

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002450

Netrin-1 增强骨髓间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折的作用及机制研究

王滋润¹, 梁丽芹², 肖成伟¹, 郝 鹏¹

(四川省医学科学院、四川省人民医院 1. 骨科; 2. 外科, 成都 610072)

【摘要】目的:探讨 Netrin-1 增强骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)治疗骨质疏松性骨折的作用及机制。**方法:**流式细胞术检测 BMSC 凋亡水平和人白细胞抗原 G(human leukocyte antigen-G, HLA-G)的表达;构建骨质疏松性骨折大鼠模型;ELISA 检测碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)和骨钙素的浓度;免疫组化检测骨组织中来源于 BMSC 和巨噬细胞的数目。**结果:**流式细胞术检测显示 Netrin-1 能够抑制缺血缺氧引起的 BMSC 凋亡($F=27.311, P=0.000$),同时升高缺血缺氧抑制的 HLA-G 表达($F=27.094, P=0.000$)。BMSC 可减少血清中碱性磷酸酶和 TRAP 的浓度,升高血清中骨钙素浓度、骨组织内骨细胞数目和骨密度。Netrin-1 能够进一步增强 BMSC 的这些功能,相对于 BMSC 组,差异均具有统计学意义。免疫组化结果显示,BMSC 组存活的 BMSC 数目为(10.401 ± 1.392)个/高倍视野(high-power field, HPF),Netrin-1 组的数目为(25.506 ± 2.257)个/HPF,2 组之间差异有统计学意义($t=5.694, P=0.000$);BMSC 组巨噬细胞数目为(21.900 ± 4.458)个/HPF,相对于骨质疏松组,差异有统计学意义;Netrin-1 组巨噬细胞数目为(11.500 ± 3.808)个/HPF,相对于 BMSC 组,差异具有统计学意义($F=79.863, P=0.000$)。**结论:**Netrin-1 通过细胞保护和调控炎症反应,增强 BMSC 对骨质疏松性骨折的治疗效果。

【关键词】骨质疏松;骨折;间充质干细胞;Netrin-1**【中图分类号】**R816.8**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-10-22

Role of Netrin-1-enhanced bone marrow mesenchymal stem cells on the treatment of osteoporotic fracture and its mechanism

Wang Zirun¹, Liang Liqin², Xiao Chengwei¹, Hao Peng¹

(1. Department of Orthopedics; 2. Surgical Department, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the role of Netrin-1-enhanced bone marrow mesenchymal stem cells(BMSC) on the treatment of osteoporotic fracture and its mechanism. **Methods:** The apoptotic level of BMSC and the expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) were detected by flow cytometry. Mice models with osteoporotic fracture were built. Concentrations of alkaline phosphatase, tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) and osteocalcin were detected by ELISA, and the number of human BMSC and macrophages in bone tissue was detected by immunohistochemistry. **Results:** Flow cytometry showed that Netrin-1 was able to inhibit the apoptosis of BMSC induced by ischemia and hypoxia($F=27.311, P=0.000$), and increase the expression of HLA-G($F=27.094, P=0.000$). BMSC was able to reduce the concentration of alkaline phosphatase and TRAP in serum, and increase the concentration of osteocalcin in serum, the number of osteocytes in bone tissue and the bone mineral density. Netrin-1 was able to further enhance functions of BMSC. Compared with the BMSC group, the difference was statistically significant. Immunohistochemical results showed that the number of surviving BMSCs in the BMSC group was (10.401 ± 1.392)/high-power field(HPF) and was (25.506 ± 2.257)/HPF in the Netrin-1 group, with significant differences between two groups($t=5.694, P=0.000$). The number of macrophages in the BMSC group was (21.900 ± 4.458)/HPF, which was significantly different from that in the osteoporosis group. The number of macrophages in the Netrin-1 group was (11.500 ± 3.808)/HPF, which was significantly different from that in the BMSC group($F=79.863, P=0.000$). **Conclusion:**

Netrin-1 can enhance the therapeutic effect of BMSC on osteoporotic fracture through cell protection and regulation of inflammatory reaction.

