

续断“发汗”前后水煎液及含药血清对人成骨样 MG-63 细胞、幼鼠成骨细胞增殖的影响

杨莹^{1,4}, 杜伟锋^{2*}, 康显杰¹, 来平凡¹, 屠珏³

1. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学 中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401

3. 浙江中医药大学 动物实验研究中心, 浙江 杭州 310053

4. 浙江中医药大学附属广兴医院, 浙江 杭州 310007

摘要:目的 探讨续断“发汗”前后水煎液及含药血清对人成骨样 MG-63 细胞、成骨细胞增殖的影响。方法 将人成骨样 MG-63 细胞、幼鼠成骨细胞分别与续断“发汗”前后水煎液及大鼠含药血清共同培养。MTT 法检测细胞增殖, 硝基苯磷酸盐法检测成骨细胞的碱性磷酸酶 (ALP) 活性。**结果** 续断水煎液和含药血清均能显著促进 MG-63 细胞和成骨细胞增殖 ($P < 0.01$), 并能显著提高成骨细胞的 ALP 活性 ($P < 0.01$), 且相同剂量未“发汗”组作用普遍优于或非劣于“发汗”组。**结论** 结合前期成分研究, 推断续断“发汗”前后成分的改变影响了其促进细胞增殖和分化的作用, 为其进一步研究奠定基础。

关键词: 续断; 发汗; MG-63 细胞; 成骨细胞; 细胞增殖; 碱性磷酸酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5594-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.017

Effect of decoction and drug-containing serum of sweated and crude *Radix Dipsaci* on proliferation of MG-63 cells and osteoblasts

YANG Ying^{1,4}, DU Wei-feng², KANG Xian-jie¹, LAI Ping-fan¹, TU Jue³

1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China

3. Animal Experimental Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

4. Guang Xing Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China

Abstract: Objective To investigate the effect of decoction and drug serum of sweated and crude *Dipsaci Radix* on the proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) and osteoblasts. **Methods** MG-63 cells and osteoblasts were co-cultured with decoction and rat serum containing *Dipsaci Radix* before and after “sweating”. The cell proliferation was detected by MTT method and the ALP activity of osteoblasts was detected by nitrophenyl phosphate method. **Results** Both decoction and drug-containing serum can significantly promote the proliferation of MG-63 cells and osteoblasts ($P < 0.01$), and significantly increase the ALP activity of osteoblasts ($P < 0.01$). Moreover, sweated group were generally better than or non-inferior to crude group at the same dose concentration of two administration methods. **Conclusion** Combined with component studies, it can be inferred that the changes in composition before and after “sweating” affect its role in promoting cell proliferation and differentiation, with view to laying the foundation for further research.

Key words: *Dipsaci Radix*; sweating; human osteoblast-like MG-63 cells; osteoblasts; cell proliferation; ALP

续断为川续断科多年生草本植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的根^[1], 道地产区主要分布在四川省攀枝花及西昌一带, 具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏的作用。续断传统的加工

收稿日期: 2018-03-08

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81303224); 浙江中医药大学科研基金项目-2018 国家自然科学基金预研项目 (2018ZG34); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (QNRC2-C12)

作者简介: 杨莹 (1993—), 女, 浙江杭州人, 硕士研究生, 从事中药资源开发利用及品质评价研究。E-mail: nazhidongxi@163.com

*通信作者: 杜伟锋 (1984—), 男, 河北任县人, 副研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。

Tel: (0571)87195895 E-mail: duweifeng_200158@sohu.com

采收方法为秋季采挖,除去根头和须根,用微火烘至半干,堆置“发汗”至内部变绿色时再烘干。“发汗”是部分根及根茎类、皮类等药材在干燥加工过程中采用的独特处理方法,既有利于药用部位内部水分向外分布,易于干燥,同时又调节和促进生物组织中的酶系统与微生物群落活力,启动或加速了初生/次生化学产物的生物转化与化学转化过程,直接影响着药材品质的形成^[2]。也有研究表明,续断“发汗”会使部分挥发油成分的含量降低^[3]。同时,“发汗”也会使某些药材的毒性增加^[4],造成二次污染。因此,续断“发汗”的合理性和必要性都尚无定论。

