

文章编号: 1004-7220(2015)03-0197-06

· 论 著 ·

动态轴向压应变促进丝素蛋白支架内 MC3T3-E1 细胞成骨分化

曾昭勋^a, 张 文^b, 罗宗平^b, 何 帆^b, 杨惠林^{a,b}, 陈 曦^b
(苏州大学 a. 附属第一医院, 骨科; b. 骨科研究所, 苏州 215006)

摘要: **目的** 观察动态轴向压应变对三维丝素蛋白支架内成骨细胞成骨相关基因表达的影响。**方法** 应用动态力学加载仪对实验组小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 加载动态轴向压应变 (5% 应变幅度, 1 Hz, 30 min/d, 共 21 d), 对照组细胞常规静置培养, 不施加力学刺激。应用定量 PCR 检测细胞成骨基因碱性磷酸酶 (ALP)、I 型胶原 (COL I)、骨特异性转录因子 (Runx2)、成骨相关转录因子 (Osx)、骨钙蛋白 (OCN) mRNA 表达量。**结果** 成骨细胞在周期性轴向压应力刺激下, Runx2、Osx 及 COL I 表达分别增加 280%、68.9% 和 79.6%, ALP 及 OCN 表达也分别增加 10.7% 和 26.9%。实验组成骨相关基因 mRNA 表达与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 成骨细胞复合丝素蛋白生物支架材料在周期性轴向压应力刺激下, 成骨基因 COL I、Runx2、Osx 及 OCN 表达明显上调, 可能是生理状态下压应力刺激促进骨折愈合的重要机制之一。研究结果对于以力学信号为基础的细胞疗法修复骨缺损等疾病具有重要临床价值。

关键词: 丝素蛋白; 成骨细胞; 压应变; 成骨分化; 力学刺激

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.03.197

Dynamic axial compressive strain promotes osteogenic differentiation of osteoblasts seeded in silk fibroin scaffolds

ZENG Zhao-xun^a, ZHANG Wen^b, LUO Zong-ping^b, HE Fan^b, YANG Hui-lin^{a,b}, CHEN Xi^b
(a. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Soochow University; b. Orthopedic Institute, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To explore the effects of dynamic axial compressive strain on the mRNA expression of bone formation related-genes in osteoblasts seeded in 3D silk fibroin scaffolds. **Methods** In the experimental group, MC3T3-E1 cells were seeded in 3D scaffolds and then subjected to dynamic axial compressive strain (at amplitude of 5% and frequency of 1 Hz, 30 min/day for 20 days), while in the control group, MC3T3-E1 cells were cultured statically without any mechanical stimulation. The gene expression of alkaline phosphatase (ALP), collagen I (COL I), runt-related transcription factor 2 (Runx2), osterix (Osx), osteocalcin (OCN) was detected by real-time PCR. **Results** Under cyclic axial compressive strain, the Runx2, Osx and COL I mRNA levels increased by 280%, 68.9% and 79.6%, respectively, while the ALP and OC mRNA levels also up-regulated by 10.7% and 26.9%, respectively. There were significant differences in mRNA expression of osteogenesis-related genes between the experimental group and control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Under the stimulation of cyclic axial compressive strain, the osteogenic differentiation of osteoblasts seeded in the silk fibroin scaffolds is promoted, with a significant up-regulation in the mRNA expression of COL I, Runx2, Osx and OCN, which suggests that the stimulation of compressive stress at physiologic magnitude could be one of important mechanisms

收稿日期: 2014-04-04; 修回日期: 2014-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270995)。

通信作者: 罗宗平, 教授, Tel: (0512) 67781386; E-mail: zongping_luo@yahoo.com。

in promoting fracture healing. This research finding will be important for the clinic application of mechanical stimuli-mediated cell therapy for bone defect.

