

· 论 著 ·

左归丸和右归丸对大鼠脂肪干细胞增殖及成骨分化影响的比较

李玲慧^{1,2} 詹红生^{1*} 丁道芳^{1,2} 杜国庆^{1,2} 龚浩³ 宋奕^{1,2}

1. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203;

2. 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 201203;

3. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 11-1146-06

摘要: **目的** 比较左归丸、右归丸对大鼠脂肪干细胞(ASCs)增殖和成骨性分化的影响。**方法** 成年大鼠 15 只,随机分为 3 组,分别以左归丸(ZGW 组)、右归丸(YGW 组)和生理盐水(CON 组)连续灌胃后制备含药血清。胶原酶消化法分离大鼠脂肪干细胞,成骨诱导 21 d 后,茜素红染色对细胞进行鉴定。分别采用 CCK-8 法、PNPP 法测定加药诱导后 ASCs 的增殖能力及碱性磷酸酶表达差异;比色法检测细胞外钙离子浓度。Western Blot 法测定加药诱导 7 d 后的 Runx2 蛋白表达量。**结果** ASCs 细胞呈长梭形生长,增殖旺盛;茜素红染色显示为阳性。CCK-8 法检测结果显示,加药 24 h 及 48 h 时, YGW 组 OD 值显著高于 ZGW 组及 CON 组($P < 0.05$);加药 72 h 时, ZGW 组、YGW 组 OD 值均显著高于 CON 组($P < 0.05$),而两个加药组间并无显著性差异($P > 0.05$)。PNPP 检测结果显示, ZGW 组、YGW 组 OD 值均显著高于 CON 组($P < 0.05$);其中 YGW 组 OD 值显著高于 ZGW 组($P < 0.05$)。YGW 组细胞外钙离子浓度显著升高($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示, YGW 组 Runx2 蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。**结论** 与滋肾阴法相比,温肾阳法在促进 ASCs 增殖及成骨分化方面均表现出明显优势。

关键词: 左归丸;右归丸;脂肪干细胞;成骨分化;Runx2**Comparison of the effect of Zuogui pill and Yougui pill on the proliferation and osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells**LI Linghui^{1,2}, ZHAN Hongsheng¹, DING Daofang^{1,2}, DU Guoqing^{1,2}, GONG Hao³, SONG Yi^{1,2}

1. Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

2. Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai Academy of TCM, Shanghai 201203, China

3. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100102, China

Corresponding author: ZHAN Hongsheng, Email: zhanhongsheng2010@163.com

Abstract: **Objective** To compare the effect of Zuogui pill and Yougui pill on the proliferation and osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells (ASCs). **Methods** Fifteen adult rats were randomly divided into 3 groups: Zuogui pill group (ZGW group), Yougui pill group (YGW group), and normal saline group (CON group). Drug containing-serum of rats was acquired after continuous lavage with decoction of Zuogui pill and Yougui pill, and physiological saline, respectively. Rat ASCs were isolated using collagenase digestion method. After 21-day osteogenic induction, the cells were identified using Alizarin red staining. The proliferation of ASCs and the expression of alkaline phosphatase after drug intervention were detected using CCK-8 and PNPP methods. Extracellular Ca^{2+} concentration was detected using colorimetric method. The expression of Runx2 protein after 7-day drug induction was detected using Western blotting. **Results** The ASCs were mainly spindle-shaped and proliferated quickly. The result of Alizarin red staining was positive. The results of CCK-8 method showed that the OD value was significantly higher in YGW group than that in both ZGW

基金项目:“中医骨伤科学”国家重点学科(100508)、国家自然科学基金项目(81073114,81001527,81102603,81173621)、上海领军人才项目(041)、上海高校“中医脊柱病损研究”创新团队建设项目(2009-26)、上海市科委重点项目(09dz1973800,08411950300,11DZ1973400,11XD1404600)。

* 通讯作者:詹红生,Email:zhanhongsheng2010@163.com

group and CON group after 24-hour and 48-hour culture ($P < 0.05$). And after 72-hour culture, the OD value in both YGW group and ZGW group was higher than that in CON group ($P < 0.05$), while no significant difference between the two drug-intervened groups was observed ($P > 0.05$). The result of PNPP detection showed that the OD value in both YGW group and ZGW group was significantly higher than that in CON group ($P < 0.05$). Compared with that in ZGW group, the OD value in YGW group was higher ($P < 0.05$). The extracellular Ca^{2+} concentration was higher in YGW group ($P < 0.05$). The result of Western blotting showed that the expression of Runx2 protein increased significantly in YGW group ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with the method of nourishing the kidney-yin, the method of warming the kidney-yang has obvious advantage in promoting both the proliferation and the osteogenic differentiation of ASCs.

