doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.007

大黄素抑制胃癌细胞糖酵解并促进凋亡*

关 波 张 松 郭 舜 石 磊 戚志华 李诗草 刘琳娜⁴ (第四军医大学唐都医院药剂科 陕西西安 710038)

摘要目的:探讨大黄素对人胃癌 BGC-823 细胞凋亡及糖酵解的影响。方法:采用不同浓度大黄素(30 μmol/L、90 μmol/L、180 μmol /L)、磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)抑制剂处理人胃癌 BGC-823 细胞,通过四甲基偶氮唑盐(MTT)检测细 胞活力,采用试剂盒检测细胞葡萄糖消耗及乳酸水平,western blotting 检测细胞已糖激酶 II、Bcl-2 相关蛋白 (Bcl-2 Associated X Protein, Bax)、PI3K、人低氧诱导因子 1α (Human Hypoxia-inducible factor 1α,HIF-α)的表达。结果:大黄素能浓度依赖性的抑制 BGC-823 细胞增殖、葡萄糖消耗,降低乳酸水平;并降低已糖激酶 II 的表达,促进凋亡蛋白 Bax 表达。PI3K 抑制剂可抑制胃癌细 胞糖酵解水平, 而将大黄素与 PI3K 抑制剂联合使用后, 与单一抑制剂组比, 对细胞糖酵解抑制水平进一步加强, 大黄素可下调 PI3K 下游蛋白及 HIF-α 的表达。结论:大黄素对人胃癌 BGC-823 细胞的增殖抑制作用其作用机制与调节 PI3K 途径及 HIF-α, 并 抑制已糖激酶 II表达降低胃癌细胞糖酵解水平相关。

关键词:大黄素;己糖激酶Ⅱ;胃癌细胞;凋亡

中图分类号:R-33;R285.5;R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)13-2437-05

Emodin Inhibits Glycolysis and Promotes Apoptosis of Gastric Cancer Cells*

GUAN Bo, ZHANG Song, GUO Shun, SHI Lei, QI Zhi-hua, LI Shi-cao, LIU Lin-na $^{\triangle}$

(Department of Pharmacy, Tangdu Hospital of The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of emodin on human gastric cancer BGC-823 cell apoptosis and glycolysis. **Methods:** Using different concentrations of emodin (30 mol/L, 90 mol/L, 180 mol/L), phosphatidylinositol 3- kinase (Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) inhibitor treatment of human gastric cancer cell line BGC-823, cell vitality was detected by four methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay kit, glucose consumption and lactate level in gastric cancer cells were also detected, the effect of emodin on human gastric cancer cells hexokinase II and Bcl-2 Associated X Protein(Bax), PI3K, Human Hypoxia-inducible factor 1α (HIF- α) were determinated. The effect of emodin on glycolysis of human gastric cancer BGC-823 cells was investigated by PI3K inhibitors. **Results:** Emodin inhibited human gastric cancer BGC-823 cell growth in concentration dependent manner, also significantly decreased glucose consumption and lactate levels; inhibited gastric cancer cell hexose kinase II expression, while promoting the regulation of apoptosis protein Bax expression. PI3K inhibitors also can inhibit the gastric cancer cell glycolysis level. The combination of emodin and PI3K inhibitor enhanced the glycolytic inhibition level of cells compared with the single inhibitor group. Emodin also reduced the expression of downstream of PI3K protein and HIF- α . **Conclusion:** Emodin has a significant inhibitory effect on the proliferation of human gastric cancer BGC-823 cells, and its mechanism may be related to its regulation of downstream of PI3K protein and HIF- α , thereby inhibiting the expression of hexokinase II and decreasing the glycolytic level of gastric cancer cells.

