补肾中药促进成骨前体细胞 MC3T3-E1 成骨与分化研究进展

朱庭辰[1]，华 臻[2]，殷 杰[1]，王建伟[2]

（1.南京中医药大学，江苏 南京 210023；2.南京中医药大学无锡附属医院，江苏 无锡 214071）

[摘要]骨缺损修复是由成骨细胞、破骨细胞及多种生长因子共同参与的复杂、漫长的过程。成骨前体细胞 MC3T3-E1 在骨缺损的再生修复过程中起重要作用。近年来随着中药现代提纯分离技术的快速发展，基于中医“肾主骨生髓”理论，运用补肾中药制剂提高成骨前体细胞 MC3T3-E1 成骨与分化效能的研究逐渐开展，并初见成效，这为骨缺损的修复再生开辟了一条新思路。

[关键词]补肾中药；MC3T3-E1；成骨细胞；骨缺损；研究进展

[中图分类号]R285.5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2019.06.023

1964年 PECK 等首次从胎鼠骨组织中成功分离出新生大鼠成骨细胞，开创了前成骨细胞用于骨代谢研究的新纪元[1]。近年来，随着骨组织工程的兴起及各类促成骨成分被广泛研究，骨缺损的研究进入新的阶段。MC3T3-E1 细胞是一种成骨细胞前体，可在成骨相关信号的诱导刺激下进一步分化为成熟的成骨细胞[2]。其具有成骨细胞特性，增殖能力强，细胞生物性稳定，是一种良好的成骨细胞分化研究模型[3]。因此，如何提高 MC3T3-E1 细胞增殖及成骨与分化的效能，已成为国内外骨科领域研究的重点。目前常用的骨修复材料与骨形态发生蛋白等骨修复因子价格昂贵，制备工艺复杂，活性不稳定，具有潜在致癌风险[4-5]。近年来随着中药分离提纯技术的快速发展，在中医“肾主骨”理论指导下，以补肾中药制剂干预前成骨细胞 MC3T3-E1 以促进骨组织再生修复的研究逐渐丰富并初见成效[6-9]。中医学认为，肾主骨生髓，补肾可以强筋壮骨。现代药理研究[10]表明，补益肝肾可使骨密度增加，骨抗弯曲和抗压缩能力增强，促进骨小梁显微结构改善和修复。补肾中药可以促进成骨与抑制破骨、改善

基金项目：无锡市卫生局卫生科研青年项目（Q201708）

作者简介：朱庭辰（1993- ），男，硕士研究生

[15] 王喜军.中药药效物质基础研究的系统方法学：中医方证代谢组学[J].中国中药杂志，2015，40(1)：13-17.

[16] 陈志敏，胡昌江，郑午，等.代谢组学在中药炮制机制研究中的应用概述[J].中华中医药学刊，2018，36(2)：275-279.

[17] 侯健.基于代谢组学的炙淫羊藿温肾助阳炮制机理研究[D].镇江：江苏大学，2017.

[18] 钟立甲，张文泉，华永丽，等.代谢组学方法评价当归不同炮制品挥发油抗大鼠急性炎症作用的研究[J].中国中药杂志，2016，41(11)：2061-2069.

[19] 李春雨，何琴，唐进法，等.免疫应激介导的何首乌“九蒸九晒”炮制减毒作用及代谢组学研究[J].药学学报，2017，52(7)：1069-1076.

[20] 孙娥，徐凤娟，张振海，等.中药炮制机制研究进展及研究思路探讨[J].中国中药杂志，2014，39(3)：363-369.

[21] 潘凌云，徐雯，王楠，等.动物体内过程研究方法在中药炮制领域应用现状分析[J].中华中医药杂志，2018，33(2)：624-627.

[22] 孙娥，韦英杰，张振海，等.基于黄酮成分吸收代谢的炙淫羊藿炮制机制研究[J].中国中药杂志，2014，39(3)：383-390.

[23] 李慧芬，张学兰.特女贞苷与红景天苷的大鼠在体胃肠吸收比较[J].中国中药杂志，2014，39(6)：1107-1110.

