

• 基础研究 •

# 羟基红花黄色素 A 对激素诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

万甜<sup>1</sup>, 吴敏瑞<sup>1</sup>, 齐振熙<sup>2</sup>

(1.福建中医药大学骨伤学院,福建 福州 350122; 2.福建中医药大学中西医结合学院,福建 福州 350122)

**【摘要】 目的:**观察羟基红花黄色素 A(HSYA)对激素诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)内成骨标志物碱性磷酸酶、Cbf $\alpha$ 1 及 I 型胶原表达的影响,探讨其防治激素性股骨头缺血性坏死的作用机制。**方法:**健康成年新西兰大白兔 15 只,体重 0.9~1.3 kg,腹腔注射麻醉后,无菌条件下作胫骨和髂前上棘骨髓腔穿刺抽取骨髓血,分离出 BMSCs,体外培养并传代,取第 3 代生长状态良好的 BMSCs 随机分为空白组,模型组及羟基红花黄色素 A 低、中、高剂量组。模型组用大剂量地塞米松诱导 BMSCs 成脂分化,抑制其成骨分化;羟基红花黄色素 A 低、中、高剂量组加入地塞米松作用的同时给予羟基红花黄色素 A 干预;空白组无特殊处理。1 周后检测各组细胞内成骨标志物碱性磷酸酶活性、Cbf $\alpha$ 1 及 I 型胶原 mRNA 的表达。**结果:**模型组骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶活性较空白组明显下降 ( $P<0.01$ ),Cbf $\alpha$ 1 及 I 型胶原 mRNA 的表达也明显降低 ( $P<0.01$ ),而 HSYA 各组较模型组均有明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。**结论:**羟基红花黄色素 A 治疗激素性股骨头缺血性坏死的机制可能与对抗激素诱导下的 BMSCs 成骨分化减少有关。

**【关键词】** 股骨头坏死; 羟基红花黄色素 A; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2014.03.013

**Effect of Hydroxy Safflower Yellow A on Glucocorticoid-induced bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation** WAN Tian, WU Min-ru, and QI Zhen-xi\*. \*College of Integrative Medicine, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, Fujian, China

**ABSTRACT Objective:**To observe the effect of Hydroxy Safflower Yellow A (HSYA) on the expression of osteogenic markers, such as alkaline phosphatase, Cbf $\alpha$ 1 and type I collagen, and explore the mechanism of HSYA in the prevention and treatment of glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head. **Methods:**Fifteen healthy and adult New Zealand white rabbits were collected and weighted 0.9 to 1.3 kg. The rabbits were injected abdominally with anesthetic drugs, then received marrow cavity puncture of tibia and anterior superior iliac spine to get bone marrow blood. Rabbits bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were separated from the bone marrow blood, cultured in vitro and passaged. The 3rd generation of BMSCs which had good growth condition were randomly divided into blank group, model group and HSYA groups with different doses. The BMSCs in model group were treated with high dose of dexamethasone to induce adipogenic differentiation of cells cultured in vitro, and inhibit osteogenic differentiation. The BMSCs in HSYA groups received high dose of dexamethasone and different concentrations of HSYA simultaneously. The blank group received not any special handling. After a week, the expressions of alkaline phosphatase, Cbf $\alpha$ 1 and type I collagen mRNA were detected. **Results:**The alkaline phosphatase activity was significantly decreased in BMSCs of the model group as compared with the blank group ( $P<0.01$ ), and the expression of Cbf $\alpha$ 1 and type I collagen mRNA were also decreased significantly ( $P<0.01$ ). The alkaline phosphatase activity was significantly increased in BMSCs of each HSYA group as compared with the model group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and the expression of Cbf $\alpha$ 1 and type I collagen mRNA were also increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion:**The mechanism of HSYA may be related to the effect of antagonism to the reduced osteogenic differentiation induced by glucocorticoid.

