

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.004

淫羊藿苷对大鼠正畸牙齿压力区牙周组织 RANKL 和 Wnt3a 表达的影响*

韩 博 王兰珠 刘遼仲 于淑婷 张苗苗[△]

(哈尔滨医科大学口腔医学院正畸科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察不同剂量的淫羊藿苷对大鼠正畸牙齿移动时压力区牙周组织中 RANKL 和 Wnt3a 表达的影响。**方法:**将 24 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,根据淫羊藿苷灌胃的剂量分为生理盐水组(对照组)、1 mg/kg 淫羊藿苷组、3 mg/kg 淫羊藿苷组、5 mg/kg 淫羊藿苷组(实验组),使用 50 g 力近中移动左侧上颌第一磨牙。通过免疫组化方法检测压力区牙周组织中 RANKL 和 Wnt3a 蛋白的表达。**结果:**生理盐水组上颌第一磨牙压力区牙根和牙槽骨表面粗糙,牙周膜间隙变窄,可见骨吸收陷窝和破骨细胞,不同剂量淫羊藿苷组牙周膜间隙趋于恢复正常,骨吸收陷窝出现明显减少。RANKL 和 Wnt3a 在生理盐水组和淫羊藿苷组的压力区牙周组织中都有表达。与生理盐水组比较,不同剂量淫羊藿苷组压力区牙周组织中 RANKL 的表达均显著降低,Wnt3a 的表达均明显增加,且 RANKL 的表达随淫羊藿苷剂量的增加而逐渐减少($P < 0.05$),Wnt3a 的表达随淫羊藿苷剂量的增加明显增加($P < 0.05$)。**结论:**不同剂量淫羊藿苷能减少正畸时牙齿移动过程中压力区牙周组织中 RANKL 的表达,增加 Wnt3a 的表达,且作用与其剂量具有一定的相关性。

关键词:RANKL; Wnt3a; 淫羊藿苷; 牙周组织

中图分类号:R-33; R783.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)18-3419-05

The Effect of Icaritin on the Expression of RANKL and Wnt3a in the Pressure Zone of Periodontal Tissue During Orthodontic Tooth Movement*

HAN Bo, WANG Lan-zhu, LIU Kui-zhong, YU Shu-ting, ZHANG Miao-miao[△]

(Department of Orthodontics, College of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of different dosage of icaritin on the RANKL and Wnt3a expressions in the pressure side of periodontal tissue during orthodontic tooth movement (OTM). **Methods:** Twenty four male SD rats were randomly divided into four groups according to the different dosage of icaritin as follows: physiological saline group (control group); 1 mg/kg icaritin group; 3 mg/kg icaritin group; 5 mg/kg icaritin group (experience group). 50 g force was used to move the left maxillary first molar. Immunohistochemical staining technology was used to detect the expression of RANKL and Wnt3a in the pressure side of periodontal tissue. **Results:** Rats in the physiological saline group showed crude surfaces of the root of tooth and alveolar bone at the pressure area of the maxillary first molar and narrowed space of the periodontium, and bone resorption pits and osteoclasts could be observed. Rats in various dosage of icaritin group displayed that the space of the periodontium tended to recover normally, and significantly reduced bone resorption pits could be noted. RANKL and Wnt3a expressed on both the physiological saline and icaritin groups in the pressure zone of periodontal tissue. Compared with the saline group, the expression of RANKL was significantly decreased in the pressure side of periodontal tissue in the different dosage of icaritin groups, and the expression of Wnt3a were significantly increased. Furthermore, the expression of RANKL was decreased gradually with the increase of dosage ($P < 0.05$). And the expression of Wnt3a was increased gradually with the increase of dosage ($P < 0.05$). **Conclusions:** Different dosage of icaritin could reduce the expressions of RANKL and increase the expression of Wnt3a in the periodontal tissue remodeling during OTM, and its effect has certain correlation with its dosage.

