,骨质疏松主要由破骨细胞的活性增强,骨吸收增多所致,随着生物科学技术的不断进步,人们发现成骨细胞在骨质疏松的发生、发展过程中同样发挥着重要作用,骨质疏松时成骨细胞的增殖活性及分泌基质的功能均出现明显下降^[13]。长期以来,骨质疏松的治疗药物主要针对于干扰破骨细胞分化,抑制骨质的吸收,而以成骨细胞为靶点的抗骨质疏松药物则极少^[14]。淫羊藿素虽然被证实能够显著促进成骨细胞增殖及分化,然而其对成骨细胞凋亡的影响却未见报道,且淫羊藿素骨保护作用的机制更是远未阐明。本研究以成骨细胞为研究对象,观察ER α 36在淫羊藿素对人成骨肉

瘤细胞株MG63细胞促增殖和抗凋亡中的作用,并深入研究其下游信号转导机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 人成骨肉瘤MG63细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,淫羊藿素购自上海友思生物技术有限公司,无酚红DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和胰蛋白酶购自Gibco公司,青链霉素购自北京索莱宝科技有限公司,蛋白Marker和PVDF膜购自Bio-Rad公司,蛋白酶抑制剂Cocktail购自Roche公司,BCA蛋白检测试剂盒和CCK-8检测试剂盒购自碧云天生物有限公司,ERK信号通路阻断剂U0126和AKT信号通路阻断剂LY294002购自Sigma公司,Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购自BD公司,Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,pRNAT-U6.1/Neo载体为Genscript产品,由中南大学肿瘤研究所惠赠;兔抗人p-ERK一抗、兔抗人ERK一抗、兔抗人p-AKT一抗、兔抗人AKT一抗和兔抗人 β -actin一抗均购自CST公司;小鼠抗人ER α 36一抗购自北京坤奥基医药科技有限公司,HRP标记羊抗兔二抗和HRP标记羊抗小鼠二抗购自北京博奥森生物技术有限公司,ECL发光液购自Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养 MG63细胞采用无酚红完全DMEM培养基(含10% FBS),放置于含5% CO₂、37 °C细胞培养箱中培养,倒置显微镜下观察细胞的生长情况,当MG63细胞生长至80%汇合或即将汇合时进行细胞传代。

1.3 细胞转染 按照Lipofectamine 2000试剂盒说明书的操作步骤向MG63细胞内加入ER α 36特异性shRNA载体pRNAT-U6.1/Neo-shRNA-ER α 36和空白对照载体pRNAT-U6.1/Neo-shRNA-control,shRNA-ER α 36的序列为5'-GATGCCAATAGGTACT-GAATTGATATCCGTTTCAGTACCTATTGGCAT-3'^[15]。转染48 h后,用Western blot检测靶基因的敲减效率。收集成功敲减ER α 36表达的MG63细胞,进行后续实验。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖 取MG63细胞制备成细胞密度为 1×10^4 /mL的细胞悬液,接种到24孔板中,每孔1 mL。根据不同的实验目的,向24孔板中的MG63细胞加入不同的药物,包括淫羊藿素(1×10^{-8} ~ 1×10^{-6} mol/L),U0126(1×10^{-5} mol/L),LY294002(2×10^{-5} mol/L)。淫羊藿素、U0126、LY294002

分别用 DMSO 溶解后, 加入到培养基中稀释为相应的工作浓度, 溶剂对照组加入终浓度为 0.1% 的 DMSO。继续培养 48 h 后, 加入 100 μ L 的 CCK-8 溶液, 按照 CCK-8 检测试剂盒说明书的步骤进行操作, 酶标仪读取波长 450 nm 下的 OD 值。每组设 3 个复孔, 实验重复 4 次。

1.5 细胞凋亡的检测 取 MG63 细胞制备成密度为 2.5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL。药物处理组根据不同的实验目的, 给予血清剥夺的 MG63 细胞不同的药物处理 48 h, 包括淫羊藿素 (1×10^{-8} mol/L)、U0126 (1×10^{-5} mol/L) 和 LY294002 (2×10^{-5} mol/L)。处理结束后, 收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒说明书的步骤, 制备密度为 1×10^6 /mL 的细胞悬液 100 μ L, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L PI, 混匀, 避光反应 15 min, 加入 400 μ L binding buffer, 1 h 内上流式细胞仪检测。每组设 2 个复孔, 实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 取 MG63 细胞制备成密度为 2.5×10^5 /mL 的细胞悬液, 接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL。向 6 孔板中加入淫羊藿素 (1×10^{-8} mol/L), 分别处理 MG63 细胞 5、10、20、30 min, Western blot 分别检测 p-ERK、ERK、p-AKT 和 AKT 蛋白表达水平。具体步骤: 向细胞中加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 冰上孵育 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 g 离心 30 min, 取上清液进行 BCA 蛋白浓度测定, 用裂解液将各样本蛋白的浓度调成一致。4 \times 上样缓冲液稀释蛋白后 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 上样等量

蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 80 V 电泳至 Marker 条带分开, 转为 120 V 继续电泳至结束, 随后进行蛋白转印, 300 mA 恒流转膜, 按每 1 kDa 转膜 1 min, 蛋白转印至 PVDF 膜后, 采用 5% BSA 或 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBS 洗膜 2 次, 每次 5 min。一抗 (稀释比例为 1:1 000~1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗 (稀释比例为 1:3 000~1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后 TBS 洗膜 1 次, 10 min。加入 ECL 发光液进行曝光, Quantity One 软件分析目的蛋白的相对灰度值。每组设 2 个复孔, 实验重复 3 次。

1.7 统计学分析 数据用 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。多组样本均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 各组样本均数间多重比较采用 LSD 法。P < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ER α 36 敲减降低了淫羊藿素对 MG63 细胞的促增殖作用

为了观察 ER α 36 在淫羊藿素促成骨细胞增殖中的作用, 我们首先验证了 MG63 细胞中 ER α 36 的敲减效果, Western blot 结果显示靶基因载体转染组 ER α 36 的表达较空白载体转染组显著降低, 表明 MG63 细胞的 ER α 36 敲减模型构建成功 (图 1A)。随后, 我们分别给予 ER α 36 表达正常和表达减少的 MG63 细胞不同浓度的淫羊藿素处理, 研究表明,

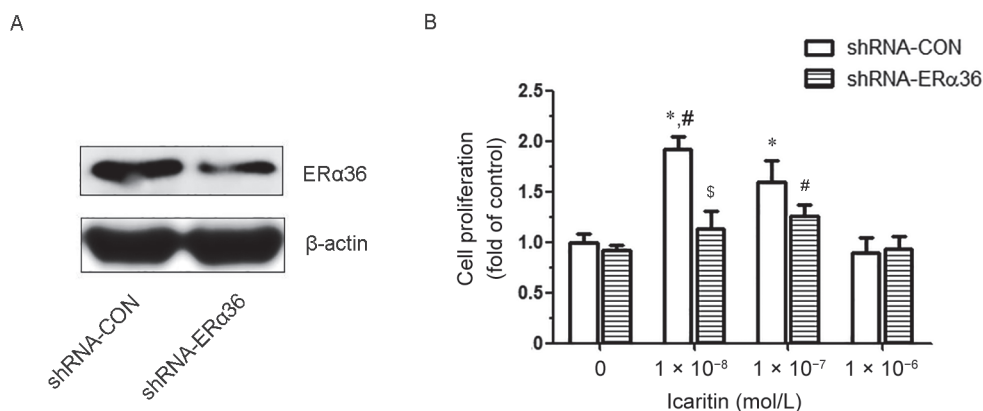


图 1. ER α 36 的敲减削弱淫羊藿素对 MG63 细胞的促增殖作用

Fig. 1. Knockdown of ER α 36 reduced the proliferation promotion effect of icaritin on MG63 cells. A: The ER α 36 expression in MG63 cells after transfection with the shRNA-CON or the shRNA-ER α 36 measured by Western blot. B: Cell proliferation of the MG63 cells treated with different concentrations of icaritin detected by CCK-8 assay. Mean \pm SD, $n = 4$. * $P < 0.05$ vs control (0 mol/L icaritin group with shRNA-CON transfection); [#] $P < 0.05$ vs icaritin (1×10^{-7} mol/L) group with shRNA-CON transfection; ^S $P < 0.05$ vs icaritin (1×10^{-8} mol/L) group with shRNA-CON transfection.

