

# 青娥方调节 MMP2/EGFR 通路影响成骨细胞凋亡的实验研究

戴焱<sup>1△</sup> 李浩<sup>2</sup> 范彦博<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的:探讨中药青娥方调节 MMP2/EGFR 通路影响成骨细胞凋亡的作用机制。方法:成骨细胞分为 6 组,A 组只加入培养液。除 A 组外,均加入 30 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  培养液,C 组再加入 MMP2 重组蛋白,D 组再加入 5% 含药血清,E 组再加入 10% 含药血清,F 组再加入 MMP2 重组蛋白干预后 5% 含药血清。最后测定各组凋亡率和信号蛋白表达水平。结果:B 组比 A 组细胞凋亡数目增加显著,F 组凋亡细胞比例最小(仅为 22.97%),而 D 组中处于 G0-G1 期的细胞最少,S 期的细胞最多。C 组中 ERK2 和 Bad 表达显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。D 和 E 两组比较,EGFR 含量轻微下降,ERK2 含量稍有增加,而 Bad 含量无变化,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。F 组中 EGFR 表达显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );ERK2 和 Bad 明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:只有中药青娥丸和基质金属蛋白酶同时应用可降低 EGFR-ERK2-Bad 通路蛋白表达,成骨细胞失凋亡,促进成骨。

**[关键词]** 青娥方;基质金属蛋白酶 2;表皮生长因子;成骨细胞;凋亡

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)11-0007-06

## Experimental Study of Qing'e Prescription Regulating MMP2/EGFR Pathway on Osteoblast Apoptosis

DAI Yi<sup>1△</sup> LI Hao<sup>2</sup> FAN Yanbo<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup> Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China;

<sup>2</sup> Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

**Abstract Objective:** To observe the mechanism of Qinge prescription regulating the apoptosis of osteoblasts by MMP2/EGFR signaling pathway. **Methods:** Osteoblasts were divided into 6 groups. Group A only added culture medium. The 30 ng/mL TNF- $\alpha$  medium was added in all group except group A. Then, group C was added MMP2 recombinant protein, group D was added 5% drug-containing serum, group E was added 10% drug-containing serum, and group F was added 5% drug-containing serum after intervention with MMP2 recombinant protein. Finally, the apoptosis rate and signal protein level of each group were measured. **Results:** The number of apoptotic cells in group B was significantly higher than that in group A. The percentage of apoptotic cells in group F was the least, only 22.97%, while that in group D was the least in G0-G1 stage and the largest in S stage. The expression of ERK2 and Bad decreased significantly in group C ( $P < 0.05$ ). The content of EGFR decreased slightly, the content of ERK2 increased slightly, but the content of Bad remained unchanged ( $P > 0.05$ ). The expression of EGFR in group F was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and ERK2 and Bad increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** In this study, only Qing'e prescription and matrix metalloproteinase are used

simultaneously to reduce the expression of EGFR/ERK2/Bad pathway protein, osteoblasts lost apoptosis and promote osteogenesis.

**Keywords:** Qing'e prescription; matrix metalloproteinase 2; epidermal growth factor; osteoblast; apoptosis

基金项目:武汉市 2016 年黄鹤英才(专项)计划

(武人才办 2017-2 号)

湖北省知识创新专项(自然科学基金)项目  
(2017CFB485)

武汉市科技局应用基础项目(20150601010061)

<sup>1</sup> 武汉市中医医院骨科(武汉,430014)

<sup>2</sup> 湖北省中医院骨科

<sup>3</sup> 武汉市中医医院中药药剂学实验中心

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:daiyiw@163.com

骨质疏松症中的骨重建是以旧骨吸收大于新骨形成为特征的骨代谢过程,其中成骨细胞增殖减少和功

能减低,导致成骨作用减弱,骨量减少<sup>[1,2]</sup>,如何提高成骨细胞功能成为防治骨质疏松症的关键<sup>[3]</sup>。前期研究表明<sup>[4-7]</sup>,青娥方是缓解骨质疏松症患者症状、提高骨密度的中药经方,具有改善基质金属蛋白酶 2 (MMP2)和表皮生长因子受体(EGFR)蛋白表达的作用,但是机理尚不清楚。本研究是在青娥方干预后,测定相关信号通路蛋白,观察成骨细胞凋亡,探讨青娥方的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雌性成年 Wistar 大鼠 6 只,体质量在 160~170 g 之间,由湖北省实验动物研究中心提供,许可证号 SCXK(鄂)2008-0005。动物饲养及实验操作均按照武汉市中医医院管理标准执行。

