

胎盘间充质干细胞不同给药途径治疗骨质疏松性骨折树鼩的疗效和机制

黄贵江¹, 季雨伟¹, 赵鑫¹, 杨艺², 赵玉兰², 王佩锦², 唐薇¹, 角建林²<https://doi.org/10.12307/2023.259>

投稿日期: 2022-01-25

采用日期: 2022-04-18

修回日期: 2022-05-18

在线日期: 2022-06-02

中图分类号:

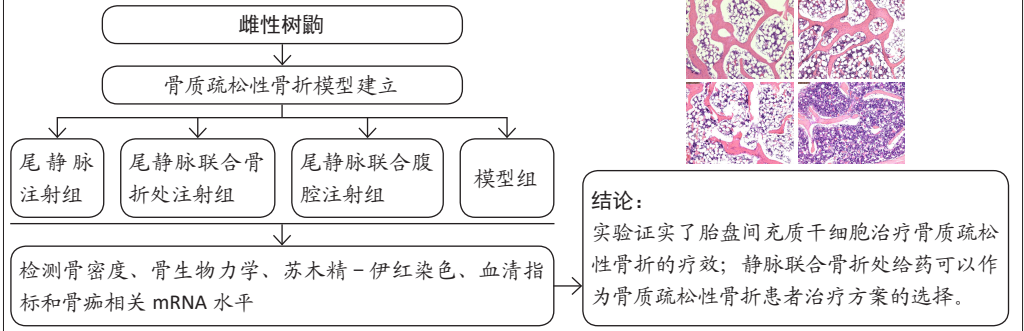
R459.9; R394.2; R683

文章编号:

2095-4344(2023)06-00909-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 人源胎盘间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折树鼩不同给药方式的差异



文题释义:

人源胎盘间充质干细胞: 具有来源丰富、取材方便、能释放组织因子并具有向三胚层分化的能力, 并且比从其他成人组织或器官中分离的干细胞显示出更强的增殖、干细胞特性以及分化、免疫调节的特征, 是目前干细胞的最好来源。但目前人源胎盘间充质干细胞极少用于骨组织工程的研究, 采用人源胎盘间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折很可能为其治疗方法打开新的视野。

树鼩: 作为灵长类实验动物有着与人体相似的作息, 使用树鼩作为骨质疏松性骨折模型可以更好地模拟人体结构。

摘要

背景: 目前人源胎盘间充质干细胞极少用于骨组织工程的研究, 采用人源胎盘间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折很可能为其治疗方法打开新的视野。

目的: 探讨人源胎盘间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折树鼩的机制和不同给药方式对其疗效的影响。

方法: 将雌性树鼩切除双侧卵巢和子宫模拟绝经后骨质疏松症, 自然喂养180 d成模。对骨质疏松树鼩行右股骨骨折术, 建立骨质疏松性骨折模型。将24只骨质疏松性骨折树鼩随机分为4组, 调整人源胎盘间充质干细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 尾静脉注射组尾静脉注射1 mL人源胎盘间充质干细胞; 尾静脉联合骨折处注射组尾静脉和骨折处各注射0.5 mL人源胎盘间充质干细胞; 尾静脉联合腹腔注射组尾静脉和腹腔各注射0.5 mL人源胎盘间充质干细胞; 模型组尾静脉注射1 mL生理盐水。骨折术后第3天起, 每周注射1次, 连续注射3次。末次治疗8周后, 检测各组树鼩骨密度, 各组树鼩取股骨行三点骨生物力学和苏木精-伊红染色实验。ELISA法检测各组树鼩血清钙素、雌激素、骨碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶的表达水平, 实时荧光定量PCR检测骨痂处骨形态发生蛋白2、骨保护素、核因子 κB 受体激活物配体mRNA的表达水平。

结果与结论: ①末次治疗8周后, 与模型组相比, 其他3组的骨密度增大, 最大载荷、结构刚度和能量吸收均增加, 其中尾静脉注射组增加最为明显; ②其他3组的血清雌激素、骨碱性磷酸酶和骨钙素水平均较模型组显著增加, 抗酒石酸酸性磷酸酶活性显著降低, 尾静脉注射组改善最为明显; ③苏木精-伊红染色显示, 尾静脉注射组、尾静脉联合骨折处注射组病理变化有明显改善; ④此外, 与模型组相比, 其他3组骨保护素、骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平有不同程度提高, 其中尾静脉联合骨折处注射组提高最显著; ⑤与模型组相比, 其他3组核因子 κB 受体激活物配体 mRNA表达水平有不同程度降低, 其中尾静脉联合骨折处注射组降低最显著; ⑥提示人源胎盘间充质干细胞移植能有效改善骨质疏松性骨折树鼩症状, 增加骨质疏松性骨折树鼩骨碱性磷酸酶、骨钙素、骨保护素等骨形成指标, 降低抗酒石酸酸性磷酸酶和核因子 κB 受体激活物配体等骨吸收指标, 改善树鼩骨密度和骨生物力学指标; 尾静脉注射组全身治疗效果最好, 针对骨折处治疗效果尾静脉联合骨折处注射组显示出更好的优势。

