

· 基础研究 ·

复元活血汤含药血清对大鼠成骨细胞功能的影响

于波¹, 崔宪春², 谢进¹

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014)

摘要 目的:探讨复元活血汤含药血清对大鼠成骨细胞功能的影响及其作用机制。**方法:**取 2 月龄 SD 雄性大鼠 12 只, 随机分为 2 组, 每组 6 只, 分别给予 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复元活血汤生药灌胃(含药血清组)和同等量的生理盐水灌胃(空白血清组), 每天 2 次, 14 d 后腹主动脉采血。取新生 SD 大鼠 2 只, 采用二次酶消化法消化幼鼠颅盖骨获取成骨细胞, 采用血清药理学方法, 分别采用含胎牛血清的培养液(胎牛血清组)、含复元活血汤生药灌胃大鼠血清的培养液(含药血清组)和含生理盐水灌胃大鼠血清的培养液(空白血清组)培养成骨细胞。分期测定体外培养的大鼠成骨细胞的增殖功能、分化功能、矿化功能及碱性磷酸酶含量。**结果:**①成骨细胞增殖功能。时间效应 $F = 381.260, P = 0.000$; 组别效应 $F = 1\,071.170, P = 0.000$; 时间与组别交互效应 $F = 22.500, P = 0.000$ 。②成骨细胞分化功能。时间效应 $F = 159.950, P = 0.000$; 组别效应 $F = 62.120, P = 0.000$; 时间与组别交互效应 $F = 2.400, P = 0.029$ 。③成骨细胞矿化功能。时间效应 $F = 115.500, P = 0.000$; 组别效应 $F = 4.370, P = 0.082$; 时间与组别交互效应 $F = 56.300, P = 0.000$ 。④成骨细胞碱性磷酸酶含量。时间效应 $F = 2\,175.670, P = 0.000$; 组别效应 $F = 1\,201.370, P = 0.000$; 时间与组别交互效应 $F = 428.870, P = 0.000$ 。**结论:**复元活血汤能明显地促成骨细胞的增殖和分化功能, 其作用可能与成骨细胞合成和分泌碱性磷酸酶有关。

关键词 复元活血汤 成骨细胞 碱性磷酸酶

Study on the effect of serum containing FuYuanHuoXue Recipe on the function of rat's osteoblasts in vitro

YU Bo*, CUI Xian - chun, XIE Jin. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, Shandong, China

ABSTRACT Objective: To study the effect of serum containing FuYuanHuoXue Recipe on the function of rat's osteoblasts in vitro and the mechanism of action. **Methods:** 12 SD maleness rats aged 2 months were divided into two groups with 6 rats in each group at random, rats in one group(experimental group) undergone intragastric administration of FuYuanHuoXue decoction($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) while equivalent normal saline was administrated in another group(control group) twice everyday, blood was obtained from abdominal aorta 14 days later. Osteoblasts were obtained from 2 neonatal rats and cultured respectively with fluid containing fetal bovine serum, serum from the rats in experimental group and control group. Function of osteoblasts was evaluated according to the measurement of proliferation, differentiation, mineralization and quantity of alkaline phosphatase(AKP). **Results:** ①Proliferation of osteoblast: time effect: $F = 381.260, P = 0.000$; effect between groups: $F = 1\,071.170, P = 0.000$; reciprocal effect between time and group: $F = 22.500, P = 0.000$. ②Differentiation of osteoblast: time effect: $F = 159.950, P = 0.000$; effect between groups: $F = 62.120, P = 0.000$; reciprocal effect between time and group: $F = 2.400, P = 0.029$. ③Mineralization of osteoblast: time effect: $F = 115.500, P = 0.000$; effect between groups: $F = 4.370, P = 0.082$; reciprocal effect between time and group: $F = 56.300, P = 0.000$. ④content of AKP: time effect: $F = 2\,175.670, P = 0.000$; effect between groups: $F = 1\,201.370, P = 0.000$; reciprocal effect between time and group: $F = 428.870, P = 0.000$. **Conclusion:** FuYuanHuoXue decoction can incite proliferation and differentiation of rat's osteoblast in vitro owing to the promotion in secretion of alkaline phosphatase.

