

## 壳寡糖及其衍生物对体外培养成骨细胞增殖的作用特点\*<sup>☆</sup>

金黎明<sup>1</sup>, 魏长征<sup>2</sup>, 田文杰<sup>1</sup>, 赵小菁<sup>1</sup>, 王雅玲<sup>1</sup>, 范圣第<sup>1</sup>

### Chitooligosaccharide and its derivatives promote the proliferation of osteoblasts *in vitro*

Jin Li-ming<sup>1</sup>, Wei Chang-zheng<sup>2</sup>, Tian Wen-jie<sup>1</sup>, Zhao Xiao-jing<sup>1</sup>, Wang Ya-ling<sup>1</sup>, Fan Sheng-di<sup>1</sup>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Chitooligosaccharide (COS) and monosaccharide moleculars derived from chitin and chitosan have the superiority to macromolecular saccharide, owing to low weight and good water solubility.

**OBJECTIVE:** To observe the abilities of COS and its derivatives, such as glucosamine (GluNH<sub>2</sub>), N-acetyl-glucosamine (NAG) and carboxymethyl-COS (CM-COS) to promote the proliferation of osteoblasts *in vitro*.

**DESIGN, TIME AND SETTING:** Controlled observation experiments were completed in the Biochemistry Laboratory, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China from February 2004 to July 2005.

**MATERIALS:** Cell strain MC3T3-E1 of mice skull was offered by the Cell Center of Peking Union Medical College Hospital (China). NAG, COS, GluNH<sub>2</sub> and CM-COS were prepared in the Biochemistry Laboratory, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China (China).

**METHODS:** NAG, COS, GluNH<sub>2</sub> and CM-COS were added into DMEM medium according to the concentrations of 10, 100, 500, 1 000 and 2 000 mg/L, respectively. The mRNA was extracted from the cultured osteoblasts. Then mRNA differential display analysis was applied to study the mechanism.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** The proliferation of osteoblasts was studied by MTT method. The growth of osteoblasts was observed under inverted microscope. The mechanism was studied by mRNA differential display.

**RESULTS:** NAG at appropriate concentrations could promote the proliferation of osteoblasts, and the higher concentration (1 000 mg/L) had stronger effects. The promotion of COS was more obvious, and the most effective concentration was 500 mg/L. GluNH<sub>2</sub> promoted the proliferation of osteoblasts on lower concentrations (10 and 100 mg/L) while higher concentrations (> 500 mg/L) indicated inhibiting function. CM-COS also showed the function of proliferation, but the effect was not prominent. The optical microscopy outcome was consistent with that of MTT method. The results of mRNA differential display showed that four samples had no obvious effect on activating new genes.

**CONCLUSION:** In some sense, COS and its derivatives all can promote the proliferation of osteoblasts cultured *in vitro*. NAG and COS are more effective than GluNH<sub>2</sub> and CM-COS. No gene production is found in osteoblasts.

Jin LM, Wei CZ, Tian WJ, Zhao XJ, Wang YL, Fan SD. Chitooligosaccharide and its derivatives promote the proliferation of osteoblasts *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2008;12(19):3637-3640  
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-19/19k-3637(ps).pdf]

#### 摘要

**背景:** 甲壳素、壳聚糖降解后得到的壳寡糖和单糖分子质量小、水溶性良好, 具有大分子糖所不具备的更独特的生理生化活性。

**目的:** 观察壳寡糖及其衍生物 N-乙酰氨基葡萄糖、氨基葡萄糖、羧甲基壳寡糖对体外培养的成骨细胞 MC3T3-E1 的作用特点。

**设计、时间及地点:** 对比观察实验, 于 2004-02/2005-07 在中国海洋大学海洋生命学院生化实验室完成。

**材料:** 小鼠颅骨成骨细胞株 MC3T3-E1 由北京协和医院细胞中心提供; N-乙酰氨基葡萄糖、壳寡糖、氨基葡萄糖、羧甲基壳寡糖为中国海洋大学海洋生命学院生化实验室自制。

**方法:** 分别将 N-乙酰氨基葡萄糖、氨基葡萄糖、壳寡糖、羧甲基壳寡糖以 10, 100, 500, 1 000, 2 000 mg/L 加入 DMEM 培养基中。将用 4 种糖培养的成骨细胞按试剂盒方法提取 mRNA, 进行 mRNA 差异显示分析。

