

骨科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002972

人脐带间充质干细胞通过调控 OPG/RANKL 比值
对骨质疏松大鼠的影响及机制研究卫莹¹, 刘师伟², 段瑞雪³, 赵宇翔³, 李楠¹, 吴亚茹³(1. 山西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 太原 030001; 2. 山西白求恩医院内分泌科, 太原 030032;
3. 太原市中心医院内分泌科, 太原 030009)

【摘要】目的:探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)对骨质疏松大鼠的影响及机制。**方法:**将 30 只 SPF 级 6 月龄雌性 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组(Sham 组)、卵巢切除组(OVX 组)、卵巢切除+HUC-MSCs 干预组($4 \times 10^6/3$ d, HUC-MSCs 干预组), 每组各 10 只, Sham 组切除大鼠腹腔少量脂肪, 其余各组均去除双侧卵巢建立骨质疏松大鼠模型。建模成功后, HUC-MSCs 组用干细胞干预 12 周, 其余 2 组用等剂量生理盐水干预。干预结束后, 通过骨代谢血清指标血钙(calcium, Ca)、血磷(phosphorus, P)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I 型胶原 C 端肽(c-terminal peptide of type I collagen, CTX)、骨组织形态计量学参数测量、骨密度检测、成骨细胞表面积/骨表面积比(osteoblast surface/bone surface, ObS/BS)和破骨细胞表面积/骨表面积比(osteoclast surface area/bone surface, OcS/BS), 评估大鼠骨质疏松改善情况, 同时通过 Western blot 探究各组大鼠骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、 β -连环蛋白(β -catenin)、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)的表达情况。**结果:**HUC-MSCs 组大鼠血清 Ca、ALP 含量明显高于 OVX 组(2.320 ± 0.188 vs. 1.822 ± 0.139 ; 79.584 ± 8.349 vs. 43.644 ± 5.369 ; 均 $P=0.000$), P、CTX 含量明显低于 OVX 组(1.651 ± 0.068 vs. 1.864 ± 0.076 , $P=0.000$; 119.832 ± 18.180 vs. 144.272 ± 15.629 , $P=0.039$); HUC-MSCs 组骨小梁结构得到明显改善, 骨密度、骨小梁数目、骨小梁面积比、ObS/BS 均明显高于 OVX 组(161.114 ± 16.726 vs. 126.558 ± 7.100 , $P=0.009$; 1.702 ± 0.220 vs. 1.051 ± 0.323 , $P=0.020$; 33.111 ± 6.101 vs. 19.575 ± 5.629 , $P=0.022$; 45.279 ± 3.947 vs. 33.948 ± 7.339 , $P=0.041$), 骨小梁分离度、OcS/BS 明显低于 OVX 组(0.592 ± 0.066 vs. 0.845 ± 0.165 , $P=0.018$; 37.532 ± 3.910 vs. 44.891 ± 3.615 , $P=0.026$); Western blot 结果显示 HUC-MSCs 组 OPG/RANKL 比值、 β -catenin、Runx2 的蛋白表达量明显高于 OVX 组(0.776 ± 0.045 vs. 0.097 ± 0.063 , $P=0.000$; 0.590 ± 0.057 vs. 0.202 ± 0.088 , $P=0.000$; 0.595 ± 0.078 vs. 0.239 ± 0.071 , $P=0.001$)。**结论:**HUC-MSCs 可以通过 Wnt/ β -catenin/Runx2 通路调节 OPG/RANKL 比值, 促进骨形成, 抑制骨吸收, 改善骨质疏松。

【关键词】骨质疏松; 人脐带间充质干细胞; 骨代谢; 骨保护素/核因子- κ B 受体活化因子配体**【中图分类号】**R580**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-05-15Effects and mechanism of human umbilical cord mesenchymal stem cells
on osteoporosis rats by regulating the ratio of
osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligandWei Ying¹, Liu Shiwei², Duan Ruixue³, Zhao Yuxiang³, Li Nan¹, Wu Yaru³(1. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine,
Shanxi Medical University; 2. Department of Endocrinology, Shanxi Bethune Hospital;
3. Department of Endocrinology, Taiyuan Central Hospital)**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells(HUC-MSCs) on osteoporosis ratsand its mechanism. **Methods:** Thirty SPF grade 6-month-old

female rats were randomly divided into three groups: sham

operation group(Sham group), ovariectomy group(OVX group)

and HUC-MSCs intervention group(HUC-MSCs group)($4 \times$

communication author: 刘师伟, Email: lswspring6@aliyun.com.

