

17β-雌二醇联合淫羊藿苷促进SD大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化

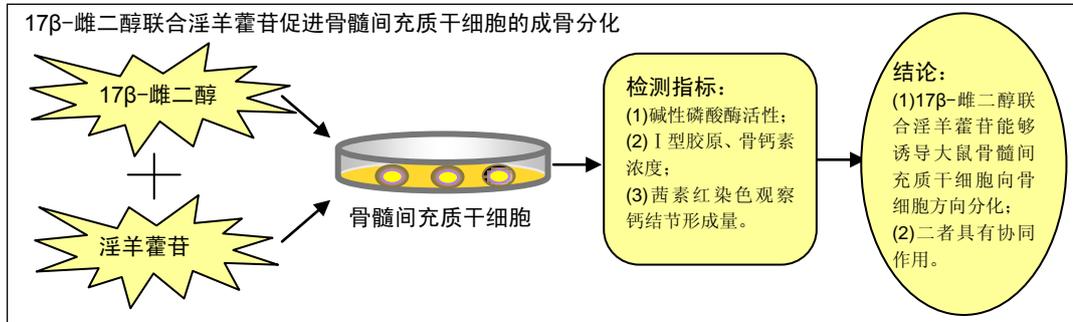
· 研究原著 ·

杨燕兵¹, 靳宪辉², 王海萍¹ (¹河北北方学院, 河北省张家口市 075000; ²衡水市人民医院, 河北省衡水市 053000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0879

ORCID: 0000-0002-7039-3415(杨燕兵)

文章快速阅读:



杨燕兵, 男, 河北省衡水市人, 汉族, 河北北方学院在读研究生。

通讯作者: 王海萍, 博士, 硕士生导师, 河北北方学院, 河北省张家口市 075000

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2018-05-05



文题释义:

成骨分化观察指标的选择: 骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程可分为细胞增殖、骨基质成熟、骨基质矿化 3 个阶段。每个阶段的特征和生物标志物有所不同。碱性磷酸酶是早期骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的生物标志物之一。在体外大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导第 3 天碱性磷酸酶就开始表达, 并在 7-9 d 其表达量会逐渐减少。骨钙素是成熟成骨细胞合成的一种非胶原蛋白, 具有高度特异性, 只在基质矿化期开始以后其基因才开始表达, 是成骨分化成熟的标志, 可作为成骨细胞分化的中期指标。I 型胶原是矿化骨组织中惟一的胶原类型成骨细胞标志物, 矿化结节能直接反映成骨细胞体外矿化的能力。

淫羊藿苷: 是从中国传统中药淫羊藿中提取出来的黄酮类化合物, 是淫羊藿的主要有效成分。大量研究证明, 淫羊藿苷具有促进骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化, 抑制破骨细胞分化成熟和抑制骨质疏松等作用。由于来源广泛, 价格低廉以及毒副作用小等特点, 淫羊藿苷在骨组织工程研究中的应用越来越广泛。

摘要

背景: 以往研究表明, 17β-雌二醇、淫羊藿苷均能够促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化, 二者联合应用的报道较少。

目的: 观察 17β-雌二醇联合淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞向骨细胞分化的影响。

方法: 运用全骨髓贴壁分离法分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 流式细胞仪进行骨髓间充质干细胞表面标志物(CD29, CD45, CD90)的鉴定。将培养细胞分为对照组、17β-雌二醇组、淫羊藿苷组、联合诱导组, 进行相应成骨诱导。各组细胞经成骨诱导 7, 14, 21 d 后分别进行碱性磷酸酶活性、I 型胶原、骨钙素浓度检测及茜素红染色观察钙结节形成量。

结果与结论: ①17β-雌二醇联合淫羊藿苷作用下细胞成骨能力均增强; ②成骨诱导 7 d 后, 各组碱性磷酸酶活性均表达, 联合诱导组>17β-雌二醇组>淫羊藿苷组>对照组; ③成骨诱导 14 d 后, 各组 I 型胶原活性均表达, 联合诱导组>17β-雌二醇组=淫羊藿苷组>对照组; ④诱导 21 d 后, 各组骨钙素均表达, 联合诱导组>17β-雌二醇组>淫羊藿苷组>对照组; ⑤茜素红染色镜下钙结节数量: 联合诱导组>17β-雌二醇组=淫羊藿苷组>对照组; ⑥结果表明, 17β-雌二醇联合淫羊藿苷能够诱导大鼠骨髓间充质干细胞向骨细胞方向分化, 且具有协同作用。

