

FTY720 对大鼠小肠移植慢性排斥血管硬化和细胞因子影响

张海云, 许荣誉, 庄奕煌, 庄建良*

(福建医科大学附属泉州第一医院 肿瘤外科, 福建 泉州 362000)

【摘要】 目的 研究 FTY720 对同种异体大鼠小肠移植慢性排斥的作用及可能作用机制。方法 以 F344 大鼠为供体, Lewis 大鼠为受体, 建立小剂量环孢霉素诱导 F344-to-Lewis 大鼠小肠移植慢性排斥模型。实验分为四组, 组为对照组, $n=7$; 组为 FTY720 组, $n=8$; 组为环孢霉素 A (CsA) 组, $n=8$; 组为 FTY720+CsA 组, $n=8$ 。术后八周行移植组织病理学评分和 ELISA 法测定血清中移植细胞因子 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 以及 TNF α , IFN γ 的表达。结果 术后八周移植组织病理学评分, 组、组与对照组比较均明显改善。但是仅血管硬化评分: 组与对照组比较, 差异具有显著性 ($P<0.05$)。术后血清 (IL-10、IFN γ) 与移植 (IL-10), 组、组与对照组比较具有显著性差异 ($P<0.05$)。结论 单独使用 FTY720 或联用 CsA 具有改善大鼠小肠移植慢性排斥血管硬化以及促进 Th1/Th2 平衡趋向 Th2 表达的趋势的免疫保护作用。

【关键词】 FTY720; 小肠移植; 慢性排斥; 细胞因子

中图分类号: R-332; R392.4

文献标识码: A

doi:10.3969/j.issn.1674-4659.2012.01.0028

Effect of FTY720 on Angiosclerosis and Cytokine of Chronic Rejection after Small Bowel Transplantation of Rats

ZHANG Haiyun, XU Rongyu, ZHUANG Yihuang, ZHUANG Jianliang*

(Department of Surgical Oncology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and possible mechanism of FTY720 on the chronic rejection (CR) after small bowel transplantation of rats. **Methods** Using F344 rats as donors and Lewis rats as receptors to establish the model of chronic small bowel allograft rejection of F344-to-Lewis rats. The rats were randomly divided into four groups:) control group, $n=7$;) FTY720 group, $n=8$;) CsA group, $n=8$;) FTY720 + CsA group, $n=8$. Histopathological scores and the expression of allograft cytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and TNF α , IFN γ in blood serum by ELISA test were evaluated 8 weeks after transplantation. **Results** The histopathological scores 8 weeks after transplantation in group and group improved obviously in contrast to the control group. There was significant difference in vascular sclerosis scores between group and control group ($P<0.05$). Compared with control group, the expression of IL-10, IFN γ and IL-10 in blood serum in group and group attained statistic significance ($P<0.05$). **Conclusion** These results suggest that FTY720 and FTY720+CsA regulate the process of chronic small bowel rejection as shown by the improvement of graft arteriosclerosis and the modulation of cytokine expression. The mechanism of FTY720 deserves further study.

【Key words】 FTY720; Small bowel transplantation; Chronic rejection; Cytokine

FTY720 系 1995 年日本藤多哲朗与吉富制药公司合作, 从冬虫夏草培养液中提取出的有效成分 ISP-1, 经结构改造合成的新制剂^[1]。近年有关 FTY720 在大鼠皮肤、心脏、肝脏的同种异体移植及犬、猴等大型动物肾脏的同种异体移植中, 均呈较强的免疫抑制活性^[2, 3]。但有关 FTY720 与移植慢性排斥的研究仍很少。实体器官的慢性排斥, 移植血管硬化是慢性排斥的主要病理特征之一^[4], 此外, 移植排斥反应中细胞因子起着关键的介导作用^[5]。为了进一步探讨小肠移植慢性排斥发生过程中, FTY720 干预是否具有免疫保护作用, 在 F344-to-Lewis 大鼠小肠移植慢性排斥模型的基础, 我们通过观察术后

八周大鼠小肠移植慢性排斥病理特征的表达情况及细胞因子表达, 探讨 FTY720 干预是否具有改善小肠移植慢性排斥的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

