

左归丸通过线粒体途径抗叔丁基过氧化氢诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡

刘立萍¹, 李雪峰¹, 姜波², 张澜川¹, 曲根生³, 李然^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110032; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;
3. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**观察左归丸对叔丁基过氧化氢诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的保护效应,探讨其作用机制是否与其干预线粒体途径有关。**方法:**以成骨细胞 MC3T3-E1 为研究对象,制备左归丸含药血清,建立叔丁基过氧化氢(t-BHP)成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激模型,实验分为空白组,t-BHP 组,左归丸+t-BHP 组,补佳乐+t-BHP 组。孵育 24,48,72 h 后,采用噻唑蓝(MTT)法检测左归丸含药血清对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞存活的影响;孵育 48 h 后,采用吖啶橙溴乙啶(AO/EB)染色法检测细胞凋亡,采用 Hoechst 33342 染色法观察凋亡细胞核变化,采用罗丹明 123 荧光染色法观察线粒体膜电位的改变,采用蛋白质免疫印迹(Western blot)法分析线粒体蛋白家族 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,t-BHP 组显著抑制细胞增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$),细胞凋亡增加,线粒体膜电位降低,Bcl-2 蛋白表达明显下调($P < 0.01$);与 t-BHP 组比较,左归丸加 t-BHP 组促进暴露于 t-BHP 诱导的 MC3T3-E1 氧化损伤细胞的存活($P < 0.01$),48 h 者尤佳,逆转细胞凋亡情况,提高细胞线粒体膜电位,上调 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.05$),抑制 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达($P < 0.01$)。**结论:**左归丸含药血清能够抗 t-BHP 诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡,其作用机制可能与其干预线粒体途径有关。

[关键词] 氧化应激;成骨细胞;细胞凋亡;线粒体途径;左归丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0117-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017090117

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170214.1623.060.html>

[网络出版时间] 2017-02-14 16:23

Protective Effect of Zuoguiwan on Tert-butyl Hydroperoxide-induced MC3T3-E1 Cell Apoptosis via Mitochondria-dependent Pathways

LIU Li-ping¹, LI Xue-feng¹, JIANG Bo², ZHANG Lan-chuan¹, QU Gen-sheng³, LI Ran^{1*}

(1. Basic Medical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
3. The First Clinical College, Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects of Zuoguiwan (ZGW) on tertiary butyl hydroperoxide-induced MC3T3-E1 cell apoptosis, in order to study the possible mechanisms of ZGW via mitochondria-dependent pathways. **Method:** ZGW drug-contained serum was prepared. With murine osteoblastic MC3T3 cells as the research object, the oxidative stress model was established by tertiary butyl hydroperoxide (t-BHP), and then divided into 3 groups, blank control group, t-BHP group, ZGW + t-BHP group and Estradiol

[收稿日期] 20160818(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503488);中国博士后科学基金面上项目(2014M551123);辽宁省大学生创新创业训练计划项目(201510162000027)

[第一作者] 刘立萍,博士,副教授,硕士生导师,从事中医方药理论与作用机制研究,Tel: 024-31207086,E-mail: fangji2013@163.com

[通讯作者] *李然,博士,副教授,硕士生导师,从事方剂配伍与作用机制研究,Tel: 024-31207085,E-mail: lnliiran@163.com

Valerate + t-BHP group. After incubation for 24, 48, 72 hours, the effects of ZGW on viability and apoptosis of t-BHP-induced MC3T3-E1 cells were investigated by MTT assay. After incubation for 48 hours, cell apoptosis was measured by acidine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining. The changes of nucleus were observed by Hoechst 33342 staining. The changes of mitochondrial membrane potential were analyzed with rhodamine 123 (Rh123) staining. Western blot analysis was used to evaluate expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expressions. **Result:** Compared with blank model group, the proliferation of MC3T3-E1 cell was significantly inhibited in t-BHP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), cell apoptosis increased, mitochondrial membrane potential decreased, and the protein expression of Bcl-2 was significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with t-BHP group, the survival of MC3T3-E1 cells exposed to the oxidative damage induced by t-BHP was promoted in ZGW + t-BHP group ($P < 0.01$), particularly at 48 h, cell apoptosis reduced, mitochondrial membrane potential significantly improved, and the protein expression of Bcl-2 was increased ($P < 0.05$), while Bax and caspase-3 expression were decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Drug-contained serum of ZGW can inhibit t-BHP-induced MC3T3-E1 cell apoptosis. The possible mechanism may be related to mitochondria-dependent pathways.