10⁶/3 day), with 10 rats in each group. In Sham group, a small

amount of abdominal fat was removed, and the other groups were

removed bilateral ovaries to establish osteoporosis rat model.

After successful modeling, HUC-MSCs group was intervened

(2022-01-06)

with stem cells for 12 w, while the other two groups were intervened with equal dose of normal saline. After the intervention, calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (ALP), c-terminal peptide of type I collagen (CTX), histomorphometric parameters of femur, bone mineral density (BMD), osteoblast surface/bone surface ratio (Obs/BS) and osteoclast surface area/bone surface (OcS/BS) were used to evaluate the improvement of osteoporosis in rats. Meanwhile, the expression of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), β -catenin and Runt-related transcription factor 2 (Runx2) were detected by Western blot.

Results: The contents of serum Ca and ALP in HUC-MSCs group were significantly higher than those in OVX group (2.320 ± 0.188 vs. 1.822 ± 0.139 ; 79.584 ± 8.349 vs. 43.644 ± 5.369 ; all $P=0.000$); P and CTX contents were significantly lower than those in OVX group (1.651 ± 0.068 vs. 1.864 ± 0.076 , $P=0.000$; 119.832 ± 18.180 vs. 144.272 ± 15.629 , $P=0.039$); BMD, the number of trabecular bone, the ratio of trabecular area and Obs/BS in HUC-MSCs group were significantly higher than those in OVX group (161.114 ± 16.726 vs. 126.558 ± 7.100 , $P=0.009$; 1.702 ± 0.220 vs. 1.051 ± 0.323 , $P=0.020$; 33.111 ± 6.101 vs. 19.575 ± 5.629 , $P=0.022$; 45.279 ± 3.947 vs. 33.948 ± 7.339 , $P=0.041$); the bone trabecular separation and OcS/BS in HUC-MSCs group were significantly lower than those in OVX group (0.592 ± 0.066 vs. 0.845 ± 0.165 , $P=0.018$; 37.532 ± 3.910 vs. 44.891 ± 3.615 , $P=0.026$); the results of Western blot showed that the ratio of OPG/RANKL and the protein expression of β -catenin and Runx2 in HUC-MSCs group were significantly higher than those in OVX group (0.776 ± 0.045 vs. 0.097 ± 0.063 , $P=0.000$; 0.590 ± 0.057 vs. 0.202 ± 0.088 , $P=0.000$; 0.595 ± 0.078 vs. 0.239 ± 0.071 , $P=0.001$). **Conclusion:** HUC-MSCs can regulate OPG/RANKL ratio through Wnt/ β -catenin/Runx2 pathway, thus promoting bone formation, inhibiting bone resorption and improving osteoporosis.

[Key words] osteoporosis; human umbilical cord mesenchymal stem cell; bone metabolism; osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种与骨强度下降相关的全身性、代谢性疾病,其特征是骨量减少、骨组织结构恶化,骨骼脆性增加、骨折风险加大,现已成为全世界主要的公共卫生问题之一^[1]。近年来,OP 患者逐年增加,主要高发于中老年人和绝经后妇女,社会经济负担不断加重^[2-3]。目前 OP 的治疗方法以药物治疗为主,主要包括骨吸收抑制剂和骨形成促进剂及双重作用药物,均具有一定程度的副作用,且花费高、耗时长、疗效差,迫切需要探寻新的方法来解决该问题。

骨质疏松的发病因素复杂,如行为、营养、激素和遗传易感性等均可导致骨质疏松的发生发展,其中由成骨细胞 (osteoblast, OB) 调节为主的骨形成和破骨细胞 (osteoclast, OC) 控制为主的骨吸收之间的骨代谢不平衡为主要发病机制。因此,如何调节骨代谢是治疗骨质疏松的重中之重。人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs) 具有分化潜能大、增殖能力强、免疫原性低、取材方便、无道德伦理问题限制等优势,在细胞治疗及再生医学组织工程研究中具有广阔的应用前景^[4-6]。有研究表明, HUC-MSCs 体外移植可以改善骨质疏松^[7-8],但其机制尚不明确。本研究通过建立骨质疏松大鼠模型,探讨其影响及具体机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

