

GSB 中药血清对 rMSCs 定向诱导分化为成骨细胞的影响

阎德文 李海燕 吴清平 付林 罗国春 桂耀庭 肖建德

摘要：目的 观察 GSB 中药血清对大鼠 MSCs 定向诱导分化成骨的影响。方法 将培养的 rMSCs 分为对照组(C 组) [含 10% 胎牛血清 ,100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的完全培养液] 诱导组(O 组) [完全培养液 ,加诱导培养液(0.1 μ mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠及 50 μ g/ml 维生素 C) ,加 20% 空白血清] 和含药血清诱导组(G 组) [完全培养液加诱导培养液诱导培养液中加入 20% 含药血清] 。显微镜下观察细胞形态变化 ,生化法测定上清中 Ca^{2+} 浓度 ,Gomori 改良钙钴法进行 ALP 染色 , Von Kossa 法进行矿化结节染色 ,RT-PCR 法测定 I 型胶原(COL1) 和脂蛋白脂酶(LPL) 的表达 ,放免法测定上清中骨钙素含量。结果 O 组和 G 组在加入诱导培养液 3 ~ 4 天后梭形细胞比例减少 ,细胞变形形成多角形、乃至方形 ,部分区域细胞成多层生长 ,改良 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶染色阳性细胞 , Von Kassa 染色发现钙盐沉积 ,培养 9 d 后细胞 Ca^{2+} 浓度开始升高 ,并随时间持续显著增长 ,且 G 组明显高于 O 组。自第 15 d 后 ,O 组和 G 组细胞 ALP 活性随时间延长而明显增高 ,且 G 组显著高于 O 组 ,培养的第 14 d ,G 组骨钙素分泌量明显高于 O 组。成骨诱导剂作用 MSCs 12 d 后 ,COLL I mRNA 表达阳性 , LPL mRNA 表达阴性 ,且 G 组比 O 组 COLL I mRNA 表达更强。结论 补肾填精中药 GSB 促进骨钙素分泌、增强 ALP 活性、促钙盐沉积 ,具有增强成骨诱导剂诱导 rMSCs 向成骨细胞分化 ,并促进成骨细胞成熟作用。

关键词：含药血清；间充质干细胞；成骨细胞；分化

Serum containing experimental recipe-GSB enhances proliferation and differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells *in vitro* YAN Dewen , LI Haiyan , WU Qingping , et al . Department of Endocrinology , Shenzhen Second People's Hospital , Shenzhen 518035 , China

Abstract : Objective To study the tonifying kidney and benefiting essence of life by the traditional Chinese medicine , we investigate the effect of serum containing GSB-extract(GSB serum) on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells(rMSCs). **Methods** rMSCs derived from the fourth passages were incubated in LDMEM supplemented with different concentration of GSB serum(5% , 10% and 20%). Expanded cells were detected by MTT , to confirm appropriate serum concentration to be used . Subsequently , cultured cells at passage 4 were nontreated in LDMEM medium with 10% FBS(as a control , C group) or treated in LDMEM medium with 20% rat serum with(G group) or without(O group) experimental recipe-GSB extracted . The mRNA levels of type I collagen and lipoprotein lipase were measured by RT-PCR . **Results** rMSCs changed from a spindle shape to a polygonal appearance , ALP staining and von Kossa staining were positive in both O group and G group while the controls were not . The ALP activity in every group of every period of time had significant difference . The ALP activity of O group and G group were higher than that of C group on fifth day ; there're significant differences between O group and C group , G and C group on fifth and tenth day , no difference between G and O group . There're significant differences between C group and each other group only in the first twenty days , and there're significant differences between O group and G group in every period of time . The concentration of Ca^{2+} was significantly higher in GSB serum group than that of control group after rMSCs were incubated for 9 days . There're no clear differences between the three groups on third and sixth day . There're significant differences between C group and each other group only in the first twenty one days . However there're significant differences between O

group and G group after fifteen days. There're significant differences between the three groups on the fourteenth and twenty first day on the content of osteocalcin. The OCN content of O and G groups are higher than C group. The OCN content of G group is higher than that of O group on the fourteenth and twenty first day with significant difference. The mRNA level of type I collage was measured after rMSCs were induced for 12 days , higher level in G group than in C group. The expression of lipoprotein lipase was not measured. **Conclusions** GSB serum may promote proliferation and osteogenic differentiation of rMSCs. Experimental recipe-GSB possesses to manufacture the essence.

