

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.004 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

沈奕, 李晓森, 傅晓东, 王伟力. 股骨近端 Stro-1⁺细胞与骨形态发生蛋白及其受体的相关性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8380-8384.

股骨近端Stro-1⁺细胞与骨形态发生蛋白及其受体的相关性*★

沈奕, 李晓森, 傅晓东, 王伟力

上海交通大学医学院附属仁济医院骨科, 上海市200127

沈奕★, 男, 1974年生, 上海市人, 汉族, 1997年上海第二医科大学毕业, 硕士, 主要从事关节外科髋关节置换术后假体松动的相关机制研究。
mrshenyi@126.com通讯作者: 王伟力, 主任医师, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院骨科, 上海市200127
drwangwl@126.com中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344(2012)45-08380-05收稿日期:2012-02-06
修回日期:2012-04-15
(20120206001/M·C)

文章亮点: Stro-1 是人类骨髓干细胞的一种表面抗原, Stro-1 阳性的骨髓间充质干细胞具有很强的成骨分化能力。基于这点, 本实验研究 Stro-1 细胞、骨形态发生蛋白 7、骨形态发生蛋白受体与假体周围成骨的相关性, 为个体化预测、干预和延长假体的生存期提供依据。

关键词: 骨重建; 骨髓间充质干细胞; 骨形态发生蛋白; 骨形态发生蛋白受体; 假体

缩略语: 骨形态发生蛋白: bone morphogenetic protein, BMP; 骨形态发生蛋白受体: bone morphogenetic protein receptor, BMPR

摘要

背景: 髋关节置换后假体的融合率与假体周围的骨重建密切相关, 这个过程中骨髓间充质干细胞的募集、向成骨细胞分化的途径受骨形态发生蛋白调控。

目的: 分析股骨近端 Stro-1⁺细胞与骨形态发生蛋白 7、骨形态发生蛋白受体的相关性。

方法: 32 例患者初次进行髋关节置换, 取术中股骨矩开槽时骨块, 体外细胞培养 14 d 后检测骨髓间充质干细胞数量, Stro-1⁺标记干细胞的总量, 骨形态发生蛋白 7、骨形态发生蛋白受体 1a、骨形态发生蛋白受体 2 的表达。

结果与结论: Stro-1⁺、骨形态发生蛋白 7、骨形态发生蛋白受体 1a、骨形态发生蛋白受体 2 的表达在不同年龄组有轻微差异, 但差异无显著性意义, 在不同性别组差异也无显著性意义; 股骨近端 Stro-1⁺细胞数量(即代表具有向成骨细胞分化功能的细胞)与骨形态发生蛋白 7 表达呈负相关关系, 与骨形态发生蛋白受体 1a 表达呈正相关关系, 其可以影响髋关节假体的骨融合与生存率。

Correlation between Stro-1⁺ cells and bone morphogenetic protein and its receptor in proximal femur

Shen Yi, Li Xiao-miao, Fu Xiao-dong, Wang Wei-li

Abstract

BACKGROUND: A successful osseointegration after total hip arthroplasty relies on the bone reconstruction around the prosthesis. Bone marrow mesenchymal stem cells are recruited and the commitment of bone marrow mesenchymal stem cells to an osteoblastic differentiation pathway is apparently under the control of bone morphogenetic proteins.

OBJECTIVE: To analyze the correlation between Stro-1⁺ bone marrow mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein 7 and bone morphogenetic protein receptor in proximal femur.

METHODS: Bone samples were obtained from the discarded metaphysis region of the proximal femur in 32 patients with primary total hip arthroplasty, and the number of bone marrow mesenchymal stem cells was measured after *in vitro* cultured for 14 days. Stro-1⁺ was used to mark the stem cells. The expression of bone morphogenetic protein 7, bone morphogenetic protein receptor 1a and bone morphogenetic protein receptor 2 was detected.

RESULTS AND CONCLUSION: There were differences of Stro-1⁺ cells, bone morphogenetic protein 7, bone morphogenetic protein receptor 1a and bone morphogenetic protein receptor 2 expression between different years, but the differences were not significant, and there was no significant difference between genders. There was a negative correlation between the numbers of Stro-1⁺ cells in proximal femur and expression of bone morphogenetic protein 7 that means the cell had the function to differentiate into osteoblasts. The correlation between the number of Stro-1⁺ cells and expression of bone morphogenetic protein receptor 1a was positive which can influence the fusion rate and the survival rate of the hip prosthesis.

