

· 论 著 ·

基于 Cyclin D1 基因敲减探讨健骨颗粒促进成骨细胞增殖的机理

杨娟 贾晓康 张楚天 黄云梅 黄美雅 张志恒 孙攀 吴银生 林燕萍*
福建中医药大学, 福建 福州 350122

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 08-1067-07

摘要: **目的** 验证 Cyclin D1 及其下游信号蛋白对成骨细胞增殖的调控作用, 探讨健骨颗粒促进成骨细胞增殖的作用机制。**方法** 培养成骨样细胞株 UMR-106, 运用 CRISPR/Cas9 技术敲减 Cyclin D1 基因后, 将细胞分为基因敲减+生理盐水组(组1)、基因敲减+健骨颗粒组(组2)、病毒空载体细胞(组3, 阴性对照)。未行基因敲减的细胞分为正常细胞+生理盐水组(组4)和正常细胞+健骨颗粒组(组5)。分别用生理盐水血清或健骨颗粒含药血清干预各组细胞 24、48、72 h, 通过 CCK8 法检测细胞增殖情况, 利用 Real time PCR 检测 Cyclin D1、Cyclin E、CDK 2、CDK 4、Rb 及 E2F-1 基因的表达水平。**结果** 经 Western-bolt 检测表明基因敲减的成骨细胞 Cyclin D1 蛋白表达明显下降。CCK8 法检测结果显示, 与组 4 相比, 组 5 增殖速度变快 ($P < 0.05$), 组 3 增殖速度无差异 ($P > 0.05$), 组 1 和组 2 增殖速度均减慢 ($P < 0.05$); 与组 5 相比, 组 2 增殖速度减慢 ($P < 0.01$); 与组 1 相比, 组 2 增殖速度无统计学意义 ($P > 0.05$)。Real time PCR 检测结果显示, 与组 4 相比, 组 5 Cyclin D1、CDK2、CDK4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 mRNA 的表达明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 组 3 表达无统计学意义 ($P > 0.05$), 组 1 和组 2 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与组 5 相比, 组 2 增殖速度减慢 ($P < 0.01$); 与组 1 相比, 组 2 无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Cyclin D1 及其下游信号蛋白是调控成骨细胞增殖的关键因素; 健骨颗粒可以通过调节 Cyclin D1 及其下游信号蛋白促进成骨细胞增殖。

关键词: 健骨颗粒; 成骨细胞; Cyclin D1; 基因敲减; 细胞增殖

The mechanism of Jiangu granule in promoting osteoblast proliferation based on Cyclin D1 knock-down

YANG Juan, JIA Xiaokang, ZHANG Chutian, HUANG Yunmei, HUANG Meiya, ZHANG Zhiheng, SUN Pan, WU Yinsheng, LIN Yanping*

Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

* Corresponding author: LIN Yanping, Email: lyp66@ 126.com

Abstract: Objective To verify the regulation of Cyclin D1 and downstream signaling proteins on osteoblast proliferation cycle and explore the mechanism of Jiangu granule in promoting the proliferation of osteoblasts. **Methods** The osteoblast-like cell lines UMR-106 was knock-down of the Cyclin D1 gene by CRISPR/Cas9 gene editing and divided into 2 groups: gene knock-down + saline group (group 1) and gene knock-down + Jiangu granule group (group 2). The virus empty vector cell (group 3) was used as negative control. Cells without gene knock-down were divided into normal cells + saline group (group 4) and normal cells + Jiangu granule group (group 5). The cells were respectively treated by saline or Jiangu granule drug-containing serum for 24, 48 and 72 hours, and CCK8 method was used to detect cell proliferation. Gene expression of Cyclin D1, Cyclin E, CDK 2, CDK 4, Rb and E2F-1 were detected by Real time PCR. **Results** Western-bolt detection showed that the expression of Cyclin D1 protein decreased significantly in osteoblasts with gene knock-down. The result of CCK8 test shows that compared with normal cells + saline group, normal cells + Jiangu granule group's multiplication rate was obviously increased ($P < 0.05$), negative control group had no significant difference ($P > 0.05$), while gene knock-down + saline group and gene knock-down + Jiangu granule group had much

