

左、右归丸对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中 TGF- β_1 mRNA 的影响

宋囡¹, 何文智², 王智民³, 任艳玲^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学药学院, 沈阳 110847;
3. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847)

[摘要] 目的: 研究左、右归丸含药血清对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的作用。方法: 将 28 只大鼠随机分为 4 组, 分别以左归丸(ZGW)、右归丸(YGW)、阳性对照药戊酸雌二醇片(estradiol valerate tablets, EVT)和蒸馏水给大鼠灌胃, 各组灌胃剂量分别为 18.9, 20.52 g·kg⁻¹, 0.36 mg·kg⁻¹, 1.0 mL·kg⁻¹, 日 2 次, 于第 4 天给药 2 h 后, 腹主动脉取血, 离心, 56 °C 水浴灭活 30 min 后, 大鼠含药血清制备完成。再配制 10% 各组含药血清的 α -MEM 分别加入诱导剂(YDJ)(10⁻⁷ mol·L⁻¹ 地塞米松、50 μ mol·L⁻¹ 维生素 C、10 mmol·L⁻¹ β -甘油磷酸钠)与单纯诱导剂组共 5 组对 BMSCs(1 × 10⁵/L)进行干预 9 d, 用 Western blot 法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原(type I collagen, COL I)蛋白表达, 用 RT-PCR 法检测转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1) mRNA 表达。结果: Control 组比较: ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组均可促进 BMSCs 的 ALP, COL I 蛋白的表达, 上调 BMSCs TGF- β_1 mRNA 表达($P < 0.05$); 与 YDJ 组比较: ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组可促进 BMSCs 的 ALP, COL I 蛋白的表达, 上调 BMSCs TGF- β_1 mRNA 表达($P < 0.05$); 且 ZGW + YDJ 组优于 YGW + YDJ 组($P < 0.05$)。结论: 左、右归丸含药血清能协同诱导剂促进 BMSCs 成骨分化, 且左归丸组更为有效, 表明中医“滋肾阴”对 BMSCs 的成骨诱导更为有效。

[关键词] 左归丸; 右归丸; 骨髓间充质干细胞; 碱性磷酸酶; I 型胶原; 转化生长因子 β_1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0210-05

[doi] 10.11653/syfy2013180210

[收稿日期] 20130131(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373527); 辽宁省教育厅创新团队项目(LT2010068); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LR201025); 辽宁省科技厅自然科学基金项目计划(201102148)

[第一作者] 宋囡, 医师, 硕士, 在读博士, 从事中药理论及应用研究, Tel: 15104015589, E-mail: cpcool@126.com

[通讯作者] *任艳玲, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事方药配伍规律及作用机制的研究, Tel: 024-31207267, E-mail: yanlingren@tom.com

[7] Artavanis-Tsakonas, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415):770.

[8] Weinmaster G. Notch signal transduction: a real Rip and more [J]. Pattern Formation and Developmental Mechanisms, 2000, 10(4):363.

[9] Nam Y, Aster J C, Blacklow S C. Notch signaling as a therapeutic target[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(4):501.

[10] 陈晨, 张毅. Notch 信号通路与间充质干细胞分化[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2):510.

[11] Han W, Yu Y, Liu X Y. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration [J]. Cell Res, 2006, 16(2):189.

[12] Karlsson C, Jonsson M, Asp J, et al. Notch and HES5 are regulated during human cartilage differentiation[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3):539.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005:530.

[14] 陆桂祥, 黄新风, 齐幼龄. 百年乐对肺气虚病人免疫功能及血锌浓度的影响[J]. 广西中医药, 1993, 16(2):47.

[15] 谢干琼, 杨品纯, 蒙关师, 等. 百年乐对果蝇衰老过程的影响[J]. 广西中医药, 1987, 10(6):31.

[16] 陆桂祥, 黄新风. 百年乐对小鼠免疫功能的影响[J]. 广西中医药, 1988, 7(1):17.

[17] 陈黎. 复方扶芳藤合剂抗大肠癌术后化疗白细胞减少疗效观察[J]. 广西中医药, 2001, 24(1):49.