Shen Y, Li XM, Fu XD, Wang WL. Correlation between Stro-1⁺ cells and bone morphogenetic protein and its receptor in proximal femur. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8380-8384.

0 引言

人工关节置换是治疗关节病变的一种重要手段, 极大地改善了严重关节功能障碍患者的生活质量。非骨水泥型髋关节置换日益普及, 除了手术本身, 患者假体周围骨细胞重建能力也很重要^[1]。成功的手术可减少早期并发症, 而良好的骨重建能力可减少后期假体松动率。

关节外科医生应对关节置换后患者进行合理的随访和个性化的治疗。理想的随访除了确认其关节置换是否成功(无早期并发症, 假体位置正确等), 还可以根据假体周围骨重建的能力, 对中后期假体可能发生松动的概率和时间进行预测。因此临床医生需要一些相应的实验室手段对患者的预后进行较为精确的判断, 以尽可能延长假体的生存期, 避免不必要的松动翻修手术, 为相应临床干预延长假体的生存期提供理论依据。

1 对象和方法

设计: 临床基础研究。

时间及地点: 于2009年3月至2011年5月在上海交通大学医学院完成。

对象: 选取32例初次接受髋关节置换的患者, 男16例, 女16例, 52-87岁, 平均年龄(67.8±11.3)岁; 其中<70岁15例, 平均年龄(56.4±4.3)岁, >70岁17例, 平均年龄(78.2±5.8)岁。

纳入标准: ①骨关节炎及股骨颈骨折患者。②年龄在50-90岁。③有标准的骨盆平片及股骨全长正侧位片。④对治疗方案及试验知情同意者。

排除标准: ①类风湿性关节炎及其他自身免疫性疾病患者。②在髋关节置换前接受过2周以上非类固醇消炎镇痛药物、类固醇激素、雌激素替代疗法、二磷酸盐化合物以及钙剂治疗的患者。③髋关节置换后出现并发症者, 包括感染、假体置入失败、创伤愈合问题以及血管、神经的损伤。

方法:

操作的标准化: 为了减少对试验结果的影响, 髋关节置换手术将由同一位医师及其带领的团

队完成, 采用同一手术入路(后外侧切口), 应用同一家公司的生物型固定假体。所用假体为美国施乐辉公司(Smith&Nephew)微孔加羟基磷灰石涂层股骨柄, 在不影响原微孔覆盖的情况下, 在股骨柄近端喷涂羟基磷灰石, 可以同时增加骨长入和骨附着, 使得股骨柄固定更加牢固, 铸造的钛合金粗糙面允许骨整合并提高稳定性。

骨髓间充质干细胞的体外培养: ①髋关节置换术中取出股骨近端开槽后废弃的骨块, 放入无菌的培养液中, 1 h内送实验室。②骨块加入5 mL HBSS后洗涤2次后离心(1 200 r/min 离心25 min), 取上清液-80 °C保存。提取细胞后在加入5 mL α -MEM培养基(含谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素以及体积分数20%胎牛血清)的T75瓶中培养。③每周更换3次培养液, 观察细胞生长情况, 显微镜下达到50%分布后分瓶(一般需4-10 d), 对生长情况不佳的标本予以剔除。④所有标本要求在体外培养同样天数, 把培养时间定为14 d, 见图1。

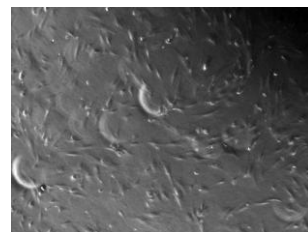


Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells after *in vitro* cultured for 14 d ($\times 100$)
图1 体外培养第14天的骨髓间充质干细胞($\times 100$)