[24] 张清华.采用外翻肠囊法研究甘草炮制对巴戟天中环烯醚萜类成分吸收特征的影响[D].福州：福建中医药大学，2018.

[25] 解静，高杉，李琳，等.网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J].中草药，2019，50(10)：2257-2265.

[26] 刘志强，王博龙.中药网络药理学药效成分筛选与靶标预测的研究进展[J].中成药，2019，41(1)：171-178.

[27] 付智慧，李淑军，胡慧华，等.基于电子舌技术的豨莶草炮制前后滋味比较[J].中草药，2017，48(4)：673-680.

[28] 李志远.基于电子鼻技术的沉香气味识别及其物质基础研究[D].北京：北京中医药大学，2015.

[29] 马文凤，许浚，韩彦琪，等.仿生技术在中药五味辨识研究中的进展与实践[J].中草药，2018，49(5)：993-1001.

[30] 刘昌孝，陈士林，肖小河，等.中药质量标志物（Q-Marker）：中药产品质量控制的新概念[J].中草药，2016，47(9)：1443-1457.

（收稿日期：2019-05-18；编辑：张倩）

骨髓间充质干细胞骨生物性能。目前研究较集中的中药有淫羊藿、补骨脂、骨碎补、女贞子等;中药组方有左归丸、补肾活血固齿方等。这为研究骨缺损的修复重建提供了新思路。目前,关于此类研究的综述较少,笔者试从补肾中药促进成骨前体细胞MC3T3-E1增殖、分化及成骨的理论基础、观察研究及机制方面进行综述。

1 中医"肾主骨"理论与成骨前体细胞MC3T3-E1的关系

肾主骨,肾生髓,髓藏于骨腔之中,以充养骨骼,正所谓"肾充则髓实"。而髓的生成,为"肾主骨"提供了物质基础。现代研究[11]表明,在人体内,细胞成骨化的过程中,随着人从幼年长至成熟,人的骨髓间充质细胞快速增加,到达高峰后处于相对稳定,部分细胞停止增殖分化,人到老年时,骨髓间充质细胞逐渐减少。肾之精气对骨的影响在人生长过程中的变化规律与成骨细胞在人体内成骨化的过程极为相似[12],均随着年龄增长而发生相应改变。由此可见,肾中精气与骨组织生长、凋亡有着密不可分的联系,这也为研究补肾中药促进前成骨细胞MC3T3-E1成骨与分化提供了理论基础。

2 补肾中药对MC3T3-E1细胞增殖与成骨的影响

2.1 补肾中药对成骨前体细胞MC3T3-E1增殖、抗凋亡影响的研究 成骨细胞根据不同分化阶段可以分为间充质干细胞、成骨前体细胞、成熟的成骨细胞、骨细胞。研究认为,成骨前体细胞MC3T3-E1生物性能十分活跃,其增殖与分化对骨缺损的修复重建极其重要[13]。因此,如何促进成骨前体细胞增殖和分化是骨缺损修复重建的核心环节。