Key words: Silk fibroin; Osteoblast; Compressive strain; Osteogenic differentiation; Mechanical stimulation

在骨组织工程中,细胞复合支架材料和细胞生长力学微环境的优化构建是影响结果的重要因素。丝素蛋白因其良好的生物相容性及抗拉伸强度,在皮肤、软骨组织工程中得到广泛应用^[1],但用于骨组织工程研究的并不多。研究发现,合适的机械应力刺激在骨折愈合过程中起着重要作用。本课题组将小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 接种在自制的三维丝素蛋白支架上,通过体外给予周期性的轴向压应变,观察丝素蛋白支架复合成骨细胞在压应变刺激下的成骨效应,在基因水平上探讨压应力刺激对成骨细胞分化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及耗材 MC3T3-E1 细胞(中国医学科学院细胞库),逆转录试剂盒(Fermentas,立陶宛), α -MEM 培养基(Gibco,美国),胎牛血清(Gibco,美国),胰蛋白酶(Hyclone,美国),青霉素-链霉素双抗(Hyclone,美国),SosoFast EvaGreen Supermix 试剂盒和八联管(Bio-Rad,美国)等。

1.1.2 主要仪器 Real-time PCR 仪(Bio-Rad,美国),细胞培养箱(Sanyo MCO-20AIC,日本),倒置相差显微镜(Nikon Eclipse TE2000-S,日本),荧光显微镜(Olympus BX51,日本),超净操作台(ESCO A2,新加坡),离心机(Beckman Allegra X-15R,美国),体外细胞开放式压力程控培养装置(HY-0230,上海衡仪)。

1.2 材料制备及细胞培养动态力学环境

1.2.1 三维丝素多孔支架制备方法 将 5 g 生丝在含 4.24 g Na_2CO_3 的 2 L 去离子水中煮沸脱胶 20 min,温水洗涤,烘干;脱胶蚕丝溶解于 9.3 mol/L 溴化锂溶液,60 °C,4 h。然后将蚕丝溶解液透析除盐,3 d 后透析液分装于 50 mL 离心管中,5 000 g 高速离心 1 h,取上层液备用;将 2 mL 丝素蛋白溶解液灌入自备模具中,再依次加入 4 g 直径 450 ~ 600 μm NaCl 颗粒;室温下自然干燥 3 d,通过盐析法成型后的丝素蛋白支架室温下晾干,修剪 1 cm \times 1 cm 大小圆柱状支架,钴 60 消毒备用。

1.2.2 支架孔隙率检测 将待测圆柱状支架材料(干重为 M_0),浸入盛有乙醇的 50 mL 离心管中直至完全浸透,称取称量瓶质量记为 m_a ,取出湿支架,标记离心管质量为 m_b 。同时选取 50 mL 比重瓶,装满乙醇溶液后称重 m_1 ,将已经浸透乙醇的湿支架浸入比重瓶,继续加入乙醇至满后称重 m_2 。根据以下公式计算孔隙率:

支架孔体积

$$V_1 = (m_a - m_b - m_0) / \rho$$

支架表观体积

$$V_2 = [(m_a - m_b) - (m_2 - m_1)] / \rho$$

其中, ρ 为乙醇密度。

支架孔隙率

$$\varepsilon = (V_1 / V_2) \times 100\% = \frac{(m_a - m_b - m_0)}{[(m_a - m_b) - (m_2 - m_1)]} \cdot 100\%$$

1.2.3 支架结构表征 多孔材料经表面喷金后,使用 Hitachi S4800 型扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察多孔支架微观结构,另外采用 Nicolet 6700 型傅里叶变换红外外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)测试,波数范围 400 ~ 4 000 cm^{-1} ,分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数 20 次。丝素多孔材料元素组成采用 X 射线能谱(energy dispersive X-Ray, EDX)进行分析。

1.2.4 MC3T3-E1 在支架内存活检测 MC3T3-E1 接种于丝素蛋白多孔支架,培养 24 h 进行检测。吸出培养液,PBS 冲洗材料 3 次,4% 多聚甲醛室温下固定 10 min,PBS 振洗 3 次,用 0.1% Triton \times 100 破膜 3 min,加入 2.5 mg/L 鬼笔环肽和 0.5 mg/L DAPI 进行细胞染色,室温下避光孵育 30 min,PBS 洗 3 次,10 min/次,荧光显微镜观察细胞存活情况,蓝色显示细胞核,绿色显示细胞骨架。