Key words: Zuogui pill; Yougui pill; Adipose-derived Stem Cells; Osteogenic differentiation; Runx2

骨质疏松症是以骨强度下降,骨折风险增加为特征的骨骼系统疾病^[1]。中医学认为,肾主骨生髓,肾虚是骨质疏松症发病的主要病理基础。肾精是构成肾脏的原始物质,其主要成分为先天之精,是人体阴阳之根本,可化生为人体之气血津液、推动机体生长发育。干细胞相关研究是当今生物医学领域最令人瞩目的热点研究之一。脂肪干细胞(Adipose-Derived Stem Cells, ASCs)是从脂肪组织中分离出来、具有多向分化潜能的间充质干细胞,在适当条件下可定向分化为成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞等^[2-4]。这与中医学“肾精”功能的描述不谋而合,二者具有极大的相似性。故本研究在中医学理论的指导下,选用滋补肾阴和温补肾阳的代表方剂左归丸及右归丸,以含药血清制备完全培养基,观察两种药物对体外培养的脂肪干细胞增殖功能及成骨性分化的影响,旨在为中医药治疗骨质疏松症的机理研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 15 只, 200 ± 10 g 清洁级,由上海中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2008-0016。

1.2 主要试剂与仪器

LG-DMEM 培养基、FBS、0.25% 胰酶(Gibco); 双抗(Biowest) Collagenase I (Sigma); CCK-8 检测试剂盒(日本同仁); Runx2、PCNA 兔抗大鼠多克隆抗体(Abcam); PNPP、BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce); 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris-base、SDS、AP、TEMED (Applicham); 倒置荧光显微镜(Olympus); CO_2 培养箱(HERA); 生物安全柜(Labconco)。

1.3 药物、分组及含药血清的制备

左归丸:熟地 24 g, 山药 12 g, 枸杞 12 g, 山茱萸 12 g, 川牛膝 9 g, 鹿角胶 12 g, 龟板胶 12 g, 菟丝子

12 g。右归丸:熟地 24 g, 山药 12 g, 山茱萸 9 g, 枸杞 12 g, 菟丝子 12 g, 鹿角胶 12 g, 杜仲 12 g, 肉桂 6 g, 当归 9 g, 附子 6 g。以上药物剂量均为人的临床日用量(上海中医药大学附属曙光医院中药房生产的中药浓本方),根据《药理实验方法学》换算为大鼠日用量,以去离子水加热搅拌至溶解。本研究随机分为三组,即左归丸组(ZGW)、右归丸组(YGW)及对照组(CON),每种药物干预 5 只 SD 大鼠,对照组以生理盐水代替。连续给药 3d,每天早晚各一次,第 4 天两次给药间隔 2 h,末次给药 1 h 后以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,经腹主动脉采血,室温放置 2 h 后离心(2000 r/min , 20 min),吸取上层血清, 56°C 、30 min 灭活,经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜抽滤除菌,分装后置于 -80°C 保存备用。药物干预方案:将体积分数为 10% 的各组含药血清加入成骨诱导培养基干预培养。

1.4 ASCs 的体外分离与培养

以上 SD 大鼠采血处死后,以 75% 乙醇对大鼠腹部皮毛进行消毒。沿腹股沟方向剪开皮肤,切取白色脂肪组织,置入含双抗的 PBS 反复冲洗 3 次并清除肉眼可见的血管及杂质。将脂肪组织剪碎后置入 0.1% I 型胶原酶中, 37°C 震荡消化 30 min,取出含细胞的悬液, 1000 rpm 离心 10 min,以 LG-DMEM (含体积分数 10% FBS) 将细胞重悬,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后换液,以后隔天换液 1 次。细胞生长至 80% 汇合时,以 1:3 传代,倒置相差显微镜摄片记录细胞生长状况。