在促进MC3T3-E1细胞增殖分化的补肾中药制剂中,有关淫羊藿的研究相对丰富,淫羊藿具有强筋骨、补肾阳、祛风湿等功效,常用来治疗骨质疏松、围绝经期综合征等疾病[14]。徐忠坤等[15]研究表明,淫羊藿总黄酮胶囊中各成分均能促进MC3T3-E1细胞分化增殖,其中保活苷Ⅱ的活性最高。Gong等[16]在研究人工骨膜促进骨再生的研究中发现,中药单体淫羊藿苷可以使MC3T3-E1细胞中碱性磷酸酶活性明显增强,骨钙素和Ⅰ型胶原表达增加,此外,在载钙纤维基质上培养的MC3T3-E1细胞中还观察到清晰的钙沉积含量,这也为MC3T3-E1细胞可以生成骨组织提供了有力的证据。Ho等[17]对比研究了金雀花碱和淫羊藿苷诱导骨形成和减少的关系,发现淫羊藿苷比金雀花碱具有更强的抗凋亡作用,可抑制由PI3K抑制剂PI828诱导的MC3T3-E1细胞中Caspase-3下游的分裂。Lai等[18]运用3D打印技术制备聚乳酸-聚乙醇酸/β-磷酸钙/淫羊藿苷支架,发现淫羊藿苷能促进MC3T3-E1细胞的分化。Qiu等[19]从女贞子干果中分离出3种新的甾体类化合物,即努烯内酯、异茉莉花苷B、6′-O-反式肉桂酰-色考龙苷,并对所有化合物进行成骨细胞前MC3T3-E1细胞成骨活性测试。结果表明,努烯内酯和6′-O-反式肉桂酰-色考龙苷对成骨细胞前的细胞增殖有明显促进作用。研究表明,女贞子水提液可以促进MC3T3-E1细胞的增殖和分化,可能是通过雌激素受体(estrogen receptor,ER)、蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)和核转录因子κB(nuclear-factor kappa B,NF-κB)信号通路来表达的,女贞子水提液对成骨细胞的影响体现了女贞子"功缓"的特点[20-21]。Song等[22]对骨碎补提取物治疗妇女绝经后骨质疏松症进行研究,发现骨碎补总黄酮可以抑制前成骨细胞MC3T3-E1凋亡并促进增殖,体外实验表明,骨碎补总黄酮调节MC3T3-E1活性的作用是由雌激素受体依赖性途径介导的。研究表明,骨碎补总黄酮通过上调骨保护素(osteoprotegerin,opg)以及下调NF-κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear-factor kappa B ligand,RANKL)表达的受体激活物抑制破骨细胞生成。Xia等[23]从骨碎补中分离出山奈酚,以2×10^4/mL的细胞浓度与负鼠肾细胞、成骨细胞MC3T3-E1和人成纤维细胞共孵育数个浓度,以70 nmol/L的山奈酚为条件培养基,用于刺激MC3T3-E1的增殖。结果表明,山奈酚能促进OK细胞生长,提高OK细胞中骨形态蛋白受体Ⅱ的水平,但单独使用并不能促进MC3T3-E1细胞增殖。这有力地佐证了中医学理论中肾脏对骨形成有重大影响的观点,骨碎补还可以促进肾脏修复和间接刺激骨形成。除了中药单体的研究,还有补肾方剂对成骨前体细胞MC3T3-E1影响的研究。桑红灵等[24]发现,血清饥饿会诱导MC3T3-E1细胞凋亡,减少Caspase3蛋白表达,左归丸含药血清能抑制MC3T3-E1细胞凋亡并促进其增生。研究表明,左归丸含药血清虽然可以促进MC3T3-E1细胞分化增殖,尤其在分化中后期更为显著,但沉默Cx43基因对其有抑制作用[25]。

2.2 补肾中药促进MC3T3-E1细胞成骨化的研究 在骨骼的动态变化中,破骨细胞将骨质吸收,成骨细胞在此基础上生成新的骨组织。如何促进成骨细胞骨化、钙化早已是研究促进骨缺损修复重建的核心问题[26]。

