

黄芪多糖对低氧环境中BMSCs成骨分化的影响

伍志伟^{1,2*} 刘丹¹ 薛娜¹ 刘永琦^{1,2} 苏韫¹ 颜春鲁¹

¹甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000;

²甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治省级重点实验室, 兰州 730000)

摘要 该文研究了黄芪多糖(*Astragalus polysaccharides*, APS)对低氧环境中成骨诱导的骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的作用。BMSCs培养于含40 $\mu\text{g/mL}$ APS、氧浓度分别为3%、6%、10%和20%的成骨诱导培养液4周, 通过茜素红染色分析BMSCs中骨钙蛋白沉积、Real-time PCR和Western blot分别检测成骨相关基因骨髓基质细胞核心结合因子 $\alpha 1$ (*runt-related transcription factor 2*, *Runx2*)和骨形态发生蛋白-2(*bone morphogenetic protein-2*, *BMP-2*)的mRNA和蛋白质水平。结果表明, 在不同氧浓度下, 与单纯成骨诱导剂组相比, 含APS的成骨诱导剂组BMSCs中出现了大量桔红色的骨钙蛋白沉积, *Runx2*和*BMP-2*的mRNA和蛋白质水平显著升高; 尤其在氧浓度为6%时, 差异较显著($P < 0.05$)。40 $\mu\text{g/mL}$ APS具有促进低氧环境中成骨诱导的BMSCs成骨分化的作用, 其促进作用与氧浓度相关。

关键词 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 黄芪多糖; 低氧环境

Effects of *Astragalus polysaccharides* on Osteogenic Differentiation of BMSCs Cultured in Low Oxygen Environment

Wu Zhiwei^{1,2*}, Liu Dan¹, Xue Na¹, Liu Yongqi^{1,2}, Su Yun¹, Yan Chunlu¹

¹Basic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

²Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with TCM Research in Gansu Colleges and Universities, Lanzhou 730000, China)

Abstract In the present study, the effects of *Astragalus polysaccharides* (APS) on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) induced by osteogenic medium under hypoxic environment were analyzed. BMSCs were cultured by osteogenic induction medium containing 40 $\mu\text{g/mL}$ *Astragalus polysaccharides* under the different oxygen concentration (3%, 6%, 10% and 20%) environments for 4 weeks. The osteocalcin particles existing in BMSCs-induced were detected by alizarin red staining. The levels of mRNA and protein of osteoblastic genes, runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) and bone morphogenetic protein-2 (*BMP-2*), in the BMSCs-induced were determined by Real-time PCR and Western blot, respectively. The results showed that, compared with the BMSCs-induced by pure osteogenic induction medium, more red orange osteocalcin particles were observed in BMSCs cultured in the medium containing *Astragalus polysaccharide*, and the mRNA and protein levels of *Runx2* and *BMP-2* were significantly increased, especially in 6% oxygen concentration ($P < 0.05$). 40 $\mu\text{g/mL}$ *Astragalus polysaccharides* could promote osteogenic

收稿日期: 2017-03-08 接受日期: 2017-04-12

甘肃省自然科学基金(批准号: 1212RJ2A081)和甘肃省省属普通本科高校基本科研业务费专项(批准号: 2305136301)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-8765427, E-mail: wzhiwei@aliyun.com

Received: March 14, 2017 Accepted: April 12, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.1212RJ2A081) and Gansu Provincial General Undergraduate Colleges and Universities Fundamental Research Funds (Grant No.2305136301)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8765427, E-mail: wzhiwei@aliyun.com

网络出版时间: 2017-05-18 17:08:15 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170518.1708.012.html>

differentiation of BMSCs-induced by osteogenic medium under hypoxic environment, and the role was related to oxygen concentration.