**KEYWORDS** Femur head necrosis; Hydroxy Safflower Yellow A; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(3):224-228 www.zggszz.com

激素性股骨头缺血性坏死(steroid-induced avas-

cular necrosis of femoral head, SANFH)是临床上常见的骨科疾病,股骨头缺血性坏死后将发生骨坏死、新骨修复、塌陷、头变形、骨关节炎等一系列病理改变<sup>[1]</sup>。SARS 后,随着糖皮质激素的应用增多, SANFH 患者数量有逐年上升的趋势<sup>[2]</sup>。因此,探索防治 SANFH

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:465744)  
Fund program: Natural Science Foundation of China (No. 465744)  
通讯作者:齐振熙 E-mail:zxq@fjtc.edu.cn  
Corresponding author: QI Zhen-xi E-mail: zxq@fjtc.edu.cn

发生的相关机制,进一步提高本病的预防治疗水平具有重要的现实意义。近年来研究发现<sup>[3]</sup>大剂量激素可抑制骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)成骨分化,促进其成脂分化。已被用来解释激素性股骨头缺血性坏死的发病机制<sup>[4]</sup>。活血化癥中药可对抗激素的作用,对激素性股骨头缺血坏死早期有明显的防治作用<sup>[5]</sup>。红花是临床上治疗 SANFH 常用活血化癥方中的代表性药物。羟基红花黄色素 A(HSYA)是红花的药理功效的最有效水溶性成分<sup>[6]</sup>。本实验通过观察 HSYA 对激素诱导的 BMSCs 内成骨标志物碱性磷酸酶(ALP)活性、成骨分化特异性转录因子 Cbfa1 及 I 型胶原 mRNA 表达的影响,探讨其防治 SANFH 的作用机制,进而为临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 健康成年新西兰大白兔 15 只,雌雄不拘,体重(1.1±0.2) kg,由福建中医药大学实验动物中心提供,许可证编号:SYXK(闽)2005-0004。饲养环境维持室温 23~25℃,相对湿度 55%~60%,每小时换风 16 次,12 h 光照/12 h 黑暗自动控制循环光照的条件。

**1.2 药物制备** 羟基红花黄色素 A(上海源叶生物科技有限公司提供,批号:20120809,每支 20 mg,纯度≥98%)用 15 ml 胎牛血清完全稀释,过滤后用 15 ml 离心管密封,置于 4℃冰箱保存。

**1.3 试剂和仪器** 低糖 DMEM 培养基、胎牛血清及 0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA(美国 Hyclone 公司)。CD29-FITC 及 CD34-FITC(美国 BioLegend 公司)。地塞米松磷酸钠注射液(浙江仙居制药股份有限公司,批号:H3362062)。碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物公司,批号:20091108)。I 型胶原(Collagen-I)及 Cbfa1 逆转率试剂盒(美国 Genview 公司,批号:253072)。酶标仪(型号:ZS-3 板式,北京市新风机电技术公司);紫外分光光度计(Q-5000,Quwell 公司)。凝胶成像分析仪(WD-9413,北京市六一仪器厂)。电泳仪(DG-III,BIORAD 公司)。荧光定量 PCR 仪(ABI PRISM 7700,ABI 公司)普通 PCR 仪(9600,ABI 公司)。台式高速冷冻离心机(TGL-20M,长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

**1.4 兔 BMSCs 体外培养及传代** 每次选取 4 只新西兰大白兔,将氯胺酮(2 ml/支)和速眠新(1.5 ml/支)以 1:1 比例给予新西兰大白兔(0.4 ml/kg)腹腔注射麻醉后,采用 16 号骨髓穿刺针接 20 ml 注射器(内含 2 500 U/ml 的肝素钠 2 ml),无菌条件下作双侧胫骨上端内侧和髌前上棘骨髓腔穿刺抽取骨髓约 3 ml,将骨髓液与 PBS 缓冲液 1:1 稀释混匀,离心

5 min(100 r/min),弃上清,加入约 5 ml 含体积分数 15%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基制成单细胞悬液,移至 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,放入 37℃,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度条件下的培养箱中培养,3 d 后首次半量换液,以后每 3 d 全量换液 1 次。待原代细胞生长铺满至瓶底约 90%以上时,加入 0.25%的胰蛋白酶联合 0.02% EDTA 消化液 2 ml,静置 3~5 min。倒置显微镜观察,待细胞触角收缩变圆后,加入约 5 ml 含体积分数 15%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,用移液器轻轻吹打成细胞悬浮液。移入离心管,离心 5 min(1 000 r/min)。吸弃上清,加入 5 ml 含体积分数 15%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基吹打成细胞悬液,按 1:2 传代培养。