Key words FUYUAN HUOXUE DECOCTION; Osteoblasts; Alkaline Phosphatase

清·陈士铎在《洞天奥旨》中记载“跌打损伤瘀皆瘀血在内而不散也, 血不活则瘀不能去, 瘀不去则折不能续也”。中医学将活血化瘀作为治疗骨折的基础方法, 而现代医学研究也证明活血化瘀法能改善血液流变学性质, 降低血液黏稠度, 提高血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 和

VEGF - mRNA 的表达, 促进血管再生^[1]。但活血化瘀法能否促进骨折断端成骨细胞的功能, 其作用机制如何, 目前相关报道较少见。笔者通过实验观察了中医活血化瘀代表方剂复元活血汤含药血清对大鼠成骨细胞功能的影响, 现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验试剂 DMEM 培养基(Gibco)、胰蛋白酶(Gibco)、II 型胶原酶(Gibco)、MTT(SIGMA)、PNPP

(SIGMA)、D-Hank's 液、胎牛血清(购自中国科学院天津血液研究所)、 β -甘油磷酸钠(FlukaAG)、无水氯化钙、硫化胺、DMSO、75% 酒精、4% 多聚甲醛、10% 中性福尔马林、2% 硝酸钴、1% 硫化胺水溶液、苏木精、0.1% Triton X100、0.1% 茜素红溶液、3% 戊巴比妥钠。

1.2 实验仪器 CO_2 培养箱,倒置显微镜(OLYMPUS),超净工作台,离心机,碱性磷酸酶测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(购自碧云天生物技术研究所),6 孔、24 孔、96 孔培养板,盖玻片,培养皿,15 mL 离心管,解剖器具等。

1.3 主要液体配制 ①碱性磷酸酶染色孵育液:3% β -甘油磷酸钠 10 mL、2% 巴比妥钠 10 mL、2% 无水氯化钙 20 mL、2% 硫酸镁 1 mL、蒸馏水 5 mL, pH 值 9.4。②MTT:取 5 mg MTT 溶于 1 mL 生理盐水中,抽滤备用,避光保存。③PNPP:取 500 mg PNPP 粉剂溶于 5 mL 双纯水,抽滤备用,4 °C 避光保存。④D-Hank's 液: KH_2PO_4 0.06 g、NaCl 8.0 g、 NaHCO_3 0.35 g、KCl 0.4 g、葡萄糖 1.0 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.06 g,加蒸馏水至 1 000 mL,高压灭菌,4 °C 下保存。

1.4 实验动物 新生 SD 大鼠 2 只,用于大鼠成骨细胞的提取。2 月龄 SD 雄性大鼠 12 只,体质量(0.12 ± 0.01)kg,用于含药血清的制备。实验大鼠均由山东大学实验动物培育中心提供,动物合格证号:Scxk(鲁)20090001 号。

1.5 实验药物 复元活血汤。药物组成:柴胡 9 g、天花粉 9 g、当归 9 g、红花 6 g、穿山甲 6 g、大黄 12 g、桃仁 9 g、甘草 6 g。由山东中医药大学制药厂协助制备,1 mL 汤剂含生药 1 g,无菌封瓶,4 °C 冰箱保存备用。

2 方法

2.1 分组 将 12 只 SD 雄性大鼠随机分为 2 组,每组 6 只,分别给予 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复元活血汤生药灌胃和同等量的生理盐水灌胃,每天 2 次。