Key words: Emodin; Hexokinase II; Gastric cancer cells; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R285.5; R735.2 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)13-2437-05

前言

大黄素是为蓼科植物虎杖的干燥根茎和根中有效成分,可 从大黄、芦荟、番泻叶等中药提取,其化学名称为 6- 甲基 -1, 3,8-3 羟基蒽醌。现代药理学研究表明大黄素具有明显的抗肿 瘤、抗病毒、免疫调节等作用^{0,2]},对宫颈癌、大肠癌、肝癌细胞等 肿瘤细胞均具有杀伤和抑制作用,还可有效抑制甲状腺癌细胞 的增殖^{154]}。胃癌是我国常见肿瘤之一,近年研究显示大黄素对胃 癌细胞具有明显抑制作用,使人胃癌 BGC-823 细胞增殖周期停滞于 G0/G1 期,促进其凋亡,但其作用机制尚未完全明确^四。

糖酵解是肿瘤细胞主要的能量供应途径,肿瘤细胞在有氧 条件下优先采用糖酵解反应提供其增殖所需的能量被称为瓦 博格(Warburg)效应^[8,9],可以为肿瘤细胞提供增殖所需的能量 及必须的氨基酸等合成原料,从而维持肿瘤细胞的快速增殖及 迁移。己糖激酶 II 是糖酵解第一限速酶,而 PI3K/Akt 途径及 HIF-α 均参与调控该蛋白^[10-12]。胃癌细胞中糖酵解同样明显高

^{*}基金项目:陕西省重点研究发展计划项目(2017SF-136);陕西省中医药管理局中医药科研项目(ZYMS008)

作者简介:关波(1982-),女,硕士,主治医师,研究方向:胃癌分子机制研究及临床治疗,E-mail: guanboxa@163.com

[△] 通讯作者:刘琳娜,女,硕士生导师,副主任药师,主要研究方向:肠道疾病及药物临床治疗,E-mail: linnaliuxa@163.com

⁽收稿日期:2018-01-25 接受日期:2018-03-01)

于正常细胞^[13],而大黄素对胃癌细胞糖酵解的作用并不清楚。因此,本研究主要探讨了大黄素对人胃癌 BGC-823 细胞凋亡 及糖酵解的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌 BGC-823 细胞系购自中国科学院上海细胞研究 所,大黄素(SIGMA,美国),LY294002 PI3K 抑制剂、四甲基偶 氮唑盐(MTT) (SIGMA,美国),p-Akt、Akt、HIF-α、己糖激酶 II、 Bax(abcam,英国),DMSO 购自百灵威试剂公司;Lactate Colorimetric Assay Kit II,Glucose(GO) Assay Kit 购自 Bivision 公司。 1.2 方法

人胃癌 BGC-823 细胞在二氧化碳培养箱中,采用含有 10%小牛血清培养及加入 85 IU/L 青霉素、100mg/L 链霉素的 改良杜氏伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养液培养备用。实验分为4组,分别为空白对照组(Ctrl 组)和大黄素组 (浓度为 30 μmol/L、90 μmol/L、180 μmol /L)。采用 MTT 法考察大黄素对胃癌细胞活力的影响;另分4 组分别为空白对照组(Ctrl 组),大黄素组(90μmol/L),PI3K 抑 制剂组 (30 μmol/L),大黄素加 PI3K 抑制剂组(90μmol/L)。

1.3 MTT 实验

将胃癌细胞 BGC-823 按照 1× 10⁵ 个细胞的浓度,在 96 孔 板中接种,24 h 后加入分别加入 30 μmol /L、90 μmol /L、180 μmol /L 的大黄素培养液继续培育,每组 8 孔。24h 后,将 30 μL MTT 加入到培养孔中继续孵育 4 h,加入 150 μL DMSO, 充分溶解结晶物。采用酶标仪检测 550 nm 吸光度(A)值,计算 细胞活力。实验重复 3 次。

1.4 葡萄糖消耗及乳酸水平检测

采用利用 Lactate Colorimetric Assay Kit II 检测细胞培养 基中的乳酸含量,操作按照实际盒提供的操作说明进行。葡萄 糖消耗检测采用 Glucose(GO) Assay Kit 提供的操作说明进行 分析。