### 1.2 实验药物及试剂

成骨细胞株 UMR106,华中科技大学协和医院中心实验室提供;TRIzol (Invitrogen, 美国,批号 20141807);TRAP 酶染色试剂盒(Sigma Diagnostic, USA,批号 20141509)。

### 1.3 实验仪器

FAC Sort 型流式细胞仪(Becton Dickinson, USA);DA7600 PCR 仪(中山大学达安基因股份有限公司,中国)。

### 1.4 方法

**1.4.1 重组 MMP2 蛋白的制备和检测** 以 pGEM-T-MMP2 质粒为模板,按照带有 EcoR I, Sal I 两酶切位点的 MMP2 基因片段进行 PCR 扩增。引物为:5-CAG-GCTCTTCTCCTTTCACAAC-3; 5-AAGCCAC GGCT-TGGTTTTCCTC-3。选取稀释后的模板, dNTP, pfu polymerase buffer(10 倍), primer1, primer2 各 1  $\mu$ L, pfu polymerase 0.5  $\mu$ L,加水至 20  $\mu$ L。反应结束后,再补加 Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 72  $^{\circ}$ C 放置 10 min。常规沉淀溶解后,使用 EcoR I, Sal I 两种限制性内切酶对 PCR 片段及 pGEX-4T-2 载体进行双酶切。回收 PCR 酶切片段,与 pGEX-4T-2 载体片段连接。连接体系为: pGEX-4 T-2 载体片段 1  $\mu$ L, MMP2 基因片段 3  $\mu$ L, T4 DNA Ligase 1  $\mu$ L, T4 DNA Ligase Buffer 1  $\mu$ L,加水进行连接反应。抽提质粒,酶切和测序后获得满意 pGEX-4T-2-MMP2 重组质粒。

**表达与纯化:**将重组质粒 pGEX-4 T-2-MMP2 转化入感受态大肠杆菌菌株 BL21 细胞中,选取高表达量的样品加入甘油保存, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。常规收集培养离心收集菌体。洗涤后重悬,加入蛋白酶抑制剂。超声破碎细胞后,离心弃沉淀,滤膜过滤后放置冰上备用。反复洗涤,将 25  $\mu$ L 的 Thrombin 酶加入到 500  $\mu$ L 的 1 $\times$  PBS 中,混匀后加至 Sepharose4 BGST

柱中,封住柱口,4  $^{\circ}$ C 缓慢摇动过夜。次日,经 SDS-PAGE 检测纯度后加入甘油分装, -70  $^{\circ}$ C 保存。

**Western Blot 检测:**纯化蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后,进行电转,所得的硝酸纤维素膜经 5 min 漂洗,放入封闭液加入兔抗鼠 MMP2 抗体, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS 洗 3 次后,室温孵育 2 h, TBS 缓冲液洗 3 次。每次 10 min,将膜置于含 BCIP/NBT 的染色液中,在室温显色。

**鉴定:**经 10% SDS-PAGE 胶电泳重组蛋白,并染色后脱色,切取蛋白片段,进行 MALDI-TOF 技术鉴定。

**1.4.2 中药青娥方含药血清的制备流程** 选取《国家药典》(2015 版)要求的青娥方主要药物,来自于武汉市中医医院中药药理学三级实验室。按照水煎滤汁过滤浓缩成每毫升含 0.4 g 生药的药液,常规加工备用。

选取正常雌性 Wistar 大鼠 6 只,按体表面积折算动物 10 倍等效剂量,配成 4 mL/d 含生理盐水溶液灌胃。先连续 2 次,中间间隔 2 h,麻醉采血,常规提取含药血清备用。