slower rate ($P < 0.05$). Compared with normal cells + Jiangu granule group, there was a significant decrease in gene knock-down + Jiangu granule group ($P > 0.01$), and there was no significant difference between gene knock-down + saline group and gene knock-down + Jiangu group ($P > 0.05$). Real time PCR demonstrated that compared with normal cells + saline group's mRNA expression of Cyclin D1, CDK2, CDK4, Cyclin E, Rb and E2F-1, the expression in normal cells + Jiangu granule group was distinctly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while negative control group had no significant difference ($P > 0.05$), and the expression in gene knock-down + saline group and gene knock-down + Jiangu granule groups were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with normal cells + Jiangu granule group's, the gene knock-down + Jiangu granule group had decreased rate ($P > 0.01$), while there was no significant difference between gene knock-down + saline group and gene knock-down + Jiangu group ($P > 0.05$). **Conclusion** Cyclin D1 and its downstream signaling proteins are the key factors to regulate the proliferation of osteoblasts. The function of Jiangu granule in promoting osteoblast proliferation may be achieved by regulating Cyclin D1 and its downstream signaling proteins.

Key words: Jiangu granule; osteoblast; Cyclin D1; gene knock-down; cell proliferation

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少、骨的细微结构发生改变、骨脆性增加并易于发生骨折为特点的全身性骨骼疾病^[1]。根据国际骨质疏松症基金会的一项最新研究^[2]显示,我国骨质疏松疾病的总患病率为 6.6%~19.3%,平均高达 13%。据 2013 年人口普查结果显示,超过 60 岁的老人约为 2.02 亿,推测至 2050 年这一数字可能上升至 4 亿,其中骨质疏松症或表现出骨密度低下的患者将达到 2.12 亿^[3]。生活中人们常常忽视 OP 的存在,直到发生骨折才被察觉,因此 OP 也被形象地称作“无声无息的疾病”。骨质疏松症患者早期无明显症状,且缺少有效的诊治方法,其引起的高骨折率导致了患者残疾和早逝,给中老年人特别是绝经后妇女的生活带来了严重困扰。研究发现^[4],绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的发生与诸多因素有关,与女性绝经后雌激素的缺乏关系密切。雌激素的缺乏使成骨细胞和破骨细胞的功能发生改变,骨转换速度加快使得骨吸收大于骨形成,导致骨密度降低,从而形成绝经后骨质疏松症。成骨细胞对骨形成、骨代谢和维持成年骨骼系统的正常状态都发挥着重要作用^[5]。因此,探讨成骨细胞增殖是研究绝经后骨质疏松症的重点方向之一。

Cyclin D1 是调控细胞周期 G1 期的关键蛋白,可以推动细胞周期由 G1/S 检测点进入 S 期^[6-7]。前期研究表明^[8-9],成骨细胞中存在 Cyclin D1、CDK4 等细胞周期调控蛋白的表达,成骨细胞的增殖与 Cyclin D1 密切相关。而健骨颗粒能调控成骨细胞 G1/S 期,加快细胞周期总体进程,促进成骨细胞增殖。本研究将以 Cyclin D1 基因敲减为切入点,观察基因敲减后各项指标的表达情况,探讨健骨颗粒促进成骨细胞增殖的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药物:健骨颗粒由煅狗骨、淫羊藿、山茱萸、山药、党参等药物组成,原药材购自福建省医药公司,由福建中医药研究院中试车间负责加工制备,每克健骨颗粒含原生药 2.9 g。

1.1.2 实验动物:3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只,体重(322 ± 20)g,由上海克莱实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(沪)2012-0002,合格证编号:2007000562039。饲养于福建中医药大学医学实验动物中心,每笼 5 只,室温、通风良好、自然光照、自由饮食和活动。

1.1.3 实验试剂:胎牛血清(美国 Gibco 公司);DMEM 高糖培养基(新西兰 Hyclone 公司);CCK8 试剂盒、 β -action 抗体、Cyclin D1 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);Cyclin D1、Cyclin E、CDK4、E2F1 PCR 引物(上海生物工程有限公司);YBR Premix Ex Taq™ PCR Kit(日本 TaKaRa 公司);sgRNA-EGFP/sgRNA-ERFP/sgRNA-puro 慢病毒颗粒、Cas9-puro 慢病毒颗粒、普适型阴性对照 sgRNA-EGFP 慢病毒颗粒(上海吉凯基因公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清的制备:将 3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为健骨颗粒组、生理盐水组,每组 10 只,分别以健骨颗粒 2 g (kg·d)、生理盐水 2 mL 灌胃 7 d,于最后一次灌胃 1 h 后取腹主动脉血制备成含药血清, -20℃ 保存备用。

