

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0432-05

## 黄芪多糖对犬骨髓基质干细胞增殖 及超微结构的影响

许春姣<sup>1</sup>, 翦新春<sup>2</sup>, 郭峰<sup>2</sup>, 高清平<sup>2</sup>, 彭解英<sup>3</sup>, 徐锡平<sup>4</sup>

(1.中南大学湘雅医院 口腔科; 2.中南大学口腔医学院 口腔颌面外科学教研室;  
3.牙周黏膜病学教研室; 4.中南大学湘雅医学院 电镜室, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨黄芪多糖(APS)对诱导培养的犬骨髓基质干细胞(BMSCs)增殖、分化成骨作用及超微结构的影响。方法 用瑞氏-姬姆萨染色、改良Gomori钙-钴法、茜素红染色法检测BMSCs分化成骨的能力。用四唑盐(MTT)比色和酶动力学方法测定不同浓度和时间的APS对诱导培养的BMSCs增殖影响以及超微结构的改变。结果 诱导条件下BMSCs具有成骨细胞活性,瑞氏-姬姆萨染色呈深蓝色,改良Gomori钙-钴法将细胞及矿化结节染成黑色,茜素红染色法见细胞及矿化结节成红色。第1、3天时,低浓度(0.005 mg/mL)APS可促进诱导培养的BMSCs增殖;而第5天时,高浓度(50 mg/mL)APS则明显抑制诱导培养的BMSCs增殖。第5天,透射电镜下,0.005 mg/mL APS组细胞线粒体、粗面内质网增多,细胞外基质分泌增加;50 mg/mL APS组细胞发生退变,粗面内质网和线粒体明显减少,且二者明显肿胀、变性、膜结构破坏。结论 短期低浓度APS能促进诱导培养的BMSCs的代谢和蛋白质的合成,有利于细胞的增殖和向成骨分化。

[关键词] 骨髓基质干细胞; 黄芪多糖; 分化; 超微结构

[中图分类号] R932 [文献标识码] A

Effect of astragalus polysaccharides on the proliferation and ultrastructure of dog bone marrow stem cells induced into osteoblasts in vitro XU Chun-jiao<sup>1</sup>, JIAN Xin-chun<sup>2</sup>, Guo Feng<sup>2</sup>, GAO Qing-ping<sup>2</sup>, PENG Jie-ying<sup>3</sup>, XU Xi-ping<sup>4</sup>. (1. Dept. of Stomatology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Central South University, Changsha 410008, China; 4. Dept. of Electron Microscope, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] Objective To observe the growth and osteogenic property of cultured dog bone marrow stem cells (BMSCs) by investigating the effects of astragalus polysaccharides(APS) on the proliferation and ultrastructure of BMSCs into osteoblasts in vitro. Methods BMSCs osteogenic property was detected by improved Wright-Giemsa, Gomori and alizarin dyeing method. The proliferation and differentiation of the induced BMSCs with APS in different concentration and time were detected by MTT assay and the morphologic change of the induced BMSCs was observed by transmission electron microscope(TEM). Results BMSCs osteogenic property was detected with Wright-Giemsa deep-blueing, Gomori method blacking and with more mineral nodules alizarin dyeing method carmining. APS with concentration of 0.005 mg/mL can promote the proliferation of the induced BMSCs in short-term culture(1th, 3th day) and 50 mg/mL can decrease the effect through long-term culture(5th day). Observed by TEM(5th day), the number of mitochondria, rough endoplasmic reticulum increased and the extracellular matrix was excreted more in the induced BMSCs by APS with concentration of 0.005 mg/mL. However, not only the number of mitochondria, rough endoplasmic reticulum reduced but also the structure was swollen, degenerative, membrane damaged in the induced BMSCs by APS with concentration of 50 mg/mL. Conclusion APS with lower concentration in short-term culture may promote BMSCs proliferation and differentiation.