## 1.5 BMSCs 药物干预

**1.5.1 不同浓度 HSYA 制备** 用 15%胎牛血清的 DMEM 培养液配制不同浓度 HSYA 溶液,分别对细胞干预 48 h 后,置于酶标仪上进行 MTT 检测,计算不同浓度药物对细胞的促进率。结果表明 0.1 mg/ml HSYA 对 BMSCs 生长促进最明显。因此高剂量组 HSYA 浓度定为 0.2 mg/ml,中剂量组 HSYA 浓度为 0.1 mg/ml,低剂量组 HSYA 浓度为 0.05 mg/ml。

**1.5.2 分组及药物干预** 选取第 3 代生长状态良好的兔 BMSCs 用随机数字表法分为 HSYA 低、中、高剂量组、模型组和空白组。HSYA 各组分别加入含不同浓度 HSYA 的培养液,同时加地塞米松至终浓度 10<sup>-6</sup> mol/L;模型组加含 15%胎牛血清的 DMEM 培养液,同时加地塞米松至终浓度 10<sup>-6</sup> mol/L;空白组加含 15%胎牛血清的 DMEM 培养液,不加地塞米松。干预 1 周后检测成骨标志物。

## 1.6 观察项目与方法

**1.6.1 BMSCs 的形态学观察及鉴定** 在倒置显微镜下观察 BMSCs 原代和传代细胞的生长情况及形态特征,并适时拍照。选取第 3 代生长状态良好的兔 BMSCs,流式细胞仪检测细胞表面标记物。具体如下:取长满瓶底的第 3 代细胞,吸弃培养液,PBS 液冲洗 2 遍。每瓶加入 0.25%胰蛋白酶加 0.02% EDTA 联合消化液 2 ml,静置 3~5 min,显微镜下观察,至细胞变圆脱落后,用 5 ml 移液器轻轻吹打至细胞脱落。后置于离心机中离心 5 min(1 000 r/min)。PBS 液冲洗 2 遍,后加入 PBS 制成细胞悬液,取 10 μl 细胞悬液置于细胞计数板上计数,制成浓度 1×10<sup>6</sup>/ml 细胞悬液。每个试管取出 100 μl 细胞悬液分别加入 CD29、CD34 和同型阴性对照抗体。避光冰上孵育 45 min。用 PBS 洗涤细胞 3 次,用 500 μl PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 CD29、CD34 的阳性表达率。

**1.6.2 BMSCs 内碱性磷酸酶(ALP)测定** 5 组细胞

干预 1 周后, 每组取 8 个样本, 用 0.02% EDTA 及 0.25% 胰蛋白酶联合消化, 离心 10 min (1 000 r/min), 收集细胞, 反复冻融 3 次裂解, 离心 10 min (3 000 r/min)。收集上清液, 用碱性磷酸酶试剂盒在酶标仪上检测。

**1.6.3 Cbfa1 和 Collagen-I mRNA 表达水平的检测**

①总 RNA 提取: 5 组细胞干预 1 周后, 收集细胞, 加入 Trigol, 室温放置 5 min, 使其充分裂解。一步法提取总 RNA, 用微量紫外分光光度计 Q5000 测定其浓度与纯度,  $1.7 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ 。测定 RNA 完整性并拍照。

②反转录 (reverse transcription, RT): 用 DNase 处理提取的 RNA, 使用 TOYOBO 反转录试剂盒合成 cDNA, 完后放到 PCR 仪上进行反转录反应, 反应体系: 0.5 mM dNTPs 1  $\mu$ l, 5 $\times$ Buffer 4  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ M Oligo (dT) 18 1  $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l MMLV 逆转录酶 0.5  $\mu$ l, DNase 处理过的 RNA 5  $\mu$ l, DEPC 处理水补至 20  $\mu$ l。逆转录程序设定为: 42  $^{\circ}$ C 保温 60 min; 95  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 1~5 min。

