

本文引文格式:程琳,姚洁,隋萍,等.表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠干细胞成骨分化作用的研究[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):315-319,335.

【论著与临床报道】

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠干细胞成骨分化作用的研究

程琳,姚洁,隋萍,李兵,陈习驰,靳攀

(长江大学医学部,湖北 荆州 434023)

**摘要:**目的 通过比较表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对大鼠干细胞的直接作用和与成骨诱导液的协同作用,探究EGCG在成骨分化中的作用。**方法** 利用全骨髓贴壁法分离大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)。培养至第三代,将细胞分为4组:A组(BMSCs);单纯用完全培养基培养BMSCs;B组(BMSCs+EGCG);将BMSCs在添加10 μmol/L EGCG的完全培养基中培养;C组(BMSCs+Osteoinductive fluid);用成骨诱导液培养BMSCs;D组(BMSCs+Osteoinductive fluid+EGCG);将BMSCs在添加10 μmol/L EGCG的成骨诱导液中培养。培养7 d和14 d,通过CCK-8检测细胞增殖情况,通过碱性磷酸酶(ALP)检测、ALP染色和成骨相关基因骨钙素(*Ocn*)、I型胶原(*Col1a1*)、骨涎蛋白(*Bsp*)、Runt相关转录因子2(*Runx2*)等的表达水平评估EGCG在大鼠干细胞成骨分化中的作用。**结果** CCK-8检测发现C组和D组细胞增殖均明显低于A组和B组,但是C组与D组差异不显著,说明EGCG对大鼠干细胞的增殖影响不明显;ALP检测中A组与B组差异不显著,D组与C组比较差异有统计学意义,且ALP染色中D组染色明显高于C组,同时在成骨相关基因表达的检测中D组mRNA表达水平也明显高于C组,这些结果说明单纯EGCG对干细胞成骨作用比较微弱,但是在成骨诱导液存在时其成骨作用大大增强。**结论** EGCG发挥促进成骨作用需要依赖其它因素,其自身不能启动成骨过程。

**关键词:**表没食子儿茶素没食子酸酯;干细胞;成骨分化;骨质疏松症

中图分类号:R580

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)03-0315-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.03.002

### Effect of epigallocatechin gallate on osteogenic differentiation of rat stem cells

Cheng Lin, Yao Jie, Sui Ping, Li Bing, Chen Xichi, Jin Pan

(Health Science Center, Yangtze University, Jingzhou 434023, Hubei, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the influence of epigallocatechin gallate (EGCG) on osteogenic differentiation via comparing the direct effect of EGCG and synergistic effect with osteoinductive fluid on rat stem cells. **Methods** The bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of the rats were isolated by the method of whole bone marrow adherence. In the third generation, the cells were divided into four groups: Group A, Group B, Group C and Group D. In Group A (BMSCs), the BMSCs were cultured in the complete medium alone. In Group B (BMSCs+EGCG), the BMSCs were cultured in the complete medium supplemented with 10 μmol/L EGCG. In Group C (BMSCs+osteoprostheses fluid), the BMSCs were cultured with osteogenic induction fluid. In Group D (BMSCs+Osteoprostheses fluid+EGCG), the BMSCs were cultured in osteogenic induction fluid supplemented with 10 μmol/L EGCG. On the 7th and 14th day of culture, the cell proliferation was detected by CCK-8. The role of EGCG in osteogenic differentiation of rat stem cells was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) assay, ALP staining and the expression levels of osteogenesis-related genes such as osteocalcin (*Ocn*), type I collagen (*Col1a1*), bone sialoprotein (*Bsp*) and Runt-associated transcription factor 2

基金项目:国家自然科学基金项目(81860386);长江大学“校级大学生创新创业训练计划项目”(Yz2021292)