1.2.5 细胞支架 SEM 观察 SEM 观察支架内部生长情况。支架细胞清洗步骤同 1.2.4 节所述,2.5% 戊二醛固定 4 h,用刀片将支架从中央切开成厚度约 2 mm 的支架薄片,通过酒精梯度脱水,SEM 观察 2 组细胞成骨效果。

1.2.6 丝素多孔支架与 MC3T3-E1 复合培养及力学加载 MC3T3-E1 细胞培养及多孔支架处理同前。调整细胞浓度为 1×10^7 /mL, 接种至三维丝素多孔支架 (10 mm × 10 mm), 加入完全培养基静置培养。随机将构建的细胞-支架结构分为实验组及对照组。对实验组细胞支架复合体施加频率 1 Hz、振幅 5% 的周期性动态压应变, 30 min/d, 共计 21 d; 对照组静置培养, 不施加压应变刺激。

实验组: 6 个复孔, 每个培养孔中加入 α -MEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 2 mL, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。1 d 后更换为成骨细胞诱导培养液 (含 50 mg/L 抗坏血酸、10 mmol/mL β -甘油磷酸钠), 48 h 后开始力学加载。每 2 d 换液 1 次。

对照组: 6 个复孔, 培养条件同上。48 h 后继续静置培养, 不施加压应变刺激。每 2 d 换液 1 次。

1.2.7 定量 PCR 检测成骨相关基因表达 经 Trizol 试剂裂解各组细胞, 提取总 RNA, 取 1 μ g RNA 通过多聚酶链反应逆转录成 cDNA; 目的基因引物由上海生工生物工程技术有限公司合成提供 (见表 1)。采用 SYBR Green 荧光定量试剂按如下反应条件扩增: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火温度 30 s, 共 40 个循环, 经 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各组目的基因表达量。

表 1 成骨相关基因引物序列

Tab. 1 Real-time PCR primer of bone formation related-genes

基因	引物序号
COL-1	上游 5'-AACCCGAGGTATGCTTGATCT-3'
	下游 5'-CCAGTTCCTTCATTGCATTGC-3'
ALP	上游 5'-AACCCAGACACAAGCATTCC-3'
	下游 5'-GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG-3'
OCN	上游 5'-CTGGCTCGGCTCTGTCTCT-3'
	下游 5'-TGCTTGACATGAAGGCTTTG-3'
Runx2	上游 5'-AAGTGGCGTGCAAACCTTTCT-3'
	下游 5'-TCTCGGTGGCTGGTAGTGA-3'
O _{sx}	上游 5'-ACTGGCTAGGTGCTGCTCAG-3'
	下游 5'-GGTAGGGAGCTGGGTTAAGG-3'
GAPDH	上游 5'-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3'
	下游 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'

1.3 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析, 各组数据间比较采用独

立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有实验重复 3 次。

2 结果

2.1 支架材料大体结构形貌观察

肉眼观察三维支架材料成白色圆柱状体, 规格 10 mm × 10 mm, 表面粗糙, 内部结构疏松成海绵状, 干态下质硬, 湿态下柔软 (见图 1)。



图 1 丝素蛋白多孔支架大体形态

Fig. 1 General morphology of the porous silk fibroin scaffolds

2.2 支架材料 SEM 观察

SEM 下可见丝素蛋白支架内部呈现孔隙网状结构, 孔壁厚度均匀, 形态大小规则, 孔隙连通性良好, 孔径大小为 $(325 \pm 62) \mu\text{m}$, 孔隙率测试结果为 93% (见图 2)。

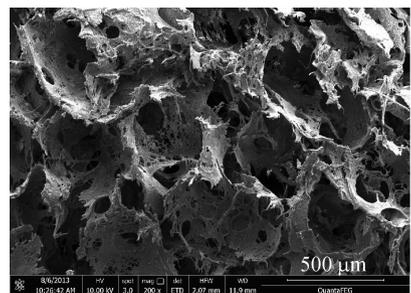


图 2 丝素蛋白多孔支架的超微结构

Fig. 2 SEM images of the porous silk fibroin scaffolds

2.3 红外分析结果

通常情况下, 丝素的二级结构以无规卷曲为主, 在水中浸泡一段时间后会逐渐溶解。通过甲醇浸泡处理, 使可溶于水的无规卷曲和不稳定的 I 型结构转变为含较多 β 折叠结构的 II 型结构, 该结构稳定, 不溶于水。无规卷曲结构特征吸收峰出现在