关键词: 胎盘间充质干细胞; 树鼩; 骨质疏松性骨折; 疗效; 给药途径; 动物模型

缩略语: 人源胎盘间充质干细胞: human placenta-derived mesenchymal stem cells, hPMSCs; 核因子 κB 受体激活物配体: receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL

Effect and mechanism of different administration routes of placenta-derived mesenchymal stem cells in the treatment of tree shrews with osteoporotic fracture

Huang Guijiang¹, Ji Yuwei¹, Zhao Xin¹, Yang Yi², Zhao Yulan², Wang Peijin², Tang Wei¹, Jiao Jianlin²

¹Department of Science and Education, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China; ²Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

¹昆明医科大学第一附属医院科教科, 云南省昆明市 650000; ²昆明医科大学, 云南省昆明市 650000

第一作者: 黄贵江, 男, 1997年生, 云南省彝良县人, 汉族, 硕士, 主要从事骨质疏松方面的研究。

并列第一作者: 季雨伟, 硕士, 初级药师, 主要从事间充质干细胞与骨质疏松方面的研究。

通讯作者: 唐薇, 硕士, 副主任药师, 昆明医科大学第一附属医院科教科, 云南省昆明市 650000

并列通讯作者: 角建林, 高级实验师, 昆明医科大学, 云南省昆明市 650000

<https://orcid.org/0000-0003-3489-6602> (黄贵江)

基金资助: 云南省科技厅——昆明医科大学应用基础研究联合专项面上项目 [2019FE001-(035)], 项目负责人: 唐薇

引用本文: 黄贵江, 季雨伟, 赵鑫, 杨艺, 赵玉兰, 王佩锦, 唐薇, 角建林. 胎盘间充质干细胞不同给药途径治疗骨质疏松性骨折树鼩的疗效和机制 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(6):909-914.



Huang Guijiang, Master, Department of Science and Education, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China
Ji Yuwei, Master, Junior pharmacist, Department of Science and Education, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Huang Guijiang and Ji Yuwei contributed equally to this article.

Corresponding author: Tang Wei, Master, Associate chief pharmacist, Department of Science and Education, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Co-corresponding author: Jiao Jianlin, Senior experimentalist, Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: At present, human placental mesenchymal stem cells are rarely used in bone tissue engineering research, and the use of human placental mesenchymal stem cells in the treatment of osteoporotic fractures is likely to open new horizons for their therapeutic methods.

OBJECTIVE: To investigate the mechanism of human placenta-derived mesenchymal stem cells in the treatment of tree shrews with osteoporotic fracture, and the effect of different drug delivery methods on the efficacy of tree shrews with osteoporotic fracture.

METHODS: Bilateral ovaries and uterus were removed from female tree shrews to simulate postmenopausal osteoporosis, and they were naturally fed for 180 days. The osteoporotic fracture tree shrew model was established by performing a right femoral fracture. The 24 tree shrews with osteoporotic fracture were randomly divided into four groups. We adjusted the concentration of the human placenta-derived mesenchymal stem cells to $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$. In the tail vein injection group, human placenta-derived mesenchymal stem cells were injected with 1 mL in the tail vein. In the tail vein combined with fracture injection group, human placenta-derived mesenchymal stem cells were injected with 0.5 mL in the tail vein and 0.5 mL at the fracture site. In the tail vein combined with intraperitoneal injection group, human placenta-derived mesenchymal stem cells were injected with 0.5 mL in the enterocoelia and 0.5 mL in the tail vein. In the model group, 1 mL physiological saline was injected through tail vein. From the 3rd day after the fracture, tree shrews were injected once a week and three times in a row. Eight weeks after the last treatment, bone mineral density was tested in tree shrews of each group. Three-point bone biomechanics and hematoxylin-eosin staining experiments were performed on the femurs of tree shrews in each group. The expression levels of osteocalcin, estrogen, bone alkaline phosphatase and tartrate resistant acid phosphatase were measured by ELISA in all groups. The mRNA expression levels of bone morphogenetic protein-2, osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand were measured by quantitative real time polymerase chain reaction.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Eight weeks after the last treatment, compared with the model group, the other three groups showed increased bone mineral density, maximum load, structural stiffness and energy absorption, with tail vein injection group showed the most significant increase. (2) Serum estrogen, bone alkaline phosphatase and osteocalcin expression levels in tail vein injection group, tail vein combined with fracture injection group, and tail vein combined with intraperitoneal injection group increased significantly compared with the model group. Serum tartrate resistant acid phosphatase levels decreased significantly in the tail vein injection group, tail vein combined with fracture injection group, and tail vein combined with intraperitoneal injection group compared with the model group. These serum detection results showed the most obvious improvement in tail vein injection group. (3) Hematoxylin-eosin staining showed significant improvement of pathological changes in tail vein injection group and tail vein combined with fracture injection group. (4) The expression level of osteoprotegerin and bone morphogenetic protein-2 mRNA in tail vein injection group, tail vein combined with fracture injection group, and tail vein combined with intraperitoneal injection group increased to varying degrees compared with model group; the tail vein combined with fracture injection group had the highest level. (5) The expression level of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand mRNA in tail vein injection group, tail vein combined with fracture injection group, and tail vein combined with intraperitoneal injection group decreased to different degrees compared with model group, with tail vein combined with fracture injection group having the lowest level. (6) It is concluded that human placenta-derived mesenchymal stem cell transplantation can effectively improve the symptom of tree shrews with osteoporotic fracture, increase bone formation indexes such as bone alkaline phosphatase, osteocalcin and osteoprotegerin, decrease bone resorption indexes such as tartrate resistant acid phosphatase and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, and improve bone mineral density and bone biomechanics of tree shrews. Tail vein injection group had the best results for systemic treatment and tail vein combined with fracture injection group showed better results for treatment at the fracture site.