③引物序列: 由 GenBank 数据库获得目的基因 mRNA 的全长序列, 利用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计引物序列。其中 Cbfa1 基因的 cDNA 序列为: 5' CCTATGACCAGTCTTACCCCTCCTAG3'; 5' GCAGTGTTCATCATCTGAAA-TACGC3', 长度为 142 bp; Collagen-I 基因的序列为: 5' AGCCTGAGCCAGCAGATTGA3'; 5' TCTTCC-AGTCAGAGTGGCACAT 3', 长度为 109 bp; 管家基因 GAPDH 的 cDNA 序列为: 5' GCGCCTGGT-CACCAGGGCTGCTT3'; 5' TGCCGAAGTGGTCGTG-GATGACCT 3', 长度为 461 bp, 均由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

④PCR 反应: 20 pmol/ $\mu$ l primer f (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l, 20 pmol/ $\mu$ l primer (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l, 2 $\times$ Mix (Taq 酶, Taq buffer, dNTPs) 12.5  $\mu$ l, Sybr Green I (10 $\times$ ) 1  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l, DEPC 处理水补至 25  $\mu$ l。PCR 扩增条件: Cbfa1: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环。Collagen-I: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 下储存。

⑤琼脂糖凝胶电泳: 配 2% 凝胶并制胶。胶凝固后, 取扩增产物 5  $\mu$ l, 加入 1  $\mu$ l 6 $\times$  Loading Buffer, 混匀后上样。同时取 5  $\mu$ l DNA Marker 上样。在 0.5 $\times$ TBE 的电泳液中, 以 5 V/cm 的电压电泳 30 min, 电泳结果在凝胶成像分析系统中分析基因条带的光密度值, 并求出与内参照基因 GAPDH 的光密度

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计

学意义。

## 2 结果

**2.1 BMSCs 形态观察及标志抗原的表达** 细胞接种于培养瓶后, 呈圆形, 大小不一, 悬浮于培养液中。24 h 后, 部分细胞开始贴壁, 呈圆形、梭形或多角形。换液后可见短梭形细胞分散生长。5~6 d 后细胞呈现出成纤维状或纺锤状, 贴壁生长, 增殖快。8~9 d 后细胞相互紧密贴附生长, 逐渐融合成片, 沿胞体长轴有序排列, 呈旋涡状。BMSC 经传代纯化, 至第 3 代 BMSCs 生长状态较好, 形态单一均匀, 融合后呈典型的极性。BMSC 后期生长也比较旺盛, 可连续传 7~10 代。选取第 3 代生长状态良好的兔 BMSCs, 采用流式细胞仪检测细胞标志抗原表达的阳性率。结果显示, 第 3 代兔 BMSCs CD29 阳性率为 99.6, CD34 阳性率为 1.48。

**2.2 BMSCs 内 ALP 活性检测结果** 各组细胞干预 1 周后, 模型组 BMSCs 内 ALP 活性较空白组明显下降, 而 HSYA 各组较模型组均有明显升高, 且随着剂量的加大, ALP 活性呈上升趋势。各组数据均符合正态性, 符合方差齐性, 用单因素方差分析, 结果为 ( $F=183.523, P=0.000$ )。与空白组比较, 模型组  $P=0.000$ ; 与模型组比较, HSYA 低、中、高剂量组分别为  $P=0.038, 0.009, 0.002$ 。见表 1。

**2.3 Cbfa1 和 Collagen-I mRNA 的表达结果** 各组细胞干预 1 周后, 以 GAPDH 为对照, 通过凝胶成像扫描系统做半定量分析, 计算 Cbfa1 与 GAPDH, Collagen-I 与 GAPDH 的吸光度比值, 并以此值分别作为 Cbfa1、Collagen-I 含量的相对值。结果显示: 模型组细胞内 Cbfa1 mRNA、Collagen-I mRNA 含量均明显低于空白组, 而 HSYA 各组 Cbfa1 mRNA、Collagen-I mRNA 含量均明显高于模型组, 且随着药量的增加细胞内 Cbfa1 mRNA、Collagen-I mRNA 含量呈上升趋势。各组数据均符合正态性, 符合方差齐性, 用单因素方差分析, Cbfa1 mRNA ( $F=36.457, P=0.000$ ), Collagen-I mRNA ( $F=21.357, P=0.000$ )。Cbfa1 mRNA 表达结果, 与空白组比较, 模型组  $P=0.000$ ; 与模型组比较, HSYA 低、中、高剂量组分别为  $P=0.021, 0.003, 0.000$ ; Collagen-I mRNA 表达结果, 与空白组比较, 模型组  $P=0.000$ ; 与模型组比较, HSYA 低、中、高剂量组分别为  $P=0.027, 0.012, 0.001$  (见表 1)。

