

低氧环境下麝香含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化及血管生长因子表达的影响

侯费祎¹ 李慎松¹ 张莲¹ 邵宏斌¹ 周燕^{1△}

[摘要] 目的:探讨低氧环境下麝香含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化及血管生长因子表达的影响。方法:贴壁筛选提取大鼠骨髓间充质干细胞,提取 P3 代细胞,进行细胞形态学、表型及多向分化实验鉴定。低氧(3%)环境下培养骨髓间充质干细胞,利用 O92 细胞缺氧试剂盒检测不同时间点荧光强度,荧光越强说明细胞缺氧越明显;分别制备麝香含药血清和空白对照组血清,并干预低氧环境骨髓间充质干细胞,检测其在低氧环境下对骨髓间充质干细胞成骨分化相关指标(碱性磷酸酶、骨钙素、钙盐)的影响及对血管生长因子(血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素(Angiogenin)、转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素 6(IL-6))表达的影响。结果:随着低氧培养时间延长,细胞缺氧逐渐加重,表现为 O92 标记的细胞荧光强度更强;麝香含药血清组碱性磷酸酶、骨钙素、钙盐沉积量明显优于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);麝香含药血清组血管生长因子 VEGF、Angiogenin、TGF- β 表达明显优于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 IL-6 的表达两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:麝香含药血清在低氧环境下对骨髓间充质干细胞成骨分化有促进作用,对骨髓间充质干细胞分泌的血管生长因子产生不同影响,能够促进骨髓间充质干细胞分泌 VEGF、Angiogenin、TGF- β ,而对 IL-6 的表达无明显影响。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;低氧环境;麝香;血管生长因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)12-0001-06

Efficacy of Musk Medicated Serum on Osteogenic Differentiation and Secretion of Vascular Growth Factor of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia

HOU Feiyi¹ LI Shensong¹ ZHANG Lian¹ SHAO Hongbin¹ ZHOU Yan^{1△}

¹ The 940 Hospital of the Joint Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of musk medicated serum on osteogenic differentiation and secretion of vascular growth factor of rat bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxia. **Methods:** Rat bone marrow mesenchymal stem cells were extracted by adherent screening, and P3 generation cells were extracted for identification of cell morphology, phenotype and multi-directional differentiation. Bone marrow mesenchymal stem cells were cultured under hypoxia (3%). The fluorescence intensity at different time points was detected by O92 cell hypoxia kit. The cell hypoxia was more obvious when the fluorescence intensity was stronger. The serum containing musk and the serum of the blank control group were prepared, and the bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxia were intervened. The efficacy of the serum containing musk on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (alkaline phosphatase, osteocalcin, calcium salt) and the expression of vascular growth factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), Angiogenin, transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin-6 (IL-6) under hypoxia were detected. **Results:** With the prolongation of hypoxia culture time, cell hypoxia gradually increased, and the fluorescence intensity of O92 labeled cells was stronger. The deposition of alkaline lyase, osteocalcin and calcium salt in the serum containing musk was

significantly better than that in the blank control group ($P < 0.05$), with statistical difference. The expression of VEGF, Angiogenin and TGF- β in musk medicated serum group was significantly better than that in blank control group ($P < 0.05$), with statistical difference, while the expression of

基金项目:甘肃省科技计划项目(20JR10RA009)

甘肃省卫生行业专项计划项目(GSWSKY2021-045)

¹ 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院(兰州,730050)

[△]通信作者 E-mail:houlfeiyiqq@163.com

IL-6 between the two groups was not statistically significant. **Conclusion:** The drug-containing serum of musk has a promoting efficacy on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in hypoxia environment, and has different efficacy on vascular growth factors secreted by bone marrow mesenchymal stem cells. It can promote the secretion of VEGF, Angiogenin and TGF- β by bone marrow mesenchymal stem cells, but has no significant efficacy on the expression of IL-6.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; musk; vascular growth factor

骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)是存在于骨髓基质中的非造血干细胞,大量试验证实骨髓间充质干细胞可向多种细胞分化,其体外培养方法简单,扩增容易,可分化为各种中胚层组织细胞,从而成为组织工程的首选种子细胞^[1-3]。因其特性而作为骨损伤修复种子细胞,被广大研究者作为中药研究对象。在其损伤修复过程中,不仅自身细胞参与损伤修复,同时自身分泌相关生长因子,促进损伤修复。由于骨损伤后局部血管破坏,或者大段骨缺损,造成局部缺血缺氧,严重者可能造成骨不连等不良后果,造成局部氧体积分数降低^[4-5],干细胞在体内缺血缺氧微环境下存活能力以及成骨和成血管生物学特性的改变,仍然需要进一步深入研究^[6]。对于缺氧状态下,如何促进其血管再生恢复、达到骨愈合是研究的难点和热点。本研究利用麝香含药血清干预低氧状态下骨髓间充质干细胞,明确其在低氧环境下对骨髓间充质干细胞成骨分化及其血管生长因子 VEGF、Angiogenin、TGF- β 、IL-6 分泌的影响,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 药物和细胞培养试剂

胎牛血清、细胞培养基均购买于 GIBCO 公司,胰蛋白酶购买于 SIGMA 公司,O92 细胞缺氧检测试剂盒购买于贝博®公司,人工麝香由甘肃中医药大学提供。

1.2 动物来源

SPF 级 SD 4 个月龄大鼠 40 只,雌雄各半,体重 220 g 左右,2 个月龄大鼠 2 只。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 采用贴壁筛选法提取骨髓间充质干细胞。大鼠脱颈处死后,75%酒精浸泡 30 min,无菌操作台上取出 SPF 级 SD 大鼠股骨和胫骨,将周围组织利用无菌纱布剥离干净,暴露髓腔。培养皿中放入细胞培养液,并对髓腔进行吹打冲洗,完毕后,利用细胞网过滤,将过滤液装入细胞培养皿中,在 37℃,5% CO₂ 孵育箱内培养,一般每 2~3 d 换细胞培养液一次。待细胞单层铺满皿底时,用胰蛋白酶消化,并以 1:2 的比例进行传代培养。

1.3.2 细胞鉴定

1.3.2.1 细胞表型鉴定(CD45、CD44、CD90):取 P3 代,胰酶消化细胞,待形态皱缩后,弃掉胰酶液体,加入

培养基,轻柔吹打,使得细胞完全浮起后,放置于离心管中,以 1 000 r/min 速度离心 10 min,弃去上层培养液;再加入 10 mL PBS 液,轻柔摇晃后,继续利用离心机以原来设定速度离心处理,如此反复 3 次;PBS 稀释一抗,稀释比例为 1:40,在 37℃避光环境下孵育约 30 min,孵育完毕后继续加入 10 mL PBS 液,继续按照原设置速度进行离心,如此反复 3 次;清洗完毕后加入 500 μ L PBS 液,然后进行细胞表型鉴定。

1.3.2.2 成骨成脂诱导:成骨诱导 7 d 后,细胞逐渐出现聚集、钙化,硝酸银染色;成脂诱导 12 d 后,油红 O 染色。

1.3.3 含药血清制备 麝香混合生理盐水按照实验动物与人体表面积等效量换算出大鼠等效用药剂量为 14.70 g/kg,空白对照组只灌服相同体积的生理盐水。2 次/d,灌胃 13 d 后,第 14 天一次服用全天剂量,1 h 内腹主动脉采集血液,3 000 r/min 速度离心 15 min,取血清,过滤除菌后-20℃冰箱保存备用。

1.3.4 血清干预 取 P3 代细胞随机分为两组,分别加麝香血清和生理盐水含药血清进行干预,所有培养液均含 5%胎牛血清和 5%制备血清,低氧浓度下培养(IG750 三气培养箱中,37℃,5% CO₂ 和 3% O₂ 条件下培养)。

1.3.5 动物饲养 在本院 SPF 级动物实验中心动物房饲养,SPF 级动物专用饲料饲养,进食、饮水无限制。

1.4 检测指标

1.4.1 细胞缺氧状态检测 分别于干预后的第 3,6,9 天利用 O92 细胞缺氧检测试剂盒染色对干细胞进行荧光标记(具体按照试剂盒说明书操作),细胞标记完成后荧光显微镜下观察不同时间点荧光显色情况,荧光亮度越强,表示细胞缺氧越明显。