Key words: RANKL; Wnt3a; Icaritin; Periodontal tissue

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R783.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2017)18-3419-05

前言

正畸牙齿移动的核心是在合适的矫治力刺激下牙周组织吸收和新生的动态平衡,即牙周组织的改建^[1]。影响牙周组织改建的因素主要包括细胞因子、物理疗法、西药及中草药等^[2]。淫

羊藿苷是中药制剂淫羊藿的重要成分之一,具有增加免疫功能、抗衰老等功效^[3],也可促使成骨细胞数量增加,具有成骨作用,因此被普遍应用于骨质疏松的治疗^[3-5]。研究表明淫羊藿苷能够促使牙周膜内的成骨细胞分化,并对破骨细胞的数量和功能存在抑制作用^[6-8],能减少大鼠快速扩弓时牙根压力区破骨细

* 基金项目:黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q11033)

作者简介:韩博(1989-),男,硕士研究生,主要从事口腔正畸临床工作,电话:13804609841, E-mail: 971288579@qq.com

△ 通讯作者:张苗苗(1964-),女,硕士生导师,教授,主要研究方向:正畸学, E-mail: zhangmiaohlj@163.com

(收稿日期:2017-01-10 接受日期:2017-01-25)

胞数量^[9]。RANKL 是影响破骨细胞形成的重要因子,能够促进破骨细胞的生成和活化,并抑制成骨细胞的细胞增殖^[10,11]。淫羊藿苷能够影响 RANKL 的表达,减少破骨细胞数量同时降低骨吸收^[7,12]。我们前期的实验发现 RANKL 在正畸牙齿移动不同时期的表达发生了变化,证明该蛋白参与组织改建,并在其中发挥着关键作用^[13]。Wnt3a 作为经典 Wnt 蛋白的一种重要亚型,可以诱导成骨细胞分化,同时对破骨细胞有抑制作用^[14]。淫羊藿苷可以通过激活 Wnt/ β -catenin-BMP 信号通路使 Wnt3a 的表达增加^[15]。目前,中草药影响正畸牙齿移动的机制尚不清楚,关于淫羊藿苷剂量是否调控正畸过程中的牙周组织改建也鲜有报道。因此,本研究建立了大鼠正畸牙齿移动模型,探讨不同剂量的淫羊藿苷对大鼠正畸牙齿移动时牙齿周围组织中 RANKL 和 Wnt3a 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

24 只 7 周健康雄性 SD 大鼠,体重 200 ± 20 g。适应性喂养 1 周,随机分为 4 组,每组 6 只,分别为:生理盐水组(对照组)和 1 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg 淫羊藿苷组(实验组)。本实验得到哈尔滨医科大学伦理委员会审核批准。按 3.3 mL/kg 浓度的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠。将镍钛拉簧的两端使用正畸结扎丝结扎在左侧上颌第一磨牙和上颌切牙的颈部,对左上第一磨牙施 50 g 的近中牵引力,使磨牙近中移动建立正畸牙移动模型。在大鼠上颌切牙颈部制备 0.5~1.0 mm 深的固位槽沟,利用树脂对切牙处的结扎丝进行固位,防止脱落。自加力装置放置第一天起使用不同剂量的淫羊藿苷灌胃,对照组灌同等体积的生理盐水,持续时间为 14 d。每天检查加力装置两次,如有加力装置脱落立即重新放置。

1.2 标本的制备

在建模 14 d 后处死实验动物,取下加力装置。制取上颌第一磨牙及周围组织标本块,经 4%多聚甲醛固定,然后脱钙 6 周左右,最后以腭侧为包埋面进行包埋。沿牙体长轴方向制备上颌第一磨牙近远中方向的连续切片(1~5 μ m),分别用于 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.3 免疫组织化学染色及光密度值测量