[Key words] bone marrow stem cells; astragalus polysaccharides; differentiation; ultrastructure

[收稿日期] 2007-03-28; [修回日期] 2007-08-06

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(06jj4016)

[作者简介] 许春姣(1966-),女,广西人,副教授,博士

[通讯作者] 翦新春, Tel: 0731-4327493

牙周炎、外伤、肿瘤、先天畸形等引起的牙槽骨缺损是临床常见的口腔疾病之一。因此,在疾病控制后,使已破坏的牙槽骨再生并重建新附着是牙

周治疗的关键。目前,应用于牙周再生的生长因子主要有骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等<sup>[1-2]</sup>,但因来源困难、造价高、有致基因突变的危险等,使其在临床上难以广泛开展。中草药是天然植物,具有多种药效,且来源丰富、造价低、毒副作用小。有研究表明黄连、银杏、木兰花、石蛇床子、红花籽等对抗炎、抗菌、牙周组织愈合有明显疗效<sup>[3-6]</sup>。黄芪可以促进骨髓成纤维细胞集落(colony forming unit-fibroblastic, CFU-F)数增殖<sup>[7]</sup>,促进成骨细胞增殖和分化<sup>[8]</sup>。

骨髓基质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)具有多向分化潜能,是目前最为合适的骨组织工程种子细胞<sup>[9]</sup>。研究表明BMSCs与牙周组织中多种组织的再生有关<sup>[10]</sup>。因此,为提高BMSCs的成骨效率,有必要选择合适的培养条件,以促进其增殖并定向分化为成骨细胞以修复缺损的牙槽骨。

本实验通过观察黄芪有效成分黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)对诱导培养的犬BMSCs增殖的影响,寻找APS适宜的作用浓度和时间,并通过透射电镜技术(transmission electron microscope, TEM)观察APS对细胞超微结构的影响,为进一步探讨APS适宜的作用浓度和时间提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器与试剂

相差显微镜(Olympus公司,日本),透射电镜(H600, Hitachi公司,日本),CO<sub>2</sub>培养箱(TABAI ESPEC CORP,日本),超净工作台(苏州净化设备厂),Elix-800型酶联免疫检测仪(Bio-TEK Instruments INC,美国),1640完全培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(Hyclone公司,美国),地塞米松、维生素C、-甘油磷酸钠、四唑盐(MTT)、茜素红(Sigma公司,美国)。黄芪多糖(水提取法)由中国科学院上海药物研究所植化室提供。

### 1.2 骨髓基质干细胞的体外培养和鉴定

选取由中南大学实验动物中心提供的1-2月龄健康家犬1只,体重为2-3 kg,雌雄不限。用全骨髓法培养,取刚接种的第2代细胞,改用诱导培养基(完全培养基含浓度为10<sup>-8</sup> mol/L地塞米松、50 μg/mL维生素C、10 mmol/L -甘油磷酸钠)培养,置37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱内孵育。相差显微镜连续观察体外培养细胞的生长、增殖、基质分泌和细胞形态的变化。取第4代细胞,用于瑞氏-姬姆萨染色、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色、茜素红染色以判断其向成骨细胞转化及实验。

成骨细胞在瑞氏-姬姆萨染色上有特征,故在形态学上具有鉴别价值。ALP染色阳性被认为是成骨细胞的特异征象,是鉴别成骨细胞的主要依据<sup>[11]</sup>。本实验用改良Gomori钙-钴法,根据成骨细胞内的ALP在pH值9.2-9.8时可将底物-甘油磷酸钠水解,释放出无机磷酸盐,经钙离子作用生成磷酸钙,再与钴离子作用生成磷酸钴,最后与硫化铵生成黑色硫化钴颗粒沉淀于细胞胞浆中。胞浆染成棕色或黑色结果判断为阳性。茜素红属于一种蒽醌类衍生物,是茜素磺酸钠盐,它能与碳酸钙或磷酸钙中的钙盐结合形成橘红或深红复合物,钙盐沉淀处呈橘红或深红色。