在ER α 36表达正常条件下,和对照(0 mol/L)组相比,低剂量淫羊藿素(1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L)能够明显促进MG63细胞的增殖,而 1×10^{-6} mol/L淫羊藿素对MG63细胞的增殖无明显影响;ER α 36敲减后,淫羊藿素(1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L)对MG63细胞的促增殖作用显著减弱,说明ER α 36参与了低剂量的淫羊藿素对MG63细胞的促增殖作用(图1B)。鉴于 1×10^{-8} mol/L淫羊藿素对MG63细胞的促增殖作用最为显著,我们在后续实验中采用的淫羊藿素剂量为 1×10^{-8} mol/L。

2.2 ER α 36敲减降低了淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用

我们采用血清剥夺的方式来诱导MG63细胞的凋亡,研究ER α 36在淫羊藿素对MG63细胞抗凋亡中的作用。结果显示,血清剥夺能够明显增加ER α 36表达正常和ER α 36表达减少的MG63细胞的凋亡,而在加入 1×10^{-8} mol/L的淫羊藿素进行干预后,ER α 36表达正常的MG63细胞的凋亡情况明显减轻,而ER α 36表达减少的MG63细胞的凋亡情况较不加淫羊藿素组无明显变化,提示ER α 36

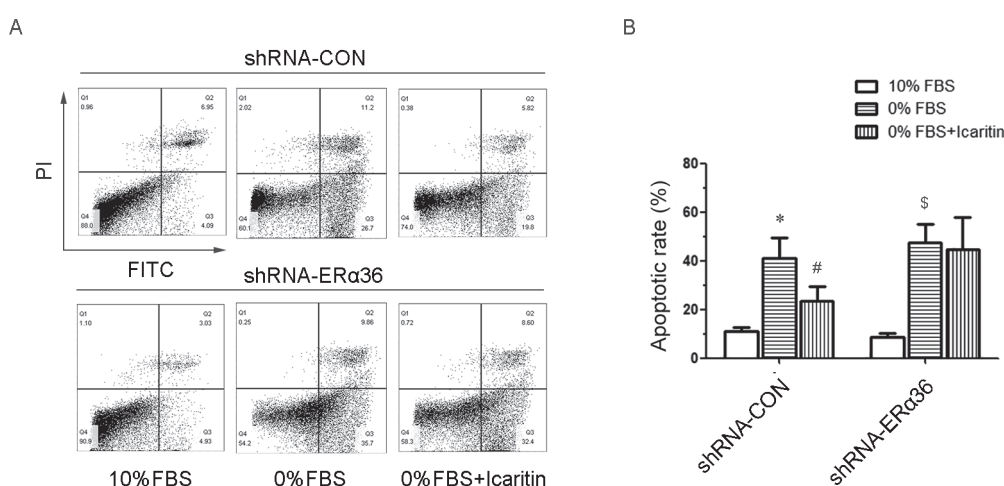


图 2. ER α 36敲减削弱淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用

Fig. 2 Knockdown of ER α 36 reduced the anti-apoptosis effect of icaritin on MG63 cells. Serum-deprived MG63 cells were treated with DMSO or icaritin (1×10^{-8} mol/L) for 48 h, and non-serum-deprived MG63 cells were used as control. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM) after Annexin V-FITC and PI double staining. A: Representative FCM images of apoptotic MG63 cells. B: Data analysis result. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs 10% FBS-treated MG63 cells group with shRNA-CON transfection; # $P < 0.05$ vs serum-deprived MG63 cells group with shRNA-CON transfection; $^{\$}P < 0.05$ vs 10% FBS-treated MG63 cells group with shRNA-ER α 36 transfection.

参与了淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用(图2)。

2.3 淫羊藿素通过ER α 36激活了MG63细胞内的ERK和AKT信号通路

为了研究淫羊藿素对成骨细胞促增殖和抗凋亡作用的细胞内信号转导机制,我们检测了淫羊藿素干预5、10、20和30 min后,MG63细胞内ERK和AKT蛋白的磷酸化水平的变化情况,结果显示,淫羊藿素干预ER α 36表达正常的MG63细胞后,ERK和AKT的磷酸化水平在短时间内迅速增加,而MG63细胞经敲减ER α 36的表达后,给予淫羊藿素处理并不能明显增加ERK和AKT的磷酸化水平,提示淫羊藿素可能通过ER α 36激活细胞内ERK

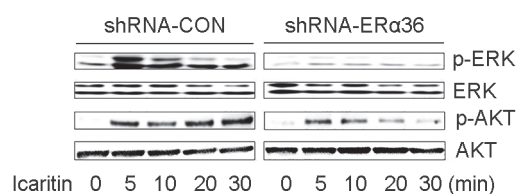


图 3. 淫羊藿素可能通过ER α 36激活了MG63细胞内的ERK和AKT信号通路

Fig. 3 Icaritin may activate the ERK and AKT signaling pathways in MG63 cells through ER α 36. MG63 cells were treated with icaritin (1×10^{-8} mol/L) for the indicated time, and the protein expressions of p-ERK, ERK, p-AKT and AKT were measured by Western blot. The results are representative of three independent experiments.

