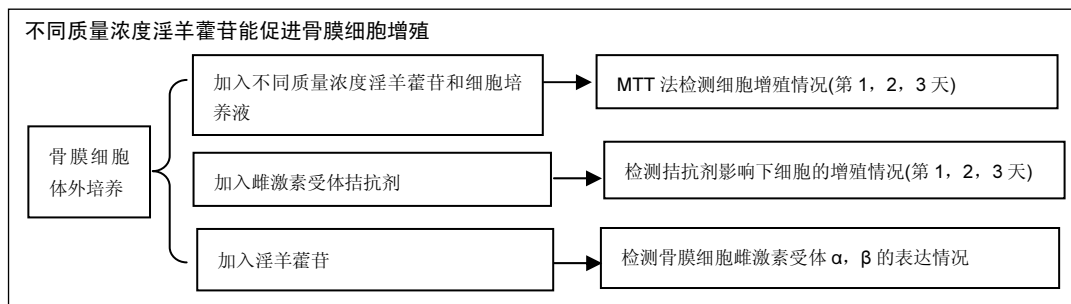


淫羊藿苷促进骨膜细胞增殖及其机制

李红明¹, 高原¹, 胡小雄² (1深圳市龙华区人民医院全科, 广东省深圳市 518000; 2宜春市人民医院感染科, 江西省宜春市 336000)
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0081 ORCID: 0000-0003-3601-0764(李红明)

文章快速阅读:



李红明, 男, 1978 年生, 汉族, 湖南省衡阳市人, 2014 年南华大学毕业。

通讯作者: 高原, 深圳市龙华区人民医院全科, 广东省深圳市 518000

中图分类号: R318
文献标识码: A
稿件接受: 2017-11-08

文题释义:

骨膜: 是骨表面除关节外所被覆的坚固的结缔组织包膜, 在骨端和肌腱附着部位, 非常致密地附着在骨上, 其他部位的骨膜厚, 容易从骨上剥离。

淫羊藿苷的功能: 能增加心脑血管血流量、促进造血功能、免疫功能及骨代谢, 还具有补肾壮阳、抗衰老等功效。

摘要

背景: 骨膜细胞是成骨细胞及软骨细胞的前体细胞, 虽然有研究表明骨形态发生蛋白 7 等可用于诱导骨膜细胞增殖, 但价格较贵, 不易推广。植物雌激素淫羊藿苷诱导骨膜细胞增殖给组织工程提供了新的方向。

目的: 观察淫羊藿苷对人骨膜细胞增殖的影响, 分析其作用机制。

方法: 体外培养人骨膜细胞, 传至第 3 代后, 用 10^3 /孔的浓度种植于 24 孔板。首先进行细胞增殖实验: 实验分为 2 组: 实验组加入不同质量浓度淫羊藿苷(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L)及细胞培养液, 对照组仅加入细胞培养液。随后探讨细胞增殖机制, 实验分为 2 组: 实验组加入雌激素受体拮抗剂 ICI182780 于不同质量浓度淫羊藿苷(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L)的细胞中, 对照组仅加细胞培养液培养。两种实验均采用 MTT 法检测细胞在第 1, 2, 3 天的细胞增殖情况。采用蛋白质印迹法检测不同质量浓度的淫羊藿苷对骨膜细胞雌激素受体 α 和雌激素 β 蛋白的影响。

结果与结论: ①细胞增殖: 体外培养的人骨膜细胞增殖良好, 干预 1, 2, 3 d 后, 质量浓度 10^{-1} , 10^{-2} 及 10^{-3} mg/L 的淫羊藿苷均能促进细胞增殖($P < 0.05$); ②细胞增殖机制分析: 加入雌激素受体拮抗剂 ICI182780 后, 质量浓度 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L 的淫羊藿苷对骨膜细胞均无明显的促进增殖作用($P > 0.05$), 但可上调骨膜细胞雌激素受体 α , β 蛋白的表达; ③结果证实, 质量浓度 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L 淫羊藿苷能促进骨膜细胞增殖, 其机制可能通过上调雌激素受体 α , β 蛋白的表达发挥作用的。