1.2.2 细胞的传代培养:用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,将成骨样细胞株 UMR-106 在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。每天换液一次,3 d 传代一次。

1.2.3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲减成骨样细胞 Cyclin D1 基因

1.2.3.1 感染 Cas9 慢病毒,构建稳定细胞株:取状态良好处于对数生长的成骨样细胞 UMR-106,通过胰酶消化法分离收集,根据公式(病毒量=MOI×细胞数量/病毒滴度)得出 Cas9 慢病毒体积,将病毒 LV-LV-Cas9-Puro(7768-1)加入六孔板中进行培养,对细胞进行筛选以得到稳定表达 Cas9 的混合克隆细胞株。

1.2.3.2 感染 sgRNA 慢病毒,敲减 Cyclin D1 基因:通过胰酶消化法分离收集生长状态良好的 Cas9 混合克隆细胞株,配置成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,分为阴性对照组和基因敲减组。根据公式算出 sgRNA 慢病毒和普适型阴性对照 sgRNA-EGFP 慢病毒颗粒体积(sgRNA 基因序列:CTCGCAGCACCCGGTCGTTG)后将病毒加入六孔板孔中。观察细胞并于培养 72 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,在感染 120 h 后收集细胞检测或进行下游实验。

1.2.3.3 Surveyor 法(错配酶法)活性检验:感染慢病毒 5~7 d 后,收集细胞,抽提细胞混合克隆基因组,以 sgRNA 感染的细胞群 DNA 为阴性对照,以感染靶位点 sgRNA 的细胞群为实验组;靶序列 PCR 扩增后经过变性,退火,形成错配,从而被错配酶识别并剪切。产物跑电泳,比较切割条带和未切割条带的比例,反映出 Cas9/sgrNA 的活性。

1.2.3.4 Western-bolt 验证基因敲减细胞:取生长状态良好的成骨样细胞,用生理盐水含药血清分别干预正常成骨样细胞、病毒载体阴性对照组、基因敲除+成骨样细胞 48 h,运用 Western-bolt 验证基因敲减细胞中 Cyclin D1 是否存在。

1.2.3.5 成骨样细胞增殖曲线分析:将生长状态良好的成骨样细胞、基因敲减+成骨样细胞、阴性对照组细胞,接种于 96 孔板中,分别于培养 1、2、3、4、5、6、7、8 d 后每组每次取 8 个孔,加入 CCK8 溶液,37 °C 恒温培养 4 h。用酶标仪检测 OD 值绘制生长曲线。

1.2.4 检测不同浓度健骨颗粒含药血清对成骨样细胞增殖的影响:每组设 6 个血清浓度,用 CCK8 法检测并得出促细胞增殖的最佳含药血清浓度。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 Cyclin D1、Cyclin E、CDK 2、CDK 4、Rb 及 E2F-1 mRNA 的表达:用 Trizol 法提取细胞总 RNA,当 OD 260/OD 280 值在 1.8~2.0 时,说明提取的 RNA 纯度较好。根据反转录试剂盒提供的实验步骤进行反转录,合成 Cyclin D1、Cyclin E、CDK 2、CDK 4、Rb 及 E2F-1 扩增引物,根据两步法标准采用实时荧光定量 SYBR GREEN PCR 法检测扩增程序进行扩增,用参照基因 GAPDH 对所有样品进行校正,通过 7500 型实时定量 PCR 仪软件分析,得到 RT-PCR 扩增曲线和溶解曲线,并比较组间 mRNA 的相对含量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Primer	Sequence(5'-3')
Cyclin D1	Forward	5' AGGCGGATGAGAACAAGCA3'
	Reverse	5' GAGGGTGGGTTGGAATGAA3'
Cyclin E	Forward	5' CCTTACATGCCATCACAACAGAA3'
	Reverse	5' GGAGCAAGCACCATCAGTAACA3'
CDK 4	Forward	5' CAACGCCTGTGGATATGTGGAG3'
	Reverse	5' CTTCTGGAGGCAATCCAATGAG3'
CDK 2	Forward	5' CCTGCACCAGGACCTCAAGAA3'
	Reverse	5' CGGTGAGAATGCCAGAATGCTA3'
Rb	Forward	5' TTCCAACAGAACTGGCAGAAATG3'
	Reverse	5' AGTCAGGTGTCCCGAGGGTCTA3'
E2F-1	Forward	5' AACGGAGGCTGGATCTGGAA3'
	Reverse	5' AGAAGCGTTTGTGTCAGATTAG3'
GAPDH	Forward	5' GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG3'
	Reverse	5' ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA3'