## 3 讨论

MSCs 骨向分化能力及调控途径, 可以作为防治骨和关节疾病的中药新药的作用新靶点<sup>[7]</sup>。一些学者用实验证实中药防治 SANFH 的机制与对抗激素对 BMSCs 成骨分化的抑制, 促进其成骨分化有关<sup>[8]</sup>。

表 1 兔骨髓间充质干细胞内 ALP、Cbf $\alpha$ 1 mRNA 及 Collagen-I mRNA 表达结果( $\bar{x}\pm s$ )Tab.1 Expression of ALP, Cbf $\alpha$ 1 mRNA and Collagen-I mRNA in rabbits bone marrow mesenchymal stem cells( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	碱性磷酸酶(ALP)(U/L)	Cbf $\alpha$ 1 mRNA	Collagen-I mRNA
空白组	8	17.9594 $\pm$ 0.1279	0.8655 $\pm$ 0.0147	0.8126 $\pm$ 0.0463
模型组	8	8.3218 $\pm$ 0.6991 <sup>△</sup>	0.5252 $\pm$ 0.0237 <sup>△</sup>	0.4936 $\pm$ 0.0298 <sup>△</sup>
HSYA 低剂量组	8	11.1362 $\pm$ 0.3220*	0.7191 $\pm$ 0.0354*	0.6282 $\pm$ 0.0192*
HSYA 中剂量组	8	14.2764 $\pm$ 0.2720*	0.7923 $\pm$ 0.0135*	0.6546 $\pm$ 0.0256*
HSYA 高剂量组	8	17.0072 $\pm$ 0.1232*	0.8530 $\pm$ 0.0300*	0.7929 $\pm$ 0.0324*

注:ALP:组间总体比较, $F=183.523, P=0.000$ ;与空白组比较,模型组  $P=0.000$ ;与模型组比较,HSYA 低、中、高剂量组分别为  $P=0.038, 0.009, 0.002$ 。Cbf $\alpha$ 1 mRNA:组间总体比较, $F=36.457, P=0.000$ ;与空白组比较,模型组  $P=0.000$ ;与模型组比较,HSYA 低、中、高剂量组分别为  $P=0.021, 0.003, 0.000$ 。Collagen-I mRNA:组间总体比较, $F=21.357, P=0.000$ ;与空白组比较,模型组  $P=0.000$ ;与模型组比较,HSYA 低、中、高剂量组分别为  $P=0.027, 0.012, 0.001$

Note:ALP:compared among these groups, $F=183.523, P=0.000$ ;compared with blank group, $P=0.000$  in model group;compared with model group, $P=0.038, 0.009, 0.002$  in low, medium, high dose group respectively. Cbf $\alpha$ 1 mRNA:compared among these groups, $F=36.457, P=0.000$ ;compared with blank group, $P=0.000$  in model group;compared with model group, $P=0.021, 0.003, 0.000$  in low, medium, high dose group respectively. Collagen-I mRNA:compared among these groups, $F=21.357, P=0.000$ ;compared with blank group, $P=0.000$  in model group;compared with model group, $P=0.027, 0.012, 0.001$  in low, medium, high dose group respectively

