

· 论 著 ·

牛膝杯苋甾酮激发大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及 CXCR4 表达的研究

陈鸿泰^{1,2} 罗毅文² 陈东风¹ 徐亮亮^{1,3} 刘亚梅^{1*} 王斌^{2*} 谢平金⁴

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510240

3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

4. 上海中医药大学深圳医院/深圳市罗湖区中医院, 广东 深圳 518000

中图分类号: R965.2; R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 11-1550-06

摘要: 目的 研究牛膝杯苋甾酮激发大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)体外迁移及 CXCR4 蛋白表达的影响。方法 按照牛膝杯苋甾酮 5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度干预 BMSCs, 进行 MTT 法、Transwell 迁移小室及 PCR 测试, 确定杯苋甾酮激发 BMSCs 迁移的最佳浓度; 通过 siRNA 沉默 CXCR4, 进一步验证 SDF-1/CXCR4 信号轴在杯苋甾酮干预 BMSCs 迁移中的作用。结果 MTT 法、Transwell 及 PCR 结果显示, 以 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度杯苋甾酮干预 BMSCs 迁移效果最好, 且 CXCR4 表达量最高 ($P < 0.05$)。用 siRNA 沉默 CXCR4 后, 4 组细胞的迁移能力从低到高的顺序均为 CXCR4 沉默组、空白对照组、杯苋甾酮+CXCR4 沉默组、杯苋甾酮组 ($P < 0.05$), 与 CXCR4 蛋白表达一致。结论 活血药牛膝提取物杯苋甾酮能激发大鼠 BMSCs 体外迁移, 其相关机制可能与上调 CXCR4 蛋白表达有关。

关键词: 杯苋甾酮; 骨髓间充质干细胞; 迁移; 活血法; 骨质疏松

Study on the in vitro migration and CXCR4 expression of rat bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by cyasterone

CHEN Hongtai^{1,2}, LUO Yiwen², CHEN Dongfeng¹, XU Liangliang^{1,3}, LIU Yamei^{1*}, WANG Bin^{2*}, XIE Pingjin⁴

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Department of Trauma and Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China

3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

4. Shenzhen Luohu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China

* Corresponding author: WANG Bin, Email: wangbin1973@163.com; LIU Yamei, Email: gzhlym@gzucm.edu.cn

Abstract: Objective To study the effects of cyasterone on stimulating the in vitro migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and the expression of CXCR4 protein. **Methods** BMSCs were intervened according to the concentration of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ of cyasterone. The MTT assay, Transwell migration chamber and PCR test were performed to determine the optimal concentration of cyasterone to stimulate the migration of BMSCs. The siRNA was used to silence CXCR4 to further verify the role of the SDF-1/CXCR4 signal axis in the migration of BMSCs intervened using cyasterone. **Results** The results of MTT assay, Transwell and PCR showed that the migration of BMSCs with the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ cyasterone was the best, and the expression of CXCR4 was the highest ($P < 0.05$). After silencing CXCR4 with siRNA, the order of migration ability of the four groups of cells from low to high was CXCR4 silencing group, blank control group, cyasterone + CXCR4 silencing group, and cyasterone group ($P < 0.05$). It is consistent with the expression of CXCR4 protein. **Conclusion** Cyasterone, the extractive of radix cyathulae belong to blood-activating medicinal, could stimulate the migration of rat BMSCs in vitro. The related mechanism may be related to the up-

基金项目: 国家自然科学基金(81503593, 81473699); 广东省自然科学基金(2016A030313649, 2017A030313729); 广东省省级科技技术项目(2014A020221055); 广州中医药大学 2017 年“薪火计划”资助项目清单(XH20170104)

* 通信作者: 王斌, Email: wangbin1973@163.com; 刘亚梅, Email: gzhlym@gzucm.edu.cn

regulation of CXCR4 protein expression.