30 只雌性 SD 大鼠 (北京维达河实验动物科技有限公司)、第三代 HUC-MSCs 细胞株 (深圳三启生物技术有限公司)、抗酒石酸酸性磷酸酶染液试剂盒 (南京建成)、碱性磷酸酶染液试剂盒 (南京建成)、EDTA 脱钙液 (武汉博士德)、4% 多聚甲醛固定液 (武汉博士德)、大鼠血清碱性磷酸酶检测试剂盒 (上海西唐)、大鼠血清雌二醇 ELISA 试剂盒 (上海西唐)、大鼠血清 I 型胶原 C 端肽 ELISA 试剂盒 (上海西唐)、大鼠血清钙检测试剂盒 (北京博奥)、大鼠血清磷检测试剂盒 (北京博奥)、大鼠抗骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 抗体 (Thermo Fisher)、抗核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 抗体 (Santa Cruz)、抗 β -连环蛋白 (β -catenin) 抗体 (Abcam)、抗 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 抗体 (Abcam)。

1.2 实验方法

1.2.1 骨质疏松大鼠模型建立及鉴定 该研究方案由山西医科大学动物伦理和使用委员会审查并批准 (SYDL2021006)。30 只 SPF 级 6 月龄 SD 雌性大鼠在 23℃、50% 湿度的光/暗循环 12 h 条件下生活,自由获取食物和水。适应性喂养 2 周后,随机分为 3 组:假手术组 (Sham 组) ($n=10$)、去卵巢组 (OVX 组) ($n=10$)、去卵巢+HUC-MSCs 干预组 ($4 \times 10^6/3$ d, HUC-MSCs 干预组) ($n=10$)。Sham 组切除两侧卵巢周边等体积大小脂肪,其余各组均切除两侧卵巢,建立骨质疏松模型。术后正常饲养,每周进行体质量监测,8 周后,通过检测血清雌二

醇(estradiol, E_2), 骨代谢指标血钙(calcium, Ca)、血磷(phosphorus, P), 骨形成标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP), 骨吸收标志物 I 型胶原 C 端肽(c-terminal peptide of type I collagen, CTX)及骨小梁微结构观察和骨组织骨形态计量学参数测定进行模型鉴定。

1.2.2 干细胞制备 将所需的第三代 HUC-MSCs 细胞株从液氮罐中取出、复苏, 镜下观察细胞状态良好, 使用无菌生理盐水清洗 3 次, 计数, 随后用生理盐水配制成细胞密度为 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 吹打混匀, 分装为 1 mL, 立即干预, 现配现用。

1.2.3 干预及标本采集 骨质疏松大鼠模型成功后, HUC-MSCs 干预组的大鼠以 $4 \times 10^6/3 \text{ d}$ 进行尾静脉注射, Sham 组、OVX 组通过尾静脉注射等剂量生理盐水, 干预 12 周。干预结束后, 大鼠血清标本通过眶静脉采血并静置离心获取, 置于 -20°C 保存待用; 大鼠实施安乐死后收集骨组织标本, 右侧股骨、胫骨用 4% 多聚甲醛固定, 待后续实验使用; 左侧股骨置于 -80°C 保存待用。

1.2.4 血清指标测定 在模型鉴定时, 根据试剂盒说明书, 采用 ELISA 法, 测定大鼠血清 E_2 水平; 在模型鉴定及干预结束后, 采用以上相同方法测定大鼠骨代谢血清指标 Ca、P、ALP、CTX 水平。

1.2.5 骨小梁微结构观察和骨形态计量学参数测量 模型鉴定时及干预结束后, 将 4% 多聚甲醛固定 24 h 的股骨置于 EDTA 中脱钙, 脱水、石蜡包埋、切成 $5 \mu\text{m}$ 厚度的冠状面, 进行 HE 染色, 在光学显微镜下选取 3 个不同的视野进行拍照, 观察镜下骨小梁结构 ($200 \times$), 采用 Image-Pro Plus 软件对大鼠股骨干骺端进行骨形态计量学参数定量分析。测定的骨形态计量学参数包括骨小梁数量、骨小梁面积比、骨小梁分离度^[9]。

1.2.6 胫骨骨密度检测 将右侧胫骨从 4% 多聚甲醛固定液中取出, 无菌纱布擦拭干净, 置于双能 X 线骨密度仪上, 进行骨密度(bone mineral density, BMD)扫描, 随后采用小动物分析软件系统, 自动分析胫骨骨密度。