[Key words] oxidative stress; osteoblasts; apoptosis; mitochondria-dependent pathways; Zuoguiwan

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量降低和骨组织微观结构改变为主要特征的代谢性骨病, 骨形成与骨吸收间的平衡状态被打破, 成骨细胞降低, 破骨细胞增加。OP 与氧化应激水平密切相关, 细胞内的活性氧 (reactive oxidative species, ROS) 诱导的氧化应激影响成骨细胞和破骨细胞, 引起骨代谢紊乱, 影响老年患者骨密度。氧化应激对老年原发性骨质疏松症的发生和发展起重要影响, 抗氧化治疗可能对该病有一定的疗效^[1]。过氧化氢处理后 MC3T3-E1 成骨细胞的骨形成过程减慢, 氧化应激增强^[2], 细胞增殖明显抑制, ROS 活性和凋亡增加, 线粒体膜电位降低^[3]。OP 属于中医“骨痿”、“骨痹”等范畴, 肾精亏虚为其本, 补肾填精法为其有效治法。左归丸出自《景岳全书》, 是补肾填精之代表方剂。前期研究表明左归丸具有抗衰老和逆转过氧化氢升高作用^[4], 本研究进一步观察左归丸对叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, t-BHP) 诱导的成骨细胞 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响, 探讨其作用机制是否与其干预线粒体途径有关。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雌性大鼠 45 只, 体重 (200 ± 20) g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (辽) 2010-0001。所有动物实验研究均符合辽宁中医药大学伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 细胞培养 MC3T3-E1 Subclone 14, 由中国科学院上海生命科学研究院提供。MC3T3-E1 成骨细胞用含 10% FBS 的 α -MEM 培养液培养, 每周换 2 次培养液, 37 °C 5% CO₂ 培养箱内孵育。

1.3 药物及试剂 左归丸原方用熟地黄 24 g, 山药 (炒)、枸杞子、山茱萸、龟甲胶、鹿角胶、菟丝子各 12 g, 川牛膝 9 g, 上述中药饮片购于辽宁中医药大学附属医院; 补佳乐 (戊酸雌二醇片, 批号 151A); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Genview 公司, 批号 298-93-1); t-BHP, 吖啶橙 (AO), 溴乙锭 (EB), 罗丹明 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 19997, 0360, 0492, 83702); 赫斯特染色 (Hoechst) 33342 (北京雷根公司, 批号 0620A14), 抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 抗体、抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体、抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体、抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 A1615, B1115, 12010, E0610)。

1.4 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), TS100 型倒置生物显微镜 (日本 Nikon 公司), IX71 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), iMark 型全自动酶标仪及 Trans-Blot SD 型半干转印系统 (美国 Bio-Rad 公司), FluorChem Q 型蛋白质印迹成像系统 (美国 Proteinsimple 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 大鼠按体重随机分为 3 组, 正常组、左归丸组、补佳乐组, 每组 15 只。根据人与大鼠等剂量换算公式折算大鼠左归丸的等临床剂量为 9.68 g · kg⁻¹ 体重^[5], 补佳乐的等临床剂量为 0.09 mg · kg⁻¹ 体重。灌服 10 mL · kg⁻¹, 正常组灌服蒸馏水, 1 次/d, 于第 8 天给药 2 h 后, 麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 2 h, 2 500 r · min⁻¹ 离心 20 min, 收集血清, 56 °C 灭活 30 min, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 于 -80 °C 保存。

