

文章编号:1003-2754(2019)04-0322-05

雷洛昔芬通过抑制神经细胞凋亡保护 脑缺血大鼠脑细胞的机制研究

管 萍, 刘文娟, 卢鹏超, 李志红

摘 要: **目的** 探讨雷洛昔芬通过抑制神经细胞凋亡保护脑缺血大鼠脑细胞的机制。**方法** 建立大鼠大脑中动脉栓塞模型,分离培养大鼠海马组织,通过神经元加钙实验测定雷洛昔芬对神经元的保护性,通过 Western-blot 测定凋亡相关蛋白表达量,利用 RT-PCR 测定血液 miRNA-21、miRNA-29 因子表达水平。**结果** 雷洛昔芬中、高剂量组荧光强度显著降低($P < 0.05$);与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中、高剂量组细胞增殖率显著增加,细胞 miRNA-21 和 miRNA-29 表达量显著降低($P < 0.001$);雷洛昔芬组细胞 caspase-3、Apaf-1 蛋白均显著低于空白组与假手术组($P < 0.001$);与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中、高剂量组细胞的 caspase-3、Apaf-1 蛋白显著增加($P < 0.001$)。**结论** 雷洛昔芬通过抑制神经细胞凋亡蛋白 caspase-3、Apaf-1 及 miRNA-21、miRNA-29 的表达保护脑缺血大鼠脑细胞。

关键词: 雷洛昔芬; 神经细胞; 凋亡蛋白; 脑缺血

中图分类号:R743.3 **文献标识码:**A

Mechanisms of raloxifene protecting brain cells from cerebral ischemia in rats by inhibiting neuronal apoptosis

GUAN Ping, LIU Wenjuan, LU Pengchao, et al. (Tianmen First People's Hospital Hubei, Tianmen 431700, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of raloxifene protecting cerebral cells of rats with cerebral ischemia by inhibiting neuronal apoptosis. **Methods** Rat middle cerebral artery embolism model was established, rat hippocampus tissue was isolated and cultured, the protective effect of raloxifene on neurons was determined by adding calcium to neurons, the expression of apoptosis-related eggs was determined by Western blot, and the expression levels of microRNA21 and microRNA29 in blood were determined by RT-PCR. **Result** The fluorescence intensity of raloxifen medium-dose group and high-dose group decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the low-dose group, the cell proliferation rate increased significantly, the expression of microRNA-21 and microRNA-29 decreased significantly in the middle-dose group and the high-dose group ($P < 0.01$). The results of apoptosis-related proteins showed that caspase-3 and Apaf-1 proteins in raloxifen group were significantly lower than those in blank group and sham-operated group ($P < 0.001$); compared with low-dose group, caspase-3 and Apaf-1 proteins were significantly higher in the middle-dose group and the high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Raloxifene can protect brain cells from cerebral ischemia by inhibiting the expression of caspase 3, Apaf-1, microRNA-21 and microRNA-29.

Key words: Raloxifene; Neurons; Apoptotic protein; Cerebral ischemia

脑血管病是一种常见的多发性疾病,死亡率和致残率较高,近年来我国死亡原因中排名第二^[1]。急性缺血性脑血管病占脑血管疾病的43%~65%,死亡率为15%~25%,严重危害人类健康^[2]。雷洛昔芬是一种选择性雌激素受体调节剂^[3]。它是苯基唾液酚的合成非甾体衍生物,具有一定的组织特异性^[4]。在生殖系统组织中,雷洛昔芬作为雌激素受体拮抗剂,可抑制乳腺和子宫肿瘤的生长,在生殖系统外的组织中起部分雌激素受体激动剂的作用,可以防止骨质流失和降低血清胆固醇水平^[5]。

1 材料和方法

1.1 一般资料 选取体重在(240±20)g的雄

性Wistar大鼠为研究。分为空白对照组、假手术组、雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组,每组10只大鼠。

1.2 实验方法

1.2.1 建立大鼠大脑中动脉栓塞模型 腹腔注射3.5%水合氯醛(0.35 g/kg),麻醉后分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉结扎。在颈总动脉近颈内外支切口处,通过切口将16 mm~17 mm长的

收稿日期:2019-02-15;修订日期:2019-03-29

作者单位:(天门市第一人民医院,湖北 天门 431700)