第一作者简介:程琳(1999-),女,在读临床医学专业本科,E-mail:1060568670@qq.com

通讯作者简介:靳攀(1986-),男,博士,讲师,硕士研究生导师,研究方向:骨与软组织再生修复研究,E-mail:jinpansh@163.com

(Runx2). **Results** CCK-8 detection showed that cell proliferations in group C and D were lower than those in group A and B. However, no significant difference was found between group C and group D, which demonstrated that EGCG had no obvious effect on the proliferation of rat stem cells. There was no significant difference between group A and group B in ALP detection. There was statistically significant difference between group D and group C, and ALP staining in group D was significantly higher than that in group C. Meanwhile, in the detection of osteogenesis-related gene expressions, the mRNA expression level of group D was also significantly higher than that of group C. These results indicated that EGCG alone had a weak osteogenic effect on stem cells, but its osteogenic effect was greatly enhanced in the presence of osteogenic induction fluid. **Conclusion**

EGCG's role in promoting osteogenesis depends on other factors, and it cannot initiate the osteogenesis process by itself.

**Key words:** EGCG; stem cells; osteogenic differentiation; osteoporosis

骨质疏松症是一种慢性代谢性骨疾病,在骨重建过程中,当骨吸收超过骨形成时就会发生<sup>[1]</sup>,尤其相伴的骨量低下、骨脆性增加和易发生骨折等问题更是严重威胁人群健康。有研究报道绝经后妇女饮茶能显著提高骨密度<sup>[2]</sup>,我国流行病学调查也显示饮茶可以提高骨密度、防骨质疏松的发生<sup>[3]</sup>。绿茶中的主要成分为儿茶素,其属于茶多酚(tea polyphenols)中的一种,主要种类有表儿茶素(epicatechin, EC)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin gallate, EGCG],目前研究认为其中主要发挥作用的是 EGCG<sup>[4]</sup>。多项研究证实 EGCG 无论体内动物实验还是体外细胞实验均有明显的促进成骨作用<sup>[5-7]</sup>,但是其促进成骨是 EGCG 自身的作用还是必须在其它因素参与下才能发挥作用目前尚不清楚。本研究拟通过比较 EGCG 对大鼠干细胞的直接作用和与成骨诱导液的协同作用,探究 EGCG 在成骨分化中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin gallate, EGCG, 纯度  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, 美国];SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠(5 日龄)5 只(购自广西医科大学实验动物中心); $\alpha$ -MEM 培养基(Gibco, 美国);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 中国);胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(0.25%)、青链霉素混合液(100x)(北京索莱宝科技有限公司, 中国);CCK-8(Biosharp 公司, 中国);RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(碧云天生物技术研究所, 中国);碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒、碱性磷酸酶染液(南京建成生物工程研究所, 中国);总 RNA 小量抽提试剂盒(双柱型)(广州美基生物科技有限公司, 中国);PCR 引物(北京六合华大基因科技股份有限公司, 中国);逆转录试剂盒

(TaKaRa, 日本);PCR 试剂盒(巴塞尔罗氏公司, 瑞士);RNase-free water(上海生工生物工程股份有限公司, 中国);全波长酶标仪(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific 公司, 美国);洁净工作台(素净集团苏州安泰空气技术有限公司, 中国);二氧化碳培养箱(Thermo Scientific™ Forma Series II Water-Jacketed, 赛默飞公司, 美国);倒置荧光显微镜(尼康 Nikon 公司, 日本);常温离心机(Eppendorf 公司, 德国);核酸检测仪(Thermo Fisher Scientific, 美国);多槽梯度 PCR 仪(ProFlex, Applied Biosystems, 美国);实时荧光定量 PCR 仪(LightCycler 96, 罗氏公司, 瑞士)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 干细胞的提取与培养 利用全骨髓贴壁法分离大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)<sup>[8]</sup>,将新生 3~7 d Sprague-Dawley(SD)乳鼠颈椎脱臼法处死,于 75%酒精中浸泡 5 min 消毒,转移至无菌洁净工作台中,剪下双侧大腿,左手持无菌纱布,右手拿无菌小剪刀除去皮肤、皮下肌肉、神经和血管后剔净股骨,放入无菌 PBS 洗 3 次;将股骨两端干骺端剪掉,暴露髓腔,用 1 mL 注射器抽吸完全培养基(按照 90 mL 高糖培养基加入 10 mL 胎牛血清和 1 mL 青链霉素的比列配制)多次冲洗股骨髓腔,直至骨髓冲洗干净、股骨完全发白为止。补充培养基至常用量,将培养皿移入培养瓶中,置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,2 d 后初次换液,以后每 3 d 换液,待细胞铺面瓶底面积 80%左右时传代培养。