【Key words】osteoporosis; fracture; mesenchymal stem cells; Netrin-1

作者介绍: 王滋润, Email: wangfirstday@163.com,

研究方向: 骨质疏松和干细胞。

通信作者: 郝 鹏, Email: hhaopeng@163.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200420.1730.006.html>

(2020-04-21)

骨质疏松症是一种以骨组织减少为主要特点的代谢性骨病,常发生在绝经后女性和老年男性。据统计,我国 50 岁以上人群骨质疏松症患病率接近 20%^[1]。骨折是骨质疏松最常见的并发症之一,严重者甚至引起瘫痪^[2]。手术治疗是骨质疏松性骨折的主要治疗手段,具有操作简单、手术时间短和恢复迅速等优点,但是骨折的根本原因并没有得到根本纠正^[3]。因此,预防和早期治疗骨质疏松具有十分重要的临床意义。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)是一种从骨髓中分离提取的多能干细胞,在特定微环境诱导下,可分化为骨细胞和神经细胞等^[4-6]。BMSC 移植可有效预防和治疗骨质疏松。然而骨质疏松骨组织局部是一个缺血缺氧的微环境, BMSC 在移植后会大量死亡,严重影响治疗效果^[7-9]。Netrin-1 是一种轴突导向分子,研究发现 Netrin-1 具有诱导 BMSC 分化和修复神经损伤等重要功能,此外还能保护细胞抵御恶劣微环境的损伤^[10-12]。本文拟研究 Netrin-1 在 BMSC 治疗骨质疏松中的应用,并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

12 月龄的雌性 SD 大鼠购于北京维通利华公司; BMSC 购于广州赛业生物科技有限公司; DMEM/F12 基础培养基、胰酶和胎牛血清购于美国 Hyclone 公司; Netrin-1、人白细胞抗原 G (human leukocyte antigen-G, HLA-G) 流式抗体购于美国 BD 公司; 凋亡流式检测试剂盒购于美国罗氏公司; 兔抗人抗核抗体购于美国 Abcam 公司; 碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)和骨钙素 ELISA 试剂盒购于欣博盛生物科技公司。

1.2 细胞凋亡培养

BMSC 置于含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养。实验分 3 组: 对照组(正常的细胞培养基)、缺血缺氧组(无血清培养基,用缺氧罐充入 95% N₂、5% CO₂ 培养模拟缺氧)和 Netrin-1 组(缺血缺氧培养基中加入 10 ng/mL Netrin-1)。培养 48 h 后,用 0.25% 胰酶消化,收集各组细胞, PBS 清洗 3 次后,加入 Annexin V 和 PI 试剂,避光染色 1 h 后, PBS 清洗 3 次,流式细胞术检测各组凋亡细胞的比例。

1.3 动物模型的构建

骨质疏松大鼠模型的构建参照文献报道的方法^[13]。12 月龄的雌性 SD 大鼠,随机分为对照组(正常大鼠骨折处理)、骨质疏松组(骨质疏松大鼠骨折处理)、BMSC 组(骨质疏松大鼠骨折处理后,进行 BMSC 移植)和 Netrin-1 组(骨质疏松大鼠骨折处理后,进行 Netrin-1 刺激的 BMSC 移植)。除对照组

外,各组大鼠均进行双侧卵巢的切除手术,术后 3 个月形成骨质疏松模型。各组大鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉后,切开左侧膝关节内侧,沿髌韧带内侧打开关节腔,小心采用克氏针于股骨平台偏前方沿股骨长轴插入 15 cm,然后以文氏钳继续将克氏针固定于远端髓内松质骨内,之后用小动物专用电钻锯断股骨,采用生理盐水清洗后,根据分组将 5×10^6 个 BMSC 注射到断面,之后逐层缝合创面,骨质疏松性骨折大鼠模型构建成功。