Key words : Serum containing GSB-extract(GSB serum); Marrow mesenchymal stem cells ; Osteoblast ; Differentiation

补肾中药促成骨作用是目 前中药防治骨质疏松症的研究热点^[1 2]。大量研究表明 ,中药影响骨代谢、防治骨质疏松症 ,具有多系统、多靶点作用的特点。我们临床研究表明补肾益精中药“ 龟丝补 ” (GSB)复方既可促进骨形成 ,又可抑制骨吸收 ,对绝经早期妇女具有防治骨质疏松的作用^[3-5] ,但其作用的分子机制仍不十分清楚。目前认为 ,骨髓微环境对骨代谢调节起主要的局部作用 ,骨髓中包含有成骨和破骨细胞的前体 ,且储存大量细胞因子直接调控前体细胞的增殖、分化、成熟和功能表达。其中骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells ,MSCs)乃成骨细胞前体的上游细胞 ,可分化为成骨细胞、脂肪细胞等^[6]。本研究采用 GSB 含药血清对大鼠 MSCs 体外培养 ,探讨其对 rMSCs 定向诱导分化成骨细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

DMEM(L)(Hyclone ,USA) 胎牛血清(FBS , Hyclone ,USA) DMSO(Sigma , USA) 地塞米松(Sigma ,USA) β-甘油磷酸钠(Sigma ,USA) 抗坏血酸(分析纯)(广州化学试剂厂) MTT(Sigma ,USA) Total RNA 提取试剂盒(Promega) RT-PCR Kit (Promega , USA) 浓缩型 DAB 试剂盒(Vector Laboratories ,Inc.) mRNA 引物(上海生工) 胰蛋白酶(GIBCOBRL ,USA) 青霉素钠(华北制药厂 ,批号 040518 B) 硫酸链霉素(华北制药厂 ,批号 040210) 骨钙素放射免疫试剂盒(北京福瑞生物工程公司) YJ-2450 医用净化工作台[苏州安泰空气技术有限公司] LD 5-2 A 型台式离心机[北京医用仪器厂] CO₂ 孵箱(MCO-15 AC) SANYO ,JPN] 倒置相差显微镜(XDS-1 B) 重庆光电仪器总公司] 312 e 自动微板读数仪、Bechman Epicx 流式细胞仪、水平式电泳仪 [CLP ,USA] 凝胶成像分析系统[Dolphin DOC , Wealtec ,USA] PCR 仪[PTC-200 ,MJ Research] 酶联

免疫标记仪(Bio-Rad 550)(Bio-Rad ,Hercules ,CA , USA)

1.2 大鼠骨髓间质干细胞(rMSC)体外培养与鉴定

4 周龄雄性 Wistar 大鼠[由中山大学医学院动物实验中心提供]经乙醚麻醉后断颈处死。按文献^[7 8]进行体外培养与鉴定。第 4 代培养细胞进行流式细胞仪检测 ,结果显示细胞均一性较好 ,其中 CD 34 表达呈阴性 ,而 CD₉₀、CD₁₀₅ 和 CD₁₆₆ 表达呈阳性 ,阳性率分别为 94.87%、93.36% 和 93.82% ,提示培养所得细胞为非造血性细胞 ;且部分细胞 SH₂ 和 SH₃ 共阳性(见另文)。提示培养扩增所获得的 CD₃₄ (-)/CD₉₀(+)+ SH₂(+)细胞主要是骨髓间质干细胞(MSCs)。用细胞计数板作有核细胞计数 ,调整细胞浓度为 5 × 10⁴ /ml ,以备实验之用。

1.3 中药龟丝补(GSB)含药血清的制备

健康雄性 Wistar 大鼠 25 只 ,体重约 200 ~ 250 g ,购自中山大学医学院动物研究所。其中随机取 15 只大鼠 ,每次每只按 5 g(饮片)/100 g 体重灌胃给药 ,按通法采血 ,将待测药每天给药 2 次 ,连续 3 天 ,末次给药后 1 h 采血。剩余 10 只 Wistar 大鼠制备正常空白血清 ,采用同样方法灌服等容生理盐水采血。所有大鼠均经乙醚麻醉后摘除眼球取血液 ,同组合并后离心获取血清。血清置于 56℃ 恒温水槽中加热灭活 30 min ,再用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后备用^[9 10]。根据 MTT 法检测细胞增殖结果 ,以 20% 含药血清为实验最佳浓度(见另文)。