2.2 血清制备 灌胃 14 d 后,无菌条件下采用快速腹主动脉采血法取血。采血前 12 h 禁食, $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。麻醉起效后使大鼠仰卧于操作台上,背部放置一粗试管以充分暴露腹主动脉,常规消毒后用手术剪沿腹正中线剪开腹腔。术者右手持穿刺针,针尖斜面朝上,沿 $25^\circ \sim 30^\circ$ 方向刺入,深度约 5 mm,抽吸血液。玻璃管收集腹主动脉血 6 mL,室温

放置 1 h,于 4 °C 以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上层血清过滤($0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜)后移至新 EP 管中, -20 °C 保存。

2.3 成骨细胞分离培养

2.3.1 大鼠成骨细胞原代培养 将 2 只新生 SD 大鼠放入 75% 酒精中浸泡消毒 10 min,无菌操作取下颅盖骨,除去附着的血管及结缔组织,用 D-Hank's 液清洗 3 次,剪成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小的碎块,放入 15 mL 离心管。再用 D-Hank's 液清洗 3 次,加入 8 倍于骨碎块体积的 0.25% 胰蛋白酶,于 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中预消化 30 min, 5~10 min 摇匀一次。然后以 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃消化液。加入 8 倍于骨块体积的 0.1% II 型胶原酶,于 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中消化 5 次,其间 3~5 min 摇匀一次,每次消化 10 min。弃去前 2 次消化液,取最后 3 次消化液,以 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清液,所得白色沉淀物即为制得的成骨细胞样细胞团。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞,吹打均匀,接种到 2 个 100 mm 一次性培养皿中,置于 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内进行培养,倒置显微镜下观察细胞贴壁后换液,弃去悬浮细胞,每隔 2 d 换液 1 次。观察成骨细胞贴壁生长情况,见 80% 细胞融合成单层,即进行传代。

2.3.2 三次传代培养 吸去培养液,加 0.25% 胰蛋白酶 3 mL,轻轻晃动培养皿,使胰蛋白酶覆盖整个皿底,37 °C 消化 1~3 min,镜下见细胞皱缩,间距加大,分离为单个小圆细胞时,滴加 DMEM 培养液中止消化,然后吹打、悬浮细胞,将细胞悬液移入 15 mL 离心管, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。弃上清液,沉淀细胞加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液悬浮细胞,吹打均匀后用培养液调成适当浓度,分装在 4 个培养皿和 1 个 6 孔培养板中(已放入盖玻片)。观察 6 孔培养板中成骨细胞贴壁生长情况,见细胞密度适中,初见细胞融合趋势,即可用于细胞鉴定。

2.3.3 成骨细胞的鉴定 用倒置显微镜逐日观察细胞生长情况和形态特征,当细胞爬满玻片后,将玻片取出,进行成骨细胞鉴定。①成骨细胞的形态学鉴定:4% 多聚甲醛固定后,常规 HE 染色;②成骨细胞的碱性磷酸酶染色:用 Gomori 改良钙钴法^[2],将细胞在 10% 中性福尔马林固定 10 min 后,加入新配制的孵育液,于 37 °C 孵育 4 h,流水洗 10 min,2% 硝酸钴

作用 5 min, 蒸馏水洗片刻, 1% 硫化胺水溶液(现配)处理 1 min, 再用苏木精复染 1 min, 脱水处理后甘油明胶封固。

2.4 相关指标观察

2.4.1 成骨细胞增殖功能 将成骨细胞浓度调整为 $2 \times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板, 分胎牛血清组、含药血清组和空白血清组, 每组各分 5 个板子, 每组重复 10 孔。待细胞贴壁后换空白 DMEM 培养基继续培养过夜, 使细胞生长同步化。第 2 天胎牛血清组换含胎牛血清浓度为 10% 的 DMEM 培养液; 含药血清组换复元活血汤灌胃的大鼠血清浓度为 20% 的 DMEM 培养液; 空白血清组换生理盐水灌胃的大鼠血清浓度为 20% 的 DMEM 培养液。放入 37°C 、0.5% CO_2 培养箱中分别培养 1、2、3、4、5 d。实验结束前 4 h 每孔各加 20 μL 0.5% MTT, 37°C 孵育 4~6 h。弃培养液, 加 DMSO 150 μL , 用微量振荡器振荡 15 min, 静置 0.5 h 后酶标仪检测其吸光度, 在波长 490 nm 比色。

