

钟海波,郭祥,黄琳惠. 葛根素通过 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 78-83.

Zhong HB, Guo X, Huang LH. Puerarin stimulates osteogenesis and bone formation through ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 78-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.013

葛根素通过 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制

钟海波¹, 郭祥¹, 黄琳惠²

(1.中南大学湘雅医学院附属海口医院骨科,海口 570208;2.海南省人民医院呼吸与危重症医学科,海口 570311)

【摘要】 目的 探究葛根素通过 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制。**方法** 分离培养成人成骨细胞(MC3T3-E1),运用 MTT 法对比加入不同浓度葛根素后细胞增殖能力和对生长曲线的影响。通过测定碱性磷酸酶活性检测葛根素对成骨细胞分化的影响。通过测定钙沉积量分析葛根素对骨形成的影响。通过 ERK1/2 阻断剂 PD8089,p38 抑制剂 SB203580 的加入分析 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制。利用蛋白质免疫印迹(WB)检测细胞骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)的表达。**结果** 不同浓度葛根素干预成骨细胞,可以不同程度上促进其增殖,1 μmol/L 葛根素组效果最明显。第 1 天和第 3 天较空白组增殖趋势不明显,第 5 天和第 7 天较空白组有明显差异。葛根素可以激活碱性磷酸酶活性,初级成骨细胞分化。葛根素可以促进钙的沉积,刺激骨形成。使用 ERK1/2 阻断剂 PD8089 后,或用抑制剂 SB203580 阻断 p38 MAPK 信号通路后,细胞增殖、碱性磷酸酶含量以及钙沉积量均较葛根素组有所下降。葛根素组(T group)BMP-2 表达高于对照组($P<0.05$);葛根素+PD8089 组(T+PD group)低于 T 组高于对照组;葛根素+SB203580 组(T+SB group)钙沉积量较 T 组明显降低($P<0.05$),与对照组 BMP-2 表达量相比亦降低($P<0.05$)。**结论** 葛根素在骨细胞周期过程中,ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路对骨分化和骨形成起到了调控作用。

【关键词】 葛根素;信号通路;骨分化;骨形成

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0078-06

Puerarin stimulates osteogenesis and bone formation through ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways

ZHONG Haibo¹, GUO Xiang¹, HUANG Linhui²

(1.Department of Orthopedics, Haikou Hospital Affiliated to Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, China.2.Department of Respiratory and Critical Medicine, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which puerarin stimulates osteogenesis and bone formation through the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. **Methods** Adult osteoblasts (MC3T3-E1) cell culture was used in this study.The proliferative ability and the influence of growth curve of the cells after added different concentrations of puerarin were compared by MTT staining. The effect of puerarin on the differentiation of osteoblasts was assessed by

[作者简介]钟海波(1979—),男,主治医师。研究方向:中医骨伤的基础与临床研究。E-mail: 13907556602@139.com

measuring alkaline phosphatase activity and the effect of puerarin on bone formation was analyzed by measuring calcium deposition. Through the addition of ERK1/2 blocker PD8089 and p38 inhibitor SB203580, the mechanisms of involvement of the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways in stimulating osteogenesis and bone formation were analyzed. Western blotting was used to detect the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). **Results** Different concentrations of puerarin promoted the proliferation of osteoblasts to different degrees. The effect of puerarin at 0.1 mol/L was the most significant. The trend of proliferation was not pronounced on the first and third days compared with the level in the blank group, but significant differences emerged between the fifth and seventh days. Puerarin activated alkaline phosphatase activity and promoted the differentiation of primary osteoblasts. It also promoted calcium deposition and stimulated bone formation. After using the ERK1/2 blocker PD8089 or blocking the p38 MAPK signaling pathway with the inhibitor SB203580, cell proliferation, alkaline phosphatase content, and calcium deposition were lower than those of the puerarin group. The expression of BMP-2 in group puerarin (T) was higher than that of the control group ($P<0.05$), and that of group puerarin+PD 8089 (T+PD) was lower than that of group T, while the amount of calcium deposition in the group puerarin+SB 203580 (T+SB) was significantly lower than that in group T ($P<0.05$), and there was a decrease ($P<0.05$) in the BMP-2 expression compared with that in the control group. **Conclusions** In the cell cycle in bone, puerarin and the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways play regulatory roles in bone differentiation and bone formation.