Key words: placental mesenchymal stem cell; tree shrew; osteoporotic fracture; efficacy; administration route; animal model

Funding: Special General Project of Applied Basic Research Joint of Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Kunming Medical University, No. 2019FE001(-035) (to TW)

How to cite this article: HUANG GJ, JI YW, ZHAO X, YANG Y, ZHAO YL, WANG PI, TANG W, JIAO JL. Effect and mechanism of different administration routes of placenta-derived mesenchymal stem cells in the treatment of tree shrews with osteoporotic fracture. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2023;27(6): 909-914.

0 引言 Introduction

骨质疏松症好发于老年人，以骨量降低、骨微结构破坏导致脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病^[1-4]。骨质疏松症患者由于骨结构被破坏，比正常人更容易发生骨折，治疗骨质疏松性骨折是一个巨大的难题^[5-6]。骨形成对骨质疏松性骨折的治疗十分重要，骨形成是在间充质干细胞来源的成骨细胞骨建模、重塑和骨折修复过程中进行的^[7-9]。早在1995年有研究使用小鼠骨髓间充质干细胞尾静脉注射入经¹³⁷Cs辐射过的小鼠中，注射进入小鼠体内的间充质干细胞参与骨和软骨细胞分化^[10]。随后 KADIYALA 等^[11]将携带骨髓间充质干细胞的羟基磷灰石/磷酸三钙植入物移植到犬股骨区前部皮下和肌肉内，发现在移植植物中有骨形成，揭示干细胞在体内移植可以向成骨方向分化。随着对间充质干细胞研究的不断深入，目前已经有多种间充质干细胞制剂如骨髓间充质干细胞、脐带间充质干细胞、脂肪间充质干细胞应用于临床治疗骨疾病并取得了巨大突破^[12-14]。人源胎盘间充质干细胞 (human placenta-derived mesenchymal stem cells, hPMSCs) 具有来源丰富、取材方便、能释放组织因子并具有向三胚层

分化的能力^[15-17]，并且比从其他成人组织或器官中分离的干细胞显示出更强的增殖、干细胞特性以及分化、免疫调节的特征^[18-19]，是目前干细胞的最佳来源。但目前 hPMSCs 极少用于骨组织工程的研究，采用 hPMSCs 治疗骨质疏松性骨折很可能为其治疗方法打开新的视野。

目前干细胞治疗常用的给药途径为静脉注射给药，但也有相关研究证实不同给药途径对于骨质疏松动物模型疗效的影响不同^[20]，因此探索一个安全有效的给药系统对于干细胞治疗十分重要。

此次实验使用灵长类动物树鼯进行骨质疏松性骨折造模，通过不同途径移植 hPMSCs，进行骨密度、骨生物力学、血清和骨组织相关 mRNA 的测定，旨在探讨 hPMSCs 治疗骨质疏松性骨折的作用机制并初步探索不同给药方式对其疗效的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验，对各组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析，方差齐时采用 LSD 法检验。

1.2 时间及地点 实验于2020年1月至2021年1月在昆明医科大学实验动物学部及昆明医科大学科技成果孵化中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择8月龄雌性滇西亚种树鼩共24只, 体重(110±15)g, 由昆明医科大学实验动物学部提供, 生产许可证号: SCXK(滇)K2020-0004。实验方案经昆明医科大学实验动物学部动物实验伦理委员会批准, 批准号: kmmu2020115。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 实验用干细胞 hPMSCs 由云南舜喜再生医学工程有限公司提供, 批号: 2018093041G/ 代次: P5, 干细胞由提供方按分离培养、传代、冻存和复苏等标准操作规程完成。

1.3.3 主要仪器设备 Multiskan-go 1510 酶标仪 (Thermo); Prodigy Spec 型 DXA 骨密度测定仪 (GE); 荧光定量 PCR 仪 (ABI); 正置显微镜 DM4000B(德国 Leica); TK-252D/RDT(TK-252D) 骨生物力学仪 (MUROMACHI KIKAI)。

1.3.4 主要耗材及试剂 戊巴比妥钠 (上海上药新亚); ELISA 检测试剂盒 (南京建成); DEPC 水 (索莱宝); HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(Vazyme biotech); 苏木精-伊红染色液 (索莱宝)。