2.2 细胞实验分组 分为 4 组,分别是空白组, t-BHP 组,左归丸 + t-BHP 组及补佳乐 + t-BHP 组。

2.3 细胞增殖测定 取第 3 代细胞,以 1×10^5 个细胞接种于 96 孔培养板,24 h 后,换用含 0.2% FBS 的 α -MEM 培养液饥饿 24 h,换用不含或含 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ t-BHP 的 α -MEM 培养液,80 μL /孔,预处理 60 min。各组加入相应的含药血清,20 μL /孔,分别孵育 24,48,72 h 后,换用 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液,10 μL /孔,于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱内孵育 4 h,弃孵育液,每孔加入 100 μL DMSO,振荡混匀 15 min。待沉淀完全溶解后,酶标仪上 490 nm 测定吸光度 A 。

2.4 吖啶橙溴乙啶 (AO/EB) 染色法检测细胞凋亡 MC3T3-E1 细胞以 2×10^4 个细胞接种于 24 孔板,孵育 24 h 后,换用含 0.2% FBS 的 α -MEM 培养液饥饿 24 h,换用不含或含 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ t-BHP 的 α -MEM 培养液干预 48 h。弃培养基,PBS 洗涤 3 次后,加 AO/EB 溶液 ($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),400 μL /孔,37 $^\circ\text{C}$ 避光染色 20 min 后,吸去染色液,PBS 洗涤 2 次,在荧光显微镜下观察细胞情况。活细胞的形态规则,呈绿色荧光;早期凋亡细胞核聚缩,染色质呈黄色荧光;晚期凋亡细胞核聚缩碎裂,染色质呈橙黄色荧光;坏死细胞核呈圆形,染色质呈亮橙黄色荧光。

2.5 Hoechst 33342 染色法检测凋亡细胞核形态 细胞染色前处理同 2.4 项,弃去培养基,PBS 洗涤 3 次后,加入 Hoechst 33342 染色液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),400 μL /孔,室温避光染色 10 min 后,吸去染色液,PBS 洗涤 1 次,在荧光显微镜下观察各组细胞核的形态变化并拍照。正常细胞核和凋亡细胞核均染成蓝色,但凋亡细胞核呈高亮度荧光,或核破裂状。

2.6 罗丹明 123 荧光染色法观察线粒体膜电位的改变 细胞染色前处理同 2.4 项,加入罗丹明 123

溶液 ($20 \mu\text{m} \cdot \text{L}^{-1}$),400 μL /孔,37 $^\circ\text{C}$ 避光染色 20 min 后,吸去染色液,PBS 洗涤 2 次,在荧光显微镜下观察线粒体膜电位的改变,荧光强度反映线粒体膜电位的高低。

2.7 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 分析 取第 3 代 MC3T3-E1 细胞,以 2×10^6 接种于 25 cm^2 培养瓶,融合达 80%,换用含 0.2% FBS 的 α -MEM 培养液饥饿 24 h,换用不含或含 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ t-BHP 的 α -MEM 培养液 4 mL,预孵育细胞 60 min 后,各组加入相应的含药血清,1 mL/瓶,孵育 48 h。用总蛋白提取试剂提取总蛋白,离心取上清,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,-80 $^\circ\text{C}$ 保存。提取液中加入 $5 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液,100 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min,蛋白上样每孔含 60 μg 蛋白,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜 3 h,5% 脱脂奶粉 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 1 h。一抗 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜 5 min \times 3 次,二抗山羊抗兔 HRP 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,TBST 洗膜 5 min \times 3 次。FluorChem Q 蛋白质印迹成像系统中 ECL 发光显色并采集图像,将目的蛋白与内参 β -actin 条带的吸光度进行比较,以表示目的蛋白表达。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据之间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞氧化损伤的影响 MTT 结果显示与空白组比较,t-BHP 组显著抑制细胞增殖 ($P < 0.05, P < 0.01$);与 t-BHP 组比较,左归丸加 t-BHP 组促进暴露于 t-BHP 诱导的 MC3T3-E1 氧化损伤细胞的存活 ($P < 0.05, P < 0.01$),48 h 者尤佳。见表 1。