1.4.2 ELISA 法碱性磷酸酶(ALP)活性测定、钙盐沉积量及骨钙素分泌量检测、VEGF 及 Angiogenin 的表达 含药血清干预后的第 3,6,9 天及第 12 天检测碱性磷酸酶含量;干预后第 12 天及第 16 天检测钙盐沉积量、骨钙素分泌量;干预后第 3,6,9 天检测血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素(Angiogenin)的表达。

1.4.3 细胞免疫组化检测 TGF- β 和 IL-6 的表达 利用细胞免疫组化检测干预后第 3,6,9 天两组转化生长因子- β (TGF- β)和白细胞介素 6(IL-6)的表达,具体

按照 TGF-β 和 IL-6 试剂盒说明书操作。

1.5 统计学方法

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,统计方法采用单因素方差分析(ANOVA),用 SPSS16.0 统计软件包进行统计处理。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点细胞显微镜下形态

显微镜下观察不同时间点细胞形态,刚开始细胞

呈现圆形,未贴壁时内含大量红细胞,两者细胞形态无明显差别,难以区分。2~3 d 后骨髓间充质干细胞贴壁,呈现短棒状,随着时间延长,可见骨髓间充质干细胞逐渐成为梭形,同时类似于神经细胞可见有细胞凸起,培养至第 3 代时,可见成梭形紧密排列。

2.2 细胞表型鉴定

细胞表型鉴定结果提示 CD45 阴性表达,CD44 及 CD90 表达阳性(见图 1)。

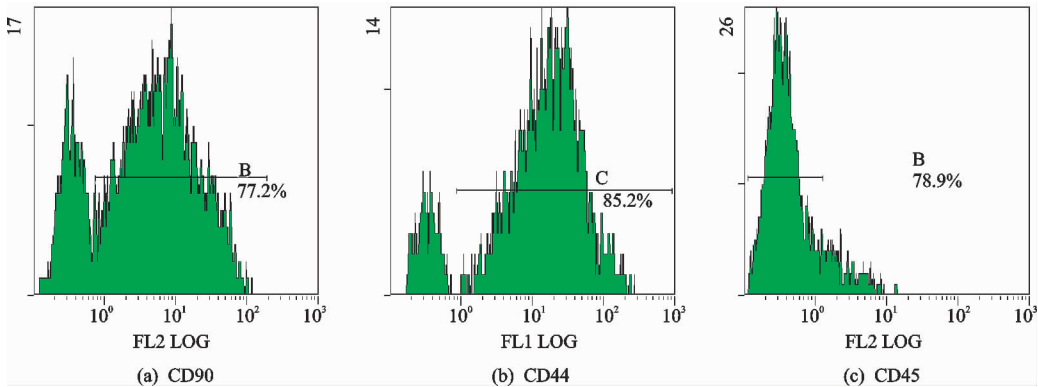


图 1 细胞表型鉴定

2.3 成骨诱导后染色

成骨诱导后硝酸银染色为黑色,油红 O 染色为红色(见图 2)。

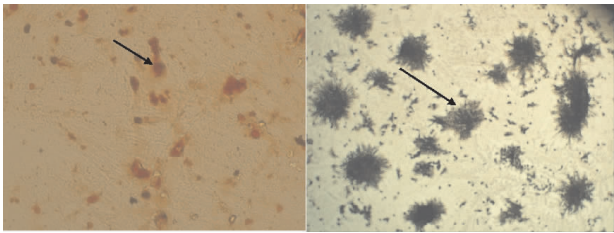


图 2 从左至右分别为成骨诱导后油红 O 染色为红色,硝酸银染色为黑色,箭头所指为钙化结节($\times 10$)

2.4 O92 细胞缺氧检测试剂盒荧光染色

分别于血清干预后第 3,6,9 天利用 O92 细胞缺氧检测试剂对细胞荧光染色,并对其观察,随着时间延长,荧光强度逐渐增强(见图 3)。

2.5 ALP 活性检测结果

麝香含药血清组 ALP 活性明显高于空白组;两组 ALP 活性在干预后第 9 天达到较高,但在第 12 天时 ALP 活性下降(见表 1)。干预后第 3,6,9,12 天麝香含药血清组 ALP 活性均高于空白组,两组仅在第 9 天时差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同时间点各组细胞 ALP 活性($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天
空白血清组	134.31 \pm 9.54	146.62 \pm 12.86	184.62 \pm 14.82	150.53 \pm 10.82
麝香含药血清组	145.28 \pm 10.62	153.92 \pm 11.94	210.59 \pm 13.08	180.85 \pm 12.38
<i>t</i>	0.428	0.381	0.291	0.429
<i>P</i>	0.429	0.328	0.031	0.127