### 1.5 实验指标测定

**1.5.1 成骨细胞凋亡的检测** 成骨细胞标准操作程序培养及消化后,制成单细胞悬液后分为 6 组, A 组仅加培养液,其余 B 至 F 组均加入 30 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  培养液,然后, C 组再加入 MMP2 重组蛋白, D 组再加入 5% 含药血清, E 组再加入 10% 含药血清, F 组再加入 MMP2 重组蛋白干预后 5% 含药血清,放入培养箱中常规培养。将成骨细胞经胰蛋白酶消化后,调整细胞浓度,冷乙醇固定 1 h,离心去除乙醇,避光条件下加入碘化丙锭染色滤过后,应用流式细胞仪测定。初步评估凋亡细胞的亚 G1 凋亡峰,并测定百分率。依 CellQuest 软件,常规测定各期细胞百分率,实验重复 3 次。

**1.5.2 成骨细胞信号通路因子表达的测定** 采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)测定 EGFR, ERK2 和 Bad 水平 mRNA 表达水平。步骤如下:

#### A 引物的设计与合成

根据 GenBank 库存序列和设计原则寻找上下游引物,由 Invitrogen 公司合成,引物序列如下。

EGFR: 5-CTCCCCACCTTGAATGAAGA-3, 片段长度 545 bp; 5-ACTGGGTCGCTTCTCTTGAA-3, 退火温度 57  $^{\circ}$ C。

ERK2: 5-CACCCAGCCATAAGCATTAC-3, 片段长度 209 bp; 5-GCCTTTGAGGTTTTTGGTCA-3, 退火温度 60  $^{\circ}$ C。

Bad: 5-ATCGTGAGCACTACATGCTA-3, 片段长度 328 bp; 5-ATGGACTGTGGTCATGAGCC-3,

退火温度 65 ℃.

β-actin: 5-CGCAGTGCCTGTCTCGATCCCG-3, 片段长度 308 bp; 5-ATTGGTCGGACTGATGAGCC-3,退火温度 62 ℃.

B 制取细胞 RNA

移除上清液,充分洗涤、干燥,依次加入 Trizol 液 (1 mL/10 cm<sup>2</sup>)和三氯甲烷吹打离心,添加异丙醇充分摇匀,4 ℃放置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,留存管壁泪滴状沉淀物,采用含 DEPC 水的 75%乙醇溶解,使用分光光度计测定 A260/A280.

C 制备 cDNA

常规测算总 RNA 的用量,通过 PCR 仪中,依次按 25 ℃下 10 min,42 ℃下 50 min,70 ℃下 15 min 条件进行转录合成,保存于-20 ℃下,以备扩增.

D RT-PCR

反转录后,将 cDNA 模板添加入待检测体系,使用实时定量 PCR 仪,按照反应条件为:50 ℃下 2 min,95 ℃下 10 min,然后 95 ℃下 15 s,60 ℃下 30 s,共 40 次循环.取扩增产物 5 μL 电泳观察条带,图片扫描,测算相对表达量.

1.6 统计学方法

所有数据用 SPSS13.0 软件分析,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  差异有统计学意义.

2 结果

2.1 重组蛋白 MMP2 的 SDS-PAGE 检测及 Western Blot 鉴定

从图 1 的结果来看,纯化后的 MMP2 蛋白纯度较高,约 95%以上,符合预期大小,MMP2 表达成功.

