

老鸛草素对小鼠骨髓基质干细胞成骨分化相关基因表达的影响

张哲^{1*}, 徐秀娟², 刘欣¹, 张彦芬³, 唐思文³, 王海荣³

(1. 河北省人民医院 省老年医学重点实验室, 石家庄 050051; 2. 河北医科大学 口腔医院, 石家庄 050017; 3. 河北以岭医药研究院有限公司, 石家庄 050035)

[摘要] **目的:**观察老鸛草素对小鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化的影响,并对成骨分化过程中相关基因表达进行检测。**方法:**分离、培养小鼠 BMSCs,加入不同浓度老鸛草素(1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol·L⁻¹)培养,另设空白组,分别于成骨诱导第7,14天采用碱性磷酸酶(ALP),骨钙素(OCN)试剂盒测定ALP活性及OCN含量,并进行ALP染色。于成骨诱导第21天时采用茜素红染色检测成骨分化过程中钙结节形成数量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 BMSCs成骨分化过程中OCN,ALP,骨涎蛋白(BSP),Runx2相关转录因子2(Runx2)mRNA和蛋白表达的变化。**结果:**与空白组比较,成骨诱导后第7,14天时,老鸛草素各剂量组ALP活性,OCN含量及ALP染色强度均明显升高($P < 0.05$),成骨诱导第21天时,老鸛草素各剂量组矿化结节数量及OCN,ALP,BSP,Runx2 mRNA和蛋白表达均明显升高($P < 0.05$)。**结论:**老鸛草素能够明显促进 BMSCs向成骨方向分化,成骨相关基因OCN,ALP,BSP,Runx2均参与这一过程。

[关键词] 老鸛草素; 骨髓基质干细胞; 成骨分化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0140-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220140

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1336.034.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 13:36

Effect of Geraniin on Osteogenic Gene Expression of Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Induction

ZHANG Zhe^{1*}, XU Xiu-juan², LIU Xin¹, ZHANG Yan-fen³, TANG Si-wen³, WANG Hai-rong³

(1. Key Laboratory of Geriatrics, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China;

2. Stomatological Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

3. Hebei Yiling Medicine Institute Co. Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of geraniin on the osteogenic gene expression of murine bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) during osteogenic induction. **Method:** BMSCs were isolated from mice bones, and cultured with different concentration of geraniin (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol·L⁻¹). The blank group was also set up. After 7, 14 days of osteogenic induction, the activity of alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin (OCN) content were detected, and ALP staining was performed. Alizarin red staining was adopted to detect calcium deposits on 21 d. Real-time PCR and Western blot were applied to detect the changes in expressions of osteoblast differentiation marker genes OCN, ALP, bone sialoprotein (BSP), Runx2. **Result:** At 7, 14 d of osteogenic induction, geraniin groups showed significant increases in ALP activity, OCN content and ALP staining intensity, compared with control group ($P < 0.05$). At 21 d of osteogenic induction, geraniin groups showed significant increases in the number of mineralized nodule, and the mRNA and protein expressions of OCN, ALP, BSP and Runx2 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Geraniin could induce osteogenic differentiation of BMSCs. Osteoblast

[收稿日期] 20151010(017)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2015137)

[通讯作者] * 张哲,博士,助理研究员,从事老年病研究,Tel:0311-85988007,E-mail:zhe_zhang80@126.com

differentiation marker genes OCN, ALP, BSP and Runx2 participate in this process.

[Key words] geraniin; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨微结构破坏、骨折风险加大为特征的全身骨代谢疾病,好发于老年人和绝经后妇女^[1]。研究证实,骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)是多功能干细胞,在不同诱导因素作用下具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等中胚层组织细胞分化的重要潜能^[2-3]。由于其易于获取,体外增殖能力强,已经成为基因治疗、骨组织工程研究的理想种子细胞,也是干细胞研究领域的热点^[4]。大量研究证实,传统中药能够诱导 BMSCs 增殖及向成骨细胞方向分化,如淫羊藿苷、肉苁蓉、接骨散等^[5-7]。老鹳草素是从滇产叶下株植物全草中分离提取的一种多酚类化合物。现代药理学研究发现,老鹳草素具有镇痛、降压、抗肿瘤等多种药理作用,多用于治疗肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿等病症。在骨再生研究领域,有学者研究发现老鹳草素对维甲酸导致的大鼠骨质疏松症具有明显的保护作用,体外实验证实老鹳草素对破骨细胞骨吸收的抑制是其发挥抗骨质疏松作用的机制之一^[8-9]。然而,老鹳草素是否具有调控骨髓基质干细胞骨向分化的作用目前尚缺乏相关研究。本研究通过体外分离培养小鼠 BMSCs,探讨老鹳草素诱导 BMSCs 成骨分化的可能性,并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测参与此过程的相关基因表达的变化,为老鹳草素在骨质疏松治疗领域的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,6~8 周龄,体重(20.15±2.21)g,购于北京华阜康生物公司,动物合格证号 SCXK(京)2009-0004。