表 1 左归丸含药血清对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞氧化损伤的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of Zuoguiwan on protects tertiary butyl hydroperoxide (t-BHP)-treated MC3T3-E1 cells from death ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	体积分数/%	24 h	48 h	72 h
空白	-	0.47 \pm 0.04	0.72 \pm 0.04	0.45 \pm 0.07
t-BHP	-	0.35 \pm 0.01 ²⁾	0.45 \pm 0.02 ²⁾	0.33 \pm 0.02 ¹⁾
左归丸 + t-BHP	10	0.42 \pm 0.01 ⁴⁾	0.68 \pm 0.05 ⁴⁾	0.41 \pm 0.06
补佳乐 + t-BHP	10	0.39 \pm 0.02 ⁴⁾	0.61 \pm 0.08 ³⁾	0.32 \pm 0.05

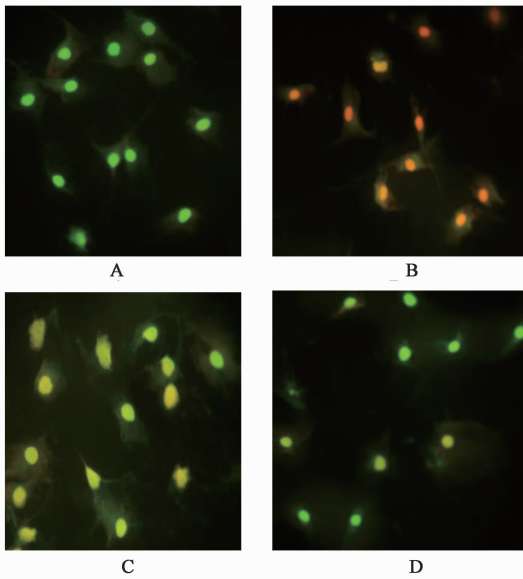
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05, ^2)$ $P < 0.01$;与 t-BHP 组比较³⁾ $P < 0.05, ^4)$ $P < 0.01$ (图 4 同)。

3.2 对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响 AO/EB 染色结果显示空白组细胞形态规则,呈绿色荧光;t-BHP 组 AO/EB 染色标记的 MC3T3-E1 细胞核严重聚缩,染色质呈黄色至橙黄色荧光;左归丸 +

t-BHP 组和补佳乐 + t-BHP 组细胞形态基本规则,偶见细胞核聚缩,呈绿色荧光或偶见呈黄色荧光。Hoechst 33342 染色结果显示空白组与 t-BHP 组染色标记 MC3T3-E1 细胞核均染成蓝色,但 t-BHP 组

细胞核呈高亮度荧光,可见核破裂状;与 t-BHP 组比较,左归丸 + t-BHP 组和补佳乐 + t-BHP 组细胞核荧光强度减弱。见图 1,2。

t-BHP 组显著增强线粒体膜电位荧光强度。见图 3。



A. 空白组;B. t-BHP 组;C. 左归丸 + t-BHP 组;D. 补佳乐 + t-BHP 组 (图 2~4 同)

图 1 左归丸含药血清对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响 (AO/EB, ×100)

Fig. 1 Effect of Zuoguiwan on t-BHP-treated MC3T3-E1 cells apoptosis (AO/EB, ×100)

