

续骨补肾方含药血清对成骨细胞增殖及骨形成蛋白-2, I 型胶原表达的影响

高宗强^{1△} 袁伟杰² 严淑婷²

[摘要] 目的:探究续骨补肾方含药血清在骨折愈合过程中对成骨细胞增殖及 BMP-2, I 型胶原 mRNA 表达的影响,进一步揭示其促进骨折愈合的具体机制,为临床推广提供实验依据。方法:分离培养大鼠成骨细胞并进行鉴定,传代备用并制备 15% 含药血清并分组(高、中、低剂量 3 个含药血清组和生理盐水组) + DMEM 培养基;MTT 法观察各组对成骨细胞增殖的影响;RT-PCR 检测成骨细胞的 I 型胶原、BMP-2 mRNA 表达。结果:续骨补肾方含药血清组在 24 h, 48 h, 72 h 均可促进成骨细胞增殖,且在 24 h 低剂量组促进成骨细胞增殖作用最强;在 72 h 时,中剂量组促进成骨细胞增殖作用最强,差异有统计学意义。续骨补肾方含药血清各剂量组均可上调 BMP-2, I 型胶原 mRNA 的表达($P < 0.05$),且低剂量组作用最强。结论:续骨补肾方可促进成骨细胞增殖,增加 BMP-2, I 型胶原 mRNA 的表达,促进骨折愈合,且低剂量是最佳剂量。

[关键词] 续骨补肾方;成骨细胞;I 型胶原

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)11-0005-06

Effect of Serum Containing Xugu Bushen Recipe on Proliferation of Osteoblasts and the mRNA Expression of BMP-2 and Collagen Type I

GAO Zongqiang^{1△} YUAN Wenjie² YAN Shuting²

¹ The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

² Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi China.

Abstract Objective: To investigate the effect of serum containing Xugu Bushen recipe on the proliferation of osteoblasts and mRNA expression of BMP-2 and collagentype I in the process of fracture healing. **Methods:** Isolation, culture and identification of osteoblasts; Preparation and grouping of drug-containing serums (high, medium and low dose serums and normal saline groups); MTT assay was used to observe the effect of each group on osteoblast proliferation; RT-PCR detection of osteoblast collagen type I, BMP-2 mRNA expression. **Results:** The serum group containing the prescription of Xugu Bushen decoction could promote the proliferation of osteoblasts at 24 h, 48 h and 72 h. At 72 h, the medium dose group had the strongest effect on promoting the proliferation of osteoblasts. Xugu Bushen decoction drug-containing serum high and low dose group can raise BMP-2, collagen type I mRNA expression ($P < 0.05$), the strongest and low dose group. **Conclusion:** Xugu Bushen decoction can promote the proliferation of osteoblasts and increase the mRNA expression of collagen type I and BMP-2.

Keywords: Xugu Bushen decoction; osteoblasts; collagen type I

骨折愈合是指骨折断端间的组织修复反应,是成骨细胞、破骨细胞及其他多种细胞和细胞因子参与的复杂

过程。骨包括了无机质和有机质,在有机质中 I 型胶原是其主要组成部分。骨在愈合的不同时期有不同的细胞及细胞因子参与,骨形态发生蛋白 BMP 家族是目前发现唯一能诱导骨形成的细胞因子家族,而其中的 BMP-2 是 BMP 家族中最强成骨活性因子^[1,2]。

续骨补肾方来源于民间经验方,在临床上应用多年,疗效显著,但是对其具体的作用机制目前尚不清

基金项目:陕西省中医管理局中医药科研课题(13-JC006)

¹ 西安交通大学第二附属医院骨三科(西安,710004)

² 陕西中医药大学

[△]通信作者 E-mail:gzq7575@xjtu.edu.cn

楚,故限制了该药的进一步临床应用。本研究选用该药的含药血清,通过观察其对成骨细胞的增殖以及 BMP-2, I 型胶原 mRNA 表达的影响,试图从细胞及分子学水平进一步揭示其作用原理,为进一步深入研究及临床推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 16 只,出生 24 h SD 大鼠幼鼠 10 只。