1.4 方法

1.4.1 动物模型制备与分组 实验雌性树鼩于树鼩房适应性喂养7d后, 禁食12h, 采用戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射麻醉, 切除子宫及双侧卵巢建立骨质疏松模型。术后在伤口处给予适量青霉素预防感染, 连续3d。建模180d后根据作者所在课题组既往研究结果证实树鼩骨质疏松模型成功建立^[21]。后续使用戊巴比妥麻醉树鼩, 在清洁环境下暴露右股骨干行骨折术建立骨质疏松性骨折树鼩模型, 钢锯锯断股骨中段, 使用1.0mm克氏针固定后缝合皮肤。

将24只骨质疏松性骨折树鼩按随机数字法平分为4组, 每组6只。hPMSCs消化后经生理盐水重悬, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 尾静脉注射组尾静脉注射1mL; 尾静脉联合骨折处注射组尾静脉和骨折处各注射0.5mL; 尾静脉联合腹腔注射组尾静脉和腹腔各注射0.5mL。模型组尾静脉注射1mL生理盐水。在骨质疏松性骨折造模后第3天开始进行干预, 前3周每周注射1次, 共注射3次。

末次治疗8周后测定树鼩骨密度, 随后腹腔注射戊巴比妥钠40mg/kg麻醉处死树鼩, 处死前禁食不禁水12h。心脏采血, 4℃过夜, 3000r/min离心15min收集血清; 取左股骨生理盐水浸泡后用纱布包裹, 放4℃保存。截取右股骨骨痂及其边缘1mm左右的骨组织, 使用生理盐水冲洗标本, 放入冻存管中并放置-80℃冰箱保存; 将剩余的右股骨远端骨组织用多聚甲醛固定24h, 随后放置于10%EDTA中脱钙1个月, 待脱钙完成后将组织包埋、切片和染色, 行组织学观察。

胎盘间充质干细胞 (hPMSCs) 的培养及鉴定

细胞研究目的:	探索 hPMSCs 对骨质疏松性骨折树鼩模型的疗效和影响
细胞来源:	人胎盘绒毛膜层
添加材料:	低糖培养基、体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素溶液; 注射用 hPMSCs 内的溶媒为生理盐水
原代培养时间:	原代细胞第 3 天换液, 之后 2 d 换液 1 次, 大约 15 d 培养至 70% - 80% 细胞融合度开始传代
细胞传代:	培养至 70% - 80% 细胞融合度开始传代, 按 1 : 2 比例进行传代, 原代约 14 d 传 1 代, 第 1 代约 7 d 传代, 传至第 5 代使用
细胞鉴定:	通过镜下观察细胞形态及成骨、成软骨和成脂诱导分化鉴定判断为 hPMSCs
伦理学批准:	实验获得昆明医科大学第一附属医院伦理委员会批准

1.4.2 骨生物力学测试 保护好股骨组织完整性, 剔除周围附着的软组织, 取4组树鼩左侧股骨行三点力学实验。将股骨水平放置于2个支撑点上, 跨度为20mm, 以10mm/min加载速率下压探头至股骨中段, 直至股骨发生断裂, 得到结构刚度、最大载荷、能量吸收等生物力学指标。

1.4.3 苏木精-伊红染色 将右侧股骨远端组织经以多聚甲醛固定、脱钙处理后制成苏木精-伊红染色切片, 显微镜下进行组织形态学观察。

1.4.4 血清指标检测 应用ELISA法检测各组树鼩血清中骨钙素、雌激素、骨碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶表达水平。

1.4.5 实时荧光定量PCR检测 实时荧光定量PCR检测骨痂处骨形态发生蛋白2、骨保护素、核因子κB受体激活物配体 (receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL) mRNA的表达水平。

将骨痂组织从-80℃冰箱中转移到无菌无酶、液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨, 研磨期间不断加入液氮, 直至骨痂研磨成粉末状 (无明显颗粒)。用Trizol提取总RNA, 定量后反转录为Random cDNA, 加入引物以及荧光染料进行扩增。反应条件如下, 93℃预变性30s; 95℃10s、60℃30s, 循环次数40次, 熔解曲线分析条件为95℃15s, 60℃60s, 95℃15s。结果采用实时荧光定量PCR相对扩增分析法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计分析, 每组实验最少重复3次。引物序列见表1。

表1 | 内参基因和目的基因引物序列
Table 1 | Primer sequences of reference genes and target genes

基因		引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
骨形态发生蛋白 2	Forward	ATC ACC TCA GCG GAA CTT CAG G	22
	Reverse	TGA GCC ACT TCC ACC ACG AAT C	22
骨保护素	Forward	GTC CTC CTG GCA CCT ACC TGA A	22
	Reverse	CCT TCC TGG CAT TCG CAC ACT C	22
RANKL	Forward	GCA GCA TCG CCT TGT TCC TCT A	22
	Reverse	TCC AAC CAT GAA CCT TCC ACC A	22
GAPDH	Forward	GGT GAT GCT GGT GCC GAG TAT G	22
	Reverse	CCT CCA CGA TGC CGA AGT TGT C	22

