

黄芪汤对人体代谢的影响及其在疾病防治中的辅助作用

王守丽 谢国祥 赵爱华 陈天璐 贾伟

摘要 目的 本研究采用代谢组学技术和方法,研究健康人口服黄芪汤前后血浆代谢谱的变化,为黄芪汤的药效研究提供依据和参考。**方法** 联合采用气相色谱质谱和液相色谱质谱两个平台,结合单变量和多变量统计分析方法,考察服用黄芪汤前后人体血浆中内源性代谢物的波动情况。**结果** 主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析结果均显示,服药前和服药后2h,人体血浆代谢谱有明显的分离趋势,内源性代谢物发生了显著的波动。借助多维和多维统计分析方法,筛选出了49种服药前后的差异代谢物。黄芪汤中的主要成分芒柄花素及其代谢产物芒柄花素葡萄糖苷的水平在服药后均显著升高。色氨酸、苯丙氨酸和胆酸等物质显著降低。**结论** 服用黄芪汤后人体氨基酸代谢、脂肪代谢、糖类代谢和胆酸代谢均有波动,这些代谢物与肝病和糖尿病的防治有紧密关联。

关键词 黄芪汤 代谢组学 肝病 糖尿病

中图分类号 R49

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.008

Influence of Huangqi Decoction on Human Metabolism and Its Auxiliary Role in Disease Prevention and Treatment. Wang Shouli, Xie Guoxiang, Zhao Aihua, et al. Center for Translational Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To investigate the changes of metabolic profiles in healthy adults before and after oral administration of HQD, and to provide new insights for the pharmacodynamic study of HQD. **Methods** Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS) and ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOFMS) platforms, combined with univariate and multivariate statistical analysis, were used to investigate the fluctuations of endogenous metabolites in pre- and post-dose plasma samples of healthy individuals. **Results** Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) consistently showed that the separation trends of metabolic profiles derived from pre and post-dose groups were highly significant, which indicated that the endogenous metabolites changed greatly after taking HQD. Furthermore, forty-nine differential metabolites were screened out by using univariate and multivariate statistical analysis. Comparing with pre-dose group, formononetin (the principal component of HQD) and its downstream product formononetin glucuronide were both higher whereas tryptophan, phenylalanine and cholic acid were lower in post-dose group. **Conclusion** Amino acid, lipid and fatty acid, glucose and cholic acid metabolism were all altered after taking HQD. These metabolites are closely associated with the prevention and therapy of liver diseases and diabetes.

Key words Huangqi decoction; Metabolomics; Liver diseases; Diabetes

黄芪汤出自宋代,《太平惠民和剂局方》原方黄芪甘草之比为6:1,故又名黄芪六一汤^[1]。黄芪汤由黄芪、甘草构成。近代研究表明黄芪的有效成分为黄芪皂苷、黄芪多糖、 γ -氨基丁酸、微量元素(硒、锰、铁、钙等)^[2]。甘草含甘草酸、甘草次酸、黄酮、生物碱等多种成分,其中甘草酸是最重要的活性成分,具

有抗病毒、抗炎、抗过敏、抗变态反应、抗肿瘤及免疫调节等作用^[3]。

现代研究表明,黄芪汤能减轻大鼠酒精性肝纤维化的组织病理改变,还可通过诱导肝脏卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC)肝向分化作用来促进肝硬化逆转^[4, 5]。另一方面,有研究发现黄芪汤能降低2型糖尿病大鼠的空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)及调节脂质代谢紊乱,其作用机制可能与升高胰岛素含量,改善胰岛素抵抗,保护胰岛 β 细胞有关^[6]。然而,近年来黄芪汤在动物模型中研究较多,研究口服

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31501079)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院转化医学中心

通讯作者:陈天璐,硕士生导师,电子信箱:chentianlu@sjtu.edu.cn

黄芪汤后人体内代谢物波动情况的却鲜有报道。

本研究利用气相色谱 - 飞行时间质谱联用仪 (gas chromatography time - of - flight mass spectrometry, GC - TOFMS) 和超高效液相色谱 - 四级杆飞行时间质谱联用仪 (ultra - high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry, UPLC - QTOFMS) 两种代谢组学平台, 对人体血浆代谢物进行全谱分析, 研究健康志愿者口服黄芪汤前后体内代谢轮廓的变化, 尤其是内源性代谢物波动情况, 重点讨论了氨基酸和胆酸等差异代谢物在肝病和糖尿病防治中的作用。