1.2 主要仪器与耗材

倒置相差显微镜(舜宇光学科技有限公司),二氧化碳培养箱(新加坡艺思高科技有限公司),酶标仪(美国 Forma 公司),台式电子天平(美国赛多利斯公司),多管架自动平衡离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),冷冻离心机(德国艾本德公司),高压蒸汽灭菌锅(德国 Micro 公司),超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司),电热恒温水浴箱(上海志诚公司),血细胞计数板(北京长风公司),细胞培养皿、96 孔细胞培养板(美国 Costar 公司),针头滤器($0.22\ \mu\text{m}$)(美国 Millipore 公司),眼科剪、眼科镊子(浙江玉环求精医用仪器厂)。

1.3 主要药品与试剂

续骨补肾方(由三七 9 g,红花 10 g,当归 10 g,血竭 2 g,续断、骨碎补、龙骨、狗脊、淫羊藿各 12 g,鳖甲 15 g,鹿角胶 6 g 组成,由陕西中医药大学附属医院中药房提供),D-Hanks 溶液(美国 Hyclone 公司),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),标准胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),胰蛋白酶-EDTA 消化液(北京索莱宝科技有限公司),青链霉素双抗(美国 Hyclone 公司),L-谷氨酰胺(美国 Hyclone 公司),MTT(噻唑蓝)(北京索莱宝科技有限公司),Takara 试剂盒(宝日医生物技术有限公司),其它化学试剂均为国产分析纯。

1.4 方法

1.4.1 成骨细胞的分离、培养 采用酶消化法,取 SD 大鼠幼鼠 10 只(24 h),处死后浸入 75% 酒精中 10 min,在超净工作台下取出颅骨,剔除软组织。用 D-Hanks 液体洗涤 2 次,剪成 $1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$ 的碎块。 0.5% 胰蛋白酶预消化, 0.15% I 型胶原酶消化,离心获得细胞。D-Hanks 液体洗 2 次,置于含 15% FBS 的 DMEM 细胞完全培养液中, $37\ ^\circ\text{C}$, $5\%\ \text{CO}_2$ 培养箱中饱和湿气培养。48 h 后观察细胞贴壁情况,每 3 d 更换一次培养液。待原代培养细胞 80% 汇合时, 0.25% 胰蛋白酶 $37\ ^\circ\text{C}$ 消化,进行传代培养。

1.4.2 成骨细胞的鉴定

1.4.2.1 形态观察 每天在倒置显微镜下观察细胞形态变化及生长情况,观察细胞的生长及传代。

1.4.2.2 碱性磷酸酶染色(Gomori 钙钴法) 取第二代成骨细胞进行实验。将无菌的玻片放入培养皿中,传代时加入适量的细胞悬液,作细胞爬片,待细胞长满玻片后取出。D-Hanks 液体冲洗后用冷丙醇固定 10 min,蒸馏水冲洗数次。入孵育液中, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 4~6 h。自来水冲洗数次, 2% 硝酸钴中浸 3~5 min,蒸馏水洗数次。 1% 硫化铵中 2 min,自来水冲洗,自然干燥,封固。

1.5 续骨补肾含药血清的制备

将续骨补肾方的剂量减半,按照人与大鼠之间的剂量换算后,将药材饮片采取传统的水煎煮法煎煮,合并水煎液。按照高中低剂量组浓缩至所需剂量(即高剂量组 $7.86\ \text{g/mL}$,中剂量组 $2.62\ \text{g/mL}$,低剂量组 $0.87\ \text{g/mL}$)。取 16 只 SD 大鼠,分为高、中、低剂量组,生理盐水组,按照高剂量组 $5.5\ \text{g/kg}$,中剂量组 $3.7\ \text{g/kg}$,低剂量组 $1.2\ \text{g/kg}$ 进行口饲灌胃,生理盐水组灌入等量生理盐水,每组 4 只,灌胃 7 d,2 次/d。末次灌胃 2 h 后腹主动脉采血,所取血液于 $4\ ^\circ\text{C}$ 下放置 0.5~2.0 h, $3\ 000\ \text{r/min}$ 离心 30 min。取上层血清同组混合后 $56\ ^\circ\text{C}$ 水浴灭活 30 min 并经 $0.22\ \mu\text{m}$ 一次性滤膜抽滤除菌,5 mL 每管分装, $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.6 MTT 法观察成骨细胞增殖