关键词:

17β-雌二醇; 淫羊藿苷; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 碱性磷酸酶; I 型胶原; 骨钙素; 钙结节; 干细胞

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 淫羊藿属; 雌二醇; 细胞分化; 组织工程

17Beta-estradiol combined with icariin promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats

Yang Yan-bing¹, Jin Xian-hui², Wang Hai-ping¹ (¹Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; ²Hengshui People's Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that 17β-estradiol and icariin can both promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), but their combined use is rarely reported. **OBJECTIVE:** To observe the effects of 17β-estradiol combined with icariin on the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs.

Yang Yan-bing, Master candidate, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Corresponding author: Wang Hai-ping, M.D., Master's supervisor, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

METHODS: BMSCs were isolated and cultured by whole-bone marrow adherence separation. Surface markers (CD29, CD45, CD90) of BMSCs were identified by flow cytometry. Cultured cells were divided into control group, 17 β -estradiol group, icariin group, combined induction group, followed by corresponding treatments. At 7, 14 and 21 days after osteogenic induction, alkaline phosphatase activity, levels of collagen type I and osteocalcin were detected, and alizarin red staining was performed to observe the formation of calcium nodules. **RESULTS AND CONCLUSION:** The osteogenic ability of BMSCs treated with 17 β -estradiol combined with icariin was enhanced. After 7 days of osteogenic induction, the alkaline phosphatase activity was detected in all groups, and ranked as follows: combined induction group > 17 β -estradiol group > icariin group > control group. After 14 days of osteogenic induction, the expression of collagen type I was observed in all groups and ranked as follows: combined induction group > 17 β -estradiol group=icariin group > control group. After 21 days of osteogenic induction, osteocalcin was expressed in all groups and ranked as follows: induction group > 17 β -estradiol group > icariin group > control group. The number of calcium nodules as determined by alizarin red staining was ranked as follows: induction group > 17 β -estradiol group=icariin group > control group. Therefore, 17 β -estradiol and icariin have synergistic effects to induce BMSCs to differentiate into bone cells. **Subject headings:** Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Epimedium; Estradiol; Cell Differentiation; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

绝经后妇女骨质疏松发病率明显升高, 绝经后机体内雌激素水平迅速下降是主要原因^[1], 激素替代疗法是该病最经典的治疗方案^[2], 王洁等^[3]证实了17 β -雌二醇能促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化, 且体外浓度在10⁻⁹ mol/L时作用最为显著。随着祖国医学的不断发展进步, “补肾壮骨”中药在临床治疗骨质疏松、骨不连等有明显的疗效。翟远坤等^[4]证实了淫羊藿苷可提高碱性磷酸酶活性, 增加钙化结节和碱性磷酸酶阳性克隆数量, 促进bFGF, IGF-1, OSX, Runx-2 mRNA的表达; 宋鹏等^[5]证实淫羊藿苷可双向调节骨髓间充质干细胞的分化, 既促进骨髓间充质干细胞成骨分化的同时又抑制了骨髓间充质干细胞成脂分化。由于长期应用雌激素的不良反应较为显著以及淫羊藿等中药的作用相对迟缓, 因此实验探讨17 β -雌二醇联合中药淫羊藿提取物淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞体外成骨诱导分化的作用是否有协同作用, 在降低药量的同时提高骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化效率, 为临床用药提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 材料