1.4 血清学指标检测

2 周后,各组大鼠采用 1% 戊巴比妥钠麻醉,收集心脏血, 3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,采用 ELISA 试剂盒检测碱性磷酸酶、TRAP 和骨钙素的浓度,操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.5 组织学染色

收集各组大鼠的股骨标本,4% 多聚甲醛固定 12 h,之后脱钙 24 h,进行石蜡切片,一部分切片进行 HE 染色检测骨组织的基本形态;一部分切片进行兔抗人抗核抗体免疫组化染色,检测骨组织中来源的 BMSC 和巨噬细胞的数目。

1.6 统计学处理

实验数据采用 GraphPad Prism 5 进行分析。结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料多组之间的比较采用单因素方差分析和组间 Bonferroni 两两比较,2 组之间计量资料的比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Netrin-1 抑制 BMSC 的凋亡

对照组、缺血缺氧组和 Netrin-1 组 BMSC 凋亡的比例分别为 $(9.910 \pm 3.653)\%$ 、 $(27.782 \pm 4.877)\%$ 和 $(18.403 \pm 3.940)\%$ ($F=27.311$, $P=0.000$); 两两比较,相对于对照组,缺血缺氧组 BMSC 凋亡的比例明显下降 ($P=0.000$); 相对于缺血缺氧组, Netrin-1 组 BMSC 凋亡的比例明显升高 ($P=0.000$) (图 1)。

2.2 Netrin-1 促进 BMSC 高表达 HLA-G

HLA-G 是 BMSC 发挥免疫抑制功能的主要机制。流式细胞术结果显示对照组、缺血缺氧组和 Netrin-1 组 BMSC 表面 HLA-G 的平均荧光强度为 48.661 ± 3.669 、 36.045 ± 3.359 和 45.631 ± 3.359 ($F=27.094$, $P=0.000$); 两两比较,相对于对照组,缺血缺氧组 BMSC 表面 HLA-G 的平均荧光强度明显下降 ($P=0.000$); 相对于缺血缺氧组, Netrin-1 组 BMSC 表面 HLA-G 的平均荧光强度明显升高 ($P=0.000$) (图 2)。

2.3 血清中碱性磷酸酶、TRAP 和骨钙素的变化

ELISA 结果显示对照组、骨质疏松组、BMSC 组和 Netrin-1 组碱性磷酸酶的浓度分别为 (23.242 ± 3.163) 、 (32.674 ± 2.908) 、 (26.119 ± 2.407) 和 (20.070 ± 2.621) ng/mL ($F=37.030$, $P=0.000$), TRAP 的浓度分别为 (32.147 ± 4.650) 、 (51.587 ± 5.212) 、 (41.455 ± 5.242) 和 (34.435 ± 10.575) ng/mL ($F=16.230$, $P=0.000$), 骨钙素的浓度分别为 (399.160 ± 44.266) 、 $(250.22 \pm$

31.304)、 (319.360 ± 36.435) 和 (416.400 ± 44.553) ng/mL ($F=54.380, P=0.000$)。两两比较, 相对于对照组, 骨质疏松组碱性磷酸酶和 TRAP 的浓度明显升高, 骨钙素的浓度明显下降 ($P=0.000$); 相对于 BMSC 组, Netrin-1 组碱性磷酸酶和 TRAP 的浓度明显下降, 骨钙素的浓度明显升高 (均 $P=0.000$)。

2.4 骨密度变化

对照组、骨质疏松组、BMSC 组和 Netrin-1 组骨细胞数目分别为 (14.400 ± 2.221) 、 (6.100 ± 3.143) 、 (18.100 ± 4.332) 和 (34.600 ± 5.358) 个/高倍视野 (high-power field, HPF) ($F=38.270, P=0.000$)。两两比较, 相对于对照组, 骨质疏松组骨细胞数目明显下降 ($P=0.000$); 相对于 BMSC 组, Netrin-1 组骨细胞数目明显升高 ($P=0.000$) (图 3)。