关键词:

淫羊藿苷; 骨膜细胞; 细胞增殖; 诱导剂; 植物雌激素; 雌激素 α 受体; 雌激素 β 受体; 雌激素拮抗剂; 组织构建

主题词:

组织工程; 细胞增殖; 雌激素类

基金资助:

江西省科技计划项目(20071BBG60108)

Icariin promotes the proliferation of human periosteum cells and the underlying mechanism

Li Hong-ming¹, Gao Yuan¹, Hu Xiao-xiong² (1General Department, Longhua District People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; 2Department of Infection, the People's Hospital of Yichun City, Yichun 336000, Jiangxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Periosteal cells are precursors of osteoblasts and chondrocytes. Some studies have reported that bone morphogenetic protein-7 can be used to induce periosteal cell proliferation, but limited by the high cost. Phytoestrogen icariin-induced periosteal cell proliferation has provided a new direction for tissue engineering.

OBJECTIVE: To investigate the effect of icariin on the proliferation of human periosteum cells and to analyze

Li Hong-ming, General Department, Longhua District People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Corresponding author: Gao Yuan, General Department, Longhua District People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China



the underlying mechanism.

METHODS: Human periosteal cells were cultured *in vitro* and seeded to the 24-well plate with the concentration of 10^3 /well after third passage. Cell proliferation test: the cells were cultured in the cell culture medium (control group), or the culture medium containing different concentrations of icariin (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} mg/L). Proliferation mechanism test: the cells were cultured in the cell culture medium (control group), or the culture medium containing different concentrations of icariin (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} mg/L) plus estrogen receptor antagonist ICI182.780. The cell proliferation in each test was detected by MTT assay at 1, 2 and 3 days of culture. The effects of different concentrations of icariin on the levels of estrogen receptor α and β proteins in the periosteal cells were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The proliferation of human periosteum cells *in vitro* was successful, and icariin with the concentrations of 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} mg/L could significantly the cell proliferation ($P < 0.05$). However, this effect was blocked after ICI182780 addition ($P < 0.05$), and the levels of estrogen receptor α and β were upregulated. To conclude, icariin can enhance the proliferation of periosteal cells probably by upregulating the expression of estrogen receptor α and β .

Subject headings: Tissue Engineering; Cell Proliferation; Estrogens

Funding: the Science and Technology Program of Jiangxi Province, No. 20071BBG60108

0 引言 Introduction

骨膜细胞因其有增殖及分化为成骨细胞及软骨细胞的能力, 经常被用在骨组织工程中, 可以说骨膜细胞是骨细胞的基地及土壤^[1]。骨膜在骨损伤后能被激活并参与到骨修复过程中^[2-3], 并通过膜内成骨及膜外成骨在骨损伤修复中发挥重要作用。

骨膜细胞因其潜在的特定分化和增殖能力, 目前倍受关注, 有研究证实低强度脉冲超、低氧和骨形态发生蛋白7均可影响骨膜细胞的增殖和分化^[4-5], 虽然有研究证实淫羊藿苷对成骨细胞及骨髓基质干细胞有定向诱导分化的作用^[6-7], 但其对骨膜细胞及其相关机制目前尚无相关研究。

淫羊藿提取物中的主要有效成分是黄酮类物质, 其中含量最多的是淫羊藿苷, 属于植物类雌激素。实验在体外培养骨膜细胞基础上, 研究淫羊藿苷对骨膜细胞增殖的影响并探讨其机制, 为淫羊藿苷作为诱导剂运用于骨组织工程提供理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2017年1月至5月在广州医科大学学生化实验室完成。