Key words: cyasterone; bone marrow mesenchymal stem cells; migration; activating blood circulation method; osteoporosis

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为一种多能干细胞,在通过一定条件下诱导向成骨、软骨和脂肪等分化来修复受损的组织器官^[1]。已有研究表明,骨折时 BMSCs 被周围组织或循环中诱导并募集至骨折端对骨修复, BMSCs 浓度总量增加可促进骨折愈合^[2-4]。骨折早期,部分 BMSCs 通过血液循环到达骨折部位,并快速地增殖并向骨/软骨细胞分化^[5]。然而,通过循环系统注射的 BMSCs 只有少部分到达受损部位^[6]。高效促进 BMSCs 向骨折部位定向归巢, BMSCs 趋化性研究是日前的热点。本课题组前期研究发现补肾活血法方药可促进 BMSCs 的体外迁移,加快骨折修复过程。其中补肾组乙酸乙酯部位能有效促进 BMSCs 增殖,而促进 BMSCs 迁移的有效部位在活血组^[7]。通过对活血组中药即当归、红花、没药、川牛膝的挥发油和乙醇回流提取物(简称醇提物)进行深入研究,结果表明,红花挥发油、川牛膝醇提物不仅促进 SD 大鼠 BMSCs 增殖、迁移,还可动员干细胞巢内的 BMSCs 进入外周血。RNA 测序结果表明,杯苋甾酮作为川牛膝醇提物的有效成分之一,可以促进 BMSCs 的 C-X-C 型趋化因子受样 4(C-X-C chemokine receptor type4, CXCR4)-表达。本研究拟通过杯苋甾酮对大鼠 BMSCs 体外迁移能力及 CXCR4 表达的影响,揭示中医活血法促进 BMSCs 迁移、加快骨折修复的内在分子机制。

1 材料和方法

1.1 动物 SPF 级

SD 大鼠,雄性,4 周龄,体重 80~90 g,共 2 只[广州中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤):2013-0034]。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司),磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Hyclone 公司),DMEM 低糖培养基(美国 Gibco 公司),0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),CXCR4 抗体(Abcam 公司),山羊抗兔二抗(北京博奥森公司),FITC 荧光试剂盒(北京博奥森公司),吉姆萨染液(广州瑞舒公司),二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司),CXCR4 沉默质粒(吉玛公司),SCW-HS-840 型超净工作台(苏州市长春电子仪器厂),CKX31 型倒置显微镜(日本

Olympus 公司),B16UUCO₂培养箱(德国 Heraeus 公司),25 cm²培养瓶(美国 Corning 公司),Transwell 板(24 孔、6 孔,聚酯透明膜,3.0 μm)(美国 Corning 公司)。

1.3 BMSCs 的分离及培养^[8]

颈椎脱臼处死大鼠,在超净台无菌下分离出股骨与胫骨,剪断干骺端,置于双抗 DMEM 培养基,用无血清 DMEM 培养基对骨髓腔进行冲洗并收集冲洗液,离心 8 min(1 000 r/min)后弃上清液;于 4 mL 完全培养基(含 10%FBS)混匀沉淀,接种于 25 cm²培养瓶中(37℃)、5% CO₂培养箱中培养。24 h 培养后,换液。以后每 2 d 换液一次,至细胞融合度为 80%~90%,消化细胞传代并标记为 P1,传代的细胞每 3~4 d 换液一次,传代至 P3。

1.4 MTT 细胞增殖实验

取 P3 BMSCs 制备单细胞悬液,调整细胞浓度(5×10^4 个/mL),接种于 96 孔板, 5×10^3 /孔,细胞贴壁后,培养基培养 24 h,分别加入牛膝杯苋甾酮按照 5、10、20 μg/mL 浓度梯度培养 48 h,加入 MTT 20 μL(5 mg/mL),继续在 37℃培养箱中培养 4 h,吸取上清液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO),150 μL 振荡 10 min,用酶标仪测吸光度值(OD490 nm)。

1.5 Transwell 小室实验

P3 代细胞接种前无血清培养 12 h 后,消化细胞,用含 FBS 培养基(0.1%)调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,取 200 μL 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室,培养箱培养 2 h 后,下室加入 750 μL 含或不含杯苋甾酮(5、10、20 μg/mL)的 FBS 培养基(20%),每组设 3 个复孔。培养箱中培养 10 h 后,取出小室,弃孔中培养液,PBS 洗 2 遍,4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗 2 遍,吉姆萨染液染色 20 min,PBS 洗 2 遍,在倒置显微镜(×400)下,随机取 5 个视野,观察计数细胞。