2.4.2 成骨细胞分化功能 细胞培养及分组同成骨细胞增殖测定。于培养 1、2、3、4、5 d 后, 弃上清液, D-Hank's 液洗 3 次, 然后每孔加入 50 μL 0.1% Triton X100, 置于 4°C 冰箱过夜。采用磷酸对硝基苯酯二钠盐法, 每孔加入 ALP 检测试剂盒中新配制的底物 100 μL , 置入 37°C 温箱内 30 min, 最后加 100 μL 0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 终止反应, 用酶标仪于 405 nm 波长处测吸光度。

2.4.3 成骨细胞矿化功能 取培养的第 3 代成骨细胞, 调整浓度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 500 μL 接种于 3 个 24 孔板。待细胞贴壁后, 换 20% 含药血清培养液和空白血清培养液。按培养时间, 设 3、5、7、9、12、15 d 6 个组, 每组 6 孔重复。培养结束后弃培养液, D-Hank's 液冲洗后 95% 酒精固定 10 min, 0.1% 茜素红溶液染色 30 min, 蒸馏水冲洗晾干, 以橘红色结节、边界清晰、短径 $> 200 \mu\text{m}$ 为标准, 低倍镜下进行计数。

2.4.4 成骨细胞碱性磷酸酶含量 取第 3 代成骨细胞, 调整浓度为 $2 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 分 2 组(含药血清组和空白血清组)接种于 2 个 6 孔板, 每组 5 孔, 每孔 2 mL, 放入 37°C 、0.5% CO_2 培养箱中培养。待细胞贴壁后换空白 DMEM 培养基继续培养过夜, 使细胞生长同步化。第 2 天含药血清组换 20% 含药血清培养液, 空白血清组换 20% 空白血清培养液, 连续培养 5 d。测

定时 2 组每天各取 1 个孔吸取培养液 100 μL , -20°C 保存备用。根据碱性磷酸酶测定试剂盒说明书所述的操作方法测定 2 组的测定管吸光度和标准管吸光度。根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明测定 2 组吸光度, 制作 BCA 蛋白测定标准曲线, 根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。然后根据公式: 碱性磷酸酶含量($\text{U} \cdot \text{gprot}^{-1}$) = 测定管吸光度 \times 标准管含酚的量(0.003 mg) \div 标准管吸光度 \div 取样量中的蛋白克数, 计算碱性磷酸酶的含量。

2.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件对所得数据进行统计学处理, 各组成骨细胞增殖功能、分化功能、矿化结节计数和碱性磷酸酶含量的比较均采用重复测量方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 成骨细胞的鉴定

3.1.1 成骨细胞的形态学观察 ①相差显微镜观察: 原代成骨细胞分离出来以后, 镜下见细胞呈小圆球形, 周边细胞膜透亮, 胞内有一个小黑点, 为胞核[图 1(1)]; 细胞贴壁后膨大, 呈三角形, 核明显增大, 在接种 2~5 d 可见大部分细胞贴壁, 伸展, 成短梭形[图 1(2)]; 6~9 d 后细胞形态多样化, 多呈梭形、三角形, 胞浆丰富向外伸展出生长突, 生长突逐渐增多、不断扩大[图 1(3)]; 随培养时间延长, 细胞伸出较多突起, 而且有的细胞借突起相互连接, 10~15 d 细胞几乎满布, 形成单层细胞层, 融合成片, 细胞分界较为模糊[图 1(4)]。②HE 染色: 形态同相差显微镜观察所见。细胞内可见嗜苏木精之蓝色颗粒, 为细胞核[图 2(1)]。非有丝分裂期细胞为单核, 随培养时间延长, 胞核逐渐增大且清晰, 呈圆形或卵圆形, 含 1~2 个核仁[图 2(2)]; 有丝分裂期细胞或为单核, 或为双核, 可以观察到前、中、后、末 4 个时期细胞形体和结构的变化[图 2(3)]。