1 638 ~ 1 655 cm^{-1} 、1 535 ~ 1 545 cm^{-1} 、1 235 cm^{-1} 、650 cm^{-1} [2]。而 Silk II (β 折叠结构) 特征吸收峰出现在 1 616 ~ 1 637 cm^{-1} (酰胺 I)、1 530 cm^{-1} (酰胺 II)、1 230 ~ 1 235 cm^{-1} (酰胺 III)、695 cm^{-1} (酰胺 V) 附近。由图 3 曲线可知, 甲醇处理后丝素蛋白在 1 701 ~ 1 705 cm^{-1} (酰胺 I)、1 616 ~ 1 637 cm^{-1} (酰胺 I)、1 530 cm^{-1} (酰胺 II) 处有明显的吸收峰, 表明 β 折叠结构所占比例较高。通过对上述丝素多孔材料 FTIR 的定性分析结果表明, 丝素蛋白二级结构 β 折叠结构的含量在经过甲醇处理后增加, 二级结构更加趋于稳定。

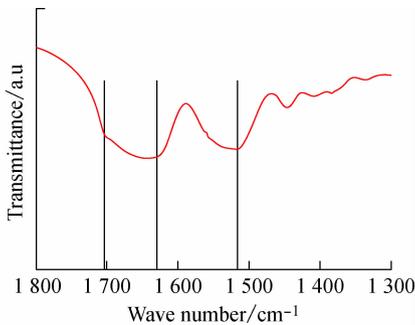


图3 丝素蛋白材料的傅里叶红外光谱图

Fig. 3 Fourier transform infrared spectroscopy spectrum of the silk fibroin scaffolds

2.4 支架元素构成 EDX 分析

图 4 可以清楚地看到通过盐析法制的丝素蛋白支架保留其原始的元素组成, 表面均为氨基酸组成的多肽序列或蛋白质结构, 说明制作过程中接触到的其他金属元素并未残留在支架内, 这有利于细胞在支架内的增殖、黏附及分化。

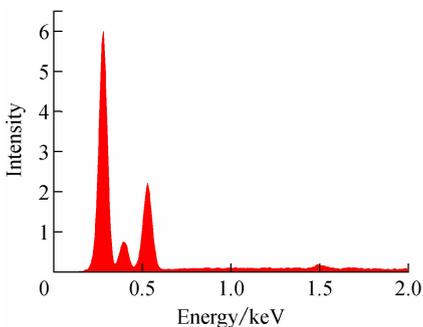


图4 丝素蛋白材料元素 EDX 分析图

Fig. 4 EDX spectrum of elementary composition in the silk fibroin scaffolds

2.5 细胞复合支架共培养观察

细胞黏附过程中, 细胞重组肌动蛋白骨架形成应力纤维。细胞种植支架材料 24 h 后, 免疫荧光染色, 荧光显微镜观察可见在三维支架孔内细胞显示高的荧光密度, 细胞均匀分布在支架孔壁内, 提示支架良好的生物亲和性 (见图 5)。细胞复合丝素蛋白多孔支架材料后第 3 d, SEM 下观察可见细胞分布于支架孔内表面, 交织成梭形并开始分泌细胞外基质细胞 (见图 6)。

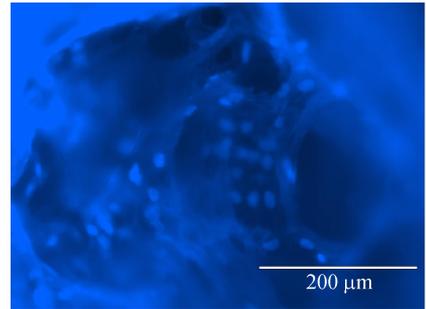


图5 丝素蛋白支架内细胞 DAPI 染色

Fig. 5 Observation of DAPI stained MC3T3-E1 cells growing on the silk fibroin scaffolds