材料与方法

1. 试剂与仪器: 乙醇和甲醇为色谱纯, 购自美国 Fisher Scientific Worldwide 公司。甲酸、吡啶、DL - 4 - 氯苯丙氨酸、甲氧基胺盐酸盐、十七烷酸和 N, O - 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA) 均为分析纯, 购自美国 Sigma - Aldrich (St. Louis, MO) 公司。超纯水由 Milli - Q 纯水仪 (18.2 M Ω , Millipore, Bedford, MA, 美国) 制备。黄芪汤颗粒购自江阴天江药业有限公司 (批号: 1212353), 规格为每 3 袋颗粒剂 (1 剂) 相当于含生药 35g (黄芪 30g, 甘草 5g)。仪器为气相色谱 - 飞行时间质谱联用仪 (GC - TOFMS, 美国 Agilent 公司) 和超高效液相色谱 - 四级杆飞行时间质谱联用仪 (UPLC - QTOFMS, 美国 Waters 公司)。

2. 临床试验: 健康受试者 10 例, 年龄 18 ~ 45 岁, 男女性别各半, 均于试验前签署知情同意书。空腹 10h 后, 每个受试者将 12 袋黄芪汤颗粒剂 (相当于生药 140g, 所含黄芪和甘草分别为 120g 和 20g) 加入适量温水溶解, 摇匀后口服, 并用总量约 200ml 温水分次冲洗杯中残留药物。于给药前及给药后 2h 各经静脉采血 3ml, 立即离心 (3500r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10min) 并取上清液保存于 -80 $^{\circ}$ C。

3. 样品前处理: (1) GC - TOFMS 样本前处理: 取血浆样本 100 μ l, 依次加入内标即 0.1mg/ml 的 DL - 4 - 氯苯丙氨酸水溶液 10 μ l 和 1mg/ml 的十七酸 10 μ l, 加入甲醇: 氯仿 (3:1) 175 μ l, 涡旋振荡 30s 并于 -20 $^{\circ}$ C 静置 10min, 离心 (13200r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10min) 取上清液 200 μ l, 真空干燥。加入 15mg/ml 的甲氧胺 50 μ l, 涡旋振荡 30s, 于 30 $^{\circ}$ C 恒温反应 1.5h。加入 BSTFA 试剂 50 μ l, 涡旋振荡 30s, 于 70 $^{\circ}$ C 恒温反应 1h, 待上机测试。(2) UPLC - QTOFMS 样本前处理: 取血浆样本 80 μ l, 加入内标即 0.03mg/ml 的 DL - 4 -

氯苯丙氨酸水溶液 20 μ l, 加入甲醇: 乙腈 (1:9) 500 μ l, 涡旋振荡 2min, 超声 1min, -20 $^{\circ}$ C 放置 10min, 离心 (12000r/min, 4 $^{\circ}$ C, 15min) 取上清液 150 μ l 于进样瓶中, 待上机测试。