2.6 钙盐沉积量检测

各个时间点麝香含药血清组钙盐沉积量明显高于空白血清组,两组随着时间的延长钙盐沉积量均逐渐升高(见表 2)。干预后第 12 天及第 16 天麝香含药血清组钙盐沉积量均高于空白血清组,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 骨钙素分泌量检测

干预后第 12 天及第 16 天麝香含药血清组骨钙素分泌量均高于空白血清组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 2 不同时间点各组细胞钙盐沉积量($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g}/\text{孔}$)

组别	第 12 天	第 16 天
空白血清组	65.52 \pm 2.76	100.24 \pm 2.12
麝香含药血清组	74.28 \pm 2.91	110.74 \pm 4.84
<i>t</i>	2.781	1.937
<i>P</i>	0.328	0.251

2.8 ELISA 法检测干预后第 3,6,9 天 VEGF 的表达

干预后第 3,6,9 天麝香含药血清组 VEGF 的表达均高于空白血清组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

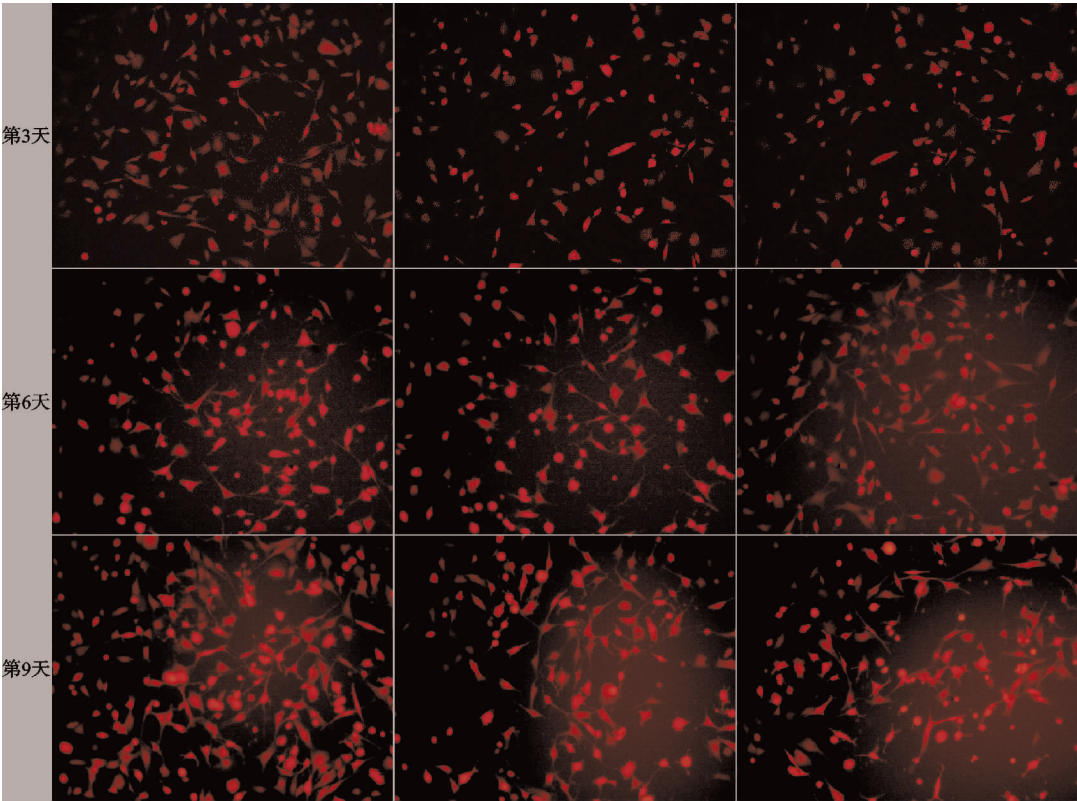


图 3 低氧培养第 3,6,9 天后,利用 O92 行细胞荧光染色,提示随着时间延长,荧光强度更强(×200)

表 3 不同时间点各组细胞骨钙素分泌量($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	第 12 天	第 16 天
空白血清组	389.69±12.88	440.62±15.86
麝香含药血清组	405.37±13.64	453.84±14.84
<i>t</i>	0.329	0.283
<i>P</i>	0.261	0.452

