

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.005

骨碎补结合组织工程软骨促进软骨再生的实验研究*

牟明威¹ 张陇豫² 汪冠球¹ 白松绵¹ 王泽茂^{2Δ}

(1 北京中医药大学东直门医院骨科 北京 100700; 2 北京中医药大学东直门医院东区骨科 北京 100700)

摘要 目的:评估骨碎补结合组织工程软骨治疗对实验兔软骨缺陷模型软骨再生的疗效。**方法:**将 hIGF-1 基因转染 MSCs, 并与脱细胞真皮基质(ADM)构建组织工程软骨。24 只新西兰白兔随机分为 A、B、C、D 四组, A、C 组进行自体软骨移植, B、D 组进行改建的细胞-ADM 移植。C、D 组用 40% 骨碎补汤喂养 4 周, 150 mL/d。第 12 周处死实验动物, 分离缺损关节软骨部位, 蜡块包埋染色, 通过总体形态评价软骨再生组织。采用组织学评分评估再生软骨质量。采用甲苯胺蓝染色评价缺损部位产生软骨糖胺聚糖的情况。**结果:**与 B 组比较, C 组和 D 组的新生软骨覆盖度、新骨髓的颜色、缺损边缘和表面粗糙度均显著提高($P<0.05$); 再生软骨的组织学评分软骨表面评分显著改善($P<0.05$)。C 组与 D 组具有比其他组更好的基质、细胞分布和表面指数。并且有较厚的透明样软骨组织, 具有正常的糖胺聚糖产生。表明该治疗方法可以通过再生透明样软骨且没有不良事件来减少软骨缺陷。**结论:**工程软骨结合骨碎补治疗可显著改善兔膝关节软骨缺损修复的质量, 为临床治疗软骨病变提供重要理论依据。

关键词: 骨碎补; 人胰岛素样生长因子-1; 关节软骨缺损

中图分类号: R-33; R684; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)23-4421-05

Experimental Study on Effect of Drynaria Combining with Tissue Engineered Cartilage to Promote Cartilage Regeneration*

MU Ming-wei¹, ZHANG Long-yu², WANG Guan-qiu¹, BAI Song-mian¹, WANG Ze-mao^{2Δ}

(1 Department of Neurology, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China;

2 Department of Neurology, East District Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of rhizome drynaria combined with tissue engineering cartilage on cartilage regeneration in experimental rabbits with cartilage defects. **Methods:** The hIGF-1 gene was transfected into MSCs by using the method of isolation, purification and recombination of transgenic stem cells. The MSCs were transplanted into rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. The cells were further amplified and mixed with acellular dermal matrix (ADM) to construct tissue engineered cartilage. Twenty-four New Zealand white rabbits, aged 6 months, were randomly divided into 4 groups (A, B, C and D). six rabbits in each group. Group A and C were transplanted with autologous cartilage. Group B and D were transplanted with modified cells. Group C and D group were fed with 40% Drynaria Decoction, 150ml/d for 4 weeks. Animals were sacrificed at 12 weeks postoperatively, and articular cartilage defects were isolated. Cartilage defect samples were embedded in paraffin blocks and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Cartilage regeneration was evaluated by gross morphology, including sclerotic shape, color, contour and homogeneity. The quality of regenerated cartilage was assessed by histological scoring. Toluidine blue staining was used to evaluate the occurrence of chondrogenic glycosaminoglycans (GAG). **Results:** Compared with group B, the cartilage coverage, the color of new bone marrow, the edge of defect and the surface roughness of group C and D were significantly improved ($P<0.05$); the cartilage surface score of regenerated cartilage was significantly improved $P<0.05$. Groups C and D had better matrix, cell distribution and surface index than the other groups. And had a thick like hyaline cartilage tissue, with the normal glycosaminoglycan production. It is indicated that drynaria combined with tissue engineering cartilage can reduce cartilage defects by regenerating hyaline cartilage. **Conclusion:** Cartilage combined with drynariae can significantly improve the quality of cartilage defect repair in rabbit knee joint, and provide an important theoretical basis for clinical treatment of cartilage lesions.