通讯作者:卢鹏超, E-mail: youxiangke1@163.com

尼龙绳插入颈总动脉内结扎。完全插入大脑中动脉。注射尼龙线后,动物的右眼睑下垂。动物在醒来后向左移动了一个圈,说明模型是成功的。假手术组颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉分离结扎^[6]。

1.2.2 分组及给药 将手术组随机分成3组即雷洛昔芬低剂量组(10 mg/kg bw)、雷洛昔芬中剂量组(50 mg/kg bw)、雷洛昔芬高剂量组(100 mg/kg bw),每天灌胃不同剂量的雷洛昔芬溶液,正常对照组及假手术组每天灌胃等剂量的生理盐水,自由进食,饲养30 d。

1.2.3 海马组织分离及培养 处死大鼠前,用酒精棉球擦拭全身,初步消毒。再次浸泡在75%的酒精中,1 min后取出,打破头部。将头皮和头骨切掉。打开大脑皮层,用眼钳取双侧海马,置于种植培养基培养皿中。显微镜下,用显微眼科钳切除脑膜,切除海马以外的脑组织。用DISGH溶液冲洗3次,用微眼剪(约1 mm)切断海马,加入0.125%胰蛋白酶溶液,在37℃培养箱中消化约20 min,加入与组织悬液等量的20%小牛血清培养基10 min,终止胰蛋白酶作用,添加10%胎牛血清和10%小牛血清的培养基,形成细胞悬浮液,细胞计数后,用DMEM溶液调节细胞密度至 5×10^6 ,将细胞接种到培养皿中,5% CO₂,95%空气,37℃恒温培养箱中培养,24 h后通过MTT实验测定其生长情况。

1.2.4 神经元加钙 取神经上皮组织,制成细胞悬液,用无镁BSS漂洗3次,加入含3 μmol Fluo-3/AM的无镁BSS 1 ml在CO₂培养箱中培养20 min。然后用Fluo-3/AM游离无镁BSS代替原液,在二氧化碳培养箱中培养20 min,确保AM组在Fluo-3/AM细胞质冷却酶的作用下完全去除。

1.2.5 神经元内钙含量测定 细胞内钙浓度与Fluo-3荧光强度成正比,因此细胞内Fluo-3荧光强度代表细胞内钙浓度。激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)可实时检测细胞内Fluo-3荧光强度的变化。荧光-3荧光激发波长为488 nm,发射波长为530 nm,激光激发强度调节到最小。在此条件下,Fluo-3本身的荧光猝灭在检测时间(900 s)内可以忽略不计。

1.2.6 神经元活性的测定 通过MTT实验对神经元细胞的活性进行测定。取部分上述分离得到的细胞,利用RPMI-1640完全培养基调细胞浓度至 1×10^7 个/ml,加到96孔板中,每孔100 μl,以等体积的完全培养基为调零孔,每组设6个复孔,37℃,5% CO₂培养箱中培养48 h,向各孔加20 μl MTT溶液(5 mg/ml),培养4 h,弃上清,向各孔中加入150 μl DMSO,水平振动仪中快速震荡10 min,在酶

标仪上测定570 nm处吸光度值。

1.2.7 神经元细胞凋亡测定 吸取5 μl Annexin V-FITC凋亡试剂于细胞中,混匀,室温下避光孵育15 min,加入 $1 \times$ binding buffer,重悬细胞,1200 rpm,离心5 min,弃上清,加200 μl $\times$ binding buffer,重悬细胞,进行流式细胞仪检测。流式软件Flowjo 7.5进行数据分析。

1.2.8 细胞中凋亡相关蛋白表达量的测定 采用Western blot方法对细胞凋亡相关蛋白即caspase-3蛋白、Bcl-2蛋白及Apaf-1蛋白的表达情况进行测定,通过Image J软件对条带的灰度值进行测定,利用灰度值分析各蛋白的表达量。