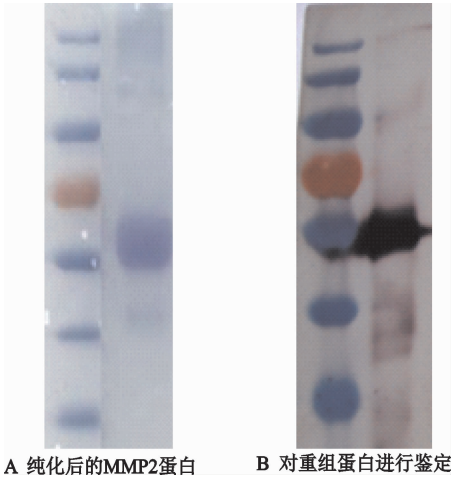


图 1 MMP2 纯化后的 SDS-PAGE 检测及 Western Blot 鉴定

2.2 中药青娥方抑制成骨细胞凋亡的结果

表 1 表明,B 组到 F 组相比 A 组显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),按照细胞周期类型分析,B 组较多处于 G0-G1 期(休止期-DNA 复制前期);与 B 组比较,C 组、D 组和 F 组处于 G0-G1 期细胞均显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),C 到 F 组处于 S 期的细胞均有显著提高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),以 D 组均值最高,E 组和 F 组的细胞处于 G2-M 期显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ).

表 1 中药复方对成骨细胞周期的作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率	G0-G1 期	G2-M 期	S 期
A 组	10.620±1.252**	52.657±0.746**	12.842±0.510	34.502±0.663**
B 组	40.335±2.281▲▲	60.122±0.784	12.853±0.535	27.028±0.039
C 组	39.102±2.369▲▲	56.208±0.696▲**	12.020±0.632	31.770±0.390**
D 组	29.057±1.401▲▲**	49.750±0.783▲**	11.135±0.511	39.785±1.455▲**
E 组	36.762±1.701▲▲	58.5581±.285▲▲	9.767±0.649▲▲**	31.675±0.849**
F 组	22.467±1.086▲▲**	51.643±1.066**	14.910±0.758▲*	33.497±1.285**

注:各组与 A 组比较:▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$ .各组与 B 组比较:※ $P < 0.05$ ,※※ $P < 0.01$ .与 A 组比较,凋亡率  $t$  值从 B 至 F 组依次为 72.49,69.51,40.05,62.33 和 35.07, $P$  值依次为 0.004 9,0.005 5,0.007 2,0.005 8 和 0.008 8.G0-G1 期  $t$  值从 C 至 E 组依次为 18.09,22.74 和 38.91, $P$  值依次为 0.041,0.032 和 0.008 1.G2-M 期  $t$  值 E 和 F 组依次为 39.02 和 21.54, $P$  值依次为 0.007 9 和 0.035.与 B 组比较,凋亡率 A,D 和 F 组  $t$  值依次为 89.91,48.06 和 53.31, $P$  值依次为 0.003 1,0.006 9 和 0.006 1.G0-G1 期  $t$  值从 A,C,D 和 F 组依次为 42.61,39.11,56.77,37.01 及 48.02, $P$  值依次为 0.007 1,0.007 9,0.005 5,0.008 5 及 0.007 6.S 期  $t$  值 A,C,D,E 和 F 组依次为 69.44,54.02,75.81,52.91 及 67.07, $P$  值依次为 0.005 5,0.006 0,0.004 7,0.006 2 和 0.005 7.

2.3 青娥方对成骨细胞周期调控的结果

图 2 为各组成骨细胞凋亡的直方图.红色尖峰是 G0-G1 期细胞百分率,浅蓝色峰是凋亡细胞百分率,深蓝色图形是 S 期细胞百分率,红色矮峰是 G2-M 期

细胞的百分率.表明 B 组比 A 组显著增多,各组药物干预下,细胞的周期分布和凋亡明显不同,D 组细胞多分布于 S 期而较少分布于 G0-G1 期,F 组凋亡细胞最少,占细胞总数的 22.97%.