[Keywords] puerarin; signal transduction pathway; bone differentiation; bone formation

葛根在我国多地均有种植,它是一种药食同源的中药,素来与人参相媲美。葛根素(puerarin, Pur)是葛根中的主要药理成分,其化学名为 4, 7-二羟基-8-D-葡萄糖基异黄酮,分子量为 416^[1-2]。一些研究发现,葛根素能够刺激成骨细胞的活性或者抑制破骨细胞的功能,对预防和治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)有一定临床效果^[3-4]。骨质疏松病理机制的一个重要方面是成骨细胞的增殖与分化受到抑制。越来越多的研究者开始探寻葛根素对骨髓间质干细胞的作用和在骨代谢过程中的角色。在骨组织中,主要功能细胞是成骨细胞,其可能来自骨膜组织、骨组织和骨髓组织。细胞的增殖和分化是生命体进化过程中的基本属性,因此细胞存在有两种状态,增殖和功能状态。MAPK(motigen activated protein kinase)信号通路是骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向成骨细胞定向增殖分化重要信号通路之一,其中包括 ERK1/2(extracellular signal-regulated kinases 1 and 2)和 p38 MAPK 这两条并行且作用相反的信号通路^[5-7]。p38 MAPK 通路可以促进成骨细胞的分化,而 ERK1/2 通路却对成骨细胞的分化起到抑制作用,两条通路间的协同平衡将决定 BMSCs 是否向成骨细胞分化^[8]。本实验通过观察葛根素对人成骨细胞增殖分化以及对 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路的作用,从细胞水平探讨其刺激骨分化和骨形成的作用机制,为葛根素在临床上的进一步开发利用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

成人成骨细胞(MC3T3-E1)购自中国医学科学院细胞中心(批号:2017-2208)。

1.2 主要试剂与仪器

葛根素(HPLC>98%)购自辽宁中成制药有限公司(批号:20166529);胎牛血清,DMEM 培养液、胰蛋白酶、蛋白酶 E 购自美国 Sigma 公司;ERK1/2 阻断剂 PD8089, p38 抑制剂 SB203580、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒、钙测定试剂盒购自 ZYMED 公司;BMP-2 单克隆抗体(亚诺法生技台湾总公司,货号 H00000650-M06);FITC 标记亲和纯化绵羊抗小鼠 IgG(H+L)二抗,(Jackson 公司,货号 515-095-003;1:4000)。

二氧化碳培养箱(上海美谱达有限公司);酶标仪(上海智城有限公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

选用 3~6 代生长状态良好的 MC3T3-E1 成骨细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,以每孔 1.0×10^4 均匀接种于 96 孔板。用 10% FCS+DMEM 培养液继续培养,待细胞贴壁生长至 70~85% 融合时,用 0.5% FCS+DMEM 培养液替换原培养液,继续培养(37℃, 5% CO₂),作细胞生长曲线,确定细胞生长的对数期。

1.3.2 不同浓度葛根素对成骨细胞增殖的影响

细胞培养液中分别加入浓度为 0 μmol/L、0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L 葛根素的等体积 0.5%FCS+DMEM 培养液作用,分析其对细胞增殖的影响。

1.3.3 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路对成骨细胞的影响

分 4 组:对照组(Control group),T 组(1 μmol/L 葛根素,T group),T+PD 组(1 μmol/L 葛根素+10 μmol/L ERK1/2 阻断剂 PD8089,T+PD group),T+SB 组(1 μmol/L 葛根素+10 μmol/L p38 抑制剂 SB203580,T+SB group)均培养 5 d,细胞接种于 96 孔板,每组设 24 孔,3 次重复。

1.3.4 MTT 法检测细胞增殖

待测细胞液中加入 MTT 溶液(5 mg/mL)每孔 20 μL,继续孵育 4 h,每孔再加入 150 μL 二甲基亚砷,室温摇床振荡 10 min 使其充分溶解,后在酶标仪上 49 nm 处测定吸光值(OD 值)。并且,根据 MTT 绘制细胞生长曲线;选用 3~6 代生长状态良好的 MC3T3-E1 成骨细胞,按以每孔 1.0x10⁴ 均匀接种于 96 孔板,共 7 板,从第一天开始,每天取出一板细胞进行 MTT 比色,一共检测七天。根据每组细胞的 OD 均值绘制成骨细胞生长曲线。