Key words: Osteoprotegerin; Human insulin-like growth factor-1; Articular cartilage defect

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R684; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)23-4421-05

前言

关节软骨是没有神经、淋巴管与血管的单一结缔组织, 依赖周围的关节滑液提供营养。当损伤造成关节软骨缺损后, 由

* 基金项目: 北京中医药科技项目(JJ2013-36)

作者简介: 牟明威(1971-), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向: 骨与关节损伤

Δ 通讯作者: 王泽茂, 电话: 010-84013151, E-mail: wangdchtsh@163.com

(收稿日期: 2016-12-28 接受日期: 2017-01-21)

于缺损组织无血管,并缺乏无分化的软骨细胞,而软骨细胞通常存在于坚固、封闭的胶原糖蛋白固体分子基质中,造成未分化的间充质细胞无法进入软骨损伤部位^[1-3]。因此,关节软骨自身的修复能力极其有限,很难再生。在运动损伤中,关节软骨损伤发生率非常高,关节软骨的修复治疗成为骨科医学学术界需要共同面对的难题。解决问题的方法包括为找到软骨缺损的替代物与促进软骨细胞生长的药物^[4-6]。

本研究以中医学“肾主骨”、“肝主筋”的传统理论为指导^[7,8],采用转基因干细胞分离、纯化、复合技术,在体外扩增兔骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)基础上,将hIGF-1基因转染MSCs,经再次扩增并与脱细胞真皮基质(ADM)构建组织工程软骨,使用改建后的工程软骨修复兔关节损伤模型软骨缺损,并配合以中药骨补碎治疗,评估这种实验方法对软骨细胞再生的促进作用,及骨碎补对MSCs的成形成、分化、定向的影响,为临床治疗关节缺损提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究共使用24只骨骼成熟的新西兰白兔,雌雄不限,6月龄,体质量约3 kg,根据国际实验动物科学理事会关于实验室动物的护理和使用指南进行喂养,将它们饲养在单独的笼中,标记并允许自由移动、自由进食与饮水,在实验开始之前实验动物在笼子里至少喂养14天,以驯化到实验条件。

1.2 仪器与试剂

H2100R 高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);T100型PCR仪(山东博科生物产业有限公司);JY04S-3C凝胶电泳成像分析系统(北京君意东方电泳有限公司);pIRES2-EGFP质粒(北京中医药大学生化教研室提供);hIGF-1一抗,兔抗人(上海博耀生物公司);甲苯胺蓝溶液(北京索莱宝科技有限公司);骨碎补(我院药剂科提供,含量1 g/mL)。

1.3 实验方法

1.3.1 pEGFP-IRES2-hIGF-1 表达载体的构建 根据相关文献^[9]制定的载体PIRES2-EGFP酶切位点与hIGF-1序列,采用Primer5.0软件设计PCR引物,上游引物:5-gccgctagcgaagatgcacacatgtctc,下游引物:3-ccgctcgagctacatctgtagtcttcttctc,扩增hIGF-1目的基因,扩增条件:94℃×2 m,1 c→94℃×15 s→58℃×20 s→72℃×20 s,25c→72℃×5 m,1 c,进行电泳初步鉴定。克隆PCR产物片段到pMD18-T载体,以转化感受态细菌,采用蓝白斑法进行阳性菌落筛选,PCR鉴定阳性质粒,抽提DNA,进行双酶切鉴定,Nhe I 双酶切载体pMD18-hIGF-1,Xho I 双酶切载体pIRES2-EGFP,酶切产物回收、连接、转化、扩增及鉴定,得pEGFP-IRES2-hIGF-1重组质粒,进行基因测序。

1.3.2 细胞转染与表达检测 应用密度梯度离心法对MSCs进行分离、纯化与培养。在5% CO₂与37℃孵箱培养,每隔一天进行换液,孵育至第三代,实验待用。兔MSCs细胞接种于6孔板培养,细胞/孔密度为6×10⁵,融合于40%~80%时进行转染,转染操作按照试剂盒说明书进行,记录荧光表达的情况,在第4天进行细胞消化,采用流式细胞仪对转染效率进行检测,抽提转染细胞的总RNA,采用RT-PCR法对hIGF-1分子表达进行检测,准备细胞爬片,采用免疫组化法对胞浆中蛋白表达