表注: RANKL 为核因子 κB 受体激活物配体

1.5 主要观察指标 ① hPMSCs 不同给药途径对各组树鼩骨

密度和骨生物力学指标的影响；②各组树鼩股骨苏木精-伊红染色组织形态学观察；③各组树鼩血清雌激素、骨碱性磷酸酶、骨钙素和抗酒石酸酸性磷酸酶表达水平；④各组树鼩骨痂骨形态发生蛋白2、骨保护素、RANKL mRNA 的表达。

1.6 统计学分析 实验数据采用 Graphpad Prism 8 统计软件进行分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Bartlett 法检测各组方差齐性，满足方差齐后组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法经过昆明医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用树鼩 24 只，分为 4 组，实验过程无脱失，全部进入结果分析。

2.2 hPMSCs 对 各 组 树 鼩 骨 密 度 的 影 响 治 疗 后 对 4 组 骨 质 疏松性骨折树鼩行骨密度测定，与模型组相比，尾静脉注射组和尾静脉联合骨折处注射组的骨密度显著增大 ($P < 0.05-0.01$)，尾静脉注射组全身骨密度改善更为明显，结果见表 2。

表 2 | 各组骨密度和骨生物力学指标变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	能量吸收 (N·mm)	结构刚度 (N/mm)	最大载荷 (N)	骨密度 (g/cm ³)
尾静脉注射组	23.43±2.77 ^b	292.27±32.62 ^b	80.17±4.84 ^b	0.108±0.009 ^b
尾静脉联合骨折处注射组	21.78±2.01 ^a	245.34±44.48 ^a	70.20±3.60	0.097±0.008 ^a
尾静脉联合腹腔注射组	21.33±1.11	212.45±44.80	71.50±5.56	0.095±0.005
模型组	18.22±0.87	146.93±12.88	65.60±3.56	0.085±0.003

表注：与模型组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$

2.3 hPMSCs 对 各 组 树 鼩 股 骨 骨 生 物 力 学 的 影 响 结 果 显 示，尾静脉注射组在能量吸收、结构刚度和最大载荷的提升中均显著优于模型组 ($P < 0.01$)，尾静脉联合骨折处注射组的能量吸收和结构刚度较模型组提升明显 ($P < 0.05$)，见表 2。

2.4 hPMSCs 对 各 组 树 鼩 股 骨 远 端 病 理 形 态 的 影 响 模 型 组 树 鼩 股 骨 远 端 的 骨 小 梁 变 细、数量减少、连续性较差、游离断端增加、骨小梁间距增宽；尾静脉联合腹腔注射组树鼩的病理变化较模型组比有所改善；尾静脉注射组和尾静脉联合骨折处注射组树鼩股骨远端的骨小梁较粗、排列整齐、连续性良好、游离断端减少、骨小梁间距变窄，见图 1。

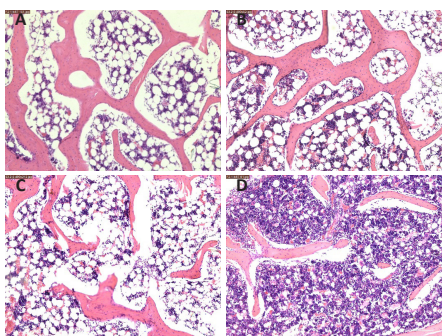
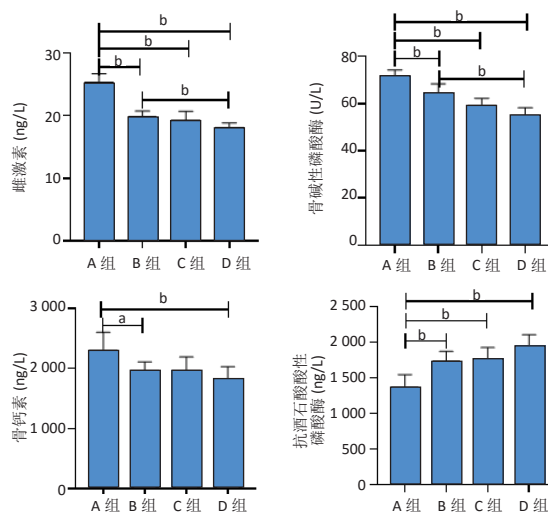


图 1 | 各组树鼩骨组织苏木精-伊红染色结果 (×100)

Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining results of tree shrew bone tissue in each group (×100)

图注：图 A-D 分别为尾静脉注射组、尾静脉联合骨折处注射组、尾静脉联合腹腔注射组和模型组。与模型组相比，3 组树鼩股骨骨小梁结构均有改善，其中尾静脉注射组和尾静脉联合骨折处注射组改善效果最好

2.5 hPMSCs 对 各 组 树 鼩 血 液 指 标 的 影 响 与 模 型 组 比 较，尾静脉注射组的血清雌激素、碱性磷酸酶和骨钙素水平显著升高 ($P < 0.01$)；尾静脉联合骨折处注射组对比模型组血清雌激素、骨碱性磷酸酶水平升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，其余 3 组抗酒石酸酸性磷酸酶活性明显降低 ($P < 0.01$)，见图 2。