取第 3 代细胞,用胰酶消化细胞后,收集细胞悬液。细胞计数后调整细胞浓度为 $6.5 \times 10^4/\text{mL}$,于 96 孔板中每孔接种 $100\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,每组设 6 个复孔,边缘孔用无菌 D-Hanks 填充,一次铺三个 96 孔板,分别于第 24 h,48 h,72 h 取出进行检测。细胞贴壁 24 h 后,弃培养液,加入不含血清的 DMEM 高糖培养基,饥饿培养 24 h 使细胞生长同步化,弃无血清培养基。然后加入含有 15% 含药血清的培养基进行干预。分别于 24 h,48 h,72 h 终止培养,弃培养基,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的 MTT 溶液, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 4 h,小心吸弃 MTT 溶液,每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO,摇床振荡 5 min 后,酶标仪 $490\ \text{nm}$ 处测吸光值。实验重复 3 次。

1.7 RT-PCR 检测成骨细胞的 I 型胶原及 BMP-2 mRNA

将成骨细胞以 $9 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于 6 孔板中,干预 48 h 后,通过 RT-PCR 检测各组细胞 I 型胶原及 BMP-2 mRNA 相对表达量。弃培养基中的培养液,D-Hanks 洗涤 2 次后,每孔加入 Trizol 试剂从细胞提取总 RNA。使用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 β -Actin 作为内参,利用 ABI7500PCR 仪进行 RT-PCR 反应,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达的倍数变化。RT-PCR 反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$ 30 s, $95\ ^\circ\text{C}$ 5 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。引物由生工公司设计,引物序列见表 1。

表 1 鼠源 I 型胶原、BMP-2 及 β -肌动蛋白荧光定量 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物片段/bp
I 型胶原	上游引物序列:5'-TGTTTCGCTTCTACAGAGGAGACC-3'	138
	下游引物序列:5'-TGTCGGTCCACGTCTCATCCAG-3'	
BMP-2	上游引物序列:5'-CAGCGGAAGCGTCTTAAGTCCAG-3'	168
	下游引物序列:5'-GGCATGGTTGGTGGAGTTCAGG-3'	
β -Actin	上游引物序列:5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC-3'	165
	下游引物序列:5'-GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3'	

1.8 统计学方法

用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间以单因素方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞的分离、纯化和传代培养

在倒置显微镜下观察活细胞可见,接种前的刚分离之成骨细胞呈体积均一的圆形细胞,刚接种的成骨细胞呈球形,成骨细胞接种 24 h 后大部分均贴壁生长,呈三角形、梭形、多角形等不规则形状,形态多样、排列紧密,见图 1。

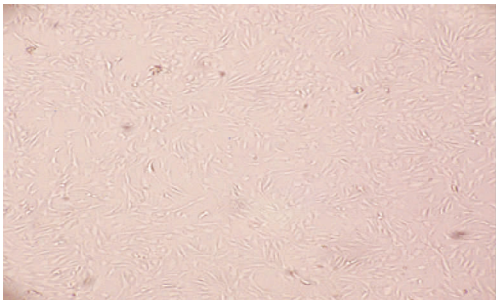


图 1 贴壁生长的成骨细胞(40 \times)

48 h 后细胞形态膨大,伸展出长短不一的突起,胞核清晰可见,见图 2。

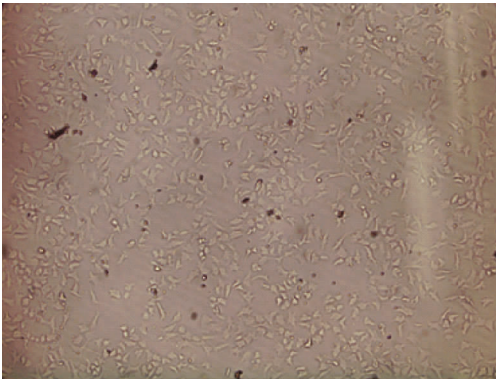


图 2 48 h 后的成骨细胞(40 \times)

4~8 d 时,细胞分离相多见,细胞突起相互连接,汇合时细胞呈铺路石状,并可见重叠生长,见图 3。

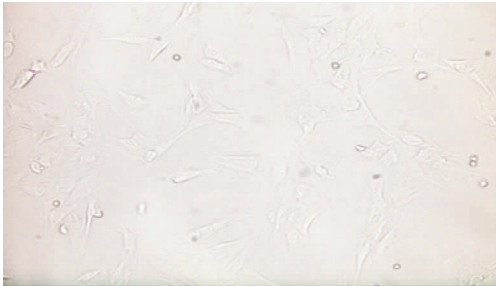


图 3 第 4 天的成骨细胞(10 \times)