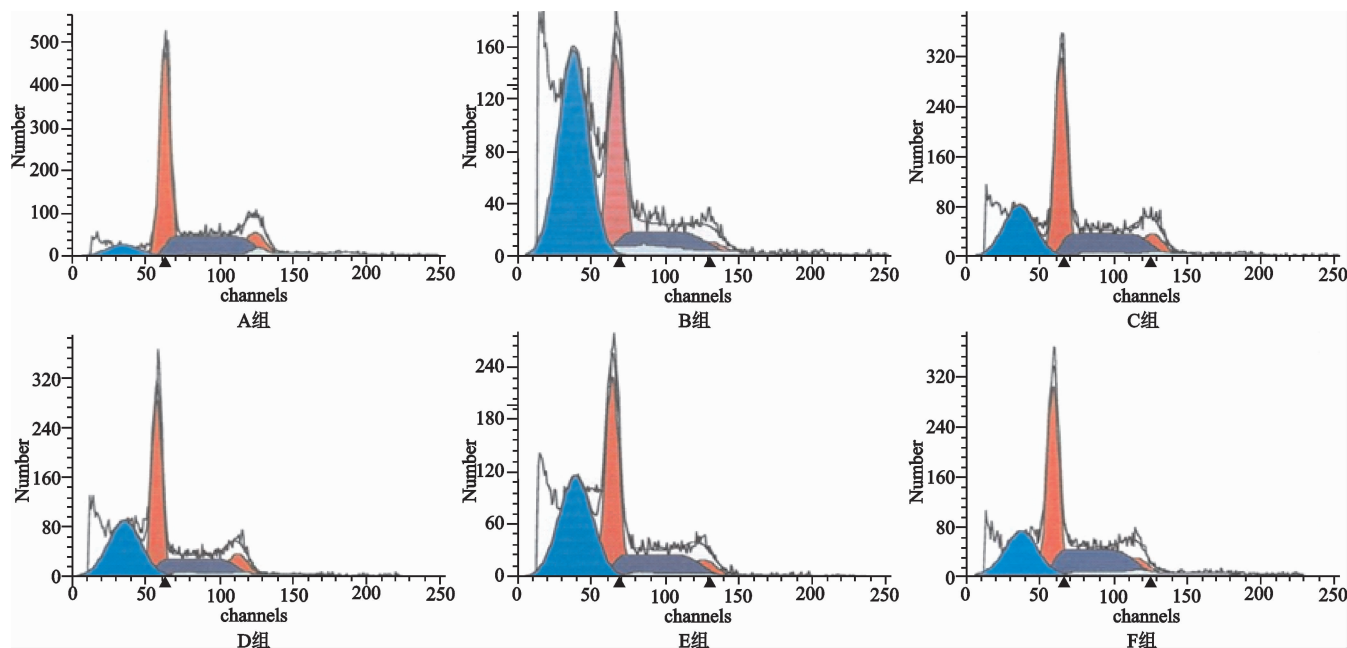


图2 各组凋亡直方图

## 2.4 成骨细胞通路相关因子测定

图3和图4提示,F组中EGFR含量明显低于其余各组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),ERK2和Bad含量高于其余各组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。表示经方配合MMP2蛋白联合作用对成骨细胞信号蛋白表达明显改变,通过胞外结合了EGFR,抑制其表达,反向激活膜上ERK2,传递入核内Bad,激活抗凋亡作用,增强了细胞的成骨活性。

同时,D和E组伴随药物浓度增加,EGFR含量依次下降,ERK2含量基本依次上调,而Bad含量不变,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。数据变化无规律,推测中药血清可能部分结合胞外EGFR,但是不稳定,

仅增加细胞膜上ERK2的表达,不能影响核内Bad的传导及抑制凋亡,成骨作用不稳定。

而且C和F组均添加MMP2蛋白干预,其中C组中EGFR数值在1左右,而ERK2和Bad表达显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。F组中EGFR表达显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );ERK2和Bad明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明MMP2在单独添加细胞时,无明显作用于信号通路的表达,只有作用于添加过复方药物血清细胞时,信号通路表达的细胞外EGFR,细胞膜ERK2和核内Bad有明显改变,抗凋亡作用稳定,成骨明显。