图注：A-D 组分别为尾静脉注射组、尾静脉联合骨折处注射组、尾静脉联合腹腔注射组和模型组。^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$

图 2 | 各组树鼩血清雌激素、骨碱性磷酸酶、骨钙素和抗酒石酸酸性磷酸酶检测结果比较

Figure 2 | Comparison of serum estrogen, bone alkaline phosphatase, osteocalcin and tartrate resistant acid phosphatase detection results among four groups of tree shrews

2.6 hPMSCs 对 各 组 树 鼩 骨 折 部 位 愈 合 的 影 响 对 骨 痂 特 定 mRNA 序列进行定量分析结果显示，与模型组相比，其他 3 组的骨形态发生蛋白 2、骨保护素 mRNA 表达水平均有不同程度改善 ($P < 0.05$)，其中尾静脉联合骨折处注射组改善最佳；对于 RANKL mRNA 表达水平，其他 3 组均较模型组有不同程度降低，其中尾静脉联合骨折处注射组降低最多，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，见表 3。

表 3 | 各组骨形态发生蛋白 2、骨保护素、RANKL mRNA 水平对比

($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 | Comparison of bone morphogenetic protein-2, osteoprotegerin and RANKL mRNA levels in each group

组别	骨形态发生蛋白 2 mRNA	骨保护素 mRNA	RANKL mRNA
尾静脉注射组	1.47±0.09 ^a	1.88±0.06 ^a	0.58±0.04 ^a
尾静脉联合骨折处注射组	1.57±0.12 ^a	1.99±0.06 ^a	0.51±0.02 ^a
尾静脉联合腹腔注射组	1.28±0.09 ^a	1.49±0.10 ^a	0.68±0.06 ^a
模型组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00

表注：与模型组相比，^a $P < 0.01$

3 讨论 Discussion

骨质疏松性骨折是老年人最常见的疾病之一，严重危害老年人的生活质量和生命安全。树鼩作为灵长类实验动物有着与人体相似的作息，使用树鼩作为骨质疏松性骨折模型可以更好地模拟人体结构^[22]。目前已经有大量研究表明各个组织来源的间充质干细胞用于治疗骨质疏松发挥了较好的疗效^[23-25]，但是使用 PMSCs 治疗骨质疏松的报道极少且作用机

制尚不完全清楚。此次实验使用 hPMSCs 治疗骨质疏松性骨折树鼩模型, 选取了 3 种不同方式给药组和模型组进行实验观察, 以期探索 hPMSCs 治疗骨质疏松性骨折树鼩模型的疗效以及不同给药方式对疗效的影响。

骨密度测定结果发现 hPMSCs 治疗骨质疏松性骨折树鼩模型疗效显著, 但不同给药方式对骨质疏松疗效影响不同, 全身治疗效果最佳的是尾静脉注射组; 同时骨生物力学研究表明全身治疗效果最佳的是尾静脉注射组。此次实验结果与其他间充质干细胞治疗骨质疏松的实验结论一致^[24], 提供了 hPMSCs 治疗骨质疏松性骨折的表型基础。

骨在整个生命过程中都在进行新陈代谢, 成骨细胞不断形成新骨, 破骨细胞不断吸收旧骨。血清骨形成和吸收相关指标的表达水平可以间接反映体内骨代谢情况^[26], 绝经后骨质疏松主要是由雌激素水平缺乏导致的骨高转换状态^[27]。碱性磷酸酶是反映成骨细胞活性的主要指标^[28-30]。骨钙素是由成骨细胞合成和分泌的一种肽类物质, 能较好地反映骨转换、骨更新及成骨细胞的功能^[31]。抗酒石酸酸性磷酸酶在肺泡巨嗜细胞和破骨细胞中含量最丰富, 其水平的升高可标志着体内骨破坏增加^[32-33]。此次实验表明, 治疗组血清雌激素、碱性磷酸酶和骨钙素的水平均较模型组升高, 但尾静脉注射组升高最为明显。雌激素水平的升高可一定程度上抑制破骨细胞的活跃程度, 血清碱性磷酸酶和骨钙素水平的增加标志着在给药后成骨细胞的活性增加。治疗组血清抗酒石酸酸性磷酸酶活性显著降低, 标志着给予 hPMSCs 后破骨细胞的活性降低。在血清学指标中尾静脉注射组改善最为明显, 这表明在发挥全身治疗作用过程中尾静脉注射组更为明显。

成骨和破骨细胞构成了骨骼的动态平衡, 其中骨形态发生蛋白 2 在间充质干细胞成骨分化中发挥着主要的作用^[34-37]。骨保护素主要由成骨细胞分泌 RANKL 诱饵受体, 阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合从而抑制破骨细胞的形成^[38]。骨骼骨痂处行 PCR 检测指标显示, 3 组的成骨和破骨标志物与模型组比较差异有显著性意义; 成骨相关 mRNA 骨保护素、骨形态发生蛋白 2 表达治疗组显著高于模型组, 其中尾静脉联合骨折处注射组改善最为明显。破骨相关 mRNA RANKL 的表达水平治疗组显著低于模型组, 表明破骨细胞的活性被显著抑制, 其中尾静脉联合骨折处注射组改善最为明显。