1.4 实验分组

组别	培养条件	简称
常规对照组	LDMEM 培养液 *	C
成骨诱导组	LDMEM 培养液 + 成骨诱导剂 ** + 20% 空白血清	O
含药血清诱导组	诱导组培养液 + 20% 含药血清	G

注 : * LDMEM 培养液含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素。 ** 成骨诱导剂 0.1 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μmol/L 维生素 C 和 100 ml/L 胎牛血清

1.5 细胞形态显微观察

按文献^[8]在7 d和14 d分别采用改良 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶(ALP)染色,21 d行细胞爬片 von Kossa 染色。

1.6 成骨细胞标志的定量检测^[8,11,12]

1.6.1 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性的测定(比色法):取第4代培养细胞,以 1×10^4 /ml接种于24孔培养板,每孔接种细胞悬液1 ml,共6板。每板分别加完全培养液作正常对照组和成骨细胞分化培养液,低、中、高含药血清培养液以及空白血清培养液。分别于5、10、15、20 d,每次实验组和对照组各取6孔,用2.5 g/L胰蛋白酶消化,PBS洗2次。每孔细胞加1 ml PBS,于200 W超声波破碎仪上处理3次,每次60 s,间隔5 min。离心后取上清液测 ALPase 含量(A_{405})。

1.6.2 钙的定量测定(生化法):诱导第0、3、6、9、12、15、18、21 d,吸去孔内诱导液,PBS洗3次,每孔加等量0.5 mol/L稀盐酸以溶解沉积的钙,振荡过夜,次日以 $1000 \times g$ 离心10 min,上清液中 Ca^{2+} 浓度用Sima kit 587-A测定。

1.6.3 骨钙素的测定(放射免疫法):分别收集培养至第14 d和第21 d的培养上清液,冷冻于 $-30^\circ C$ 待测。测定时,分别将各组复溶后的上清液25 μ l,加入 ^{125}I 标记的骨钙素100 μ l和骨钙素抗体100 μ l,混合并 $4^\circ C$ 过夜;然后每管加分离剂1 ml混匀,室温放置15 min,1500 r/min离心15 min,弃上清液,检测各管沉淀的放射性计数;由放射性计数计算出培养液中骨钙素的浓度,制作骨钙素标准曲线(标准品含量范围在0~50 μ g/L);再将所得数据除以各组相应的细胞数,进行标准化处理。

1.7 RT-PCR 检测 I 型胶原(COLL 1)和脂蛋白脂酶(LPL)表达

采用陈槐卿等^[13]设计的 COL 1 和 LPL 引物(表1)。将 β -actin 的扩增结果作为内参照。培养细胞 RNA 的提取:按试剂盒说明书进行。

表1 引物序列设计

分组	引物序列
COLL 1 (122 bp)	上游:5'-CCT GGA AGA GAT GGT GCT-3' 下游:5'-CCA TTC TTG CCA GCA GGAC-3'
LPL (266 bp)	上游:5'-AGA AGG TCA ATA GAA TTA CTG GCT TGG 3' 下游:5'-CTG GTC CAC ATC TCC AAG-3'
β -actin (240 bp)	上游:5'-AAC CCT AAG GCC AAC ACTGAA AAG-3' 下游:5'-TCA TGA GGT ACT CTG TGA GGT 3'

按 RT-PCR Kit 说明书操作。反应条件为:(1)37 $^\circ C$ 逆转录30 min;(2)94 $^\circ C$ 灭活 RNA 酶2 min;(3)

94 $^\circ C$ 解链30 s;(4)55 $^\circ C$ 退火30 s;(5)72 $^\circ C$ 延伸45 s;(6)第(3)~(5)步再重复30次;(7)72 $^\circ C$ 延伸7 min。扩增毕,产物做水平琼脂糖凝胶电泳。(COLL 1, β -actin 退火温度为55 $^\circ C$,LPL为58 $^\circ C$)。