流式细胞检测: 骨髓间充质干细胞悬液在4 °C时与单抗共同培育1 h, 然后用PBS冲洗未结合抗体。单克隆抗体结合异硫氰酸荧光素(FITC), 藻红蛋白(PE)或异藻蓝蛋白(APC)采用Becton Dickinson流式细胞仪检测Stro1⁺细胞(即代表具有向成骨细胞分化功能的细胞数)的总数量(绝对计数法), 骨形态发生蛋白受体1 α (bone morphogenetic protein receptor 1 α , BMPR-1 α)、骨形态发生蛋白受体2(bone morphogenetic protein receptor 2, BMPR-2)的密度(染色阳性的细胞百分数)。每个样本至少检测10⁴个细胞, 应用细胞检测软件分析。

Department of Orthopedics, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Shen Yi ★, Master, Department of Orthopedics, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China
mrshenyi@126.com

Corresponding author: Wang Wei-li, Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China
drwangwl@126.com

Supported by: International Non-governmental Cooperation Project of Shanghai Science and Technology Commission, No. 09410706100*

Received: 2012-02-06
Accepted: 2012-04-15

酶联免疫分析: 骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins 7, BMP-7) 的表达通过酶联免疫吸附测定试剂盒 (R&D System, Minneapolis, MN, USA) 检测。

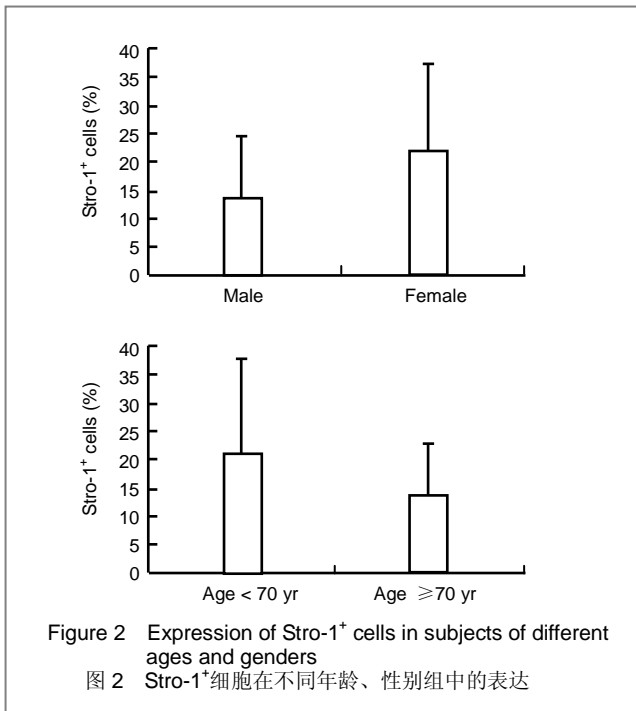
主要观察指标: Stro1⁺细胞的总数量、BMP-7、BMPR-1a、BMPR2的密度(染色阳性的细胞百分数)。

统计学分析: 使用SPSS 10.0统计学软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验方法进行各组数据间的比较。Stro1⁺标记干细胞的总数量、BMP-7、BMPR-1a、BMPR-2密度的关系应用线性回归分析。

2 结果

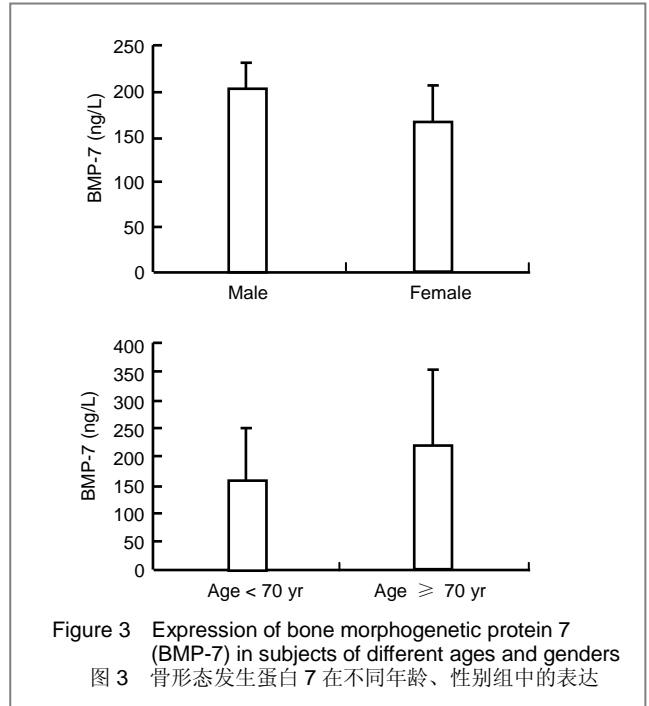
2.1 骨髓间充质干细胞中 Stro-1⁺细胞的表达 Stro-1⁺细胞的表达患者个体间差异明显, 用流式细胞仪检测平均表达率为 $(18.67 \pm 13.58)\%$ (3.02%–50.82%)。