[18] 王力, 吴鑫, 卢新政, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对培养大鼠骨髓间充质干细胞增殖影响的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11):1480.

[19] 谭艳芳, 殷小成, 熊玉娟, 等. 黄芪甲甙对大鼠骨髓间充质干细胞多种造血相关因子表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1817.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Zuogui Wan and Yougui Wan on TGF- β_1 on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

SONG Nan¹, HE Wen-zhi², WANG Zhi-min³, REN Yan-ling^{1*}

(1. College of Basic Medicine, Medical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. Medicine College, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China;

3. College of First Clinic, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of serum containing Zuogui Wan and Yougui Wan on the osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Method:** To assign 28 rats into 4 groups at random, then the rats were respectively gavaged with Zuogui Wan, Yougui Wan, positive control drug (estradiol valerate, EVT) and distilled water. The dosage of gavage was respectively 18.9, 20.52 g·kg⁻¹, 0.36 mg·kg⁻¹, 1.0 mL·kg⁻¹, two times one day. On the 4th day, after being gavaged 2 h, get the containing serum from aorta abdominalis, centrifuge, inactivate (56 °C, 30 min). The four kinds of 10% containing serum separately adding inducer (10⁻⁷ mol·L⁻¹ dexamethasone, 50 μmol·L⁻¹ vitamin C, 10 mmol·L⁻¹ sodium β-glycerophosphate), with inducer group, simultaneously intervene the BMSCs (1 × 10⁵/L) for about 9 days. Then, to show the expression of alkaline phosphatase (ALP) and type I collagen (COL I) protein with the method of Western blot, to test expressing transforming growth factor beta₁ (TGF- β_1) mRNA by RT-PCR. **Result:** Compared with control group, Zuogui Wan, Yougui Wan, EVT can promote BMSCs ALP, COL I expression, upregulate BMSCs TGF- β_1 mRNA ($P < 0.05$); compared with inducer group, Zuogui Wan, Yougui Wan can promote BMSCs ALP, COL I expression, upregulate BMSCs TGF- β_1 mRNA, also Zuogui Wan is better than Yougui Wan ($P < 0.05$). **Conclusion:** Serum containing Zuogui Wan and Yougui Wan can help inducer on the osteogenic differentiation in BMSCs, and Zuogui Wan is better, which indicates nourishing kidney-Yin is more effective on osteogenic differentiation in BMSCs.

[Key words] Zuogui Wan; Yougui Wan; bone marrow mesenchymal stem cells; alkaline phosphatase; type I collagen; transforming growth factor beta 1

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一类具有多向分化潜能的干细胞,可以通过分化为成骨细胞而促进骨形成^[1-2],中医学认为“肾藏精,精生髓,髓养骨。”故 BMSCs 与“肾精”存在一定的关系^[3],本实验以此为理论基础通过研究左、右归丸含药血清对 BMSCs 的干预,探讨中医滋补肾阴、温补肾阳立法之不同对 BMSCs 成骨分化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 28 只,200 ~ 220 g,共 4 组,每组 7 只,雌雄各半,购买于辽宁长生生物技术有限公司,许可证号 SCXK(辽)2010-0001,用于制备含药血清。提取和培养骨髓间充质干细胞采用同种 2 月龄雄性大鼠 1 只。

1.2 药物及试剂 中药饮片购买于辽宁中医药大

学附属第一医院,左归丸(组方:熟地黄 24 g,炒山药 12 g,枸杞子 12 g,山茱萸 12 g,鹿角胶 12 g,菟丝子 12 g,牛膝 9 g,龟板胶 12 g);右归丸(组方:熟地黄 24 g,炒山药 12 g,枸杞子 12 g,山茱萸 12 g,鹿角胶 12 g,菟丝子 12 g,当归 9 g,肉桂 6 g,杜仲 9 g,附子 6 g)。将以上两种药方自制成水煎剂,生药量为 1 g·mL⁻¹;诱导剂(YDJ)地塞米松(Sigma, D1756),维生素 C(Vc, Sigma, A7506),β-甘油磷酸钠(Fluka, AGCH-9470);戊酸雌二醇片(Estradiol Valerate Tablets, EVT, 法国 Delpharm Lille S A S, 批号国药准字 J20080036);改良型 α-MEM 培养液、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)(Hyclone);胰酶(Sigma);Anti-ALP(alkaline phosphatase)抗体 Anti-Collagen- I (type I collagen) 抗体(博奥森);Anti-GAPDH 抗体(中杉金桥);RT-PCR 试剂盒