标本经 PBS 冲洗 3 次,然后置于二甲苯、梯度乙醇中脱蜡、脱水,抗原修复,血清封闭,敷 RANKL、Wnt3a 兔抗鼠多克隆抗体,最后 DAB 显色盒显色,苏木素复染,脱水透明,中性树脂封片。显微镜下随机选取每张切片中第一磨牙近中根近中(压力区)牙周膜的 3 个高倍镜视野,经摄像后储存于 Image-ProPlus6.0 图像分析软件(Media Cybernetics,美国),计算各种标本阳性染色区域的平均光密度值 (Mean Optical Density, MOD)。

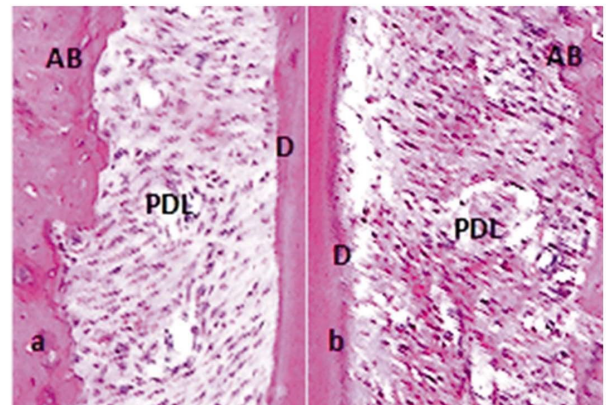
1.4 统计学分析

实验数据全部采集后使用 SPSS17.0 软件,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿苷对牙槽骨和牙周组织形态的影响

光镜下,对照组上颌第一磨牙压力区牙根和牙槽骨表面粗糙,牙周膜间隙变窄,可见骨吸收陷窝和破骨细胞。实验组牙周膜间隙趋于恢复正常,骨吸收陷窝出现明显减少(图 1)。



a: 对照组 b: 5 mg/kg 组

a: control group b: 5 mg/kg group

PDL: 牙周膜, AB: 牙槽骨, D: 牙根。

PDL: periodontal ligament; AB: alveolar bone; D: dentin.

图 1 生理盐水组和 5 mg/kg 淫羊藿苷组牙周组织变化 (HE 染色 $\times 50$)。

Fig. 1 The changes of periodontal tissue in physiological saline group and 5 mg/kg icariin groups (HE staining $\times 50$).

2.2 淫羊藿苷对压力区牙周组织 RANKL 表达的影响

RANKL 免疫组化染色结果显示:RANKL 阳性信号为黄色或棕黄色,RANKL 在对照组和实验组压力区牙周组织中均呈阳性表达(图 2)。不同剂量淫羊藿苷组压力区牙周组织 RANKL 的表达均显著低于对照组,且 RANKL 的表达随淫羊藿苷剂量的增加而减少($P < 0.05$),见图 2。

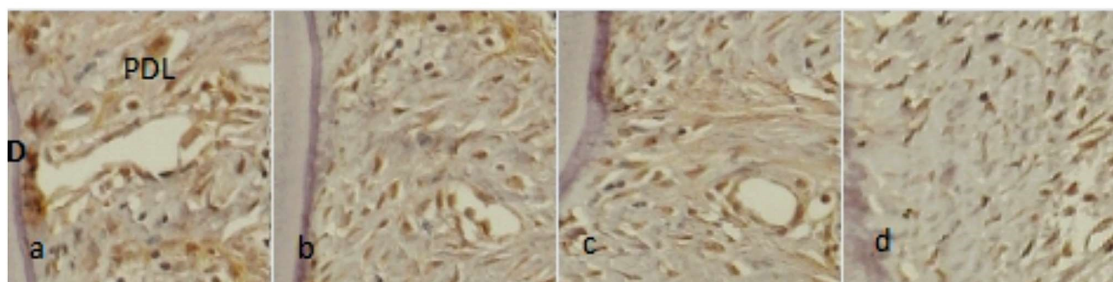
2.3 淫羊藿苷对压力区牙周组织 Wnt3a 表达的影响

Wnt3a 免疫组化染色结果:Wnt3a 阳性信号为黄色或棕黄色,Wnt3a 在对照组和实验组压力区牙周组织中均呈阳性表达(图 2)。不同剂量淫羊藿苷组压力区牙周组织 Wnt3a 的表达均显著高于对照组,且 Wnt3a 的表达随淫羊藿苷剂量的增加而增加($P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