1.2.9 细胞凋亡RNA表达量的测定 取大鼠血清,利用RT-PCR方法检测血液中miRNA-21、miRNA-29因子的表达水平。利用总miRNA快速提取试剂盒提取总RNA,并使用miRNA特有的逆转录引物,将其与Super M-MLV逆转录酶进行反向转录,反转录体系:(1)5×PrimeScript Buffer 4 μl;(2)1×PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μl;(3)Oligo dT Primer (50 μmol) 1 μl (25 pmol);(4)Random 6 mers (100 μmol) 1 μl (50 pmol);(5)Total RNA 1 μl;RNase Free dH₂O 12 μl。RT-PCR在实时定量系统中上进行,扩增条件:(1)预变性:95℃时10 min;(2)变性:94℃时30 s、退火/延伸:60℃时1 min,两个步骤40个循环;(3)融解曲线分析:95℃时15 s、60℃时1 min、94℃时15 s和60℃时15 s。引物设计(见表1);反应体系(见表2)。

1.3 数据处理 图像数据由TCS-NT软件和Photoshop软件处理。利用TCS-NT生理学软件对Fluo-3荧光强度进行了定量分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于细胞内钙的测定,选择8~10个细胞的数据作为样本,在每次实验中进行平均化统计分析。统计学检验采用单因素方差分析。当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经元形态完整性分析 神经元形态完整,胞体和突起清晰,胞体呈椎体或多角形,突起明显。用大鼠特异性烯醇化酶(NSE)抗体鉴定培养细胞,表明神经元(NSE阳性细胞)纯度达95%(见图1)。

2.2 神经元钙含量的测定 以 3×10^4 mol/L谷氨酸培养海马神经元细胞1 min后,细胞内钙浓度迅速升高。大约95%的细胞有反应。用无镁BSS洗涤2.5 min后,雷洛昔芬组,再次给予谷氨酸,治疗前后谷氨酸诱导细胞内钙浓度升高。结果表明,

不同浓度的雷洛昔芬可显著降低谷氨酸诱导的细胞内钙的增加。空白组、假手术组、雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组各组细胞的荧光强度分别为 (230.2 ± 10.3) 、 (233.5 ± 11.3) 、 (342.3 ± 12.4) 、 (302.5 ± 14.5) 、 (312.3 ± 13.5) , 5 组比较差异有统计学意义 ($F = 160.033, P < 0.001$)。与空白对照组的荧光强度相比, 假手术组无显著变化 ($P > 0.05$), 雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组荧光强度均显著增加 ($P < 0.001$), 但与雷洛昔芬低剂量组相比, 雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组荧光强度均显著降低 ($P < 0.001$)。

2.3 神经元细胞活性及凋亡率测定 通过 MTT 实验对神经元细胞增殖能力进行测定, 利用流式细胞仪对其凋亡率进行测定, 实验结果表明, 空白组、假手术组、雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组各组细胞的增殖率分别为 (0.68 ± 0.02) 、 (0.66 ± 0.02) 、 (0.21 ± 0.01) 、 (0.59 ± 0.03) 、 (0.54 ± 0.04) , 5 组比较差异有统计学意义 ($F = 534.265, P < 0.001$)。假手术组细胞增殖率与空白组相比无显著性 ($P > 0.05$), 雷洛昔芬组细胞增殖率均显著低于空白组与假手术组 ($P < 0.001$), 但与雷洛昔芬低剂量组相比, 雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率均显著增加 ($P < 0.001$), 且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率无显著性差异 ($P > 0.05$)。细胞凋亡率结果表明, 空白组、假手术组、雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组各组细胞的凋亡率分别为 (1.1 ± 0.03) 、 (1.2 ± 0.02) 、 (10.38 ± 0.23) 、 (8.92 ± 0.12) 、 (9.01 ± 0.21) , 5 组比较差异有统计学意义 ($F = 9288.651, P < 0.001$)。假手术组细胞增殖率与空白组相比无显著性 ($P > 0.05$), 雷洛昔芬组细胞增殖率均显著低于空白组与假手术组 ($P < 0.001$), 但与雷洛昔芬低剂量组相比, 雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率均显著增加 ($P < 0.001$), 且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 细胞凋亡相关蛋白分析 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算细胞中凋亡相关蛋白 caspase-3、Apaf-1 的相对表达量, 5 组比较差异有统计学意义 ($F_1 = 38.328, F_2 = 1151.204, P < 0.001$), 结果 (见图 2、表 3)。细胞凋亡率凋亡相关蛋白表明, 假手术组细胞凋亡相关蛋白 caspase-3、Apaf-1 与空白组相比蛋白表达量有显著性 ($P > 0.05$), 雷洛昔芬组细胞 caspase-3、Apaf-1 蛋白均显著低于空白组与假手术组 ($P < 0.001$), 但与雷洛昔芬低剂量组相比, 雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞中 caspase-3、Apaf-1 蛋白均显著增加 ($P < 0.001$), 且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组 caspase-3、Apaf-1 蛋白表达量无显著性差异 ($P > 0.05$) (见图 2)。