4. 分析条件: (1) GC - TOFMS: 不分流进样模式, 进样量为 1 μ l。色谱柱为 DB - 5MS (30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 μ m)。载气为氦气, 流速为 1.0ml/min。色谱柱升温程序设置为 80 $^{\circ}$ C 持续 2min $\rightarrow$ 以 10 $^{\circ}$ C/min 的速度加热至 180 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 以 6 $^{\circ}$ C/min 的速度加热至 230 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 以 40 $^{\circ}$ C/min 的速度加热至 295 $^{\circ}$ C, 然后再持续 8min。进样口、接口和离子源的温度分别为: 270 $^{\circ}$ C、270 $^{\circ}$ C 和 220 $^{\circ}$ C。电离方式为 EI, 电子能量为 70eV。扫描范围为 50 ~ 500m/z, 采集速率为 25 光谱/秒。(2) UPLC - QTOFMS: 色谱柱为 ACQUITY BEH C18 柱 (2.1mm $\times$ 100mm, 1.7 μ m)。流动相分为 A、B 两相。正、负离子模式下 A 相分别为水溶液 (0.1% 甲酸) 和水溶液, B 相分别为乙腈: 甲醇 (95:5) (0.1% 甲酸) 和乙腈: 甲醇 (95:5)。采用梯度洗脱方式, 设置如下: 0 ~ 1min (1% ~ 20% B), 1 ~ 3min (20% ~ 70% B), 3 ~ 8min (70% ~ 85% B), 8 ~ 9min (85% ~ 99% B), 9 ~ 10.5min (99% B), 10.5 ~ 11.5min (99% ~ 1% B), 11.5 ~ 13min (1% B)。流动相流速 0.4ml/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样体积 5 μ l。质谱采用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式进行检测。正离子模式参数为毛细管电压 3.2kV, 锥孔电压 35kV, 脱溶剂气温度 450 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流速 800L/h, 离子源温度 120 $^{\circ}$ C; 负离子模式参数为毛细管电压 2.5kV, 锥孔电压 40kV, 脱溶剂气温度 450 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气流速 900L/h, 离子源温度 120 $^{\circ}$ C。数据采集范围 50 ~ 1100m/z, 采集时间 0.3s。

5. 统计学方法: GC - TOFMS 和 UPLC - QTOFMS 所得数据分别经 ChromaTOF 软件 (v4.51.6.0, Leco Co.) 和 TargetLynx Applications Manager version 4.1 (Waters, Manchester, 英国) 转换为通用模式并整合为一套完整三维数据集 (包含样本信息、保留时间和峰强度)。利用 SPSS 19.0 (SPSS, 芝加哥, IL) 和 SIMCA - P 13.0 (Umetrics, Umeå, 瑞典) 软件对该数据集进行单变量和多变量统计分析, 包括配对 *t* 检验、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS - DA)。因绝大多数变量均为非正态, 进行配对 *t* 检验前, 需对数据进行 log 转换。此外, 为了降低多次假设检验带来的误

差,配对 t 检验的 P 值都经过 FDR (false discovery rate)校正,以降低假阳性率。

结 果

1. 代谢组学轮廓分析:利用 GC - TOFMS 和 UPLC - QTOFMS 平台,对 10 位志愿者服用黄芪汤前后的血浆样本进行全谱分析,共得到 504 个峰,将其质谱或精确分子量与本课题组自建的标准品库进行比对,最后鉴别确定了 153 个代谢物。分别采用无监督

的 PCA 和有监督的 OPLS - DA 来表征两组的差异 (图 1 中 A 和 B)。PCA 和 OPLS - DA 分析结果显示口服黄芪汤前后有较明显的区分趋势,表明药物对内源性代谢物组有明显的影响。此外,表 1 为黄芪汤健康志愿者的临床信息及服药前后的生命体征。10 例健康志愿者在口服黄芪汤前后生命体征平稳,未出现任何不适症状。