1.2.2 实验分组 培养至第三代,将细胞分为 4 组:A 组(BMSCs):单纯用完全培养基培养 BMSCs, B 组(BMSCs + EGCG):将 BMSCs 在添加 10  $\mu$ mol/L EGCG 的完全培养基中培养, C 组(BMSCs + Osteoinductive fluid):用成骨诱导液培养 BMSCs, D 组(BMSCs + Osteoinductive fluid + EGCG):将 BMSCs 在添加 10  $\mu$ mol/L EGCG 的成骨诱导液中培养。

1.2.3 细胞增殖检测 将干细胞消化、离心,重悬后,用细胞计数板计数,24 孔板每孔接种 10 000 个/孔,培

养 2 d 后待细胞贴壁紧密且细胞数量有一定扩增后, 每组加入对应的培养基培养, 之后每 3 d 换液。培养至待检测时间点, 1 mL 培养基中加入 100  $\mu$ L CCK-8 溶液, 轻轻晃动后放入 37  $^{\circ}$ C 5%  $\text{CO}_2$  培养箱避光孵育 1 h, 取出 24 孔板重复振荡, 用无血清培养基对半稀释后混合均匀, 每孔吸取 200  $\mu$ L 转移至 96 孔板中, 将吸光度设定在 450 nm 处, 酶标仪检测吸光度 (OD value)。

1.2.4 ALP 检测 各组细胞在对应的培养液中培养 7 d 和 14 d 后, 吸走全部培养基, 缓慢加入 PBS 清洗 3 次。苯甲基磺酰氟 (PMSF) 加入 RIPA 裂解液中配制成 PMSF 终浓度为 100 mM 的混合液, 24 孔板每孔加入 200  $\mu$ L 混合液, 用枪头反复吹打, 充分裂解细胞。按照厂家的使用说明, 首先将蛋白标准品稀释成不同的浓度进行测量, 绘制标准曲线; 然后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测待测样品在酶标仪 562 nm 波长处的吸光度, 用标准曲线计算样品的蛋白浓度。同时将碱性磷酸酶 (AKP) 测定试剂盒中试剂取出, 按照说明书步骤进行加样, 混合均匀后 37  $^{\circ}$ C 水浴, 15 min 后加入显色剂, 混匀后于 520 nm 处测量吸光度, 通过说明书中的公式计算 ALP 活性。

1.2.5 ALP 染色 在 24 孔板接种细胞前, 每孔加入

无菌的细胞爬片, 分组后各组加入对应的培养液, 14 d 后取出细胞爬片。按照碱性磷酸酶染液说明书步骤进行, 在 PBS 溶液中清洗干净, 将细胞爬片放入固定液中固定 3 min, 然后浸入新鲜配制的底物应用液中, 避光孵育 15 min, PBS 溶液洗涤 2 min, 最后放入复染液中复染 30 s, 蒸馏水冲洗干净, 常温晾干, 中性树脂封片。

1.2.6 成骨相关基因检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 来检测成骨相关基因的表达水平, 主要包括骨钙素 (osteocalcin, *Ocn*)、I 型胶原 ( $\alpha$ -1 type I collagen, *Col1a1*)、骨涎蛋白 (bone sialoprotein, *Bsp*) 和 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, *Runx2*)。分别于培养的 7 d 和 14 d, 用总 RNA 提取试剂盒提取各个样品的总 RNA, 同时用核酸检测仪检测  $A_{260}/A_{280}$  评估 RNA 的纯度是否达标。在去除基因组 DNA 后, 采用反转录反应试剂盒合成 cDNA, 采用荧光定量法在实时荧光定量 PCR 仪上反应: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 共 40 个循环。以  $\beta$ Actin 为内参, 按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算各个基因的相对表达量。引物序列见表 1。