雄性健康近交系 F344 和 Lewis 大鼠, 体重 220 ~ 250 g (中国医学科学院北京动物实验中心, 北京维通利华公司提供)。试剂包括: FTY720 粉剂及环孢霉素 A (瑞士诺华制药有限公司); 低温高速离心机 (Heraeus 公司); ELISA 试剂盒 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 以及 TNF- α , INF- γ) (R&D 公司); 考马斯亮蓝 G-250 (Fluka 进口分装); 牛血清白蛋白 (BSA) (上海长阳生化制药厂); DG3022A 型酶联免疫检测仪 (南京华东电子管厂); 721 分光光度计 (上海第三分析仪器厂产品); JA2603 型电子天平 (上海医科大学仪器厂)。

1.2 实验分组与处理

参考文献^[6], 应用小剂量环孢霉素 A (CsA) 诱导大鼠小

收稿日期: 2011-08-10 修回日期: 2011-12-14

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (项目编号: 2008J0310)

作者简介: 张海云, 男, 福建泉州人, 主治医师, 医学博士, 从事胸外科专业。

* 通讯作者: 庄建良, 男, 福建泉州人, 主任医师, 从事胸外科专业。

肠移植慢性排斥模型。术后 0 ~ 13 天给予小剂量 CsA (5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 肌注)。术后 2 周分组给药不同。

动物分组如下: 组为对照组 (n=7), 给予 PBS 缓冲液;

组为 FTY720 组 (n=8), 给予 FTY720; 组为 CsA 组 (n=8), 给予 CsA; 组 FTY720 + CsA 组 (n=8), 给予 FTY720 联合 CsA。采取灌胃方式给药。剂量参照文献 [2, 7], FTY720 按 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 环孢霉素 A 按 3 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 每日称重计当日量。

动物实验通过医学研究伦理审查同意。

1.3 手术方法、术后处理与取材

根据前期研究 [8], 建立小剂量环孢霉素诱导 F344-to-Lewis 大鼠小肠移植慢性排斥模型。在正常饮食基础上, 给予 PBS 液, FTY720, CsA 直至术后 8 周取材。

术后 8 周取材, 经受体腹主动脉抽取约 6 ~ 8 ml 的动脉血, 取血清留待测细胞因子。切取末段移植肠约 6 cm, 注意弃用造瘘口及其周围纤维化组织肠段。约 3 cm 标本 10% 中性福尔马林固定后行 HE 染色, Masson's 染色, 弹力纤维染色, 作病理组织分析。其余部分约 3 cm 迅速置于液氮罐后转入 -70 °C 超低温冰箱保存, 作测定移植肠细胞因子。

1.4 移植肠慢性排斥组织学评分

移植肠的慢性排斥评分标准参照文献 [6, 9], 选取的指标包括: 移植血管硬化 (0 ~ 5 分), 系膜纤维化, 淋巴细胞浸润, 移植肠粘膜绒毛钝化改变 (0 ~ 3 分), 光学显微镜 400 × 镜下二人评分。

1.5 制备 10% 移植肠组织匀浆

称取 100 mg 移植肠组织, 剪碎, 加入预冷的 1 ml 裂解液 A, 冰上混匀后放入匀浆器中, 充分研磨成肠组织匀浆, 2 000 rpm 离心 30 s, 提取上清液继续裂解 20 min, 加入 50 μl 10% Nonidet P (NP) 后继续震荡 30 s, 4 °C, 10 000 rpm 离心 1 min, 取上清液 4 °C 保存待测 [10]。

1.6 考马斯亮蓝 G-250 法测定移植植物蛋白质含量

应用常量法制作蛋白标准曲线: 标准牛血清白蛋白液的浓度为 0.5 g/l, 在试管中分别加入蛋白标准液: 12.5、25、50、75、100、125、150 μl (即含小牛血清蛋白分别为 6.25、12.5、25、37.5、50、62.5、75 μg)。然后分别加生理盐水补充使其体积为 200 μl, 空白管加 200 μl 生理盐水, 混匀后各加考马斯亮蓝显色液 4 000 μl, 摇匀, 室温放置 5 min 后在 595 nm 比色测光密度。根据标准蛋白浓度绘制出标准曲线。同样方法测试待测样品中蛋白含量 [9]。

1.7 ELISA 法测定血清与移植物的细胞因子表达

按照试剂盒说明书步骤进行, 具体如下: 加入 50 μl 待测血清或 10% 移植肠匀浆、标准品以及对照品, 加入 50 μl 或 100 μl 稀释后的生物素标记的 IL-2 或 IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ 的抗体。

室温下 (18 ~ 25 °C) 孵育 3 h, 冲洗 3 遍, 加入 100 μl 亲和素标记的辣根过氧化物酶, 室温下孵育 30 分钟, 冲洗 3 遍。继之加入 100 μl 待用的 TMB (四甲基联苯胺), 避光, 显色 12 ~ 15 min, 加入 50 μl 终止液 (2 M H₂SO₄) 终止反应。