1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件分析,结果表示为 $\bar{x} \pm s$,两组间差异比较采用 t 检验,多组间差异比较采用 ANOVA 分析,差异有显著性者进一步采用 LSD 方法进行两两比较。

2 结果

2.1 细胞形态学改变

加入成骨细胞分化培养液后,3~4 d后发现梭形细胞比例减少,细胞变形成多角形、乃至方形,细胞排列密集,部分区域细胞成多层生长。在7 d和14 d均得到改良 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶染色阳性细胞,阳性细胞率分别为11.5%和37.5%。在21 d细胞爬片做 Von Kossa 染色发现有钙盐沉积出现(图1、2)。

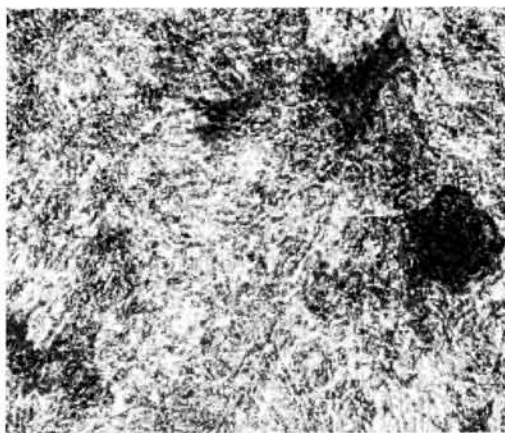


图1 ALP 染色(Gomori-钙钴法),分化诱导14 d (150 $\times$)

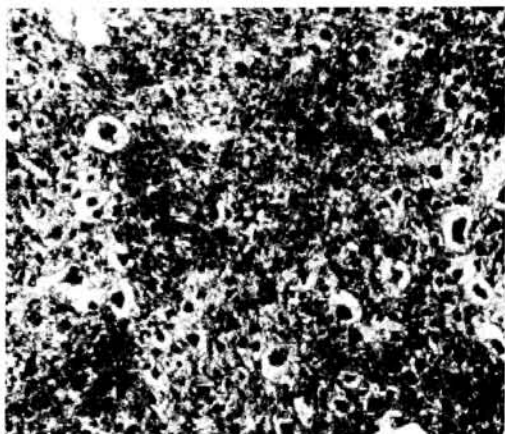


图2 von Kossa 染色,分化诱导21 d (150 $\times$)

2.2 GSB 血清对成骨细胞标志物的影响

2.2.1 对 ALP 活性的影响 :从表 2 可知 ,各时间段 3 组间 ALP 活性经检验差异均有显著性意义($F = 5.513 \sim 846.968$, $p = 0.004 \sim 0.000$)。进一步两两比较 ,发现所有时间段 ,O 组与 G 组 5 d 组 ALP 活性均高于 C 组($p = 0.000$) ,说明成骨诱导剂和 GSB 含药血清都具有诱导 rMSCs 向成骨细胞分化的作用。其中 5 d 组和 10 d 组 ,O 组与 C 组、G 组与 C 组差异有显著性($p = 0.000$) ,而 G 组与 O 组差异无显著性 ; 15 d 组和 20 d 组 3 组间两两比较差异均有显著性($p = 0.000$) ,说明在培养早期(10 d 内)二者成骨诱导作用无明显差异 ,但随着培养时间延长 ,GSB 含药血清成骨细胞诱导更加明显。

表 2 rMSCs 定向诱导成骨细胞的 ALP 活性(U/L)

组别	5 d	10 d	15 d	20 d
(C)	0.090±0.009	0.101±0.015	0.094±0.011	0.114±0.017
(O)	0.284±0.017	0.490±0.022	1.558±0.215	2.583±0.033
(G)	0.288±0.11	0.492±0.020	2.030±0.286	3.184±0.289

各组 4 个时间段之间 ALP 活性经方差检验差

表 3 rMSCs 定向诱导成骨细胞的钙沉积量(mmol/L)($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
(C)	0.055±0.011	0.057±0.008	0.058±0.016	0.067±0.023	0.058±0.015	0.050±0.013	0.098±0.015
(O)	0.058±0.012	0.057±0.008	0.055±0.022	0.152±0.029	0.620±0.123	2.048±0.062	3.095±0.163
(G)	0.053±0.010	0.067±0.014	0.108±0.026	0.175±0.021	1.583±0.196	2.668±0.175	3.668±0.266