Ge等[27]在研究中发现,异补骨脂素(isopsor-

alen,ISO)是补肾中药补骨脂的主要有效成分之一,具有多种生物学作用,包括抗骨质疏松作用。ISO可以促进MC3T3-E1细胞成骨化,增加钙结节水平和碱性磷酸酶活性,上调成骨细胞标记物,包括碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)、Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2,RUNX2)和Ⅰ型胶原α1链(type Ⅰ collagen α1,Col1α1)。此外,ISO通过直接结合芳香烃受体(arylhydrocarbon receptor,AHR)来限制AHR的核质穿梭。在体外和体内,AHR靶基因细胞色素P450家族1亚家族A成员1(Cyp1a1)也受到抑制。AHR激动剂吲哚-3-甲醇(i3c)和3-甲基胆蒽(3mc)抑制了这种作用。此外,ISO还以AHR依赖的方式增加雌激素受体α的表达,ISO作为AHR拮抗剂,通过AHR/ERα轴促进成骨细胞分化。Zhang等[28]对ISO与胶原体外合成的关系进行研究,结果显示,与对照组相比,ISO刺激的MC3T3-E1细胞胶原表达明显上调($P<0.05$),ISO通过激活转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)信号通路,抑制Smad7蛋白表达促进胶原合成,从而促进骨组织的成骨化。王建茹等[29]比较不同浓度淫羊藿苷溶液对MC3T3-E1细胞成骨的诱导作用,发现1×10^{-4} mmol/L浓度的淫羊藿苷溶液促成骨效果最明显,其成骨诱导作用与重组人骨形态发生蛋白-2(recombinat human bone morphogenetic protein-2,rhBMP-2)接近,可以作为一种骨诱导生长因子替代剂联合骨修复材料用于促进骨组织再生。陈旭凤等[30]研究表明,淫羊藿苷可以促进MC3T3-E1细胞成骨与分化,其可能是通过Wnt/β-catenin/BMP-2信号通路而实现的。Li等[31]通过实验证明女贞子水提物对MC3T3-E1细胞有促进成骨作用,其可调节上清液中OPG和RANKL蛋白的表达实现。阚默等[32]在研究鹿茸Ⅰ型胶原(sika deer velet collagen Ⅰ,SDC-Ⅰ)治疗骨质疏松的作用机制时,用不同浓度的SDC-Ⅰ处理小鼠成骨前细胞MC3T3-E1,发现SDC-Ⅰ可以刺激MC3T3-E1细胞Smad 2/3和TGF-β1的表达,促进骨的形成,并认为可能是通过TGF-β1/Smad信号通路来实现的。相关研究表明,补肾活血固齿方可以通过上调成骨诱导因子BMP2的表达,诱导前成骨细胞MC3T3-E1向成骨细胞发展,从而促进骨的形成[33-34]。赵玲[35]研究发现,补肾活血固齿方可以促进MC3T3-E1细胞向成骨细胞样表型发展,增加MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性及Ⅰ型胶原蛋白(collagen Ⅰ,Col Ⅰ)和矿化结节的形成,促进MC3T3-E1细胞分化成熟,促进骨组织的形成。

3 补肾中药促进MC3T3-E1细胞增殖及成骨与分化的机制探讨

目前,补肾中药对促进MC3T3-E1细胞增殖及成骨与分化的研究已经深入到通路、分子水平,在细胞微环境中,多条信号通路共同作用,从而促进MC3T3-E1细胞增殖及成骨与分化。有学者研究发现,骨形态发生蛋白转导途径是通过Smad分子介导,主要依靠Smad4(Co-Smad)与Smad1/5/8(R-Smad)聚合后转录Runx2的表达,进而调节成骨细胞的相关基因表达[36-38]。有学者认为Smad分子是关键的促进成骨的调节蛋白,并研究发现在成骨细胞中特异性敲除Smad分子,骨形态发生蛋白信号即被阻断,成骨与分化停滞[39]。还有学者[40]认为Wnt通路信号是MC3T3-E1细胞在骨骼发育中的关键点,同时也证实了Wnt通路信号在促进MC3T3-E1细胞骨化进程中起到重要作用。也有学者认为补肾中药是通过促进OPG和RANKL的mRNA和蛋白表达,从而帮助MC3T3-E1细胞骨化[31]。

4 讨论

随着社会的快速发展,由原发性骨病或创伤所致的骨缺损已于临床上广泛存在,仅在美国每年就存在10万例以上的骨不连病例[41]。骨组织的再生重建具有极大的研究潜价值,但骨组织的修复是一个漫长、受多种因素影响的复杂过程。目前对骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)的研究较为丰富,而MC3T3-E1细胞作为成骨前体细胞研究相对较少。MC3T3-E1细胞具有体外稳定的特性,且价格便宜,更适宜研究使用。研究表明,补肾中药对MC3T3-E1细胞增殖、分化、成骨有明确的促进效果。中医药在治疗骨组织的再生重建方面具有独特优势,其特点在于整体调节、辨证论治。补肾类中药治疗骨缺损、骨质疏松症疗效确切,然而其开发研究虽较多,但多处于初级阶段,存在低水平重复现象。中药及方剂治疗疾病是复杂的、多靶点的综合作用结果,现有研究对中药复方的成分分析不够明确,存在很多局限性。今后应在继承传统中医药理论的基础上,运用现代医学先进的技术手段,中西医结合研究补肾中药促进骨生长的机制,进一步明确其有效成分并阐明其作用机制。

参考文献:

[1] PECK W A, BIRGE SJ J R, FEDAK S A. Bonecells: biochemical and biological studies after enzymatic isoliat

ion[J]. Science,1964,146(3650):1476-1477.