2.2 成骨细胞的碱性磷酸酶染色鉴定

经 Gomori 钙钴法固定、染色、洗涤、封片后,显微镜下可见胞质中呈现有黑色着色颗粒或块状沉淀,此为阳性反应,镜下细胞阳性率高,见图 4。

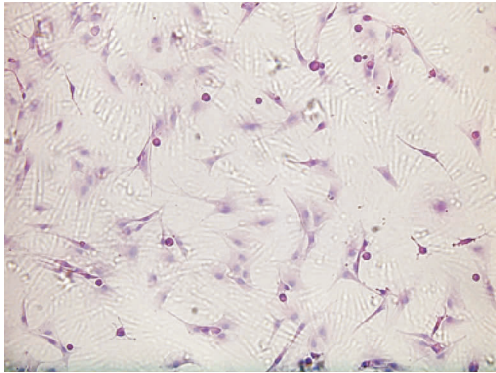


图 4 苏木精-伊红染色的成骨细胞

2.3 MTT 法观察各组对成骨细胞增殖的影响

续骨补肾方含药血清各剂量组在 24 h,48 h,72 h 促进成骨细胞增殖作用均强于生理盐水组,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 24 h 时低剂量组促进成骨细胞增殖作用最强,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 72 h 时中剂量组促进成骨细胞增殖作用最强,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组对成骨细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, OD_{490}$)

时间/h	生理盐水组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
24	0.57 \pm 0.08	0.84 \pm 0.05 ¹⁾	0.71 \pm 0.06 ¹⁾	0.64 \pm 0.09 ²⁾
		(¹⁾ $P < 0.01$	(¹⁾ $P < 0.01$	(²⁾ $P = 0.01$
48	0.64 \pm 0.11	0.91 \pm 0.03 ¹⁾	0.95 \pm 0.12 ¹⁾	1.00 \pm 0.08 ¹⁾
		(¹⁾ $P < 0.01$	(¹⁾ $P < 0.01$	(¹⁾ $P < 0.01$

(续表 2)

时间/h	生理盐水组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
72	1.05±0.10	1.29±0.06 ¹⁾	1.38±0.06 ¹⁾	1.19±0.05 ¹⁾³⁾
		(¹⁾ $P<0.01$)	(¹⁾ $P<0.01$)	(¹⁾³⁾ $P<0.01$)

注:1)与生理盐水组对比, $P<0.05$;2)与低剂量组对比, $P<0.05$;3)与中剂量组比, $P<0.05$.

2.4 RT-PCR 检测成骨细胞的 I 型胶原、BMP-2 mRNA 表达

各剂量含药血清干预成骨细胞 48 h 后,I型胶原、

BMP-2mRNA 的实时荧光定量 RT-PCR 检测扩增曲线和溶解曲线表明,内参、I型胶原、BMP-2 基因有效扩增,有明显扩增曲线,溶解曲线峰特异,无杂峰(见图 5).