核心结合因子  $\alpha$ 1 (core-binding factor alpha 1, Cbf $\alpha$ 1) 是脊椎动物成骨细胞分化的关键调节因子,调节所有关键成骨细胞基因的表达。Cbf $\alpha$ 1 还能控制分化的成骨细胞进一步成骨,控制分化成骨细胞的成骨速率。现已证明 Cbf $\alpha$ 1 是成骨细胞特异性表达的两个关键调控者之一,是最重要的一个成骨特异性基因,在成骨细胞系分化和成熟过程中起重要作用,对成骨细胞的分化和骨形成十分必要<sup>[9]</sup>。武密山等<sup>[10]</sup>发现,Cbf $\alpha$ 1 与骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程密切相关,Cbf $\alpha$ 1 mRNA 的表达始于成骨细胞诱导分化的早期,并持续表达于成骨分化全过程中。Harada 等<sup>[11]</sup>对 3 种亚型 Cbf $\alpha$ 1 功能进行研究,发现稳定转染 Cbf $\alpha$ 1 均可诱导或上调骨钙素、骨桥素和 I 型胶原 mRNA 的表达,与成骨细胞分化相关。Cbf $\alpha$ 1 在成骨细胞系中高表达,它除了能够结合骨钙素基因 2 于启动子区的成骨细胞顺时原件 2 并激活该基因的转录外,还能调节成骨细胞中多个基因<sup>[12]</sup>。碱性磷酸酶、I 型胶原是骨髓基质干细胞骨向分化常见的标志物。

目前,中药防治股骨头缺血性坏死越来越受到人们的重视,其中活血化瘀中药应用最多<sup>[13]</sup>。因为股骨头缺血性坏死的本质是股骨头失去了血运<sup>[14]</sup>,所以活血化瘀法作用显著。红花系菊科植物红花(Carthusmus tinctorius L)的干燥花,性温味辛,能活血通经、散瘀止痛,为活血化瘀代表药物。研究表明,红花提取物具有抗氧化、抑制血小板聚集,抑制血栓形成,延长凝血时间,改善血管供血不足等作用<sup>[15]</sup>。本研究选用的是活血化瘀中药红花的单体,也是其药理功效的最有效水溶性部位——羟基红花黄色素 A,离体条件下观察其对激素诱导的病理状态的

BMSCs 成骨分化的调控,阐明中医方药的效用机制。

本研究结果显示,大剂量激素( $1\times 10^{-6}$  mol/L)诱导 BMSCs 后,细胞内成骨标志物 ALP、Cbf $\alpha$ 1 及 Collagen-I mRNA 的表达明显降低。而中药各组在激素诱导的同时加入不同剂量羟基红花黄色素 A 干预后,ALP、Cbf $\alpha$ 1 及 Collagen-I mRNA 的表达较模型组均有明显升高。表明大剂量激素可显著抑制细胞内成骨标志物表达,而红花提取物可对抗激素对这种表达的抑制。提示红花提取物可从基因水平,有效增加成骨细胞分化的关键调节因子 Cbf $\alpha$ 1 表达,从而诱导或上调成骨细胞基因(骨钙素、骨桥素和 Collagen-I mRNA 等)的表达,达到抑制激素对 BMSCs 成骨分化的拮抗作用,并促进 BMSCs 的成骨分化。

#### 参考文献

- [1] 陈雷雷,何伟. 股骨头缺血性坏死相关生物力学研究进展[J]. 中国骨伤, 2011, 24(2): 174-177.  
Chen LL, He W. Advances in biomechanical studies on osteonecrosis of the femoral head[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(2): 174-177. Chinese with abstract in English.
- [2] 高曦,于雪峰. 骨蚀灵胶囊防治激素性股骨头缺血坏死的实验研究[J]. 中医药信息, 2006, 23(5): 73-74.  
Gao X, Yu XF. Experimental study of glucocorticoid induced necrosis of the femoral head for the treatment of Gushiling capsule[J]. Zhong Yi Yao Xin Xi, 2006, 23(5): 73-74.
- [3] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med Magwood, 2001, 226(6): 507-520.
- [4] 殷力,李月白,许建中,等. 地塞米松调节骨髓基质细胞成脂及成骨分化的组织化学研究[J]. 河南医学研究, 2000, 9(4): 311-312.  
Yin L, Li YB, Xu JZ, et al. An histochemical study of regulation of adipogenic and osteoblastic differentiation marrow stromal cells by dexamethasone[J]. He Nan Yi Xue Yan Jiu, 2000, 9(4): 311-312.

Chinese.