### 1.3 黄芪多糖对骨髓基质干细胞增殖的影响

将生长良好的第4代BMSCs胰酶消化后吹散,细胞计数后调整浓度至每毫升1×10<sup>4</sup>个,加入96孔板,每孔100 μL,37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度标准环境下以诱导培养液孵育24 h后,弃去培养液及未贴壁的细胞。实验分为实验组和对照组,实验组又根据诱导培养液中APS的浓度不同分为0.005、0.05、0.5、5、50 mg/mL APS组,对照组仅为诱导培养液,每浓度组为5孔,每孔100 μL。37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度下孵育1、3、5 d后,MTT法检测细胞增殖水平,用酶联免疫检测仪490 nm波长测光吸收值。

### 1.4 黄芪多糖对骨髓基质干细胞超微结构的影响

选取诱导培养的第4代BMSCs,用0.25%的胰蛋白酶消化后接种到新的培养瓶中,培养24 h后,吸弃原有培养液,实验分为实验组和对照组,实验组又分为0.005、50 mg/mL APS组,分别加入浓度为0.005、50 mg/mL APS的培养液4 mL,对照组加入不含APS的培养液4 mL,隔日换液。第5天时,用0.25%的胰蛋白酶消化细胞,分别收集于离心管中,1 000 r/min离心15 min,弃上清,用2%戊二醛固定细胞团块2 h,丙酮梯度脱水,真空干燥,以Epon812包埋,超薄切片后透射电镜观察。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用ONEWAY-ANOVA方差分析进行统计学处理。检验标准为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 骨髓基质干细胞的培养和鉴定结果

原代BMSCs呈成纤维细胞样生长,传代培养中可见典型的单个细胞克隆样生长方式,单个细胞分裂增殖形成克隆,不断增大,密集细胞中间基质沉积,形成钙化结节。

诱导培养14 d的BMSCs,经瑞氏-姬姆萨染色后

发现细胞胞体较大，圆形或多角形，边界清晰，胞浆量丰富，呈深蓝色，胞浆边缘多呈云絮状；胞核偏位，呈圆或椭圆形，偶有双核型，核染色质深紫色，呈粗糙疏松网状，核仁1-2个，呈蓝色，具有成骨细胞特征性表现(图1)。未经诱导培养的细胞染色结果为阴性。

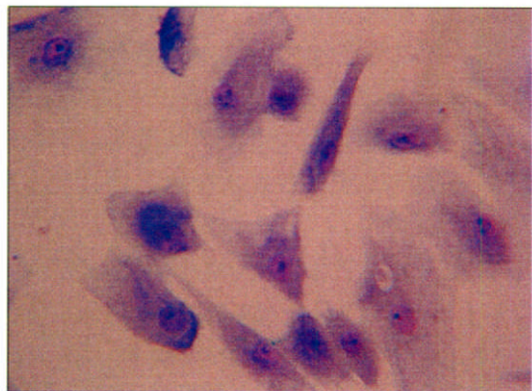


图1 诱导培养的BMSCs胞体较大，胞浆丰富呈深蓝色，其边缘呈云絮状；核染色质粗糙疏松网状，呈深紫色，核仁呈蓝色 瑞氏-姬姆萨染色 ×400

Fig 1 Induction of the BMSCs was a large cell, with cytoplasm rich and dark blue, cotton-like cloud edges, nuclear chromatin was rough osteoporosis and dark purple, nucleolar was blue Wright-Giemsa staining ×400

诱导培养14 d的BMSCs，均显示细胞和细胞间的钙盐沉积。ALP染色显示，多数细胞黑染，钙化结节染成深黑色(图2)。未经诱导培养的细胞染色结果为阴性。

茜素红染色显示，诱导培养14 d的多数细胞呈深红染色，钙化结节呈橘红染色(图3)。未经诱导培养的细胞染色结果为阴性。

## 2.2 黄芪多糖对骨髓基质干细胞增殖的影响

APS对BMSCs增殖的影响见图4，实验组中无论APS浓度高低，与对照组相比，第1、3天细胞呈增殖趋势；第5天除0.005 mg/mL组外，细胞呈抑制趋

势。第1天，0.005、0.05 mg/mL组保持较强的增殖，与对照组相比，光吸收值增加( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。第3天，各组增殖略弱，但0.005 mg/mL与对照组相比，光吸收值增加( $P < 0.05$ )。第5天，除0.005 mg/mL组细胞呈上升趋势外，其他各组细胞增殖呈明显抑制( $P < 0.05$ )。