**主要观察指标:** MTT 法测定成骨细胞的增殖情况。倒置显微镜下观察成骨细胞的生长情况。分析 4 种糖的 mRNA 差异。

**结果:** N-乙酰氨基葡萄糖在 5 个质量浓度梯度均能促进成骨细胞增殖, 1 000 mg/L 时效果最为明显; 壳寡糖在各质量浓度下都表现出较明显的促进细胞增殖作用, 500 mg/L 为最适质量浓度; 氨基葡萄糖表现出双向调节作用, 在 10, 100 mg/L 时有促进作用, > 500 mg/L 则表现出抑制作用; 羧甲基壳寡糖在各质量浓度下均表现出一定的促进成骨细胞生长作用, 但促进效果较 N-乙酰氨基葡萄糖和壳寡糖弱。光镜观察结果与 MTT 测定法结果一致。mRNA 差异显示 4 种糖无明显激活新基因的产生。

**结论:** 壳寡糖及其衍生物对体外培养的成骨细胞均有不同程度的促进增殖作用, 其中 N-乙酰氨基葡萄糖和壳寡糖的效果优于氨基葡萄糖和羧甲基壳寡糖, 作用中成骨细胞无新基因产生。

**关键词:** 成骨细胞; 壳寡糖; 衍生物; mRNA 差异显示; 生物材料

金黎明, 魏长征, 田文杰, 赵小菁, 王雅玲, 范圣第. 壳寡糖及其衍生物对体外培养成骨细胞增殖的作用特点[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(19):3637-3640  
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-19/19k-3637(ps).pdf]

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Jin Li-ming ☆, Doctor, Lecturer, College of Life Sciences, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning Province, China  
jlmjlm2002@sina.com

Supported by a grant from Liaoning Provincial Department of Education, No. 20060153\*; Doctor Science and Technology Foundation of Dalian Nationalities University, No. 20056106\*

Received: 2008-03-15  
Accepted: 2008-04-19

<sup>1</sup> 大连民族学院生命科学院, 辽宁省大连市116600; <sup>2</sup> 解放军第二军医大学长征医院骨科, 上海市200003

金黎明, 女, 1979年生, 黑龙江省牡丹江市人, 朝鲜族, 2004年中国海洋大学毕业, 博士, 讲师, 主要从事生物活性物质和酶工程方面的研究。jlmjlm2002@sina.com

辽宁省教育厅项目(20060153): 壳寡糖及其衍生物促进骨缺损愈合作用的研究\*; 大连民族学院博士启动基金资助项目(20056106): 人工细胞信号转导系统的构建和研究\*

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2008)19-03637-04

收稿日期: 2008-03-15  
修回日期: 2008-04-19  
(54200803150025/Y·Y)

>> 本文导读 <<

**课题背景:** 课题是在辽宁省教育厅项目: 壳寡糖及其衍生物促进骨缺损愈合作用的研究(20060153); 大连民族学院博士启动基金资助项目: 人工细胞信号转导系统的构建和研究(20056106)资助下进行的。课题宗旨拟从分子水平上探讨壳寡糖及其衍生物促进骨形成的作用。

**应用要点:** 壳寡糖和 N-乙酰氨基葡萄糖分别在 500, 1 000 mg/L 时促进成骨细胞增殖效果最为明显, 氨基葡萄糖表现出双向调节作用, 在低质量浓度时(10, 100 mg/L)有促进作用, 高质量浓度(> 500 mg/L)则表现出抑制作用; 羧甲基壳寡糖在各质量浓度下的促进效果均较 N-乙酰氨基葡萄糖和壳寡糖弱。