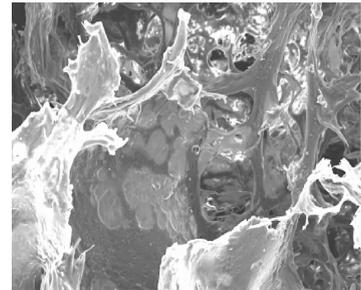


图6 丝素蛋白支架内细胞 SEM 观察 (1 000 ×)

Fig. 6 SEM observations of MC3T3 cells growing on the silk fibroin scaffolds

2.6 力学加载对成骨相关基因表达的影响

成骨样细胞经一定的轴向压应力刺激后, 成骨基因表达水平出现明显的变化。在 1 Hz、5% 应变幅度的压应变下, 支架内成骨细胞基因碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原 (collagen I, COL I)、骨特异性转录因子 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、成骨相关转录因子 (osterix, Osx)、骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) mRNA 表达均上调, 其中 Runx2 表达增加量最为明显, 增幅为 2.8

倍, *Osx* 及 *COL I* 表达上调也较为明显, 分别增加 68.9%、79.6%; *ALP* 及 *OCN* 的表达增加量相对较弱, 分别增加 10.7% 和 26.9%, 各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

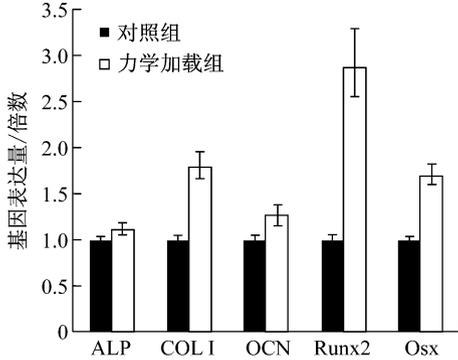


图 8 力学刺激对成骨相关基因 mRNA 表达的影响
Fig. 8 Effects of mechanical stimulation on mRNA expression of osteogenesis-related genes

3 讨论

理想的组织工程支架应当具有良好的生物相容性、骨传导性以及合适的孔径和孔隙率, 以有利于细胞黏附和增殖^[3]。本研究中盐析法制备的丝素蛋白支架经电镜扫描及红外分析, 结果显示三维支架具有较高的孔隙率、适宜的孔径大小及纯天然的生物基团, 成骨样细胞 MC3T3-E1 能在支架上黏附增殖并分泌细胞外基质, 提示该支架具有较好的细胞相容性。

细胞复合丝素支架共培养后, 由于三维支架的结构影响, 细胞在应力作用下受到的刺激一部分来自物理形态的变化, 另一部分是三维支架形变及支架内微环境的改变。位于三维支架的细胞对力学信号的感应更加灵敏、全面, 而二维细胞力学实验不能模拟体内细胞的力学环境变化及力学信号转导过程。力学信号是影响骨量增减和骨改建的重要因素^[4], 成骨细胞感受不同大小机械应力的反应复杂, 生理范围内轴向压应力可促进细胞增殖、成骨基因表达上调。但当应力刺激强度超过生理水平时, 细胞增殖受到抑制, 细胞成骨分化程度亦受到抑制。骨组织工程研究中, 力学加载时细胞实际感受到的是应变而非应力; 一般认为, 施加在三维支架上的压