2.5 miRNA 表达量的测定 通过 RT-PCR 实验对神经元细胞凋亡相关 miRNA 表达量进行测定, 实验结果表明, 空白组、假手术组、雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组各组细胞的 miRNA-21 表达量分别为 (0.14 ± 0.01) 、 (0.16 ± 0.01) 、 (0.32 ± 0.02) 、 (0.21 ± 0.01) 、 (0.22 ± 0.01) , 5 组比较差异有统计学意义 ($F = 306.250, P < 0.001$)。假手术组细胞 miRNA-21 表达量与空白组相比无显著性 ($P > 0.05$), 雷洛昔芬组细胞 miRNA-21 显著高于空白组与假手术组 ($P < 0.05$), 但与雷洛昔芬低剂量组相比, 雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率均显著降低 ($P < 0.001$), 且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞 miRNA-21 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。各组 miRNA-29 表达量分别为 (0.17 ± 0.02) 、 (0.19 ± 0.01) 、 (0.43 ± 0.03) 、 (0.31 ± 0.02) 、 (0.32 ± 0.02) , 5 组比较差异有统计学意义 ($F = 256.364, P < 0.001$)。假手术组细胞 miRNA-29 表达量与空白组相比无显著性 ($P > 0.05$), 雷洛昔芬组细胞 miRNA-29 显著高于空白组与假手术组 ($P < 0.001$), 但与雷洛昔芬低剂量组相比, 雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞 miRNA-29 表达量均显著降低 ($P < 0.001$), 且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞 miRNA-29 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 引物设计

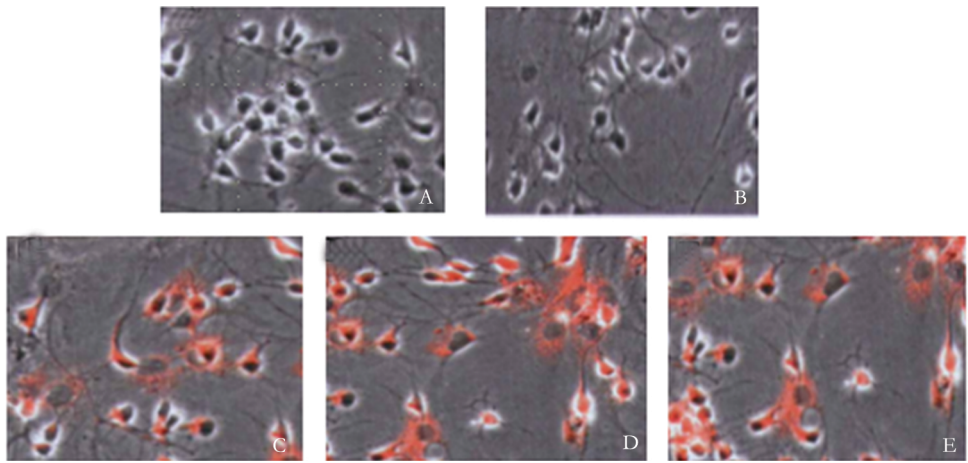
基因	上游	下游
miRNA-21	5'-AGGACGAGGUCUGCGUGAAU-3'	5'-UAGGGAUUCACGCAGACCU-3'
miRNA-29	5'-GCCCAAGGGCTCAAAAATG-3'	5'-GCGCTTACTTTGTGCTGTCC-3'
β -actin	5'-CTGCAGCATCTTCTTCC-3'	5'-CAAAGTTGTCATGATGACC-3'