(TaKaRa, code: DR019A); 引物委托 TaKaRa 公司设计合成, β -actin 引物序列: Sense: 5'-AGTGGCAGCTGGACATCCG-3', Antisense: 5'-TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG-3', 扩增长度为 295 bp, TGF- β_1 (Transforming growth factor beta 1) 引物序列: Sense: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACTCTA-3', Antisense: 5'-CGCTGAATCGAAAGCCC TGTA-3' 扩增长度为 174 bp。

1.3 仪器 3111 二氧化碳培养箱 (Thermo, 美国), BioSpec-nano 型紫外-可见分光光度计 (岛津, 日本), My Cycler PCR 仪 (Bio-rad, 美国), WD-9413B 凝胶成像分析仪 (北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 含药血清制备与实验分组 将 28 只大鼠随机分为 4 组: 左归丸组 (ZGW)、右归丸组 (YGW)、戊酸雌二醇组 (EVT)、空白对照组 (Control, 蒸馏水), 每组 7 只, 雌雄各半, 按每 1 kg 体重大鼠的给药量为人的 6.3 倍计算, 并且每日给大鼠灌胃量为正常人用药量的 2 倍, 分别为 18.9, 20.52 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 0.36 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1.0 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日给大鼠灌胃 2 次, 空白对照组灌服蒸馏水, 各组药物生药量为 1 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于第 4 天给药 2 h 后, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 采用大鼠腹主动脉取血, 静置 2 h 后, 离心 (2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 20 min), 收集血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min, 分装后, -86 $^{\circ}\text{C}$ 保存。实验分为 5 组, ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组, 以上各组含有相应的 10% 药物血清及诱导剂 (YDJ) (含 $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -甘油磷酸钠的 α -MEM 培养液)、YDJ 组 (含 10% FBS 的诱导剂)、Control 组 (含 10% Control 组血清的 α -MEM 培养液)。

2.2 BMSCs 的分离培养 将 2 月龄大鼠脱颈处死后, 75% 乙醇浸泡 15 min 后, 移入超净台, 在无菌的条件下取下双侧股骨和胫骨, 剪掉骨的两端, 暴露骨髓腔后, 用 5 mL 含青、链霉素的 α -MEM 培养液反复冲洗骨髓腔至平皿中, 直至骨的颜色变白, 收集平皿中液体到离心管中, 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 3 min 离心, 倒掉上清液, 用含 10% FBS 的 α -MEM 培养液重悬细胞后, 转入 25 cm^2 培养瓶, 再移到 CO_2 培养箱培养, 传代至第 4 代细胞, 用于以下实验。

2.3 ALP, COL I 的蛋白检测 采用 Western blotting 法, P_4 代 BMSCs 接种于 5 个 25 cm^2 培养瓶, 4 d 后饥饿, 24 h 后加各组培养液 6 mL 干预 9 d 后, 弃培养液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗 3 遍, 甩干; 每瓶细胞

加入裂解液 100 μL 细胞刮至瓶底一角, 冰上静置 30 min; 收集至预冷的 EP 管中; 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min, 取上清; BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白变性后, 每孔上样 20 μL , 电泳后转膜 3 h, 一抗孵育 1 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 次日二抗孵育 1 h 后, 暗室中加入 ECL 发光液后, 曝光 30 min, 扫描图像后分析结果, 目的蛋白与内参 GAPDH 条带的吸光度比值后, 再各组比较。