测定 450 nm 处的吸光值, 计算结果。

1.8 数据分析处理

实验数据应用均数 ± 标准差表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 两样本间均数比较行独立样本 *t* 检验。组间比较采用多组间单因素方差分析 (one-way, ANOVA), 多组间两两比较, 若方差齐用 Dunnett-*t* 检验, 若方差不齐用 Mann-Whitney *U* 检验。

2 结果

2.1 术后生长曲线

术后生长曲线 (见图 1) 表明, 各个时间段比较, 各组间前生长速率无显著性差异。但 组 (FTY720 + CsA 组) 术后恢复最快, 四周时体重为手术后当时 120.4%, 八周时为 153%, 但与其他三组统计学比较无差异。

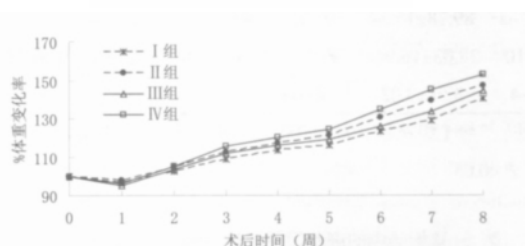


图 1 不同药物干预后小肠移植大鼠生长曲线

术后 0 天体重为 100%, 图示记录时与术后 0 天比较变化率

2.2 术后八周移植物的组织病理学评分

见表 1, 血管硬化指标评分 (0 ~ 5 分), 其余三指标 (0 ~ 3 分)。血管硬化评分: 组 (FTY720 + CsA 组) 与 组 (对照组) 比较 ($P=0.046$), 差异具有显著性, 显示 FTY720 与 CsA 联用明显改善移植血管硬化 (见图 2)。其余指标: 组 (FTY720 + CsA 组) 与 组各指标评分均较其余组低 (尤其是淋巴细胞浸润), 但统计学分析无显著性差异。

表 1 移植组术后八周病理组织学评分 ($\bar{x} \pm s$)

转基因移植组	血管硬化	肠粘膜钝化	淋巴细胞浸润	系膜纤维化
对照组	3.33±0.52	1.50±1.06	2.33±0.82	2.66±0.51
FTY720 组	3.00±0.53	1.62±1.18	1.75±0.89	2.00±1.07
CsA 组	3.212±0.64	1.37±1.18	2.00±0.75	2.37±0.74
FTY720+CsA 组	2.75±0.46	1.12±0.99	1.50±0.75	2.25±0.88

注: 血管硬化评分 0 ~ 5 分, 其余 0 ~ 3 分

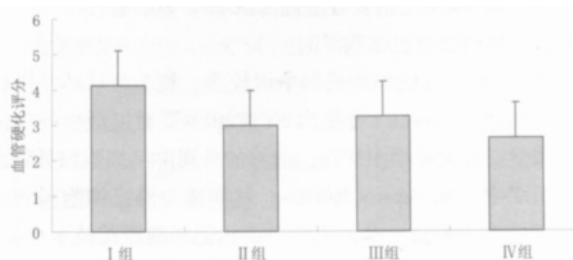


图 2 不同移植组术后八周血管硬化评分

I 组与 IV 组比较, $P<0.05$; 其余各组间比较, $P>0.05$

2.3 大鼠小肠移植慢性排斥血清

大鼠小肠移植慢性排斥血清（见表 2）与移植物（见表 3）中细胞因子表达结果表明：其中血清 IFN- γ 和 IL-10，FTY720 组（组）、FTY720 + CsA 组（组）与对照组（组）比较差异具有显著性（ $P < 0.05$ ）。移植肠细胞因子 IL-10（表 3），FTY720 组（组）、FTY720 + CsA 组（组）与对照组（组）比较具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

表 2 血清中的细胞因子表达 (pg/ml) ($\bar{x} \pm s$)