1.2 药物及试剂 老鹳草素(纯度 99.0%,由中国科学院昆明植物研究所提供)。DMEM/F12 培养基, I 型胶原酶,胎牛血清及青/链霉素(美国 Gibco 公司,批号分别为 1324365, 1214233, 1376128, 1241525);碱性磷酸酶(ALP),骨钙素(OCN)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20140214, 20140527);茜素红(美国 Sigma 公司,批号 130223);兔抗 OCN, ALP, 骨涎蛋白(BSP), Runt 相关转录因子 2(Runx2), β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-6823, sc-7145, sc-6951, sc-5875, sc-7724);细胞裂解液,辣

根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体,BCA 蛋白浓度测定试剂盒及高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 20130462, 20130835, 20130821, 20130673);反转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号 DRR047S), Trizol 及 Real-time PCR 试剂盒(美国 Promega 公司,批号分别为 AS1050, AS1867)。

1.3 仪器 960 型酶标仪(美国 Sigma 公司), Chemi Doc™ XRS⁺ 型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), 7300 型 Real-time PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 参照 Hsiao 等^[10]报道的方法,小鼠断颈处死,用 70% 乙醇浸泡 10 min, 无菌条件下取出股骨、胫骨,剪去两侧骨骺。用 1 mL 注射器抽取含 20% 胎牛血清, 1% 青/链霉素, 1% 谷氨酰胺的 DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞,70 目筛网过滤,以 25×10^6 个/cm² 密度接种。每 3 d 换液 1 次,待细胞生长至 80%~90% 融合, 0.25% 胰酶消化,按 1:3 比例传代培养。选取第 3~4 代的细胞用于实验。

2.2 成骨诱导分化 细胞以 3×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板,待细胞生长至 80%~90% 融合时分别加入含 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol·L⁻¹ 老鹳草素的成骨诱导分化培养基(DMEM-高糖中含有 10% FBS, 1% 双抗, 100 nmol·L⁻¹ 地塞米松, 10 mmol·L⁻¹ β -磷酸甘油, 50 μ mol·L⁻¹ 维生素 C),另设完全培养基组作为空白组,每 3 d 换液 1 次。

2.3 ALP 活性测定 给药 7, 14 d 后吸弃培养液, Triton X-100 裂解细胞, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 提取蛋白,依次加入 50 μ L 碱性磷酸酶底物反应液和显色剂,酶标仪 405 nm 波长处测定吸光度 A_{405} 。

2.4 OCN 含量测定 细胞裂解后 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清 100 μ L,按照 OCN 放免试剂盒说明书检测 OCN 含量。

2.5 ALP 染色 给药 7, 14 d 后吸弃培养液,乙醇固定 10 min, PBS 冲洗 3 次,加入 ALP 染色液 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h,依次加入 70 g·L⁻¹ 硝酸钙和 20 g·L⁻¹ 硝酸钴,各浸泡 2 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次, 10 g·L⁻¹ 硫化铵显色后拍照。

2.6 茜素红染色 各组细胞诱导培养 21 d,多聚甲

醛固定 30 min,去离子水洗 3 次,室温下 0.5% 茜素红染色 30 min,去离子水冲洗干净,观察矿化结节形成情况并计数单位视野内矿化结节数量。

2.7 Real-time PCR 检测 Trizol 提取细胞总 RNA,按照试剂盒说明书加样进行逆转录反应,Real-time PCR 仪扩增。引物序列见表 1,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。用仪器自带的分析软件得到各样本、各基因扩增的循环阈值(C_t)值,以 β -actin 为内参照基因,目的基因表达相对值 $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Specific primers for PCR

基因名称	引物序列/5'-3'
OCN	上游 GCCCTGACTGCATTCTGCCTCT
	下游 TCACCACCTTACTGCCCTCCTG
ALP	上游 TATGTCTGGAACCGCACTGAAC
	下游 CACTAGCAAGAAGAAGCCTTTGG
BSP	上游 AAACGAAGAAAGCGAAGCAGAA
	下游 GCTGCCGTTGCCGTTTT
Runx2	上游 ATCCAGCCACCTTCACTTACACC
	下游 GGGACCATTGGGAAGTATGATAGG
β -actin	上游 GGGTCAGAAGGATTCCTATG
	下游 GGTCTCAAACATGATCTGGG