骨折是骨科临床最常见的疾病,骨折愈合是一个连续不断的过程,一面清除破坏,一面再生修复,其本质就是骨折断端发生的骨重建塑型过程^[3]。骨因具有处于矿化的细胞外基质及连续不断的塑建过程而区别于其他组织,而骨的塑建又是吸收和增殖并存的过程。骨的增殖及细胞外基质的产生都有赖于成骨细胞来完成,并且在与其他细胞的相互作用中,成骨细胞可能起着核心作用^[4]。相关研究发现续断“发汗”后川续断皂苷 VI 含量的改变可能与其增加骨密度作用有关^[5-8],这与中医临床应用续断补肝肾、强筋骨、续折断的主治和功能相吻合。本实验采用人成骨样 MG-63 细胞及大鼠成骨细胞,研究“发汗”对续断的主要功效“续折断”的影响,分别采用续断“发汗”前后水煎液及含药血清,研究其对 MG-63 细胞、大鼠成骨细胞增殖和分化的影响,为续断“发汗”的必要性提供理论依据。

1 材料

1.1 药材

续断样品采自四川西昌,经浙江中医药大学来平凡教授鉴定为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根。未发汗样品为续断经采集后于 80 ℃ 条件下烘干而成,发汗样品为续断采集后采用《中国药典》2015 年版方法经产地“发汗”加工而成。

1.2 动物和细胞

健康 8 周龄雄性 SD 大鼠由浙江中医药大学动物实验中心提供,体质量(200±20)g;新生 SD 大鼠,清洁级,浙江中医药大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(沪)2013-0016;MG-63 细胞为具有人成骨细胞表型特征的成骨细胞模型,购于中国科学院上海细胞所,自行传代培养,于-80 ℃ 冻存。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱(Thermofisher 公司);Nikon TS100 型倒置相差显微镜(Nikon 公司);ELX2800 型酶标测试仪(美国索林公司);恒温离心机(凯达科学仪器有限公司);Nikon 光学显微镜(Nikon 公司)。

1.4 试剂

DMEM 培养基(Gibico 公司);小牛血清(杭州四季青生物公司);去类固醇小牛血清(上海生物制品所,用 Gibico 的 NCS 处理制备);II 型胶原酶(Sigma 公司);胰蛋白酶(Sigma 公司);二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(Fluka 公司);对硝基苯磷酸二钠盐(PNPP, Merck 公司);十二烷基硫酸钠(SDS, Serva 公司);二乙醇胺(DEA, 上海化学试剂厂);茜素红(天津市化学试剂研究所);苯甲酸雌二醇(武汉大华伟业医药化工有限公司,批号 070910);四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒(Genview 公司);碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒(武汉明德生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 水煎液制备

将适量样品粉末(“发汗”品和未“发汗”品)加入 8 倍量蒸馏水,浸泡 2 h,提取 2 次,每次分别提取 1.5、1.0 h,滤过,弃去滤渣,合并滤液,浓缩,用蒸馏水定容,配制成质量浓度为 1 g/mL 的药液。用时分别用 DMEM 配成终质量浓度为 50、100、200 mg/mL 的溶液。阳性对照药苯甲酸雌二醇 12.5 μg/mL, 0.22 μm 的微孔滤膜滤过除菌,用 DMEM 配成终质量浓度为 0.625、1.250、2.500 μg/mL 的溶液,备用。

2.2 含药血清制备

2.2.1 水煎液制备 按照“2.1”项下方法制备续断“发汗”品和未“发汗”品水煎液,配制成质量浓度为 1、2 g/mL 的药液,待用。

2.2.2 含药血清的制备 取雄性 SD 大鼠 42 只,随机分为 7 组,每组 6 只,分别为对照组(生理盐水)、雌二醇高剂量(25 μg/mL)组、雌二醇低剂量(12.5 μg/mL)组、续断未“发汗”品高剂量(2 g/mL)组、续断未“发汗”品低剂量(1 g/mL)组、续断“发汗”品高剂量(2 g/mL)组、续断“发汗”品低剂量(1 g/mL)组。各组均 ig 给药,每次 2 mL,每日 2 次,连续 3 d。大鼠末次给药 1.5 h 后,按 40 mg/kg ip 苯巴比妥麻醉,在严格无菌条件下由腹主动脉取血。各组血液于 4 ℃ 条件下放置 2 h,以 3 000