1.5 Western blotting

将胃癌细胞 BGC-823 按照 4× 10⁶ 个细胞的浓度接种在 6 孔板中,按照 MTT 实验分组给药,24h 后提取细胞总蛋白,采 用 BCA 法测定蛋白质含量。按照 8%进行 SDS-PAGE 凝胶电 泳,上样量为 50 μg 蛋白。电泳分离结束后,采用湿法转印将蛋 白转印至 PVDF 膜,用含 1%脱脂奶粉 TBS 和 0.1%TBST 封闭 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 3 min,加一抗,4℃孵育过夜,TB-ST 洗膜 3 次,每次 3 min。加辣根过氧化物酶标记的二抗(1: 2000),常温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 3 min。实验以 GAPDH 作为内参照。ECL 化学发光试剂显色,通过 Bio-red 生 物图像处理软件进行目的条带的表达检测及分析。

1.6 统计学分析

实验数据按照均数±标准差表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行正态性分析和方差齐性检验,多组间均数比较用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对人胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响

不同浓度的大黄素处理人胃癌细胞 BGC-823 24h 后,细胞 存活率与对照组相比显著降低,中剂量及高剂量组与对照组比 具有显著性差异(P<0.01)(图 1),且高剂量大黄素与中剂量组细 胞存活率具有显著差异(P<0.05)。以上结果提示大黄素可抑制 人胃癌 BGC-823 细胞增殖,并呈明显的浓度依赖性。





2.2 大黄素对人胃癌细胞 BGC-823 乳酸水平及葡萄糖消耗的 影响

不同浓度的大黄素处理人胃癌细胞 BGC-823 24h 后,相较 于对照组,中高剂量大黄素组人胃癌细胞 BGC-823 葡萄糖的 消耗水平明显降低(P<0.05),大黄素高剂量组、乳酸水平相较于 对照组明显降低(P<0.05),且高剂量组与中剂量组在葡萄糖消 耗及乳酸水平中均具有显著差异(P<0.05)(图 2)。该结果表明大 黄素可以明显抑制胃癌细胞糖酵解水平。

2.3 大黄素与 PI3K 抑制剂联合处理对人胃癌细胞 BGC-823 增 殖的影响

采用 PI3K 抑制剂联合大黄素处理人胃癌细胞 BGC-823, 结果显示:大黄素、PI3K 抑制剂单用均可以明显降低胃癌细胞 活力,大黄素与 PI3K 抑制剂联合处理的胃癌细胞活力较单一 PI3k 抑制剂处理显著降低(*P* < 0.05)(图 3)。

2.4 大黄素与 PI3K 抑制剂联合处理对人胃癌细胞 BGC-823 乳酸水平及葡萄糖消耗的影响

大黄素与 PI3K 抑制剂联合处理胃癌细胞 24h 后,结果显示:大黄素、PI3K 抑制剂单用均可以明显降低胃癌细胞葡萄糖 消耗及乳酸水平,而大黄素与 PI3K 抑制剂联合处理的胃癌细 胞的葡萄糖消耗及乳酸水平与单一 PI3K 抑制剂组相比显著降 低(P<0.05,图 4)。

2.5 大黄素与 PI3K 抑制剂对人胃癌细胞 BGC-823 凋亡相关蛋 白表达的影响

如图 5 所示,大黄素对胃癌细胞己糖激酶 II、p-Akt 蛋白表 达具有明显的抑制作用,同时增加促凋亡蛋白 Bax 表达 (P<



0.05);大黄素与 PI3K 抑制剂联合处理的胃癌细胞己糖激酶 II、 p-Akt 蛋白表达较大黄素进一步降低(P<0.05),大黄素对 HIF-α 同样具有抑制作用,PI3K 抑制剂组无此作用。