2.2 Stro-1⁺细胞在不同年龄、性别组中的表达 70岁以下组的 Stro-1⁺表达率 $(20.15 \pm 16.93)\%$ 略高于70岁以上组 $(13.57 \pm 8.42)\%$, 但差异无显著性意义 ($P=0.18$); 男性组中的 Stro-1⁺表达率 $(13.48 \pm 11.21)\%$ 略低于女性组的 Stro-1⁺表达率 $(21.31 \pm 14.93)\%$, 但差异无显著性意义 ($P=0.15$), 见图2。

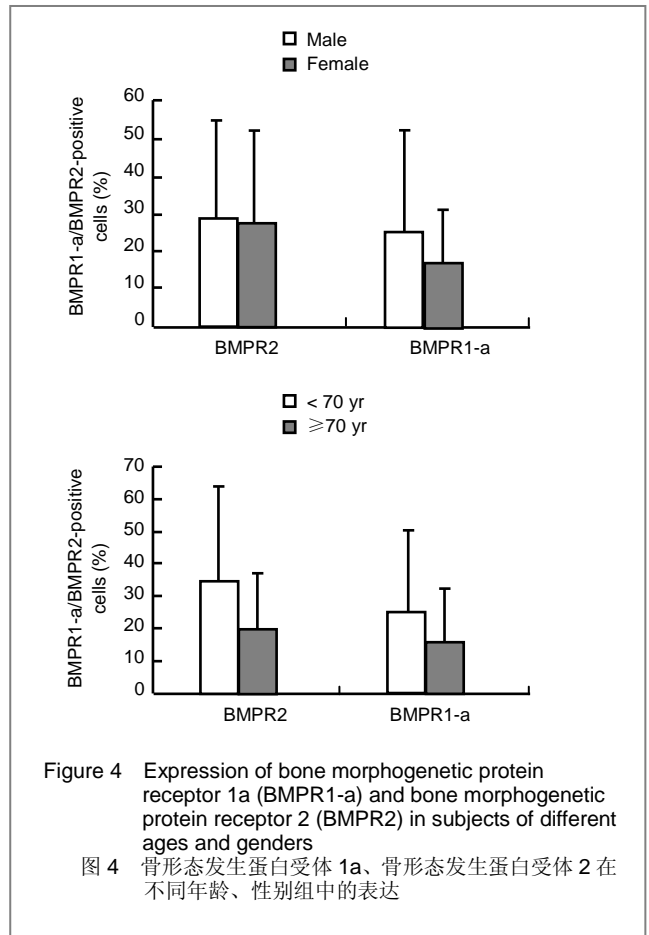


2.3 BMP-7在不同年龄、性别组中的表达 标本中 BMP-7 的平均质量浓度 (186.21 ± 118.03) ng/L (10–553.72 ng/L), 在不同年龄组间差异无显著性意义

($P=0.22$), 在不同性别组间差异无显著性意义 ($P=0.47$), 见图3。



2.4 BMPR-1a、BMPR2在不同年龄、性别组中的表达 见图4。



BMPR-1a、BMPR-2的表达率在组间较分散, BMPR-1a的平均表达率为(22.37±23.15)% (1.72%~93.61%), 70岁以下组为(24.32±23.65)%, 70岁以上组为(15.65±17.95)%, 差异无显著性意义($P=0.09$), 男性组为(23.58±28.03)%, 女性组为(16.88±14.02)%, 差异无显著性意义($P=0.93$); BMPR2平均表达率为(29.17±25.13)% (0.97~93.69%), 70岁以下组为(35.13±29.56)%, 70岁以上组为(22.03±17.86)%, 差异无显著性意义($P=0.18$), 男性组为(27.98±26.94)%, 女性组为(28.52±23.78)%, 差异无显著性意义($P=0.17$)。