和 AKT 信号通路 (图 3)。

2.4 ERK和AKT信号通路参与了淫羊藿素对MG63细胞的促增殖作用

为了观察 ERK 和 AKT 信号通路在淫羊藿素对 MG63 细胞促增殖中的作用, 我们用 ERK 信号通路阻断剂 U0126 和 AKT 信号通路阻断剂 LY294002 分别预孵育 MG63 细胞 1 h, 再给予淫羊藿素处理。结果显示, 相较于单独给予淫羊藿素组, U0126 和 LY294002 分别预处理后, 淫羊藿素对 MG63 细胞的促增殖作用均显著减弱, 提示 ERK 和 AKT 信号通路都参与了淫羊藿素对 MG63 细胞的促增殖作用 (图 4)。

2.5 ERK信号通路参与了淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用

我们采用血清剥夺的方式诱导 MG63 细胞的凋亡, 观察 ERK 和 AKT 信号通路在淫羊藿素对 MG63 细胞抗凋亡中的作用。结果表明, 相较于单独给予淫羊藿素组, U0126 预处理后, 淫羊藿素对 MG63 细胞的抗凋亡作用显著减弱; 而给予 LY294002 预处理后, 淫羊藿素对 MG63 细胞的抗凋亡作用无明显变化。该结果提示 ERK 信号通路参与了淫羊藿素对 MG63 细胞的抗凋亡作用 (图 5)。

3 讨论

成骨细胞在维持骨稳态中发挥着重要作用, 其

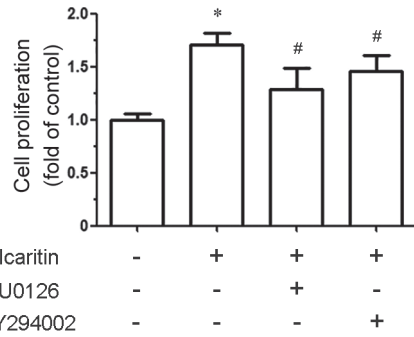


图 4. ERK和AKT信号通路参与了淫羊藿素对MG63细胞的促增殖作用

Fig. 4. ERK and AKT signaling pathways participate in proliferation promotion effect of icaritin on MG63 cells. The MG63 cells were pretreated with ERK inhibitor U0126 (1×10^{-5} mol/L) or AKT inhibitor LY294002 (2×10^{-5} mol/L) for 1 h, and then were treated with icaritin (1×10^{-8} mol/L) for 48 h. The cell proliferation was measured by CCK-8 assay. Mean \pm SD, $n = 4$. * $P < 0.05$ vs control (0 mol/L icaritin) group; # $P < 0.05$ vs icaritin (1×10^{-8} mol/L) group.

除了产生 I 型胶原和骨钙素 (osteocalcin, OC) 等直接促进骨的形成外, 还通过核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 和骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 调节破骨细胞的活性, 参与骨的重塑 [16]。研究表明, 骨质疏松时成骨细胞的增殖活性及分泌基质的功能均出现明显下降 [13]。淫羊藿素被证实能够显著促进成骨