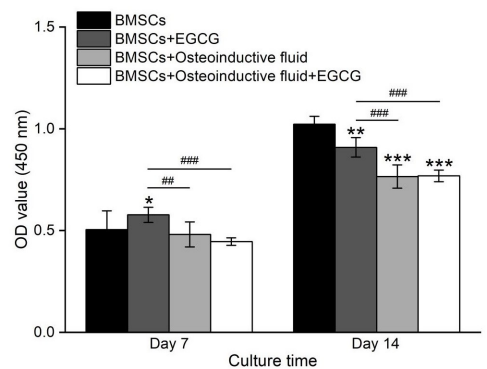
表 1 RT-PCR 引物

Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i><math>\beta</math>Actin</i>	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'
<i>Ocn</i>	5'-CAGGTGCAAAGCCAGCGAC-3'	5'-TGGGGCTCCAAGTCCATTGTT-3'
<i>Col1a1</i>	5'-GATCCTGCCGATGTCGCTAT-3'	5'-GGGACTTCTTGAGGTTGCCA-3'
<i>Bsp</i>	5'-GTGACTTGTGCACATGCGTT-3'	5'-GATTCTGCCCTCCGTAGTCG-3'
<i>Runx2</i>	5'-GTGGCCAGGTTCAACGATCT-3'	5'-TGAGGAATGCGCCCTAAATCA-3'

1.3 统计学方法 获得的计量资料数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 并使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行比较, 对数据进行最小显著性差异检验 (LSD-*t*)。采用 SPSS 26.0 软件进行分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞增殖情况 图 1 展示了各组 BMSCs 在 7 d 和 14 d 的增殖情况。CCK-8 结果显示 C 组 (BMSCs + Osteoinductive fluid) 和 D 组 (BMSCs + Osteoinductive fluid + EGCG) 细胞增殖均明显低于 A 组 (BMSCs) 和 B 组 (BMSCs + EGCG), 可以初步判断成骨诱导液对 BMSCs 的增殖有一定的抑制作用。7 d 时 B 组高于 A 组, 而 14 d 时 B 组却低于 A 组, 说明单纯 EGCG 对 BMSCs 的影响不明确; 但是 7 d 和 14 d 时 C 组和 D 组差异均不明显, 说明在成骨诱导液中 EGCG 对 BMSCs 的增殖无明显影响。

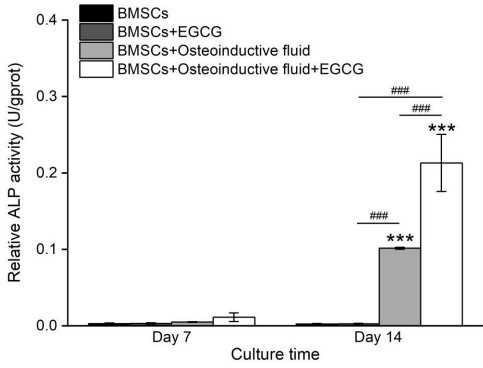


\*  $P < 0.05$ ; \*\*、\*#  $P < 0.01$ ; \*\*\*、###  $P < 0.001$ 。

图 1 不同组 BMSCs 的细胞增殖情况

2.2 ALP 检测 图 2 展示了 7 d 和 14 d 各组 BMSCs 的碱性磷酸酶 (ALP) 活性。ALP 是干细胞早期成骨分化的特异性生物标记物<sup>[9]</sup>, 7 d 时 4 组之间差异不明显, 而 14 d 时 C 组 (BMSCs + Osteoinductive fluid) 和

D组(BMSCs+Osteoinductive fluid+EGCG)的 ALP 活性明显高于 A 组(BMSCs)和 B 组(BMSCs+EGCG),A 组和 B 组差异不明显,说明成骨诱导液可以诱导 BMSCs 的成骨方向分化,加入 EGCG 明显加快了分化的进度,但是单纯 EGCG 干预对 BMSCs 的 ALP 活性影响不明显。



\*  $P < 0.05$ ; \*\*.#  $P < 0.01$ ; \*\*\*.###  $P < 0.001$ .