2.5 Stro-1⁺、BMP-7、BMPR-1a、BMPR-2的相互关联 Stro-1⁺与BMPR-1a呈正相关联系($r=0.4987$, $P=0.01$), Stro-1⁺与BMP-7呈负相关联系($r=-0.4716$, $P=0.02$), 其他数据无明显统计学关联。

3 讨论

人工关节的长期生存率与假体表面设计和局部骨生成能力密切相关。一个理想的骨髓环境应有足量的具有分化潜能的骨母细胞。而年龄、性别、种族等因素会对骨生成能力产生影响。

骨髓间充质干细胞为非均一性的细胞群体, Stro-1是人类骨髓细胞的表面抗原, Stro-1⁺骨髓间充质干细胞则具有更强的造血支持功能, 而Stro-1⁻骨髓间充质干细胞具有很强的成骨分化能力^[2]。Stro-1⁺丰富的骨髓间充质干细胞亚群细胞有较强的间质分化能力, 如脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞。有诸多因素可能导致个体间Stro-1⁺细胞的差异, 如年龄、性别等因素^[3-4]。一些和年龄相关的退行性变如骨关节炎与骨髓间充质干细胞的Stro-1⁺表达有关^[5-6]。

BMP家族因具有独特的异位骨诱导活性而被发现并被命名为骨形态发生蛋白, 与胚胎组织的发育、功能维持及组织的修复均密切相关, 是诱导骨发生的主要活性因子, 至今已发现超过20种亚型^[7-8]。BMP-7是骨形态发生蛋白家族中的一员, 主要在骨、肾组织中表达, 与胚胎组织的发育、功能维持及组织的修复均密切相关, 特别在骨发育和骨折愈合过程中高表达^[1], BMP-7在体内表现出广泛而重要的生物学作用。在生物体发育的早期阶段, 用于形成组织与器官; 在成熟机体体内, BMP-7主要与组织功能的维持、再生和修复有关, 其作用已在动物实验及临床应用中证实。

BMP-7在骨髓间充质干细胞向骨和软骨细胞转化中起关键作用^[9-10], 临床上应用BMP-7可促进骨折愈合,

治疗骨不连接, 治疗骨缺损等^[9-11]。因此, BMP-7在假体置入后的骨融合过程中起重要作用。

BMP受体是膜蛋白受体, 分子由细胞外区、跨膜区和细胞内区组成, I型BMP受体在细胞内丝氨酸酶区域之前有1个GS匣的独特结构, 其被称为活化素受体样激素, 分为IA和IB两种亚型; II型受体属降解加速因子4蛋白。BMP的信号传递由I型和II型受体共同介导, 形成复合物后, 具有激酶活性的II型受体使I型受体在GS匣发生磷酸化, 然后向胞内传导转录活化信号^[12-14]。BMPR-1a对成骨细胞的细胞外基质转运特别重要^[15-16]。

本实验中为了避免采集标本量误差, 在收集股骨近端时用同样体积2 cm³的骨块, 因此Stro-1⁺和骨形态发生蛋白受体的差别可以反映标本的个体差异。32例标本Stro-1⁺和骨形态发生蛋白受体数值个体差异较大, 但在男女分组中差异不明显。虽然70岁以下组中Stro-1⁺细胞和骨形态发生蛋白受体量较70岁以上组高, 但无差异无显著性意义。

Stro-1⁺是骨髓间充质干细胞的生物学标记, 代表了骨髓间充质干细胞的成骨潜能^[17-18]。有报道认为Stro-1⁺与年龄相关或无关^[19-22], 在本实验中Stro-1⁺与年龄无关。老年患者骨关节退行性变多伴有骨量减少, 在一定程度上与骨髓内脂肪细胞的含量增加有关^[23]。

在本实验中, 患者标本的BMP-7含量分布离散, BMP-7与年龄或性别均不相关。而标本的BMPR-1a (1.72%~93.61%) 和BMPR2 (0.97%~93.69%) 个体差异明显, 但BMPR-1a和BMPR2在年龄和性别方面差异无显著性意义, 在今后的继续研究中可以检测分析个体间的骨髓微环境的差异(如微量元素的含量)是否造成了BMP-7或骨形态发生蛋白受体的差异。