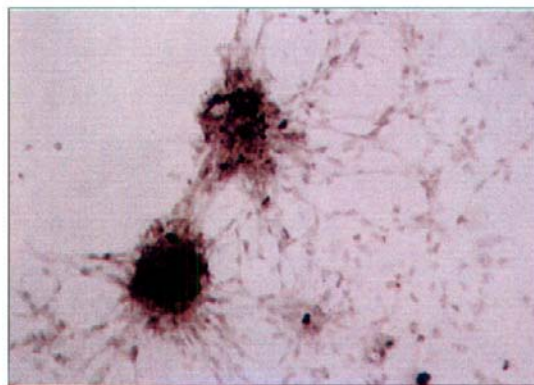


图2 诱导的BMSCs染成棕黑色，细胞着色程度不一，密集处出现黑染的钙结节 碱性磷酸酶染色 ×100

Fig 2 Induction of BMSCs dyed black and brown, cell coloring varies, dense black appeared with nodules of calcium ALP staining ×100

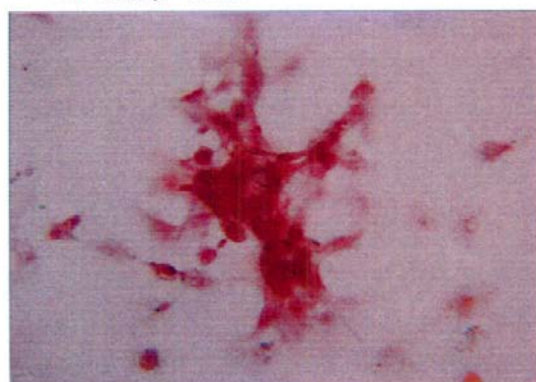


图3 诱导的BMSCs呈深红染色，钙化结节呈橘红染色 茜素红染色 ×100

Fig 3 Induction of BMSCs was dark red staining, calcified nodules showed orange-red staining Alizarin red staining ×100