正畸牙齿移动是将矫治力通过矫治牙转移到其周围的牙周支持组织中,使牙槽骨、牙周膜、牙龈等发生改建进而实现牙齿位置的改变^[1]。影响牙周组织改建的信号通路有很多,例如 OPG/RANKL、Wnt/ β -catenin 及 MAPK 信号通路等。核因子- κ B 受体活化因子配基 RANKL 具有可以推动破骨细胞的生成和活化的功能。Che W 等学者通过体外实验证明 RANKL 可以通过调控人类成骨细胞系 hFOB1.19 中相应细胞的因子的表达抑制成骨细胞的增殖^[11]。马永平^[16]等对不同时期的牙周组织进行检查,结果显示在矫治治疗过程中 RANKL 的 mRNA 的表达水平与破骨细胞数量的变化规律相符。我们的前期实验结果显示 RANKL 在大鼠未加力及正畸力作用下的牙周组织中均有表达,且与加力时间相关^[13]。在本研究中,RANKL 在正畸力作用下的实验组与对照组中均有表达,与以往的研究相一致,

A.



a: 对照组 b: 1 mg/kg 组 c: 3 mg/kg 组 d: 5 mg/kg 组

a: control group b: 1 mg/kg group c: 3 mg/kg group d: 5 mg/kg group

D: 牙根 PDL: 牙周组织

D: dentin PDL: Periodontal tissue

图 A RANKL 在牙周组织中的表达(免疫组化 × 100)

Fig. A The expression of RANKL in the PDL(immunohistochemistry × 100)

B.

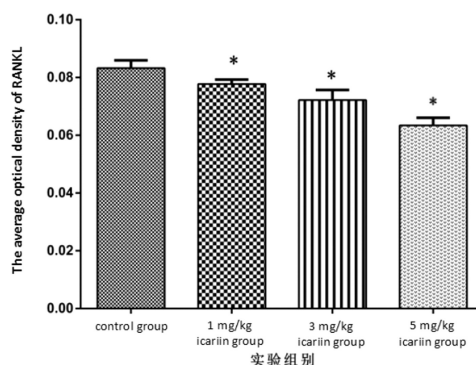


图 B RANKL 在不同剂量组平均光密度

Fig. B The average optical density of RANKL in different dosage groups

图 2 不同剂量淫羊藿苷对压力区牙周组织 RANKL 表达的影响(A.免疫组化 × 100; B.平均光密度)

Fig. 2 Effect of different dosage of icariin on the expression of RANKL in the PDL(immunohistochemistry × 100; B. average optical density)

注:不同浓度组与对照组相比,*P < 0.05(有统计学意义)