1.6 PCR 法检测 CXCR4 表达

采用 Primer5 软件,根据 NCBI 上下载的 CXCR4 基因下载的序列设计引物和探针,核苷酸序列和扩增片段长度,见表 1。荧光定量 PCR 体系及反应条件。P3 代细胞消化后接种于 12 孔板中,分别给予浓度为 5、10、20 μg/mL 及 0 μg/mL(空白对照组)的杯苋甾酮处理。处理后,裂解细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA,PCR 反应采用一步法进行扩增,扩增

体系体积为 50 μL , 包含 1 $\times$ suPerscript buffer, 引物 (各 8 Pmol), 荧光探针 (各 4 Pmol), 5 μL RNA 模板。扩增反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 共 50 个循环。RNA 操作严格按照说明书步骤进行。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

类型	名称	序列 (5'-3')	Tm 值
CXCR4	sense	ATTCCCGACATTCATTTTCC	58.9
	antisense	TGCTGAAACTGGAACACAACC	59.0
	Probe	VIC-CTGTCATCTGCCTCACTGACGTT-BHQ	64.0
GAPDH	sense	ACAGCCTCAAGATCATCAGCA	58.7
	antisense	ATGAGTCTTCCACGATACCA	57.6
	Probe	CY5-GTCTAAGCACTTGCTGCTGACAGGA-BHQ	66.3

1.7 进一步验证 SDF-1/CXCR4 信号轴在杯苋甾酮干预 BMSCs 迁移中的作用

1.7.1 Transwell 小室实验: 运用 siRNA CXCR4 的沉默质粒转染 BMSCs, 干预 24 h (12 h) 后, 消化细胞, 分为空白对照组、CXCR4 沉默组、杯苋甾酮组、杯苋甾酮+CXCR4 沉默组, 进行 Transwell 体外实验 (方法同 1.5), 其中杯苋甾酮组: 含杯苋甾酮 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 20% FBS 培养基; CXCR4 沉默组: 单纯予以 siRNA CXCR4 转染 BMSCs; 杯苋甾酮+CXCR4 沉默组: CXCR4 沉默质粒转染 BMSCs, 同时予以含杯苋甾酮 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 20% FBS 培养基。余实验步骤同上 1.6。CXCR4-Rat-365: sense: 序列 (5'-3') GACUGGUACUUUGGAAAUUTT; antisense: 序列 (5'-3') AUUUCCTAAAGUACCAGUCTT。

1.7.2 免疫蛋白印迹法 (Western blot) 检测 CXCR4 蛋白表达: 运用 siRNA CXCR4 的沉默质粒转染 BMSCs, 干预 24 h 后, 消化细胞并接种于 6 孔板中, 按空白对照组、CXCR4 沉默组、杯苋甾酮组、杯苋甾酮+CXCR4 沉默组分别处理。将各组细胞裂解, 提取总蛋白, 加入 5 $\times$ SDS 溶液煮沸变性。用微量进样器吸取各组 30 μL 样品蛋白加入浓缩胶样品孔中并电泳 20 min (100 V), 分离胶中电泳 40 min (200 V), 转膜 70 min (350 mA)。膜室温封闭 1 h; 将膜取出放入 GAPDH、CXCR4 一抗 (1:1000) 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; PBST 洗膜, 5 min $\times$ 4 次; 将膜转入二抗 (1:30 000) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h; PBST 洗膜, 5 min $\times$ 5 次; 用化学发光法显影。Image J 图像处理软件分析, 结果以 CXCR4/GAPDH 比值表示。

2 结果

2.1 不同浓度杯苋甾酮干预 MTT 细胞增殖实验

结果显示, 杯苋甾酮 10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 BMSCs 均有显著的增殖作用, 与空白对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的效果最佳 ($P<0.05$)。见图 1。

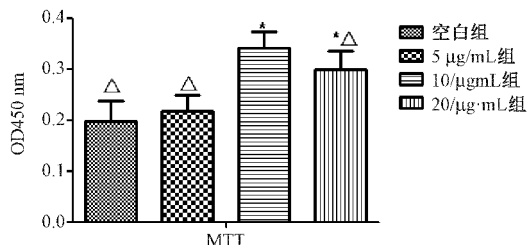


图 1 不同浓度杯苋甾酮干预 MTT 细胞增殖实验结果

Fig.1 Results of MTT cell proliferation experiment with different concentrations of cyasterone