表 2 反应体系

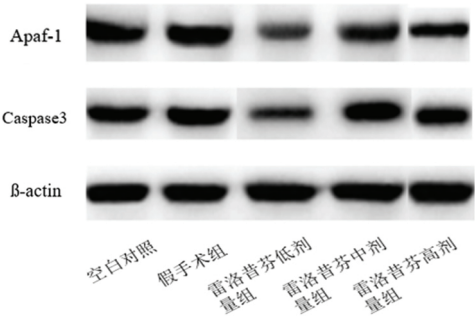
5 × PrimeEx Taq TM II (2 ×)	12.5 μl
PCR Forward Primer (10 μmol)	1 μl(0.4 μmol)
PCR Reverse Primer(10 μmol)	1 μl(0.4 μmol)
DNA 模板	2 μl
dH ₂ O(灭菌蒸馏水)	8.5 μl
Total	25 μl

表 3 神经元细胞增殖能力、凋亡蛋白及相关 miRNA 表达量测定

组别	OD570 nm	凋亡率(%)	caspase-3	Apaf-1	miRNA-21	miRNA-29
空白对照组	0.68 ± 0.02	1.1 ± 0.03	0.91 ± 0.12	1.13 ± 0.06	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.02
假手术组	0.66 ± 0.02	1.2 ± 0.02	0.86 ± 0.12	1.08 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.01
雷洛昔芬低剂量组	0.21 ± 0.01	10.38 ± 0.23	0.51 ± 0.01	0.38 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.43 ± 0.03
雷洛昔芬中剂量组	0.59 ± 0.03	8.92 ± 0.12	0.79 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.31 ± 0.02
雷洛昔芬高剂量组	0.54 ± 0.04	9.01 ± 0.21	0.74 ± 0.04	0.51 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.32 ± 0.02



A:空白组;B:假手术组;C:雷洛昔芬低剂量组;D:雷洛昔芬中剂量组;E:雷洛昔芬高剂量组,雷洛昔芬中、高剂量组荧光强度降低($P>0.05$)
图 1 神经元形态和神经元钙含量的测定



假手术组细胞凋亡相关蛋白 caspase-3、Apaf-1 与空白组相比蛋白表达量无统计学差异($P>0.05$),雷洛昔芬组细胞 caspase-3、Apaf-1 蛋白低于空白组与假手术组($P<0.001$),与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中、高剂量组细胞中 caspase-3、Apaf-1 蛋白增加($P<0.001$)
图 2 细胞凋亡蛋白表达量的 Western blot 测定结果

3 讨论

雷洛昔芬在神经系统中的作用也引起了越来越多的关注^[5]。现有的一些体内实验结果表明,雷洛昔芬对氧化应激和 β-淀粉样蛋白所致的神经损伤具有保护作用^[7]。也有证据表明雷洛昔芬对中枢神经系统多巴胺受体具有雌激素激动剂活性,提示雷洛昔芬可能作为雌激素激动剂在中枢神经系统发挥神经保护作用^[8]。此外,雷洛昔芬神经保护作用的细胞和分子机制尚不清楚。

有研究表明^[9],雷洛昔芬能抑制过氧化应激所致的神经元死亡,这种作用不是由经典雌激素受体介导的。报道指出^[10],雷洛昔芬对雌激素受体 α 诱导的神经元凋亡有抑制作用,再生的作用还取决于经典雌激素受体介导的。有报道指出^[11],谷氨酸可

直接激活细胞膜上配体激活的钙通道,引起细胞膜膨胀 Ca^{2+} 内流,同时引起细胞膜去极化,激活电压依赖性钙通道,进一步引起钙内流和钙超载^[12]。本研究以 3×10^4 mol/L 谷氨酸培养海马神经元细胞,结果表明,不同浓度的雷洛昔芬可显著降低谷氨酸诱导的细胞内钙的增加。与空白对照组的荧光强度相比,假手术组无显著变化 ($P > 0.05$),雷洛昔芬低剂量组、雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组荧光强度均显著增加 ($P < 0.001$),但与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组荧光强度均显著降低 ($P < 0.001$)。

在体内动物实验的结果表明^[13],雷洛昔芬在脑缺血缺血损伤的实验模型中对神经元具有明显的保护作用,同时体外细胞研究也证实^[14,15],雷洛昔芬在氧化应激、兴奋毒性及 β -淀粉样蛋白引起的神经元损伤中增加了神经元的存活且对其具有保护作用。本研究表明,通过 MTT 实验对神经元细胞增殖能力进行测定,利用流式细胞仪对其凋亡率进行测定,实验结果表明,雷洛昔芬组细胞增殖率与凋亡率均显著低于空白组与假手术组 ($P < 0.001$),但与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率均显著增加 ($P < 0.001$),且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞增殖率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