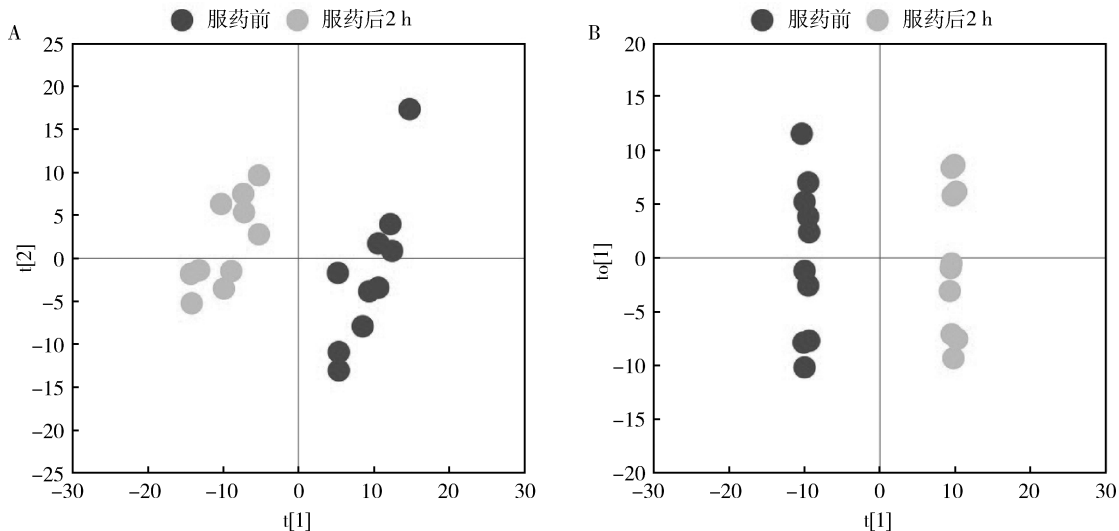


图 1 基于多变量统计分析法分析黄芪汤服药前后血浆代谢物轮廓的散点图

A. 主成分分析法 (PCA); B. 偏最小 - 判别式分析法 (OPLS - DA)

表 1 黄芪汤健康志愿者的临床信息及服药前后的生命体征

项目	服药前	服药后 2h
男性/女性	5/5	-
年龄 (岁)	25 ± 3	-
身高 (cm)	167.2 ± 4.9	-
体重 (kg)	60.9 ± 7.8	-
体重指数 (kg/m ²)	21.6 ± 1.5	-
体温 (℃)	36.3 ± 0.2	36.3 ± 0.2
呼吸 (次/分)	16 ± 0	16.9 ± 0.6
心率 (次/分)	71.5 ± 9.6	70.4 ± 8.5
收缩压 (mmHg ^a)	116.8 ± 8.8	111.8 ± 7.5
舒张压 (mmHg)	71.9 ± 7.0	69.9 ± 5.6

^a 1mmHg = 0.133kPa

2. 差异代谢物筛选:为了更准确的筛选服药前后的差异代谢物,本研究联合采用配对 t 检验和 OPLS - DA 模型提供的变量权重值 (variable importance projection, VIP) 两个指标对数据进行了单维和多维分析。其中, VIP 值反映了变量在两组间整体差异中的贡献程度,常被作为筛选差异代谢物的依据之一。本研究将同时满足 t 检验 ($P < 0.05$) 和 OPLS - DA (VIP > 1) 的物质鉴定为差异代谢物,共筛选鉴定出 49 个差异代谢物,主要涉及氨基酸代谢、脂肪代谢、

糖类代谢和胆酸代谢等多种代谢途径,这也说明黄芪汤是通过影响这些生物通路作用于人体展现其药物疗效的。由图 2 可见,与服药前相比,服药后血中芒柄花素 (formononetin, 非内源性物质)、乙酰半胱氨酸 (acetylcysteine)、胞嘧啶 (cytosine)、苏氨酸 (threonine)、鸟氨酸 (ornithine)、阿糖醇 (arabitol)、呋喃核糖 (ribofuranose)、顺式乌头酸 (cis - aconitic acid)、2, 3 - 二羟基吡啶 (2, 3 - dihydroxypyridine)、半乳糖苷 (galactopyranoside)、3 - 吲哚乙酸 (3 - indolelactic acid)、1, 2, 4 - 丁三醇 (1, 2, 4 - butanetriol)、葡糖酸内酯 (gluconic acid, lactone) 等含量增加;此外色氨酸 (tryptophan)、苯丙氨酸 (phenylalanine)、同型半胱氨酸 (homocysteine)、蛋氨酸 (methionine)、亮氨酸 (leucine)、异亮氨酸 (isoleucine)、正亮氨酸 (norleucine)、2 - 氨基丁酸 (2 - aminobutyric acid)、N - 甲酰基 - L - 蛋氨酸 (N - formyl - l - methionine)、胆酸 (cholic acid)、磷酸甘油 (glycerol phosphate)、胆固醇 (cholesterol)、果糖 (fructose)、甘露糖 (mannose)、2 - 丙烯酸 (2 - propenoic acid)、2 - 丁烯酸 (2 - butenoic acid)、(Z) - 13 - 十八碳烯酸 ((Z) - 13 - octadecenoic

acid)、丁二酸(butanedioic acid)、羟基乙酸(hydroxyacetic acid)、羟基丁二酸(malic acid)、尿素(urea)、吲哚乙酸(indolelactic acid)、焦谷氨酸(pyroglutamic acid)、二乙胺(diethylamine)等含量减少。