进行检测,收集不同时间点的MSCs培养上清,采用酶联免疫吸附法对分泌型hIGF-1浓度进行检测^[10]。

1.3.3 制备细胞-ADM 支架 将改建后的ADM材料修剪成为直径4 mm的圆形。100%异丙基溶剂浸泡10 min,共3次;70%酒精预湿2 h,PBS漂洗30 min,共3次;准备含有15% FBS的DMEM/F12全培养基的6孔板,在其中浸泡,次日备用;胰酶消化此前制作的MSCs,在改建好的ADM材料上滴加、标记、分组与培养,观察细胞生长状态与黏附状态。

1.3.4 制备动物模型 麻醉实验白兔(1.0 mL/kg 戊巴比妥,在实验动物耳缘静脉处麻醉),将其仰卧位固定在手术台上,Na₂S手术区脱毛、消毒、铺巾。在白兔髌骨外侧缘施行2 cm纵切口,切开皮肤,露出膝关节,把髌骨向外侧脱位,在股骨踝内,于内侧滑车关节面上钻成直径3 mm、深度达到软骨下层的缺损,将手术区的渗血与骨渣清理干净,使用尖镊将细胞-ADM复合物填充缺损,轻轻加压四周使复合物低于关节面,髌韧带复位,逐层关闭关节,以无菌辅料进行包扎。不固定关节,任实验白兔自由活动。术后所有白兔均单笼喂养,连续应用青霉素1周左右,剂量2×10⁵ μ/kg·d,在手术切口干燥、红肿消退且无分泌物与渗出物时,停止用药。

1.3.5 实验动物干预 24只新西兰白兔随机分为4组,每组各6只,A(缺损组)组与C组的实验动物进行自体软骨移植,B组与D组进行改建后的细胞-ADM移植。C组与D组实验动物进行40%骨碎补汤喂养,150 mL/d,共喂养4周。在第手术后第12周时处死实验动物,分离缺损关节软骨部位。

1.3.6 总体评估和组织学观察 实验动物通过在手术后12周注射过量戊巴比妥进行安乐死。通过总体形态评价软骨再生组织,评分标准包括再生软骨的形状、颜色、轮廓和均匀性27。彻底移除股骨髌,使用摆动锯切割成切片,在10%中性缓冲福尔马林固定液中固定。将样品脱钙,在浓度不同的乙醇梯度脱水,石蜡包埋。石蜡块切成4-l m的连续切片,然后脱石蜡并用苏木精和曙红(H&E)染色。采用组织学评分评估再生软骨的质量。采用甲苯胺蓝染色评价缺损部位产生软骨糖胺聚糖(GAG)的情况。

1.4 统计学分析

计量资料以均值±标准差表示,采用t检验进行组间比较,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察和评估

实验动物在行关节切开术后,未发现明显的粘连性关节炎、感染或炎性滑膜炎。打开关节腔,对缺陷部位进行仔细检查和评价。手术产生的右膝内侧髌上的圆柱形缺损没有自发修复,术后14周在A组仍然清楚地看到软骨损伤。与A组相比,B、C、D组实验动物显示出总体外观改善。一些再生的软骨组织覆盖了B组实验动物的缺陷位点。与B组比较,骨碎补喂养过的C组与D组软骨再生更好,尽管在所有实验组动物模型中C组缺陷的直径较小,但其表面看起来很粗糙。而骨碎补喂养联合细胞-ADM植入的D组,显示缺陷处有更多的类似于周围正常软骨的透明样再生软骨组织。虽然缺陷处并未完全愈合,但与C组相比,缺陷处的尺寸减小(图1)。

依据新生软骨覆盖度、新骨髓的颜色、缺损边缘和表面粗糙度的评分系统对股骨髁上的再生组织进行量化。结果表明,与缺损组 A 组比较,细胞 -ADM 植入的 B 组与 D 组所有软骨愈合指数均显著改善(缺陷余量和表面粗糙度, $P < 0.01$, 新生软

骨的覆盖和颜色, $P < 0.05$), 表明细胞 -ADM 植入组缺损边缘减少和表面部分恢复。C 组对软骨修复的治疗效果与 D 相似, 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 B 组比较, C 组和 D 组的所有指标均显著提高($P < 0.05$)(表 1)。