Keywords bone mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; *Astragalus* polysaccharides; low oxygen environment

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于中胚层的一类具有成骨和成软骨分化的多能成体干细胞,在骨质疏松、股骨头坏死、骨折等临床疾病的治疗和修复中得到广泛应用,并且已成为骨组织工程首选的种子细胞^[1-3],但经典的成骨诱导途径尚无法满足临床需要。由于BMSCs分化极易受到诱导微环境中诸如细胞因子、低氧、炎性介质等的影响,引起细胞内基因转录与调控的改变,导致细胞形态、结构、分化等生物学特性异常,甚至造成BMSCs恶性转化,极大地限制了BMSCs临床应用。

黄芪多糖(*Astragalus polysaccharides*, APS)作为黄芪的主要有效活性成分之一,在抗炎、免疫调节、促进细胞增殖与分化等方面具有独特的功效^[4-7],而氧作为生物机体新陈代谢的重要营养组分,在促进和维持生物体生长发育以及体内细胞增殖和分化过程中发挥着重要作用。目前,对于BMSCs分化的相关研究,大多是在常氧环境中进行的,忽视了体内低氧微环境对其的影响。因此,APS对低氧环境中成骨诱导的BMSCs成骨分化是否具有促进作用呢?本研究模拟体内低氧环境,应用APS干预成骨诱导的BMSCs,探析APS对低氧环境中BMSCs成骨分化的作用,对于解析APS的临床疗效和拓展BMSCs成骨分化的应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

BMSCs由本实验室从SPF级Wistar大鼠分离鉴定所得^[8]。实验获得甘肃中医药大学实验动物伦理学委员会批准。

1.2 试剂及仪器

DMEM/F12培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶和青链霉素购自Gibco公司。成骨诱导培养基购自赛业生物科技有限公司。茜素红染色试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司。RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒购自Roche公司。大鼠骨相关基因骨髓基质细胞

核心结合因子 $\alpha 1$ (runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)单克隆抗体、 β -actin抗体、羊抗兔IgG-HRP和光学印迹ECL检测试剂盒购自Abcam公司。Runx2、BMP-2引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。黄芪多糖购自上海源叶生物科技有限公司。倒置显微镜型号为IX53。Real-time PCR仪型号为CFX96。CO₂培养箱型号为MCO-18AIC。凝胶成像系统型号为ChemiDoc™ XRS+。

1.3 实验分组

实验分为空白组、APS组、诱导剂组和诱导剂+APS组,细胞培养氧浓度分别为3%、6%、10%和20%,共计16组。APS的浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (前期研究证实能有效促进BMSCs细胞增殖,可见参考文献[9])。

1.4 细胞培养

常规培养G₃代BMSCs至融合达到80%~90%时,用含0.25%胰蛋白酶Hanks液进行消化,按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于6孔板,每孔加入2 mL完全培养基(含有10%胎牛血清的DMEM/F12),每组设3个平行重复。将接种好的细胞置于常氧环境、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、相对湿度100%的培养箱中培养,至细胞汇合达到60%~70%,吸弃培养基。空白组加完全培养基,APS组加入含有40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APS的完全培养基,诱导剂组加入成骨诱导培养液(175 mL基础培养基、20 mL胎牛血清、2 mL青链霉素、2 mL谷氨酰胺、400 μL 抗坏血酸、2 mL β -甘油磷酸钠、20 μL 地塞米松),诱导剂+APS组加入含有40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APS的成骨诱导培养液。各孔分别加入对应培养液2 mL,分别置于3%、6%、10%和20%这4个氧浓度环境中培养4周,每隔3 d换液1次。

1.5 茜素红染色分析

细胞培养结束后,弃培养液,用PBS洗涤2次,每孔加入2 mL 4%中性甲醛,于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定30 min;弃甲醛, PBS洗涤2次,每孔加入1 mL茜素红染液染色5 min;弃染液, PBS洗涤2次,置于显微镜下观察成骨染色

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	长度(bp) Length (bp)	引物序列 Primer sequence
<i>β-actin</i>	172	F: 5'-AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3'
		R: 5'-GGA AAA GAG CCT CAG GGC AT-3'
<i>Runx2</i>	203	F: 5'-GCC AAT CCC TAA GTG TGG CT-3'
		R: 5'-AAC AGA GAG CGA GGG GGT AT-3'
<i>BMP-2</i>	199	F: 5'-AGG TGG CCG AAC AAA TTC CA-3'
		R: 5'-GCC ATC TTG TGT TGA CTC ACT CT-3'