1.3.5 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)测定

PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,0.04 g/L 蛋白酶 E 消化,加入底物 0.09 mol/L p-磷酸硝基酚,在 pH 10.3 的反应液内,37℃下反应 30 min,最后加入 0.1 mol/L NaOH 终止反应。结果以酶标仪在 405 nm 处测得的吸光度(OD)值表示,每组做 6 个重复,ALP 活性单位为 mmol/(L·min·g)pro。

1.3.6 钙沉积量的测定

PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,每孔加入 200 μL 0.6 mol/L 盐酸脱钙 24 h,用 ZYMED 公司钙测定试剂盒检测上清液中的钙浓度。钙沉积量表示为 mg/g pro。

1.3.7 利用蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)检测细胞 BMP-2 表达

提取总蛋白,使用 BCA 蛋白浓度试剂盒对其进行蛋白定量,并使用溴酚指示剂制备 SDS-PAGE 电泳样品。选取 5%的浓缩胶和 10%的分离胶,取 20 μL 蛋白样品进行上样,电泳结束后,参照 Marker 切取目的条带和 β-actin 分子量所在的凝胶制成“三明治”结构,200 mA 恒流 90 min,将蛋白转移至 PVDF

膜上。使用 10%的脱脂乳粉溶液对 PVDF 膜进行封闭 2 h 后,BMP-2 单克隆抗体(亚诺法生技台湾总公司,货号 H00000650-M06;1: 1000)4℃ 孵育过夜。使用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,FITC 标记亲和纯化绵羊抗小鼠 IgG(H+L)二抗,(Jackson 公司,货号 515-095-003;1: 4000)室温孵育 2 h,用 TBST 洗膜三次,使用 ECL 化学发光液对蛋白进行显色成像。

1.4 统计学方法

本研究中数据全部采用 SPSS 20.0 统计分析软件(美国 IBM 公司)进行处理;计量资料采用“平均数±标准差”(x̄±s)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验;计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用 χ² 分析;以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞生长曲线

如图 1 所示,成骨细胞生长曲线呈“S”形,第 3~5 天为细胞生长对数期,第 5 天后进入平台期。

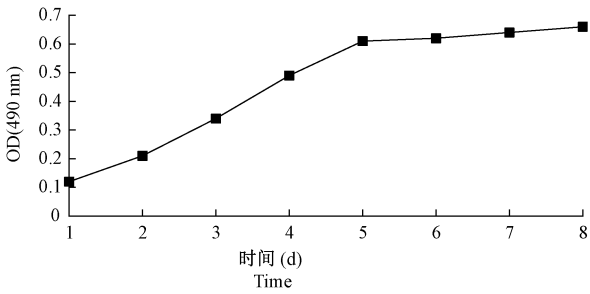


图 1 MC3T3-E1 成骨细胞生长曲线
Figure 1 Growth curve of the MC3T3-E1 osteoblasts

2.2 不同浓度葛根素对成骨细胞增殖的影响

加葛根素干预 1 天和 3 天后,各组的 OD 值与对照组无明显差异(P>0.05)。加葛根素干预 5 天和 7 天各组均高于对照组,且 1 μmol/L 葛根素组的 OD 值高于其他组,差异具有统计学意义(P<0.05),见表 1。

2.3 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路对成骨细胞增殖的影响

成骨细胞加入 1 μmol/L 葛根素能促进成骨细胞的增殖,T 组高于对照组(P<0.01);T+PD 组细胞加入 10 μmol/L ERK1/2 阻断剂 PD8089 干预后低于 T+SB 组(P<0.05);T+PD 组和 T+SB 组的 OD 490 值与 T 组比较有所下降(均 P<0.01),但均大于对照组(均 P<0.01)。

2.4 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响

T 组 ALP 活性高于对照组 ($P<0.001$);T+PD 组 ALP 活性低于 T 组,高于对照组 ($P<0.01$);T+SB 组 ALP 的表达较 T 组更低 ($P<0.01$),与对照组比较其 ALP 活性亦较低 ($P<0.01$),见图 2。

2.5 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路对钙沉积量的影响

T 组钙沉积量高于对照组 ($P<0.001$);T+PD 组低于 T 组,高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.01$);T+SB 组钙沉积量较 T 组降低 ($P<0.01$),与对照组比较其钙沉积量亦较低 ($P<0.01$),见图 3。