1.3 材料

细胞: 骨膜细胞来源于胫骨骨折患者, 男, 28岁, 同意签署伦理学知情同意后, 于手术中获得骨膜进行原代骨膜细胞培养而成。

1.4 实验方法

1.4.1 人原代骨膜细胞培养及鉴定 术中无菌条件下, 逐层分离患者皮肤及骨上面的软组织, 于骨表面切取约 $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 骨膜, 保存在含青霉素及链霉素的DMEM-F12的培养液中, 0.5 h内送至实验室。Hanks液洗涤后, 将骨膜剪碎为约0.5 mm的小碎块, 加入到培养皿内, 加入DMEM-F12培养液、青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L和胰岛素0.01 U/mL, 置入37 °C恒温细胞培养箱中培养, 每隔2 d换液1次。每天均在显微镜下观察, 当骨膜细胞成片并铺满培养皿, 并细胞形态均一后, 用胰蛋白酶消化后按照1:3传代培养, 取第3代细胞检测鉴定、并冻存用于MTT实验。

骨膜细胞培养第5天开始鉴定, 骨膜细胞鉴定选用碱性磷酸酶染色及钙结节Von Kossa(硝酸银法)染色法。把第3代骨膜细胞用胰蛋白酶消化脱离培养瓶并让其悬浮, 取细胞悬液行碱性磷酸酶染色, 方法如下: ①用PBS冲洗2次, 3 min/次; ②用40 g/L多聚甲醛固定约10 min; ③再次用PBS冲洗; ④清除残液后加碱性磷酸酶底物50 μL 于载玻片上, 静置30 min; ⑤再次PBS冲洗; ⑥用甘油封固玻片; ⑦显微镜拍照并观察碱性磷酸酶颗粒。

Von Kossa 染色法方法如下: ①PBS冲洗2次, 3 min/次; ②用多聚甲醛处理约10 min; ③用蒸馏水浸润冲洗; ④加入体积分数5%硝酸银; ⑤紫外线照射20 min; ⑥再次蒸馏水浸润冲洗; ⑦体积分数2%硫代硫酸钠浸润处理; ⑧显微镜下观察钙结节。

1.4.2 MTT法检测淫羊藿苷对骨膜细胞增殖的影响 将第3代骨膜细胞按照 10^7 L^{-1} 的细胞浓度接种于3块24孔板中, 每块24孔板分4组, 包括 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L 组及对照组, 6孔/组, 分别加入相应质量浓度的淫羊藿苷及细胞培养液入各组孔中, 对照组加入等量的细胞培养液。每组设3个复孔, 分别在第24, 48, 72小时, 取一块板加入MTT继续培养4 h, 弃上清后加入150 μL 的二甲基亚砜, 结晶溶解后, 用酶联免疫检测仪测每孔细胞在490 nm处的吸光度值, 每组测6次, 取均值。

1.4.3 雌激素受体拮抗实验 以 10^7 L^{-1} 的细胞浓度接种第3代骨膜细胞于3块24孔板中, 每块24孔板分4组, 每组6孔, 分别加入 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L 的淫羊藿苷及 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的雌激素受体拮抗剂ICI182780作为实验组, 对照组仅加细胞培养液, 每组在不同的细胞培养板设3个复孔, 分别在第1, 2, 3, 7天, 加入MTT继续培养4 h, 弃上清后加入150 μL 的二甲基亚砜, 结晶溶解后, 用酶联免疫检测仪测每孔细胞在490 nm处的吸光度值, 每组测6次, 取均值。

1.4.4 骨膜细胞雌激素受体 α , β 检测实验 实验分3组: 10^{-1} , 10^{-2} mg/L 组和对照组, 分别加入相应质量浓度淫羊藿苷入细胞培养板中, 对照组仅加同体积的细胞培养液, 每组均设6个复孔, 分别在第15, 30, 60, 120 min用蛋白印迹法(Western-blot法)检测骨膜细胞中雌激素受体 α , β 蛋白表达的情况。每组细胞数量均为 10^6 , 先洗涤, 然后加入细胞裂解液, 并离心, 行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后转