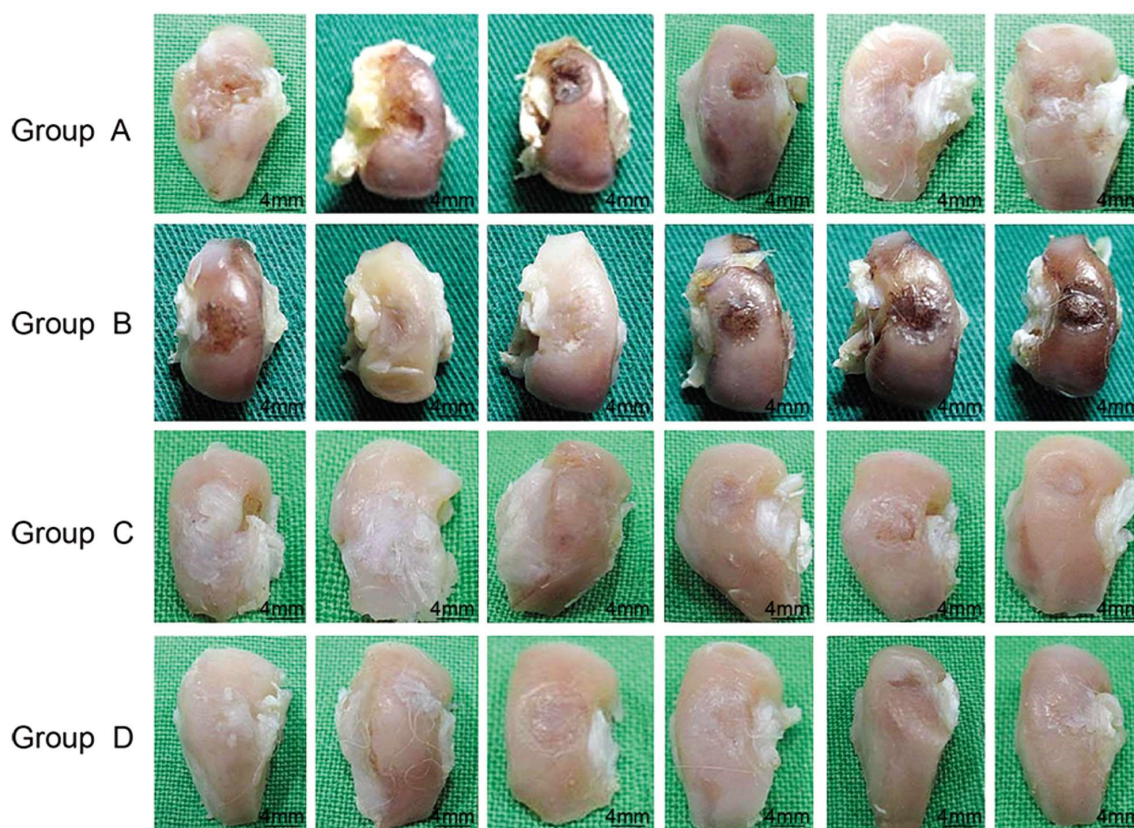


图 1 实验动物术后 12 周的总体观察。

Fig.1 Overall observation of experimental animals at 12 weeks postoperatively

表 1 再生软骨的评分,分

Table 1 The Gross Grading Score of Regenerated Cartilages

	Coverage	Neocartilage Color	Defect Margin	Surface Roughness
Group A	1.04± 0.77	1.26± 0.68	0.86± 0.76	0.69± 0.62
Group B	2.82± 0.73*	2.32± 0.76*	2.31± 0.65*	2.41± 0.87*
Group C	3.68± 0.38* ^Δ	3.32± 0.47* ^Δ	3.13± 0.60* ^Δ	3.19± 0.48* ^Δ
Group D	3.61± 0.42* ^Δ	3.48± 0.36* ^Δ	3.16± 0.51* ^Δ	3.19± 0.53* ^Δ

Note: * $P < 0.05$ vs group A; * $P < 0.01$ vs group B; ^Δ $P < 0.05$ vs B group.