3 讨论

胃癌在我国临床发病率较高,但是目前临床化疗药物普遍 具有毒性大、副作用多等问题,中药肿瘤治疗成为近年新药研 究的热点。通过从中药中寻找有效成分,并对其结果修饰及改 造是寻找临床新药的有效途径。大黄素是我国传统中药大黄的 主要活性成分,芦荟、番泻叶等中也含有大黄素,研究表明大黄 素具有显著的抗肿瘤作用,其对胃癌也具有抑制作用,但其作 用机制有待进一步阐明。有研究认为大黄素可通过抑制 RhoA 的激活进而升高胃癌肿瘤细胞 ROS 水平,减少细胞凋亡发挥 其抑制癌细胞增殖作用^[14]。也有研究认为大黄素可以通过影响 肝再生磷酸酶 -3 从而参与胃癌细胞增殖抑制的调控^[15]。

糖酵解是肿瘤细胞增殖的特征反应,是肿瘤细胞维持生物 学功能的重要机制。糖酵解增强是肿瘤细胞恶性转化的生物能 量学基础。细胞能量供应主要通过三羧酸循环及糖酵解,而肿 瘤细胞的大量增殖主要依赖糖酵解产生 ATP 来满足自身能量 代谢的需要,肿瘤过度增殖细胞处于缺氧状态,糖酵解反应明 显升高,为肿瘤细胞增殖提供所需能量及合成蛋白质,氨基酸 等营养物质的原料^[16,17]。而己糖激酶 II (HK II)是一种通过催化 己糖将其磷酸化的酶,是糖酵解过程中产生的第一个酶,也是



图 3 大黄素联合 PI3K 抑制剂对胃癌细胞活力的影响(与对照组比较, *P <0.05;与 LY294002 组比较,*P <0.05)

Fig.3 The effects of emodin combined with PI3K inhibitors on the viability of gastric cancer cells

(compared with the control group, *P < 0.05; compared with the LY294002 group, *P < 0.05)



图 4 大黄素联合 PI3K 抑制剂对胃癌细胞葡萄糖消耗及乳酸水平的影 响(与对照组比较,*P <0.05;与 LY294002 组比较,*P <0.05) Fig. 4 The effect of emodin combined with PI3K inhibitor on the glucose consumption and lactate level in gastric cancer cells (*P <0.05 compared with control group; compared with LY294002 group, *P <0.05)

细胞糖酵解途径中的关键性限速酶。近年研究显示己糖激酶-II 在多种恶性肿瘤中均高表达,是肿瘤能量供应的关键酶系 ^[18,19],此外,HK-II 定位于线粒体外膜,可形成线粒体外膜通道, 可阻止线粒体膜通透转换孔(PTP)开放、从而抑制线粒体内促 凋亡因子(如细胞色素 C 等)释放,具显著的抗细胞凋亡的作用 ^[20,21]。有研究发现胃癌中己糖激酶-II 的表达明显高于正常组 织,HK-II 在胃癌组织中的阳性表达率为 68.0%,显著高于正常 胃黏膜组织^[22],说明 HK-II 在胃癌的增殖中具有重要作用。 PI3K-Akt 信号途径参与己糖激酶-II 的调节作用,当抑制机体 Akt 磷酸化过程后,己糖激酶II 表达显著下降^[23,24],此外,HIF 是 缺氧调控因子,而肿瘤细胞糖酵解正是由于其在缺氧条件下, 现代药理学研究表明 HIF-a 也参与己糖激酶 II 的调控^[25,26]。

本研究表明大黄素可以浓度依赖性的抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖,同时显著降低细胞葡萄糖消耗及乳酸的产 生,说明大黄素可以明显抑制细胞糖酵解水平。同时,大黄素可



图 5 大黄素对人胃癌细胞 BGC-823 凋亡相关蛋白表达的影响(与对照组比较,*P <0.05;与大黄素组比较,*P<0.05) Fig.5 Effect of emodin on the expression of apoptosis related protein in human gastric cancer BGC-823 cells (*P <0.05 compared with control group; compared with Emodin group, *P <0.05)