2.9 ELISA 法检测干预后第 3,6,9 天 Angiogenin 的表达

干预后第 3,6,9 天麝香含药血清组 Angiogenin 的表达均高于空白血清组,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

表 4 不同时间点各组细胞 VEGF 的表达($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	第 3 天	第 6 天	第 9 天
空白血清组	124.43±11.35	151.12±11.30	205.02±9.15
麝香含药血清组	139.16±12.14	165.21±14.02	215.02±14.05
<i>t</i>	1.382	2.128	2.863
<i>P</i>	0.248	0.379	0.463

表 5 各组血清干预后不同时间点 Angiogenin 的表达($\bar{x}\pm s$,ng/L)

组别	第 3 天	第 6 天	第 9 天
空白血清组	60.12±1.21	100.24±2.12	110.37±4.91
麝香含药血清组	72.43±3.21	108.45±3.21	120.51±4.64
<i>t</i>	3.284	2.137	2.846
<i>P</i>	0.482	0.427	0.482

2.10 细胞免疫组化检测 TGF-β 的表达

干预后第 3,6,9 天麝香含药血清组 TGF-β 的表达均高于空白血清组,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 6 及图 4。

表 6 不同时间点细胞免疫组化检测 TGF-β 的表达($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	第 3 天	第 6 天	第 9 天
空白血清组(A 组)	360.12±6.01	431.13±14.64	440.13±15.83
麝香含药血清组(B 组)	390.10±7.89	439.01±9.01	450.31±13.19
<i>t</i>	0.498	0.539	0.328
<i>P</i>	0.382	0.464	0.393

2.11 细胞免疫组化检测 IL-6 的表达

干预后第 3,6,9 天麝香含药血清组 IL-6 的表达稍高于空白血清组,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 7 及图 5。

表 7 不同时间点细胞免疫组化检测 IL-6 的表达($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	第 3 天	第 6 天	第 9 天
空白血清组(A 组)	286.63±9.27	295.54±10.37	305.61±11.31
麝香含药血清组(B 组)	288.37±10.15	293.62±11.61	303.58±10.74
<i>t</i>	3.287	2.473	2.418
<i>P</i>	1.328	0.945	0.429

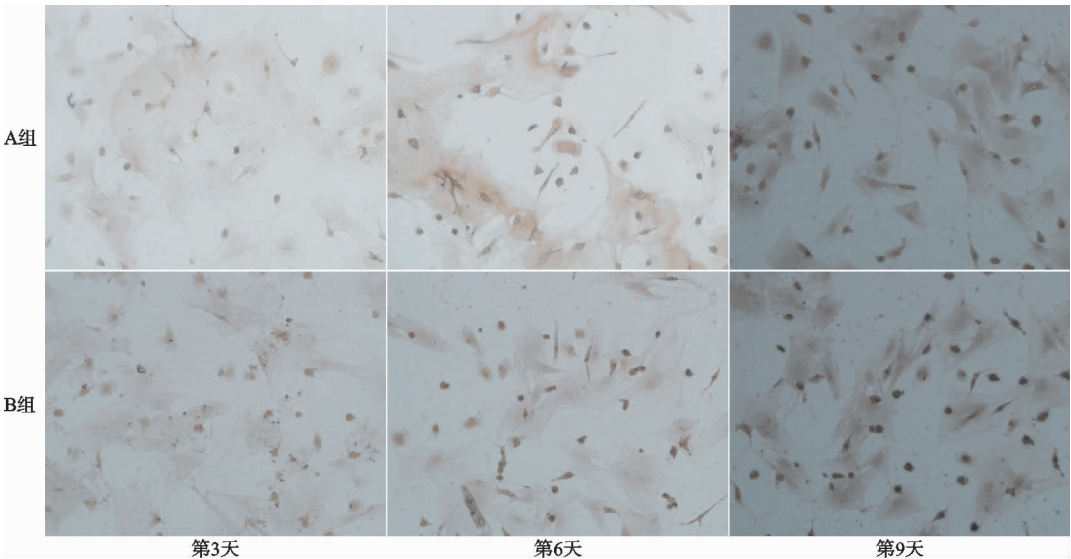


图 4 细胞免疫组化检测两组细胞低氧培养第 3,6,9 天 TGF-β 的表达,随着时间延长,TGF-β 的表达升高,且麝香含药血清组 TGF-β 的表达明显优于空白血清组($\times 200$)