2.2 组织学检查与评分

A 组中再生的软骨太少,无法覆盖软骨下骨,且骨小梁的数量减少。在接受细胞 -ADM 植入的 B 组实验动物中,发现新形成的软骨组织,新形成的组织与周围软骨之间存在清晰间隙。与周围正常软骨相比,再生的软骨相对较薄(正常组织的 1/4-1/5),在两种软骨之间存在明显的不连续性。在再生组织的中间区域,发现细胞的柱状结构,同时观察到紊乱细胞群。C 组实验动物中,2 只得到了良好的恢复。3 只软骨组织有不规则的关节表面,并且 1 只有暴露的软骨下骨,经组织学检查发现其被纤维组织覆盖。C 组的软骨层的厚度比 B 组厚(正常组织的 1/3-1/4),并且在边界中发现纤维组织,再生组织的表面区域发现典型的扁平化细胞。与 B 组类似, C 组中也发现混合 / 柱状方向聚集的软骨细胞(图 2)。C 组再生组织填充圆柱形缺陷的

表面,似乎与正常透明软骨整合,这与接受细胞 -ADM 植入联合骨补碎喂养的 D 组发现的基础软骨下骨类似。然而,在 3 只实验动物的新软骨组织与正常组织之间仍然发现间隙。

再生软骨的组织学评分显示,与 A 组比较, B、C、D 组评分均显著改善(对于 B 组, $P < 0.05$, 对于 C 与 D 组, $P < 0.01$)。与 B 组相比, C 组与 D 组再生软骨的表面显著改善($P < 0.05$)。然而,在基质和细胞分布中没有显著差异(表 2)。

2.3 糖胺聚糖(GAG)评估

甲苯胺蓝染色显示在 A 组的大多数样品中,再生组织对 GAG 的染色不良(图 3, 100×)。对于细胞 -ADM 植入 B 组的实验动物,软骨细胞是扁平纤维组织细胞和圆形软骨细胞的组合,其中后者仅在再生组织的中间区域偶尔看到,且对 GAG 染色呈阳性。在接受骨补碎喂养的 C 组实验动物中发现透明样软

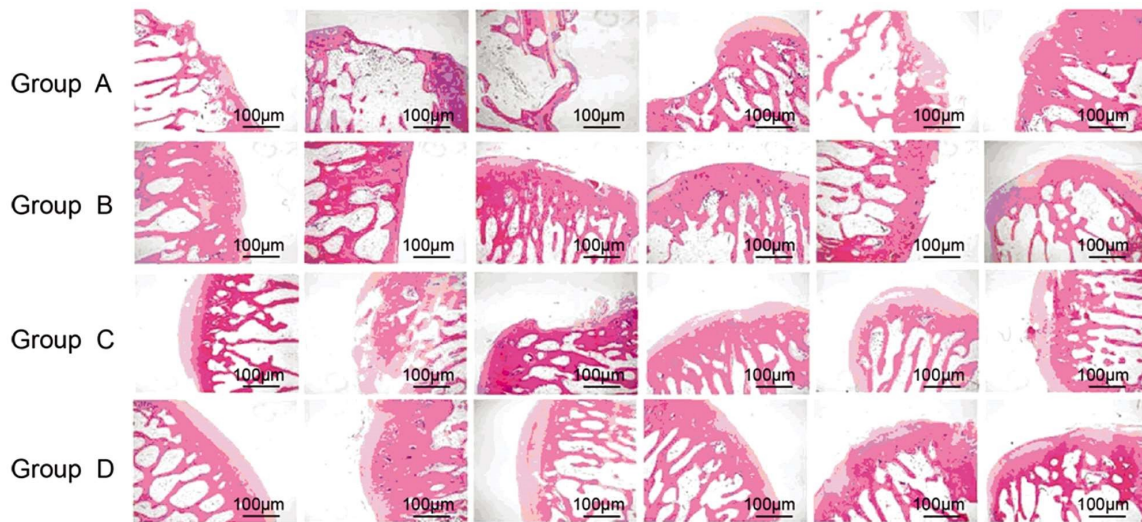


图 2 实验动物再生的软骨的组织学检查(40×)

Fig. 2 Histological examination of cartilage regenerated in experimental animals (40×)

表 2 再生软骨的组织学评分

Table 2 Histological scoring of regenerated cartilage

	Matrix	Cell	Distribution Surface
Group A	0.84± 0.56	0.84± 0.76	1.09± 0.68
Group B	1.93± 0.48*	1.68± 0.22*	1.84± 0.62*
Group C	2.01± 0.88**	1.92± 0.94**	2.26± 0.64** ^Δ
Group D	2.76± 0.28**	2.76± 0.21**	2.76± 0.28** ^Δ

Note: *P<0.05 vs group A; *P<0.01 vs group B; ^Δ P<0.05 vs MSCs group.