r/min 离心 10 min 后取上清液, 56 °C 灭活, 滤过除菌后冷藏备用。根据预实验结果, 用时以 DMEM 稀释为体积分数 25%。

2.3 成骨细胞的培养

新生 (<24 h) SD 大鼠, 75%乙醇浸泡消毒 10 min, 无菌机械取下头盖骨, 置磷酸缓冲液 (PBS) 液内清除结缔组织后, 剪成 1 mm² 大小, 0.25%胰蛋白酶 37 °C 下预消化 20 min, 弃预消化液, 将骨片置于 0.1% II 型胶原酶中振荡消化 1 h×2 次, 合并 2 次消化液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 细胞沉淀用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基重悬, 吹打, 5%

CO₂ 培养箱、37 °C 下培养。24 h 后换液 1 次, 清除未贴壁细胞后, 2 d 换液 1 次。待细胞长至半汇合时用 0.25%胰蛋白酶消化传代, 取第 2 继代细胞供实验用。倒置显微镜每日观察细胞的生长情况及形态特征。

2.4 大鼠成骨细胞的鉴定

第 2 继代细胞接种于铺有玻片的 24 孔板内, 待细胞生长至汇合时取出玻片, PBS 清洗, 2.5%戊二醛固定 10 min, 用 ALP 染色试剂盒按操作步骤染色, 成骨细胞经 ALP 组化染色, 胞浆显示蓝色 ALP 阳性颗粒, 光镜下观察并拍照, 见图 1。

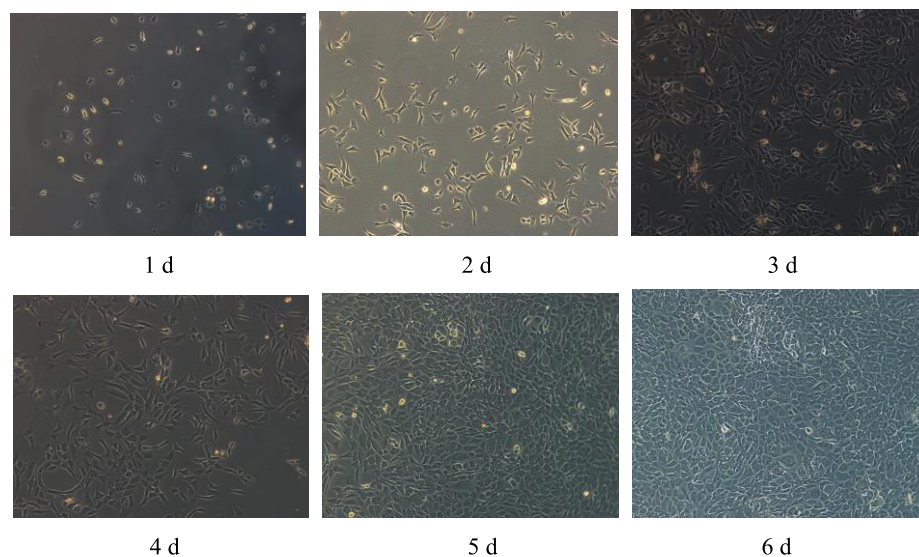


图 1 成骨细胞 ALP 染色 (×400)

Fig. 1 ALP staining of osteoblasts (×400)

2.5 MTT 法检测细胞增殖

大鼠成骨细胞和 MG-63 细胞以 1×10^5 /孔接种于 96 孔培养板中, 每板加细胞液 100 μL, 培养箱中放置 2 h, 分别加入续断水煎液、雌二醇及相应的含药血清, 每孔加药液 100 μL, 置于 5% CO₂ 培养箱、37 °C 下培养。44 h 后取出 96 孔培养板, 吸取细胞上清液 100 μL, 加入 20 μL 5 g/L 的 MTT 显色剂, 置于 5% CO₂ 培养箱、37 °C 下培养 4 h。4 h 后取出 96 孔培养板, 吸弃上清液, 用 100 μL DMSO 溶解, 振摇, 于酶标仪 490 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。