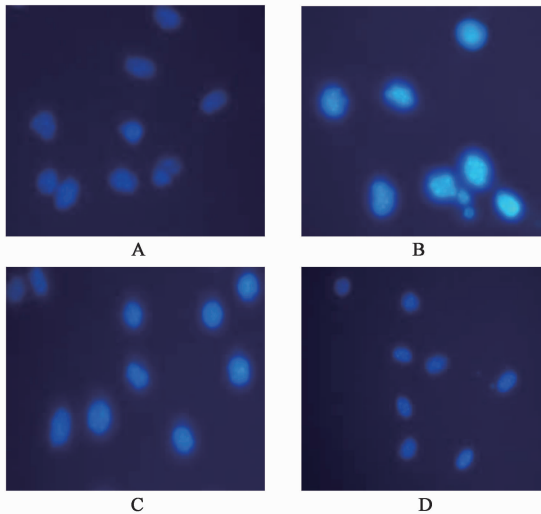


图 2 左归丸含药血清对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 凋亡细胞核形态的影响 (Hoechst 33342, ×200)

Fig. 2 Effect of Zuoguiwan on t-BHP-treated MC3T3-E1 cells apoptosis and apoptotic nuclei (Hoechst 33342, ×200)

3.3 对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位的影响 与空白组比较,t-BHP 组罗丹明 123 标记的 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位荧光强度明显减弱;与 t-BHP 组比较,左归丸 + t-BHP 组和补佳乐 +

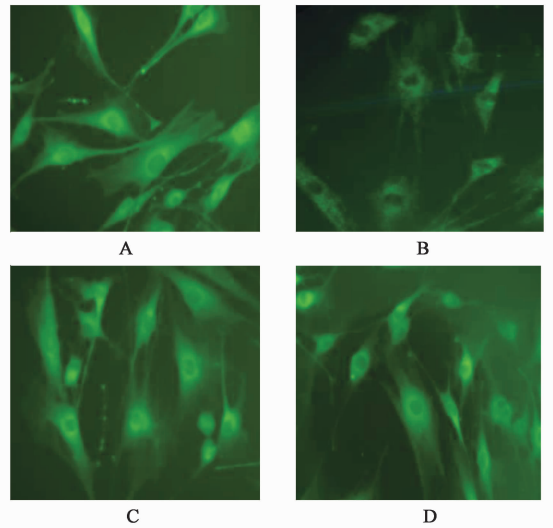


图 3 左归丸含药血清对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位的影响 (罗丹明 123, ×200)

Fig. 3 Effect of Zuoguiwan on t-BHP-treated MC3T3-E1 cells mitochondrial membrane potential (Rhodamine 123, ×200)

3.4 对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞线粒体 Bcl-2 家族蛋白的影响 与空白组比较,t-BHP 组 Bcl-2 蛋白表达明显下调 ($P < 0.01$), Bax 和 Caspase-3 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$);与 t-BHP 组比较,左归丸 + t-BHP 组显著上调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.05$),左归丸 + t-BHP 组和补佳乐 + t-BHP 组抑制 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 4。

4 讨论

氧化应激表现在骨质疏松症病理条件下,是骨吸收增加和低骨量相关的细胞损伤和死亡的一个主要原因^[6]。氧化应激影响细胞功能^[7],可诱导成骨细胞凋亡,降低成骨细胞活性^[8]。氧化应激可以破坏成骨细胞的各种细胞成分,被认为是骨损失的关键致病因素。过氧化氢诱导成骨细胞 MC3T3-E1 细胞凋亡,存在剂量和时间依赖性^[9]。本研究结果显示左归丸含药血清改善 t-BHP 诱导的成骨细胞功能障碍,促进暴露于 t-BHP 诱导氧化损伤 MC3T3-E1 细胞的存活。提示左归丸含药血清可以逆转 t-BHP 处理后 ROS 生成引起 MC3T3-E1 细胞增殖的下降和细胞凋亡的增加,左归丸对 t-BHP 诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡具有保护效应。

t-BHP 诱发 MC3T3-E1 细胞凋亡,补肾中药的抗氧化活性可能通过线粒体依赖性途径发挥作用^[10];能够显著提高细胞线粒体膜电位并上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达,下调促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达。能够显著抑制过氧化氢诱导