1.2.7 成骨细胞及破骨细胞计数 取出处理好的石蜡切片, 用碱性磷酸酶染色成骨细胞, 每个切片随机取 4 个视野, 用普通显微镜在 $200 \times$ 镜下观察并拍照, 并用 Image-Pro Plus 软件测定成骨细胞表面积/骨表面积比(osteoblast surface/bone surface, ObS/BS)。用抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色破骨细胞后, 用同样的方法分析破骨细胞表面积/骨表面积比(osteoclast surface area/bone

surface, OcS/BS)。

1.2.8 Western blot 检测 取冻存的骨组织, 每组称取 200 mg 进行总蛋白提取, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜 1 h, 脱脂奶粉封闭 2 h, 抗大鼠 OPG 一抗、抗大鼠 RANKL 一抗、抗大鼠 β -catenin 一抗、抗大鼠 Runx2 一抗, 1:1 000 稀释, 4°C 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h; 化学发光显色液进行显色, 获得 OPG、RANKL、 β -catenin、Runx2 目的条带, 并用 Image J 进行定量分析, 观察大鼠骨组织中 OPG、RANKL、 β -catenin、Runx2 蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理

所有资料均采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行处理。所得到的数值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 骨质疏松模型鉴定

与 Sham 组 (331.800 ± 26.084) 相比, OVX 组的大鼠体重在术后 3 周后 (355.600 ± 27.605) 明显增高 ($t=2.265, P=0.031$); OVX 组血清中 E_2 、Ca、ALP 含量明显低于 Sham 组 ($t=-5.158, P=0.000; t=-8.616, P=0.000; t=-0.308, P=0.019$), P、CTX 含量明显高于 Sham 组 ($t=4.249, P=0.002; t=5.690, P=0.000$)。同时, OVX 组大鼠较 Sham 组骨小梁结构相对疏松紊乱, 骨小梁间距变宽, 骨髓腔内出现大量脂肪细胞; OVX 组的大鼠骨小梁数目、面积比明显低于 Sham 组 ($t=-6.908, P=0.000; t=-8.324, P=0.000$), 骨小梁分离度明显高于 Sham 组 ($t=5.380, P=0.003$) (图 1、表 1、图 2、表 2)。由此判断, 骨质疏松大鼠模型构建成功。

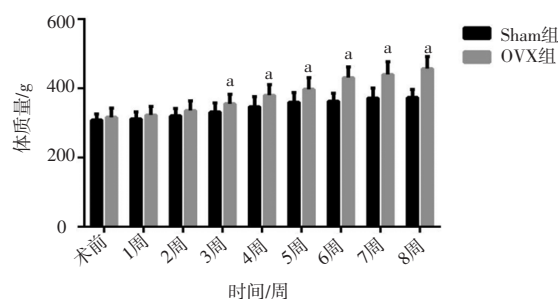


图 1 大鼠去卵巢术后体重监测结果 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

表 1 2 组大鼠血清 E_2 及骨代谢生化相关指标水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	$E_2/(\text{pmol} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{Ca}/(\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{P}/(\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{ALP}/(\text{pmol} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\text{CTX}/(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
Sham组	498.094 ± 110.349	2.688 ± 0.175	1.390 ± 0.132	107.041 ± 14.062	81.165 ± 13.909
OVX组	247.834 ± 44.129^a	1.831 ± 0.170^a	1.688 ± 0.111^a	74.815 ± 15.365^a	133.945 ± 17.966^a
t 值	-5.158	-8.616	4.249	-0.308	5.690
P 值	0.000	0.000	0.002	0.019	0.000

注: a, 与 Sham 组相比较, $P < 0.05$

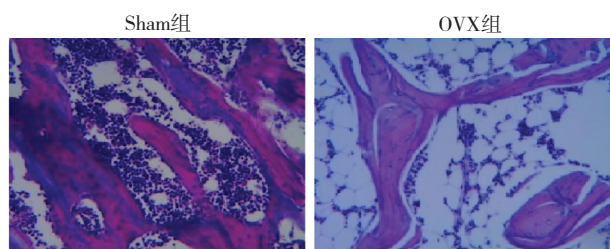


图2 大鼠骨小梁微结构镜下观(200 ×)

表2 2组大鼠骨形态计量学参数测量结果($\bar{x} \pm s$)

组别	骨小梁数目 $/ (1 \cdot \text{mm}^{-2})$	骨小梁面积比 $/\%$	骨小梁分离度 $/\text{mm}$
Sham组	2.314 ± 0.345	50.776 ± 6.824	0.215 ± 0.303
OVX组	1.011 ± 0.282^a	22.022 ± 4.617^a	0.831 ± 0.279^a
t 值	-6.908	-8.324	5.380
P 值	0.000	0.000	0.003