细胞中凋亡相关蛋白即 caspase-3、Apaf-1 的表达结果表明,假手术组细胞凋亡相关蛋白 caspase-3、Apaf-1 与空白组相比蛋白表达量无显著性 ($P > 0.05$),雷洛昔芬组细胞 caspase-3、Apaf-1 蛋白均显著低于空白组与假手术组 ($P < 0.001$),但与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞中 caspase-3、Apaf-1 蛋白均显著增加 ($P < 0.001$),且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组 caspase-3、Apaf-1 蛋白表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。与雷洛昔芬低剂量组相比,雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞 miRNA-21、miRNA-29 表达量均显著降低 ($P < 0.001$),且雷洛昔芬中剂量组、雷洛昔芬高剂量组细胞 miRNA-21、miRNA-29 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

综上所述:雷洛昔芬通过抑制神经细胞凋亡蛋白 caspase-3、Apaf-1 及 miRNA-21、miRNA-29 的表达保护脑缺血大鼠脑细胞。

[参考文献]

- [1] Justicia C, Gabriel C, Planas AM. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes [J]. *Glia*, 2015, 30(3): 253-270.
- [2] Bachevalier J, Meunier M. Cerebral ischemia: are the memory deficits associated with hippocampal cell loss [J]. *Hippocampus*, 2015, 6(5): 553-560.
- [3] Gradishar W, Glusman L, Usman J, et al. Effects of high dose raloxifene in selected patients with advanced breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2015, 88(9): 2047-2053.
- [4] Weickert TW, Weinerg D, Lenroot R, et al. Adjunctive raloxifene treatment improves attention and memory in men and women with schizophrenia [J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(6): 685-694.
- [5] Jochems C, Islander U, Kallkopf A, et al. Role of raloxifene as a potent inhibitor of experimental postmenopausal polyarthritis and osteoporosis [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2014, 56(10): 3261-3270.
- [6] Jin G, He XR, Chen LP. The protective effect of ginkgo bilboa leaves injection on the brain dopamine in the rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *African Health Sciences*, 2014, 14(3): 725.
- [7] Icl B. Raloxifene affects fatty acid oxidation in livers from ovariectomized rats by acting as a pro-oxidant agent [J]. *Toxicology Letters*, 2013, 217(1): 82-89.
- [8] Foster SA, Shi N, Curkendall S, et al. Fractures in women treated with raloxifene or alendronate: a retrospective database analysis [J]. *BMC Women's Health*, 2013, 13(1): 15.
- [9] Tran TH, Ramasamy T, Cho HJ, et al. Formulation and optimization of raloxifene-loaded solid lipid nanoparticles to enhance oral bioavailability [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14(7): 4820-4831.
- [10] Ravi PR, Aditya N, Kathuria H, et al. Lipid nanoparticles for oral delivery of raloxifene: optimization, stability, in vivo evaluation and uptake mechanism [J]. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 2014, 87(1): 114-124.
- [11] Burra M, Jukanti R, Janga KY, et al. Enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride via lyophilized solid lipid nanoparticles [J]. *Advanced Powder Technology*, 2013, 24(1): 393-402.
- [12] Bourque M, Morissette M, Paolo TD. Raloxifene activates G protein-coupled estrogen receptor 1/Akt signaling to protect dopamine neurons in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mice [J]. *Neurobiology of Aging*, 2014, 35(10): 2347-2356.
- [13] Kim K, Svedbom A, Luo X, et al. Comparative cost-effectiveness of bazedoxifene and raloxifene in the treatment of postmenopausal osteoporosis in Europe, using the FRAX algorithm [J]. *Osteoporosis International: a Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2014, 25(1): 325-337.
- [14] Muschitz C, Kocijan R, Fahrleitner-Pammer A, et al. Overlapping and continued alendronate or raloxifene administration in patients on teriparatide: effects on areal and volumetric bone mineral density-the Confors study [J]. *Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research*, 2014, 29(8): 1777-1785.
- [15] Amugongo SK, Yao W, Jia J, et al. Effect of sequential treatments with alendronate, parathyroid hormone (1-34) and raloxifene on cortical bone mass and strength in ovariectomized rats [J]. *Bone*, 2014, 67(5): 257-268.