本实验中另一个发现就是Stro-1⁺细胞与BMPR-1a和BMP-7有很强的关联性。Stro-1⁺细胞与BMP-7含量呈负相关, 这说明BMP-7含量增加致成骨作用增加, 因此Stro-1⁺细胞减少。也有其他文章报道BMP-7含量增加导致Stro-1⁺细胞含量减少及BMP-7通过介导成骨分化作用导致Stro-1⁺细胞减少^[24]。

综上所述, 本实验分析人股骨近端Stro-1⁺细胞与BMP-7、骨形态发生蛋白受体的相关性, 研究结果对于早期预测髋关节置换后假体骨融合与长期存活率提供了参考, 为相应的个体化介入治疗提供理论依据。

致谢: 感谢上海市科学技术委员会给予的经费支持, 本课题受上海市科委非政府间国际合作项目资助(09410706100)。

4 参考文献

- [1] Yamada H, Yoshihara Y, Henmi O, et al. Cementless total hip replacement: past, present, and future. *J Orthop Sci.*2009;14: 228-241.
- [2] Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991;78(1):55-62.
- [3] Byers RJ, Brown J, Brandwood C, et al. Osteoblastic differentiation and mRNA analysis of STRO-1-positive human bone marrow stromal cells using primary in vitro culture and poly (A) PCR. *J Pathol.* 1999;187(3):374-381.
- [4] Brusnahan SK, McGuire TR, Jackson JD, et al. Human blood and marrow side population stem cell and Stro-1 positive bone marrow stromal cell numbers decline with age, with an increase in quality of surviving stem cells: correlation with cytokines. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(11-12):718-722.
- [5] Giurea A, Rüger BM, Hollemann D, et al. STRO-1+ mesenchymal precursor cells located in synovial surface projections of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(9):938-943.
- [6] Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, et al. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R85.
- [7] Imamura T, Maeda S, Hayashi M. Regulation of BMP signaling. *Clin Calcium.* 2006;16(5):738-744.
- [8] Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 2007;31(6):721-727.
- [9] Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem.* 2001;82(2):187-199.
- [10] Ivkovic A, Marjanovic I, Hudetz D, et al. Regenerative medicine and tissue engineering in orthopaedic surgery. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:923-944.
- [11] Ma T, Nelson ER, Mawatari T, et al. Effects of local infusion of OP-1 on particle-induced and NSAID-induced inhibition of bone ingrowth in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(3): 740-746.
- [12] Penton A, Chen Y, Staehling-Hampton K, et al. Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell.* 1994;78(2):239-250.
- [13] Ruberte E, Marty T, Nellen D, et al. An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell.* 1995;80(6):889-897.
- [14] Flechtenmacher J, Huch K, Thonar EJ, et al. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1996;39(11):1896-1904.
- [15] Mishina Y, Starbuck MW, Gentile MA, et al. Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27560-27566.
- [16] Fayaz HC, Giannoudis PV, Vrahas MS, et al. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. *Int Orthop.* 2011;35(11): 1587-1597.
- [17] Zannettino AC, Paton S, Kortessidis A, et al. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1^{bright}/CD34⁻/CD45⁻/glycophorin-A-bone marrow cells. *Haematologica.* 2007;92(12):1707-1708.
- [18] White AP, Vaccaro AR, Hall JA, et al. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop.* 2007;31(6):735-741.
- [19] Quarto R, Thomas D, Liang CT. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int.* 1995;56(2):123-129.
- [20] Murphy JM, Dixon K, Beck S, et al. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(3):704-713.
- [21] Leskelä HV, Risteli J, Niskanen S, et al. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(4): 1008-1013.
- [22] De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.* 2001;44(1):85-95.
- [23] Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology.* 2002;48(2):62-71.
- [24] Lallier TE, Spencer A. Use of microarrays to find novel regulators of periodontal ligament fibroblast differentiation. *Cell Tissue Res.* 2007;327(1):93-109.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 上海市科委非政府间国际科技合作项目 (09410706100)。

作者贡献: 沈奕负责实验设计及实验实施, 王伟力教授负责实验评估, 李晓焱、傅晓东负责资料收集。沈奕成文, 王伟力审校并对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 参与试验的患病个体及其家属对实验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 干预及治疗方案获仁济医院伦理委员会批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。