1.5 ASCs 成骨性诱导及鉴定

成骨诱导培养液: LG-DMEM, 10% FBS, $0.01 \mu\text{M}$ 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, 37.5 mg/L 抗坏血酸, 10 mM β -甘油磷酸钠。第三代 ASCs 诱导 21 d, PBS 清洗 1 次, 95% 酒精固定 10 min, PBS 清洗, 0.2% 茜素红-Tris-HCl 避光孵育 30 min, PBS 清洗后于倒置显微镜下摄片观察。

1.6 CCK8 法检测药物对细胞增殖功能的影响

第三代 ASCs 制备成细胞悬液,以 5000 个细胞/孔接种于 96 孔板内,24 h 贴壁后以含相应药物的成骨诱导培养液加入各组细胞培养孔干预培养,分别于 24 h、48 h 及 72 h 后采用 CCK-8 法,以多功能酶标仪读取波长 450 nm 处的 OD 值(见表 1)。

1.7 PNPP 法检测药物对大鼠 ASC 碱性磷酸酶表达的影响

第三代 ASCs 以含相应药物的成骨诱导培养液干预 7 d,提取各组细胞内的总蛋白,以 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,各组均取 30 μg 蛋白,设置 6 个复孔,加入 96 孔板,每孔加入 100 μl PNPP 反应液,避光 1 h 后以多功能酶标仪读取波长 405 nm 处的 OD 值。

1.8 细胞外钙离子浓度定量检测

第三代 ASCs 以含相应药物的成骨诱导培养液干预培养 7 d,采用 GENMED 钙离子浓度比色法定量检测试剂盒对细胞培养上清中的钙离子浓度进行定量检测。按照说明书配制梯度浓度的 CaCl₂ 标准溶液,继之配制检测工作液;将 96 孔板中的各检测孔加入 180 μl 检测工作液及 20 μl 各浓度 CaCl₂ 标准液或待测的细胞上清,每组设置 6 个复孔,背景校正孔加入未培养细胞的各组培养液,轻轻敲打混匀,室温孵育 5 min,避免光照;以多功能酶标仪读取波长 570 nm 处的 OD 值,以标准曲线换算出各检测样本的钙离子含量;收集各组细胞,提取各组细胞内的总蛋白,以 BCA 蛋白测定试剂盒测定总蛋白含量,细胞外钙离子含量均以其总蛋白含量进行均一化。

1.9 蛋白免疫印迹法(Western Blot)测定各组细胞 Runx2 蛋白表达差异

第三代细胞以适当密度接种于 6 孔板,药物干预 7 d,RIPA 裂解细胞,以 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,加入上样缓冲液定量分装,煮沸 10 min,经 SDS-PAGE 胶电泳后转膜,封闭 1 h,加入 Runx2 抗体(或 PCNA 抗体)孵育过夜;TBST 洗膜 3 次。加入二抗孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,化学发光法检测不同样品蛋白表达的情况;经计算机图像分析仪扫描并行灰度值测定及分析。

1.10 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,以均数 ± 标准差表示;组间比较采用单因素方差分析,检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 细胞形态学观察及鉴定

光镜下观察细胞,接种第 1 天时培养基中可见少量漂浮的红细胞,上层液面漂浮大量脂滴,约 1 h 后大多数细胞开始贴壁,折光性良好,但形态尚未展开,呈圆点状或短梭形。24 h 后首次换液,PBS 清洗一次去除未贴壁杂质、脂滴及其他死细胞。接种 72 h 后,细胞呈长梭形生长,增殖旺盛、形态一致(见图 1)。传代至第 15 代后,细胞仍维持长梭状形态,增殖旺盛、排列整齐,未见明显衰老、凋亡或大量脂滴生成。

第三代 ASCs 进行成骨性诱导,细胞形态逐渐由细长的梭形变宽变大,继续诱导可见其形态逐渐不规则。诱导 21 d 后细胞呈现重叠生长,局部堆积成团块,形成钙结节,茜素红染色呈橘红色(见图 2),说明该细胞具备成骨特性,符合干细胞的基本特征,可鉴定为脂肪干细胞。