1.3 统计学处理

所有实验数据运用 SPSS 21.0 软件进行处理,参数以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采

用 One-way ANOVA(单因素方差分析法)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 成骨样细胞 Cyclin D1 基因敲减的鉴定

2.1.1 观察细胞感染效率:感染 sgRNA 慢病毒 72 h 后,成骨样细胞 GFP 荧光表达率达 80% 以上(图 1)。

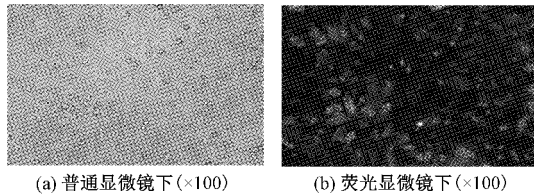


图 1 荧光显微镜同视野下观察 GFP 表达情况 (A、B 均为感染 sgRNA 慢病毒的 Cas9 混合克隆细胞)

Fig.1 Expression of GFP under the observation of fluorescence microscope in the same field ($\times 100$) (A, B are all Cas9 mixed cloned cells infected with sgRNA slow virus)

2.1.2 Surveyor 法(错配酶法)检测 sgRNA 活性:由图 2 可见,与对照组相比,实验组在预期位置出现了切割条带,说明 sgRNA 具有活性,可以进行后续实验。

2.1.3 Western-bolt 验证基因敲减细胞:结果显示,正常细胞和病毒载体阴性对照组 Cyclin D1 表达明显,而基因敲减细胞表达为明显下降(图 3)。

2.2 成骨样细胞增殖曲线分析

通过 CCK8 法检测成骨样细胞增殖曲线。结果显示,正常细胞和病毒载体阴性对照组细胞在 24 h 时增殖较慢,24 h 后开始加速进入指数生长期;分别于第 3 天和第 4 天达到顶峰后开始缓慢生长,随着培养时间的推移,第 7 天、第 8 天开始出现增殖抑

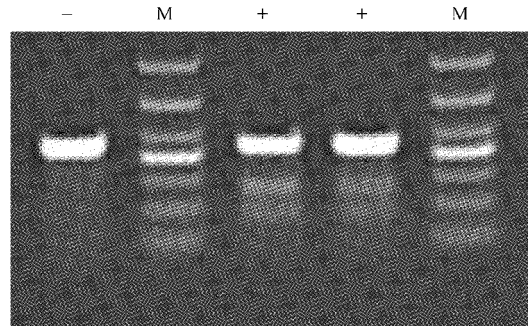


图 2 Surveyor 法(错配酶法)检测 sgRNA 活性 (-:对照 sgRNA 感染的细胞群 DNA;+:感染靶位点 sgRNA 的细胞群 DNA;M:Marker)

Fig.2 Test of sgRNA activity by the Surveyor method (-: control of sgRNA infected cell group DNA; +: cell group DNA infected with Target point sgRNA; M: Marker)

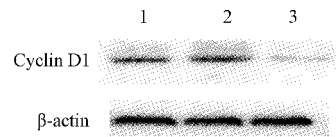


图 3 Western-bolt 验证基因敲减细胞(1:正常细胞组;2:病毒载体阴性对照组;3:基因敲减组)

Fig.3 Western-bolt verifies gene knock-down cells (1: normal cells; 2: virus empty vector cell group; 3: gene knock-down group)