2.6 PNPP 法检测成骨细胞的 ALP 活性

成骨细胞以 1×10^5 /孔接种于 24 孔培养板中, 每板加细胞液 500 μL, 培养箱中放置 2 h, 分别加入续断水煎液、雌二醇及相应的含药血清, 每孔加药液 200 μL, 置于 5% CO₂ 培养箱、37 °C 下培养

72 h。72 h 后取出 24 孔板, 用 PNPP 法^[9]在酶标仪 420 nm 处测定 *A* 值, 比较药物对成骨细胞 ALP 活性的影响。

2.7 数据统计方法

数据用 SPSS 22.0 软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 *F* 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 续断“发汗”前后水煎液及含药血清对 MG-63、成骨细胞增殖的影响

3.1.1 对 MG-63 细胞增殖的影响 研究未“发汗”和“发汗”续断水煎液对 MG-63 细胞增殖的作用, 结果见表 1。药物对细胞作用 48 h 后, 与对照组比较, 雌二醇和续断水煎液均能显著促进 MG-63 细胞增殖 ($P < 0.01$)。与“发汗”续断水煎液的同一剂量比较, 未“发汗”续断水煎液更能促进 MG-63 细胞增殖, 中、高剂量组差异显著 ($P < 0.01$)。

研究未“发汗”和“发汗”续断含药血清对 MG-63 细胞增殖的作用,结果见表 2。药物对细胞作用 48 h 后,与对照组比较,雌二醇和续断含药血清均能显著促进 MG-63 细胞增殖 ($P<0.01$)。与“发汗”续断含药血清同一剂量比较,未“发汗”含药血清更能促进 MG-63 细胞增殖,高剂量组差异显著 ($P<0.05$)。

表 1 “发汗”前后续断水煎液对 MG-63 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of decoction of sweated and crude *Dipsaci Radix* on proliferation of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	0.413 ± 0.018
雌二醇	0.625	$0.629 \pm 0.045^{**}$
	1.250	$0.660 \pm 0.025^{**}$
	2.500	$0.693 \pm 0.041^{**}$
续断未“发汗”	5.0×10^4	$0.640 \pm 0.005^{**}$
	1.0×10^5	$0.721 \pm 0.041^{**}$
	2.0×10^5	$0.833 \pm 0.016^{**}$
续断“发汗”	5.0×10^4	$0.601 \pm 0.002^{**}$
	1.0×10^5	$0.635 \pm 0.003^{**\Delta\Delta}$
	2.0×10^5	$0.758 \pm 0.011^{**\Delta\Delta}$

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与同剂量的续断未“发汗”组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs same dose of crude *Dipsaci Radix* group

表 2 发汗前后“续断”含药血清对 MG-63 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of drug-containing serum of sweated and crude *Dipsaci Radix* on proliferation of MG-63 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	0.529 ± 0.021
雌二醇	12.5	$0.702 \pm 0.115^{**}$
	25.0	$0.999 \pm 0.114^{**}$
续断未“发汗”	1.0×10^6	$1.010 \pm 0.092^{**}$
	2.0×10^6	$1.047 \pm 0.081^{**}$
续断“发汗”	1.0×10^6	$0.991 \pm 0.089^{**}$
	2.0×10^6	$1.002 \pm 0.068^{**\Delta}$

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与同剂量的续断未“发汗”组比较: $\Delta P<0.05$

$^{**}P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs the same dose of crude *Dipsaci Radix* group

3.1.2 对成骨细胞增殖的影响 研究未“发汗”和“发汗”续断水煎液对成骨细胞增殖的作用,结果见表 3。在药物对细胞作用 48 h 后,与对照组比较,雌二醇和续断水煎液均能显著促进成骨细胞增殖

($P<0.01$)。与“发汗”续断水煎液的同一剂量比较,未“发汗”续断水煎液更能促进成骨细胞增殖,低、中剂量组差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。