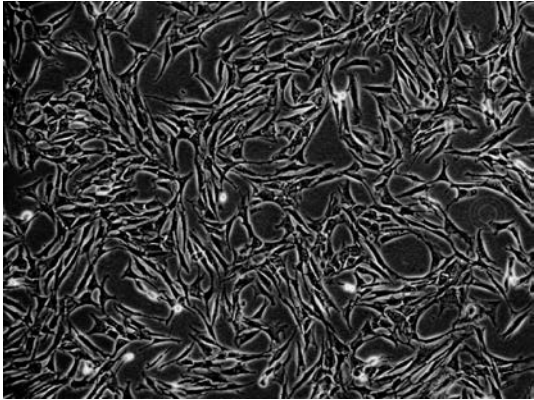


图 1 原代培养 72 h 的 ASCs 形态(×100)
Fig. 1 Morphology of primary ASCs after 72-hour culture (×100).

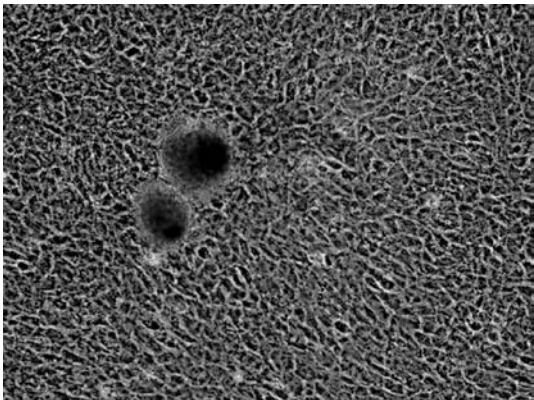


图 2 第三代 ASCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色(×100)
Fig. 2 Alizarin red staining of the third passage of ASCs after cultured in osteogenic medium for 21 days (×100)

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖率

CCK-8 法检测结果显示(见表 1),加药 24 h 及 48 h 时,ZGW 组 OD 值与 CON 组并无明显差异($P > 0.05$);YGW 组 OD 值高于 CON 组,并且显著高于 ZGW 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。加药 72 h 时,ZGW 组及 YGW 组 OD 值均显著高于 CON 组($P < 0.05$),而两个加药组间并无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1 各组细胞光密度值的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of OD value between the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	OD ₄₅₀ (增殖测定)		
		24 h	48 h	72 h
ZGW	6	0.485 ± 0.019	1.199 ± 0.031	2.260 ± 0.078 *
YGW	6	0.546 ± 0.014 * #	1.275 ± 0.023 * #	2.363 ± 0.034 *
CON	6	0.482 ± 0.009	1.195 ± 0.051	2.001 ± 0.049

注: * 与 CON 组比较 $P < 0.05$; # 与 ZGW 组比较 $P < 0.05$

2.3 PNPP 法测定各组碱性磷酸酶表达差异

PNPP 法检测结果显示(见图 3),ZGW 组及 YGW 组的 OD 值均显著高于 CON 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);其中 YGW 组 OD 值显著高于 ZGW 组($P < 0.05$)。以上结果说明,左归丸及右归丸均可提高 ASCs 的碱性磷酸酶表达,但右归丸的效果更明显。

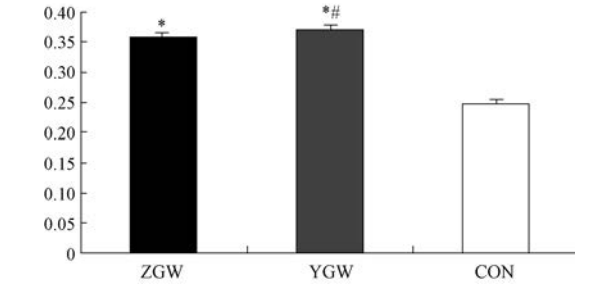


图 3 各组细胞碱性磷酸酶表达比较(OD 值)

(* 与 CON 组比较 $P < 0.05$; # 与 ZGW 组比较 $P < 0.05$)

Fig. 3 Comparison of the expression of alkaline phosphatase among groups

(* $P < 0.05$ compared with CON group; # $P < 0.05$ compared with ZGW group)