项目	组	组	组	组
IL-2	35.52 $\pm$ 16.91	21.56 $\pm$ 9.37	64.17 $\pm$ 38.61 ^{·△}	26.57 $\pm$ 11.40 [·]
IFN- γ	148.21 $\pm$ 45.44 [△]	63.65 $\pm$ 24.60 [·]	93.01 $\pm$ 46.43	53.34 $\pm$ 21.64 [·]
IL-6	244.36 $\pm$ 43.01	136.53 $\pm$ 29.07	101.63 $\pm$ 21.04 [·]	111.47 $\pm$ 22.45 [·]
TNF- α	89.78 $\pm$ 15.34	93.52 $\pm$ 17.43	136.04 $\pm$ 27.34	118.78 $\pm$ 7.77
IL-10	38.03 $\pm$ 16.94 [△]	97.62 $\pm$ 42.73 [·]	38.52 $\pm$ 10.67	100.75 $\pm$ 40.58 [·]
IL-4	3.51 $\pm$ 3.02	4.01 $\pm$ 2.45	5.93 $\pm$ 3.53	6.67 $\pm$ 3.46

注：·与 组比较， $P < 0.05$ ；[△]与 组比较， $P < 0.05$ ；[·]与 组比较， $P < 0.05$

表 3 移植肠中的细胞因子表达 (pg/mg 蛋白) ($\bar{x} \pm s$)

项目	组	组	组	组
IL-2	9.19 $\pm$ 4.47	7.16 $\pm$ 3.63	4.38 $\pm$ 2.67	6.37 $\pm$ 3.85
IFN- γ	21.21 $\pm$ 6.23	16.67 $\pm$ 8.46 [·]	9.02 $\pm$ 2.47 ^{·△}	9.31 $\pm$ 3.37 [·]
IL-6	31.12 $\pm$ 7.34	11.67 $\pm$ 4.23 ^{·*}	27.95 $\pm$ 6.53 [△]	19.65 $\pm$ 5.89
TNF- α	21.60 $\pm$ 8.85	21.12 $\pm$ 7.37	24.11 $\pm$ 5.63	16.76 $\pm$ 6.12
IL-10	23.46 $\pm$ 12.37	59.11 $\pm$ 16.63 [·]	41.43 $\pm$ 14.34	54.65 $\pm$ 18.47 [·]
IL-4	2.87 $\pm$ 1.34	4.21 $\pm$ 1.40	3.65 $\pm$ 1.43	5.31 $\pm$ 1.96

注：·与 组比较， $P < 0.05$ ；[△]与 组比较， $P < 0.05$ ；[·]与 组比较， $P < 0.05$

3 讨论

我们前期的研究表明，应用小剂量环孢霉素诱导大鼠小肠移植慢性排斥模型，组织学观察显示小肠移植慢性排斥的常见病理特征在术后 6 ~ 12 周发生^[8]。其中，移植物动脉硬化是实体器官移植慢性排斥最重要的特征之一^[4, 8]。FTY720 作为一种新型的免疫抑制剂，在动物实验的急、慢性排斥中免疫抑制作用已经确认。目前，FTY720 用于治疗肾移植排斥反应已经进入 期临床研究阶段。同样，本研究组的证据表明，FTY720 无论单用还是联合应用 CsA 都明显改善移植物血管病变和减少移植物淋巴细胞浸润。

有关 FTY720 的作用机制争议较多，较为公认的是淋巴细胞归巢机制。Enosawa 曾提出 FTY720 主要通过减少外周淋巴细胞数量发挥免疫抑制作用，成熟的外周淋巴细胞归巢到次级淋巴组织中（如 Peyer's Patches）从而减少淋巴细胞浸润。肖鹤等通过流式细胞技术及荧光染料标记细胞跟踪技术也证实，FTY720 主要是通过促进外周淋巴细胞归巢发挥免疫抑制作用。然而，aly/aly 基因缺失的小鼠先天缺乏 Peyer's 淋巴结，应用 FTY720 仍然发现外周血淋巴细胞数量的减少^[11-12]。尽管如此，

本研究组结果表明 FTY720 无论单用还是联合应用减少移植物淋巴细胞浸润，提示 FTY720 是通过淋巴细胞这一环节发挥作用。

目前认为，移植排斥反应主要由细胞因子介导的免疫应答来完成。根据它们在炎症和免疫排斥反应中的不同作用，为了便于临床应用理解，分为 Th1 与 Th2 型两大类（或称一型和二型）细胞因子^[13]。既往研究认为，Th1 型细胞因子包括 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等，与移植排斥反应有关。Th2 型细胞因子包括 IL-4、IL-6、IL-10 等，主要与免疫耐受有关^[13-14]。仅仅 Th2 细胞因子并不足够诱导免疫耐受，而 Th1 细胞因子并非完全不利移植物生存。建立在复杂细胞因子网络观点上的 Th1/Th2 细胞因子平衡移动的概念，取代某一种细胞因子变化能够更好的反映和理解器官移植的免疫状态。研究结果显示，与对照组比较，单用 FTY720、CsA 以及联用组的 Th1 型细胞因子和 Th2 型细胞因子都发生了变化，表明在慢性排斥环境下建立了新的 Th1/Th2 平衡表达。FTY720 单用组以及联用 CsA 组，具有促进 Th1/Th2 平衡趋向 Th2 表达的趋势，尤其是 IL-10 细胞因子的表达增高非常显著。