注:a,与Sham组相比较, $P < 0.05$

2.2 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠骨代谢血清指标 Ca、P、ALP 和 CTX 的影响

经方差分析,Sham组、OVX组、HUC-MSCs 干预组 3 组

间大鼠血清中 Ca、P、ALP 和 CTX 含量的差异均有统计学意义($F=33.075, P=0.000; F=42.697, P=0.000; F=72.119, P=0.000; F=13.197, P=0.000$)。进一步两两比较发现,与 Sham 组相比较,OVX 组血清 Ca、ALP 水平明显降低(均 $P=0.000$),P、CTX 水平明显增加(均 $P=0.000$);与 OVX 组相比,HUC-MSCs 干预组 Ca、ALP 浓度明显增高(均 $P=0.000$),P、CTX 水平明显降低($P=0.000, P=0.039$)(表 3)。

2.3 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠骨小梁微结构及骨形态计量学参数的影响

OVX 组骨小梁结构疏松紊乱,排列不整齐,含有大量的脂肪细胞,HUC-MSCs 干预后骨小梁结构得到明显改善。方差分析 3 组大鼠的骨小梁数目、面积比、分离度的数据差异均有统计学意义($F=5.991, P=0.022; F=14.071, P=0.002; F=18.754, P=0.001$)。与 Sham 组相比,OVX 组骨小梁数目、面积比明显降低($P=0.012; P=0.000$),骨小梁分离度明显增大($P=0.000$);与 OVX 组相比较,HUC-MSCs 干预组骨小梁数目、面积比均明显增加($P=0.020, P=0.022$),骨小梁分离度明显降低($P=0.018$)(图 3、表 4)。

表3 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠骨代谢生化相关指标水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	Ca/(mmol·mL ⁻¹)	P/(mmol·mL ⁻¹)	ALP/(pmol·mL ⁻¹)	CTX/(pg·mL ⁻¹)
Sham组	2.584 ± 0.164	1.430 ± 0.097	94.463 ± 8.476	87.300 ± 21.952
OVX组	1.822 ± 0.139^a	1.864 ± 0.076^a	43.644 ± 5.369^a	144.274 ± 15.629^a
HUC-MSCs干预组	2.320 ± 0.188^b	1.651 ± 0.068^b	79.584 ± 8.349^b	119.832 ± 18.180^b
F 值	33.075	42.697	72.119	13.917
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

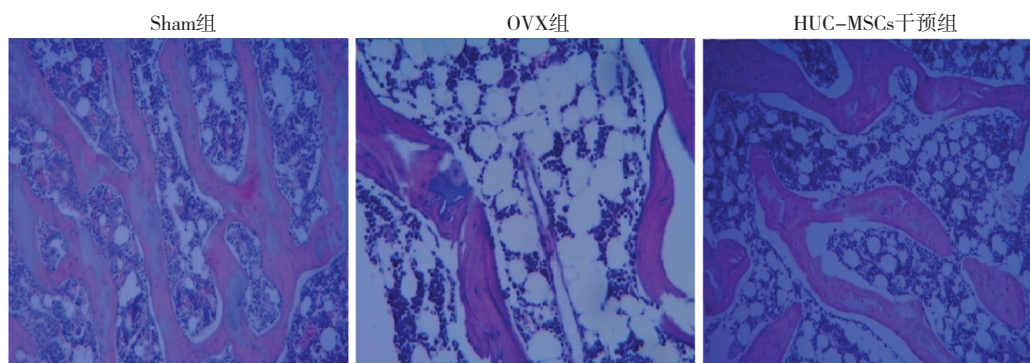
注:a,与Sham组相比较, $P < 0.05$;b:与OVX组相比较, $P < 0.05$ 

图3 HUC-MSCs 干预对骨质疏松大鼠骨小梁结构的影响(200 ×)

表4 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠骨形态计量学相关参数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	骨小梁数目/ $(1 \cdot \text{mm}^{-2})$	骨小梁面积比/ $\%$	骨小梁分离度/mm
Sham组	1.782 ± 0.411	45.596 ± 8.691	0.308 ± 0.121
OVX组	1.051 ± 0.323^a	19.575 ± 5.629^a	0.845 ± 0.165^a
HUC-MSCs干预组	1.702 ± 0.220^b	33.111 ± 6.101^b	0.592 ± 0.066^b
F 值	5.991	14.071	18.754
P 值	0.022	0.002	0.001