此次实验结果表明, PMSCs 可以作为有效治疗骨质疏松性骨折的生物制剂。干细胞经尾静脉注射进入全身的量增加, 而骨质疏松又是全身性症状, 所以尾静脉注射组对于全身的症状改善最为明显。其次尾静脉联合腹腔注射组疗效并不佳, 其可能的原因是虽然尾静脉注射部分可以遍布全身, 但是进入腹腔的细胞可能由于腹腔微环境和大网膜动脉的吞噬作用而未能起到作用^[39-41]。骨质疏松性骨折除了全身性的骨量丢失以外还伴随有局部骨折, 实验结果表明在静脉联合骨折处给药可以明显增加骨折处骨保护素、骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达, 降低 RANKL mRNA 的表达, 且效果比单独尾静脉注射组、尾静脉联合腹腔注射组更为优异, 其原因可

能为尾静脉联合骨折处给药不仅改善了树鼩的全身骨丢失, 而且对于更需要积极治疗的骨折处的疗效更为优越。这为探索骨质疏松性骨折患者的治疗方式——同一种细胞不同给药方式联合使用开创了先例, 尾静脉联合伤口处注射也在一定程度上提高了干细胞治疗的靶向。但是 hPMSCs 治疗骨质疏松症通过哪些通路调控成骨和破骨相关蛋白表达的机制不明, 有待课题组进一步设计实验深入研究。

此次研究结果有力地佐证了 PMSCs 可作为有效治疗骨质疏松性骨折的生物制剂; 并且为骨质疏松性骨折患者提供了一种可行的给药方式: 静脉联合骨折处给药在充分发挥全身治疗作用的同时对于局部骨折处的改善也更加明显。

致谢: 谨在该研究完成之际, 感谢导师唐薇对我和师兄研究上的指导与帮助, 也在此感谢昆明医科大学技术转移中心角建林老师提供技术上的指导, 使得研究能够顺利完成。

作者贡献: 黄贵江参与实验动物的饲养、取材和实验相关指标的检测和文章撰写, 季雨伟参与实验动物的饲养、取材和实验相关指标的检测, 赵鑫参与实验动物的饲养和骨密度测定, 杨艺参与实验动物的饲养和取材, 赵玉兰参与实验动物的取材与骨生物力学测定, 王佩锦参与骨密度测定, 唐薇作为科研思路负责人, 参与文章的修订, 角建林提供实验思路和实验室平台。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》, 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重, 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 原发性骨质疏松症基层诊疗指南 (2019 年) [J]. 中华全科医师杂志, 2020,19(4): 304-315.
- [2] AL SAEDI A, STUPKA N, DUQUE G. Pathogenesis of Osteoporosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2020;262:353-367.
- [3] 徐陆晨, 李运峰. 骨质疏松性骨折药物治疗的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017,23(7):947-953.
- [4] 季雨伟. 胎盘间充质干细胞制剂不同给药途径治疗树鼩 OPF 的疗效研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021.
- [5] 张萌, 李荣俊. 唑来膦酸治疗老年骨质疏松性骨折的效果及对骨代谢状态的影响 [J]. 中国医学创新, 2022,19(2):57-60.
- [6] 全健, 丁文涛. 自拟补肾健骨汤联合阿仑膦酸钠治疗老年骨质疏松性胸腰椎压缩性骨折患者的临床效果分析 [J]. 贵州医药, 2022,46(4): 615-616.
- [7] SU P, TIAN Y, YANG C, et al. Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8): 2343.
- [8] CHEN XJ, SHEN YS, HE MC, et al. Polydatin promotes the osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by activating the BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108746.