1.2.1 实验动物 清洁级健康雄性SD大鼠, 3周龄, 体重40 g左右, 由河北医科大学动物实验中心提供。实验过程中对动物的处置均符合伦理学准则^[6]。

1.2.2 实验试剂 IMDM培养基(美国GIBCO公司); 胎牛血清(澳大利亚GIBCO公司); 大鼠骨钙素酶联免疫试剂盒(CUSABIO公司); 大鼠I型胶原蛋白酶联免疫试剂盒(CUSABIO公司); 碱性磷酸酶测试盒(南京建成公司); CD29-PE/CD45-FITC/CD90-PE-CyTM7(美国BD公司); 淫羊藿苷(Cayman公司); 雌激素(北京百灵威公司); 地塞米松(上海TCI公司); β -甘油磷酸钠(Cayman公司); L-抗坏血酸(上海TCI公司); 茜素红染料(南京建成公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 骨髓间充质干细胞的原代分离、培养及传代 颈椎脱臼法处死大鼠, 置于体积分数为75%乙醇中浸泡5 min后, 无菌条件下分离出四肢的股骨及肱骨, 并放入缓冲液(含青霉素-链霉素)中浸洗3次, 去除长骨的骨骺端, 用

IMDM完全培养基反复冲洗骨髓腔, 并将含骨髓细胞的培养基加入15 mL离心管中, 室温离心, 弃上清液, 加入完全培养基, 均匀接种于25 mL培养瓶, 置入37 °C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中, 48 h后首次换液, 弃除不贴壁的悬浮细胞, 此后每48 h换液1次。待贴壁细胞长至80%~90%融合时, 胰酶消化, 以1:2的比例传代, 培养至第3代备用^[7]。

1.3.2 倒置显微镜下骨髓间充质干细胞形态学观察 每日于倒置相差显微镜下观察细胞的生长状态和形态变化并拍照记录。

1.3.3 流式细胞仪进行骨髓间充质干细胞的鉴定 取第4代骨髓间充质干细胞, 先用PBS浸洗2遍然后用胰酶消化, 镜下见细胞回缩后用IMDM完全培养基终止消化并吹打混匀, 移至15 mL无菌离心管中, 室温1 000 r/min离心7 min, 弃上清后PBS浸洗1次, 再次离心, 细胞重悬并计数, 使细胞浓度调整为1 \times 10¹⁰ L⁻¹分装至5支5 mL离心管中, 每管200 μ L, 依次加入CD29-PE抗体25 μ L, CD45-FITC抗体10 μ L, CD90-PE-CyTM7抗体25 μ L, CD29-PE抗体25 μ L+CD45-FITC抗体10 μ L+CD90-PE-CyTM7抗体25 μ L, 阴性对照加入适量PBS, 4 °C避光孵育30 min后再次离心, 弃上清液, PBS浸洗1次, 各组等量加入500 μ L PBS后使细胞悬浮。运用流式细胞仪技术鉴定骨髓间充质干细胞表面特定抗原的表达。

1.3.4 骨髓间充质干细胞体外诱导分化 取第4代骨髓间充质干细胞, 消化后调整细胞浓度至1 \times 10⁷ L⁻¹, 接种于25 mL培养瓶中, 将培养细胞分为对照组、17 β -雌二醇组、淫羊藿苷组、联合诱导组。培养24 h后进行定向诱导, 对照组加入基础成骨诱导剂(地塞米松1 \times 10⁻⁸ mol/L、 β -甘油磷酸钠1 \times 10⁻² mol/L、抗坏血酸5 \times 10⁻² g/L), 17 β -雌二醇组加入基础成骨诱导剂和17 β -雌二醇1 \times 10⁻⁹ mol/L, 淫羊藿苷组加入基础成骨诱导剂及淫羊藿苷1 \times 10⁻⁴ mol/L, 联合诱导组加入基础成骨诱导剂、17 β -雌二醇1 \times 10⁻⁹ mol/L及淫羊藿苷1 \times 10⁻⁴ mol/L。持续诱导21 d, 隔天半量换液, 7 d传代1次。

1.3.5 碱性磷酸酶活性测定 将骨髓间充质干细胞以1 \times 10⁷ L⁻¹细胞浓度接种到培养瓶中, 按上述实验分组进行成骨诱导, 各组细胞于成骨诱导第7天进行碱性磷酸酶活性测定。吸取各组培养液上清, 离心, 取上清标本, 按照碱

性磷酸酶试剂盒说明书操作, 酶标仪在520 nm波长处测定各组样本的吸光度值。根据公式: 碱性磷酸酶活性(金氏单位/100 mL)=(测定吸光度值-空白吸光度值)/(标准吸光度值-空白吸光度值)×酚标准品浓度×100 mL, 计算出各组碱性磷酸酶相对活性。