3.1.2 成骨细胞的碱性磷酸酶染色 细胞合成的碱性磷酸酶经 Gomori 改良钙钴法染色呈棕黑色细微颗粒, 多数分布在细胞膜上以及周围, 在胞浆内也可见到少量颗粒细胞, 轮廓不清[图 3(1)]。经苏木精复染后, 细胞轮廓更清晰, 结构更清楚, 可见细胞核嗜苏木精之蓝色颗粒, 棕黑色细微颗粒更明显, 分布在细胞膜上以及周围[图 3(2)]。

3.2 成骨细胞增殖功能 所得数据经球形检验, $\chi^2 = 27.390$, $P = 0.001$ 。进一步采用重复测量资料的方

差分析:时间效应 $F = 381.260, P = 0.000$;组别效应 $F = 1\,071.170, P = 0.000$;时间与组别交互效应 $F = 22.500, P = 0.000$ (表 1)。

3.3 成骨细胞分化功能 所得数据经球形检验, χ^2

$= 109.640, P = 0.000$ 。采用重复测量方差分析:时间效应 $F = 159.950, P = 0.000$;组别效应 $F = 62.120, P = 0.000$;时间与组别交互效应 $F = 2.400, P = 0.029$ (表 2)。

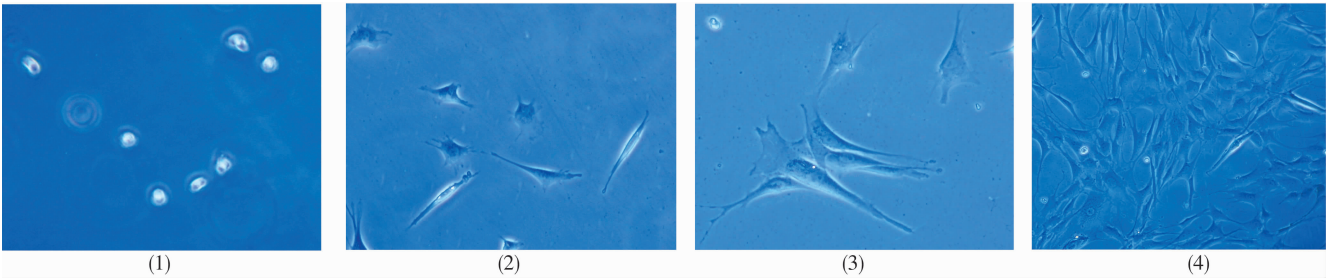


图 1 成骨细胞形态观察
(1)刚分离的原代细胞 (2)培养 4 d (3)培养 8 d (4)培养 15 d

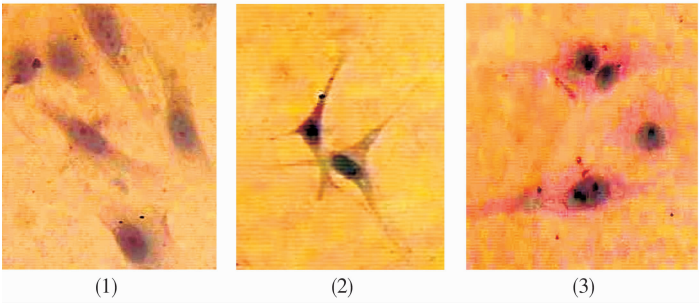


图 2 成骨细胞的 HE 染色
(1)经苏木精染色后 (2)非有丝分裂期 (3)有丝分裂期

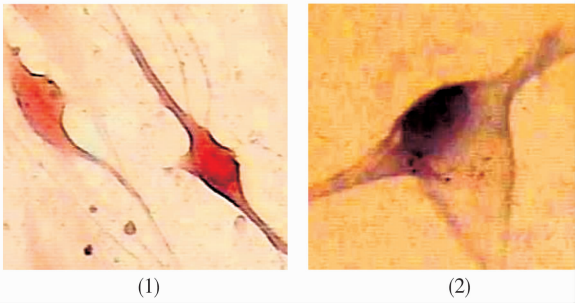


图 3 成骨细胞的碱性磷酸酶染色
(1)Gomori 改良钙钴法染色后细胞形态
(2)苏木精复染后细胞形态

表 1 各组大鼠成骨细胞增殖功能测定结果

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
胎牛血清组	0.21 ± 0.05	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.51 ± 0.10
含药血清组	0.67 ± 0.07	0.90 ± 0.32	1.01 ± 0.12	1.14 ± 0.12	0.52 ± 0.07
空白血清组	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.07	0.83 ± 0.10	1.07 ± 0.07	1.22 ± 0.06

表 2 各组大鼠成骨细胞分化功能测定结果

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
胎牛血清组	0.15 ± 0.00	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.02