注: 与空白组比较, * $P<0.05$; 与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.2 不同浓度杯苋甾酮促进 BMSCs 体外迁移实验

结果显示, 与空白组对比, 杯苋甾酮 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均促进细胞迁移 ($P<0.05$), 且以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的效果最佳 ($P<0.05$)。见图 2、3。

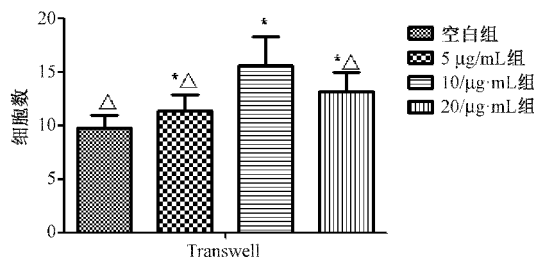


图 2 不同浓度杯苋甾酮促进 BMSCs 体外迁移结果

Fig. 2 Different concentrations of cyasterone to promote the migration of BMSCs in vitro

注: 与空白组比较, * $P<0.05$; 与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

2.3 不同浓度杯苋甾酮干预 CXCR4 表达

PCR 结果显示, 杯苋甾酮 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均促进 CXCR4 表达 ($P<0.05$), 且呈浓度依赖性, 以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的效果最佳 ($P<0.05$), 与 Transwell 结果相对吻合 (见图 4)。

2.4 进一步验证 SDF-1/CXCR4 信号轴在杯苋甾酮干预 BMSCs 迁移中的作用

2.4.1 各组 Transwell 结果: 与空白组对比, CXCR4 沉默组抑制细胞迁移 ($P<0.05$); 相反, 杯苋甾酮组则促进细胞迁移 ($P<0.05$)。另外, CXCR4 沉默+杯

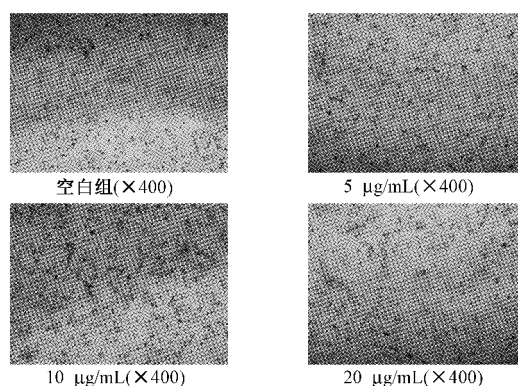


图 3 不同浓度杯菟甾酮干预后各组显微镜下细胞情况 A:空白对照组(×400);B:杯菟甾酮 5 μg/mL 组(×400);C:杯菟甾酮 10 μg/mL 组(×400);D:杯菟甾酮 20 μg/mL 组(×400)。

Fig. 3 Cellular conditions of each group after intervention with different concentrations of cyasterone. A: Blank control group (×400); B: Cyasterone 5 μg/mL group (×400); C: Cyasterone 10 μg/mL group (×400); D: Cyasterone 20 μg/mL group (×400).

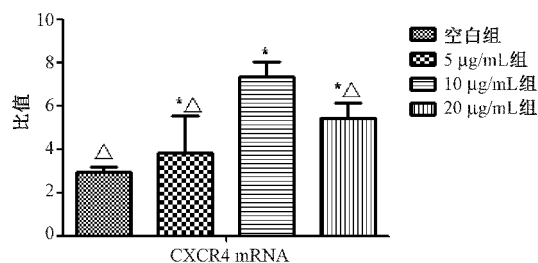


图 4 不同浓度杯菟甾酮干预 CXCR4 表达结果

Fig. 4 CXCR4 expression results under different concentrations of cyasterone intervention

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与 10 μg/mL 组比较, $^{\Delta} P < 0.05$ 。

菟甾酮组则与空白组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5、6。

2.4.2 各组干预后 CXCR4 蛋白表达: Western blot 结果显示,与空白组对比,CXCR4 沉默组均抑制 CXCR4 蛋白表达 ($P < 0.05$);相反,杯菟甾酮组则促进 CXCR4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。另外,CXCR4 沉默+杯菟甾酮组则与空白组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。