移到硝酸纤维素膜,封闭后,加入内参GAPDH并加入雌激素受体 α , β 一抗,免疫沉淀1 h后,用TBST溶液洗涤,加入HRP标记二抗,2 h后,再进行发光和定影,用Image J软件进行图片条带灰度值分析,每组重复3次。

1.5 主要观察指标 实验组和对照组在第15, 30, 60, 120分钟对应的吸光度值。

1.6 统计学分析 实验计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同组别数据间的比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人骨膜细胞的形态及鉴定结果 骨膜细胞接种入含有DMEM-F12的培养瓶内2 h即贴壁,12 h后基本贴壁,显微镜观察可见大部分为梭形的骨膜细胞,少量不规则形。骨膜细胞在培养第1天后逐步局部聚集成片状。细胞增殖数量增加,培养第3天后,细胞培养瓶下面贴满骨膜细胞,体积比较大,细胞的增殖分泌功能强(图1A)。细胞培养第5天后,经碱性磷酸酶染色可见细胞间有淡蓝色的颗粒(图1B),钙结节经硝酸银Von Kossa染色法可见细胞间散在黑色的颗粒(图1C),说明所培养的是骨膜细胞。

2.2 淫羊藿苷对骨膜细胞增殖的影响 淫羊藿苷作用于骨膜细胞24 h后,与对照组相比, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L的淫羊藿苷均可促进骨膜细胞的增殖($P < 0.05$),干预48, 72 h及第7天后,其促进骨膜细胞增殖的效应仍然存在($P < 0.05$);组间对比,在不同时间段, 10^{-1} mg/L的质量浓度对细胞增殖有最大的促进作用(表1)。

2.3 雌激素受体拮抗剂对骨膜细胞增殖的影响 在 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L的淫羊藿苷加入雌激素受体拮抗剂ICI182.780干预骨膜细胞24 h后,与对照组相比,各组淫羊藿苷均未明显促进骨膜细胞的增殖($P > 0.05$),干预48, 72 h后,仍然无促进骨膜细胞增殖的效应($P > 0.05$; 表2)。

2.4 淫羊藿苷对骨膜细胞雌激素受体 α , β 蛋白表达的影响与对照组相比,质量浓度 10^{-1} , 10^{-2} mg/L的淫羊藿苷在干预15 min后可上调雌激素受体 β ,直到120 min上调作用仍然存在,但在1 h后才有明显对雌激素受体 α 蛋白的上调作用,可持续到120 min(图2)。

3 讨论 Discussion

淫羊藿苷属黄酮类物质,一般由淫羊藿中提取,具有增强免疫、抗癌、调节激素分泌及改善心血管功能等功效^[8-10]。有研究通过建立动物模型,发现淫羊藿苷可通过阻滞钙通道、扩张血管、降低血管阻力而发挥增加脑血流量的作用^[11-12]。有学者通过体外培养乳兔成熟破骨细胞及骨片,进一步证实淫羊藿苷可使破骨细胞吸收陷窝数减少,可抑制破骨细胞吸收和分化^[13]。有研究认为淫羊藿苷可抑制破骨细胞活性,从而起到抑制微小颗粒引起的炎症及骨溶解作用^[14],有学者进一步证实淫羊藿苷是通过MAPK通

路抑制破骨细胞增殖分化及骨吸收的^[15]。有研究认为淫羊藿苷可用以治疗动物模型绝经后的骨质疏松^[16]。淫羊藿苷对骨髓基质干细胞也有重要作用,实验证实淫羊藿苷可调节骨髓基质干细胞的分化^[17]。陈克明等^[18]体外培养大鼠骨髓基质干细胞,用MTT法等实验证实淫羊藿苷有促进骨髓基质干细胞成骨分化的作用。有学者用全骨髓贴壁法分离等证实,淫羊藿苷还可促进间充质干细胞成骨分化,同时可上调骨形态发生蛋白2及转化生长因子 $\beta 1$ 的表达量^[19]。有研究同样证实淫羊藿苷能上调骨形态发生蛋白2的mRNA表达水平,促进碱性磷酸酶分泌,进而引起成骨细胞分化^[9]。