2.4 细胞外钙离子浓度定量检测

钙离子浓度检测结果显示(见图 4),YGW 组细胞外的钙离子浓度显著高于 CON 组($P < 0.05$),ZGW 组钙离子浓度与 CON 组并无显著性差异。

2.5 Western Blot 法测定各组细胞 Runx2、PCNA 蛋白表达差异

Western Blot 结果显示(见图 5),两个加药组均有上调 Runx2 蛋白的趋势,YGW 组 Runx2 与内参

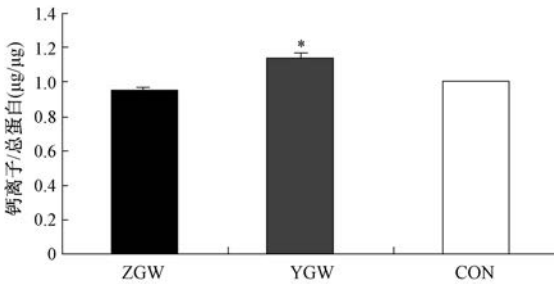


图 4 各组 ASCs 细胞外钙离子浓度差异

(* 与 CON 组比较 $P < 0.05$)

Fig. 4 Comparison of the extracellular Ca^{2+} concentrations among groups

(* $P < 0.05$ compared with CON group)

GAPDH 的灰度值比较 CON 组有显著性提高($P < 0.05$)。其中,两个加药组间亦有明显差异,YGW 组显著高于 ZGW 组($P < 0.05$)。YGW 组及 ZGW 组均可显著上调细胞 PCNA 蛋白表达,前者更明显($P < 0.05$)。

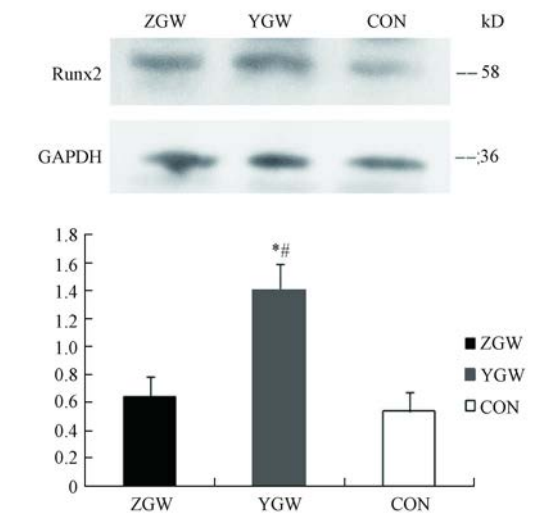


图 5 各组细胞 Runx2 蛋白表达差异

(* 与 CON 组比较 $P < 0.05$; # 与 ZGW 组比较 $P < 0.05$)

Fig. 5 Comparison of the expression of Runx2 protein among groups

(* $P < 0.05$ compared with CON group; # $P < 0.05$ compared with ZGW group)

3 讨论

中医药在骨质疏松的防治作用一直受到多方面肯定,我国 2007 年骨质疏松临床诊疗指南将中药列为治疗药物之一。在这一系列中药中,补肾中药占了相当大的比例,因而针对骨代谢疾病的研究也大多从此入手^[5-7]。中医认为肾主藏精,其充在骨,肾

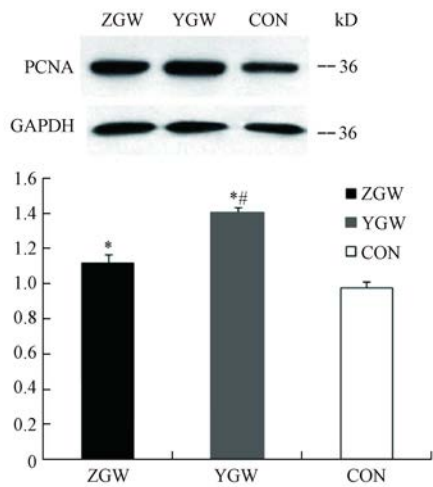


图 6 各组细胞 PCNA 蛋白表达差异

(* 与 CON 组比较 $P < 0.05$; # 与 ZGW 组比较 $P < 0.05$)