- [9] 陈迟迟,张雨,何家辰,等. 肥胖小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化 [J]. 中国组织工程研究,2022,26(24):3846-3851.
- [10] PEREIRA RF, HALFORD KW, O'HARA MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(11):4857-4861.
- [11] KADIYALA S, YOUNG RG, THIEDE MA, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997;6(2):125-134.
- [12] GJERDE C, MUSTAFA K, HELLEM S, et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):213.
- [13] PARK YB, HA CW, LEE CH, et al. Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results From a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept With 7 Years of Extended Follow-Up. *Stem Cells Transl Med*. 2016. doi:10.5966/sctm.2016-0157
- [14] LEE WS, KIM HJ, KIM K, et al. Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(6):504-511.
- [15] DING C, ZOU Q, WU Y, et al. EGF released from human placental mesenchymal stem cells improves premature ovarian insufficiency via NRF2/HO-1 activation. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(3):2992-3009.
- [16] 王燕,杨建成,金毅然,等. 间充质干细胞诱导的神经干细胞条件培养基对原代培养海马神经干细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 宁夏医科大学学报,2022,44(4):325-331.
- [17] 崔桂玉,白剑,苗兰英,等. HLA-G 阳性的胎盘间充质干细胞体外诱导 Treg 的实验研究 [J]. 中国应用生理学杂志,2018,34(5):396-400.
- [18] CHRISTODOULOU I, KOLISIS FN, PAPA-EVANGELIOU D, et al. Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy]. *Stem Cells Int*. 2013;2013:246134.
- [19] YAN X, FU X, JIA Y, et al. Nrf2/Keap1/ARE Signaling Mediated an Antioxidative Protection of Human Placental Mesenchymal Stem Cells of Fetal Origin in Alveolar Epithelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:2654910.
- [20] AGATA H, SUMITA Y, HIDAKA T, et al. Intra-Bone Marrow Administration of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Is a Promising Approach for Treating Osteoporosis. *Stem Cells Int*. 2019;2019:4214281.
- [21] 武羽洁,袁鑫,角建林,等. 两种方法建立树鼩骨质疏松模型的比较实验研究 [J]. 医学研究杂志,2019,48(8):51-54.
- [22] NI X, QIU Z. Tupaiine tree shrews (Scandentia, Mammalia) from the Yuanmou Lufengpithecus locality of Yunnan, China. *Swiss J Palaeontol*. 2012;131(1):51-60.
- [23] WANG X, CHEN T, DENG Z, et al. Melatonin promotes bone marrow mesenchymal stem cell osteogenic differentiation and prevents osteoporosis development through modulating circ_0003865 that sponges miR-3653-3p. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):150.
- [24] WANG Z, WANG D, LIU Y, et al. Mesenchymal Stem Cell in Mice Uterine and Its Therapeutic Effect on Osteoporosis. *Rejuvenation Res*. 2021; 24(2):139-150.
- [25] YANG BC, KUANG MJ, KANG JY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes act via the miR-1263/Mob1/Hippo signaling pathway to prevent apoptosis in disuse osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;524(4):883-889.
- [26] ZHAO S, MO X, WEN Z, et al. Declining serum bone turnover markers are associated with the short-term positive change of lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women. *Menopause*. 2022;29(3):335-343.
- [27] FISCHER V, HAFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2022;123:14-21.
- [28] FENG X, JIANG S, ZHANG F, et al. Shell water-soluble matrix protein from oyster shells promoted proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts in vitro and vivo. *Int J Biol Macromol*. 2022; 201:288-297.
- [29] LADANG A, ROUSSELLE O, HUYGHEBAERT L, et al. Parathormone, bone alkaline phosphatase and 25-hydroxyvitamin D status in a large cohort of 1200 children and teenagers. *Acta Clin Belg*. 2022;77(1):4-9.
- [30] CITAK M, GRASMÜCKE D, SUERO EM, et al. The roles of serum alkaline and bone alkaline phosphatase levels in predicting heterotopic ossification following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2016;54(5):368-370.
- [31] 廖婧,冯正平. 骨钙素对糖、脂代谢的影响及分子机制的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志,2021,27(3):426-430.
- [32] ZENGER S, EK-RYLANDER B, ANDERSSON G. Biogenesis of tartrate-resistant acid phosphatase isoforms 5a and 5b in stably transfected MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(5):598-607.
- [33] YANG Y, WEI Q, AN R, et al. Anti-osteoporosis effect of Semen Cuscutae in ovariectomized mice through inhibition of bone resorption by osteoclasts. *J Ethnopharmacol*. 2022;285:114834.
- [34] ZHANG W, ZHANG X, LING J, et al. Osteo-/odontogenic differentiation of BMP2 and VEGF gene-co-transfected human stem cells from apical papilla. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):3747-3754.
- [35] CUI Q, XING J, YU M, et al. Mmu-miR-185 depletion promotes osteogenic differentiation and suppresses bone loss in osteoporosis through the Bgn-mediated BMP/Smad pathway. *Cell Death Dis*. 2019; 10(3):172.
- [36] CHEN F, LIANG Q, MAO L, et al. Synergy effects of Asperosaponin VI and bioactive factor BMP-2 on osteogenesis and anti-osteoclastogenesis. *Bioact Mater*. 2022;10: 335-344.
- [37] WANG Z, QI G, LI Z, et al. Effects of urolithin A on osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand via bone morphogenetic protein 2. *Bioengineered*. 2022;13(3): 5064-5078.
- [38] UDAGAWA N, KOIDE M, NAKAMURA M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab*. 2021; 39(1):19-26.
- [39] 丁海霞,王富军,黄晓伟,等. 不同途径移植脐带血干细胞对兔 2 型糖尿病的疗效观察 [J]. 中华细胞与干细胞杂志 (电子版), 2016, 6(6):334-338.
- [40] 李翰宇. 不同剂量下腹腔注射人脐带间充质干细胞治疗 2 型糖尿病大鼠的有效性研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [41] 徐谷根,肖毅,尹卓娜,等. 不同部位脐带血干细胞移植治疗糖尿病大鼠的效果研究 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版),2015,9(13): 2602-2604.

(责任编辑: GD, ZN, ZH)