图 2 不同组 BMSCs 的 ALP

2.3 ALP 染色 图 3 展示了 14 d 时各组 BMSCs 的 ALP 染色。ALP 染色较弱时,细胞胞浆中出现红棕色颗粒;染色较强时,胞浆呈现棕褐色或者咖啡色,强阳性表达时染色区域甚至有团聚甚至成片现象。如图 3 所示,A 组(BMSCs)染色较弱,B 组(BMSCs+EGCG)开始出现阳性染色,主要呈现红棕色;C 组(BMSCs+Osteoinductive fluid)和 D 组(BMSCs+Osteoinductive fluid+EGCG)主要呈现棕褐色阳性区域,尤其 D 组出现了成片的阳性区域。结合 ALP 活性的检测,

ALP 染色进一步说明了 EGCG 在成骨诱导液中其促进成骨分化的作用得到了极大的提升。

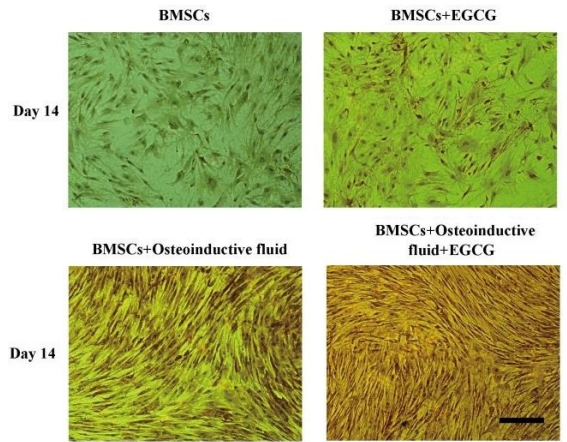
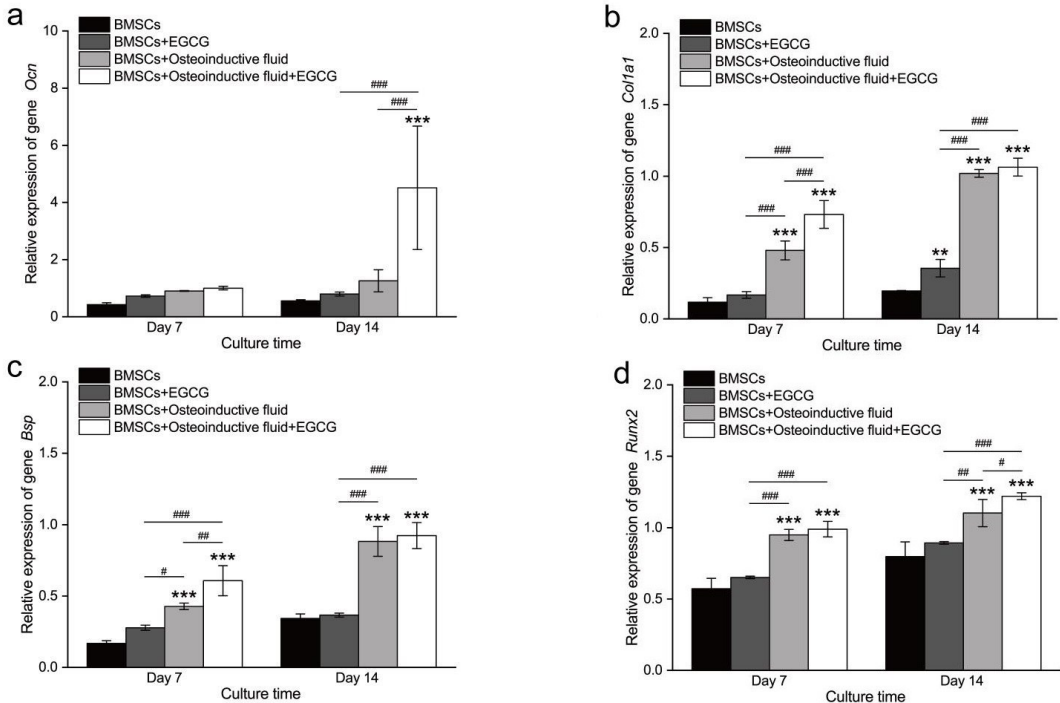