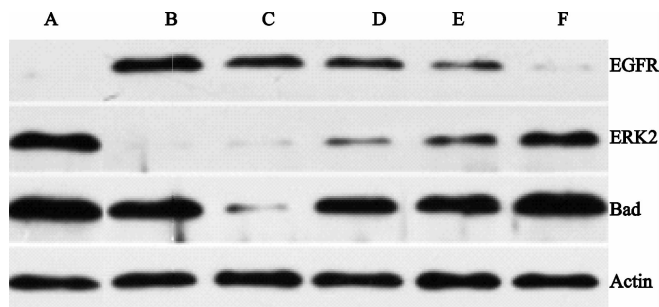


图3 成骨细胞信号通路总RNA琼脂糖凝胶电泳图

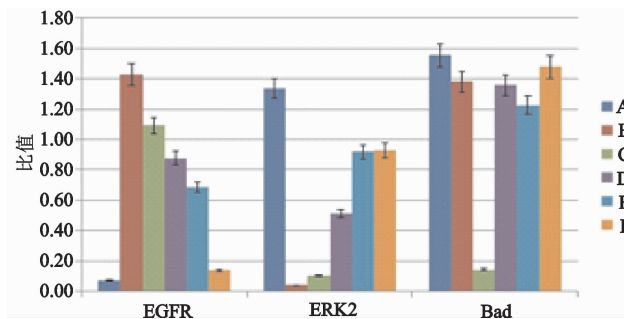


图4 各组三个信号蛋白WB值与Actin的比值

(自左向右分组为A到F组)

## 3 讨论

### 3.1 成骨细胞和含药血清制作选取依据

本研究中选用国际公认的成骨细胞系UMR106,具有均一、稳定和纯度高的优点<sup>[8]</sup>。同时采用中药喂服动物,抽取其血清作为含药血清来干预实验,既规避了中药粗提物的弱点,又体现了中药复方的配伍原则和量效关系<sup>[9,10]</sup>。

### 3.2 青娥方可以抑制成骨细胞凋亡

细胞凋亡是Kerr和Currie两位教授于1972年提出,多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程<sup>[11]</sup>。近期研究表明这一过程的失常与衰老和退行性病变尤其是骨代谢紊乱尤其是成骨细胞的功能失调密切相关。成骨细胞在此过程中前期合成分泌类骨质,后期钙化为新

骨<sup>[12]</sup>,因此成骨细胞凋亡抑制骨组织的修复重建过程<sup>[13]</sup>。细胞凋亡的定量检测常使用流式细胞仪采用单参数分析碘化丙啶染色法进行,运用凋亡细胞的 DNA 含量低于正常二倍体细胞含量的原理,通过观察并计算染色后细胞出现亚二倍体峰的面积<sup>[14]</sup>。本研究中显示 D 组和 F 组均比 B 组的细胞凋亡数显著减少,尤其 D 组的凋亡率最低,提示青娥方可能降低成骨细胞的凋亡率,药物浓度增加,成骨细胞凋亡减少,成骨量增多。细胞凋亡的途径分为两条,一是物理化学因素介导细胞内应激反应,称为线粒体途径;二是影响细胞膜表面的死亡受体,称为膜受体途径<sup>[15]</sup>。同时凋亡具有级联反应的特征,通过信号转导通路蛋白,胞外刺激跨膜进入细胞内,再转入细胞核内影响 DNA 的转录,促进凋亡<sup>[16,17]</sup>。本实验中 D、E、F 三组再含药血清添加后通过 MMP2-EGFR-BAD 通路干扰细胞的凋亡率,改善成骨细胞作用。同时发现随着浓度升高,成骨细胞抑制凋亡率不同,推测影响了细胞周期干预点。紧接着,本课题组又对细胞周期进行了探讨。