以明显抑制细胞己糖激酶 - II 的表达,而大黄素与 PI3K 抑制剂 联合使用后对己糖激酶 - II 的抑制加强,并且相对于单一抑制 剂组显著提高对胃癌细胞糖酵解及乳酸水平的抑制作用,该结 果说明大黄素对于胃癌细胞 BGC-823 的糖酵解水平的抑制作 用应该是通过同时抑制 Akt 途径及 HIF-α 途径。有研究发现大 黄素可以通过影响 HIF-α 的生物合成从而影响糖酵解反应的 发生,抑制人胰腺癌的增殖^[27]。而我们的研究发现大黄素在胃 癌细胞中不仅通过影响 HIF-α 的蛋白水平,同时可以通过影响 Akt 的磷酸化水平,继而影响己糖激酶表达,抑制胃癌细胞糖 酵解反应。目前,围绕大黄素在其中肿瘤细胞中调控 Akt 途径, 发挥其生物活性的研究已有报道^[28,29],但大黄素在胃癌细胞中 如何调控 Akt 及 HIF 途径发挥其作用的分子机制还有待进一 步阐明。

参考文献(References)

张文根,杨赛钢,李波,等.中国蓼科植物化学成分研究进展[J].现代生物医学进展,2008,8(2):393-396

Zhang Wen-gen, Yang Sai-gang, Li Bo, et al. Progress Chinese advances in study on chemical constituents of Polygonaceae plants [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(2): 393-396

[2] 张丹丹.大黄的临床药理研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9 (17): 68-69

Zhang Dan-dan. Clinical pharmacological study of rhubarb[J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2011, 9(17): 68-69

- [3] 赵华栋,张静,南菁,等.芦荟大黄素对人甲状腺癌细胞 K1 的促凋亡 作用[J].现代生物医学进展, 2010, 10(17): 3225-3227
 Zhao Hua-dong, Zhang Jing, Nan Jing, et al. Aloe emodin promoting apoptosis in human thyroid K1 cancer cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10 (17): 3225-3227
- [4] He Y, Huang J, Wang P, et al. Emodin potentiates the antiproliferative effect of interferon α/β by activation of JAK/STAT pathway signaling through inhibition of the 26S proteasome [J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 4664-4679
- [5] Liu B, Yuan B, Zhang L, et al. ROS/p38/p53/Puma signaling pathway is involved in emodin-induced apoptosis of human colorectal cancer cells[J].Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 15413-15422
- [6] Zhang L, He D, Li K, et al. Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 222-228
- [7] Chihara T, Shimpo K, Beppu H, et al. Effects of Aloe-emodin and Emodin on Proliferation of the MKN45 Human Gastric Cancer Cell Line[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(9): 3887-3891
- [8] Lin L, Huang H, Liao W, et al. MACC1 supports human gastric cancer growth under metabolic stress by enhancing the Warburg effect [J]. Oncogene, 2015, 34(21): 2700-2710
- [9] Yang L, Zhang W, Wang Y, et al. Hypoxia-induced miR-214 expression promotes tumour cell proliferation and migration by enhancing the Warburg effect in gastric carcinoma cells [J]. Cancer

Lett, 2018, 414: 44-56

- [10] Ni Z, He J, Wu Y, et al. AKT-mediated phosphorylation of ATG4B impairs mitochondrial activity and enhances the Warburg effect in hepatocellular carcinoma cells[J]. Autophagy, 2017, 22: 1-43
- [11] Xiao Y, Peng H, Hong C, et al. PDGF Promotes the Warburg Effect in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1_α Signaling Pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1603-1613
- [12] Shen Y, Liu Y, Sun T, et al. LincRNA-p21 knockdown enhances radiosensitivity of hypoxic tumor cells by reducing autophagy through HIF-1/Akt/mTOR/P70S6K pathway [J]. Exp Cell Res, 2017, 358(2): 188-198
- [13] Yuan LW, Yamashita H, Seto Y. Glucose metabolism in gastric cancer: The cutting-edge [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22 (6): 2046-2059
- [14] Cai J, Niu X, Chen Y, et al. Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits RhoA activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis[J]. Neoplasia, 2008, 10(1): 41-51
- [15] Sun ZH, Bu P. Downregulation of phosphatase of regenerating liver-3 is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis induced by emodin in the SGC-7901 human gastric carcinoma cell line [J]. Exp Ther Med, 2012, 3(6): 1077-1081
- [16] Zeng L, Zhou HY, Tang NN, et al. Wortmannin influences hypoxiainducible factor-1 alpha expression and glycolysis in esophageal carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(20): 4868-4880
- [17] Zhu Y, Ramos da Silva S, He M, et al. An Oncogenic Virus Promotes Cell Survival and Cellular Transformation by Suppressing Glycolysis
 [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(5): e1005648
- [18] Lowry OH, Passonneau JV. The Relationships between Substrates and Enzymes of Glycolysis in Brain[J]. J Biol Chem, 1964, 239: 31-42
- [19] Nahm JH, Kim HM, Koo JS. Glycolysis-related protein expression in thyroid cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(3): 1010428317695922
- [20] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-

edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria[J]. Oncogene, 2006, 25: 4777-4786

- [21] Shoshan-Barmatz V, Zakar M, Rosenthal K, et al. Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787: 421-430
- [22] Liu X, Wang X, Zhang J, et al. Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis [J]. Oncogene, 2010, 29(3): 442-450
- [23] Liu J, Pan C, Guo L, et al. A new mechanism of trastuzumab resistance in gastric cancer: MACC1 promotes the Warburg effect via activation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Hematol Oncol, 2016, 9(1): 76-82
- [24] Chen XS, Li LY, Guan YD, et al. Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: therapeutic targeting of the Warburg effect[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(8): 1013-1019
- [25] Phadngam S, Castiglioni A, Ferraresi A, et al. PTEN dephosphorylates AKT to prevent the expression of GLUT1 on plasmamembrane and to limit glucose consumption in cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 84999-85020
- [26] Kitajima S, Lee KL, Hikasa H, et al. Hypoxia-inducible factor-1α promotes cell survival during ammonia stress response in ovarian cancer stem-like cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(70): 114481-114494
- [27] Hu L, Cui R, Liu H. Emodin and rhein decrease levels of hypoxiainducible factor-1α in human pancreatic cancer cells and attenuate cancer cachexia in athymic mice carrying these cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(50): 88008-88020
- [28] Sui JQ, Xie KP, Zou W, et al. Emodin inhibits breast cancer cell proliferation through the ER_α-MAPK/Akt-cyclin D1/Bcl-2 signaling pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 6247-6251
- [29] Lin W, Zhong M, Yin H, et al. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in vitro and in vivo[J]. Oncol Rep, 2016, 36(2): 961-967

(上接第2451页)

- [14] Ru N, Liu SS, Zhuang L, et al. In vivo microcomputed tomography evaluation of rat alveolar bone and root resorption during orthodontic tooth movement[J]. Angle Orthod, 2013, 83(3): 402-409
- [15] Papageorgiou SN, Kutschera E, Memmert S, et al. Effectiveness of early orthopaedic treatment with headgear: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Orthod, 2017, 39(2): 176-187
- [16] Mizrak S, Turan V, Inan S, et al. Effect of nicotine on RANKL and OPG and bone mineral density[J]. J Invest Surg, 2014, 27(6): 327-31
- [17] Esfahrood ZR, Zamanian A, Torshabi M, et al. The effect of nicotine and cotinine on human gingivalfibroblasts attachment to root surfaces

[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2015, 26(5): 517-522

- [18] Yang C, Zhang Y, Zhang Y, et al. Three-dimensional quantification of orthodontic root resorption with time-lapsed imaging of microcomputed tomography in a rodent model [J]. J Xray Sci Technol, 2015, 23(5): 617-626
- [19] An J, Li Y, Liu Z, et al. A micro-CT study of microstructure change of alveolar bone during orthodontic tooth movement under different force magnitudes in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 1793-1798
- [20] Bakathir MA, Linjawi AI, Omar SS, et al. Effects of nicotine on bone during orthodontic tooth movement in male rats. Histological and immunohistochemical study[J]. Saudi Med J, 2016, 37(10): 1127-1135