结果。

1.6 Real-time PCR分析

采用Real-time PCR检测*Runx2*、*BMP-2* mRNA水平。应用RNA提取试剂盒(Roche公司)提取细胞培养物总RNA, 并进行反转录(具体操作参照试剂盒说明书); 以大鼠骨*Runx2*和*BMP-2*基因序列设计引物(表1), 通过Real-time PCR检测各组中*Runx2*和*BMP-2* mRNA水平。PCR反应体系组成: 12.5 μL 2×SYBR Green I Mix、上下游引物各0.5 μL、20 ng cDNA模板、用无菌去离子水补至25 μL。PCR反应条件: 95 °C预变性1 min; 95 °C变性10 s, 58 °C变性20 s, 共做45个循环。

1.7 Western blot分析

应用RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)提取细胞培养物总蛋白, 以30 μg/hole蛋白上样量、12 V/cm电压进行聚丙烯酰胺凝胶电泳[dodecyl sulfate, sodium salt (SDS)-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE]2 h后; 于20 V/cm电压转印至PVDF膜, 将PVDF膜置于5%脱脂奶粉中, 4 °C过夜封闭; 弃封闭液, 分别以1:1 000大鼠*Runx2*、*β-actin*和*BMP-2*一抗室温孵育4 h后, 收集一抗; 应用PBST洗涤PVDF膜5次, 每次5 min; 加入1:5 000羊抗兔IgG-HRP二抗, 室温孵育2 h, 收集二抗; 加入Optiblot ECL Detect Kit(0.1 mL/cm²)作用3 min后, 于ChemiDoc™ XRS+检测*Runx2*和*BMP-2*蛋白含量。

1.8 数据分析

应用SPSS 16.0对数据进行统计分析, 采用多因素方差分析进行各组间均数比较。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 茜红素染色分析

经茜红素染色后, 在不同氧浓度条件下培养的

诱导剂组和诱导剂+APS组BMSCs内均出现了桔红色的骨钙蛋白沉积。相同氧浓度条件下, 与空白组和APS组相比, 诱导剂组和诱导剂+APS组差异均为极显著($P < 0.01$)。相同氧浓度条件下, 诱导剂+APS组BMSCs内骨钙蛋白含量较诱导剂组高, 差异显著($P < 0.05$)。在不同氧浓度下, 诱导剂组和诱导剂+APS组中骨钙蛋白沉积表现出一定的差异, 且在氧浓度6%时, 细胞内骨钙蛋白沉积最多(图1)。

2.2 Real-time PCR分析

不同处理组培养细胞中成骨相关基因*Runx2*和*BMP-2* mRNA的Real-time PCR检测结果表明, 在同一氧浓度下, 空白组和APS组之间*Runx2*和*BMP-2* mRNA表达水平差异不显著, 但明显低于诱导剂组和诱导剂+APS组, 差异极显著($P < 0.01$, 图2); 诱导剂+APS组高于诱导剂组, 且在氧浓度为6%, 差异显著($P < 0.05$, 图2)。在不同氧浓度下, 同一组间除6%氧环境中BMSCs外, 其余组间*Runx2*和*BMP-2* mRNA水平差异均不显著。

2.3 Western blot分析

不同处理组培养细胞中成骨相关蛋白*Runx2*和*BMP-2*的Western blot检测结果表明, 在同一氧浓度下, 空白组和APS组之间*Runx2*和*BMP-2*蛋白质水平差异不显著, 但明显低于诱导剂组和诱导剂+APS组, 差异极显著($P < 0.01$, 图3); 诱导剂+APS组高于诱导剂组, 且在氧浓度为6%, 差异显著($P < 0.05$, 图3)。在不同氧浓度下, 同一组间除6%氧环境中BMSCs外, 其余组间*Runx2*和*BMP-2*蛋白质水平差异均不显著。这一结果与Real-time PCR检测结果一致。