2.6 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路对细胞 BMP-2 表达的影响

T 组 BMP-2 表达高于对照组 ($P<0.001$);T+PD 组低于 T 组,高于对照组;T+SB 组钙沉积量较 T 组

降低 ($P<0.001$),与对照组 BMP-2 表达量相比亦降低 ($P<0.01$),见图 4。

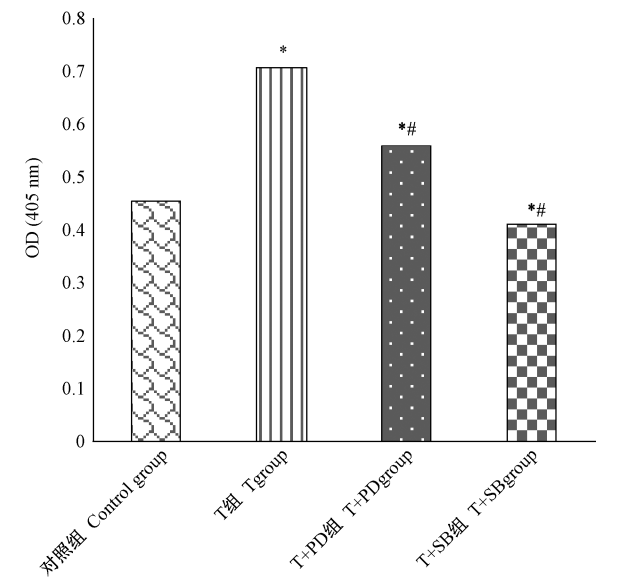
3 讨论

成骨细胞的增殖与分化受到抑制是骨质疏松症的主要致病机理,因其不能形成一定量的胶原性蛋白和非胶原性蛋白,降低了骨密度和骨质量,最终导致骨断裂。成骨细胞是骨代谢的主要功能细胞,其增殖和分化很大程度上决定了最终形成的骨量。

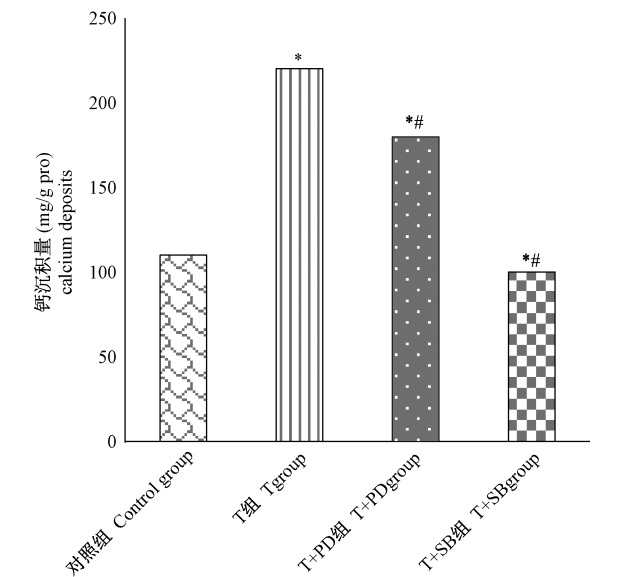
中草药葛根是豆科植物野葛或甘葛藤的干燥根。大量的药理研究和临床试验表明,其主要成分葛根素能够改善心肌微循环代谢、扩张冠状血管、降低血管的阻力、降血糖、改善心肌缺血的功效^[9-10]。同时,葛根素还能起到抗氧化、清除超氧阴离子和 OH⁻,抑制 H₂O₂ 引起的细胞溶血和过氧化

表 1 MTT 检测细胞增殖结果 [log(1/trans)] (n=24)
Table 1 MTT detection of cell proliferation [log(1/trans)]

组别 Groups	第 1 天 OD 值 Day1 OD	第 3 天 OD 值 Day3 OD	第 5 天 OD 值 Day5 OD	第 7 天 OD 值 Day7 OD
空白对照组 Control group	0.123 ± 0.017	0.320 ± 0.014	0.596 ± 0.016	0.645 ± 0.015
0.1 μmol/L 葛根素组 0.1 μmol/L Par group	0.126 ± 0.012	0.318 ± 0.018	0.664 ± 0.041	0.688 ± 0.036
1 μmol/L 葛根素组 1 μmol/L Par group	0.128 ± 0.006	0.322 ± 0.015	0.682 ± 0.035	0.702 ± 0.046
10 μmol/L 葛根素组 10 μmol/L Par group	0.125 ± 0.010	0.298 ± 0.022	0.621 ± 0.034	0.655 ± 0.026
P 值 P-value	0.251	0.105	0.021	0.005



注:与对照组相比,* $P<0.01$;与 T 组相比,# $P<0.01$ 。
图 2 各组成骨细胞 ALP 的活性变化情况
([mmol/(L·min·g pro)], n=24)
Note.Compared with control group,* $P<0.01$.Compared with T group,# $P<0.01$.