Fig. 6 Comparison of the expression of PCNA protein among groups

(* $P < 0.05$ compared with CON group; # $P < 0.05$ compared with ZGW group)

可主骨生髓, 骨的生长、发育以及强盛或衰弱均与肾精盛衰关系密切; 肾为先天之本, 是人体阴阳之根本, 肾精可化生为人体 的气血津液、推动机体生长发育。干细胞相关研究是当前生物医学领域的研究热点之一; 干细胞是指具有自我复制和多向分化潜能的原始细胞, 在一定条件下可分化为多种功能细胞或组织器官。中医学“肾为元阴元阳” 的理论 与干细胞的特性具有极大的相似之处。本研究基于二者的潜在联系, 以补肾法为纲领, 观察中医药对干细胞分化功能的调控, 试图揭示补肾中药治疗骨质疏松症的机理。

脂肪干细胞 (ASCs) 是近来发现的存在于脂肪组织中的间充质干细胞, 研究已经证实它能够向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等不同方向分化。与骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 相比, 脂肪干细胞更易于获取、体外增殖更快, 且培养条件更简单 (不像骨髓间充质干细胞对培养基中胎牛血清的来源和质量有严格要求)^[8]。ASCs 有可能替代 BMSCs 而成为组织工程种子细胞的新来源, 因此本研究选取 ASCs 为研究对象, 初步探索补肾中药对其成骨性分化能力的影响。矿化结节是成骨细胞分化晚期的特征性指标, 它的形成表明成骨细胞已分化成熟。本实验所提取的细胞经成骨诱导后, 有大量的矿化结节形成, 说明该细胞具有向成骨细胞分化的潜能, 符合干细胞的基本特征, 证实为脂肪源性干细胞。

补肾法是中医药防治骨质疏松症的核心治法, 又可进一步分为温补肾阳和滋补肾阴两类^[9]。本研究在中医学理论的指导下, 选用滋补肾阴和温补肾阳的代表方剂左归丸及右归丸, 观察二者对脂肪干细胞成骨分化的调控作用差异。左归丸、右归丸均出自明代张景岳的《景岳全书》; 前者由六味地黄丸化裁而来, 是滋阴补肾法的代表方剂; 后者由金匱肾气丸加减而成, 为温补肾阳的代表方剂。我们前期的研究结果表明^[10], 补肾方可以调节成骨细胞及骨髓基质干细胞 Runx2 mRNA 的表达, 而其拆方养阴组分及温阳组分在调控 Runx2 的表达方面又因作用于成骨细胞及骨髓基质干细胞的不同而作用优势有所不同, 温阳组分在促进骨髓基质干细胞的 Runx2 mRNA 的表达上更有优势。因此, 我们逐步将视线聚焦在温肾阳中药上, 试图从细胞增殖及成骨标志性蛋白表达的水平出发, 阐述温肾阳中药对脂肪干细胞成骨性分化的调控作用。

脂肪干细胞来源于中胚层, 虽具有很强的自我更新能力, 但通常处于静止期, 一般情况下并不会增殖, 只有在适当的刺激下才能表现出强大的扩增能力。研究结果显示, 培养 48 h 内, 右归丸可明显促进脂肪干细胞增殖, 左归丸组与对照组则无明显差异; 培养 72 h 后, 左归丸及右归丸均可明显促进 ASCs 增殖。PCNA 蛋白检测结果与 CCK-8 结果一致, 加药诱导 7 d 后, 左归丸及右归丸均可显著促进 ASCs 增殖, 右归丸更显著。以上结果提示补肾阳中药在培养早期即可促进脂肪干细胞增殖, 而滋肾阴中药则需培养一段时间方能表现出对 ASCs 增殖的促进作用, 说明在促进 ASCs 增殖方面, 温肾阳中药优于滋肾阴中药。碱性磷酸酶 (ALP) 是成骨细胞分泌的标志性酶, 是成骨细胞分化早期的特异性标志之一, 其活性的高表达是细胞成骨功能增强的体现^[11]。本研究中, ASCs 向成骨细胞诱导一周后, 左归丸组及右归丸组均能明显上调细胞 ALP 的表达, 而右归丸较左归丸效果更强, 说明温肾阳中药在增加细胞功能性蛋白表达及增强细胞成骨活性方面优于滋肾阴中药。右归丸可显著促进细胞外钙离子沉积, 而左归丸作用并不明显。Runx2 是间充质干细胞成骨分化和骨发育过程中所必需的特异性转录因子^[12]。Runx2 的表达是成骨细胞开始分化的标志, 因此它成为骨形成过程中最早、最具特异性的标志基因之一。本研究中发现, 右归丸可明显上调 ASCs 的 Runx2 蛋白表达, 而左归丸并无此作用, 说明温肾阳中药可促进脂肪间充质干细胞向成骨细胞分化。