2.8 Western blot 检测 提取细胞总蛋白,半干法电泳转移至 PVDF 膜,10% 脱脂奶粉封闭 2 h。依次加入特异性一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,

表 2 老鹤草素对 BMSCs ALP 活性和 OCN 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of geraniin on ALP activity and OCN content of BMSCs($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mol·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹		OCN/g·L ⁻¹	
		7 d	14 d	7 d	14 d
空白	-	1.17 ± 0.16	1.19 ± 0.19	4.68 ± 0.62	4.70 ± 0.68
老鹤草素	1 × 10 ⁻⁹	1.40 ± 0.22 ¹⁾	1.59 ± 0.26 ¹⁾	6.05 ± 0.79 ¹⁾	7.11 ± 0.10 ¹⁾
	1 × 10 ⁻⁸	1.61 ± 0.27 ^{1,2)}	1.80 ± 0.30 ^{1,2)}	7.82 ± 0.98 ^{1,2)}	9.05 ± 1.42 ^{1,2)}
	1 × 10 ⁻⁷	1.94 ± 0.28 ^{1,3)}	2.18 ± 0.34 ^{1,3)}	10.01 ± 1.65 ^{1,3)}	12.66 ± 1.97 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与老鹤草素 1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹组比较²⁾ $P < 0.05$;与老鹤草素 1 × 10⁻⁸ mol·L⁻¹组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

3.3 对 BMSCs 成骨相诱导及 ALP 染色的影响 老鹤草素各剂量组 ALP 染色较空白组明显加深($P < 0.05$);诱导 14 d 时,老鹤草素各剂量组染色均较 7 d 时明显加深($P < 0.05$),呈显著剂量依赖性。

3.4 对 BMSCs 矿化结节形成的影响 成骨诱导培养 21 d 时,老鹤草素各剂量组矿化结节数量较空白组明显增加($P < 0.05$),呈显著剂量依赖性。见表 3。

化学发光法显色、定影。用 UVP 软件扫描测定蛋白条带 IA 值, β -actin 作为内参照,以目的蛋白与 β -actin 吸光度值的比值表示目的蛋白相对表达水平。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包处理数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Dunnett 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BMSCs 的培养和鉴定 BMSCs 接种于培养瓶后散在分布,呈较小的圆形。24 h 后细胞贴壁良好。72 h 后首次换液去除未贴壁的细胞,3 ~ 4 d 后细胞呈梭形、星形或三角形,6 ~ 7 d 后细胞快速增殖呈“漩涡状”。7 ~ 9 d 后集落数目继续增加,呈均一的梭形。细胞传代后生长均匀,胞体明显增加,呈梭形或纤维样形态。流式细胞仪分析 BMSCs 表面抗原表达,与同型对照相比第 3 ~ 4 代小鼠 BMSCs 高表达 CD44,阳性率为 26.2%,低表达 CD45,阳性率为 2.56%,提示实验所培养的细胞具有 BMSCs 干细胞特征。

3.2 对 BMSCs ALP 活性和 OCN 含量的影响 小鼠 BMSCs 经成骨诱导 7 d 后,老鹤草素各剂量组 ALP 活性和 OCN 含量均较空白组明显增加($P < 0.05$),诱导 14 d 时,老鹤草素各剂量组 ALP 活性和 OCN 含量均较 7 d 时明显升高($P < 0.05$),呈显著剂量依赖性。见表 2。

表 3 老鹤草素对 BMSCs 矿化结节形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of geraniin on mineralized nodules of BMSCs($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mol·L ⁻¹	矿化结节数量/个
空白	-	6.47 ± 0.81
老鹤草素	1 × 10 ⁻⁹	12.68 ± 1.76 ¹⁾
	1 × 10 ⁻⁸	20.22 ± 3.54 ^{1,2)}
	1 × 10 ⁻⁷	33.24 ± 4.62 ^{1,3)}

3.5 对 BMSCs 成骨分化相关基因表达的影响 老鹤草素各剂量组 OCN, ALP, BSP, Runx2 mRNA 和蛋

白表达均较空白组明显增加 ($P < 0.05$), 呈显著剂量依赖性。见表 4, 5, 图 1。

表 4 老鹤草素对 BMSCs 成骨分化中 OCN, ALP, BSP, Runx2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