进一步采用骨密度检测仪检测各组的骨密度, 结果显示对照组、骨质疏松组、BMSC 组和 Netrin-1 组骨密度分别为 (0.243 ± 0.046) 、 (0.146 ± 0.036) 、 (0.221 ± 0.030) 和 $(0.295 \pm$

$0.028)$ g/cm² ($F=30.200, P=0.000$)。两两比较, 相对于对照组, 骨质疏松组骨密度明显下降 ($P=0.000$); 相对于 BMSC 组, Netrin-1 组骨密度明显升高 ($P=0.000$)。

2.5 骨组织中 BMSC 数目的变化

免疫组化结果显示, 对照组和骨质疏松组检测不到阳性表达的 BMSC; BMSC 组存活的 BMSC 数目为 (10.401 ± 1.392) 个/HPF, Netrin-1 组存活的数目为 (25.506 ± 2.257) 个/HPF, 2 组之间差异有统计学意义 ($t=5.694, P=0.000$) (图 4)。

2.6 骨组织中巨噬细胞数目的变化

免疫组化结果显示, 对照组、骨质疏松组、BMSC 组和 Netrin-1 组巨噬细胞数目分别为 (9.200 ± 3.225) 、 (41.500 ± 7.990) 、 (21.900 ± 4.458) 和 (11.500 ± 3.808) 个/HPF ($F=79.863, P=0.000$)。两两比较, 相对于对照组, 骨质疏松组巨噬细胞数目明显升高 ($P=0.000$); 相对于 BMSC 组, Netrin-1 组巨噬细胞数目明显下降 ($P=0.000$) (图 5)。