IL-10 在同种异体器官移植的细胞因子网络中扮演着重要的角色，具有抑制抗原特异性的 T 细胞增殖及其分泌促炎细胞因子的作用。在发生器官移植排斥反应中往往伴有 IL-10 的低表达，而免疫耐受则为 IL-10 高表达。Asderakis 等^[15]在肾移植的研究提示，IL-10 高表达对移植肾长期存活有明显相关性，IL-10 高表达者较少出现移植肾慢性失功现象，高表达组较低表达组（75 vs. 50%）5 年生存率更高。Daniel C 在小鼠结肠炎模型研究认为^[16]，FTY720 通过促进 IL-10 高表达改善小鼠结肠炎表现，CD4⁺ CD25⁺ T 细胞活性调节是其作用的主要环节。Shirwan H^[17]认为，IL-10 是一种潜在的负性调节因子，它通过直接或间接作用下调 IL-2，TNF- α 、IFN- γ 等促炎细胞因子的表达水平，从而达到抑制炎症反应，发挥免疫保护的作用。本研究也验证了在 IL-10 表达增强的同时，IFN- γ 表达下调。

综上所述，本研究组资料表明其在小肠移植慢性排斥中显著改善移植物血管硬化，在减少淋巴细胞浸润，结果提示单用 FTY720 即有明显的免疫抑制作用，联合应用 CsA 效果更显著。尽管其作用机制仍然不明确，但 FTY720 具有促进 Th1/Th2 平衡趋向 Th2 表达的趋势，尤其是 IL-10 细胞因子的表达增高非常显著，这为进一步研究提供了方向。

参考文献

- [1] Kiuchi M, Adachi K, Kohara T, et al. Synthesis and immunosuppressive activity of 2-substituted 2-aminopropane-1, 3-diols and 2-aminoethanols [J]. *J Med Chem*, 2000, 43 (15) : 2946-2961.
- [2] 张永革, 孙尔维, 张雷. FTY720 诱导大鼠心脏移植长期存活 [J]. *中华器官移植杂志*, 2004, 25 (1) : 35-37.
- [3] Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, et al. FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation [J]. *Circulation*, 1999, 100 (12) : 1322-1329.
- [4] Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic

- transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6 (2): 247-253.
- [5] Gaston RS. Cytokines and transplantation: a clinical perspective [J]. *Transplant Sci*, 1994, 4 Suppl 1: S9-19.
- [6] Orloff SL, Yin Q, Corless CL, et al. A rat small bowel transplant model of chronic rejection: histopathologic characteristics [J]. *Transplantation*, 1999, 68 (6): 766-779.
- [7] Wang MH, Liu SY, Ou NT, et al. Protective effects of FTY720 on chronic allograft nephropathy by reducing late lymphocytic infiltration [J]. *Kidney International*, 2004, 66 (3): 1248-1256.
- [8] Zhang H, Li Y, Wang J, et al. Sequential Observations Show Upregulation of TGF-beta1 at the Early Phase of Chronic Small Bowel Rejection in Rats [J]. *Digest Dis and Sci*, 2007, 52 (11): 3224-3230.
- [9] Kouwenhoven EA, SteinOakley AN, Jablonski P, et al. EGF and TGF-beta1 gene expression in chronically rejecting small bowel transplants [J]. *Dig Dis Sci*, 1999, 44 (6): 1117-1123.
- [10] 陈毓荃. 生物化学研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [11] Enosawa S, Suzuki S, Kakefuda T, et al. Induction of selective cell death targeting on mature T-lymphocytes in rats by a novel immunosuppressant, FTY720 [J]. *Immunopharmacology*, 1996, 34 (2-3): 171-179.
- [12] 肖鹤, 崔健, 张磊, 等. FTY720 介导的淋巴细胞归巢作用对外周淋巴细胞的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27 (11): 1009-1010.
- [13] Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more [J]. *Immunol Today*, 1991, 12 (8): 256-257.
- [14] Pirenne J, Kitade H, Kawai M, et al. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion [J]. *Transplantation*, 2005, 79 (S3): S25-27.
- [15] Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, et al. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation [J]. *Transplantation*, 2001, 71 (5): 674-677.
- [16] Daniel C, Sartory N, Zahn N, et al. FTY720 ameliorates Th1-mediated colitis in mice by directly affecting the functional activity of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (4): 2458-2468.
- [17] Shirwan H, Barwari L, Khan NS. Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides [J]. *Transplantation*, 1998, 66 (12): 1802-1809.