1.3.6 大鼠 I 型胶原蛋白浓度测定 将骨髓间充质干细胞以 1×10^7 L⁻¹细胞浓度接种到培养瓶中, 按上述实验分组进行成骨诱导, 各组细胞于成骨诱导第14天进行 I 型胶原蛋白浓度测定。吸取各组培养液上清, 离心, 取上清标本, 按照大鼠 I 型胶原蛋白酶联免疫试剂盒说明, 对样品进行稀释, 等比调节各组样品质量浓度为7.8–500 ng/L, 之后按照说明书操作, 并用酶标仪在450 nm波长处测定各组样本的吸光度值。利用Curve Expert 1.3软件, 以标准品浓度为纵坐标, 吸光度值为横坐标, 制作标准曲线。根据样本吸光度值及标准曲线计算出各样本相应的浓度。

1.3.7 大鼠骨钙素浓度测定 将骨髓间充质干细胞以 1×10^7 L⁻¹细胞浓度接种到培养瓶中, 按上述实验分组进行成骨诱导, 各组细胞于成骨诱导第21天进行骨钙素浓度测定。吸取各组培养液上清, 离心, 取上清标本, 按照大鼠骨钙素酶联免疫试剂盒说明, 对样品进行稀释, 等比调节各组样品质量浓度为0.312–20 ng/L, 之后按照说明书操作, 并用酶标仪在450 nm波长处测定各组样本的吸光度值。利用Curve Expert 1.3软件, 以标准品浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 制作标准曲线。根据样本吸光度值及标准曲线计算出各样本相应的浓度。

1.3.8 茜素红钙结节染色 将骨髓间充质干细胞以 1×10^7 L⁻¹细胞浓度接种到培养瓶中, 按上述实验分组进行成骨诱导, 各组细胞分别于成骨诱导第21天进行茜素红钙结节染色。PBS漂洗3遍后, 体积分数为95%乙醇固定15 min, 0.1%茜素红染色10 min, 蒸馏水冲洗, 干燥, 封固, 光学显微镜观察拍照。

1.4 统计学分析 运用SPSS 19.0统计软件进行处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞形态 镜下可见初分离的大鼠骨髓悬液细胞密集, 12 h后细胞开始贴壁, 部分细胞形态伸展、体积增大, 贴附于瓶壁(图1A), 72 h可见部分细胞伸出突起, 突起圆钝而光滑, 细胞呈梭形、菱形或多边形, 核大而饱满, 外观似成纤维细胞样(图1B)。培养14 d后, 细胞融合成片, 分界变得较为模糊, 胞体增大, 形态则变为短梭形和不规则形, 部分细胞聚集成灶(图1C), 培养21 d, 诱导细胞部分出现散在的矿化结节, 中心透光度较差(图1D)。

2.2 大鼠骨髓间充质干细胞鉴定结果 细胞表面抗原CD45阳性表达率为0.5%, 细胞表面抗原CD29阳性表达率99.6%, 细胞表面抗原CD90阳性表达率99.7%, 其结果符

合大鼠骨髓间充质干细胞特征(图2)。

2.3 碱性磷酸酶活性 诱导第7天细胞培养上清中碱性磷酸酶活性由高到低排序为: 联合诱导组、17β-雌二醇组、淫羊藿苷组、对照组, 见表1。

表1 各组细胞碱性磷酸酶活性、I型胶原蛋白浓度、骨钙素浓度和钙结节数量 (X±s)
Table 1 Alkaline phosphatase activity, levels of collagen type I and osteocalcin and number of calcium nodules in cells

组别	碱性磷酸酶相对活性	I型胶原蛋白浓度	骨钙素浓度	钙结节数量
对照组	0.25±0.01	16.95±0.14	38.27±0.13	1.00±0.63
17β-雌二醇组	0.31±0.01 ^a	19.10±0.12 ^a	42.21±0.39 ^a	2.50±0.55 ^a
淫羊藿苷组	0.29±0.01 ^{ab}	19.15±0.34 ^a	41.22±0.12 ^{ab}	2.17±0.75 ^a
联合诱导组	0.35±0.01 ^{abc}	21.40±0.37 ^{abc}	46.00±0.07 ^{abc}	3.83±0.98 ^{abc}
F值	122.451	273.812	1294.154	14.602
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与17β-雌二醇组比较, ^b $P < 0.05$; 与联合诱导组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.4 I型胶原蛋白相对浓度 诱导第14天, 各组细胞培养上清 I 型胶原蛋白相对浓度差异有显著性意义($P < 0.05$), 且浓度由高到低顺序为: 联合诱导组、17β-雌二醇组及淫羊藿苷组(差别无显著性意义)、对照组, 见表1。