[2] LONG F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012,13(1):27-38.

[3] CHAVES NETO A H, MACHADO D, YANO C L, et al. Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and β-glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation[J]. Dev Growth Differ,2011,53(1):88-96.

[4] BRANNAN P S, GASTON R G, LOEFFLER B J, et al. Complications with the use of BMP-2 in scaphoid nonunion surgery[J]. J Hand Surg Am, 2016,41(5): 602-608.

[5] FAUNDEZ A, TOUMIER C, GARCIA M, et al. Bone morphogenetic protein use in spine surgery-complications and outcomes: a systematic review[J]. Int Orthop,2016,40 (6):1309-1319.

[6] LIU Y, HUANG L, HAO B, et al. Use of an osteoblast overload damage model to probe the effect of Icariin on the proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells through the Wnt/β-Catenin signalling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(4): 1605-1615.

[7] YANG Y, SU Y, WANG D, et al. Tanshinol rescues the impaired bone formation elicited by glucocorticoid involved in KLF15 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016,2016:1092746[2016-03-14]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808655. DOI: 10.1155/2016/1092746.

[8] WANG P L, ZHANG F X, QIU Z C, et al. Isolation and identification of metabolites of bakuchiol in rats[J]. Fitoterapia, 2016, 109: 31-38 [2016-03-01]. https://www.chemsrc.com/en/Paper/801445.html. DOI:10.1016/j.fitote.2015.11.006.

[9] TSENG S H, SUNG C H, CHEN L G, et al. Comparison of chemical compositions and osteoprotective effects of different sections of vlvet antler[J]. J ethnopharmacol, 2014,151(1):352-360.

[10] 肖亚平,曾杰,焦琳娜,等.补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(1):21-30.

[11] MIMEAULT M, HAUKE R, BATRA S K. Stem cells: a revolution in therapeutics recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies[J]. Clin Pharmacol Ther,2007,82(3):252-264.

[12] 华臻,杨俊锋,潘娅岚,等.补肾中药促进骨髓间充质干细胞成骨与分化的研究进展[J].中华中医药杂志,2015,30(9):3222-3226.

[13] DAI Q, XU Z, MA X, et al. mTOR/Raptor signaling is critical for skeletogenesis in mice through the regulation of Runx2 expression[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(11):1886-1899.

[14] WEI Q, HE M, CHEN M, et al. Icariin stimulates osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells by increasing TAZ expression[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91: 581-589 [2017-04-19]. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S075333221632529X. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.04.019.

[15] 徐忠坤,殷洪梅,李芳,等.淫羊藿总黄酮胶囊中黄酮类成分含量测定及抗骨质疏松活性研究[J].中国中药杂志,2018,43(15):3140-3144.

[16] GONG M, CHI C, YE J, et al. Icariin-loaded electrospun PCL/gelatin nanofiber membrane as potential artificial periosteum[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 170: 201-209. [2018-06-12]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29909312. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.012.

[17] HO M X, POON C C, WONG K C, et al. Icariin, but not genistein, exerts osteogenic and anti-apoptotic effects in osteoblastic cells by selective activation of non-genomic ERα signaling [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 474 [2018-05-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5958194/. DOI: 10.3389/fphar.2018.00474.

[18] LAI Y, CAO H, WANG X, et al. Porous composite scaffold incorporating osteogenic phytomolecule icariin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits[J]. Biomaterials, 2018, 153:1-13. [2017-10-23]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29096397. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.025.

[19] QIU Z C, ZHAO X X, WU Q C, et al. New secoiridoids from the fruits of Ligustrum lucidum[J]. J Asian Nat Prod Res,2018,20(5):431-438.