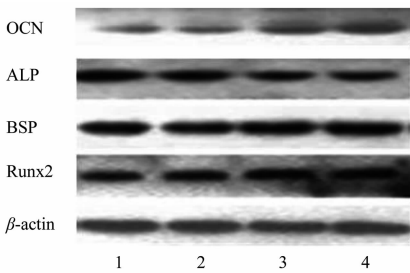
Table 4 Effect of geraniin on OCN, ALP, BSP, Runx2 mRNA expression of BMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mol·L ⁻¹	OCN/ β -actin	ALP/ β -actin	BSP/ β -actin	Runx2/ β -actin
空白	-	0.58 ± 0.08	0.77 ± 0.12	0.64 ± 0.09	0.60 ± 0.07
老鹤草素	1 × 10 ⁻⁹	0.72 ± 0.11 ¹⁾	0.95 ± 0.15 ¹⁾	0.91 ± 0.15 ¹⁾	0.87 ± 0.12 ¹⁾
	1 × 10 ⁻⁸	0.98 ± 0.14 ^{1,2)}	1.21 ± 0.20 ^{1,2)}	1.25 ± 0.20 ^{1,2)}	1.17 ± 0.14 ^{1,2)}
	1 × 10 ⁻⁷	1.20 ± 0.18 ^{1,3)}	1.46 ± 0.24 ^{1,3)}	1.42 ± 0.21 ^{1,3)}	1.37 ± 0.19 ^{1,3)}

表 5 老鹤草素对 BMSCs 成骨分化中 OCN, ALP, BSP, Runx2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of geraniin on OCN, ALP, BSP, Runx2 protein expression of BMSCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mol·L ⁻¹	OCN/ β -actin	ALP/ β -actin	BSP/ β -actin	Runx2/ β -actin
空白	-	0.48 ± 0.07	0.66 ± 0.11	0.57 ± 0.08	0.51 ± 0.08
老鹤草素	1 × 10 ⁻⁹	0.62 ± 0.09 ¹⁾	0.80 ± 0.13 ¹⁾	0.78 ± 0.13 ¹⁾	0.69 ± 0.11 ¹⁾
	1 × 10 ⁻⁸	0.84 ± 0.12 ^{1,2)}	1.06 ± 0.15 ^{1,2)}	1.12 ± 0.18 ^{1,2)}	0.93 ± 0.15 ^{1,2)}
	1 × 10 ⁻⁷	1.13 ± 0.15 ^{1,3)}	1.39 ± 0.21 ^{1,3)}	1.32 ± 0.20 ^{1,3)}	1.26 ± 0.21 ^{1,3)}



1. 空白组; 2. 老鹤草素 1 × 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 组; 3. 老鹤草素 1 × 10⁻⁸ mol·L⁻¹ 组; 4. 老鹤草素 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 组

图 1 Western blot 检测老鹤草素对 BMSCs 成骨分化中 OCN, ALP, BSP, Runx2 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of geraniin on OCN, ALP, BSP, Runx2 protein expression of BMSCs with Western blot

4 讨论

向成骨细胞分化是 BMSCs 的重要潜能,也是 BMSCs 用于骨再生的基础。如何能有效的刺激 BMSCs 向成骨细胞分化和(或)抑制其向其他方向分化,在骨组织工程学和骨质疏松治疗学方面具有重要价值。研究发现, BMSCs 在成骨细胞分化诱导剂作用下能够向成骨细胞方向分化,并且表达多种特异性表型基因,如 OCN, ALP, BSP, Runx2 等,同时特异性成骨细胞产物分泌增多,如 ALP 活性, OCN 含量及矿化结节形成增加等^[11-12]。其中, ALP 是细胞膜上的一种钙结合转运蛋白,可作为成骨细胞分化的早期标志物,其活性高低可以反应成骨细胞的成熟状态^[13]。OCN 是骨基质中含量最多的非胶原蛋白,也是成骨细胞分化的晚期标志物,其含量高低

可作为判断药物干预下 BMSCs 成骨分化能力的参考指标^[14-15]。细胞外基质的矿化是成骨细胞特异性生物学行为,茜素红染色则能够直接观察矿化结节形成数量。本实验采用 ALP, OCN 及矿化结节形成作为判断 BMSCs 向成骨细胞分化的指标。结果显示,老鹤草素各剂量组 BMSCs 经成骨诱导培养 7 d 后,小鼠 BMSCs 培养液中 ALP 活性和 OCN 含量明显增加, ALP 染色明显加深,并随着培养时间延长逐渐增加,且 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 老鹤草素作用最强;在成骨诱导培养 21 d 时,矿化结节数量明显增加,且 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 老鹤草素作用最强。以上结果表明,老鹤草素能够明显促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化。