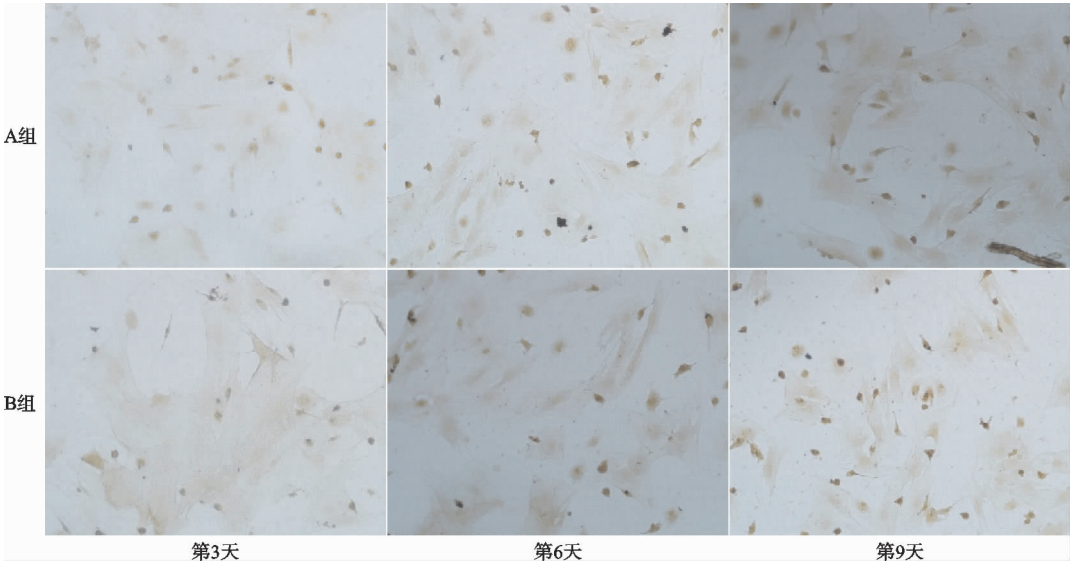


图 5 细胞免疫组化检测两组细胞低氧培养第 3,6,9 天 IL-6 的表达,随着时间延长,IL-6 的表达升高,但麝香含药血清组与空白血清组比较无明显差异($\times 200$)

麝香含药血清在低氧环境下对骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化有促进作用,对骨髓间充质干细胞分泌的血管生长因子产生不同影响。随着低氧培养时间延长,细胞缺氧逐渐加重,表现为 O92 标记的细胞荧光强度更强;麝香含药血清组碱性磷酸酶、骨钙素、钙盐沉积量明显优于空白血清组,差异有统计学意义($P<0.05$);麝香含药血清组血管生长因子 VEGF、Angiogenin、TGF-β 表达明显优于空白血清组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 IL-6 的表达两组差异无统

计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

由于骨髓间充质干细胞的多向分化特性,体外扩增容易,且低免疫原性,因此是组织工程的重要种子细胞^[7-10]。由于骨折或者其他原因引起大段骨缺损,体内干细胞参与修复时面临缺氧问题,同时也有研究表明低氧状态是机体造血过程中骨髓局部组织中的重要特性之一,骨髓间充质干细胞和造血干细胞在骨髓组织的缺氧微环境下相互作用,通过促进血管龛的作用

支持造血,而骨髓间充质干细胞是充质干细胞和造血干细胞的前体细胞^[6],因此干细胞在体内缺血缺氧微环境下存活能力及成骨和成血管生物学特性的改变,仍然需要进一步深入研究^[11]。