制。而基因敲减细胞组较前两组生长缓慢,无明显增殖高峰,培养 8 d 后出现增殖抑制。见图 4。

2.3 不同浓度健骨颗粒含药血清对成骨样细胞增殖的影响

CCK8 法检测结果显示:含药血清干预 48 h 后,与正常细胞生理盐水组相比,正常细胞健骨颗粒组

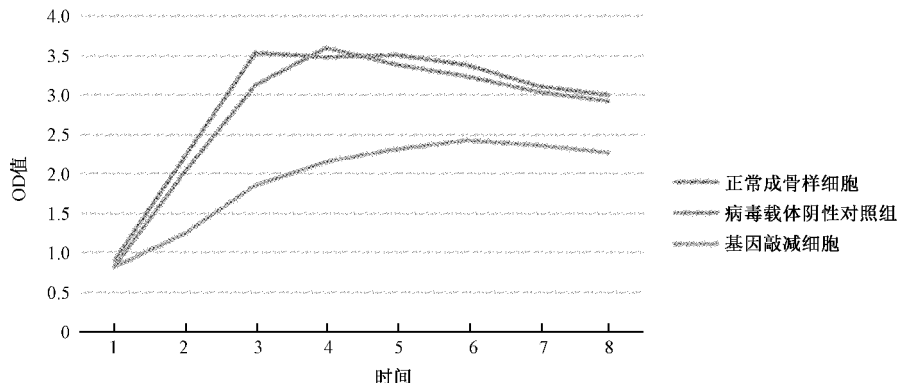


图 4 各组细胞生长曲线

Fig.4 Cell growth curves of each group

增殖速度变快,病毒载体阴性对照组增殖速度无明显差异,基因敲减+生理盐水组和基因敲减+健骨颗粒组增殖速度减慢;与正常细胞健骨颗粒组相比,基因敲减+健骨颗粒组增殖速度减慢;与基因敲减+生

理盐水组相比,基因敲减+健骨颗粒组增殖速度无显著差异。当浓度达到 10% 时,细胞增殖速度明显加快,随着血清浓度继续增高,增殖速度变慢。见图 5。

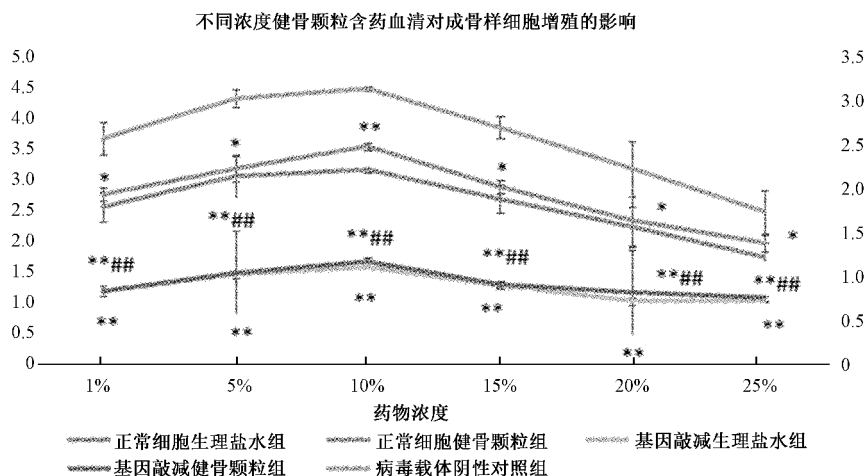


图 5 不同浓度健骨颗粒含药血清对成骨样细胞增殖的影响 (与正常细胞生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常细胞健骨颗粒组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

Fig.5 Effects of serum containing different concentrations of Jiangu granule on osteoblast proliferation (vs normal cells + saline group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs normal cells + Jiangu granule group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

2.4 各组成骨样细胞中 Cyclin D1、Cyclin E、CDK2、CDK4、Rb 及 E2F-1 mRNA 表达水平的荧光定量 RT-PCR 分析结果

荧光定量 RT-PCR 结果显示,含药血清干预 24、48、72 h 的细胞组 Cyclin D1、CDK2、Rb 及 E2F-1 的 mRNA 呈逐渐增高趋势,随时间同步增长,而各细胞组 CDK4、Cyclin E 的 mRNA 表达在 48 h 时为最高,48 h 后开始下降;组间比较显示,各组细胞含药血清干预 24、48、72 h 后,与正常细胞+生理盐水组相比,正常细胞+健骨颗粒组 Cyclin D1、CDK2、CDK4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 mRNA 表达明显增高,病毒载体阴性对照组无统计学意义,基因敲减+生理盐水组和基因敲减+健骨颗粒组 Cyclin D1、CDK2、Rb 及 E2F-1 mRNA 表达明显降低;与正常细胞生理盐水组相比,基因敲减+生理盐水组和基因敲减+健骨颗粒组干预 48 h 的 CDK4 mRNA 表达和干预 24 h 的 Cyclin E mRNA 表达明显降低,其他时间段无统计学意义;与正常细胞健骨颗粒组相比,基因敲减+健骨颗粒组 mRNA 表达显著降低;与基因敲减+生理盐水组相比,基因敲减+健骨颗粒组 mRNA 表达无统计学意义。见图 6。