[20] 李琴.女贞子及其成分对MC3T3-E1细胞增殖和OPG表达影响及其机制研究[D].北京:中国农业大学,2015.

[21] 李琴,范迎赛,高宗勤,等.女贞子水提液促MC3T3-E1细胞增殖和OPG表达的相关通路试验[J].中国兽医杂志,2016,52(5):59-62.

[22] SONG S H, ZHAI Y K, LI C Q, et al. Effects of total flavonoids from Drynariae Rhizoma prevent bone loss *in vivo* and *in vitro*[J]. Bone Rep,2016,5:262-273.

[23] XIA L, LI Y, ZHOU Z, et al. Icariin delivery porous PHBV scaffolds for promoting osteoblast expansion *in vitro*[J]. Mater Sci Eng C Mater Bio Appl, 2013,33 (6):3545-3552.

[24] 桑红灵,周安方,孙志博,等.左归丸调控Cx43对血清饥饿诱导MC3T3-E1细胞凋亡的保护作用[J].中华中医药学刊,2018,36(5):1071-1075.

[25] 桑红灵,周安方,喻小明,等.沉默Cx43基因对左归丸调控MC3T3-E1细胞Runx2、Osterix表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(11):5045-5049.

[26] SUDO H, KODAMA H A, AMAGAI Y, et al. *In vitro* differentiation and cal-cification in a new clone osteogenic cell line derived from new bornmousecalvaria [J]. J Cell Biol, 1983, 96 (1):191-198.

[27] GE L, CUI Y, CHENG K, et al. Isopsoralen enhanced osteogenesis by targeting AhR/ERα[J]. Molecules,2018,23(10): pii: E2600[2018-10-11]. http://www.mdpi.com/1420-3049/23/10/2600/pdf. DOI: 10.3390/molecules23102600.

[28] ZHANG H, TA N. Effect of isopsoralen on Smad7 in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Exp Ther Med, 2017,14(2):1561-1567.

[29] 王建茹,张育敏,韩波.淫羊藿苷对MC3T3-E1成骨前体细胞的成骨诱导作用及意义[J].山东医药,2018,58(16):17-20.

[30] 陈旭凤,喻澜,夏秦.淫羊藿苷促前成骨细胞MC3T3-E1成骨与分化的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2018,38(6):687-692.

[31] LI Q, FAN Y S, GAO Z Q, et al. Effect of Fructus Ligustri Lucidi on osteoblastic like cell-line MC3T3-E1 [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 170: 88-95[2015-07-21]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115003384. DOI:10.1016/j.jep.2015.05.013.

[32] 阚默,石晓征,曲晓波.鹿茸Ⅰ型胶原对MC3T3-E1细胞TGF-β1/Smad基因蛋白表达的影响[J].长春中医药大学学报,2018,34(5):857-860.

[33] 李立芳,李敏,刁志,等.补肾活血固齿方对大鼠MC3T3-E1细胞BMP2表达及超微结构的影响[J].中华中医药学刊,2016,34(7):1663-1665.

[34] 都广艳.补肾活血固齿方对MC3T3-E1细胞BMP-2表达及COLⅠ合成影响的实验研究[D].石家庄:河北医科大学,2015.

[35] 赵玲.补肾活血固齿方对MC3T3-E1细胞超微结构及分化影响的实验研究[D].石家庄:河北医科大学,2015.

[36] LEE K S, HONG S H, BAE S C. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein[J]. Oncogene,2002,21(47):7156-7163.

[37] AFZAL F, PRATAP J, ITO K, et al. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(1):63-72.

[38] FRANCESCHI R T, XIAO G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(3):446-454.

[39] WANG M, JIN H, TANG D, et al. Smad1 plays an essential role in bone development and postnatal bone formation[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(6): 751-762.

[40] WORTON L E, SHI Y C, SMITH E J, et al. Ectodermal-neural cortex 1 isoforms have contrasting effects on MC3T3-E1 osteoblast mineralization and gene expression[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(8): 2141-2150.

[41] HAK D J, FITZPATRICK D, BISHOP J A, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects[J]. Injury, 2014, 45 (Suppl 2):S3-S7.

(收稿日期:2019-04-07;编辑:张倩)