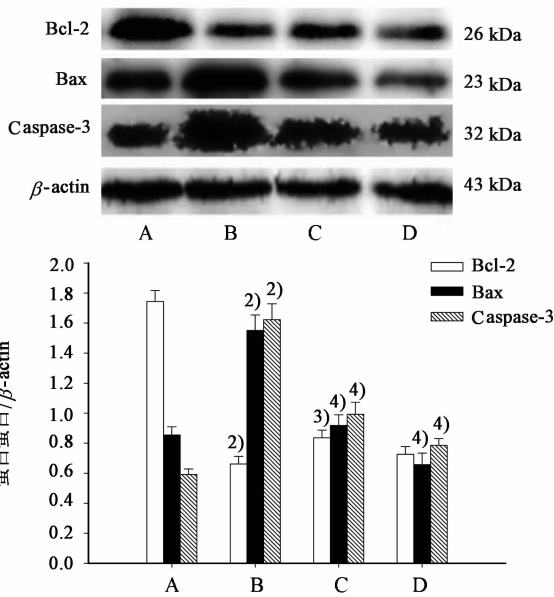


图 4 左归丸含药血清对 t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞线粒体 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of Zuoguiwan on Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein in t-BHP-treated MC3T3-E1 cells

的 MC3T3-E1 细胞凋亡并通过线粒体依赖的凋亡途径发挥作用^[11]。本研究罗丹明 123 染色结果显示,与 t-BHP 组比较,左归丸 + t-BHP 组显著增强线粒体膜电位荧光强度,能够上调抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达,下调促凋亡 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达。提示 t-BHP 可能通过增加细胞内 ROS 水平,使成骨细胞细胞质内 Bax 易位到线粒体,线粒体膜电位下降,激活线粒体凋亡途径,引起成骨细胞凋亡;线粒体凋亡途径在 t-BHP 引起 MC3T3-E1 细胞凋亡中起着重要作用, t-BHP 诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡,可引起 MC3T3-E1 细胞线粒体中 Bax 蛋白表达增加,使 Bax 蛋白从细胞质中易位到线粒体,激活线粒体凋亡途径;左归丸具有抗氧化活性,可能通过线粒体途径抗 t-BHP 诱导的成骨细胞凋亡。

氧化应激与成骨细胞分化有关,Runx2 调节在成骨细胞分化过程中起着非常重要的作用,Runx2 改性剂影响 MC3T3-E1 成骨细胞的氧化应激,影响 ROS 产生和叔丁基氢过氧化物相关分化率的减少^[12]。过氧化氢引起成骨细胞功能紊乱和细胞凋亡,刺激诱导 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 的活化、氧化应激、细胞死亡和细胞凋亡,AMPK 的活化防止过氧化氢诱导成骨细胞凋亡^[13]。前期研究结果表明左归丸含药血清可能部分通过活化 MAPK 信号通路,上调 Runx2 表达,刺激 I 型胶原表达,促进骨形成^[14-16]。左归丸活化 MAPK 信号通路,上调转录

因子 Runx2 表达是否与其抗氧化应激损伤有关需要进一步展开研究工作。

[参考文献]

[1] 王箭,林启旺,白玉玲,等. 氧化应激和骨代谢水平与老年原发性骨质疏松症间的相互关系[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(2):192-195,202.

[2] 付卓栋,付超,孙慧君,等. 硫辛酸对体外培养的 MC3T3-E1 成骨细胞骨形成的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2016,9(1):43-51.

[3] 郭宝磊,杨茂伟,梁单,等. 过氧化氢通过线粒体途径诱导成骨细胞凋亡[J]. 中国老年学杂志,2013,33(22):5661-5663.

[4] 孙琳林,卢林,王书惠,等. 左归丸与六味地黄丸对衰老大鼠抗自由基能力及 P₁₆ 蛋白表达影响的比较研究[J]. 中国临床保健杂志,2012,15(3):274-276.

[5] 孟玥,任艳玲,艾思羽,等. 左、右归丸及其拆方对去卵巢大鼠肾脏 TGFβ₁/Smad1 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(9):1981-1983.