**偏倚或不足:** 在细胞培养实验中, DMEM 培养液中的酚红和血清以及所用的壳寡糖及其衍生物 N-乙酰氨基葡萄糖、氨基葡萄糖、羧甲基壳寡糖也具有一定的还原性, 可能对实验结果有一定的干扰。

0 引言

甲壳素又称甲壳质、几丁质、壳多糖等, 是自然界含量仅次于纤维素的第二大生物大分子多糖, 为N-乙酰氨基葡萄糖(2-乙酰-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖)聚合物, 主要存在于无脊椎动物外骨骼和真菌细胞壁。甲壳素脱乙酰基的产物称为壳聚糖, 其溶解性较甲壳素得到提高。近几十年来, 甲壳素、壳聚糖以及小分子的壳寡糖、单糖在农业、工业、医药生物材料、食品生物工程等领域得到了广泛的应用<sup>[1-6]</sup>。近年来的一些研究表明, 甲壳质衍生物对骨缺损有促进愈合的作用<sup>[7-8]</sup>。作者前期研究也发现, 甲壳素降解产物N-乙酰氨基葡萄糖对骨缺损的愈合有促进作用<sup>[9]</sup>。成骨细胞是骨形成细胞, 对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡与骨量维持起关键作用。而创伤愈合过程中最重要的细胞活动之一就是增殖分化。本实验即通过体外培养的方法, 探讨壳寡糖及其衍生物 N-乙酰氨基葡萄糖、氨基葡萄糖、羧甲基壳寡糖对体外培养的成骨细胞MC3T3-E1增殖分化的促进作用。

1 材料和方法

**设计:** 对比观察。

**时间及地点:** 实验于2004-02/2005-07在中国海洋大学海洋生命学院生化实验室完成。

**材料:** 小鼠颅骨成骨细胞株MC3T3-E1由北京协和医院细胞中心提供; N-乙酰氨基葡萄糖、壳寡糖, 氨基葡萄糖、羧甲基壳寡糖(本实验室自制, 按细胞培养要求进行纯化, 用培养基溶解, 0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, 并稀释到相应浓度); 羟乙基呱嗪乙硫磺酸、

MTT (Sigma公司); 胎牛血清 (HyClone公司); DMEM培养基、胰蛋白酶 (Gibco公司); 二甲基亚砜(天津市化学试剂二厂, 分析纯); RNA试剂盒 (上海华舜生物工程公司); Taq 酶 (上海申能博彩生物科技有限公司); 锚定引物 (上海生工生物工程技术有限公司)。仪器: DG3022A酶标仪 (国营华东电子管厂); PHS-3 数字酸度计 (国营杭州万达仪器表厂); 倒置式系统显微镜 (日本Olympus); BB16F CO<sub>2</sub>培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); TGL-16C台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 9700聚合酶链反应仪 (美国ABI)。

**实验过程:**

**细胞培养:** 成骨细胞株MC3T3-E1用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养。细胞在培养瓶中长满至单层后, 用0.02%乙二胺四乙酸二钠与0.05%胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液(5.0×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>)。每孔加100 μL细胞悬液, 接种于96孔板。在体积分数为0.05的CO<sub>2</sub>, 37 °C培养箱中预培养24 h后, 吸弃原培养液, 换成每孔100 μL无血清培养液, 继续培养24 h。之后再换成含不同质量浓度, 分别为10, 100, 500, 1 000, 2 000 mg/L壳聚糖及其衍生物的培养液, 培养48 h。每孔加入5 g/L MTT 20 μL, 常规孵育4 h。将各孔原有液体吸弃, 加入100 μL二甲基亚砜, 微量搅拌器上混匀约40 s, 用酶标仪于490 nm比色(A<sub>490</sub>)。结果以A值表示, 计算成骨细胞细胞增殖率为A/A<sub>0</sub>×100%。实验重复3次。所得数据进行F检验。并在倒置显微镜下观察细胞的生长情况。

**mRNA差异显示分析:** 将用4种糖培养48 h后的成骨细胞按试剂盒方法提取mRNA并进行纯化, 然后进行纯度检测。取相同量的mRNA作为反转录模板, 合成cDNA的第一链, 反应体系(25 μL)包括: 8 μL总RNA, 锚定引物(20 μmol/L)5 μL, 混合, 70 °C, 5 min, 立即置于冰上; 向反应体系中依次加入5×M-

MLVbuffer 5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 5  $\mu$ L, RNasin (40 U/ $\mu$ L) 0.7  $\mu$ L, M-MLV(200 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 焦碳酸二乙酯0.3  $\mu$ L, 混合, 42  $^{\circ}$ C, 1 h; 95  $^{\circ}$ C, 5 min灭活反转录酶, 终至反应, -20  $^{\circ}$ C保存备用。然后进行聚合酶链反应扩增。20  $\mu$ L的聚合酶链反应扩增体系包括: cDNA第一链 1  $\mu$ L, 锚定引物 (2  $\mu$ mol/L), 随机引物 (2  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, 10 $\times$ 聚合酶链反应buffer 2  $\mu$ L, Taq E (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.6  $\mu$ L, 扩增条件如下: 94  $^{\circ}$ C 3 min后, 94  $^{\circ}$ C 1 min, 41  $^{\circ}$ C 2 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 共30个循环, 循环完成后72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C保存备用。在上述扩增产物中加入等体积的变性缓冲液, 94  $^{\circ}$ C变性5 min, 迅速冰上冷却, 取5  $\mu$ L在6%变性聚丙烯酰胺凝胶上500 V恒电压电泳。