[5] 齐振熙,曹阳.不同治法防治激素性股骨头缺血性坏死的实验研究[J].中国骨伤,2002,15(2):77-78.  
Qi ZX,Cao Y. Comparative study of different methods for the treatment of glucocorticoid induced necrosis of the femoral head[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2002,15(2):77-78. Chinese.

[6] 金鸣,李金荣,吴伟.羟基红花黄色素 A 抗氧化作用的研究[J].中草药,2004,35(6):665-666.  
Jin M,Li JR,Wu W. Antioxidation study on Hydroxy Safflower Yellow A[J]. Zhong Cao Yao,2004,35(6):665-666. Chinese.

[7] 张林,康蓓蓓,李然,等.影响骨髓间充质干细胞骨向分化的方药研究思路探讨[J].中华中医药杂志,2012,27(8):2194.  
Zhang L,Kang BB,Li R,et al. Discussion of research ideas on the effects of Chinese medicine on the osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Zhonghua Zhong Yi Yao Za Zhi, 2012,27(8):2194. Chinese.

[8] 李树强,于涛,齐振熙.土鳖虫对激素诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].中国骨伤,2010,23(12):924.  
Li SQ,Yu T,Qi ZX. Influence of Ground Beetle on steroid-induced BMSCs osteogenic differentiation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2010,23(12):924. Chinese with abstract in English.

[9] Hoshi K,Komori T,Ozowa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice[J]. Bone,1999,25(6):639-651.

[10] 武密山,赵素芝,任立中,等.川续断皂苷 VI 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J].中国药理学通报,2012,28(2):225.  
Wu MS,Zhao SZ,Ren LZ,et al. Experimental study of akebia saponin D on the differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells to osteoblasts in vitro via induction[J]. Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao,2012,28(2):225. Chinese.

[11] Harada H,Tagashira S,Fhjiwara M,et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation[J]. J Biol Chem,1999,274(45):6972-6987.

[12] 王惠娟,董进.转化生长因子  $\beta$  对成骨细胞增殖、BMP-2 及 Cbfa1 基因表达的影响[J].中国当代医药,2011,18(22):23.  
Wang HJ,Dong J. Effect of transformation growth factor beta (TGF- $\beta$ ) on the proliferation, bone morphogenetic protein - 2 (BMP-2) and core binding factor al (Cbfa1) gene expression in cultured rat osteoblast[J]. Zhongguo Dang Dai Yi Yao,2011,18(22):23. Chinese.

[13] 何茂顺,江蓉星.活血化瘀中药治疗激素性股骨头坏死机制研究进展[J].实用中医药杂志,2011,27(1):66.  
He MS,Jiang RX. Research progress on the mechanism of glucocorticoid induced necrosis of the femoral head[J]. Shi Yong Zhong Yi Yao Za Zhi,2011,27(1):66. Chinese.

[14] 张功林,章鸣.吻合血管的腓骨移植治疗股骨头缺血性坏死进展[J].中国骨伤,2009,22(1):76-78.  
Zhang GL,Zhang M. Therapeutic progress of avascular osteonecrosis of the femoral head using a fibular graft by vascular anastomosis [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2009,22(1):76-78. Chinese with abstract in English.

[15] 乔逸,杨志福,奚苗苗,等.红花提取物、羟基红花黄色素 A 在血瘀大鼠体内的药动学特征[J].中国临床药理学杂志,2010,19(1):23.  
Qiao Y,Yang ZF,Xi MM,et al. Pharmacokinetic character of safflower yellow extraction and Hydroxy Safflower Yellow A in blood stasis rats[J]. Zhongguo Lin Chuang Yao Xue Za Zhi,2010,19(1):23. Chinese.

(收稿日期 2013-09-20 本文编辑:王玉蔓)

·读者·作者·编者·

### 《中国骨伤》杂志正式启用稿件远程处理系统通知

《中国骨伤》杂志已于 2010 年 1 月正式启用稿件远程处理系统。通过网站 <http://www.zggszz.com> 可实现不限时在线投稿、审稿、编辑、退修、查询等工作。本刊将不再接受纸质版和电子信箱的投稿。

欢迎广大的作者、读者和编者登录本刊网站,进入稿件处理系统进行网上投稿、审稿和稿件查询等工作。

咨询电话:010-84020925。

《中国骨伤》杂志社