[6] ZHANG Z, ZHENG L, ZHAO Z, et al. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction [J]. J Toxicol Sci, 2014, 39(5):803-813.

[7] Choi E M, Kim G H, Lee Y S. Protective effects of dehydrocostus lactone against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23(5):862-867.

[8] ZHANG J K, YANG L, MENG G L, et al. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 689(1/3):31-37.

[9] YANG Y H, LI B, ZHENG X F et al. Oxidative damage to osteoblasts can be alleviated by early autophagy through the endoplasmic reticulum stress pathway--implications for the treatment of osteoporosis [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77:10-20.

[10] GAO J M, LI R, ZHANG L et al. Cuscuta chinensis seeds water extraction protecting murine osteoblastic MC3T3-E1 cells against tertiary butyl hydroperoxide induced injury [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2):587-595.

[11] 高健美,李海波. 菟丝子通过线粒体通路抗叔丁基过氧化氢诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5):89-92.

[12] Pawlowska E, Wysokinski D, Tokarz P et al. Dexamethasone and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 reduce oxidative stress-related DNA damage in differentiating

osteoblasts [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15 (9): 16649-16664.

[13] SHE C, ZHU L Q, ZHEN Y F, et al. Activation of AMPK protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and NADPH maintenance: new implications for osteonecrosis treatment? [J]. Cell Signal, 2014, 26(1): 1-8.

[14] 刘立萍, 李然, 任艳玲, 等. 左归丸通过 p38MAPK 信号通路刺激 MC3T3 细胞核结合因子表达 (英文) [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1457-1461.

[15] 刘立萍, 任艳玲, 李然, 等. JNK 通路对左归丸含药血清调控 MC3T3 成骨细胞 Runx2 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 143-146.

[16] 蒿长英, 任艳玲, 刘立萍, 等. 左归丸含药血清通过 ERK/TGF- β /Smads 信号级联调控 MC3T3-E1 细胞增殖与分化 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(9): 1670-1675.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》2016 年度优秀论文获奖名单

题目	作者	单位	刊期
苦参碱凝胶剂的制备及体外释药特性考察	徐和, 戴领, 沈成英, 白金霞, 申宝德, 袁海龙	成都中医药大学药学院	201401
炎琥宁联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的疗效及安全性的 Meta 分析	罗钦宏, 梁锦枝, 黄艳琼, 古子娟	广州中医药大学	201401
肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的变化及柴疏四君子汤的作用	赵荣华, 谢鸣, 李聪, 张敬升, 刘进娜, 王帮众	北京中医药大学基础医学院	201402
中药联合抗风湿药治疗类风湿性关节炎活动期的临床观察	马进, 陈岷, 李获, 陈璐, 卢喆	四川省人民医院	201405
多枝雾水葛化学成分	刘旭阳, 谢郁峰, 张慧, 刘天竹, 文畅, 郭丽冰	广东药学院中药学院	201406
复方血栓通胶囊抗血栓作用的实验研究	聂勇胜, 文思, 刘静, 黄萍, 吴清和, 操红缨	广州中医药大学	201408
女贞子化学成分与药理作用研究进展	刘亭亭, 王萌	天津中医药大学	201414
柴蝎丹参汤对气滞血瘀型不稳定型心绞痛患者炎症细胞因子的影响	黄柳向, 程丑夫, 王敏	湖南中医药大学第一附属医院	201501
桃红四物汤对早期闭合性骨折祛瘀生新作用的初步探讨	季兆洁, 韩岚, 彭代银, 陈卫东, 李珊珊, 周贞贞, 朱光宇	安徽中医药大学药学院, 等	201503
黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化	刘和平, 彭招华, 张润容, 黄静, 黄文璋, 曹晖	丽珠医药集团国家中药现代化工程技术研究中心	201505

注: 2016 年获奖论文产生自 2014—2015 年发表的较高被引论文 (年总被引频次前 100 名), 经责任编辑推荐, 平衡不同栏目, 同行编委评选, 编委会年会通过并公布。按刊出时间排序。