3 讨论

中医学认为“血不活则骨不能接”“瘀不去则骨不能接”,治疗骨折“补肾是基础,活血是关键”^[9];

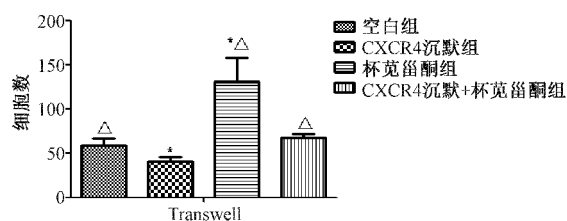


图 5 各组 Transwell 结果

Fig. 5 Transwell results for each group

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与 CXCR4 沉默组比较, $^{\Delta} P < 0.05$ 。

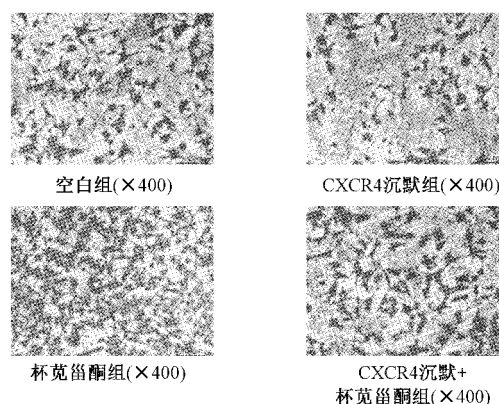


图 6 各组显微镜下细胞情况 A:空白对照组(×400);B: CXCR4 沉默组(×400);C: 杯菟甾酮组(×400);D: CXCR4 沉默组+杯菟甾酮组(×400)。

Fig. 6 Cell conditions of each group under microscope. A: Blank control group (×400); B: CXCR4 silencing group (×400); C: Cyasterone group (×400); D: CXCR4 silencing group + Cyasterone group (×400).

而“损伤一症,专从血论”“活血祛瘀法”当贯穿骨折治疗的始终^[10]。“肝主筋、肾主骨”,中医治疗骨折与大部分药物选用归肝、肾经为主的中药,取其活血化瘀、和血调营、补肾强筋的功效^[11-12]。之前活血化瘀药促进骨折愈合机理主要在局部血液循环、成骨细胞活性和分化等方面研究^[13-14],而促进 BMSCs 迁移归巢的研究较少。近年来发现,具有活血止痛中药的有效成分可促进外源性骨髓 BMSCs 在体内的迁移,不仅可使损伤部位的骨髓 BMSCs 数量增加,且局部的干细胞因子和趋化因子表达水平明显增加^[15]。这提示具有归肝、肾二经的活血化瘀中药具有促进 BMSCs 归巢至骨折端,并促进骨折愈合的作用。笔者的前期研究发现,补肾活血法在促进 BMSCs 迁移中具有重要作用,其相关机制与激活