骨,且大多数细胞对甲苯胺蓝染色呈阳性。对于细胞-ADM 植入联合骨补碎喂养的 C 组显示出典型透明软骨细胞,呈现平行

于关节表面排列。再生的组织几乎完全用甲苯胺蓝染色,并且大部分细胞在中间区域是圆形细胞。

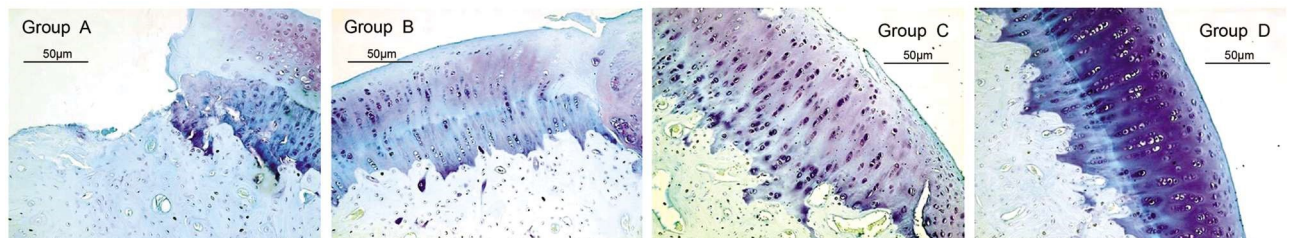


图 3 甲苯胺蓝染色评估 GAG(100×)

Fig. 3 Toluidine blue staining assessment of GAG (100×)

3 讨论

近年来, 关节软骨损伤与骨性关节炎发病呈逐年上升趋势, 已经成为影响人们生活的主要疾病, 如何治疗这种疾病已经成为国内外医学界的重大课题。而关节软骨因缺乏神经营养、淋巴与血管而很难进行自我修复^[11,12]。本研究采用中药骨补碎喂养 6 个月大的新西兰大白兔动物模型, 并采用 hIGF-1 基因转染的种子细胞与 ADM 材料复合构建的新型组织工程软骨对兔关节软骨缺损模型进行治疗。结果显示, 以改建后的软骨与骨补碎结合治疗的实验动物组具有比其他组更好的基质、细胞分布和表面指数。并且有较厚的透明样软骨组织, 具有正常的糖胺聚糖产生。表明该治疗方法可以通过再生透明样软骨且没有不良事件来减少软骨缺陷。

研究表明, MSCs 有高成骨活性与较好的成骨细胞分化潜

能, 可以分化为多种间叶组织细胞(如脂肪细胞、软骨细胞)。MSCs 容易纯化扩增与基因修饰, 免疫排斥极小, 因此 MSCs 成为最佳的骨组织种子细胞。虽然组织源影响软骨细胞分化潜能, 但 MSCs 可从各种位置(包括骨髓、脂肪组织、滑膜、牙髓、牙周韧带、脐带基质和其他间充质组织)中发现和分离。在适当的诱导条件下, MSC 可以分化成多种细胞谱系, 如成骨细胞、脂肪细胞、神经样细胞、黑素细胞和软骨细胞^[13,14]。医学专家建议使用自体 MSCs 用于修复关节软骨缺损, 事实上多种手术方法都可以刺激骨髓并从软骨下骨中提取 MSCs 用于软骨再生, 这些手术方法包括 Pridie 钻孔术、关节成形术与微裂缝手术等^[15,16]。虽然仍未能在日常实践中使用, 但专家已经提出进行关节内注射 MSCs 治疗由创伤和骨关节炎(OA)引起的关节软骨损伤。目前该方法正在进行 I/II 期试验, 术后 6 个月的初步结果

显示, MSCs 注射到患有骨关节炎膝关节中可以改善关节功能并降低疼痛,但不会引起不良反应,并且通过透明样关节软骨的再生降低软骨缺损^[17]。

中医认为,骨性关节炎的发病与肝肾的关系密切,该病的病因病机为肝肾亏损与筋骨失养。中药骨补碎归肾、肝经,壮肾生髓、益肝养筋、双调肝肾是其主要功效,同时也兼顾了骨性关节炎的病机关键。骨补碎在治疗骨科疾病方面作用如下:(1)促进成骨细胞增殖,张军等^[18]的研究表明,骨碎补总黄酮可促进成骨细胞分化与增殖,提高 OPG mRNA 表达;(2)促进骨质愈合,高怡加^[19]等的研究表明,骨碎补可促进家兔骨折部位 TGF- β 与 VEGF 的表达,促进骨折部位血管再生、软骨细胞分化增殖、间充质细胞分化与募集,最终促进了骨痂改建、形成与骨折愈合;(3)促进软骨细胞生长;(4)成骨分化与 MSCs 增殖,苏友新^[20]等的研究表明,骨补碎膏有促进兔成骨细胞分化与骨髓充质干细胞增殖的作用,是一种良好的活性因子。