3 讨论

BMSCs自我复制和多向分化的生物学特性已被广大学者所证实和认同。如何通过适宜的有效途

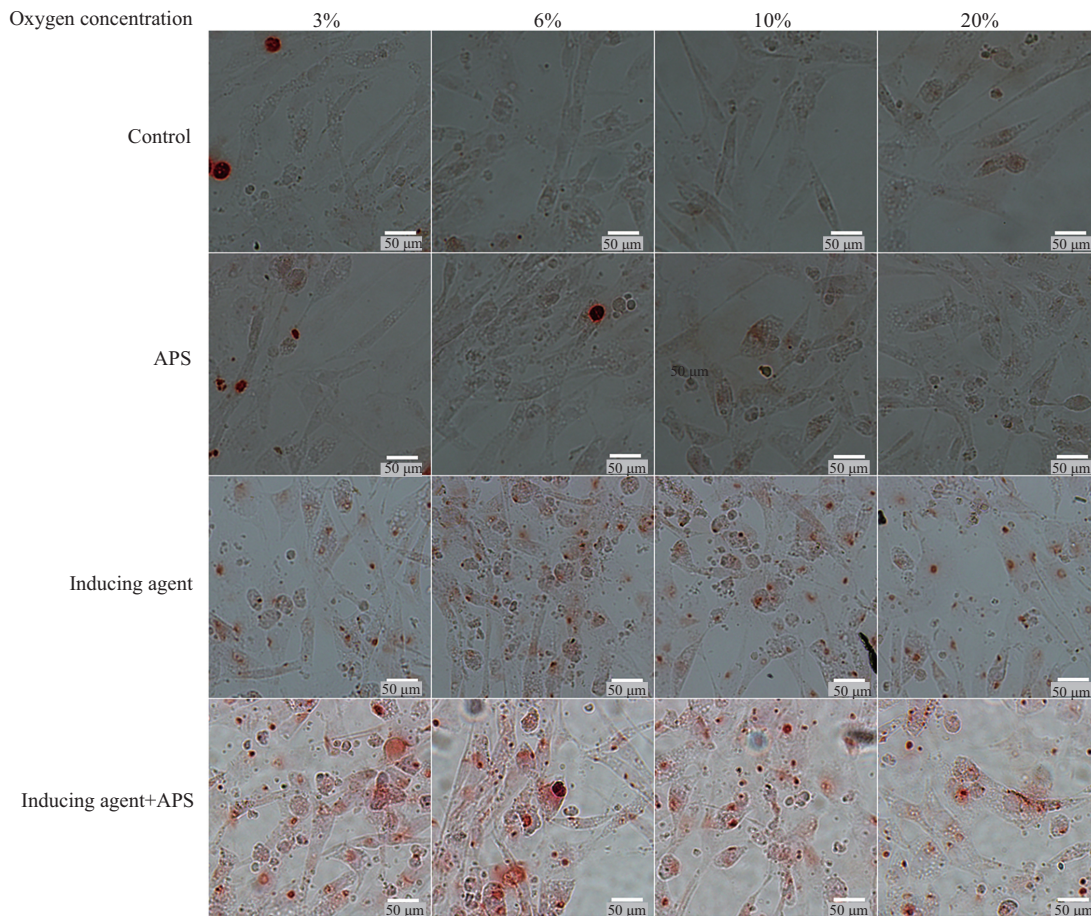
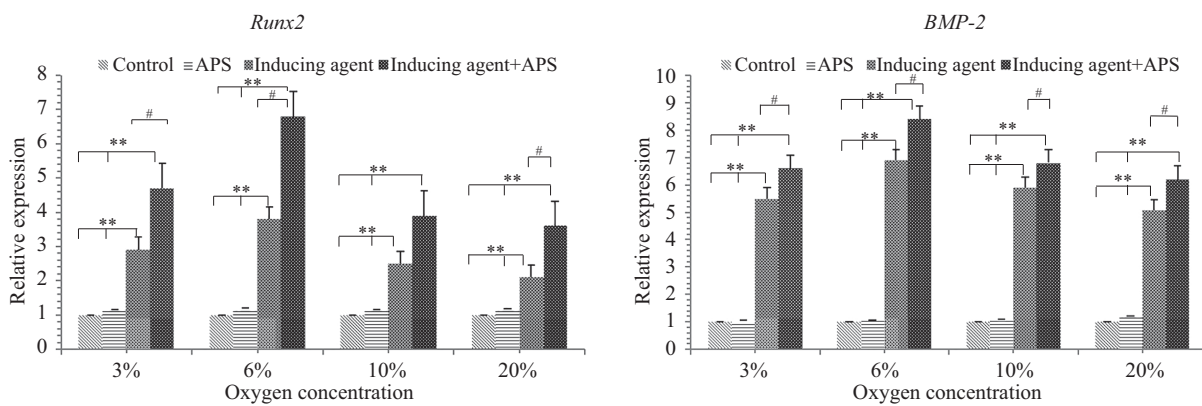