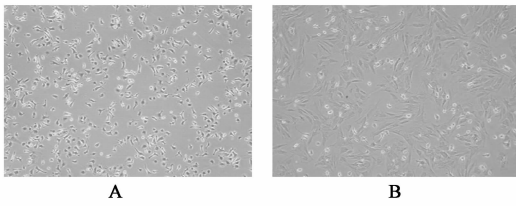
2.4 TGF- β_1 mRNA 的检测 采用 RT-PCR 法, 细胞接种及干预按 2.3 方法, 9 d (每 3 天换液一次) 后将细胞用 PBS 洗 3 遍后, 每瓶中加入 500 μL RNAiso Plus, 刮取细胞, 吸入预冷的 1.5 mL EP 中, 提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 纯度 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.2。RT 按如下条件反应: ① 30 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; ② 50 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; ③ 99 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; ④ 5 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 共 1 个循环。PCR 按如下条件反应: ① 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; ② 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; ③ 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; ④ 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; ⑤ 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; ⑥ 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。其中, ② ~ ④ 为 30 个循环。进行琼脂糖凝胶电泳, 配成 1.5% 的琼脂糖, 微波加热至完全溶解, 冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$, 加 5 μL 溴化乙锭, 把凝胶放入电泳槽后, 上样, 样品 5 μL 与 1 μL 上样缓冲液混合。电泳时电压为 200 V。采用 WD-9413B 凝胶成像分析仪进行图像分析, 并用 Gel pro32 凝胶图像分析软件对 PCR 产物进行半定量分析, 分别用 TGF- β_1/β -actin 的积分吸光度来表示 TGF- β_1 的 mRNA 表达水平。

2.5 统计学方法 计量数据采用 SPSS 13.0 软件处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 One-Way Anova 进行分析, 采用 LSD 或 Tamhane's 方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BMSCs 形态学观察 细胞接种于培养瓶后, 24 h 后可见少量细胞贴壁, 以圆形居多, 透亮, 4 d 后可见大部分细胞已贴壁, 并形成突触, 细胞可呈菱形或多角形, 此时进行首次换液, 10 ~ 12 d 细胞达 80% 融合, 方可进行首次传代, P_4 代细胞多呈纺锤形生长, 排列为旋涡状 (图 1)。

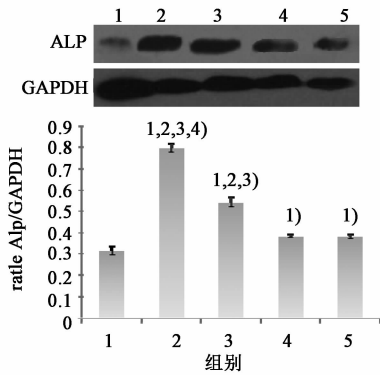
3.2 对 BMSCs 的 ALP 蛋白表达的影响 与 Control 组比较, ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组、YDJ 组均可促进 BMSCs 的 ALP 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 与 YDJ 组比较, ZGW + YDL 组、YGW + YDJ 组可促进 BMSCs 的 ALP 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 与 EVT + YDJ 组比较, ZGW + YDL 组、YGW + YDJ 组可促进 BMSCs 的 ALP 蛋白的表达



A. 第4代5 d BMSCs 细胞形态; B. 第4代2 d BMSCs 细胞形态

图1 BMSCs 细胞形态 ($\times 100$)

($P < 0.05$); 与 YGW + YDJ 组比较, ZGW + YDL 组可显著促进 BMSCs 的 ALP 蛋白的表达 ($P < 0.05$) (图 2)。



注 1. Control 组; 2. ZGW + YDJ 组;

3. YGW + YDJ 组; 4. EVT + YDJ 组; 5. YDJ 组

与 Control 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 YDJ 组比较²⁾ $P < 0.05$;

与 EVT + YDJ 组比较³⁾ $P < 0.05$;

与 YGW + YDJ 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (图 3 ~ 4 同)