目前尚无关于淫羊藿苷对骨膜细胞相关研究的报道,实验通过MTT法证实淫羊藿苷有促进骨膜细胞增殖和分化的作用,实验证实 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} mg/L的淫羊藿苷均有促进骨膜细胞增殖的作用,说明质量浓度为 10^{-3} mg/L以上的淫羊藿苷即可有效促进骨膜细胞增殖,增加淫羊藿苷的质量浓度能有效增强其促细胞增殖的作用,其有效的起始浓度尚需要进一步研究。为论证其机制,实验采用雌激素受体拮抗剂阻滞了骨膜细胞雌激素受体,发现淫羊藿苷对细胞的促增殖作用可被其阻断,进一步说明淫羊藿苷可能是通过其植物雌激素的特性,与靶细胞表面的雌激素受体结合而发挥促细胞增殖和分化作用的,此结论和陈梦等^[20]关于植物雌激素羟基红花黄色素A的研究结论一致,均证实植物雌激素是通过雌激素受体发挥作用的。实验发现,质量浓度 10^{-1} , 10^{-2} mg/L淫羊藿苷均可诱导骨膜细胞上调雌激素受体 α , β 蛋白,但雌激素受体 β 蛋白在15 min就被检测出,而雌激素受体 α 蛋白直到60 min才被检测出,说明淫羊藿苷对雌激素受体 β 亲和力高,对雌激素受体 α 亲和力相对低,可能淫羊藿苷是通过雌激素 α 和 β 两个受体介导发挥作用的。起效时间短,15 min即发挥作用,说明植物雌激素淫羊藿苷和膜受体结合后起效时间短,这和雌激素非经典途径的快速起效特性一致,可能淫羊藿苷是通过雌激素非经典途径发挥促骨膜细胞增殖的作用。

淫羊藿苷属于植物类雌激素,与细胞增殖有关^[21],存在于多种中草药当中。植物雌激素有微弱的哺乳动物雌激素的作用,可以和细胞膜雌激素受体结合,进一步激活MAPK通路,从而引起细胞增殖和分化^[22-23]。不同类的植物雌激素对细胞的亲和力各不一样^[24],拟雌内酯、染料木黄酮、黄豆苷原和雌马醇等均与细胞雌激素受体亲和力比较好。植物类雌激素有广泛的作用,对MCF-7乳腺癌细胞、心血管病、骨质疏松、骨髓间充质干细胞、等均有明显作用^[8, 13, 18, 20, 25-29],因植物雌激素因广泛存在于各类植物之中,提取相对便捷,淫羊藿苷对骨膜细胞促增殖的特性可运用于骨组织工程,为骨组织工程诱导剂提供了新的选择。

骨组织工程基本的要素是诱导剂、种子细胞和细胞支架。骨组织工程常用的诱导因子是骨形态发生蛋白等,目前较少关于中草药提取物用于骨组织工程的相关研究,实

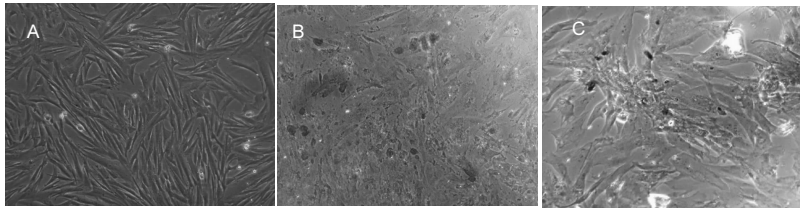


图 1 人骨膜细胞的形态及鉴定结果($\times 100$)
Figure 1 Morphology and identification of the human periosteum cells ($\times 100$)
图注: 图 A 为细胞贴壁, 细胞形态为梭形(培养 3 d); B 为细胞间检测出碱性磷酸酶结节(培养 5 d); C 为细胞间检测出钙结节(培养 5 d)。