图1 不同培养条件下BMSCs成骨诱导分化的茜素红染色分析

Fig.1 Analyses of osteogenic differentiation of BMSCs cultured in different mediums



$P < 0.01$, ** $P < 0.01$.

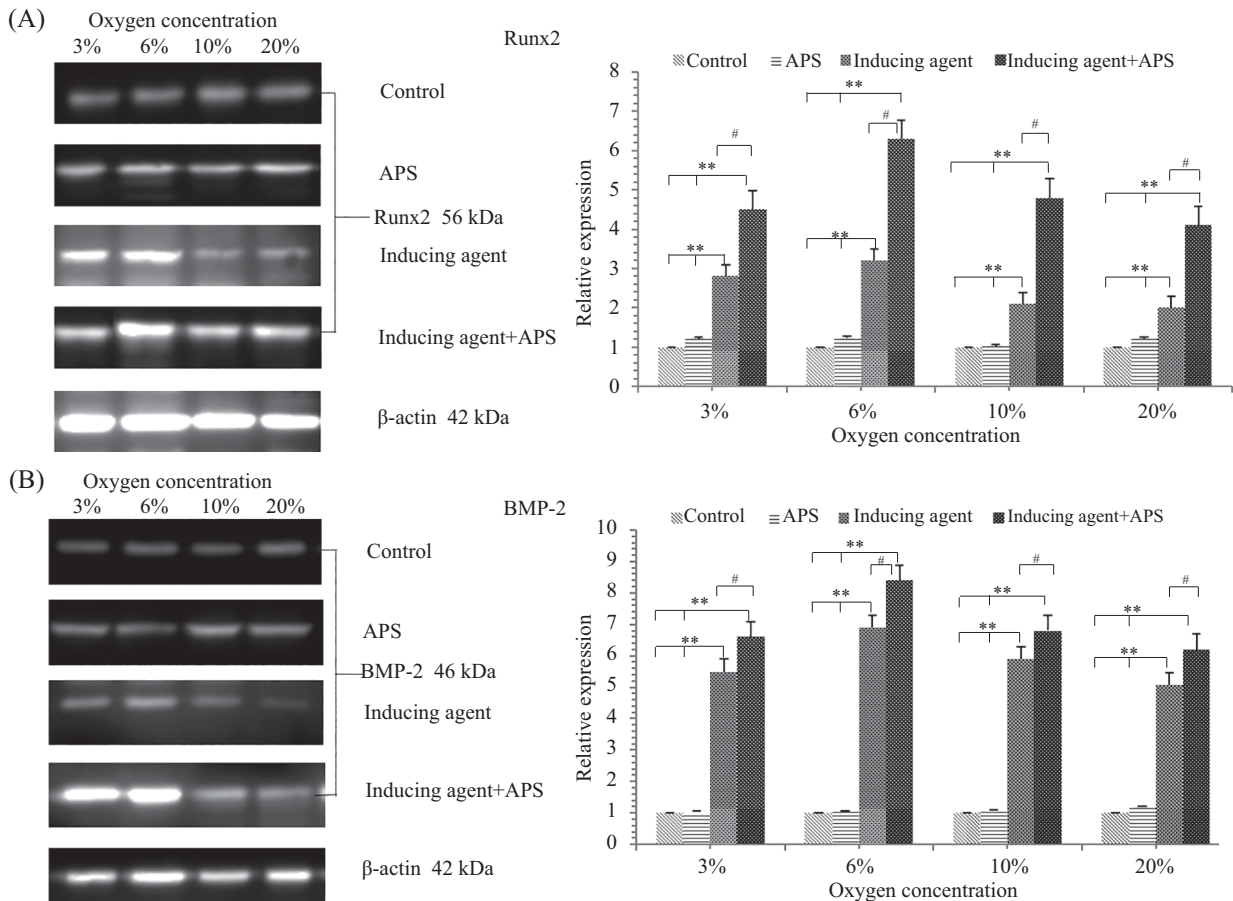
图2 成骨相关基因Runx2和BMP-2 mRNA水平的Real-time PCR分析