综上所述,与滋肾阴中药复方左归丸相比,温肾阳中药复方右归丸在促进 ASCs 增殖及成骨分化方面均表现出明显优势。本研究初步证实了中医学“肾”理论与现代医学“干细胞”理论在成骨指标方面存在的联系。下一阶段,我们将针对温肾阳中药调控干细胞分化机制方面展开研究,深入探索中医药治疗骨质疏松症的机理。

【参 考 文 献】

- [1] Hou JM, Lan XH, Wu HN, et al. Chin J Joint Surg (Electronic Edition) [J]. 2012, 6 (3) : 472-478.
 - [2] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue; implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng. 2001, 7 (2) : 211-228.
 - [3] McIntosh K, Zvonick S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells; temporal changes in vitro [J]. Stem Cells. 2006, 24 (5) : 1246-1253.
 - [4] Liang LH, Li L, Zhao JH, et al. Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi. 2012, 28 (3) : 289-293.
 - [5] Ju DH, Li HH, Liu H, et al. Therapeutic effect of recuperating kidney and invigorating spleen prescription on rats with osteoporosis of spleen and kidney deficiency syndrome [J]. CJTCMP. 2012, 27 (12) : 3207-3210.
 - [6] Pu HH, Wang HF, Li B, et al. Effect of Bushen Chinese medicine and nilestriol on 1, 25 (OH)₂D blood level and bone loss in ovariectomized rats [J]. Fudan Univ J med Sci, 2012, 39 (1) : 36-41.
 - [7] Yang F, Zheng HX, Wang J, et al. Effect of varied traditional Chinese therapies on bone mineral density and Ca²⁺-Mg²⁺-ATP enzyme in the skeletal muscle of glucocorticoid-induced osteoporosis in rats [J]. Chin J Osteoporos, 2011, 17 (1) : 56-59.
 - [8] Tapp H, Hanley EN, Jr., Patt JC, et al. Adipose-derived stem cells; characterization and current application in orthopaedic tissue repair [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234 : 1-9.
 - [9] Huang PC, Ma Y. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine. 2012, 7 (11) : 926-928.
 - [10] Wang WW, Wei YY, Shi YY. Effects of bushen Chinese medicine on expression of cbfa1 in aging osteoblast of rat [J]. Chinese Journal of Information on TCM. 2007, 14 (11) : 29-31.
 - [11] Xu LX, Gao J, Zhang QD. Effect of zuogui pill medicated serum on level of alkaline phosphatase during differentiation from rat marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17 (7) : 149-152.
 - [12] Saito T, Ogawa M, Hata Y, et al. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts [J]. J Endod, 2004, 30 : 205-208.
(收稿日期: 2013-02-26)
-
- (上接第 1145 页)
- [6] Funakoshi Y, Omori H, Yada H, et al. Relationship between changes of bone mineral density over seven years and A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene or lifestyle factors in Japanese female workers [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2010, 19 (4) : 534-539.
 - [7] Yu J B, Ke Y H, He J W, et al. No association between LRP5 gene polymorphisms and bone and obesity phenotypes in Chinese male-offspring nuclear families [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31 (11) : 1464-1469.
 - [8] Jiang X Y, Chen Y, Xu L, et al. Association of LRP5 polymorphism with bone mass density and cholesterol level in population of Chinese Han [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010, 118 (6) : 388-391.
 - [9] Urano T, Shiraki M, Usui T, et al. A1330V variant of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene decreases Wnt signaling and affects the total body bone mineral density in Japanese women [J]. Endocr J, 2009, 56 (4) : 625-631.
 - [10] Grundberg E, Lau E M, Lorentzon M, et al. Large-scale association study between two coding LRP5 gene polymorphisms and bone phenotypes and fractures in men [J]. Osteoporos Int, 2008, 19 (6) : 829-837.
 - [11] Ezura Y, Nakajima T, Urano T, et al. Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women [J]. Bone, 2007, 40 (4) : 997-1005.
 - [12] Zhang Z L, Qin Y J, He J W, et al. Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density in postmenopausal Chinese women [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (9) : 1111-1116.
 - [13] Koh J M, Jung M H, Hong J S, et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men [J]. J Korean Med Sci, 2004, 19 (3) : 407-412.
 - [14] Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, et al. LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density [J]. J Hum Genet, 2004, 49 (2) : 80-86.
 - [15] 朱翔, 章秋, 王佑民, 等. 安徽地区绝经后妇女低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因多态性与骨密度的关系 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2007 (5) .
 - [16] van Meurs J B, Rivadeneira F, Jhamai M, et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21 (1) : 141-150.
 - [17] Xiong D H, Shen H, Zhao L J, et al. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21 (11) : 1678-1695.
 - [18] Huang Q Y, Recker R R, Deng H W. Searching for osteoporosis genes in the post-genome era: progress and challenges [J]. Osteoporos Int, 2003, 14 (9) : 701-715.
(收稿日期: 2012-11-10)