3 讨论

Cyclin D1 在细胞增殖过程中起着关键作用^[10]。在 G1 期初期,有丝分裂信号刺激 Cyclin D 蛋白合成,转运 CDK4、CDK6 进入细胞核,进而完成下游蛋白的调控,使细胞周期进入 S 期。研究表明^[11-13],在 G1 期和 G1/S 期监测点存在 Cyclin D1、CDK2、CDK4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 等调节蛋白,通过调控这些蛋白,可以调节细胞周期进程,从而影响细胞增殖周期。本研究通过体外培养成骨样细胞 UMR-106,利用 CRISPR/Cas9 技术敲减 Cyclin D1 基因,在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。结果显示,荧光率达到 80% 以上,Surveyor 法(错配酶法)活性检验证明 sgRNA 具有活性,Western Blot 法检测 Cyclin D1 蛋白表达明显下降,因此可确认 Cyclin D1 基因被成功敲减,可进行后续研究。

CCK8 法和 RT-PCR 检测结果显示,成骨样细胞 Cyclin D1 基因敲减后,增值速度明显慢于正常成骨样细胞和病毒载体阴性对照组细胞;而细胞周期调节蛋白 Cyclin D1、CDK 2、CDK 4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 的 mRNA 表达水平明显低于正常成骨样细胞,增殖速度减缓。通过结果可以推断,成骨样细胞 Cyclin D1 基因敲减降低 G1 期调节蛋白 Cyclin D1

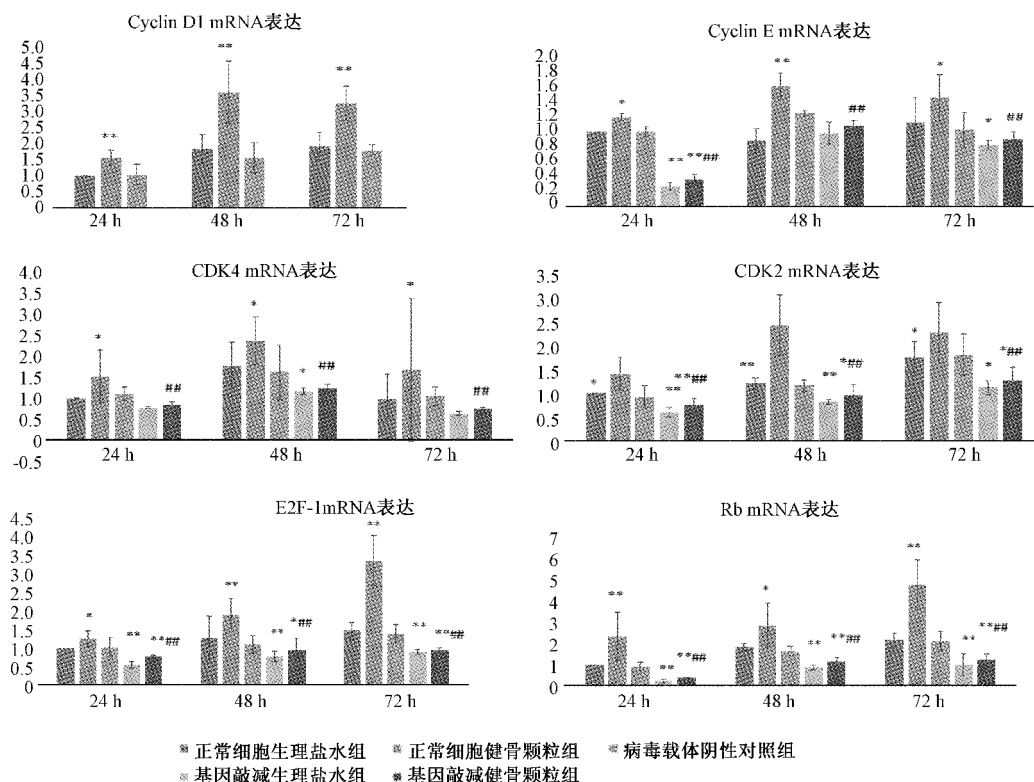


图6 荧光定量 RT-PCR 分析结果(与正常细胞生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常细胞健骨颗粒组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

Fig.6 Fluorescence quantitative RT-PCR analysis results (vs normal cells + saline group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs normal cells + Jiangu granule group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

表达,其下游蛋白 CDK 4、Cyclin E 及 E2F-1 随之下降,从而减缓成骨样细胞增殖周期;证实 Cyclin D1 以及下游信号蛋白的调控是成骨细胞增殖周期的关键环节,Cyclin D1 是成骨样细胞增殖周期的关键点;通过上调 Cyclin D1 以及下游信号蛋白表达,可以加速细胞周期进程,促进成骨细胞增殖。