Fig.2 Analyses of the mRNA levels of Runx2 and BMP-2 expression in BMSCs cultured in different mediums and oxygen concentrations by Real-time PCR

径促进BMSCs增殖和诱导BMSCs向临床疾病治疗和人们健康发展的需要分化以及维持BMSCs遗传稳定性, 已成众多科研工作者和临床专家关注的焦点。目前, 应用物理学^[10,11]、化学^[12]、生物学^[13-15]等方法促进和诱导BMSCs增殖和分化方面已经取得了

重大突破, 部分成果已被用于肝硬化、骨质疏松症、脊髓神经损伤、心脑血管疾病、老年痴呆、红斑狼疮、硬皮病等的治疗, 取得了令人鼓舞的临床试验结果^[16-18]。

骨组织修复与治疗工程技术被认为是目前治



$P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

图3 成骨相关蛋白Runx2和BMP-2水平的Western blot检测

Fig.3 Analyses of the protein levels of Runx2 and BMP-2 expression in BMSCs cultured in different mediums and oxygen concentrations by Western blot

疗由先天性疾病、创伤和肿瘤切除造成的大面积骨缺损的最具希望的手段,而种子细胞的来源和筛选是解决这一问题的关键。BMSCs因具有良好的成骨分化特性而备受广大学者的关注。然而,由于BMSCs来源有限,且成骨分化性能随着供体年龄增大而下降,导致其临床应用受到极大的限制^[19]。因此,依据BMSCs生物学特性,通过药物调节在体外进行BMSCs大量增殖和提高其成骨分化效率,对开展BMSCs治疗临床骨科疾病治疗至关重要。目前,很多学者针对BMSCs成骨分化的机制,应用多种生物制剂诱导BMSCs成骨分化获得成功,并建立了以谷氨酰胺、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和地塞米松为主的经典诱导方法,取得了良好的成骨分化效果^[20]。同时,在中医药理论的指导下,中药以其副作用小、靶点广、疗效可靠等优势被广泛应用于成骨分化相关疾病的治疗和体外研究中。大量研究报告,补肾填经、活血化瘀、补肾活血等中药方均

具有促进BMSCs成骨分化的作用^[21-23]。

近年来,有研究证实,APS在促进细胞增殖与分化、调节细胞凋亡、降低细胞毒性等方面具有一定的作用^[24-25]。同时,氧是机体生长发育的重要营养成分和体内微环境的重要组成部分,不同组织或器官中氧浓度分布存在一定的差别,如骨髓组织中的氧浓度为1%~7%,动脉血氧浓度约为12%,成熟肌肉组织中的氧浓度为1%~10%^[26]。氧元素通过调节体内基因表达、信号通路等方式在细胞的增殖与分化过程中发挥着重要的作用。目前,对于BMSCs增殖与分化的相关研究大多基于常氧环境的细胞培养,并不能真实地反映其在体内的生物学特性。

本研究模拟体内低氧环境,在3%、6%、10%和20%这4个氧浓度条件下,以40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APS干扰成骨诱导的BMSCs。骨钙蛋白沉积试验检测表明,APS干预诱导组BMSCs细胞内形成了大量桔红色的钙化结节,显著高于单独应用诱导剂诱导的

BMSCs($P<0.05$), 差异具有统计学意义; 并且在氧浓度为6%时, 其干预诱导作用较为显著。这一结果证实, APS不仅具有促进低氧环境中BMSCs成骨诱导分化的功效, 而且其促诱导分化作用与BMSCs所处微环境的氧浓度有一定关系。