2.5 骨钙素相对浓度 诱导第21天, 各组细胞培养上清骨钙素浓度由高到低排序为: 联合诱导组、17β-雌二醇组、淫羊藿苷组、对照组, 见表1。

2.6 钙结节数量 诱导第21天, 经茜素红钙结节染色后光镜下观察均为阳性(图3A–D), 且大小不一, 分布不均匀, 4组间钙结节数量差异有显著性意义。17β-雌二醇组和淫羊藿苷组差异无显著性意义, 17β-雌二醇组和淫羊藿苷组的钙结节数量多于对照组, 联合诱导组的钙结节数量多于17β-雌二醇组、淫羊藿苷组($P < 0.05$), 见表1。

3 讨论 Discussion

因创伤、肿瘤、骨质疏松等造成的骨不连、骨缺损等一直是骨科医师需要解决的难题, 骨组织工程学的长足发展有望在未来攻克这一问题。任何组织工程骨构建均由种子细胞、培养环境与支架材料组成。骨髓间充质干细胞是来源于中胚层的一类干细胞, 其在体外具有多方向分化潜能, 存在于骨髓内并具有明显贴壁能力, 可分化为成骨细胞、心肌细胞、脂肪细胞等多种细胞, 其在骨代谢调节中起着较为关键的作用^[8]。机体增加骨量和维持骨量的细胞来源主要为骨髓间充质干细胞分化成的成骨细胞, 是人体骨骼维持健康的重要因素^[9–17]。骨髓间充质干细胞比较容易获得, 体外扩增后仍无免疫原性, 且易转染外源性基因并能长期传代表达^[18–19]。另外, 应用骨髓间充质干细胞进行

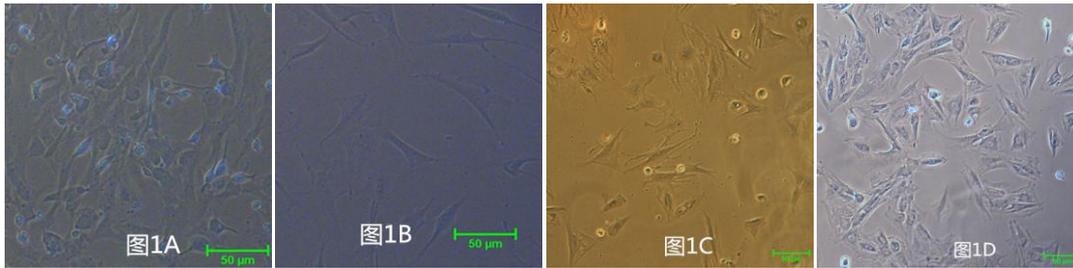


图 1 SD 大鼠骨髓间充质干细胞形态

Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats

图注: 图中 A 为接种 12 h 后细胞开始贴壁, 部分细胞形态伸展、体积增大; B 为接种 72 h 可见部分细胞伸出突起, 细胞呈梭形、菱形或多边形, 核大而饱满, 外观似成纤维细胞样; C 为培养 14 d 后, 细胞融合成片, 分界变得较为模糊, 胞体增大, 形态则变为短梭形和不规则形, 部分细胞聚集成灶; D 为成骨诱导培养 21 d, 细胞部分出现散在的矿化结节, 中心透光度较差。