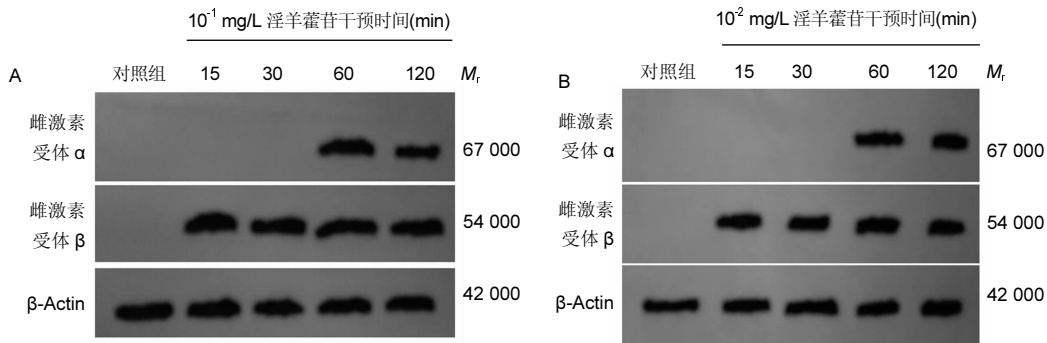


图 2 淫羊藿苷 10^{-1} , 10^{-2} mg/L 对骨膜细胞雌激素受体 α , β 蛋白表达的影响
Figure 2 Effects of 10^{-1} and 10^{-2} mg/L icariin on the expression levels of estrogen receptor α and β

表 1 淫羊藿苷对骨膜细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Effect of icariin on the proliferation of human periosteum cells

干预时间	淫羊藿苷 10^{-1} mg/L 组	淫羊藿苷 10^{-2} mg/L 组	淫羊藿苷 10^{-3} mg/L 组	对照组
24 h	0.34 \pm 0.028 ^{abc}	0.23 \pm 0.016 ^{bc}	0.11 \pm 0.026 ^c	0.09 \pm 0.017
48 h	0.46 \pm 0.017 ^{abc}	0.35 \pm 0.024 ^{bc}	0.22 \pm 0.018 ^c	0.16 \pm 0.027
72 h	0.75 \pm 0.015 ^{abc}	0.54 \pm 0.014 ^{bc}	0.29 \pm 0.039 ^c	0.20 \pm 0.029
第 7 天	0.89 \pm 0.018 ^{abc}	0.65 \pm 0.025 ^{bc}	0.33 \pm 0.046 ^c	0.31 \pm 0.015

表注: 与淫羊藿苷 10^{-2} mg/L 组相比, ^a $P < 0.05$; 与淫羊藿苷 10^{-3} mg/L 组相比, ^b $P < 0.05$; 与对照组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表 2 ICI182.780 加入淫羊藿苷后骨膜细胞增殖情况 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Effect of icariin on the proliferation of human periosteum cells after ICI182.780 addition

干预时间	淫羊藿苷 10^{-1} mg/L 组	淫羊藿苷 10^{-2} mg/L 组	淫羊藿苷 10^{-3} mg/L 组	对照组
24 h	0.08 \pm 0.027	0.09 \pm 0.015	0.10 \pm 0.025	0.09 \pm 0.018
48 h	0.17 \pm 0.018	0.18 \pm 0.022	0.17 \pm 0.019	0.16 \pm 0.025
72 h	0.19 \pm 0.014	0.20 \pm 0.013	0.21 \pm 0.038	0.20 \pm 0.027

表注: 淫羊藿苷 10^{-1} , 10^{-2} 及 10^{-3} mg/L 组与对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