祖国医学认为肾亏脾虚是绝经后骨质疏松症的发病基础^[14],肾虚为骨质疏松症发生的根本,而脾虚是骨质疏松症产生的重要病机,以补肾健脾、强筋壮骨为治疗之法,可有效防止人体骨量的丢失^[15]。根据骨质疏松症的发病机理,近年来运用补肾方药探讨骨质疏松症分子生物学机制成为基础医学研究的热点^[16-17]。在临床研究和基础实验中发现复方中药能够促进成骨细胞增殖分化、提高骨密度^[18]。林燕萍等^[9]针对绝经后骨质疏松症“肾亏脾虚”的病机特点,以“补先后天”的理论为组方原则,选用煅狗骨、淫羊藿、山茱萸、党参、山药等组成补肾健脾中药健骨颗粒。前期研究结果表明^[19],补肾中药健骨颗粒可以提高骨组织中成骨细胞的数量及功能,加速骨合成代谢,从而使骨形成大于骨吸收。同时

还发现健骨颗粒能上调成骨细胞 Cyclin D1 和 CDK4 的 mRNA 以及蛋白的表达,下调负性因子 p21 表达,促使成骨细胞细胞周期加速由 G1/S 检查点进入 S 期,促进成骨细胞增殖。因此,本课题采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲减成骨样细胞 Cyclin D1 基因,进一步探讨健骨颗粒是否能够通过 Cyclin D1 及其下游蛋白组成的信号通路促进成骨细胞增殖。研究结果显示,正常细胞健骨颗粒组的 Cyclin D1、CDK2、CDK4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 的 mRNA 表达高于正常细胞生理盐水组;而 Cyclin D1 基因敲减后,正常细胞健骨颗粒组 mRNA 的表达水平明显高于基因敲减+生理盐水组和基因敲减+健骨颗粒组的 mRNA 没有明显差异。表明健骨颗粒可以提高体外培养成骨样细胞调节蛋白 Cyclin D1、CDK2、CDK4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 的表达,推进成骨样细胞细胞周期的进程,促进成骨样细胞增殖。且 Cyclin D1 在成骨样细胞增殖过程对下游信号蛋白也有着重要调节作用,Cyclin D1 基因的敲减直接影响着 CDK2、CDK4、Cyclin E、Rb 及 E2F-1 的

(下转第 1077 页)

- 2014,34(23):6671-6672.
- [9] 史翀,王长海.人工股骨头置换术与全髋关节置换术治疗骨质疏松性股骨颈骨折221例临床疗效对比研究[J].陕西医学杂志,2017,46(7):896-899.
- [10] Cauley JA, Cawthon PM, Peters KE, et al. Risk factors for hip fracture in older men: the osteoporotic fractures in men study (Mr OS) [J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(10): 1810-1819.
- [11] 黄际远,宋文忠,郑洪银,等.成都地区健康人群骨密度的变化及不同 T-score 截断值对骨质疏松症患病率的影响[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(11):1425-1429,1434.
- [12] 毕松超,陈涛,杨建东,等.骨质疏松椎体压缩性骨折行椎体成形术后再次骨折的危险因素分析[J].骨科,2017,8(6):423-427.
- [13] 梁世博,彭昊,方洪松,等.全髋关节置换术治疗高龄患者股骨颈骨折疗效的影响因素分析[J].临床外科杂志,2017,25(2):138-140.
- [14] 王健,张于刚.老年患者血清中甲状腺激素和骨型碱性磷酸酶水平与骨质疏松骨折及临床预后的关系[J].中国卫生检验杂志,2018,28(7):833-835.
- [15] Goula T, Kouskousis A, Drosos G, et al. Vitamin D status in patients with knee or hip osteoarthritis in a Mediterranean country [J]. J Orthop Trauma, 2015, 16(1): 35-39.
- [16] 刘刚,袁东堂,于广洋,等.髋关节置换术后中位生存时间及相关预后影响因素分析[J].实用骨科杂志,2016,22(1):28-32.
- [17] 张启峰,张鹏程,杨将,等.老年股骨颈骨折全髋关节置换术时机选择与临床疗效及预后分析[J].重庆医学,2016,45(24):3369-3372.
- [18] 徐立娜,负振楠,徐长妍,等.不同假体类型对人工髋关节置换术治疗老年股骨头缺血性坏死疗效的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(19):4847-4848.
- [19] Uzoigwe CE, Burnand HGF, Cheesman CL, et al. Early and ultra-early surgery in hip fracture patients improves survival [J]. Injury, 2013, 44(6): 726-729.