Note: compared with the control group,*P < 0.05

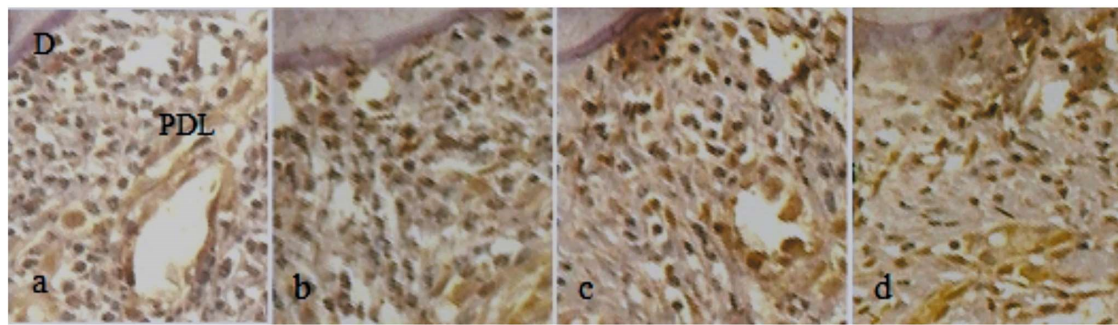
表明 RANKL 参与正畸牙周组织的改建。

经典 Wnt/β-catenin 信号通路能够调控牙周膜细胞分化和功能以及牙周膜和牙槽骨的生理代谢活动^[17-20]。我们以往的研究显示 Wnt3a 在正畸加力过程中的表达受加力时间不同的影响,并调节牙周组织的改建^[21]。研究表明 Wnt3a 作为经典 Wnt 蛋白中的一种重要亚型,具有和细胞膜受体结合并激活该通路的作用,能够促进成骨细胞分化,同时刺激 cAMP/PKA 通路,使破骨细胞的分化减少^[14]。在本研究中,实验组与对照组的压力侧牙周组织中 Wnt3a 均呈阳性表达,提示 Wnt3a 对牙齿周围组织的改建存在影响。

研究表明某些蛋白、细胞因子及药物能改变牙齿移动速率,加速或减缓牙周组织改建,其中包括中草药制剂如淫羊藿苷^[22]。以往的研究显示淫羊藿苷对骨质疏松具有很好的疗效^[23]。研究显示即使是低剂量的淫羊藿苷也能够增加成骨细胞的增殖和分化,同时可以降低破骨细胞分化、运动性和骨吸收活性^[7,24]。有报道指出在牙及其周围软硬组织的体内实验和体外实

验中,淫羊藿苷都表现出能够影响牙周组织生理代谢的作用^[8,9,25]。王峰^[9]等人将使用淫羊藿苷的正畸大鼠快速扩弓模型与未使用淫羊藿苷的模型进行对比,实验结果显示应用淫羊藿苷的实验组破骨细胞的数量减少并且活性降低。Hsieh^[25]的实验结果指出淫羊藿苷能够刺激 BMP-2 与 NO(一氧化氮)相结合,继而调控 RANKL、Cbfal/Runx2、OPG 的基因表达,使 RANKL 的表达减少。在本实验中,与对照组对比,实验组 RANKL 的表达降低,且随着淫羊藿苷药剂量的增加,RANKL 的表达逐渐减少,在药物剂量为 5 mg/kg 时达到最小值,提示淫羊藿苷对牙槽骨和牙周组织形态的影响可能与 RANKL 的表达降低有关,并且随剂量的增加抑制破骨细胞分化。秦子顺^[8]通过体内实验和体外实验的研究发现淫羊藿苷具有有效促进人牙周膜干细胞增殖同时促进成骨细胞分化的作用。淫羊藿苷能够使与成骨相关的 Runx2 基因的表达增加,刺激成骨,在进行成骨诱导培养实验时,淫羊藿苷能明显增加钙结节沉积同时促进骨小梁的生成^[9]。Li^[15]的实验显示应用淫羊藿苷能够增加 OPG 基因敲除

A.



a: 对照组 b: 1 mg/kg 组 c: 3 mg/kg 组 d: 5 mg/kg 组

a: control group b: 1 mg/kg group c: 3 mg/kg group d: 5 mg/kg group

D: 牙根 PDL: 牙周组织

D: dentin PDL: Periodontal tissue

图 A Wnt3a 在牙周组织中的表达(免疫组化 × 100)

Fig. A The expression of Wnt3a in the PDL(immunohistochemistry × 100)

B.