为了进一步验证以上结果,笔者分别从 mRNA 和蛋白表达水平对不同剂量老鹤草素干预后小鼠 BMSCs 中成骨相关基因表达进行了检测。Runx2, 又称核心结合因子,是成骨细胞分化的早期标志物,具有增加不成熟成骨细胞数量并促进前体细胞向成骨细胞分化的作用,被作为成骨细胞特异性转录因子和成骨细胞分化的关键因子,其表达水平降低必然导致成骨细胞分化能力减弱^[16]。BSP 是骨基质中主要的非胶原蛋白之一,主要表达于成熟成骨细胞,是成骨分化的晚期标志物。本研究结果显示,老鹤草素各剂量组 BMSCs 经成骨诱导培养 21 d 时能够明显上调成骨分化早期基因 ALP, Runx2 和晚期基因 OCN, BSP mRNA 和蛋白表达,从基因水平反映

出 BMSCs 成骨分化能力增强。茜素红染色结果亦表明,老鹳草素各剂量组均有不同程度的矿化结节形成,进一步证实老鹳草素能够促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化,形成矿化结节,且老鹳草素促进小鼠 BMSCs 成骨分化的作用机制可能与从转录和翻译后多水平调控 ALP, Runx2, OCN, BSP 基因表达有关。因此调控 ALP, Runx2, OCN, BSP 基因表达是老鹳草素诱导 BMSCs 向成骨细胞分化的重要分子靶点。

综上所述,本研究结果表明老鹳草素能够在细胞水平和基因水平诱导 BMSCs 向成骨方向分化,老鹳草素可调控 BMSCs 的定向分化平衡而对抗骨质疏松症的发生发展,这对于将老鹳草素应用于骨再生研究具有重要指导意义。但老鹳草素诱导 BMSCs 定向成骨分化的具体信号转导通路尚不清楚,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 黄思敏,王俊玲,魏秋实,等. 糖皮质激素双向调节骨髓基质干细胞的分化机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014,20(11): 1379-1382.

[2] 谭荣邦,史宏灿. 体外诱导骨髓间充质干细胞定向分化为软骨细胞的实验研究[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2013,20(3): 325-328.

[3] 胡颖,姜欢,杜毅. 稀土元素铈对骨髓间充质干细胞成骨分化调控的体外实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2014,24(11): 639-641.

[4] 谢小伟,裴福兴,康鹏德,等. 锶盐联合淫羊藿苷对大鼠骨髓基质干细胞成骨及成脂分化影响的研究[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(5): 450-458.

[5] 谢兴文,宋敏,金成强,等. 接骨散含药血清对骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,19(6): 1-3.

[6] 翟远坤,王鸣刚,李志忠,等. 淫羊藿苷含药血清对体外培养骨髓间充质干细胞增殖及成骨性分化的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2): 480-484.

[7] Zheng D, Peng S, Yang S H, et al. The beneficial effect of Icaritin on bone is diminished in osteoprotegerin-deficient mice [J]. *Bone*, 2012, 51(1): 85-92.

[8] 张小超,郭蕴萍,何波,等. 老鹳草素对破骨细胞 II 型碳酸酐酶 mRNA 表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1): 32-34.

[9] 张小超,何波,陈鹏,等. 老鹳草素对破骨细胞体外骨吸收功能的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2012, 33(8): 1-5.

[10] Hsiao F S, Cheng C C, Peng S Y, et al. Isolation of therapeutically functional mouse bone marrow mesenchymal stem cells within 3 h by an effective single-step plastic-adherent method [J]. *Cell Prolif*, 2010, 43(3): 235-248.

[11] 王晓东,虎松艳,王金枝,等. 锶盐对高浓度地塞米松作用下大鼠成骨细胞的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(7): 807-811.

[12] Kaewsrichan J, Wongwitwichot P, Chandarajoti K, et al. Sequential induction of marrow stromal cells by FGF2 and BMP2 improves their growth and differentiation potential in vivo [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(1): 90-101.

[13] 王国栋,吴少云,韩金祥,等. rhBMP-7 对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10): 1025-1028.

[14] Xue P, Wu X, Zhou L, et al. IGF1 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow by increasing TAZ expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(2): 226-231.

[15] 王月,吕志伟,张天宇. 辛伐他汀对骨髓基质干细胞成骨分化晚期骨钙素表达的影响[J]. *中国煤炭工业医学*, 2014, 17(7): 1135-1137.

[16] 吴欢欢,巩福星,王黔,等. 人骨髓基质干细胞体外成骨分化过程中成骨相关基因的动态表达[J]. *中国美容医学*, 2011, 20(4): 588-591.

[责任编辑 周冰冰]