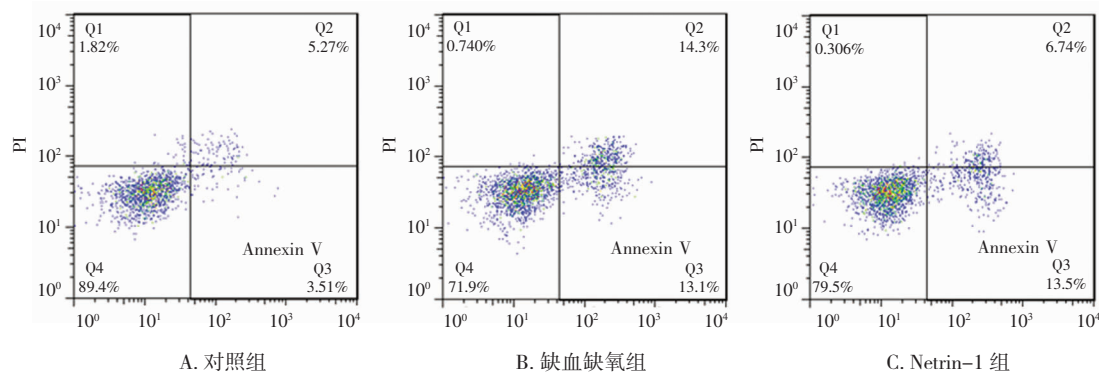


图 1 Netrin-1 抑制 BMSC 的凋亡

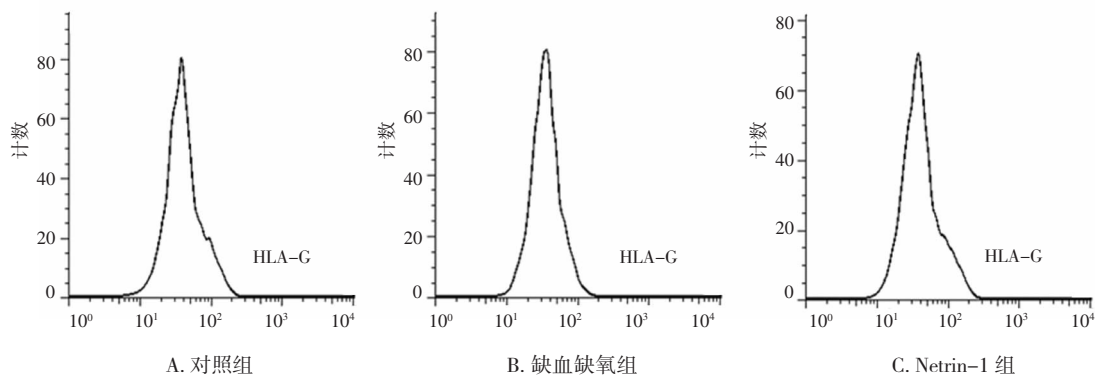


图 2 Netrin-1 促进 BMSC 高表达 HLA-G

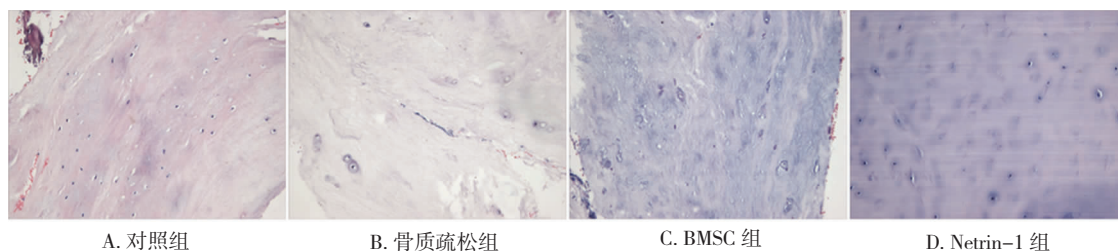


图 3 骨组织内骨细胞数目 (HE 染色, 100×)

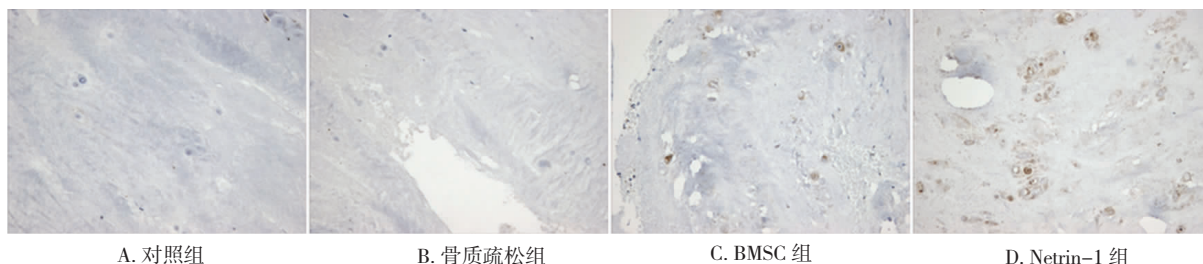


图 4 骨组织中人来源 BMSC 的数目 (免疫组化, 100 ×)

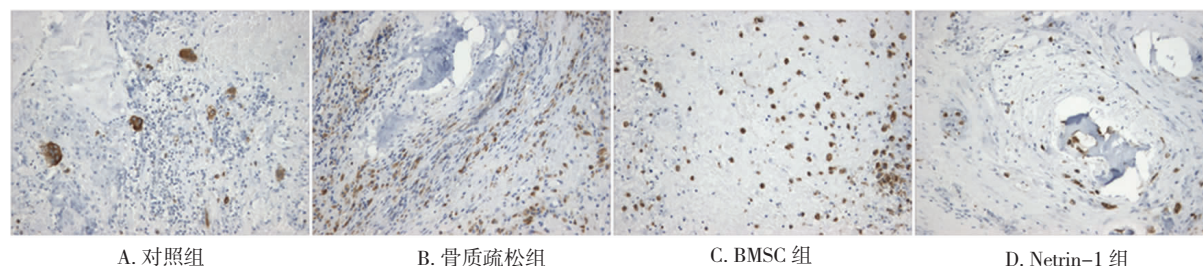


图 5 骨组织中巨噬细胞数目 (免疫组化, 100 ×)