**主要观察指标:** 成骨细胞增殖和生长情况。mRNA电泳条带。

**设计、实施、评估者:** 设计为第一作者, 实施为全部作者, 评估为第一、第二作者, 评估者经过正规培训。

## 2 结果

### 2.1 MTT测定结果 见图1。

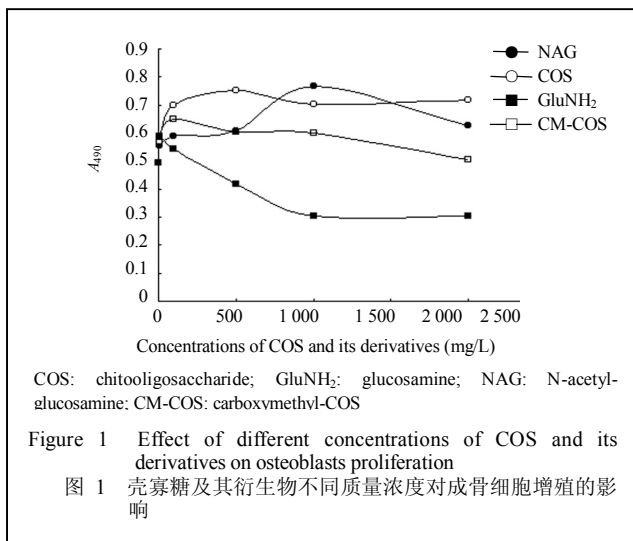


图1结果表明, N-乙酰氨基葡萄糖在实验设置的5个质量浓度梯度10, 100, 500, 1000, 2000 mg/L均能促进成骨细胞增殖, 1000 mg/L时效果最为明显; 壳寡糖在各质量浓度下都表现出促进细胞增殖的作用, 500 mg/L为最适质量浓度, 其细胞的增殖率是对照组的152.26%; 氨基葡萄糖表现出双向调节作用, 在低质量浓度下 (10, 100 mg/L) 有促进作用, 而高质量浓度时 (> 500 mg/L) 则表现出抑制作用; 羧甲基壳寡糖在各浓度下均表现出一定的促进成骨细胞生长的作用, 但促进效果较N-乙酰氨基葡萄糖和壳寡糖弱。

### 2.2 成骨细胞培养48 h后光镜观察结果 见图2。

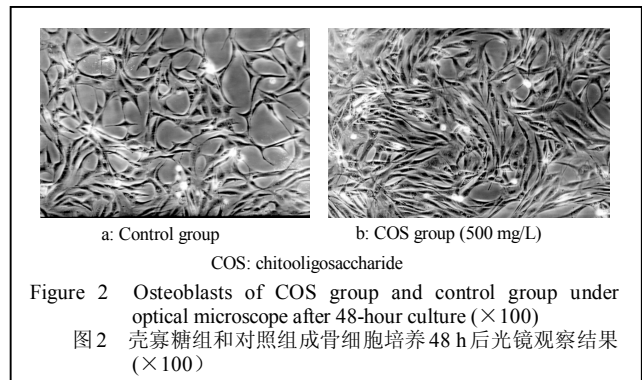


图2结果显示, 在培养瓶中进行正常体外培养的成骨细胞呈梭形、三角形等, 细胞株生长状态良好, 胞浆丰富, 细胞及核膜界限清晰, 胞体透明, 生长速度较快。加入4种样品后的培养细胞, 除了氨基葡萄糖高质量浓度时表现出抑制作用外, 各质量浓度下的细胞密度都高于对照组, 其总体情况与MTT法检测的结果相一致。