左归丸和右归丸对大鼠脂肪干细胞增殖及成骨分化影响的比较

作者：[李玲慧](#), [詹红生](#), [丁道芳](#), [杜国庆](#), [龚浩](#), [宋奕](#), [LI Linghui](#), [ZHAN Hongsheng](#),
[DING Daofang](#), [DU Guoqing](#), [GONG Hao](#), [SONG Yi](#)
作者单位：[李玲慧,丁道芳,杜国庆,宋奕,LI Linghui,DING Daofang,DU Guoqing,SONG Yi\(上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203; 上海市中医药研究院骨伤科研究所, 上海 201203\)](#), [詹红生,ZHAN Hongsheng\(上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心,上海,201203\)](#), [龚浩,GONG Hao\(中国中医科学院望京医院,北京,100102\)](#)
刊名：[中国骨质疏松杂志](#)


英文刊名：[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2013(11)

参考文献(12条)

1. [Hou JM;Lan XH;Wu HN 查看详情](#) 2012(03)
2. [Zuk PA;Zhu M;Mizuno H Multilineage cells from human adipose tissue:implications for cell-based therapies](#) 2001(02)
3. [McIntosh K;Zvonic S;Garrett S The immunogenicity of human adipose-derived cells:temporal changes in vitro](#) 2006(05)
4. [Liang LH;Li L;Zhao JH 查看详情](#) 2012(03)
5. [Ju DH;Li HH;Liu H Therapeutic effect of recuperating kidney and invigorating spleen prescription on rats with osteoporosis of spleen and kidney deficiency syndrome](#) 2012(12)
6. [Pu HH;Wang HF;Li B Effect of Bushen Chinese medicine and nilestriol on 1,25 \(OH\)2D blood level and bone loss in ovariectomized rats](#) 2012(01)
7. [Yang F;Zheng HX;Wang J Effect of varied traditional Chinese therapies on bone mineral density and Ca2+-Mg2+-ATP enzyme in the skeletal muscle of glucocorticoid-induced osteoporosis in rats\[期刊论文\]-Chin J Osteoporos](#) 2011(01)
8. [Tapp H;Hanley EN, Jr;Patt JC Adipose-derived stem cells:characterization and current application in orthopaedic tissue repair](#) 2009
9. [Huang PC;Ma Y 查看详情](#) 2012(11)
10. [Wang WW;Wei YY;Shi YY Effects of bushen Chinese medicine on expression of cbfa1 in aging osteoblast of rat\[期刊论文\]-Chinese Journal of Information on TCM](#) 2007(11)
11. [Xu LX;Gao J;Zhang QD Effect of zuogui pill medicated serum on level of alkaline phosphatase during differentiation from rat marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts\[期刊论文\]-Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae](#) 2011(07)
12. [Saito T;Ogawa M;Hata Y Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts](#) 2004