3 讨论

我国逐渐步入老年性社会,骨质疏松的发病人数逐年升高。由于骨量减少和骨质结构的改变,骨质疏松患者很容易发生骨折,严重者可引起患者股骨头坏死、瘫痪,甚至死亡^[14]。手术治疗是骨折最有效的治疗方法,然而骨质疏松患者多为老年人群,手术后的恢复十分缓慢^[15]。因此,提高骨质疏松性骨折的术后恢复速度有利于患者早期进行恢复性功能锻炼和减少各种并发症的发生。BMSC 是来源于骨髓的多能干细胞,可分化为内皮细胞、骨细胞和神经细胞等^[16]。与本研究类似,大量研究发现 BMSC 移植能够促进骨质疏松性骨折恢复,骨密度明显升高。然而骨折部位是一个缺血缺氧的微环境,会严重损伤移植 BMSC 功能^[17],本研究发现缺血缺氧会明显提高 BMSC 的凋亡率。因此,提高骨折部位移植细胞存活率对 BMSC 治疗骨质疏松性骨折具有十分重要的意义。

Netrin-1 是最重要的神经分子之一,可促进神经轴突的生长和神经元的存活。近几年大量研究发现,Netrin-1 还具有促血管生成、促分化和细胞保护等生物学功能^[18-20]。Netrin-1 可通过 UNC5H2 等通路保护内皮细胞抵御氧糖剥夺损伤。此外,Netrin-1 可明显提高 BMSC 对心肌梗死和神经损伤的治疗

效果^[21]。本研究发现,Netrin-1 可保护 BMSC 抵御缺血缺氧的损伤,抑制细胞凋亡。动物实验结果显示,相对于单纯的 BMSC 移植,Netrin-1 组存活的 BMSC 数目和骨密度均明显升高,这说明 Netrin-1 可作为一个有效的靶点,应用于骨质疏松性骨折的干细胞治疗。

最新研究发现,炎症反应在骨质疏松的发生发展过程中起着十分重要的作用^[22]。骨质疏松患者多为绝经后女性和老年患者,其体内处于轻度炎症反应状态。激活的巨噬细胞、效应性 T 细胞、白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-6 等可通过 RANK/RANKL/OPG 等通路引起骨代谢紊乱,促进骨质疏松症的发生和加重^[23-25]。BMSC 表面表达有 HLA-G 等免疫抑制分子,能够通过直接细胞接触抑制炎症反应的激活^[26]。然而,在缺血缺氧条件下,BMSC 表面 HLA-G 的表达和功能发挥均会明显降低。本研究发现,Netrin-1 能够促进 BMSC 表面 HLA-G 的表达。动物实验结果显示,Netrin-1 组在骨折部位浸润巨噬细胞的数目明显降低。少量的巨噬细胞能够促进血管新生和组织修复,但是过度炎症反应会损伤骨细胞和移植 BMSC,进一步导致骨折修复延迟,甚至无法修复。