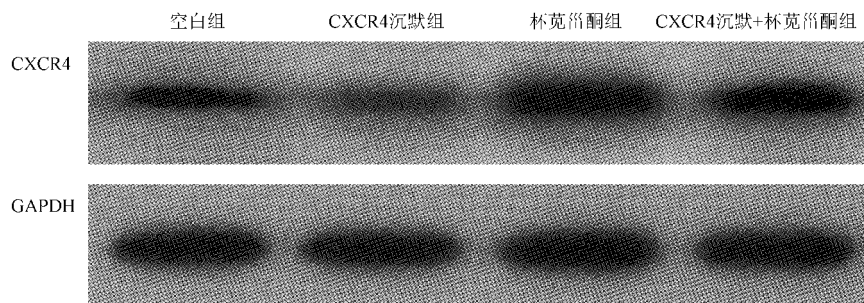


图 7 各组中 CXCR4 表达凝胶电泳图

Fig.7 Electrophoresis of CXCR4 expression in each group

SDF-1/CXCR4 信号轴有关^[16-17]。

在骨折愈合的早期炎症阶段,血管和其它组织破坏导致组织和低氧,这个过程触发炎症级联反应^[18],诱导一些细胞因子(如 IL-6)和趋化因子(如基质细胞衍生因子,stromal cell-derived factor-1, SDF-1,又称 CXCL12)等分泌,促使 BMSCs 从骨髓和骨髓中释放进入血液中,迅速聚集到骨折部位,启动骨再生过程^[19]。SDF-1 与其配体 CXCR4 具有高度亲和力,是诱导干细胞趋化和归巢相关分子中最重要的信号轴之一,在受伤的骨髓中升高,招募 BMSCs 到骨折位置,提高软骨内成骨^[20-21]。Kitaori 等^[22]的研究发现,骨折损伤时 SDF-1 可从骨髓中诱导出、与 CXCR4 结合,从而募集 BMSCs 至损伤部位,促进骨折修复。运用移植的 BMSCs 联合局部注射 SDF-1 能修复骨不连,并呈剂量依赖性^[23]。SDF-1 与受体 CXCR4 的结合在受抑制时骨折后软骨、骨痂及骨矿化的量明显影响较少^[24]。川牛膝具有活血通经、补益肝肾、祛瘀止痛、强筋健骨的功效,在治疗骨折的常用活血化瘀中药中使用频率较高。以往大量的临床和实验表明,杯菟甾酮作为川牛膝的提取、分离的化学成分之一,在治疗骨质疏松症中具有抑制破骨分化和促进成骨分化的双向作用^[25]。但其激发干细胞迁移,进而促进骨折修复尚未见研究报道。

本研究运用 MTT、Transwell 体外迁移实验筛选杯菟甾酮动员 BMSCs 归巢的最佳浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PCR 结果显示,杯菟甾酮 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均促进 CXCR4 表达($P<0.05$),且以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的效果最佳($P<0.05$),与 Transwell 结果相对吻合。为进一步证实杯菟甾酮是否通过上调 CXCR4 蛋白来促进 BMSCs 体外迁移的作用,本实验中运用 CXCR4 沉默质粒干预 BMSCs,结果显示,与空白组对比,CXCR4 沉默组抑制细胞迁移($P<0.05$);相

反,杯菟甾酮组则激发细胞迁移能力($P<0.05$),而 CXCR4 沉默+杯菟甾酮组则与空白组对比差异无统计学意义($P>0.05$)。另外,蛋白印迹结果显示 CXCR4 表达结果与迁移结果一致。说明杯菟甾酮在促进 BMSCs 体外迁移的作用机制主要是通过上调 CXCR4 这一靶点来实现的,这可能与激活 SDF-1/CXCR4 信号轴有关,但其内在机制尚待进一步探究。本研究结果为杯菟甾酮作为加快骨折愈合、缩短骨折愈合时间以及防止骨折延迟愈合及骨不连的辅助治疗提供理论依据,间接阐明中医活血法在骨折愈合中的治疗作用。

【 参 考 文 献 】

- [1] Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells[J]. Injury, 2011, 42(Suppl 1):77-81.
- [2] Watanabe Y, Harada N, Sato K, et al. Stem cell therapy: is there a future for reconstruction of large bone defects[J]. Injury, 2016, 47(Suppl 1):47-51.
- [3] Zhou Q, Yang C, Yang P. The promotional effect of mesenchymal stem cell homing on bone tissue regeneration[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2017, 12(5):365-376.
- [4] Herrmann M, Verrier S, Alini M. Strategies to stimulate mobilization and homing of endogenous stem and progenitor cells for bone tissue repair[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2015, 3:79.
- [5] Kumar S, Ponnazhagan S. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect [J]. Bone, 2012, 50(4):1012-1018.
- [6] Huang S, Xu L, Sun Y, et al. The fate of systemically administrated allogeneic mesenchymal stem cells in mouse femoral fracture healing[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6:206.
- [7] 黄永铨, 罗毅文, 王斌, 等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(1):86-92.
- [8] 王斌, 刘亚梅, 罗毅文, 等. SD 大鼠皮质骨来源间充质干细胞的培养与鉴定[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(3):