研究未“发汗”和“发汗”续断含药血清对成骨细胞的增殖作用,结果见表 4。在药物对细胞作用 48 h 后,与对照组比较,雌二醇和续断含药血清均能显著促进成骨细胞增殖 ($P<0.01$)。与“发汗”续断含药血清同一剂量比较,未“发汗”续断含药血清促进成骨细胞增殖作用微弱,但没有明显差异。

表 3 续断“发汗”前后水煎液对成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of decoction of sweated and crude *Dipsaci Radix* on proliferation of osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	0.429 ± 0.022
雌二醇	0.625	$0.642 \pm 0.065^{**}$
	1.250	$0.657 \pm 0.028^{**}$
	2.500	$0.790 \pm 0.038^{**}$
续断未“发汗”	5.0×10^4	$0.654 \pm 0.022^{**}$
	1.0×10^5	$0.741 \pm 0.020^{**}$
	2.0×10^5	$0.810 \pm 0.019^{**}$
续断“发汗”	5.0×10^4	$0.614 \pm 0.025^{**\Delta}$
	1.0×10^5	$0.641 \pm 0.019^{**\Delta\Delta}$
	2.0×10^5	$0.775 \pm 0.046^{**}$

与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与同剂量的续断未“发汗”组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$, 下同

$^{**}P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs same dose of crude *Dipsaci Radix* group, same as below

表 4 续断“发汗”前后含药血清对成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of drug-containing serum of sweated and crude *Dipsaci Radix* on proliferation of osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	0.527 ± 0.012
雌二醇	12.5	$0.735 \pm 0.049^{**}$
	25.0	$0.950 \pm 0.075^{**}$
续断未“发汗”	1.0×10^6	$0.996 \pm 0.081^{**}$
	2.0×10^6	$1.040 \pm 0.093^{**}$
续断“发汗”	1.0×10^6	$0.984 \pm 0.098^{**}$
	2.0×10^6	$1.022 \pm 0.068^{**}$

3.2 续断“发汗”前后水煎液及含药血清对成骨细胞 ALP 活性的影响

由表 5 可知,与对照组比较,雌二醇和续断水煎液均能显著提高成骨细胞 ALP 活性 ($P<0.01$)。

与“发汗”续断水煎液的同一剂量比较,未“发汗”续断水煎液更能提高成骨细胞 ALP 活性,其中低剂量组差异显著 ($P<0.01$)。

由表 6 可知,与对照组比较,雌二醇和续断含药血清均能显著提高成骨细胞 ALP 活性 ($P<0.01$)。与“发汗”续断含药血清同一剂量比较,未“发汗”续断含药血清能显著提高成骨细胞 ALP 活性 ($P<0.05$)。

表 5 续断发汗前后水煎液对成骨细胞 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of sweated and crude *Dipsaci Radix* decoction on ALP activity of osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	2.425 ± 0.134
雌二醇	0.625	$3.447 \pm 0.159^{**}$
	1.250	$3.953 \pm 0.116^{**}$
	2.500	$4.398 \pm 0.134^{**}$
续断未“发汗”	5.0×10^4	$3.880 \pm 0.134^{**}$
	1.0×10^5	$4.194 \pm 0.141^{**}$
	2.0×10^5	$4.342 \pm 0.142^{**}$
续断“发汗”	5.0×10^4	$3.695 \pm 0.113^{**\Delta\Delta}$
	1.0×10^5	$4.077 \pm 0.115^{**}$
	2.0×10^5	$4.205 \pm 0.182^{**}$

表 6 续断发汗前后含药血清对成骨细胞 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of drug-containing serum of sweated and crude *Dipsaci Radix* on ALP activity of osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	3.218 ± 0.062
雌二醇	12.5	$3.765 \pm 0.169^{**}$
	25.0	$4.492 \pm 0.208^{**}$
续断未“发汗”	1.0×10^6	$3.952 \pm 0.100^{**}$
	2.0×10^6	$4.519 \pm 0.124^{**}$
续断“发汗”	1.0×10^6	$3.835 \pm 0.079^{**\Delta}$
	2.0×10^6	$4.371 \pm 0.100^{**\Delta}$

4 结论

骨折的愈合是一个复杂的生理程序,成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,它在骨形成过程中要经历细胞增殖、细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和细胞凋亡 4 个阶段^[10]。其主要功能是主导骨基质的合成、分泌和矿化过程,在影响生理条件下骨组织