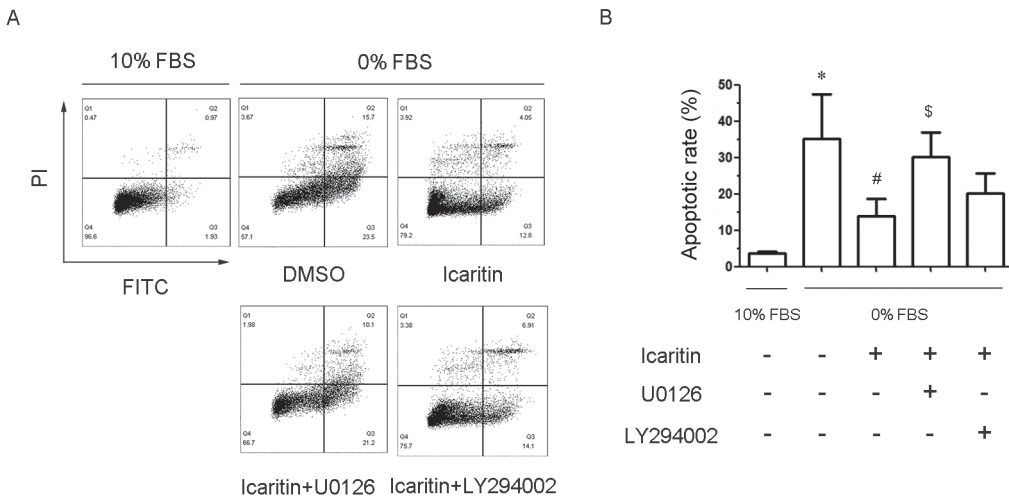


图 5. ERK信号通路参与了淫羊藿素对MG63细胞的抗凋亡作用

Fig. 5. ERK signaling pathway participates in anti-apoptosis effect of icaritin on MG63 cells. The MG63 cells were pretreated with ERK inhibitor U0126 (1×10^{-5} mol/L) or AKT inhibitor LY294002 (2×10^{-5} mol/L) for 1 h, and then were treated with icaritin (1×10^{-8} mol/L) for 48 h. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM). A: Representative FCM images of apoptotic MG63 cells. B: Data analysis result. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs 10% FBS-treated MG63 cells group; # $P < 0.05$ vs serum-deprived group; $^{\$}P < 0.05$ vs icaritin (1×10^{-8} mol/L) group with serum deprivation.

细胞增殖及分化, 然而其作用机制还远未阐明。本研究以成骨肉瘤细胞株 MG63 细胞作为研究对象, 探讨淫羊藿素对成骨细胞促增殖和抗凋亡作用的分子机制。研究结果显示, 低浓度的淫羊藿素能够促进 MG63 细胞的增殖, 并且能够抑制血清剥夺诱导的 MG63 细胞的凋亡。随后, 我们又进一步证实, 淫羊藿素对 MG63 细胞的促增殖和抗凋亡作用与 ER α 36 膜受体及其下游的 ERK 和 AKT 信号通路有关。

ERK 及 AKT 信号通路在淫羊藿素生物学活性的发挥中具有重要作用, 例如, 淫羊藿素能够通过 ERK 信号通路促进骨髓间质干细胞向成骨细胞分化, 通过 AKT 信号途径减轻香烟烟雾提取物诱导的肺上皮细胞氧化应激等^[17, 18]。然而, 淫羊藿素通过何种作用方式发挥生物效应, 长期以来并不清楚。我们在敲减 MG63 细胞的 ER α 36 后发现, 淫羊藿素激活细胞内 ERK 和 AKT 磷酸化水平的能力显著降低, 提示 ER α 36 可能介导淫羊藿素的细胞内信号转导效应。随后, 我们的进一步研究显示, ERK 信号通路参与了淫羊藿素的促增殖和抗凋亡作用, AKT 信号通路参与了淫羊藿素的促增殖作用, 值得一提的是, 在本研究中我们未观察到 AKT 信号通路参与淫羊藿素的抗凋亡作用, 其原因还有待深入研究。

低浓度的雌激素能够促进乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞的增殖, 而高浓度的雌激素则抑制该细胞的增殖, ER α 36 介导了雌激素对 MDA-MB-231 细胞增殖的双相调节作用^[19]。淫羊藿素对成骨细胞的增殖作用与其浓度也密切相关^[8]。本研究显示, ER α 36 参与了低浓度的淫羊藿素 ($< 1 \times 10^{-6}$ mol/L) 对 MG63 细胞的促增殖作用和抗凋亡作用, 而另有研究表明 ER α 36 在高浓度的淫羊藿素 ($> 5 \times 10^{-5}$ mol/L) 对 MDA-MB-231 细胞的抗增殖和促凋亡作用中也发挥了重要作用^[20]。淫羊藿素的这种双相调节作用深层分子机制还有待进一步研究。