笔者前期研究发现麝香含药血清能够促进骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化^[12],但是其在低氧环境下对骨髓间充质干细胞的增殖、成骨分化及促进血管因子分泌作用目前尚未见到相关报道。有研究表明低氧对于细胞增殖及其成骨分化有促进作用^[6],除此之外,对于血管再生也有较好的促进作用。Kinnair等^[13-14]记录了干细胞在缺氧条件下所有细胞因子的分泌谱,发现其中有部分分泌增加,还有一部分细胞因子的分泌并没有因为缺氧而产生变化,最重要的是该研究发现缺氧虽然不能使这部分细胞因子的表达上调,但是却没有下调任何细胞因子的分泌。有研究证实经缺氧诱导的充质干细胞具有更强的生血管潜能,王雅芬等^[15]发现缺氧条件下骨髓间充质干细胞可促进血管内皮细胞的迁移和成管能力,这种机制可能在视网膜新生血管中发挥作用。宋慧芳等^[16]用低氧预处理的老年骨髓间充质干细胞培养基,可以显著改善人脐静脉内皮细胞的存活和管状结构形成能力,提示低氧预处理可以通过旁分泌方式改善老年人骨髓间充质干细胞的促血管新生能力,有望作为治疗性血管新生的有效途径。目前诸多研究表明^[17-25],缺氧对骨髓间充质干细胞有促进自身成骨分化及血管生长因子分泌的作用,但同时有研究指出低氧环境氧气不可少于1%,少于1%则可能出现抑制作用,甚至细胞死亡^[3]。

麝香气味芳香,具有走窜的特性,芳香开窍,在中医急救药品中常用。碱性磷酸酶活性、骨钙素、钙盐沉积量是判断骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的早期标志物,通过检测这些指标可以反映各种细胞向成骨细胞分化功能的强弱。笔者通过在低氧环境下培养骨髓间充质干细胞,并利用麝香含药血清干预,发现在低氧环境下麝香含药血清能够促进骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化;血管内皮生长因子是血管生成的主要调节因子,血管生成素作为分泌型单链碱性蛋白,其合成主要在肝脏中,在正常血浆和肿瘤组织中常有分布,有很强的促血管生成能力,参与血管生成的绝大部分过程。TGF- β 具有多重功能因子,在细胞增殖分化及凋亡过程中发挥重要的信使作用。IL-6是迄今为止发现的功能最为广泛的细胞因子之一,是调节免疫、形成炎症反应的重要因子,同时还参与了机体造血的调控。本研究发现麝香同时能够促进骨髓间充质干细胞分泌血管内皮生长因子、血管生成素、TGF- β ,但是其对IL-6的表达无明显影响,说明麝香在低氧环境下能够促进骨髓间充质干细胞的增殖、成骨分化,同时对于干

细胞分泌血管生长因子有促进作用。本研究尚有不足之处,目前对于麝香在氧气含量少于1%的极度缺氧环境下有无促进作用及麝香的作用机制尚不明确。总之,麝香在低氧环境下可以促进骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化及血管生长因子的分泌,还需进一步研究其作用机制和有效成分,使其应用于高原低氧环境中的细胞损伤修复。

参考文献

- [1] 徐芹芹,孙慧燕,高川成,等. miR-17介导低氧诱导间充质干细胞促血管生长因子分泌的作用与机制[J]. 军事医学,2020,44(11):821-826.
- [2] 裴培,周琦,赵小琦,等. VEGF和PDGF联合诱导的BMSCs膜片复合马鹿角粉/PVA支架的体内成血管相关研究[J]. 口腔医学,2021,41(10):872-877.
- [3] 郭辉,张于娟,魏晓光,等. 低氧环境下骨髓间充质干细胞中血管内皮生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究,2021,18(23):3627-3632.
- [4] MUINOS-LÓPEZ E, RIPALDA-CEMBORÁIN P, LÓPEZ-MARTÍNEZ T, et al. Hypoxia and reactive oxygen species homeostasis in mesenchymal progenitor cells define a molecular mechanism for fracture nonunion[J]. Stem Cells,2016,34(9):2342-2353.
- [5] COX T R, ERLER J T, RUMNEY R M H. Established models and new paradigms for hypoxia-driven cancer-associated bone disease[J]. Calcif Tissue Int,2018,102(2):163-173.
- [6] 廖红兴,张志辉,刘展亮,等. 低氧诱导因子1 α 与骨形态发生蛋白6协同过表达骨髓间充质干细胞在低氧环境下的成骨和成血管效应[J]. 中国组织工程研究,2019,23(17):2644-2650.
- [7] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science,1999,284(5411):143-147.
- [8] RANERA B, LYAHYAI J, ROMERO A, et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue[J]. Vet Immunol Immunopathol,2011,144(1/2):147-154.
- [9] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature,2001,410(6829):701-705.
- [10] LENNON D P, EDMISON J M, CAPLAN A I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis[J]. J Cell Physiol,2001,187(3):345-355.
- [11] 汪禹,陈铁龙,梁翠,等. 黄芪甲苷提高骨髓间充质干细胞缺氧微环境下耐受性的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学,2021,38(7):814-819.