图2 左、右归丸 10% 含药血清对 BMSCs 的 ALP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对 BMSCs 的 COL I 蛋白表达的影响 与 Control 组比较, ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组、YDJ 组均可促进 BMSCs COL I 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 与 YDJ 组比较, ZGW + YDL 组、YGW + YDJ 组可促进 BMSCs 的 COL I 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 与 EVT + YDJ 组比较, ZGW + YDL 组可促进 BMSCs 的 ALP 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 且与 YGW + YDJ 组比较, ZGW + YDL 组可显著促进 BMSCs 的 COL I 蛋白的表达, ($P < 0.05$) (图 3)。

3.4 对 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 表达的影响 经 RT-PCR 实验, TGF- β_1 和 β -Actin 分别在 174 bp 和 295 bp 见到条带, 经分析证实结果与设计引物相符。半定量分析结果显示, 与 Control 组比较, ZGW + YDJ 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组、YDJ 组均可上调 BMSCs TGF- β_1 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 与 YDJ 组比较, ZGW + YDL 组、YGW + YDJ 组、EVT + YDJ 组均可上调 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 表

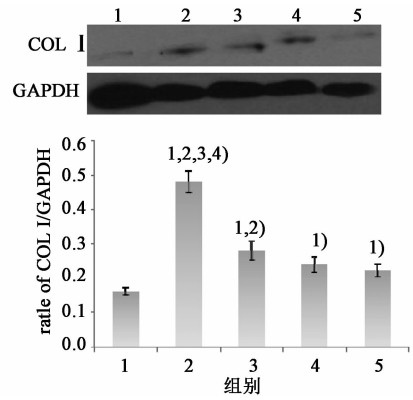


图3 左、右归丸 10% 含药血清对 BMSCs 的 COL I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

达 ($P < 0.05$); 与 EVT + YDJ 组比较, ZGW + YDL 组可显著上调 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 表达, 且与 YGW + YDJ 组比较, ZGW + YDL 组可显著上调 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 表达 ($P < 0.05$) (图 4)。

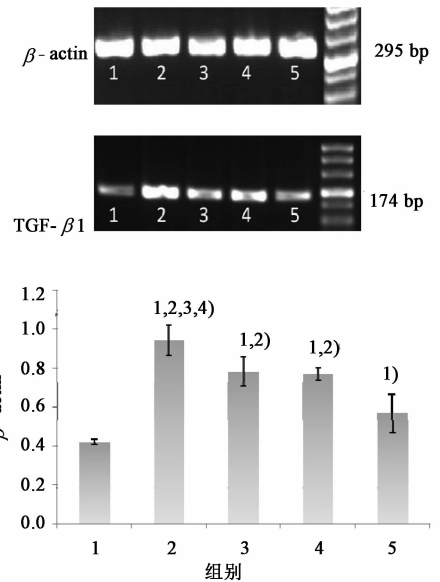


图4 左、右归丸 10% 含药血清对 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

左、右归丸均出自于张景岳的《新方八阵·补阵》, 共具益精填髓的功效, 可以通过补益肾精而协同诱导剂促进 BMSCs 成骨分化, 不同的是前者侧重滋补肾阴, 后者侧重温补肾阳^[4]。BMSCs 在向成骨细胞分化的过程中相继表达各种骨特征性标志蛋白, 如 ALP 和 Col I 在成骨细胞分化早期出现高表达^[5-7], 其中, ALP 是一种钙结合转运蛋白, 主要分布于细胞膜, 能促进细胞成熟、钙化, 是在 BMSCs 的成骨诱导过程中最早表达标志, 代表骨形成状态。Col I 是骨有机基质的主要成分, 占骨有机基质的