图 3 不同组 BMSCs 的 ALP 染色(标尺=100 μm)

2.4 成骨相关基因表达情况 图 4 展示了 7 d 和 14 d 各组 BMSCs 成骨相关基因的表达情况。如图 4a,A 组(BMSCs)、B 组(BMSCs+EGCG)和 C 组(BMSCs+Osteoinductive fluid)在 7 d 和 14 d 差异均无显著性,而 D 组(BMSCs+Osteoinductive fluid+EGCG)在 14 d 时 *Ocn* 基因表达水平明显高于其它组。在图 4b、4c 和 4d 中,除了 B 组 *Col1a1* 基因 14 d 时的表达水平高于 A 组之外,A、B 两组的其它基因在 2 个时间点的表达均呈现显著性差异。总体上来看,C 组、D 组成骨相关基因的表达明显高于 A 组和 B 组,图 4 中均出现 D 组的成骨相关 mRNA 表达水平显著高于 C 组的情况。



\*  $P < 0.05$ ; \*\*.#  $P < 0.01$ ; \*\*\*.###  $P < 0.001$ .

图 4 不同组 BMSCs 的成骨相关基因表达情况

## 3 讨论

骨质疏松症在宏观上表现为骨吸收大于骨形成,在微观上则表现为成骨细胞数量不足。干细胞是成骨细胞的主要来源,基于干细胞对骨质疏松症进行研究是目前常用的方法<sup>[10]</sup>。与脂肪干细胞(adipose tissue-derived MSCs, ATSCs)相比,骨髓间充质干细胞(BMSCs)具有更好的成骨活性和更低的异向分化特性,更适合开展骨质疏松相关的干细胞水平研究<sup>[11]</sup>。本实验通过研究单纯 EGCG 和成骨诱导液环境中的 EGCG 对大鼠 BMSCs 的成骨作用探究 EGCG 在干细胞成骨分化中的作用。本研究细胞增殖实验表明单纯 EGCG 在 7 d 时对 BMSCs 有促进作用,而在 14 d 时有抑制作用,此自相矛盾的结果可能是由于 14 d 的培养时间较长和 24 孔板底部面积有限造成。有研究报道成骨诱导液在促进干细胞成骨方向分化的同时对干细胞的增殖有一定影响<sup>[12]</sup>,本研究中添加成骨诱导液组的细胞增殖明显低于不添加的组,也证实了这一现象。除了 7 d 时 EGCG 似乎对干细胞增殖有影响外,在其它各组检测中细胞增殖与 EGCG 之间无关。ALP 水平与骨折愈合能力正相关,其含量升高可以有效反映成骨活性增强<sup>[13-14]</sup>。为了具体探测 EGCG 的成骨作用在成骨诱导液存在时和不存在时的差别,本研究进行了 ALP 活性检测和染色。参考相关文献对细胞内外 ALP 含量的比较,选择了检测细胞内的 ALP<sup>[15]</sup>。7 d 时各组无差异,而 14 d 时加成骨诱导液的两组 ALP 表达明显增高,EGCG 在成骨诱导液中显著增强了干细胞的成骨分化。ALP 染色则通过标志酶染色的方法来直观体现各组的成骨分化趋势,加成骨诱导液的细胞阳性染色明显高于不加成骨诱导液的组,且同时加成骨诱导液和 EGCG 的组明显阳性染色最强。