含药血清组	0.20 ± 0.05	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.44 ± 0.08	0.46 ± 0.07
空白血清组	0.18 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.03

3.4 成骨细胞矿化功能 两组大鼠成骨细胞分别在培养 3、5、7、9、12、15 d 后,用茜素红染色(图 4),对各孔作矿化结节计数(表 3)。球形检验的结果为 $\chi^2 = 61.810, P = 0.000$ 。采用重复测量方差分析:时间效应 $F = 115.500, P = 0.000$;组别效应 $F = 4.370, P = 0.082$;时间与组别交互效应 $F = 56.300, P = 0.000$ 。

3.5 成骨细胞碱性磷酸酶含量 两组碱性磷酸酶含量经球形检验, $\chi^2 = 15.290, P = 0.083$ 。采用重复测量方差分析:时间效应 $F = 2\,175.670, P = 0.000$;组别

效应 $F = 1\,201.370, P = 0.000$;时间与组别交互效应 $F = 428.870, P = 0.000$ (表 4)。

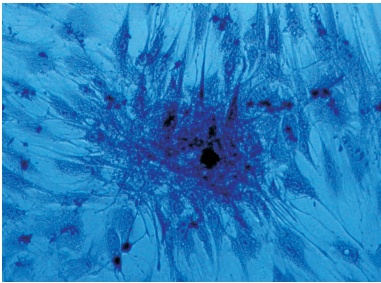


图 4 成骨细胞矿化结节

表 3 两组大鼠成骨细胞矿化结节计数

组别	3 d	5 d	7 d	9 d	12 d	15 d
含药血清组	3.67 ± 1.21	4.50 ± 1.04	8.67 ± 1.50	11.67 ± 2.16	12.50 ± 2.07	17.00 ± 2.90
空白血清组	3.83 ± 0.75	4.50 ± 0.54	6.16 ± 0.75	8.00 ± 0.89	8.67 ± 1.37	13.00 ± 2.37

表 4 两组大鼠成骨细胞碱性磷酸酶含量 金氏单位 · 100 mL⁻¹

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
含药血清组	23.79 ± 0.11	25.21 ± 0.18	30.94 ± 0.72	34.12 ± 0.35	34.17 ± 0.31
空白血清组	19.26 ± 0.24	23.10 ± 0.19	24.39 ± 0.13	26.61 ± 0.20	31.43 ± 0.41

4 讨 论

活血化瘀药物能够加快微循环血流速度,增加毛细血管网的通透性,清除血凝块及代谢产物,为骨折愈合提供营养及清除代谢产物,同时还能够促进骨折断端成骨细胞的增殖和分化功能,从而加速骨折的愈合。张俐等^[3]通过实验发现,中药活血化瘀汤对成骨细胞的增殖与分化有明显的促进作用,且具有明显的剂量依赖性。