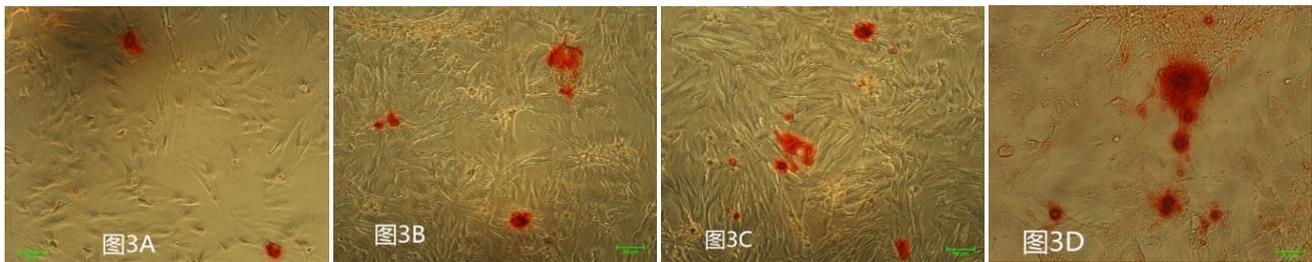


图 3 各组细胞成骨诱导后茜素红染色

Figure 3 Alizarin red staining of bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic induction

图注: 诱导第 21 天, 经茜素红钙结节染色后光镜下观察均为阳性, 且大小不一, 分布不均匀, 17β-雌二醇组(B)和淫羊藿苷组(C)的钙结节数量多于对照组(A), 联合诱导组(D)的钙结节数量多于 17β-雌二醇组、淫羊藿苷组。

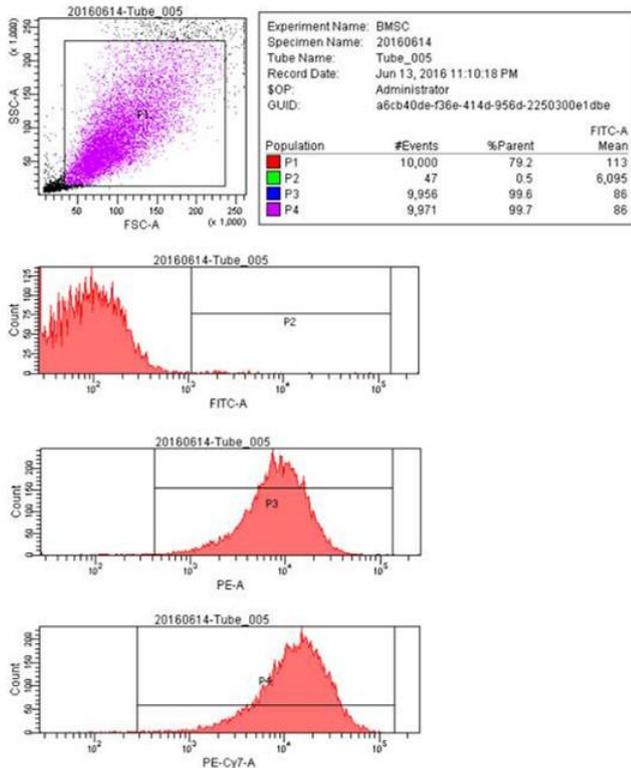


图 2 大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原表达

Figure 2 Surface antigen expression of bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats

图注: 细胞表面抗原 CD45 阳性表达率为 0.5%, 细胞表面抗原 CD29 阳性表达率 99.6%, 细胞表面抗原 CD90 阳性表达率 99.7%。

自体移植实验和治疗时几乎不受伦理学限制。体外骨髓间充质干细胞的增殖分化可以受多因素的准确调控, 因此它一直被作为移植实验和治疗首选的干细胞。

骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的过程可分为细胞增殖、骨基质成熟、骨基质矿化3个阶段^[20]。不同生物标志物可以代表不同的骨分化阶段。碱性磷酸酶是早期骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的生物标志物之一。在体外大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导第3天碱性磷酸酶就开始表达, 并在7-9 d其表达量会逐渐减少。I型胶原是矿化骨组织中惟一的胶原类型成骨细胞标志物, 这为进行成骨细胞的鉴定提供了依据。