注:与对照组相比,* $P<0.01$;与 T 组相比,# $P<0.01$ 。
图 3 各组钙沉积量的比较 (mg/g pro, n=24)
Note.Compared with control group, $P<0.01$.Compared with T group,# $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of the amount of calcium deposits in each group(mg/g)

Figure 2 Changes in the activity of ALP in each bone cell [mmol/(L·min·g pro)]

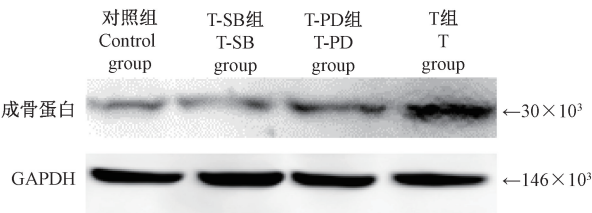


图 4 各组细胞 BMP-2 表达的比较($n=24$)
Figure 4 Comparison of the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in each group of cells

物的生成。葛根素还能抑制 HL-60 细胞的增殖,从而抑制肿瘤的形成^[10-12]。葛根素对成骨分化有正向的刺激作用,其通过对骨吸收的抑制和对骨形成的刺激作用于骨代谢,并且葛根素可诱导多种成骨前体细胞^[13-15]。葛根素可以通过抑制骨吸收刺激骨形成来参与骨代谢^[9]。本研究通过 MTT 检测结果发现,葛根素能够促进成骨细胞的增殖,干预第 1 天和第 3 天后,细胞增殖趋势不明显,从第 5 天和 7 天增殖趋势明显,且葛根素的浓度与细胞增殖速度密切相关。

骨骼是由细胞、纤维和基质所组成的一种活的组织,在一般条件下,它在不停地吸收中形成。本实验通过测定钙沉积量观察骨形成的速度。加入葛根素后成骨细胞钙沉积量和 BMP-2 明显上升,当 ERK1/2 或 p38 MAPK 信号通路被阻断后,钙沉积量和 BMP-2 均有所下降,抑制剂 SB203580 阻断 p38 MAPK 信号通路后则下降趋势更为明显。该结果表明,葛根素可以促进体外培养促进骨形成,特异性抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 通路可降低钙的吸收,p38 MAPK 通路效果更为明显。

细胞碱性磷酸酶的表达是细胞分化的早期重要指标。在本研究中,利用成骨细胞碱性磷酸酶来指示成骨细胞分化程度,加入葛根素后 ALP 表达上升,在 ERK1/2 或 p38 MAPK 信号通路被阻断后,碱性磷酸酶的活性均有所下降,本研究表明,葛根素可以促进体外培养成骨细胞的分化,特异性抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 通路可阻断葛根素对 ALP 活性的刺激作用,在成骨细胞分化过程中有着重要的作用。

本研究进而使用 ERK1/2 阻断剂 PD8089 后,或用抑制剂 SB203580 阻断 p38 MAPK 信号通路后,细胞增殖、碱性磷酸酶含量以及钙沉积量均较葛根素组有所下降。该结果证明,葛根素在骨细胞周期过程中,ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路起到了调控作用。这是因为 ERK 信号联合反应通过支

架蛋白的相互作用、亚细胞定位改变、非磷酸酶抑制物和 G 蛋白的调控等广泛并具特异性地媒介生物学过程。ERK1/2 信号通路作为丝裂原活化通路中的一种,在成骨细胞的增殖分化中有着很高的地位。p38 MAPK 信号通路主要接受成骨细胞内增殖与分化的应激信号,例如各种炎症因子(TNF- α 、IL-1)等,p38MAPK 通路激活后可调节成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的表达,促进成骨细胞分化,促进骨细胞成熟,从而调控骨形成。

综上所述,葛根素可以促进体外培养的成骨细胞的增殖与分化,促进骨形成。主要机制是葛根素通过激活 ERK1/2 和 p38 MAPK 通路刺激成骨细胞的细胞周期,激活碱性磷酸酶(ALP)的表达,促进钙的沉积,最终成骨细胞成熟分化致使骨形成,这可能是其防治和治疗骨质疏松症的机制。

参考文献:

[1] Yang B, Du S, Lu Y, et al. Influence of paeoniflorin and menthol on puerarin transport across MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model[J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(3): 349-360.