(收稿日期:2018-09-18;修回日期:2018-10-08)

(上接第1072页)

表达,进而影响成骨样细胞增殖,这也验证了健骨颗粒含药血清可以通过调节 Cyclin D1,进而调节下游相关信号蛋白表达来促进成骨样细胞增殖。

本研究结果表明,健骨颗粒能够通过调节 Cyclin D1 及其下游信号推进细胞周期进程,促进成骨细胞增殖,达到防治骨质疏松症的目的。证明了补肾健脾中药“补先后天”理论的科学性,为健骨颗粒的临床应用提供了实验理论依据。

【参 考 文 献】

- [1] 齐萌,莫伟钊.骨质疏松症的影像学进展[J].医学影像学杂志,2017,27(4):762-764.
- [2] 李冲,吕伟华,王亭亭,等.1088例医务人员骨质疏松的流行病学研究[J].中国骨质疏松杂志,2015(10):1217-1220.
- [3] Lin X, Xiong D, Peng YQ, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives [J]. Clinical Interventions in Aging, 2015, 10: 1017-1033.
- [4] 徐晓娟,沈霖,杨艳萍,等.青娥丸对绝经后骨质疏松症患者骨密度和骨转换标志物的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2013,6:8-10.
- [5] 陈霞.Eph/ephrin 双向信号系统与骨代谢平衡[J].中华生物医学工程杂志,2016,22(6):515-519.
- [6] 杜朝阳.CyclinD1 通过激活 NDR 调控细胞周期的机制研究[D].中国科学技术大学,2013.
- [7] Narushima Y, Kozuka-Hata H, Koyama-Nasu R, et al. Integrative Network Analysis Combined with Quantitative Phosphoproteomics Reveals TGFBR2 as a Novel Regulator of Glioblastoma Stem Cell Properties [J]. Molecular & Cellular Proteomics Mep, 2016, 15(3):1017-1031.
- [8] 贾晓康,黄云梅,李超雄,等.健骨颗粒通过 G1/S 期调控蛋白对成骨细胞增殖的影响[J].中国医药导报,2016,13(9):9-13.
- [9] 林海鸣,林燕萍,吴银生.健骨颗粒含药血清对成骨样细胞 OPG, RANKL mRNA 表达的影响[J].康复学报,2012,22(1):19-21.
- [10] Yu H, Jiang HL, Xu D, et al. Transcription Factor MafB Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation through Up-Regulation of Cyclin D1 [J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2016, 39(2): 700-708.
- [11] 吴银生,林燕萍,卢天祥,等.去卵巢骨质疏松大鼠成骨细胞 G₁ 期调节蛋白的改变[J].中国组织工程研究,2010,14(15):2675-2679.
- [12] 关晓燕,周卫兵,黄隽,等.CDK2-AP1 基因过表达对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及周期的影响[J].中南大学学报(医学版),2012,37(10):990-996.
- [13] 杨金娣,庞战军.F10 基因沉默及过表达对癌细胞系 JAR 细胞周期的影响[J].南方医科大学学报,2016,36(3):351-355.
- [14] 陈旭,陈瀚宇.骨质疏松症从肝脾肾三脏论治探析[J].中国中医基础医学杂志,2017,11:1533-1535.
- [15] 王伟,万雷,柴爽,等.骨质疏松症的中医病因病机和分期治疗[J].中医正骨,2018,2:29-30.
- [16] 谢雁鸣,王和鸣,邓文龙,等.补肾方药治疗原发性骨质疏松症的现代生物学基础及新药研发[J].中国科技成果,2015,21:73-73.
- [17] 贾英民,李瑞玉,武密山,等.补肾方药有效成分不同比例配伍对成骨细胞增殖和分化的影响[J].中国组织工程研究,2015,19(24):3773-3777.
- [18] 颜军礼,李蒙,李瑞玉,等.中药复方对成骨细胞增殖及骨密度的影响[J].中国组织工程研究,2013,17(33):6055-6060.
- [19] 吴银生,林燕萍,卢天祥,等.健骨颗粒含药血清对大鼠成骨细胞 G₁ 期调节蛋白的影响[J].中国中西医结合杂志,2010,30(9):966-969.

(收稿日期:2018-09-12;修回日期:2018-10-19)