复元活血汤是李东恒依据活血化瘀法而拟定的。方中重用酒制大黄荡涤留瘀败血,引瘀血下行;柴胡疏肝理气,使气行血活;当归、桃仁、红花活血祛瘀,消肿止痛;穿山甲破瘀通络;天花粉祛瘀续伤,散结消肿;甘草缓急止痛,调和诸药。各药合用使瘀祛新生,气行络通。王英燕等^[4]的研究证明复元活血汤可促进大鼠骨折愈合,提高骨钙含量,并可降低血液黏度,改善血液循环。

成骨细胞主要是由内外骨膜和骨髓基质内的间充质始祖细胞分化而来^[5],能够合成、分泌碱性磷酸酶、胶原及糖蛋白,形成骨基质,调控破骨细胞性骨吸收的作用,维持骨的代谢平衡,分泌多种造血生长因子^[6-8]。其中碱性磷酸酶可作为成骨细胞的功能标记物。

分析本实验的测定结果:①成骨细胞增殖功能。重复测量资料的方差分析结果表明各指标值存在组别效应、时间效应、时间与组别的交互效应,说明复元活血汤能更好地促进成骨细胞增殖,而且该作用随着时间的变化更加明显。②成骨细胞分化功能。重复测量方差分析结果表明各指标值存在组别效应、时间效应、时间与组别的交互效应,说明复元活血汤能促进成骨细胞分化,且随时间变化该作用更明显。③成骨细胞矿化功能。经重复测量方差分析,含药血清组和空白血清组矿化结节计数差异无统计学意义,提示复元活血汤无明显的促成骨细胞矿化功能。另外,计数结果显示矿化结节数量普遍偏少,可能与细胞接种浓

度过高有关^[9]。④碱性磷酸酶含量。含药血清组碱性磷酸酶含量高于空白血清组,且该作用随时间变化更明显,表明复元活血汤能促进成骨细胞分泌碱性磷酸酶,且该作用随时间变化更明显。据此,我们得出结论:复元活血汤有明显的促成骨细胞增殖和分化的功能,其作用可能与成骨细胞合成和分泌碱性磷酸酶有关。

本实验结果是复元活血汤含药血清对体外培养成骨细胞的直接作用,但人体是一个复杂的机体,且骨代谢还受多种激素和因子的影响,因此复元活血汤对骨折断端成骨细胞功能的影响尚需大量的临床研究来证实。

5 参考文献

[1] Wen JM, Xu YP, Dong JW, et al. Effects on VEGF and VEGF mRNA expression in issues of callus in treating fracture of rabbit with three - period treatment theory of bone fracture in traditional Chinese medicine [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2007, 32(24) : 2640 - 2645.

[2] 胡静,郑洪新. 改良成骨细胞体外培养和鉴定方法[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1) : 76 - 78.

[3] 张俐,曾勤,李楠. 活血化瘀汤影响成骨细胞功能的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2004, 12(1) : 1 - 4.

[4] 王英燕,王海,栾丽,等. 复元活血汤对骨折大鼠血液流变学的影响[J]. 中医药信息, 2006, 23(1) : 51 - 52.

[5] 邓红文,刘耀中. 骨生物学前沿[M]. 北京:高等教育出版社, 2006: 14.

[6] 漆海如,黄永明,刘金文,等. 中医药对成骨细胞作用的研究进展[J]. 中医正骨, 2006, 18(1) : 66 - 67.

[7] 智伟,邓力,杨志明,等. 成骨细胞参与骨髓造血微环境的构建及发挥调控作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(5) : 517 - 522.

[8] 陈文明,岑建农,陈子兴. 成骨细胞在造血微环境中的作用[J]. 国际输血及血液学杂志, 2007, 30(4) : 354 - 357.

[9] 尹美珍,李世普,刘琴. 成骨细胞的数量对体外钙化结节形成的影响[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(2) : 257 - 258.