综上所述,本研究采用工程软骨结合骨碎补治疗可显著改善兔膝关节软骨缺损修复的质量,进而为临床治疗软骨病变提供重要理论依据。

参考文献(References)

- [1] Harris JD, Siston RA, Pan X, et al. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review [J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(12): 2220-2233
- [2] Malicev E, Barlić A, Kregar-Velikonja N, et al. Cartilage from the edge of a debrided articular defect is inferior to that from a standard donor site when used for autologous chondrocyte cultivation [J]. J Bone Joint Surg Br, 2011, 93(3): 421-426
- [3] Boeuf S, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors [J]. Stem Cell Res Ther, 2010, 1(4): 31
- [4] Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2014, 32(6): 1408-1419
- [5] Wang Y, Yuan M, Guo QY, et al. Mesenchymal Stem Cells for Treating Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis[J]. Cell Transplant, 2015, 24(9): 1661-1678
- [6] Filardo G, Madry H, Jelic M, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2013, 21(8): 1717-1729
- [7] Zhao zhong, Liu De-chun, Song Yang-chun. The Effect of Salvia miltiorrhiza Injection on phenotype Expression of Collagen and Proteoglycan of Chondrocyte [J]. Research and Practice of Chinese Medicines, 2013, 27(1): 36-39
- [8] Xie Gen-dong, Zeng Yi-lin, Wang Qi, et al. Study on the treatment mechanism of modified Jiajian Yougui Decoction applied to knee osteoarthritis[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan, 2010, 30(8): 19-20
- [9] Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, et al. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor [J]. Nature, 198, 306(5943): 609-611
- [10] Ding Xing-po, Jin Yuan-qing, Liu Wei. Repair of articular cartilage defects by transplantation of PLGA compounded with mesenchymal stem cells modified by hIGF-1 gene[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2006, 31(3): 354-357
- [11] Ou Guo-jian, Dai Qi-yi, Qin Xue-liu, et al. Effects of roubin-manipulation on knee joint chondrocyte apoptosis and proliferating cell nuclear antigen expression in rabbits [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(50): 9387-9390
- [12] Wong KL, Lee KB, Tai BC, et al. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up[J]. Arthroscopy, 2013, 29(12): 2020-2028
- [13] Vega A, Martí n-Ferrero MA, Del Canto F, et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial [J]. Transplantation, 2015, 99(8): 1681-1690
- [14] Yang KC, Wang CH, Chang HH, et al. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth regeneration[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(10): 777-785
- [15] Wang CC, Yang KC, Lin KH, et al. A biomimetic honeycomb-like scaffold prepared by flow-focusing technology for cartilage regeneration[J]. Biotechnol Bioeng, 2014, 111(11): 2338-2348
- [16] Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, et al. The role of growth factors in cartilage repair[J]. Clin Orthop Relat Res. 2011, 469(10): 2706-2715
- [17] Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial[J]. Stem Cells, 2014, 32(5): 1254-1266
- [18] Zhang Jun, Li Hao-peng, Yang Ping-lin, et al. Effects of Total Flavonoids from Rhizoma Drynariae Medicated Serum on Proliferation, Differentiation, Cell Cycle and Apoptosis of Osteoblasts in vitro [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(7): 1090-1093
- [19] Gao Yi-jia, Huang Pei-zhen, Li Yue, et al. Effect of Rhizoma Drynariae Total Flavones on Expression of Bone Morphogenetic Protein 2 and Transforming Growth Factor β 1 in Distraction Osteogenesis[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2016, 33(5): 679-683
- [20] Su You-xin, Yan Hu, Chen Bao-jun, et al. Effect of Naringin of Drynaria Rhizome, a Chinese Medical Component of Zhuanggu Jianxi Recipe Containing Serum on Caveolin-p38MAPK Signal Pathway in IL-1 β Induced Rabbit Degenerated Chondrocytes [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2014, 12(34): 1492-1498