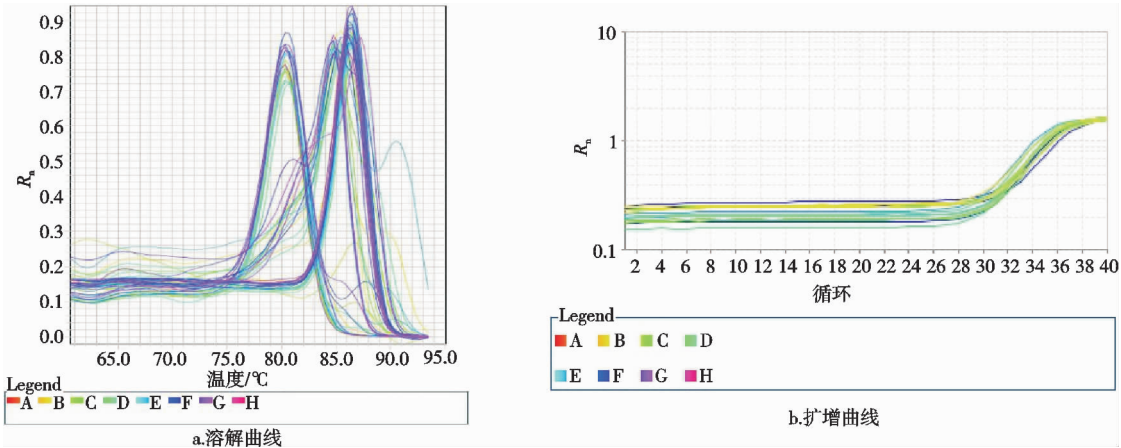


图 5 内参、BMP-2 及 I 型胶原扩增曲线及溶解曲线

同生理盐水组对比,续骨补肾方含药血清高、低剂 量组均可上调 BMP-2 及 I 型胶原 mRNA 的表达($P<0.05$),且低剂量组上调表达作用最强,见表 3 及图 6.

表 3 各组对成骨细胞的 BMP-2 及 I 型胶原 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

指标	生理盐水组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
BMP-2	1±0	1.48±0.16 ¹⁾	1.22±0.10 ¹⁾²⁾	1.41±0.07 ¹⁾
		(¹⁾ $P<0.01$)	(¹⁾ $P=0.02$, (²⁾ $P=0.01$)	(¹⁾ $P<0.01$)
I 型胶原	1±0	1.87±0.15 ¹⁾	1.10±0.15 ²⁾	1.21±0.05 ¹⁾²⁾
		(¹⁾ $P<0.01$)	(²⁾ $P<0.01$)	(¹⁾ $P=0.04$, (²⁾ $P<0.01$)

注:1)与生理盐水组对比, $P<0.05$;2)与低剂量组对比, $P<0.05$.

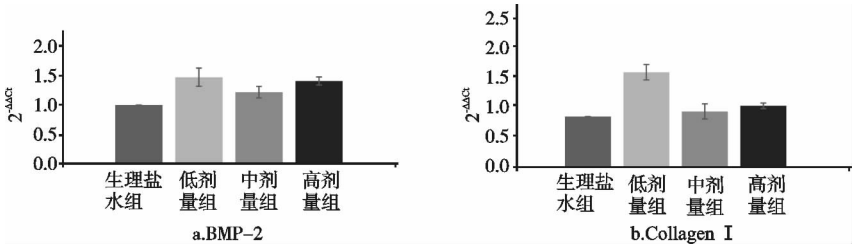


图 6 各组对成骨细胞的 BMP-2 及 I 型胶原 mRNA 表达的影响

3 讨论

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化,能特异性分泌 I 型胶原等多种生物活性物质,在骨骼损伤修复以及骨质发育中起关键作用,因此成骨细胞的增殖能力对骨折愈合的速度及程度有着很大的影响。成骨细胞增殖与分化受众多骨生长因子调控,目前研究^[2]较多的骨生长因子有骨形态发生蛋白(BMP)、成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子-β(TGF-β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)和胰岛素样生长因子(IGF)。随着基因、分子生物技术的不断提

高,对骨生长因子促进骨折愈合机制的认识也不断深入。目前促进骨折愈合的研究显示,细胞因子在骨折愈合中作用巨大^[3,4]。

在众多生长因子中,目前应用于临床的主要以 BMP 为主。BMP 属于 TGF-β 家族,为一种疏水性酸性多肽,能诱导未分化的间充质细胞聚集、定向分化为成骨细胞和软骨细胞,从而诱导新骨形成。在 BMP 的 20 多种亚型中,BMP-2 活性最强,是唯一能单独诱导骨形成的因子^[5]。重组人 BMP(rhBMP)-2 目前已应用于临床,但效果仍不理想,主要由于其在体内降解速度快且缺乏合适的载体,因此有研究者将 rhBMP-2

与可吸收胶原联合应用^[6],Gharibjanian 等^[7]应用聚己酸内酯多聚体与 rhBMP-2 的复合体培养鼠成骨细胞,结果发现 rhBMP-2 浓度和生物学活性增加,且释放时间也明显延长。聚合酶链反应显示碱性磷酸酶与成骨素基因表达明显增加,证明聚己酸内酯多聚体能使 rhBMP-2 长时间释放,骨基质生成增加,从而加快骨折愈合。