应力在 1 Hz、5% 幅度应变下可以模拟体内细胞感受正常生物力学的生化反应^[5]。

轴向压应力加载于骨组织后, 引起骨细胞发生形变, 并将各种机械信号转化为生化信号转导给成骨细胞和破骨细胞, 由后两者发挥效应。应力作用下成骨细胞增殖速度加快, 细胞增殖活跃程度也随之增加, 且分泌多种与细胞增殖分化有关的生物活性物质, 如骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs)、Runx2 等^[6]。在这些活性物质的调节下, 成骨细胞增殖分化, 分泌基质, 同时由于应力的作用, 细胞基质可在通常不能矿化的情况下矿化。其中, Runx2 表达是成骨细胞开始分化的重要标志, 它是骨形成过程中最早和最具特异性的标志基因之一; 高表达 Runx2 可激活 OCN、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP) 的转录及表达, 从而促进成骨细胞成熟^[7]。ALP 高表达是成骨细胞分化的早期重要标志之一, 它通过水解有机磷酸盐而增加局部磷酸盐浓度, 为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸, 能够反映骨细胞合成 COL I、形成骨基质的能力^[8-9]。本实验中 ALP 表达虽有上调, 但差异不明显, 考虑是由于实验时间点采集所致。COL I 是细胞外基质成熟及钙质沉积矿化的重要指标, 也常常作为骨髓间充质干细胞向成骨分化的早期检测指标^[10-11]。Osx 是成骨细胞分化和骨形成过程中必需的转录因子, 能够调控重要成骨基因表达, 如骨桥素、OCN、COL 1 及 OPN 等^[12-14]。OCN 是由非增殖期成骨细胞合成分泌的特异性产物, 是一种含量最丰富的骨非胶原蛋白, 在骨形成及矿化过程中发挥重要调节作用。在矿化发生阶段, 机体 OPN 及 OCN 表达均显著增强, OCN 的出现标志着成骨细胞分化成熟^[15]。本实验中, 经过周期性的压应力刺激, 细胞的相关成骨基因表达均得到显著提高。

本实验结果证明, 轴向压应力加载于三维支架材料, 通过骨传导将宏观力学刺激转化为微观力学信号, 引起支架内细胞微形变, 并通过激活细胞膜上的离子化学通道, 将信号转导到细胞内, 刺激相关细胞因子的合成、分泌, 引起效应细胞的应答, 显著加速成骨细胞分化。随着骨折愈合力学机制的深入研究, 力学信号在细胞内的进一步传递及其分子效应

机制将会成为细胞力学研究热点。通过探索成骨细胞生长状况以及最优化的力学环境,将为临床上骨科治疗提供新理念及疗法,从而提高骨折愈合率,缩短治疗时间,减少延迟愈合或骨不连等并发症,最终减轻患者痛苦和社会负担。

参考文献:

- [1] Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin [J]. *J Mater Chem*, 2009, 19(36): 6443-6450.
- [2] Magoshi J, Mizuide M, Magoshi Y, *et al.* Physical properties and structure of silk. VI. Conformational changes in silk fibroin induced by immersion in water at 2 to 130 C [J]. *J Polym Sci*, 1979, 17(3): 515-520.
- [3] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, *et al.* Cartilage engineering: A crucial combination of cells, biomaterials and biofactors [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(5): 307-314.
- [4] 秦岭. 力学刺激促进成骨和骨再生[J]. *医用生物力学*, 2012, 27(2): 129-132.
Qin L. Mechanical stimulation enhances osteogenesis and bone generation [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(2): 129-132.
- [5] Barthelemi S, Robinet J, Garnotel R, *et al.* Mechanical forces-induced human osteoblasts differentiation involves MMP-2/MMP-13/MT1-MMP proteolytic cascade [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(3): 760-772.
- [6] Meyer U, Meyer T, Schlegel W, *et al.* Tissue differentiation and cytokine synthesis during strain-related bone formation in distraction osteogenesis [J]. *Brit J Oral Maxillofac Surg*, 2001, 39(1): 22-29.
- [7] Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, *et al.* Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *BMC Cell Biol*, 2007, 8(1): 51.
- [8] 时青云, 闫琦, 徐苗. 染料木黄酮对成骨细胞 C-fos, ALP 及骨钙蛋白基因表达的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(5): 352-355.
- [9] 何学令, 姚晓玲, 冯贤, 等. 力学刺激和成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 116-120.
He XL, Yao XL, Feng X, *et al.* Effects from mechanical stimulation and osteogenic chemical inductor on osteoblastic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 116-120.
- [10] 杨勇, 吴华, 陶超雄, 等. 脉冲电磁场促进骨髓间充质干细胞 I 型胶原表达的初步研究 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2009, 31(7): 442-445.
- [11] Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, *et al.* The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(5): 736-742.
- [12] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [13] Tang W, Yang F, Li Y, *et al.* Transcriptional regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) in osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(3): 1671-1678.
- [14] Chen Q, Liu W, Sinha KM, *et al.* Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor osterix [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58104.
- [15] 胡新永, 殷力, 陈建文, 等. 牵张应力对成骨细胞骨钙素基因表达和增殖的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(6): 1163-1166.