*Ocn*、*Col1a1*、*Bsp* 和 *Runx2* 均为成骨分化的特异性标志基因,且已被证实与骨质疏松相关<sup>[16]</sup>。EGCG 对这些基因表达的影响与其在骨质疏松中的作用直接相关,故而监测这些基因的表达情况对研究 EGCG 在干细胞成骨分化中的作用至关重要。本研究中加成骨诱导液的两组基因表达明显高于未加成骨诱导液的两组。添加 EGCG 的成骨诱导液培养的 BMSCs 基因 *Col1a1* 和 *Bsp* 在 7 d 时显著高于未添加 EGCG 的成骨诱导液组,而添加 EGCG 的成骨诱导液培养的 BMSCs 基因 *Ocn* 和 *Runx2* 在 14 d 时显著高于未添加 EGCG 的成骨诱导液组,其它时间点是否添加 EGCG 对相关基因的表达无明显影响,这一现象可能是由于成骨诱导过程中基因表达的先后顺序导致的,具体还需要更多的研究。但是从成骨相关特异性基因表达的整体趋势上可以看出,EGCG 作用的发挥依赖成骨的环境。

综上所述,单纯 EGCG 对干细胞成骨作用和增殖作用均比较微弱,但是在成骨诱导环境中其成骨作用大大增强,说明 EGCG 发挥促进成骨作用需要依赖其它因素,其自身不能启动成骨过程,此研究可能为 EGCG 成骨相关的体外细胞和组织工程实验的改良提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] TAN H, ZHAO C, ZHU Q C, et al. Ursolic acid isolated from the leaves of loquat (*eriobotrya japonica*) inhibited osteoclast differentiation through targeting exportin 5[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(12): 3333-3340.
- [2] 彭岳文. 表没食子儿茶素没食子酸酯促进成骨细胞增殖及骨向分化的研究[D]. 广州:南方医科大学, 2017.
- [3] 于忱忱, 章轶立, 魏戎, 等. 饮品对北京市社区中老年人骨骨质疏松影响的调查研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(10): 1528-1532.
- [4] 梅宏翔, 张懿丹, 张城浩, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯在干细胞增殖及成骨分化作用中的研究现状[J]. *国际口腔医学杂志*, 2019, 46(4): 431-436.
- [5] LIN S Y, KANG L, CHEN J C, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances healing of femoral bone defect[J]. *Phytomedicine*, 2019, 55: 165-171.
- [6] LIN S Y, KAN J Y, LU C C, et al. Green tea catechin (-)-epigallocatechin-3-gallate (egcg) facilitates fracture healing[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 620.
- [7] 谢睿锋. 不同浓度表儿茶素没食子酸酯对体外培养成骨细胞的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2018.
- [8] 赵林, 冯智慧, 焦淑贤, 等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其生物学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(32): 5923-5927.
- [9] TANG J R, LI H Y, GUO M X, et al. Enhanced spreading, migration and osteodifferentiation of HBMSCs on macroporous CS-Ta - A biocompatible macroporous coating for hard tissue repair[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 129: 112411.
- [10] HUTCHINGS G, MONCRIEFF L, DOMPE C, et al. Bone regeneration, reconstruction and use of osteogenic cells; from basic knowledge, animal models to clinical trials[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): 139.
- [11] XU L L, LIU Y M, SUN Y X, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 275.
- [12] 刘霞, 马云胜, 罗美, 等. 人脐血基质细胞的体外培养及向成骨细胞诱导分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(19): 3703-3707.