- 452-455.
- [9] 王羿, 党兴. 补肾活血法对 SD 大鼠骨折模型愈合影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3150-3151.
- [10] 汪福武, 汪子栋. 骨折中医正骨辨证论治[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(20): 41-43, 50.
- [11] 徐平, 管竞环, 鲁周同, 等. 中医骨伤科用药归经探析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(3): 24-25.
- [12] 李希文, 潘建科, 刘军, 等. 基于关联规则和复杂系统熵聚类的老年性股骨粗隆间骨折用药规律研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(8): 55-58.
- [13] 高峰. 活血化瘀药物在骨折患者早期治疗中的应用[J]. 临床合理用药, 2014, 7(2A): 44-45.
- [14] 杨锋, 李小群, 李彦民, 等. 活血化瘀法对骨折早期基因表达谱的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(6): 1246-1249.
- [15] 侯费祎, 谢兴文, 李慎松, 等. 麝香酮对外源性骨髓间充质干细胞在颅骨缺损大鼠体内迁移的影响[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(8): 2043-2048.
- [16] 罗毅文, 王斌, 吴志方, 等. 补肾活血汤提取物促进大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移及 CXCR4 表达的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 356-361.
- [17] 王斌, 罗毅文, 黄永铨, 等. 补肾活血汤促骨折端间充质干细胞体外迁移及 CCR2 表达的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(8): 1-5.
- [18] Kolar P, Gaber T, Perka C, et al. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia[J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469: 3118-3126.
- [19] Bastian O, Pillay J, Alblas J, et al. Systemic inflammation and fracture healing[J]. J Leukoc Biol, 2011, 89: 669-673.
- [20] Ghadge SK, Muhlstedt S, Ozcelik C, et al. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction[J]. Pharmacol Ther, 2011, 129(1): 97-108.
- [21] Gong J, Meng HB, Hua J, et al. The SDF-1/CXCR4 axis regulates migration of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells towards the pancreas in rats with acute pancreatitis[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(5): 1575-1582.
- [22] Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(3): 813-823.
- [23] Chen GN, Fang TT, Qi Y, et al. Combined use of mesenchymal stromal cell sheet transplantation and local injection of SDF-1 for bone repair in a rat non-union model[J]. Cell Transplant, 2016, 25(10): 1801-1817.
- [24] Wei FY, Leung KS, Li G, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhanced mesenchymal stem cell recruitment through stromal derived factor-1 signaling in fracture healing[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106722.
- [25] 纪亲龙, 孔祥东, 戚珊红, 等. 杯苋甾酮抑制破骨分化和促进成骨分化的双向作用治疗骨质疏松症[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(5): 21-28.

(收稿日期: 2018-08-11; 修回日期: 2018-10-31)

(上接第 1521 页)

- [19] 刘冬梅, 刘建民. 骨钙素对糖代谢的调控作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2015, 8(2): 97-102.
- [20] Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren, et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24: 785-791.
- [21] Zhou M, Ma X, Li H, et al. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals[J]. Eur J Endocrinol, 2009, 161: 723.
- [22] Hu WW, Ke YH, He JW, et al. Serum osteocalcin levels are inversely associated with plasma glucose and body mass index in healthy Chinese women[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2014, 35(2014): 1521-1526.
- [23] 丁焯发, 荣海钦, 季虹, 等. 2 型糖尿病患者血清骨钙素水平的变化及影响因素[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(7): 471-473.
- [24] 赖金玉, 郭翼华. 绝经前后健康妇女骨钙素和骨矿的水平与骨代谢的关系[J]. 中国妇幼保健, 2004, 19(5): 19-20.
- [25] 董建军, 王桂兰, 蒋玲. 绝经后妇女血清骨钙素水平及其它相关因素与骨质疏松关系的研究[J]. 现代妇产科进展, 1994, 3(1): 27-29.
- [26] Luo YQ, Ma XJ, Hao YP, et al. Relationship between serum osteocalcin level and carotid intima-media thickness in a metabolically healthy Chinese population[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 82.
- [27] Jeong TD, Lee WC. Relationship between serum total cholesterol level and serum biochemical bone turnover markers in healthy pre- and postmenopausal women[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 398307.
- [28] 陈国富, 张腊红, 陈兆军. 骨质疏松症患者血清骨钙素与血脂的相关性分析[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(5): 489-490.
- [29] 张天智, 王月, 邓力. 运动负荷对大鼠后肢骨成骨细胞整合素表达和血清骨钙素水平的影响[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(3): 237-240.
- [30] 翁锡全, 徐国琴, 林文毅. 不同运动强度对糖尿病大鼠血清骨代谢生化指标的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(5): 522-525.

(收稿日期: 2018-04-27; 修回日期: 2018-07-25)