近期有研究表明, 在绝经后妇女体内雌激素浓度极低的状态下, ER α 36 表达水平的高低直接影响了 PMOP 的发生、发展^[12]。本研究组研究显示, 低浓度的淫羊藿素能够显著上调 MG63 细胞 ER α 36 的表达 (数据未发表)。我们推测淫羊藿素上调成骨细胞 ER α 36 的表达也可能是其发挥抗 PMOP 的作用机制之一。

综上所述, 成骨细胞在骨质疏松的发生和发展

中具有重要作用, 而本研究以成骨细胞为研究对象, 深入探讨了淫羊藿素发挥骨保护作用的机制, 结果表明, 淫羊藿素通过 ER α 36 及其下游的 ERK 及 AKT 信号通路发挥了其对成骨细胞的促增殖和抗凋亡作用。

参考文献

- 1 Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017; 5(11): 898–907.
- 2 Black DM, Rosen CJ. Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2016; 374(3): 254–262.
- 3 Andreopoulou P, Bockman RS. Management of postmenopausal osteoporosis. *Annu Rev Med* 2015; 66: 329–342.
- 4 Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 2007; 22(7):1072–1079.
- 5 Xue L, Wang Y, Jiang Y, Han T, Nie Y, Zhao L, Zhang Q, Qin L. Comparative effects of er-xian decoction, *Epimedium* herbs, and icaritin with estrogen on bone and reproductive tissue in ovariectomized rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 241416.
- 6 Liu J, Lou YJ. Determination of icaritin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis: rat pharmacokinetic studies after administration of icaritin. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36(2): 365–370.
- 7 Peng S, Zhang G, Zhang BT, Guo B, He Y, Bakker AJ, Pan X, Zhen W, Hung L, Qin L, Leung WN. The beneficial effect of icaritin on osteoporotic bone is dependent on the treatment initiation timing in adult ovariectomized rats. *Bone* 2013; 55(1): 230–240.
- 8 Huang J, Yuan L, Wang X, Zhang TL, Wang K. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity *in vitro*. *Life Sci* 2007; 81(10): 832–840.
- 9 Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(4): 1023–1027.
- 10 Deng H, Zhang XT, Wang ML, Zheng HY, Liu LJ, Wang ZY. ER- α 36-mediated rapid estrogen signaling positively regulates ER-positive breast cancer stem/progenitor cells. *PLoS One* 2014; 9(2): e88034.
- 11 Tong JS, Zhang QH, Wang ZB, Li S, Yang CR, Fu XQ, Hou Y, Wang ZY, Sheng J, Sun QY. ER- α 36, a novel variant of

- ER- α , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKC δ /ERK pathway. *PLoS One* 2010; 5(11): e15408.
- 12 Xie H, Sun M, Liao XB, Yuan LQ, Sheng ZF, Meng JC, Wang D, Yu ZY, Zhang LY, Zhou HD, Luo XH, Li H, Wu XP, Wei QY, Tang SY, Wang ZY, Liao EY. Estrogen receptor α 36 mediates a bone-sparing effect of 17 β -estradiol in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2011; 26(1): 156–168.
- 13 Marie PJ. Osteoblast dysfunctions in bone diseases: from cellular and molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(7): 1347–1361.
- 14 Corrado A, Sanpaolo ER, Di Bello S, Cantatore FP. Osteoblast as a target of anti-osteoporotic treatment. *Postgrad Med* 2017; 129(8): 858–865.
- 15 Zhang X, Wang ZY. Estrogen receptor- α variant, ER- α 36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology* 2013; 154(6): 1990–1998.
- 16 Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2013; 99(3): 170–191.
- 17 Luo G, Xu B, Wang W, Wu Y, Li M. Study of the osteogenesis effect of icaricide II and icaritin on canine bone marrow mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Metab* 2017. doi: 10.1007/s00774-017-0889-5.
- 18 Wu J, Xu H, Wong PF, Xia S, Xu J, Dong J. Icaritin attenuates cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells via activation of PI3K-AKT and Nrf2 signaling. *Food Chem Toxicol* 2014; 64: 307–313.
- 19 Zhang XT, Ding L, Kang LG, Wang ZY. Involvement of ER- α 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells. *Oncol Rep* 2012; 27(6): 2057–2065.
- 20 Wang X, Zheng N, Dong J, Wang X, Liu L, Huang J. Estrogen receptor- α 36 is involved in icaritin induced growth inhibition of triple-negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 171: 318–327.