[2] Lv H, Che T, Tang X, et al. Puerarin enhances proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells via a nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2283-2290.

[3] Yuan Y, Wu ZJ, Yao HY, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase contribute to BMP4-induced alkaline phosphatase expression in MC3T3-E1 preosteoblast [J]. Chin Med J, 2006, 119(4): 324-327.

[4] Zhang Y, Yan M, Yu QF, et al. Puerarin prevents LPS-induced osteoclast formation and bone loss via inhibition of akt activation [J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39(12): 2028-2035.

[5] Lee HW, Suh JH, Kim HN, et al. Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(8): 1227-1237.

[6] Choi SC, Kim SJ, Choi JH, et al. Fibroblast growth factor-2 and-4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the P13K-Akt and ERK1/2 signaling pathways [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4): 725-736.

[7] Liao XB, Zhou XM, Li JM, et al. Taurine inhibits osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via the ERK pathway [J]. Amino Acids, 2008, 34(4): 525-530.

[8] 王文,任玲,工健楠. MAPK 信号通路与细胞凋亡的关系 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(15): 260-261.

[9] 张曼. 血管内皮细胞的 ERK 信号转导通路调节机制研究 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(25): 250-252.

[10] Tian F, Xu LH, Wang B, et al. The neuroprotective mechanism of puerarin in the treatment of acute spinal ischemia-reperfusion

injury is linked to cyclin-dependent kinase 5[J].Neurosci Lett, 2015, 584(1): 50–55.

[11] Tian F1, Xu LH, Zhao W, et al. The neuroprotective mechanism of puerarin treatment of acute spinal cord injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2013, 543(5): 64–68.

[12] Xu H, Zhao M, Liang S, et al. The Effects of puerarin on rat ventricular myocytes and the potential mechanism [J]. Sci Rep, 2016, 6(10): 35475.

[13] Deng Y, Lei T, Li H, et al. ERK5/KLF2 activation is involved in the reducing effects of puerarin on monocyte adhesion to endothelial cells and atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Biochim Biophys Acta, 2018, 1864(8): 2590–2599.

[14] Wan Q, Liu Z, Yang Y. Puerarin inhibits vascular smooth muscle cells proliferation induced by fine particulate matter via suppressing of the p38 MAPK signaling pathway [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 146.

[15] Shan Z, Cheng N, Huang R, et al. Puerarin promotes the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells via microRNA-106b by targeting receptor activator of nuclear factor- κ B ligand [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 55–60.

[收稿日期] 2018–06–20

(上接第 65 页)

[3] 任建勋,林成仁,王敏,等.多因素整合建立气滞血瘀动物模型研究[J].中药药理与临床,2007,23(5):210–211.

[4] 王少贤,白明华,陈家旭,等.关于建立中医证候模型评价量表的思考[J].中华中医药杂志,2011,26(3):531–534.

[5] 田金洲,王永炎,时晶,等.证候模型研究的思路[J].北京中医药大学学报,2005,28(5):25–27.

[6] 王琨.血瘀证动物模型体表特征及生物学基础研究[D].北京:北京中医药大学,2008.

[7] 朱龙.浅议“以方测证”法在中医动物模型研究中的运用[J].甘肃中医,2009,22(12):18–19.

[8] 任建勋,刘建勋,林成仁,等.冠心病不稳定性心绞痛患者气滞血瘀证和气虚血瘀证的生物学基础比较分析[J].中国中西医结合杂志,2010,30(4):352–356.

[9] 刘国生,王桐生,龙子江,等.盆腔炎冲剂对大鼠慢性盆腔炎模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(3):24–26.

[10] Von Tempelhoff GF, Niemann F, Schneider DM, et al. Blood rheology during chemotherapy in patients with ovarian cancer [J]. Thromb Res, 1998, 90(2): 73–82.

[11] 向海燕,王羽伦,侯连兵,等.金刚藤分散片对大鼠慢性盆腔炎血液流变学与病理组织形态学的影响[J].现代食品与药品杂志,2007,17(2):38–41.

[12] Von Tempelhoff GF, Velten E, Yilmaz A, et al. Blood rheology at term in normal pregnancy and in patients with adverse outcome events [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2009, 42(2): 127–139.

[收稿日期] 2018–08–07