BMSCs成骨分化主要依赖于众多转录因子的调控, 这些转录因子通过活化不同阶段所需的特殊基因并使其表达, 从而达到成骨分化的结果。Runx2作为成骨分化的特异性转录因子, 经上调前成骨细胞、软骨细胞中各种矿化相关基因的转录, 使其向成骨细胞方向分化^[27]。同时, BMP-2具有体外诱导BMSCs成骨分化的活性, 是刺激成骨细胞分泌碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型前胶原氨基末端前肽(amino-terminal procollagen propeptide of type I collagen, PINP)和骨钙素(osteocalcin, OC)过程中的重要因子^[28], 是晚期成骨细胞早期分化的重要标志, 通常在成熟成骨细胞中表达。本研究对低氧环境中APS干预的成骨诱导BMSCs内Runx2和BMP-2 mRNA和蛋白质水平分析表明, 其表达水平上调; 而且在6%的氧浓度时, APS上调效果更显著。这一结果提示, APS可能通过调控Runx2和BMP-2 mRNA和蛋白质水平来促进低氧环境中BMSCs成脂诱导分化的过程, 而且其促诱导分化作用与BMSCs所处微环境的氧浓度有一定关系, 其具体机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Lü H, Sun Y, Zhang Y. MiR-133 is involved in estrogen deficiency-induced osteoporosis through modulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Med Sci Monit* 2014; 21: 1527-34.
- Dalle CL, Valenti MT, Zanatta M, Donatelli L, Cascio VL. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(11): 3356-65.
- Jang E, Jeong M, Kim S, Jang K, Kang BK, Lee DY, *et al.* Infusion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviates autoimmune nephritis in a lupus model by suppressing follicular helper t-cell development. *Cell Transplant* 2016; 25(1): 1-15.
- 荆雪宁, 邱波, 王金凤, 武永刚, 武继彪, 陈丹丹. 黄芪多糖诱导成熟的树突状细胞肿瘤疫苗体外抗肿瘤作用的实验研究. *中国中西医结合杂志*(Jing Xuening, Qiu Bo, Wang Jinfeng, Wu Yonggang, Wu Jibiao, Cheng Dandan. *In vitro* anti-tumor effect of human dendritic cells vaccine induced by *Astragalus polysaccharin*: An experimental study. *Chin J Integr Trad West Med*) 2014; 34(9): 1103-7.
- Zhang CL, Ren HJ, Liu MM, Li XG, Sun DL, Li N, *et al.* Modulation of intestinal epithelial cell proliferation, migration, and differentiation *in vitro* by *Astragalus polysaccharides*. *PLoS One* 2014; 9(8): e106674.
- 王雪梅, 贾天玉, 管彬, 冯燕海, 雒艳萍, 曹明强, 等. 黄芪多糖对免疫抑制模型小鼠Treg细胞及Th17细胞亚群的影响. 天然产物研究与开发(Wang Xuemei, Jia Tianyu, Guan Bin, Feng Yanhai, Luo Yanping, Cao Mingqiang, *et al.* Effects of *Astragalus polysaccharides* on CD4⁺ CD25⁺ treg cells and Th17 cells in immune suppressed mice. *Nat Prod Res Dev*) 2015; 39(1): 153-7.
- 罗泽飞, 苏旭春, 孔嘉欣, 闫冰川, 程玲. 黄芪多糖对环磷酰胺导致大鼠气虚血瘀证的影响. 现代肿瘤医学(Luo Zefei, Su Xuchun, Kong Jiaying, Yan Bbingchuan, Cheng ling. The influence of *Astragalus polysaccharides* on Qi-deficiency and blood-stasis in rats induced by cyclophosphamide. *J Mod Oncol*) 2016; 24(1): 30-2.
- 薛娜, 伍志伟, 刘丹, 刘永琦, 苏崑, 颜春鲁. Wistar大鼠BMSCs的分离与生物学特性分析. 中国细胞生物学学报(Xue Na, Wu Zhiwei, Liu Dan, Liu Yongqi, Su Yun, Yan Chunlu. Isolation and biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells derived from wistar rats. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(3): 324-32.
- 伍志伟, 刘丹, 刘永琦, 颜春鲁, 苏崑. 黄芪多糖对低氧环境中BMSCs成脂分化的影响. 生物工程学报(Wu Zhiwei, Liu Dan, Liu Yongqi, Su Yun, Yan Chunlu, Su Yun. Effects of *Astragalus polysaccharides* on adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in low oxygen environment. *Chin J Biotech*) 2017; 33(9): 1-9.
- Tan AW, Pingguan-Murphy B, Ahmad R, Akbar SA. Review of titania nanotubes: Fabrication and cellular response. *Ceramics International* 2012; 38(6): 4421-35.
- Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, Kontinen YT. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9(1): 31.
- Olivaresnavarrete R, Sutha K, Hyzy SL, Hutton DL, Schwartz Z, Mcdevitt T, *et al.* Osteogenic differentiation of stem cells alters vitamin d receptor expression. *Stem Cells Dev* 2012; 21(10): 1726-35.
- Carvalho AD, Alves AL, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Deffune E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132(2/3/4): 303-6.
- Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 2009; 206(11): 2483-96.
- Abdallah BM, Boissy P, Tan Q, Dahlgard J, Traustadottir GA, Kupisiewicz K, *et al.* dlk1/FA1 regulates the function of human bone marrow mesenchymal stem cells by modulating gene expression of pro-inflammatory cytokines and immune response-related factors. *J Biol Chem* 2007; 282 (10): 7339-51.
- Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009; 27(6): 1421-32.