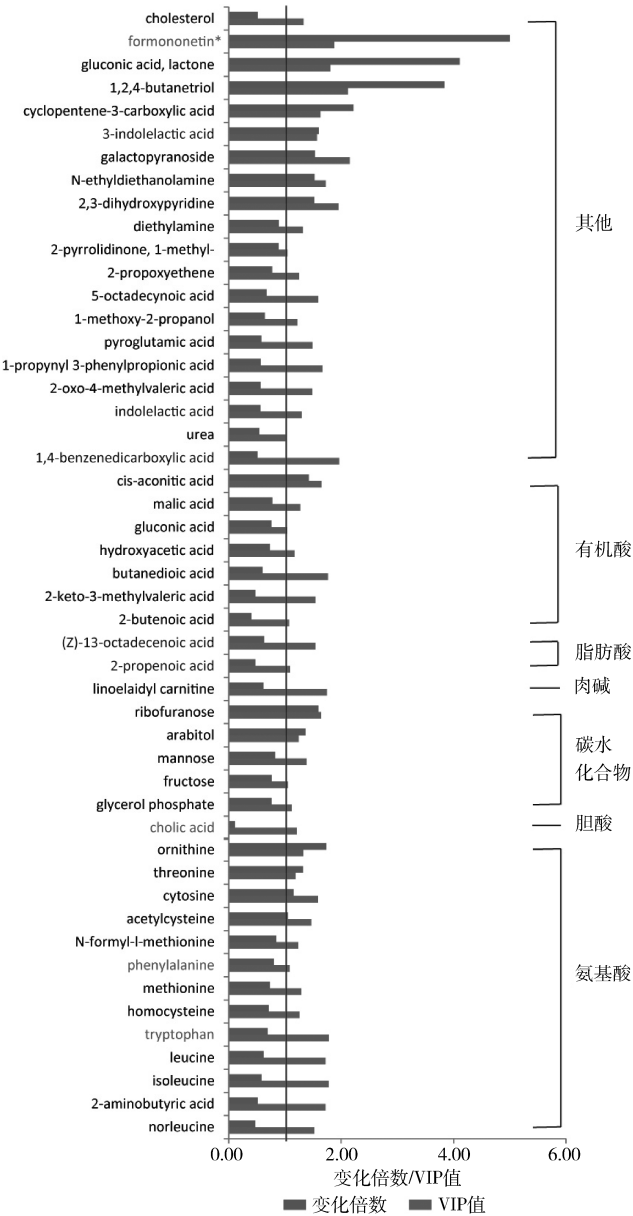


图 2 黄芪汤服药前后的差异代谢物及其分类

* 芒柄花素变化倍数实际值为 19.73,图中以 5 替代

讨 论

本研究成功应用代谢组学技术,研究了健康成人口服黄芪汤前后血浆代谢物水平的变化,将单变量和多变量统计分析相结合,确定了 49 个差异代谢物,其中包含氨基酸代谢、脂肪代谢和糖类代谢等多种代谢通路。本研究对黄芪汤代谢机制和药效研究有一定