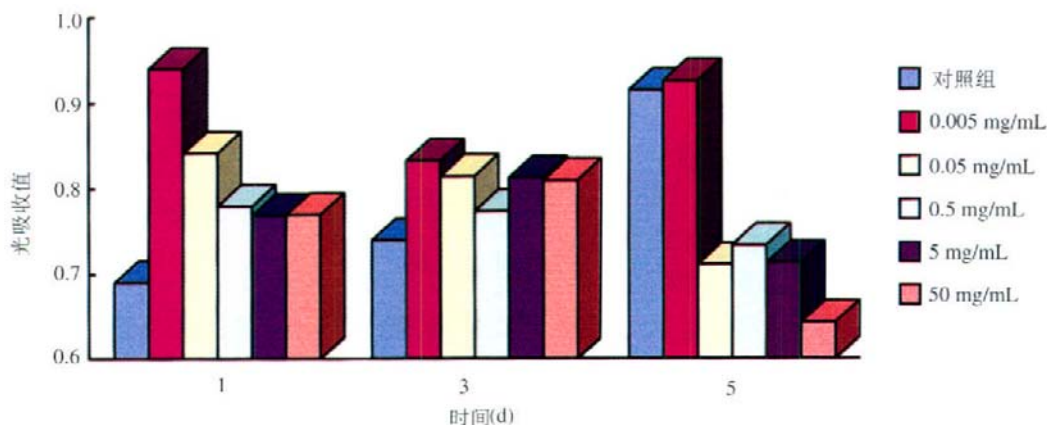


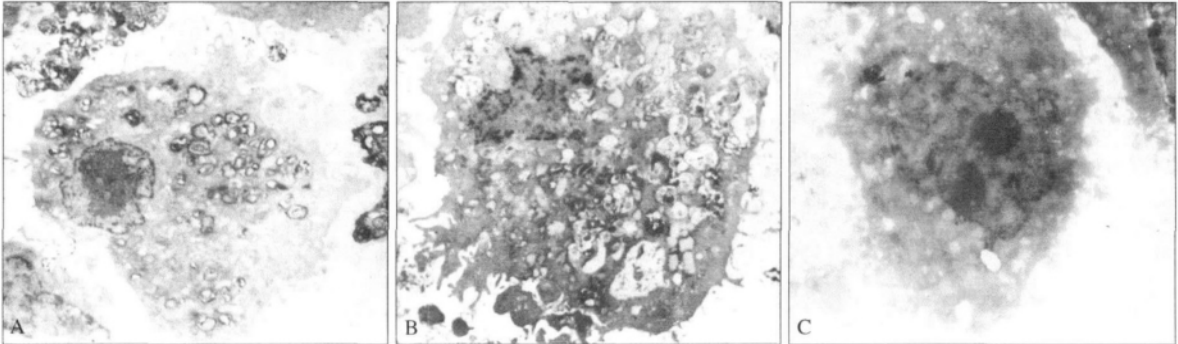
图4 黄芪多糖对骨髓基质细胞增殖的影响

Fig 4 The effects of APS on bone marrow stromal cell proliferation

### 2.3 黄芪多糖对骨髓基质干细胞超微结构的影响

透射电镜下, 对照组胞浆内可见丰富的粗面内质网和线粒体, 含少量溶酶体, 有细胞突起, 细胞核偏于一侧, 核仁明显, 核膜清楚, 有陷窝, 核膜下有丰富的异染色质, 具有成骨细胞的典型超微结构特征。0.005 mg/mL APS组, 粗面内质网和线粒体

明显增多, 且二者轻度扩张、肿胀, 膜结构完整, 细胞突起增多, 细胞内可见较多的基质小泡, 细胞外基质分泌增多。50 mg/mL APS组细胞发生退变, 粗面内质网和线粒体明显减少, 且二者肿胀明显, 多数粗面内质网呈囊泡样变, 多数线粒体呈空泡样变, 膜结构破坏, 溶酶体增多(图5)。



A: 对照组; B: 0.005 mg/mL APS组; C: 50 mg/mL APS组

图5 对照组、0.005 mg/mL APS组、50 mg/mL APS组的BMSCs超微结构 TEM ×6000

Fig 5 The ultrastructure of BMSCs in the control group, 0.005 mg/mL APS group, 50 mg/mL APS group TEM ×6000

### 3 讨论

目前牙周骨重建修复多集中在牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs)的研究上, 但PDLs移植有其难以克服的局限性, 表现在可获的细胞数量极少, 难以扩增到所需的数量, 且自体的PDLs来源困难。BMSCs正好弥补这个缺点。近年来, 有关组织工程的细胞因子研究较多, 对黄芪的主要活性成分APS在促进骨髓造血方面的报道较多。本实验通过观察APS作用下犬BMSCs的增殖及超微结构的变化, 为探讨体外培养BMSCs扩增和促成骨生成提供了新途径。

培养的成骨细胞的鉴定应该用多种方法综合判断, 既要有形态学鉴定, 也要有ALP等标志着成骨细胞成熟物质的鉴定。因成骨细胞经瑞氏-姬姆萨染色在形态学上有特征性表现, 再加上ALP染色、茜素红染色阳性, 一般可以鉴定为成骨细胞。本实验中诱导培养的BMSCs经瑞氏-姬姆萨、ALP、茜素红染色均呈强阳性, 提示已进入成熟期, 并预示着钙化的进一步发生, 在钙化期, 细胞逐渐出现变性, 其分泌的胶原纤维能结合钙盐, 形成钙结节, 表明BMSCs已转化为成骨细胞, 具有成骨细胞的表型。

黄芪为常用补气药, 始载于《神农本草经》, 是我国重要的传统药材, 每年需求量约为 $6 \times 10^7$  kg。黄芪的化学成分众多, 主要含有多糖类、皂苷类、黄酮类以及氨基酸类等。APS是黄芪的主要活性成分之一, 其具有补气固表、托毒生肌、利水的功

效, “可治气衰血虚之证”, 对骨质疏松有显著疗效<sup>[12]</sup>, 其对骨髓和骨细胞的生长作用近年来也为人们所重视<sup>[8,13]</sup>。