祖国医学治疗骨折的内治法主要为三期辨证论治,初期由于气滞血瘀,所以治疗多以活血化瘀、止痛消肿为主。中期损伤症状稍有改善,虽然患处的肿胀以及瘀血逐渐消散,疼痛也逐渐减轻,但是瘀肿去而未尽,所以治疗以活血化瘀、接骨续筋为主。后期肿胀瘀血渐已清除,但是肌肉骨骼并未恢复坚实,肢体活动尚未完全恢复,因此多以补养肝脾肾为主。根据“通则不痛”“痛则不通”理论,骨折后的疼痛多是由于瘀血积聚,故治疗骨折应主要以活血祛瘀消肿为主,与补养肝肾互参。

本实验选用民间验方——续骨补肾方,其主要由当归、三七、红花、血竭、续断、骨碎补、鳖甲、龙骨、狗脊、鹿角胶、淫羊藿 11 味中药组成,纵观本方,三七化瘀止血,活血定痛。红花活血通经,祛瘀止痛,辛散温通,此二者相须为君。当归、血竭、续断、骨碎补、鹿角胶、淫羊藿,活血通络,辛散温通,补益肝肾共为臣药,佐以收敛固摄之龙骨,滋阴散结之鳖甲,共奏活血化瘀、消肿止痛、补肾壮骨之功,多用于创伤后骨折,属瘀血凝滞证,在 1980 年代初应用于陕西中医学院附属医院骨科,并应用至今,在手术及手法复位的同时,兼服此药,常能大大缩短治疗疗程,促进骨折愈合。

通过对续骨补肾方含药血清的不同剂量分组,在 24 h,48 h,72 h 分别观察其对成骨细胞增殖的作用,发现不同剂量组含药血清均可促进成骨细胞增殖,且在 24 h 低剂量组对成骨细胞增殖作用最强,在 72 h 时中剂量组增殖作用最强,提示低中剂量浓度更能显著促进细胞增殖。通过 RT-PCR 测定含药血清对 BMP-2 以及 I 型胶原 mRNA 的表达发现,相比于生理盐水组,各剂量组含药血清均可显著上调 BMP-2 以及 I 型胶原 mRNA 的表达,但低剂量组促进 BMP-2 和 I 型胶原的作用更明显,更提示了低剂量组可能是最佳作用剂量。

现代药理研究证明,三七主要成分三七皂甙能促进大鼠成骨细胞的增殖,并能促进转录因子 2 (Runx2)、骨钙蛋白(OCN)、细胞增殖标志基因(PCNA)及 Ki-67 等基因 mRNA 的表达^[8]。红花中很重要的羟基红花黄色素 A 促进人骨髓间充质干细胞的增殖并促进其向成骨细胞转化。林天骥等^[9]发现三七皂甙能促进成骨细胞增殖,并能提高碱性磷酸酶活性,

促进骨钙素表达,可能通过激活 Wnt 信号通路,下调 RANKL/OPG 信号因子来促进骨形成^[10,11]。续断的主要成分川续断总皂苷,被多个实验证实能促进成骨细胞增殖并提高成骨活性^[12,13],并能促进基质干细胞向成骨细胞分化^[14,15]。骨碎补提取物对成骨细胞活性、增殖及相关基因表达也有明显促进作用^[16-19]。淫羊藿目前也认为能促进成骨细胞的增殖与成骨^[20-22]。

综上所述,续骨补肾方可以促进成骨细胞的增殖,并且促进 BMP-2 以及 I 型胶原 mRNA 的表达。至于其促进成骨、加快骨折愈合的更进一步作用机理,还有待下一步的深入研究。