(下转第 335 页)

- autoimmunity in IL-14 $\alpha$ -transgenic mice[J]. *J Immunol*, 2006, 177(8):5676-5686.
- [12] JANOSOVA V, CALKOVSKY V, PEDAN H, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitors in allergic rhinitis/rhinosinusitis[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1135.
- [13] SULTÉSZ M, HORVÁTH A, MOLNÁR D, et al. Prevalence of allergic rhinitis, related comorbidities and risk factors in schoolchildren[J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2020, 16(1):98.
- [14] CLARK H, GRANELL R, CURTIN J A, et al. Differential associations of allergic disease genetic variants with developmental profiles of eczema, wheeze and rhinitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2019, 49(11):1475-1486.
- [15] HOYTE F C L, NELSON H S. Recent advances in allergic rhinitis[J]. *F1000 Res*, 2018, 7: F1000 Faculty Rev-1333.
- [16] SCHULER IV C F, MONTEJO J M. Allergic rhinitis in children and adolescents[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2019, 66(5):981-993.
- [17] MORIN A, MCKENNAN C G, PEDERSEN C T, et al. Epigenetic landscape links upper airway microbiota in infancy with allergic rhinitis at 6 years of age[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 146(6):1358-1366.
- [18] 朱栋, 何翔, 李国平. 变应性鼻炎表观遗传学[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2021, 15(1):64-68.
- [19] 陈静, 程雷. 变应性鼻炎的变应原组分诊断[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2021, 29(3):161-162.
- [20] 郭志强. 环境因素在变应性鼻炎发病中的作用[J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2021, 45(3):149-152.
- [21] WANG J, ZHANG Y, LI H, et al. Immune effects of miRNA and Th17 cells on beta-Lg allergy in dietary milk based on mouse model[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(12):3442-3448.
- [22] BAL S M, BERNINK J H, NAGASAWA M, et al. IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(6):636-645.
- [23] MITAMURA Y, NUNOMURA S, NANRI Y, et al. Hierarchical control of interleukin 13 (IL-13) signals in lung fibroblasts by STAT6 and SOX11[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(38):14646-14658.
- [24] AMBRUS J L J, FAUCI A S. Human B lymphoma cell line producing B cell growth factor[J]. *J Clin Invest*, 1985, 75(2):732-739.
- [25] SHEN L, SURESH L, LI H, et al. IL-14  $\alpha$ , the nexus for primary Sjögren's disease in mice and humans[J]. *Clin Immunol*, 2009, 130(3):304-312.
- [26] LECA N, LAFTAVI M, SHEN L, et al. Regulation of human interleukin 14 transcription in vitro and in vivo after renal transplantation[J]. *Transplantation*, 2008, 86(2):336-341.
- [27] XIAN Z H, FU D H, LIU S, et al. Association between B Cell growth factors and primary sjögren's syndrome-related autoantibodies in patients with non-hodgkin's lymphoma[J]. *J Immunol Res*, 2019:7627384.
- [28] 高佩, 鸭 IFN $\alpha$ -IFN $\gamma$ -IFN $\alpha$ -IL18 基因的融合表达及其生物学活性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [29] 李娅, 王昕. 肌肉注射重组人干扰素- $\alpha$ 1b 致过敏性休克与急性重症荨麻疹[J]. *药物不良反应杂志*, 2017, 19(4):302-303.
- [30] 栗丽. 狼疮性肾炎患者血清 LL-37、IFN- $\alpha$  及 IL-17 表达水平及其意义[D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
- [31] TOMAZIC P V, LANG-LOIDOLT D. Current and emerging pharmacotherapy for pediatric allergic rhinitis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, 22(7):849-855.

收稿日期: 2021-12-17; 修回日期: 2022-05-23

(上接第 319 页)

- [13] 谭轼, 孙卫兵, 蔡晓冰, 等. 尺桡骨骨折患者维生素 D、骨源性碱性磷酸酶含量与骨折愈合速度的相关性研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2020, 24(10):96-98.
- [14] 李兰, 杨一秋, 解继胜. 去卵巢小鼠绝经后骨质疏松模型的建立和综合评定[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(1):6-10.
- [15] 张英, 袁月, 孙富丽. 成骨细胞胞内胞外碱性磷酸酶含量比较[J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(10):874-876, 884.
- [16] 马忠平, 杨云, 张志峰, 等. 芝麻素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路调控大鼠骨髓间充质干细胞成骨细胞分化预防骨质疏松的作用研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(1):50-54, 59.

收稿日期: 2022-03-17; 修回日期: 2022-03-21