选用的骨组织工程的细胞是骨膜细胞, 骨组织工程细胞来源一般是骨细胞和骨髓细胞, 骨膜细胞因其有分化好、容易取材和体外培养, 可作为优良种子细胞^[30-32]。实验培养的骨膜细胞经过碱性磷酸酶和钙结节染色鉴定, 证实其为骨系细胞, 结合取材部位, 可认为实验所用的细胞是骨膜细胞。实验用淫羊藿苷刺激骨膜细胞增殖, 并通过受体阻滞实验, 证实其通过雌激素受体发挥作用, 为骨组织工程研究体外扩增种子细胞开辟了新的途径。植物类雌激素引起细胞的生物学效应和MAPK通路密切相关^[24, 33-34], 但淫羊藿苷通过激活何种相关通路而引起细胞增殖尚需要进一步研究。

总之, 实验通过淫羊藿苷诱导骨膜细胞增殖, 并检测细胞增殖不同时间梯度的吸光度值, 证实了其有促进骨膜细胞增殖的作用, 为进一步探讨淫羊藿苷对细胞增殖的机制, 作者选择了雌激素受体拮抗剂ICI182.780, 通过雌激素受体拮抗剂阻断骨膜细胞表面雌激素受体, 发现淫羊藿苷对细胞的增殖作用完全被阻断, 说明淫羊藿苷是通过雌激素受体发挥促细胞增殖的作用的。细胞雌激素受体分为 α 和 β 受体, 为进一步论证淫羊藿苷对不

同受体的诱导作用, 实验通过蛋白质印迹法论证了骨膜细胞 α 和 β 受体不同时间点的表达, 发现淫羊藿苷早期能上调 β 受体, 后期可同时上调两种受体, 说明淫羊藿苷对雌激素 β 受体亲和力更高, 它是通过雌激素 α 和 β 两种受体介导而发挥作用的。

作者贡献: 本课题资料收集、实验设计、实验评估和实验实施均为全部作者共同完成。

经费支持: 该文章接受了“江西省科技计划项目(20071BBG60108)”的基金资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了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。