综上所述,Netrin-1 通过细胞保护和调控炎症反应,增强了 BMSC 对骨质疏松性骨折的治疗效果。本研究为干细胞治疗提供了新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Lin TH, Yang RS, Tu HJ, et al. Inhibition of osteoporosis by the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin antagonist of rhodostomin variants[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 804: 94–101.
- [2] Chew CK, Clarke BL. Abaloparatide; recombinant human PTHrP (1–34) anabolic therapy for osteoporosis[J]. Maturitas, 2017, 97: 53–60.
- [3] Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis[J]. Nat Genet, 2017, 49(10): 1468–1475.
- [4] Eirin A, Zhu XY, Puranik AS, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation[J]. Kidney Int, 2017, 92(1): 114–124.
- [5] Du W, Zhang K, Zhang S, et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer[J]. Biomaterials, 2017, 133: 70–81.
- [6] Mayourian J, Ceholski DK, Gorski P, et al. Exosomal microRNA–21–5p mediates mesenchymal stem cell paracrine effects on human cardiac tissue contractility[J]. Circ Res, 2018, 122(7): 933–944.
- [7] Hamidouche Z, Rother K, Przybilla J, et al. Bistable epigenetic states explain age-dependent decline in mesenchymal stem cell heterogeneity[J]. Stem Cells, 2017, 35(3): 694–704.
- [8] Badimon L, Cubedo J. Adipose tissue depots and inflammation: effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(9): 1064–1073.
- [9] Tang XD, Shi L, Monsel A, et al. Mesenchymal stem cell microvesicles attenuate acute lung injury in mice partly mediated by Ang–1 mRNA[J]. Stem Cells, 2017, 35(7): 1849–1859.
- [10] Chen T, Chen D, Li F, et al. Netrin–1 with stem cells promote angiogenesis in limb ischemic rats[J]. J Surg Res, 2014, 192(2): 664–669.
- [11] Li Q, Yao D, Ma J, et al. Transplantation of MSCs in combination with netrin–1 improves neoangiogenesis in a rat model of hind limb ischemia[J]. J Surg Res, 2011, 166(1): 162–169.
- [12] Ke T, Wu Y, Li L, et al. Netrin–1 ameliorates myocardial infarction-induced myocardial injury: mechanisms of action in rats and diabetic mice[J]. Hum Gene Ther, 2014, 25(9): 787–797.
- [13] Wang Y, Luo TB, Liu L, et al. LncRNA LINC00311 promotes the proliferation and differentiation of osteoclasts in osteoporotic rats through the notch signaling pathway by targeting DLL3[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(6): 2291–2306.
- [14] Zeytinoglu M, Jain RK, Vokes TJ. Vertebral fracture assessment: enhancing the diagnosis, prevention, and treatment of osteoporosis[J]. Bone, 2017, 104: 54–65.
- [15] Wang YK, Zhang YM, Qin SQ, et al. Effects of alendronate for treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(42): e12691.
- [16] Gonzalezking H, García NA, Ontoriaoviedo I, et al. Hypoxia-inducible factor–1 α potentiates Jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. Stem Cells, 2017, 35(7): 1747–1759.
- [17] Ni X, Ou C, Guo J, et al. Lentiviral vector-mediated co-overexpression of VEGF and Bcl–2 improves mesenchymal stem cell survival and enhances paracrine effects *in vitro*[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(2): 418–426.
- [18] Lin L, Isacson O. Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by Netrin–1 and Slits[J]. Stem Cells, 2006, 24(11): 2504–2513.
- [19] Hadi T, Boytard L, Silvestro M, et al. Macrophage-derived netrin–1 promotes abdominal aortic aneurysm formation by activating MMP3 in vascular smooth muscle cells[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5022.
- [20] Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, et al. Netrin–1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC[J]. EMBO J, 2014, 20(11): 2715–2722.
- [21] Maruyama K, Kawasaki T, Hamaguchi M, et al. Bone-protective functions of netrin 1 protein[J]. J Biol Chem, 2016, 291(46): 23854–23868.
- [22] Zhao HX, Huang YX, Tao JG. ST1926 attenuates steroid-induced osteoporosis in rats by inhibiting inflammation response[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(8): 2072–2086.
- [23] Che Ahmad Tantowi NA, Lau SF, Mohamed S. Ficus deltoidea prevented bone loss in preclinical osteoporosis/osteoarthritis model by suppressing inflammation[J]. Calcif Tissue Int, 2018, 103(9): 388–399.
- [24] Al-Daghri NM, Aziz I, Yakout S, et al. Inflammation as a contributing factor among postmenopausal Saudi women with osteoporosis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(4): e5780.
- [25] Li XS, Zhang JR, Zhao YL, et al. Reduced prealbumin is associated with bone mineral density in women with osteoporosis[J]. Nutrition, 2017, 33: 338–342.
- [26] Prakash MD, Miller S, Randalldemllo S, et al. Mesenchymal stem cell treatment of inflammation-induced cancer[J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(11): 2694–2703.

(责任编辑:冉明会)