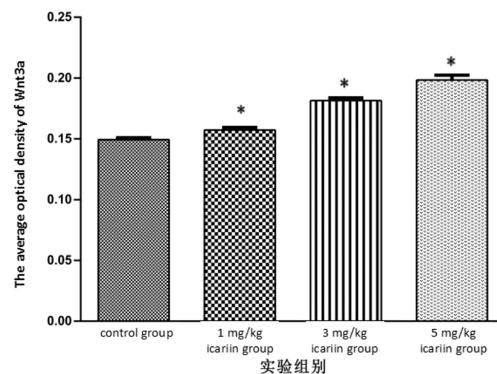


图 B Wnt3a 在不同剂量组平均光密度

Fig. B The average optical density of Wnt3a in different dosage groups

图 3 不同剂量淫羊藿苷对压力区牙周组织 Wnt3a 表达的影响(A.免疫组化 × 100; B.平均光密度)

Fig. 3 Effect of different dosage of icariin on the expression of Wnt3a in the PDL(immunohistochemistry × 100; B. average optical density)

注:不同浓度组与对照组相比,*P < 0.05(有统计学意义)。

Note: compared with the negative group,*P < 0.05.

大鼠的 Wnt3a 蛋白表达。在本实验中,不同剂量淫羊藿苷压力区牙周组织 Wnt3a 表达均较对照组显著增加,且 Wnt3a 表达随着淫羊藿苷剂量的增加而增加,提示淫羊藿苷与正畸力作用下的成骨效应有关,并且随剂量的增加刺激成骨细胞分化并对成骨的促进作用增加。

总之,本研究结果表明随淫羊藿苷剂量增加,压力区牙周组织 Wnt3a 表达逐渐增加,RANKL 表达逐渐降低,淫羊藿苷的剂量对正畸力作用下的牙周组织改建可能具有的重要作用,淫羊藿苷对牙周组织改建影响的确切机制还需进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt [J]. European Journal of Orthodontics, 2006, 28(3): 221-240
- [2] 陈雅竹,管晓燕,肖菡文,等. 中草药在正畸牙移动牙周组织改建中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2014, (46): 7477-7481

Chen Ya-zhu, Guan Xiao-yan, Xiao Qian-wen, et al. The function of Chinese herbal medicine in the reconstruction of periodontal tissue during orthodontic tooth movement [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, (46): 7477-7481

- [3] 刘奕,王峰,温宁. 淫羊藿苷对硬组织代谢影响的研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2014, (6): 365-369
- [4] 鲍远,黄俊明,靖兴志,等. 淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3501-3507
- [5] 刘广飞,程才,王璐,等. 淫羊藿苷治疗骨质疏松的研究进展 [J]. 现