作者声明: 李红明作者对研究和文章出现的不端行为承担责任。

文章中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

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] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-319.
- [2] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. BMP7L is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-323.
- [3] Kessler S, Koepp HE, Mayr-Wohlfart U, et al. Bone morphogenetic protein2 accelerates osteointegration and remodelling of solvent-dehydrated bone substitutes. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2004;124(6):410-414.
- [4] 张超,梁国穗,张颖恺,等.低强度脉冲超声波刺激对人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2006,10(5):78-80.
- [5] 张峻玮,陆海涛,杨宇明,等.低氧培养对骨膜细胞成软骨分化的影响[J].中华实验外科杂志,2016,33(5):1281-1283.
- [6] 吴涛,徐俊昌,南开辉,等.淫羊藿苷促进羊骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(19):3725-3729.
- [7] Zhao J, Ohba S, Shinkai M, et al. Icariin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369:444-448.
- [8] 叶丽卡,陈济民.淫羊藿的药理研究进展[J].中国中药杂志,2001,26(5):293-295.
- [9] 贾亮亮,袁丁,王洪武,等.淫羊藿苷药理作用的研究进展[J].现代生物医学进展,2010,10(20):3976-3979.
- [10] 李婵,王学美.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(28):2727-2732.
- [11] 关利新,衣欣,杨履艳,等.淫羊藿甙扩血管作用机制的研究[J].中国药理学通报,1996,12(4):320-322.
- [12] 汪晶晶,唐其柱,王腾,等.淫羊藿苷对兔心室肌细胞L-型钙电流的影响[J].武汉大学学报(医学版),2007,28(3):282-286.
- [13] 张大威,程岩,张金超,等.淫羊藿苷对破骨细胞的分化及骨吸收功能的影响[J].中国药理学通报,2007,23(4):463-467.
- [14] Cui J, Zhu M, Zhu S, et al. Inhibitory effect of icariin on Ti-induced inflammatory osteoclastogenesis. *J Surg Res*. 2014;192:447-453.
- [15] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF-kappaB regulated HIF-1alpha and PGE(2) synthesis. *Phytomedicine*. 2011;18:176-185.
- [16] Tang D, Ju C, Liu Y, et al. Therapeutic effect of icariin combined with stem cells on postmenopausal osteoporosis in rats. *J Bone Miner Metab*. 2017.
- [17] Wei Q, He M, Chen M, et al. Icariin stimulates osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells by increasing TAZ expression. *Biomed Pharmacother*. 2017;91:581-589.
- [18] 陈克明,葛宝丰,马慧萍,等.淫羊藿苷对体外培养骨髓基质干细胞成骨性分化的影响[J].中国骨质疏松杂志,2008,14(9):645-632.
- [19] 杨丽,张荣华,朱晓峰,等.淫羊藿苷对大鼠间充质干细胞骨向分化过程中转化生长因子 β 1、骨形态发生蛋白2表达的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(19):3518-3522.
- [20] 陈梦,赵丕文,臧金凤.羟基红花黄色素A的植物雌激素样作用机制[J].湖北中医药大学学报,2014,16(6):44-47.
- [21] Shi WG, Ma XN, Xie YF, et al. Icariin promote maturation of osteoblasts in vitro by an estrogen-independent mechanism. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2014;39:2704-2709.
- [22] 刘国良,于英君,姚远,等.补骨脂二氢黄酮甲醚对A375细胞黑色素合成及ER/MAPK信号通路的影响[J].中国医药导报,2015,12(36):4-8.
- [23] 廖清船,肖洲生,秦艳芳,等.植物雌激素金雀异黄酮通过p38MAPK通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[J].中国药理学通报,2006,22(6):683-687.
- [24] 郑晓珂,吕鹏飞,王玲巧,等.卷柏等5种中药植物雌激素活性筛选的实验研究[J].中国中药杂志,2006,31(15):1254-1257.
- [25] 赵丕文,牛建昭,王继峰,等.红花等10种中药的植物雌激素活性研究[J].中国中药杂志,2007,32(5):436-439.
- [26] 陶仕英,牛建昭,王继峰,等. β -谷甾醇对T47D细胞增殖和细胞周期的影响及作用机制探讨[J].世界科学技术-中国药现代化,2015,17(2):362-366.
- [27] 葛雅南,顾婷,刘俊岑,等.逍遥散中三种植物雌激素对MCF-7细胞增殖的影响[J].黑龙江科技信息,2016,(5):141-142.
- [28] 赵丕文,牛建昭,王继峰,等.补骨脂素的植物雌激素作用及其机制的探讨[J].中国中药杂志,2008,33(1):59-63.
- [29] 周瑞芳,李幸运,刘鹏熙.植物雌激素相关中药对乳腺癌细胞增殖的影响[C].第十届全国中医暨中西医结合乳腺病学术会议论文集.2007.
- [30] 贝抗胜,孙庆文,熊英辉,等.成骨因子BMP7在骨膜细胞体外培养中的作用[J].中华显微外科杂志,2010,33(5):384-387.
- [31] 张峻玮,陆海涛,杨宇明,等.低氧培养对骨膜细胞成软骨分化的影响[J].中华实验外科杂志,2016,33(5):1281-1283.
- [32] 杨宇明,袁峰,陆海涛,等.骨膜细胞与髓核细胞共培养向成骨方向的分化[J].中国组织工程研究,2015,19(37):5916-5922.
- [33] 王志强.异戊烯基黄酮类雌激素受体调节剂的神经保护和促胚胎干细胞分化为神经细胞的研究[D].杭州:浙江大学,2007.
- [34] 孙佳琦,张甘霖,于明薇,等.植物雌激素与乳腺癌发病发展的研究进展[J].现代生物医学进展,2016,16(12):2368-2371.