### 3.3 青娥方通过抑制细胞凋亡改变细胞周期

细胞周期是细胞前后两侧分裂结束之间的活动过程<sup>[18]</sup>。共分为细胞间期和有丝分裂期(M 期),其中细胞间期又分为 G1(DNA 合成前期),S(DNA 合成期)和 G2(DNA 合成后期)期,与 G1 期共存的还有 G0(静止态),G1A 和 G1B 态<sup>[19]</sup>,由 G1-S-G2-M 如此进行循环。通过流式细胞仪测定 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期细胞峰的细胞比例推断细胞周期来评估药物干预点<sup>[20]</sup>。本研究发现 C 组、D 组和 F 组的处于 G0-G1 期细胞数目均较 B 组显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而 D、E 和 F 组细胞 S 期数目较 B 组均有显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),以 D 组均值最高,F 组次之。E 组和 F 组的细胞处于 G2-M 期的较 B 组显著性减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ )。药物干预各组对细胞周期中 DNA 的复制和细胞分裂期均有显著效果。Jett 等<sup>[20]</sup>阐述了膜受体介导的细胞凋亡与细胞周期的关系,二者紧密联系,最大的特征是细胞阻滞在细胞周期的某一时相再发生凋亡。Steeland 等<sup>[21]</sup>的推断 TNF 的细胞毒性同细胞周期相关,抑制 G1 期可增加细胞抵抗 TNF 作用。结合上节中药复方干预细胞凋亡的结果,提示中药经方青娥方可以抵抗 TNF 作用,促使细胞脱离 G0-G1 期的凋亡状态,进入下一细胞周期,加快 DNA 复制,继而促进细胞分裂,增加细胞数量,促进成骨作用增加骨量。同时发现,随着药物浓度改变,所处细胞周期阶段也不同,基质金属蛋白酶 2 和中药血清联合添加对细胞脱离 G0-G1 期凋亡、进入 G2 期和 M 期的作用显著,而仅含药血清干预组促进 DNA 复制效果最好。

### 3.4 中药复方含药血清对成骨细胞 MMP2-EGFR-Bad 信号传导的影响

Bad 属于 Bcl-2 家族成员,通过磷酸化一去磷酸化修饰调节蛋白转录水平,采用多种不同的信号通路来抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-2<sup>[22]</sup>,研究者发现细胞外信号调节激酶(ERK1,2)是机体细胞抗凋亡通路中最为重要的关键酶<sup>[23]</sup>,该酶的主要作用为磷酸化 Bad 蛋白,磷酸化后的 Bad 蛋白继而刺激表达存活相关基因,使对应的抗凋亡作用发挥出来<sup>[24,25]</sup>。而 EGFR 作为 ERK2 的上游信号分子,通过中药复方含药血清在 MMP2 干预对成骨细胞信号通路蛋白表达明显改变,通过胞外结合 EGFR,抑制表达,激活膜上 ERK2 表达,传导入核内 Bad 蛋白,促进抗凋亡,增强成骨细胞作用。

本实验提示中药经方青娥方通过提高成骨细胞凋亡的耐受来抑制凋亡,由于药物浓度在促进增殖和抑制凋亡两个过程中难以保持一致,下一步计划通过维持药物作用浓度,对两个过程以及转换环节进行研究,降低骨转换的速度,维持骨量,为骨质疏松症的防治药物研发寻找新思路。同时,本研究发现只有中药青娥丸和基质金属蛋白酶同时应用降低 EGFR-ERK2-Bad 通路蛋白表达,影响成骨细胞的凋亡作用,促进骨重建,改善骨转换,防止骨流失。下一步通过成骨和破骨细胞共孵育体系的中药干预研究,为绝经后骨质疏松症多靶点治疗探寻理论和实践基础。