第4代骨髓间充质干细胞分为4组, 分别为对照组、17β-雌二醇组、淫羊藿苷组、联合诱导组。对照组加入基础成骨诱导剂(地塞米松 1×10^{-8} mol/L、β-甘油磷酸钠 1×10^{-2} mol/L、抗坏血酸 5×10^{-2} g/L), 17β-雌二醇组加入基础成骨诱导剂和17β-雌二醇 1×10^{-9} mol/L, 淫羊藿苷组加入基础成骨诱导剂及淫羊藿苷 1×10^{-4} mol/L, 联合诱导组加入基础成骨诱导剂、17β-雌二醇 1×10^{-9} mol/L及淫羊藿苷 1×10^{-4} mol/L, 持续诱导21 d。实验结果显示, 17β-雌二醇及淫羊藿苷都可以增强大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力, 且联合用药明显优于单独用药。

由于实验局限于细胞水平研究, 雌激素及淫羊藿苷在体内的作用可能会受到多种因素的影响, 且可能会对机体产生多种不良反应。两种药物联合对大鼠骨髓间充质干细

胞的作用机制有待于从分子水平进一步研究,以便为临床中西药物联合治疗骨质疏松等疾病提供理论依据,从而能够为临床用药提供指导。

作者贡献: 杨燕兵负责实验操作、成文。王海萍负责审核,杨燕兵对文章负责。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Albright F, Reifenshtein EC Jr, Forbes AP. Effect of stilbestrol in post-menopausal osteoporosis. *Trans Conf Metab Asp Conval*. 1946;(14):99-101.
- [2] Rozenberg S, Vandromme J, Antoine C. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(4):216-227.
- [3] 王洁,张鹏,代庆刚,等. 雌激素对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. *上海口腔医学*, 2014,23(6):654-660.
- [4] 翟远坤,葛宝丰,马慧萍,等. 淫羊藿苷促进体外培养大鼠骨髓间充质干细胞的成骨性分化[J]. *中国中药杂志*, 2010,35(23): 3219-3222.
- [5] 宋鹏,王鸣刚,姚娟,等. 淫羊藿苷对rBMSCs成骨和成脂分化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(20):200-204.
- [6] Adolphe M, Parodi AL. Ethical issues in animal experimentation. *Bull Acad Natl Med*. 2009;193(8): 1803-1804.
- [7] 张勇,程敬亮,李华丽,等. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离与原代培养[J]. *中国医学工程*, 2011,19(1): 33-34,36.
- [8] Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012; 41(3):475-486.
- [9] Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, et al. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol*. 2008;251(2):131-136.
- [10] Cai JZ, Tang R, Ye GF, et al. A Halogen-Containing Stilbene Derivative from the Leaves of *Cajanus cajan* that Induces Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Molecules*. 2015;20(6):10839-10847.
- [11] Qi M, Liu W, Ma Y, et al. Spermidine enhances osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from ovariectomized mice. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2015;31(6):787-791.
- [12] Zhou Y, Wu Y, Jiang X, et al. The Effect of Quercetin on the Osteogenesis Differentiation and Angiogenic Factor Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129605.
- [13] Lv H, Sun Y, Zhang Y. MiR-133 is Involved in Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis through Modulating Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Med Sci Monit*. 2015;21:1527-1534.
- [14] Zong S, Zeng G, Fang Y, et al. The effects of α -zearalanol on the proliferation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Metab*. 2016;34(2):151-160.
- [15] Gu Q, Chen C, Zhang Z, et al. Ginkgo biloba extract promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a pathway involving Wnt/ β -catenin signaling. *Pharmacol Res*. 2015;97:70-78.
- [16] Tian F, Ji XL, Xiao WA, et al. CXCL13 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Inhibiting miR-23a Expression. *Stem Cells Int*. 2015;2015:632305.
- [17] Luo Z, Liu M, Sun L, et al. Icarin recovers the osteogenic differentiation and bone formation of bone marrow stromal cells from a rat model of estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):382-388.
- [18] 白海,司志刚,王存邦,等. 人骨髓间充质干细胞对异体外周血T淋巴细胞的抑制作用及机制[J]. *第四军医大学学报*, 2008,29(17): 1573-1575.
- [19] Singaravelu K, Padanilam BJ. In vitro differentiation of MSC into cells with a renal tubular epithelial-like phenotype. *Ren Fail*. 2009;31(6):492-502.
- [20] Lian JB, Stein GS. Transcriptional control of vitamin D-regulated proteins. *J Cell Biochem*. 1992;49(1):37-45.