参考文献

- [1] 史文涛,戴瑶,毕士奇,等. 不同状态 BMP-2 对体外 EMSCs 成骨分化的作用[J]. 中国矫形外科杂志,2019(3): 261-267.
- [2] 张纲,李焰,谭颖徽. 细胞生长因子在骨折愈合中的作用研究进展[J]. 重庆医学,2008(2):196-197.
- [3] 康献刚,王志强. 骨折愈合过程中细胞因子的作用[J]. 中国修复重建外科杂志,2008(7):877-879.
- [4] 石长贵,蔡筑韵,鲍哲明,等. 骨骼生长因子促进骨折愈合的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2010(8): 1342-1345.
- [5] 周凤玲,张向阳. 骨形态发生蛋白-2 在骨科临床的应用[J]. 济宁医学院学报,2013(4):298-301.
- [6] 袁维,郑军,钱晋宇,等. 重组人 BMP-2 缓释作用于基质血管成分细胞促进大鼠脊柱融合的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2017(7):862-869.
- [7] GHARIBJANIAN N A, CHUA W C, DHAR S, et al. Release kinetics of polymer-bound bone morphogenetic protein-2 and its effects on the osteogenic expression of MC3T3-E1 osteoprecursor cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2009,123(4):1169-1177.
- [8] 许晓伟,王凯,郑峰. 三七总皂苷对成骨细胞增殖活力的调节作用及相关分子表达变化的实验研究[J]. 贵州医药,2018(12):1411-1413.
- [9] 林天骥,邵莉,柳毅,等. 三七皂苷单体对成骨细胞增殖和矿化功能的影响[J]. 口腔医学,2018(2):127-131.
- [10] BOYCE B F, XING L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling[J]. Arch Biochem Biophys,2008,473(2):139-146.
- [11] GURBAN C V, MEDERLE O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis[J]. Rom J Morphol Embryol,2011,52(3 Suppl):1113-1119.
- [12] 徐鑫,胡奎,薛雪梅,等. 川续断总皂苷对大鼠成骨细胞增殖、分化及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报,2018(2):10-13.
- [13] 王威,史红,何永志,等. 中药续断含药血清对成骨细胞增

- 殖和骨基质蛋白产生的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009(2):103-106.
- [14] 黄媛,徐艳,易学良,等. 川续断皂苷 VI 通过 JNK 信号通路促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 广州中医药大学学报, 2018(5):887-893.
- [15] 武密山,赵素芝,任立中,等. 川续断皂苷 VI 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. 中国药理学通报, 2012(2):222-226.
- [16] 尹文哲,邢成亮,王建业,等. 失重下骨碎补总黄酮经 ERK 通路促成骨细胞增殖研究[J]. 中医药学报, 2017(5):45-48.
- [17] 孟春力. 骨碎补提取物调节成骨细胞活性、增殖及相关基因表达的实验研究[J]. 海南医学院学报, 2017(8):1023-1026.
- [18] 宋渊,李盛华,何志军. 骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014(2):125-128.
- [19] 张军,李浩鹏,杨平林,等. 骨碎补总黄酮含药血清对成骨细胞增殖、分化、周期及凋亡的影响[J]. 中药材, 2009(7):1090-1093.
- [20] 谢利娜,刘艳辉,赵波,等. 淫羊藿苷与 BMP-2 对体外培养成骨细胞增殖的影响[J]. 北京口腔医学, 2018(6):319-322.
- [21] 钟秀霞,罗美兰. 淫羊藿苷体外诱导骨膜细胞增殖及分化[J]. 中国组织工程研究, 2018(8):1155-1160.
- [22] 魏振龙,石文贵,陈克明,等. 淫羊藿素通过 CXCR4/SDF-1 信号通路促进小鼠成骨细胞成熟和矿化[J]. 浙江大学学报(医学版), 2017(6):571-577.
- (收稿日期:2019-06-09)
-
- (上接第 4 页)
- [8] LITTLE C B, MEEKER C T, GOLUB S B, et al. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair[J]. J Clin Invest, 2013, 117(2):1627-1636.
- [9] HOCHBERG M C, ALTMAN R D, BRANDT K D, et al. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. American College of Rheumatology[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(11):1541-1546.
- [10] 张艺强,滕方舟,陈少清,等. 膝骨痹康熏洗剂联合电针、功法治疗膝关节炎的疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(1):25-28.
- [11] COLLINS-RACIE L A, FLANNERY C R, ZENG W, et al. ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage[J]. Matrix Biol, 2014, 23(5):219-230.
- [12] GLASSON S S, ASKEW R, SHEPPARD B, et al. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice[J]. Arthritis Rheum, 2013, 50(3):2547-2558.
- [13] PELLETIER JP, BOILEAU C, BOILY M, et al. The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the downregulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors; MMP-13, cathepsin K and aggrecanases[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 7(2):1091-1102.
- [14] SANDY J D. A contentious issue finds some clarity; on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2015, 78(6):652-660.
- (收稿日期:2019-07-10)