90% ,在骨组织中 Col I 是主要的纤维蛋白成分,其含量和结构的稳定是维持骨正常结构和功能的重要标志蛋白之一,也是评价 BMSCs 向成骨细胞分化的标志之一,可用于反映 BMSCs 诱导成骨细胞后合成骨胶原的能力。戊酸雌二醇片是临床常用的雌激素的一种,研究发现雌激素可以通过抑制骨吸收而促进骨形成^[8-9],同时,左、右归丸已经被证明具有类雌激素样作用^[10-11],则本实验选用戊酸雌二醇片为阳性对照药,与左、右归丸分别诱导 BMSCs 成骨分化以促进骨形成。实验结果表明以上各组均能提高 BMSCs 的 ALP 和 Col I 蛋白的表达,具有促进 BMSCs 成骨分化的作用,同时,左归丸和右归丸分别结合诱导剂后使 BMSCs 的 ALP 表达不仅优于经典诱导剂组且优于戊酸雌二醇片组,而左归丸协同诱导剂促进 BMSCs 成骨分化的作用最佳。

TGF- β_1 是骨骼中最为丰富的生长因子,具有调节成骨细胞增殖、分化,刺激 I 型胶原和一些骨基质蛋白合成的作用,TGF- β_1 是 TGF- β 超家族的一员,与骨形成的关系最为密切,具有广泛的生物学活性,对于骨向诱导过程是极具潜力的因子,调控 BMSCs 骨向分化的首选生长因子之一^[12-14]。实验结果表明,各干预因素均能促进 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 的表达,左归丸和右归丸协同诱导剂在对 BMSCs 成骨诱导的过程中,均优于诱导剂组,而左归丸对 BMSCs 的 TGF- β_1 mRNA 的上调作用优于戊酸雌二醇片和右归丸,说明两方均可协同诱导剂通过上调 TGF- β_1 mRNA 对 BMSCs 进行成骨分化诱导,并且左归丸的协同作用为最佳。但究其两方协同诱导剂诱导 BMSCs 骨向分化的进一步的机制,是否有细胞信号通路的参与,有待深入探究。

[参考文献]

[1] Christian Elabd, Armelle Basillais, Helene Beaupied, et al. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis [J]. Stem Cell, 2008, 26, 2399.
[2] Tong Mingliu, Monique Martina, Dietmar W Hutmacher, et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow-and adipose tissue-derived

human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages [J]. Stem Cell, 2007, 25, 750.
[3] 徐凌霄,高俊,张前德. 左归丸含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中碱性磷酸酶含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 149.
[4] 喻嵘,吴勇军,陈大舜. 明清医家对张景岳阴阳互济法及其左、右归方的探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(3): 49.
[5] 舒晓春,刘君静,朱丹华,等. 不同浓度补碎骨黄酮对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(7): 1261.
[6] 汪甜,杨丽,张荣华. 柚皮苷在促大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化过程中对 MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(5): 769.
[7] Bhagath Kumar Potu, Kumar M R Bhat, Muddanna S Rao, et al. Petroleum ether extract of cissus quadrangularis (LINN) enhances bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and facilitates osteoblastogenesis [J]. Clinics, 2009, 64(10): 993.
[8] 罗新,高绿芬,陈翠平,等. 17 β -雌二醇对骨髓间充质干细胞增殖及成肌分化作用的研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2010, 11(5): 369.
[9] 张晓丽. 雌激素在骨髓间充质干细胞中的表达和作用 [J]. 四川生理杂志, 2010, 32(3): 130.
[10] 蒿长英,任艳玲,赵金茹. 左归丸含药血清通过 ERK/Smads 信号通路干预 MC3T3-E1 细胞的功能基因表达 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 421.
[11] 罗汉文,关宏刚. 右归丸对骨质疏松模型大鼠垂体-肾上腺轴影响的实验研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(2): 60.
[12] 胡军,张爱斌,刘晓岚,等. 冲击波诱导人骨髓基质细胞成骨分化及机制的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(2): 147.
[13] Kyobum Kima, David Deanb, Jonathan Wallace, et al. The influence of stereolithographic scaffold architecture and composition on osteogenic signal expression with rat bone marrow stromal cells [J]. Biomaterials, 2011, 32(15): 3750.
[14] 任艳玲,李娅玲,吕海波,等. 左归丸对去卵巢骨质疏松大鼠肾脏 TGF- β_1 /Smad4 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 171.

[责任编辑 聂淑琴]