各组在 7 个时间段之间 Ca^{2+} 浓度经方差检验差异均有显著性意义($F = 7.020 \sim 1325.38$, $p = 0.000$)。进一步两两比较 ,C 组仅在培养至 21d 时与之前各组比较差异具有显著性($p = 0.000$) ;O 组与 G 组均在培养至 15 d 后 Ca^{2+} 浓度差异才有显著性($p = 0.000$)。说明诱导后期(15 d 后)GSB 含药血清的钙沉积作用比单纯成骨诱导剂者强。提示 GSB 具有增强成骨诱导剂的促钙盐沉积作用。

2.2.3 对骨钙素的影响 :结果显示 ,骨钙素(OCN)分泌量在培养第 14 d 和 21 d ,C、O 和 G 3 组间经方差分析差异均有显著性意义($F = 250.667 \sim 510.417$, $p = 0.000$)。进一步两两比较 ,培养第 14 d 和 21 d ,O 组和 G 组 OCN 分泌量均明显高于 C 组(约 3 倍) ,且 G 组高于 O 组(表 4) ,差异有极显著性意义($p = 0.000$)。说明成骨诱导剂具有诱导 rMSCs 分化为成骨细胞 ,并促使其成熟的作用 ;且 GSB 含药血清可增强这一作用。

异均亦有显著性意义($F = 214.834 \sim 1184.654$, $p = 0.000$)。进一步两两比较 ,C 组仅在培养至 20 d 时与之前各组比较差异具有显著性($p = 0.046 \sim 0.001$) ;O 组和 G 组各时间段之间两两比较差异均有显著性($p = 0.041 \sim 0.000$)。说明成骨诱导剂和 GSB 含药血清随着培养时间延长 ,rMSCs 向成骨细胞诱导增多或(和)成骨细胞功能更强。

2.2.2 对钙沉积量的影响 :经方差分析 ,在培养 9 d 后 3 组间 Ca^{2+} 浓度差异有显著性意义($F = 11.614 \sim 974.182$, $p = 0.001$) 3 d 和 6 d 两个时间段 3 组间差异不明显。进一步两两比较 ,发现 O 组与 G 组 Ca^{2+} 浓度均高于 C 组 ;且与 C 组比较 ,O 组培养至第 12 d 差异才开始有显著性意义 ;而 G 组于第 9 d 就已经差异具有显著性($p = 0.000$,在培养第 9 d ,O 组 Ca^{2+} 浓度高于 G 组($p = 0.001$) ,第 12 d 时二者差异不明显($p = 0.123$) ,至 15 d 后 O 组 Ca^{2+} 浓度均高于 G 组 ,差异具有极显著意义($p = 0.000$)(表 3)。说明 GSB 含药血清对成骨诱导细胞的钙沉积可能启动更早、沉积相对缓慢 ,但作用更强。

表 4 rMSCs 定向诱导成骨细胞培养上清液 OCN 的含量(ng/ml)

Group(n)	14 d	21 d
(C)	0.722±0.099	0.863±0.062
(O)	2.024±0.094	2.618±0.143
(G)	2.460±0.157	3.029±0.344

各组培养至第 14 d 和第 21 d 同组之间分别进行比较 ,发现各组培养第 21 d 均明显高于第 14 d ,经 t 检验差异有极显著性意义($t = - 3.627 \sim - 10.391$, $p = 0.002 \sim 0.000$)(表 4)。说明随着培养时间延长 ,诱导的成骨细胞逐渐成熟 ,OCN 分泌量因此进一步增加 ,且 GSB 含药血清的促成熟作用更明显 ,而 C 组尽管有一定增高 ,可能培养所得的 rMSCs 含有微少量的定向性骨祖细胞(DOPC)的缘故。

总之 ,从 OCN 分泌而言 ,说明 GSB 具有增强成骨诱导剂的成骨诱导及促成骨细胞成熟的作用。

2.3 GSB 血清对 I 型胶原(COLL I)和脂蛋白脂酶(LPL)表达的影响

GSB 血清或(和)成骨诱导剂作用诱导 rMSCs 12 d 后, COL1 mRNA 表达阳性, LPL mRNA 表达阴性。且 GSB 血清 + 成骨诱导剂组比单纯成骨诱导剂组 COL1 mRNA 表达更强(图 3、4)。提示 GSB 血清具有增强成骨诱导剂诱导 rMSCs 向成骨细胞分化的作用。