### 2.3 mRNA差异显示结果 RNA提取结果见图3。cDNA差异显示图谱见图4。

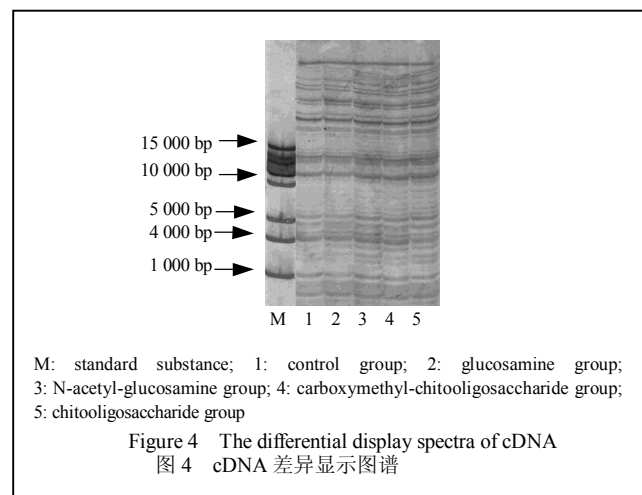
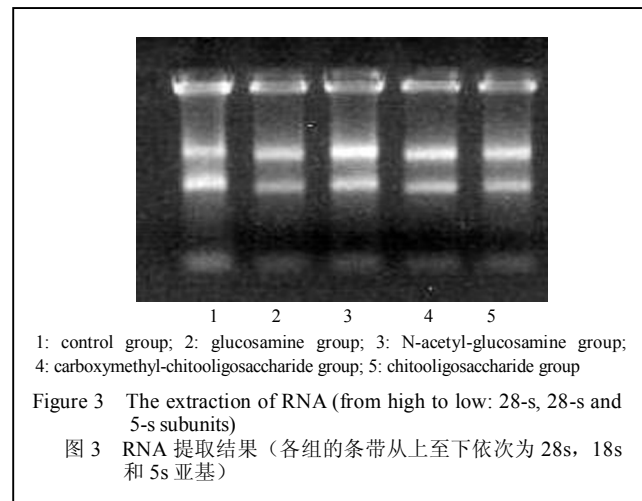


图3, 4结果显示, 成骨细胞合成旺盛, 表达蛋白较多,



但大部分的条带基本相似, 只有少数存在差异, 且仅是在表达量上存在细微差异, 证明4种糖并无明显激活新基因的产生。

### 3 讨论

关于甲壳素、壳聚糖及其衍生物对体外培养细胞的作用已有许多研究<sup>[10-13]</sup>, 其与成骨细胞的相容性方面也有相关报道<sup>[14-16]</sup>, 但是关于其对体外培养成骨细胞的直接作用鲜有报道<sup>[17-18]</sup>, Klokkevold等<sup>[18]</sup>研究了壳聚糖对体外成骨细胞分化和骨形成的影响, 取胎鼠颅盖骨间充质细胞按 $3.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度种植于培养皿中, 加入2 g/L壳聚糖200 mL的0.2%乙酸溶液共同培养14 d, 发现其成骨细胞克隆形成率明显高于未加壳聚糖的对照组, 新生骨组织的平均面积亦明显高于对照组。其实验结果表明, 壳聚糖具有促进前成骨细胞分化、加速骨形成的作用。

体外成骨细胞培养是观察不同受试物对离体成骨细胞影响的良好模型。通过MTT法对细胞数量的测定, 可以客观地评价所选择的受试物在细胞水平的效果。

成骨细胞的体外培养自1964年首次获得成功至今已有40多年的发展历史, 细胞培养可取材于骨组织、骨膜组织、骨髓组织和骨外组织<sup>[19-21]</sup>。这些来源不同的成骨细胞, 在形态结构、生物学特性、功能及分离和培养方法上没有明显差别。本实验采用小鼠颅骨成骨细胞株MC3T3-E1进行实验, 可避免成骨细胞原代培养中存在的种种问题, 如成骨细胞群体的不均一性, 成纤维细胞的污染等。同时, 在加入壳聚糖及其衍生物前用无血清培养基培养24 h, 不仅能保证大多数细胞在受试前处于同一细胞分裂相, 排除因为细胞分化状态不同而可能引起的增殖差异, 而且能排除血清中含有多种物质的可能影响, 从而显示纯粹的受试物的作用<sup>[22]</sup>。

本实验初步探讨了壳寡糖及其衍生物对成骨细胞体外增殖的作用, 证明4种糖对成骨细胞体外培养均有明显的促进作用, 其中, N-乙酰氨基葡萄糖和壳寡糖的效果要优于氨基葡萄糖和羧甲基壳寡糖。mRNA差异显示结果表明4种糖并无明显激活新基因的产生, 其促进成骨细胞增殖的具体机制还有待进一步探索。