- 代生物医学进展, 2015, 15(26): 5185-5188
- Liu Guang-fei, Cheng Cai, Wang Lu, et al. Advances in the Treatment of Osteoporosis Icarin[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15 (26): 5185-5188
- [6] Song Li-ge, Zhao Jia-shen, Zhang Xiu-zhen, et al. Icarin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation [J]. European Journal of Pharmacology, 2013, 714(1-3): 15
- [7] Huang J, Yuan L, Wang X, et al. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity in vitro[J]. Life Sciences, 2007, 81(10): 832-840
- [8] 秦子顺, 殷丽华, 王开娟, 等. 淫羊藿苷促进人牙周膜干细胞增殖及骨向分化的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(4): 370-376
- Qin Zi-shun, Yin Li-hua, Wang Kai-juan, et al. Effects of Icarin promotion on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. West China Journal of Stomatology, 2015, 33(4): 370-376
- [9] 王峰, 刘志峰, 刘奕, 等. 淫羊藿苷对大鼠快速扩弓所致牙根吸收的抑制作用[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, (7): 404-407
- Wang Feng, Liu Zhi-feng, Liu Yi, et al. The inhibitory effect of icaritin on root resorption induced by rapid palatal expansion [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2015, (7): 404-407
- [10] Zhang L, Liu W, Zhao J, et al. Mechanical stress regulates osteogenic differentiation and RANKL/OPG ratio in periodontal ligament stem cells by the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2016, 1860(10): 2211-2219
- [11] Che W, Dong Y, Quan HB. RANKL inhibits cell proliferation by regulating MALAT1 expression in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19 [J]. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 2015, 61(1): 7-14
- [12] Chen CW, Dai QP, Fan TY, et al. Icarin Prevents Cartilage and Bone Degradation in Experimental Models of Arthritis [J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016(5): 1-10
- [13] 王莹, 王兰珠, 韩博, 等. 正畸力作用下压力侧 Wnt10b、RANKL 在牙周组织中的表达[J]. 口腔医学研究, 2016, (3): 257-260
- Wang Ying, Wang Lan-zhu, Han Bo, et al. Expression of Wnt10b and RANKL in the Pressure Site of Periodontal Tissue under Orthodontic Force[J]. Journal of Oral Science Research, 2016, (3): 257-260
- [14] Weivoda MM, Ming R, Hachfeld CM, et al. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2016, 30(1): 2133-2134
- [15] Li XF, Xu H, Zhao YJ, et al. Icarin Augments Bone Formation and Reverses the Phenotypes of Osteoprotegerin-Deficient Mice through the Activation of Wnt/ β -Catenin-BMP Signaling [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013(9): 652317
- [16] 马永平, 葛长青, 高琳青. 不同矫治正畸作用下牙周骨改建过程中压力侧相关因子的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2013, (20): 3671-3678
- Ma Yong-ping, Ge Chang-qing, Gao Lin-qing. Changes of related factors on the pressure side under different appliance orthodontic during periodontal bone remodeling [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, (20): 3671-3678
- [17] 廖海清, 曹正国. 经典 Wnt 信号通路在牙周膜细胞成骨分化过程中的调控[J]. 口腔医学研究, 2016, (3): 224-227
- Liao Han-qing, Cao Zheng-guo. Effect of Canonical Wnt Signalling Pathway on the Osteogenic Differentiation and Proliferation of PDLCS[J]. Journal of Oral Science Research, 2016, (3): 224-227
- [18] Lim WH, Liu B, Cheng D, et al. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament[J]. Journal of Periodontal Research, 2014; 49(6): 751-759
- [19] Lim WH, Liu B, Mah SJ, et al. Alveolar bone turnover and periodontal ligament width are controlled by wnt [J]. Journal of Periodontal Research, 2015, 86(2): 319-326
- [20] Kook SH, Heo JS, Lee JC. Crucial roles of canonical Runx2-dependent pathway on Wnt1-induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 402(1-2): 213-223
- [21] 卢娟, 段颖莹, 吴明明, 等. 大鼠正畸牙齿移动过程中 Wnt3a 和 DKK1 的表达[J]. 口腔医学研究, 2015, (5): 448-450
- Lu Juan, Duan Ying-ying, Wu Ming-ming, et al. Expression of Wnt3a and DKK1 during orthodontic tooth movement [J]. Journal of Oral Science Research, 2015, (5): 448-450
- [22] H Wei, L Zi-li, C Yuan-lu, et al. Effect of icaritin on bone formation during distraction osteogenesis in the rabbit mandible[J]. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, 2011, 40(4): 413-8
- [23] Li C, Li Q, Mei Q, et al. Pharmacological effects and pharmacokinetic properties of icaritin, the major bioactive component in Herba Epimedii[J]. Life Sciences, 2015, 126: 57-68
- [24] 张忻, 刘天麟, 张学斌, 等. 传统中药淫羊藿苷促骨生成作用的研究进展[J]. 口腔颌面外科杂志, 2014, 24(2): 150-153
- Zhang Xin, Liu Tian-lin, Zhang Xue-bin, et al. Osteoinduction Potential of Icarin [J]. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2014, 24(2): 150-153
- [25] Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, et al. Icarin isolated from Epimedium pubescens regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytomedicine, 2009, 17(6): 414-23