的贡献。

本研究显示,芒柄花素作为黄芪汤的主要成分之一,随药物进入体内,在服药后 2h 不仅其原型水平显著升高,在服药前后的变化倍数(fold change, FC)为 19.73,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,芒柄花素的葡萄糖醛酸化产物即芒柄花素葡萄糖苷的水平在服药后 2h 也显著升高,其 FC 值为 3.26 并且 t 检验的结果在 FDR 校正前差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。可见,黄芪汤进入人体内后,其成分芒柄花素有一部分直接吸收入血,另一部分代谢为其葡萄糖醛酸化产物。该推测在其他动物模型中得到了支持。例如,有研究显示芒柄花素在小鼠体内可经葡萄糖醛酸转移酶代谢为芒柄花素葡萄糖苷^[7]。另一方面,有许多研究发现芒柄花素具有抗肿瘤、保护心血管和防治骨质疏松等功效^[8-10]。本研究中服药后芒柄花素血浆水平升高,进一步说明中药黄芪汤具有很好的临床应用前景。

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染、精神因素等各种致病因子作用于机体而引发的伴有胰岛功能减退、胰岛素抵抗等威胁人类健康的代谢紊乱综合征。2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)也称非胰岛素依赖糖尿病,占糖尿病患者 90% 以上。胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞衰竭是 T2DM 的主要特征^[11]。有研究发现在西方人群和中国人群中,色氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸的血中水平与 T2DM 患病风险密切相关,是早期预测 T2DM 发生的潜在生物学标志物^[12-14]。在对 10 年随访的样本集研究中发现,10 年后患 T2DM 的与仍然保持健康的相比,芳香族氨基酸水平均明显升高。本研究中服药后的色氨酸和苯丙氨酸水平均降低(图 2),与上述研究结果一致。

有研究显示,黄芪汤不仅能够减轻大鼠酒精性肝纤维化的病理改变,还能有效治疗由二甲基亚硝胺诱导的肝纤维化模型大鼠,这些研究表明黄芪汤对肝病的治疗具有一定的辅助作用^[4, 15]。另外,有研究表示芳香族氨基酸(例如色氨酸、苯丙氨酸)在肝病患者的血中水平是升高的,而本研究中色氨酸和苯丙氨酸的水平在服药后都是显著降低的,验证了口服黄芪汤对人体可能具有潜在的保肝作用^[16, 17]。

此外,服药后血浆水平下降的代谢物还有胆酸,也有研究表明肥胖伴糖尿病人群血中胆酸的水平高于血糖正常的对照人群^[18]。综上所述,黄芪汤可能有助于降低罹患糖尿病的风险,该结论在动物研究中得

到了证实,例如有研究表明,黄芪中黄芪多糖和黄芪皂苷可有效防治 T2DM,其作用机制主要包括改善胰岛素抵抗、增加胰岛素敏感度、抗炎、抗氧化等^[19~21]。

参考文献

- 1 姚东升,孙明瑜,刘平,等. 黄芪汤治疗肝纤维化的研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2012,13(3):146-148
- 2 杨庆珍,王增绘,付娟,等. 黄芪化学成分与生态因子的相关性[J]. 应用生态学报, 2015,26(3):732-738
- 3 蒲洁莹,何莉,吴思宇,等. 甘草属植物中三萜类化合物的抗病毒作用研究进展[J]. 病毒学报, 2013,29(6):673-679
- 4 时代音,王锐利,刘晓丹. 黄芪汤对大鼠酒精性肝纤维化的保护作用[J]. 陕西中医, 2011,32(5):623-624
- 5 朱英,刘平. 黄芪汤对肝硬化大鼠肝脏卵圆细胞肝向分化的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012,22(5):293-295,324
- 6 张晶. 黄芪汤治疗 2 型糖尿病的实验研究[D]. 唐山:河北联合大学, 2011
- 7 范艳芳. 黄酮类化合物葡萄糖醛酸化和硫酸化代谢机理及其对 P-糖蛋白的作用研究[D]. 广州:南方医科大学, 2012
- 8 Liu Y, He J, Chen X, *et al.* The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of ERK and Akt pathways[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014,34(3):637-645
- 9 Sun T, Wang J, Huang LH, *et al.* Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT2A/1B receptors and α 1-adrenoceptors in spontaneously rat arteries[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013,699(1-3):241-249
- 10 Auyeung KK, Law PC, Ko JK. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft[J]. *Oncol Rep*, 2012,28(6):2188-2194
- 11 Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, *et al.* Management of type 2 di-