### 4 参考文献

- 1 Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(8):1047-1067
- 2 Liyun J, Yubao L, Li Z, et al. Preparation and properties of a novel bone repair composite: nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(3): 981-987

- 3 Jiang T, Kumbar SG, Nair LS, et al. Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Top Med Chem* 2008;8(4):354-364
- 4 Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm* 2004;274(1-2):1-33
- 5 Su GY, Liu SX, Li CF. *Guangdong Nongye Kexue* 2008; 44 (2): 107-111  
苏广宇, 刘四新, 李从发. 甲壳素/壳聚糖的研究与应用概况[J]. *广东农业科学*, 2008, 44 (2): 107-111
- 6 Che XQ, Sun QS, Zhao K. *Gaofenzi Tongbao* 2008; 21 (2): 45-49  
车小琼, 孙庆申, 赵凯. 甲壳素和壳聚糖作为天然生物高分子材料的研究进展[J]. *高分子通报*, 2008, 21 (2): 45-49
- 7 Wang L, Pan KF, Huang YL. *Kouqiang Hemian Waikie* 2007; 17 (4): 369-373  
王磊, 潘可风, 黄远亮. 甲壳素、壳聚糖在骨修复方面的研究进展[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2007, 17 (4): 369-373
- 8 Wang SB, Shen RW, Gong SL, et al. *Zhongguo Haiyang Yaowu* 2004; 23 (3): 7-10  
王守彪, 沈若武, 龚少兰, 等. 甲壳质衍生物促进骨折愈合的实验研究[J]. *中国海洋药物*, 2004, 23 (3): 7-10
- 9 Jin LM, Liu WS, Han BQ. *Gaojishu Tongxun* 2004; 14(11):87-92  
金黎明, 刘万顺, 韩宝芹. N-乙酰氨基葡萄糖促进骨缺损愈合作用的研究[J]. *高技术通讯*, 2004, 14(11):87-92
- 10 Matsuda N, Horikawa M, Yoshida M, et al. Enhanced DNA synthesis accompanied by constitutive phosphorylation of the ERK pathway in human fibroblasts cultured on a polyelectrolyte complex. *Biomaterials* 2003;24(26): 4771-4776
- 11 Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 2001;22(22): 2959-2966
- 12 Qiao XH, Song L, Li BL, et al. *Yixue Linchuang Yanjiu* 2003; 20 (4): 259-260  
乔新惠, 宋岚, 李邦良, 等. 甲壳低聚糖对非肥胖性糖尿病小鼠胰岛细胞生长及胰岛素分泌量的影响[J]. *医学临床研究*, 2003, 20 (4): 259-260
- 13 Hwang SM, Chen CY, Chen SS, et al. Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(1):229-233
- 14 Li Y, Li SP. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2007; 27(1):65-68  
李毅, 李少萍. 聚乳酸-甲壳素接骨板的体外细胞毒性研究[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(1):65-68
- 15 Amaral IF, Cordeiro AL, Sampaio P, et al. Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007;18(4):469-485
- 16 Mohammadi Y, Soleimani M, Fallahi-Sichani M, et al. Nanofibrous poly(epsilon-caprolactone)/poly(vinyl alcohol)/chitosan hybrid scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs* 2007;30(3):204-211
- 17 Wei changzheng, Liu wanshun, Han baoqin. Activities of the derivatives of chitin on the osteoblast proliferation and the effect on bone strength in ovariectomized rats. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2006, 11(3):715-719
- 18 Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, et al. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol* 1996;67(11):1170-1175
- 19 Yang YS, Sun JY, Zhu W, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu* 2007; 11 (3): 431-434  
杨玉生, 孙俊英, 朱伟, 等. 松质骨源性人成骨细胞的分离培养和细胞密度效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11 (3): 431-434
- 20 Li JH, Yin MZ, Li SP, et al. *Wuhan Ligong Daxue Xuebao* 2007; 29(4):55-57  
李建华, 尹美珍, 李世普, 等. 兔成骨细胞体外培养体系的研究[J]. *武汉理工大学学报*, 2007, 29(4):55-57
- 21 Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, et al. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998;101(3): 567-574
- 22 Qin LM, Xiao YH, Zhou LZ, et al. *Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi* 2002; 8 (2): 18-21  
秦腊梅, 肖永华, 周丽珍, 等. 4味中药对体外培养成骨样细胞增殖的影响--对通补强骨方中主要组成药物的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2002, 8 (2): 18-21