(责任编辑: 常海庆)

(上接第 27 页)

骨不连, 骨折愈合率高达 97.4%。梁士义等^[5]采用动力髋螺钉固定, 配合壮筋续骨丹, 治疗老年股骨粗隆间骨折, 疗效满意。匡建华等^[6]用手法复位后小夹板或石膏固定配合接骨理伤汤治疗新鲜骨折, 疗效满意。李杰宝等^[7]应用接骨膏糖浆治疗肋骨骨折, 疗效确切。本实验表明, 复方壮筋续骨汤对骨折愈合有良好的作用, 其能明显促进骨折的愈合, 缩短骨折愈合时间。

研究表明, 血肿机化期, 丹参、川芎、红花等活血化瘀药可以改善骨折断端局部血液循环, 清除血凝块及代谢产物, 为骨痂形成提供条件^[8]。林燕萍等^[9]发现, 益气化瘀剂能促进血肿加快吸收、机化, 血肿吸收越快, 机化越迅速, 骨折愈合也就越快。活血化瘀中药还有明显的促进髓腔毛细血管扩张充血的作用, 为各种细胞活动提供了营养物质。骨痂形成期, 续断、骨碎补等含有丰富胶原、钙盐和微量元素, 参与蛋白合成酶代谢等, 有利于骨质修复^[10]。骨痂改造期, 补益肝肾、强筋健骨的鹿茸、人参、骨碎补等, 可明显改善蛋白以及代谢, 促进蛋白质多糖合成以及钙化, 以顺利完成新骨的爬行替代过程^[11]。益气活血、补益肝肾、强筋壮骨等中药能促进骨细胞碱性磷酸酶的合成与释放, 促进骨折断端钙磷的沉积^[12], 有利于骨折愈合, 缩短骨折愈合时间。

参考文献

- [1] 赵子春, 曹志强, 李洪, 等. 中医药促进骨折愈合的相关研究进展 [J]. *陕西中医*, 2011, 32 (5): 636-637.

- [2] 肖宗苗. 中医药促进骨折愈合的常用方法研究 [J]. *长春中医学院学报*, 2005, 21 (3): 13-14.
- [3] 李凯, 史明, 李文恒. 中医药促进术后骨折愈合的实验研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009 (10).
- [4] 张学恒, 郭筱秋, 曾石川, 等. 单侧多功能外固定支架配合中药治疗肱骨骨折骨不连 43 例 [J]. *江西中医药*, 2006, 37 (8): 37-38.
- [5] 梁士义, 刘召军. 中西医结合治疗老年股骨粗隆间骨折 42 例 [J]. *国医论坛*, 2005, 20 (5): 45-46.
- [6] 匡建华, 匡建红, 罗星华, 等. 接骨理伤汤促进骨折愈合 50 例 [J]. *湖南中医杂志*, 2003, 19 (3): 19-20.
- [7] 李杰宝, 张家衡. 接骨膏糖浆治疗肋骨骨折的临床研究 [J]. *湖北中医杂志*, 2010, 32 (3): 26-27.
- [8] 刘钟华, 杨世荣, 回春. 中药促进骨折愈合的实验研究概况 [J]. *长春中医学院学报*, 2004, 20 (2): 63-65.
- [9] 李也白, 徐风管. 复合中药制剂促进骨折愈合的实验研究 [J]. *骨与关节损伤杂志*, 1999, 14 (2): 108-110.
- [10] 周秋丽, 王丽娟. 鹿茸多肽对实验性骨折的治疗作用及机理研究 [J]. *白求恩医科大学学报*, 1999, 25 (5): 586-588.
- [11] 林燕萍, 周瑞祥. 煅狗骨对实验性骨折愈合作用的垂体 TSH、GH 细胞免疫细胞化学研究 [J]. *中国骨伤*, 1993, 6 (6): 5-7.
- [12] 马莎, 李玛琳. 中药促进骨折愈合及其机制的研究进展 [J]. *西部医学*, 2011, 23 (8): 1603-1605.

(责任编辑: 常海庆)