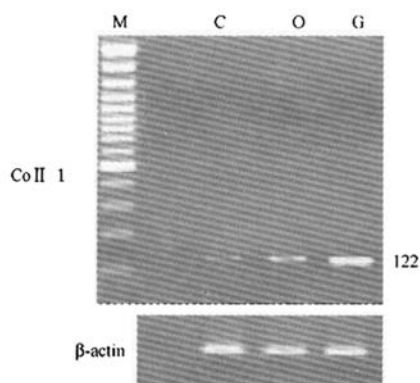


图 3 I 型胶原与 β -actin mRNA RT-PCR 产物电泳图

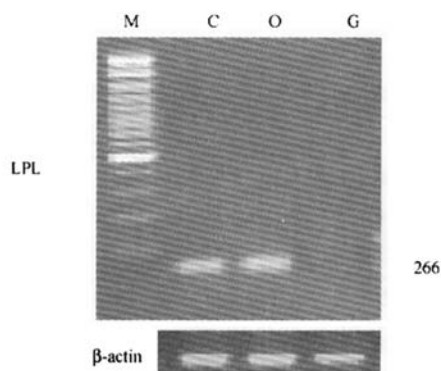


图 4 脂蛋白脂酶与 β -actin mRNA RT-PCR 产物电泳图

3 讨论

近年发现一定条件下 MSCs 具有多向分化潜能^[6,8]。在地塞米松、 β -甘油磷酸钠和维生素 C 诱导下, MSCs 可向成骨细胞分化。其中, 维生素 C 促进体外培养细胞胶原合成时脯氨酸、赖氨酸的羟基化, 同样促进非胶原基质蛋白的合成^[14]; β -甘油磷酸钠则为成骨细胞功能活动提供所需磷离子, 促进钙盐沉积与钙化^[15]。地塞米松可通过增强其受体与基因组靶序列的亲合性以调控分化细胞的基因表达, 一定浓度的地塞米松可提高 ALP 活性, 促进向成骨细胞分化, 为 MSCs 体外成骨分化所必需^[16]。

通常, I 型胶原、ALP、骨钙素可作为成骨细胞鉴定和功能状态评价的指标, 可用作 MSCs 向成骨

细胞分化的标志^[17]。I 型胶原是成骨细胞分泌的主要有机成分, 是钙盐沉着和细胞附着的支架, 骨钙素是成骨细胞分泌的主要非胶原蛋白成分; ALP 是成熟成骨细胞的标志酶之一, 在体外钙化中 ALP 起关键性作用。成骨细胞通过基质小泡释放钙离子和 ALP 等物质, ALP 通过水解有机磷酸盐, 使局部磷酸根浓度升高, 促使钙离子沉积在胶原上, 完成基质矿化过程^[18,19]。

“补肾壮阳”或“补肾滋阴”作用的补肾益精类中药, 具有多环节、多靶点的治疗效果^[1]。目前许多研究表明^[1,2], 补肾中药具有促成骨细胞作用, 主要表现在明显促进成骨细胞的增殖, 能促进成骨细胞对骨基质的矿化功能。中药龟丝补(GSB)乃根据金元朱丹溪“虎潜丸”方意组成的治疗“肾虚腰痛”验方, 由龟板、菟丝子、骨碎补、淫羊藿、知母、白芍、地黄等 7 味药物组成^[4]。方中地黄、龟板、菟丝子, 补肾填精, 强筋壮骨; 淫羊藿, 益肾壮阳、坚筋骨、通经络; 白芍, 养血柔肝; 知母, 壮水滋阴; 骨碎补, 补肾活血。诸药合用, 共奏补肾壮骨、养血滋阴、活血止痛之功。特别是菟丝子, 乃一味妙药, 是“补肾养肝、温脾助胃”之药也。但补而不峻, 温而不燥, 故入肾经, 虚可以补, 实可以利, 寒可以温, 热可以凉, 温可以燥, 燥可以润(《本草汇言》), 适合长期服用。临床研究^[3,5]证实对绝经后骨质疏松妇女具有防治作用, 其作用除抑制破骨细胞活性外, 可能与促进成骨细胞功能有关。