### 参考文献

- [1] 徐苓. 骨质疏松症[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2011:48.
- [2] Chen X, Wang Z, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. Connective Tissue Research, 2018, 59(2): 99-107.
- [3] 周丽珍,王淑丽,徐赫男,等. 复方仙贞汤抑制成骨细胞凋亡的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 69-73.
- [4] 李浩,戴毅,范彦博,等. 杜仲补骨脂药对干预去势鼠成骨细胞增殖以及 MMP3-OPN 通路蛋白表达的研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1610-1613.
- [5] 余海,徐晓娟,沈霖,等. 青娥丸对绝经后骨质疏松症患者骨密度、骨转换标志物及骨桥蛋白的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(1): 21-23.
- [6] 周广文,向楠,沈霖,等. 加味青娥丸对绝经后骨质疏松症患者的骨密度、骨代谢标志物及血清 MGP 水平的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(3): 4-8.
- [7] 马陈,沈霖,杨艳萍,等. 青娥丸对绝经后骨质疏松症患者血清癌胚抗原相关细胞黏附分子 1,  $\beta$ -链蛋白水平及骨密度的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(2): 15-18.
- [8] 王吉利,张志海,黄宏兴,等. Bcl2 促进 UMR-106 细胞 BMP-2、OPG 表达及补肾健脾活血方对其影响[J]. 中国

- 骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 841-846.
- [9] 柯玮, 朱建华. 中药血清药理方法学的研究概况[J]. 中国医药指南, 2011, 9(6): 24-25.
- [10] 黄臣虎, 陆茵, 高晓君, 等. 中药血清药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 266-71.
- [11] 曹灵修, 张林, 王俊岩, 等. 补肾健脾活血方对高糖环境下 MC3T3-E1 细胞的成骨分化及凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2820-2822.
- [12] 邓强, 张亚楼, 周杨俊杰, 等. 氟化钠诱导人成骨细胞凋亡相关 microRNA 差异表达及分析[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(8): 1149-1154.
- [13] 郭丽艳, 王金兰, 谭音玲, 等. 沙格列汀对高糖环境下成骨细胞增殖、分化和凋亡的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(28): 16-19.
- [14] 桑红灵, 周安方, 孙志博, 等. 左归丸调控 Cx43 对血清饥饿诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡的保护作用[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(5): 1071-1075.
- [15] 于冬冬, 赵丹阳, 姚啸生. 中药复方鹿角胶丸通过 PI3-K/AKT 信号通路调节破骨细胞凋亡[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(7): 874-878.
- [16] 王秉义, 潘剑. 丹参素拮抗氧化应激所致骨质疏松并通过 PI3k/Akt 通路减少成骨细胞的凋亡[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(1): 1-5.
- [17] Liu S, Fang T, Yang L, et al. Gastrodin protects MC3T3-E1 osteoblasts from dexamethasone-induced cellular dysfunction and promotes bone formation via induction of the NRF2 signaling pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(4): 2059-2069.
- [18] 张玉环, 陈保疆, 王萍, 等. 健脾补肾方含药血清对体外培养小鼠脾细胞周期影响[J]. 天津中医药杂志, 2006, 23(1): 51-53.
- [19] Farley JR, Stilt-Coffing B. Apoptosis may determine the release of skeletal alkaline phosphatase activity from human osteoblast-line cells[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68: 43-52.
- [20] Jett JH. Molecular cytometry[J]. Biol Regul Homeost Agents, 2004, 18(3): 352-356.
- [21] Steeland S, Van Ryckeghem S. Simultaneous inhibition of tumor necrosis factor receptor 1 and matrix metalloproteinase 8 completely protects against acute inflammation and sepsis. [J]. Critical Care Medicine, 2018, 46(1): 67-75.
- [22] Fujito N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27 Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal p protein S6 kinases(RSKs) promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasm is localization[J]. J Biol Chem, 2003, 278(6): 9666-9670.
- [23] Abdallah BM, Alzahrani AM, Kassem M. Secreted clusterin protein inhibits osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by suppressing ERK1/2 signaling pathway[J]. Bone, 2018 110(2): 221-229.
- [24] Urbanek K, Lesiak M, Krakowian D, et al. Notch signaling pathway and gene expression profiles during early in vitro differentiation of liver-derived mesenchymal stromal cells to osteoblasts[J]. Lab Invest, 2017, 97(10): 1225-1234.
- [25] Ding LZ, Teng X, Zhang ZB, et al. Mangiferin inhibits apoptosis and oxidative stress via BMP2/Smad-1 signaling in dexamethasone-induced MC3T3-E1 cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018 41(5): 2517-2526.

(收稿日期: 2018-04-11)