王拥军等<sup>[9]</sup>研究APS对体外培养SD大鼠头盖骨成骨细胞增殖、分化能力的影响, 发现低浓度APS(0.5 mg/mL)及高浓度APS(5.0 mg/mL)短期时(2 d)可促进成骨细胞增殖; 高浓度APS(5.0 mg/mL)长期(4 d)时将抑制成骨细胞增殖, 降低其活性。他认为APS对成骨细胞增殖、活性有双向调节作用。本实验观察不同梯度浓度的APS对BMSCs的增殖作用, 结果表明第1、3天低浓度时APS促进细胞增殖, 第5天高浓度时则明显抑制细胞增殖。结果与前期实验结果<sup>[14]</sup>基本一致。本实验还发现0.005 mg/mL APS组细胞第5天增殖仍呈上升趋势。本实验所采用的是MTT法, 主要反映细胞的能量代谢, 是检测细胞增殖活力的一种简便、准确的方法。其原理是根据增殖的活细胞能通过线粒体能量代谢, 将淡黄色的MTT还原成蓝紫色的结晶(甲瓩)沉积在细胞内和细胞周围, 形成的结晶与增殖的细胞数成正比。而死细胞无此功能。用二甲基亚砷使结晶溶解成紫蓝色溶液, 由于该溶液深浅与细胞存活数量和活性有关, 通过比色, 对光吸收值进行分析, 可反映细胞生长和存活情况。

本实验进一步观察APS对犬BMSCs超微结构的影响, 结果发现APS作用5 d, 0.005 mg/mL APS组粗面内质网和线粒体明显增多, 且二者轻度扩张、肿胀, 膜结构完整, 细胞表面突起增多, 细胞内可见较多的基质小泡, 细胞外基质分泌增多。50 mg/mL

APS组细胞发生退变,粗面内质网和线粒体明显减少,且二者明显肿胀、变性,膜结构破坏,溶酶体增多。超微结构在一定程度上反映细胞的功能状态,因此,超微结构的改变势必对细胞的生长、代谢以及生命力产生影响。

线粒体、粗面内质网较多表明细胞代谢和合成蛋白的能力增强。线粒体是细胞的能量转换系统和主要供能站,约占细胞能量供应的80%。一般来说,细胞代谢活动越活跃,所包含的线粒体数目就越多,线粒体内膜和嵴的面积就越大。本实验观察到经低浓度APS作用后,BMSCs线粒体数目增多,体积明显增大,嵴的密度增加,内膜的面积也随之增大,提示细胞代谢旺盛,为细胞的分裂与增殖奠定物质基础。粗面内质网的主要功能是合成蛋白质,分裂旺盛、增殖迅速的细胞内含有大量的粗面内质网,以提供维持细胞生长所需要的更多的结构蛋白质,同时表明细胞在分裂增殖和生物学功能方面处于非常活跃的状态。而细胞突起增多表明细胞向外分泌的物质增多,也观察到细胞外基质明显增加,这可能是APS促成骨生成的机制之一。高浓度APS则抑制细胞增殖和代谢,表现为粗面内质网和线粒体明显减少,甚至呈囊性、空泡改变,膜结构破坏。溶酶体用来清除衰老的细胞器和外来有害物质,溶酶体增多是细胞中毒的一种表现形式<sup>[9]</sup>。因此,BMSCs超微结构的改变进一步证实,同一观察时间内(5 d),低浓度APS(0.005 mg/mL)促细胞增殖和分化;高浓度(50 mg/mL)抑制细胞增殖和分化,且对细胞有一定毒性作用。

由此可见,BMSCs诱导培养的早期,加入低浓度APS可促进细胞的代谢和蛋白质合成,有利于细胞的增殖。本实验条件下,0.005 mg/mL APS和5 d为较适宜的作用浓度和时间,以此作用于诱导培养BMSCs是组织工程种子细胞体外扩增和成骨转化的另一有益尝试。

#### [参考文献]

[1] Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, et al. Periodontal repair in dogs: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration[J]. *J Periodontol*, 1995, 66(2):131-138.