本研究发现: 含药血清 GSB 加入成骨细胞分化培养液后, 3~4 d 后发现梭形细胞比例减少, 细胞变形成多角形、乃至方形, 细胞排列密集, 部分区域细胞成多层生长。在 7 d 和 14 d 均得到改良 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶染色阳性细胞, 阳性细胞率分别为 11.5% 和 37.5%。在 21 d 细胞爬片做 Von Kossa 染色发现有钙盐沉积出现。含药血清 GSB 具有增强成骨诱导剂的成骨诱导及促成骨细胞成熟的作用, 增强 ALP 活性、促进钙沉积和骨钙素(OCN)分泌。

MSCs 分化方向改变骨髓中的成骨与成脂是交互相关的^[20]。本实验通过对成骨细胞标志物的检测, 结果显示补肾填精中药 GSB 促进骨钙素分泌、增强 ALP 活性、促钙盐沉积, 具有增强成骨诱导剂诱导 MSCs 向成骨细胞分化, 并促进成骨细胞成熟的作用。此外, GSB 诱导组 I 型胶原(Col1) mRNA 表达水平明显高于成骨诱导组, 而脂蛋白脂酶(LPL) mRNA 的表达未见增加, 亦提示 GSB 促 rMSCs 的成骨分化而抑制成脂肪分化作用。

【参 考 文 献】

- [1] 王翔, 石印玉. 补肾中药防治骨质疏松症基础研究进展. 中医正骨, 2003, 15(3): 52-53.
- [2] 马慧萍, 贾正平, 白孟海, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 187-189.
- [3] 肖建德, 肖强兵, 阎德文, 等. 中药龟丝补骨片防治大鼠类固醇性骨质疏松的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7: 343-345.
- [4] 肖建德, 阎德文, 刘景芳, 等. 中药龟丝补骨片对绝经后早期妇女性激素和钙调节激素的影响. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(3): 258-262.
- [5] 阎德文, 肖建德, 孙月玲, 等. 中药龟丝补骨片对绝经后早期妇女骨转换指标和骨密度的影响. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(3): 362-364.
- [6] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. Cell Physiol, 1999, 181(1): 67.
- [7] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol, 1976, 4: 267-274.
- [8] 张丽蓉, 项鹏, 夏文杰, 等. 人骨髓间质干细胞分离和培养扩增方法的研究. 广东药学院学报, 2002, 18(2): 135-138.
- [9] 张红敏, 谢春光, 陈世伟. 含药血清体外药理试验的评价. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 741-745.
- [10] 余黎, 王坚, 朱荃. 中药血清药理学研究中血清处理方法的探讨. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2002, 18(4): 222-223.
- [11] 康新勤, 藏伟进, 青晓丽, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞定向成骨细胞分化中碱性磷酸酶的变化. 西安交通大学学报, 2004, 25(4): 366-368.
- [12] Jaiswal N, Haynsworth SE, Caplan AL, et al. Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cellular Biochem, 1998, 295-312.
- [13] 陈槐卿, 药蓉, 韩君, 等. 增龄对大鼠骨髓基质细胞分化的影响. 中国医学科学院学报, 2003, 25(3): 244-249.
- [14] Allampallam K, Chakraborty J, Robinson J. Effect of ascorbic acid and growth factors on collagen metabolism of flexor retinaculum cells from individuals with and without carpal tunnel syndrome. Occup Environ Ad, 2000, 4(3): 251-259.
- [15] Maniopoulos C, Sodek J, Iyublicher AH, et al. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res, 1988, 254(2): 317-330.
- [16] Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. Endocrinology, 1994, 134: 277-285.
- [17] 刘侠, 乐以伦. 碱性磷酸酶与钙化. 中国生物医学工程学报, 1997, 16(1): 71-82.
- [18] 王永红, 王常勇, 郭希民, 等. 人骨髓间质干细胞体外扩增和向成骨细胞分化的实验研究. 中国生物医学工程学报, 2002, 21(3): 251-255.
- [19] 马慧萍, 贾正平, 白孟海, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 187-189.
- [20] 陈槐卿, 周江, 唐艳娟. 骨质疏松症与骨髓基质细胞. 国外医学内分泌学分册, 2003, 23(2): 81-83.

(收稿日期: 2007-01-04)