的生长与代谢外,还影响损伤状态下骨组织的修复重建^[11]。ALP 是成骨细胞分泌的一种酶蛋白,特异性很高,为成骨细胞分化成熟的重要标志之一,也是最常见的评价骨形成和骨转换的指标,是反映成骨细胞活动强弱的重要标志^[12-14]。ALP 的表达代表骨的形成状况,表明细胞分化和骨组织形成的开始,其活性增强提示成骨细胞的高分化状态。因此 ALP 是成骨细胞生长和发育早期的重要标志,同时是成骨细胞功能状态的体现,随着成骨细胞的分化和增值,其成骨相关的功能也能随之表达^[11]。

本实验除评价了续断提取液对人成骨样 MG-63 细胞、成骨细胞的影响外,还评价了续断提取液含药血清的作用,在一定程度上克服了中药本身理化性质等不确定因素对实验结果的干扰,相对接近药物在体内生物转化的真实过程,揭示了续断在体内代谢过程中的转化和转变,有助于后续探索其有效部位、活性成分、药效和作用机制^[15]。

由实验结果可知,未“发汗”和“发汗”续断水煎液及含药血清均有促进 MG-63 细胞、成骨细胞增殖作用,提高成骨细胞 ALP 活性,且未“发汗”续断效果普遍优于或非劣于发汗续断。结合前期成分研究,续断经“发汗”后,主要成分川续断皂苷 VI 的量显著降低^[5-7],而该成分是续断促进细胞增殖和分化的主要活性成分之一,对于川续断皂苷 VI 的研究尚不够深入,目前仅有报道其成骨效应与 BMP2/P38 以及 ERK1/2 信号通路有关^[16]。由此推断,续断经产地加工“发汗”后,其成分的改变影响了其促进细胞增殖和分化的作用,但具体的作用机制还需进行进一步的分子机制研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 段金彪,宿树兰,严辉,等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1219-1225.
- [3] 张葆鑫,王兴国,郝廷. 成骨细胞、破骨细胞与骨折愈合的相关性研究进展 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(17): 161-164.
- [4] 姚振强,曾才铭. 成骨细胞的特性及起源综述 [J]. 中国修复重建外科杂志, 1996, 10(4): 22-25.
- [5] 王初. 发汗与不发汗续断中水溶性浸出物和川续断皂苷 VI 的比较 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 865-866.
- [6] 杨中林,刘双跃,秦民坚. 不同加工方法对续断中 Akebia Saponin D 含量变化的影响 [J]. 中医药信息, 2000(1): 16-17.

- [7] 汪 霞. 发汗与不发汗续断的比较研究 [J]. 浙江中医杂志, 2011, 46(4): 292-293.
- [8] 纪顺心, 吴雪琴, 李崇芳. 中药续断对大鼠实验性骨折损伤愈合作用的观察 [J]. 中草药, 1997, 28(2): 98-99.
- [9] 安亚兰, 王建舫, 许水明, 等. 补骨脂水提液及补骨脂素对体外培养成骨细胞的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(2): 266-271.
- [10] 童安莉, 陈璐璐, 丁桂芝. 成骨细胞骨形成机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5(3): 60.
- [11] 陆 倩, 刘 铁. 中药对成骨细胞分化增殖和功能表达影响的研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(5): 609-612.
- [12] Lian J B, Gundberg C M. Osteocalcin: Biochemical consideration and clinical application [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1988, doi: 10.1007/BF00381069.
- [13] Scutt A, Bertram P, Bräutigam M. The role of glucocorticoids and prostaglandin E2, in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage: Positive and negative effects [J]. *Calc Tissue Inter*, 1996, 59(3): 154-162.
- [14] 王 雨. 续断对体外培养成骨细胞增殖与分化作用的实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- [15] 林海鸣, 吴银生, 林 燕. 中药含药血清对体外成骨细胞增殖和分化影响的实验研究进展 [J]. 四川解剖学杂志, 2011, 19(3): 27-29.
- [16] 柯 可. 淫羊藿苷、柚皮苷及川续断皂苷 VI 体外促成骨效应的比较研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.