[2] Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, et al. Platelet-derived growth factor(PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering[J]. *J Periodontol*, 2001, 72(6):815-823.

[3] Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(6):1255-1260.

[4] Cao CF, Sun XP. Herbal medicine for periodontal diseases[J]. *Int Dent J*, 1998, 48(3 Suppl 1):316-322.

[5] Mullally BH, James JA, Coulter WA, et al. The efficacy of a herbal-based toothpaste on the control of plaque and gingivitis [J]. *J Clin Periodontol*, 1995, 22(9):686-689.

[6] Yu S, Chen K, Li S, et al. In vitro and in vivo studies of the effect of a Chinese herb medicine on osteoclastic bone resorption [J]. *Chin J Dent Res*, 1999, 2(1):7-11.

[7] 祝晓玲, 祝彼得, 刘军, 等. 黄芪诱导贫血小鼠骨髓基质细胞产生SCF的研究[J]. *中药药理与临床*, 2001, 17(5):19-20. ZHU Xiao-ling, ZHU Bi-de, LIU Jun, et al. Study on SCF production of bone marrow stromal cell stimulated with astragalus membranaceus in anemic mice[J]. *Pharmacology Clinics Chin Materia Medica*, 2001, 17(5):19-20.

[8] 王拥军, 宋莉君, 孙爱贞, 等. 黄芪多糖的提取及对体外培养成骨细胞成骨能力的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 1999, 7(6):1-4. WANG Yong-jun, SONG Li-jun, SUN Ai-zhen, et al. The refine of APS and its effect of osteogenic capability of osteoblasts in vitro[J]. *Chin J Trad Med Traum Orthop*, 1999, 7(6):1-4.

[9] Taira M, Nakao H, Takahashi J, et al. Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *J Oral Rehabil*, 2003, 30(7):697-701.

[10] Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, et al. Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology[J]. *Periodontol* 2000, 2000, 24:253-269.

[11] 丁焕文, 何锡煌, 苏增贵. 新生小鼠成骨细胞体外培养及其形态结构变化[J]. *解放军医学杂志*, 1998, 23(6):449-451. DING Huan-wen, HE Xi-huang, SU Zeng-gui. Culture in vitro and change of morphology and structure of osteoblasts from new born mice[J]. *Med J Chin PLA*, 1998, 23(6):449-451.

[12] 谢桦, 吴铁, 黄连芳, 等. 黄芪水提液对大鼠的类固醇性骨性疏松的防治作用[J]. *中草药*, 1997, 28(1):25-26. XIE Hua, WU Tie, HUANG Lian-fang, et al. Preventive effects of membranous milkvetch(astragalus membranaceus) on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats[J]. *Chin Traditional Herbal Drugs*, 1997, 28(1):25-26.

[13] 张仲平, 洪介民. 黄芪多糖对体外人骨髓造血祖细胞生成的影响[J]. *中药药理与临床*, 2000, 16(1):16-17. ZHANG Zhong-ping, HONG Jie-min. Effects of astragalus polysaccharides on the creation of human bone marrow haematogenous original cells in vitro[J]. *Pharmacology Clinics Chin Materia Medica*, 2000, 16(1):16-17.

[14] 许春姣, 翦新春, 成洪泉, 等. 黄芪对兔骨髓基质细胞增殖和向成骨细胞分化的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2004, 29(4):489-491. XU Chun-jiao, JIAN Xin-chun, CHENG Hong-quan, et al. Effects of astragalus membranaceus injection on the proliferation and differentiation of rabbit bone marrow stromal cells into osteoblasts in vitro[J]. *J Cent South Univ(Med Sci)*, 2004, 29(4):489-491.

[15] 粟向东, 胡蕴玉. 庆大霉素对兔成骨细胞增殖和超微结构影响[J]. *中华骨科杂志*, 1999, 19(3):177-179. SU Xiang-dong, HU Yun-yu. Effects of gentamycin on proliferation and ultrastructure of primary cultured rabbit osteoblasts [J]. *Chin J Orthop*, 1999, 19(3):177-179.