- 17 张华勇, 冯学兵, 马晓蕾, 刘布骏, 王红, 华冰珠, 等. 异基因骨髓间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮11例临床分析. 中华风湿病学杂志(Zhang Huayong, Feng Xuebing, Ma Xiaolei, Liu Bujun, Wang Hong, Hua Bingzhu, *et al.* Clinical analysis of allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation for 11 patients with systemic lupus erythematosus. *Chin J Rheumatol* 2009; 13(2): 89-92.
- 18 González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2009; 60(4): 1006-19.
- 19 Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316(1): 233-9.
- 20 Jäger M, Fischer J, Dohrn W, Li X, Ayers DC, Czibere A, *et al.* Dexamethasone modulates BMP-2 effects on mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Orthop Res* 2008; 26(11): 1440-8.
- 21 Zhao J, Ohba S, Shinkai M, Chung UI, Nagamune T. Icaritin induces osteogenic differentiation *in vitro*, in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369(2): 444-8.
- 22 李树强, 齐振熙, 仲卫红, 于涛. 活血化瘀中药对激素诱导骨髓间充质干细胞I型胶原mRNA表达的影响. 福建中医药大学学报(Li Shuqiang, Qi Zhengxi, Zhong Weihong, Yu Tao. Effect of Chinese medicine for activating blood circulation and removing stasis on the expression of collagen type mRNA in bone marrow mesenchymal stem cells induced by hormone. *Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine*) 2009; 19(4): 38-40.
- 23 张倍源. 补肾活血方调控microRNA-210促进BMSCs成骨分化的研究. 中国骨质疏松杂志(Zhang Beiyuan. The kidney-tonifying and blood circulation-promoting recipes promote the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by regulating microRNA-210. *Chin J Osteopor*) 2014; 20(4): 396-9.
- 24 方健康, 周轶平, 李玛琳. 中药对骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及分化的影响研究进展. 中国中药杂志(Fang Jiankang, Zhou Yiping, Li Maling. Resarch on progress on effects of traditional Chinese medicine on proliferation, apoptosis and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *China Journal of Chinese Materia Medica*) 2014; 39(15): 2834-7.
- 25 侯茜, 张秋菊, 刘永琦, 张帆. 低氧环境下黄芪注射液对人骨髓间充质干细胞体外增殖的影响. 中成药(Hou Qian, Zhang Qiujun, Liu Yongqi, Zhang Fan. Effect of *Astragalus* injection on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Chinese Traditional Patent Medicine*) 2015; 37(4): 873-5.
- 26 Chakravarthy MV, Spangenburg EE, Booth FW. Culture in low levels of oxygen enhances *in vitro* proliferation potential of satellite cells from old skeletal muscles. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(8): 1150-8.
- 27 Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19(3): 254-63.
- 28 Schneider H, Sedaghati B, Hacker MC, Siegmund-Schulz M, Naumann A. Gene silencing of chordin improves BMP-2 effects on osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(4): 335-45.