(1);55.

- [30] 杨士彩,潘东,王爱国,等. 骨折的生物医学工程评价方法研究进展[J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(3): 230-233.
- [31] WEI X, ZHANG Y L, XIANG X H, et al. Exploring the relationship of bone turnover markers and bone mineral density in community-dwelling postmenopausal women[J]. Dis Markers, 2021; 6690095.
- [32] 韩学明,孙忠良,徐建华,等. 老年人血清炎症因子与骨密度变化及骨吸收相关性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(2): 221-226.
- [33] CAULEY J A, DANIELSON M E, GREENDALE G A, et al. Bone resorption and fracture across the menopausal:

the study of women's health across the nation[J]. Menopause, 2012, 19(11): 1200-1207.

- [34] CHEN J Q, LONG F X. β -catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice[J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(5): 1160-1169.
- [35] 李琰,李志航,陈云刚,等. 骨碎补水煎液经 Wnt/ β -catenin 通路对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2): 279-284.
- [36] 史岩,马秋野,喻一东,等. 骨碎补总黄酮促进骨质疏松性骨折愈合中参与 Wnt/ β -catenin 信号通路的初步研究[J]. 中医药学报, 2018, 46(2): 49-52.

(收稿日期:2022-05-01)

(上接第6页)

- [12] 姜杨,侯继野,张晓东,等. 低氧环境下 PLGA/胶原纤维支架对小鼠骨髓间充质干细胞增殖及成肌腱分化影响[J]. 中外医疗, 2020, 39(31): 1-5.
- [13] 侯婧瑛,郭天柱,于萌蕾,等. 缺氧预处理通过激活 MALAT1 靶向抑制 miR-195 促进骨髓间充质干细胞的生存和血管形成[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(7): 1005-1011.
- [14] 王诗琦,张金生. 中医药调控缺血缺氧微环境对骨髓间充质干细胞增殖、分化及衰老的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(7): 1129-1134.
- [15] 王雅芬,苏静波,王雨生. 缺氧条件下骨髓间充质干细胞对血管内皮细胞迁移和管腔形成的影响[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(1): 16-20.
- [16] 宋慧芳,谈佳音,刘阳,等. 低氧预处理通过激活低氧诱导因子 1 α 增强老年人骨髓间充质干细胞促血管新生能力[J]. 解剖学报, 2022, 53(1): 35-41.
- [17] 陈海燕,张秋菊. 低氧条件下 BMSCs 来源外泌体激活 HIF-1 α /VEGF/JNK 通路促进血管再生的机制研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 31(14): 33-37.
- [18] 胡继宏,贾佳,路娟,等. 低氧下血管内皮细胞生长因子转染人骨髓间充质干细胞向血管内皮样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(9): 1352-1356.

- [19] 左新慧,李君,韩祥祯,等. 低氧诱导因子-1 α 对骨髓间充质干细胞成骨分化与血管生成相关因子的影响[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(7): 449-452.
- [20] 刘红,俞小芳,滕杰,等. 低氧预处理对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖、凋亡和坏死的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2012, 39(6): 558-564.
- [21] 黄晓雄,陈维凯,刘滔,等. 低氧预处理改善去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化潜能[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(13): 2130-2135.
- [22] 汪仵骁,吴恒鹏,万雪,等. miR-30b 在低氧环境中调控兔骨髓间充质干细胞成软骨分化[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(24): 3113-3118.
- [23] 张磊,龚跃昆,尹勇. OGP 对低氧环境中小鼠 BMSCs 成脂分化影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(5): 670-674.
- [24] 王诗琦,惠小珊,张金生,等. 补肾化瘀生新方对缺血缺氧微环境下骨髓间充质干细胞生存率及凋亡率的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(8): 1259-1264.
- [25] 张宝霞,张金生,惠小珊. 补肾化瘀生新方改善缺血缺氧性微环境延缓骨髓间充质干细胞衰老的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 87-92.

(收稿日期:2022-07-05)