- abetes: new and future developments in treatment[J]. *Lancet*, 2011, 378(9786):182-197
- 12 Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes[J]. *Nat Med*, 2011,17(4):448-453
- 13 Chen T, Zheng X, Ma X, *et al.* Tryptophan predicts the risk for future type 2 diabetes[J]. *PLoS One*, 2016,11(9):e0162192
- 14 Chen T, Ni Y, Ma X, *et al.* Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations[J]. *Sci Rep*, 2016,6:20594
- 15 张贵彪,孙明瑜,宋雅楠,等. 基于基因表达谱分析黄芪汤改善大鼠肝纤维化的分子机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2014,29(5):1634-1639
- 16 Holeccek M. Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: effects of variables leading to hepatic encephalopathy[J]. *Nutrition*, 2015,31(1):14-20
- 17 Dejong CH, van de Poll MC, Soeters PB, *et al.* Aromatic amino acid metabolism during liver failure[J]. *J Nutrition*, 2007,137(6 Suppl 1):1579S-85S; discussion 97S-98S
- 18 Yu H, Ni Y, Bao Y, *et al.* Chenodeoxycholic acid as a potential prognostic marker for roux-en-Y gastric bypass in Chinese obese patients[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015,100(11):4222-4230
- 19 Lv L, Wu SY, Wang GF, *et al.* Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin[J]. *Phytother Res*, 2010,24(2):219-224
- 20 段炼,李会军,闻晓东,等. 黄芪治疗糖尿病研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013,22(7):776-781
- 21 王涛,魏学娟,翁孝刚,等. 黄芪多糖对肥胖大鼠胰岛素敏感性的影响[J]. 中国药理学杂志, 2011,46(3):185-188

(收稿日期:2017-01-24)

(修回日期:2017-02-27)

(接第 38 页)

- 5 Sondag GR, Haqqi TM. The role of microRNAs and their targets in osteoarthritis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2016, 18(8): 56
- 6 Buechli ME, Lamarre J, Koch TG. MicroRNA-140 expression during chondrogenic differentiation of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(8): 1288-1296
- 7 Gabler J, Ruetze M, Kynast KL, *et al.* Stage-specific miRs in chondrocyte maturation: differentiation-dependent and hypertrophy-related miR clusters and the miR-181 family[J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(23-24): 2840-2851
- 8 Liang Y, Duan L, Xiong J, *et al.* E₂ regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 105
- 9 Zhao R, Sun B, Liu T, *et al.* Optimize nuclear localization and intra-nucleus disassociation of the exogene for facilitating transfection efficacy of the chitosan[J]. *Int J Pharm*, 2011, 413(1-2): 254-259
- 10 赵荣兰,彭效祥. 可磷酸化短肽偶联壳聚糖介导 IL-1RA 与 IGF-1 共转染对兔关节软骨细胞的作用[J]. 中国生化与分子生物学报, 2014, 30(12): 1250-1256
- 11 Nugent M. MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartil*, 2016, 24(4): 573-580
- 12 Miyaki S, Nakasa T, Otsfiki S, *et al.* MicroRNA-140 is expressed

- in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9): 2723-2730
- 13 Miyaki S, Sato T, Inoue A, *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(11): 1173-1185
- 14 Barter MJ, Tselepi M, Gómez R. Genome-wide microRNA and gene analysis of mesenchymal stem cell chondrogenesis identifies an essential role and multiple targets for miR-140-5p[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(11): 3266-3380
- 15 Sladitschek HL, Neveu PA. Bidirectional promoter engineering for single cell microRNA sensors in embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155177
- 16 Kluijver J, Gibcus JH, Hettinga C, *et al.* Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29275
- 17 Chen Y, Caporali E, Stewart M. Bone morphogenetic protein 2 stimulates chondrogenesis of equine synovial membrane-derived progenitor cells[J]. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2016, 29(5): 378-385
- 18 Griffin DJ, Ortvad KF, Nixon AJ, *et al.* Mechanical properties and structure-function relationships in articular cartilage repaired using IGF-I gene-enhanced chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(1): 149-153

(收稿日期:2016-11-23)

(修回日期:2016-12-08)