注:a,与Sham组相比较, $P < 0.05$;b:与OVX组相比较, $P < 0.05$

2.4 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠骨密度的影响

经采用双能 X 线检测大鼠右侧胫骨骨密度,并经过软件定量分析,得出 Sham 组、OVX 组、HUC-MSCs 干预组 3 组间大鼠骨密度分别为 175.878 ± 6.037 、 126.558 ± 7.100 、 161.114 ± 16.726 ,经方差分析 3 组间数据差异,具有统计学意义($F=15.729$, $P=0.004$)。进一步两两比较,OVX 组的骨密度明显低于 Sham 组($P=0.002$),在 HUC-MSCs 干预后,干预组的骨密度明显高于 OVX 组($P=0.009$)(图 4)。

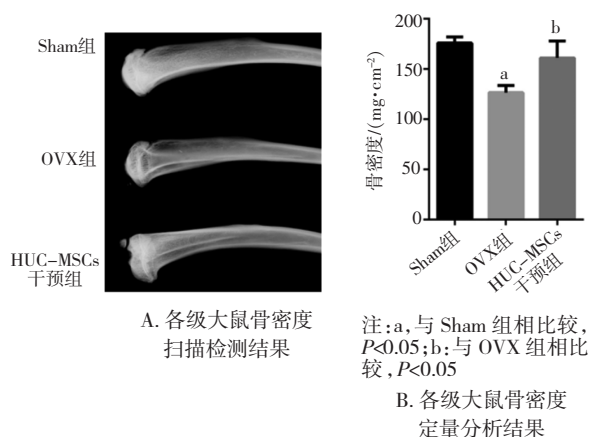
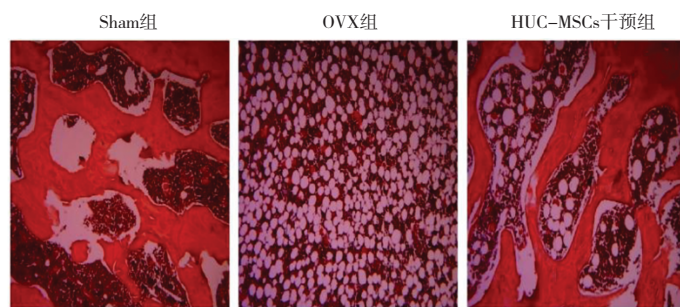


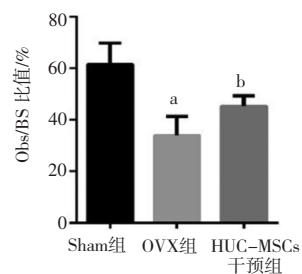
图 4 HUC-MSCs 干预对骨质疏松大鼠骨密度的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.5 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠成骨细胞、破骨细胞数量的影响

由碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶染色及成骨细胞



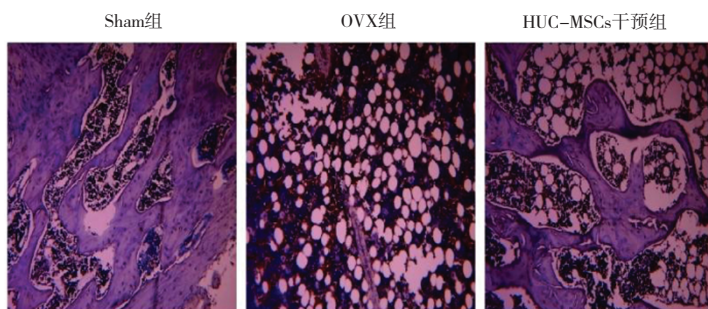
A. 各组大鼠骨切片碱性磷酸酶染色镜下观 ($200 \times$)



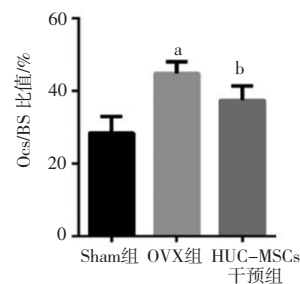
注:a,与 Sham 组相比较, $P<0.05$;b:与 OVX 组相比较, $P<0.05$

B. 各组大鼠骨切片成骨细胞定量分析结果

图 5 HUC-MSCs 干预对骨质疏松大鼠成骨细胞数量的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)



A. 各组大鼠骨切片抗酒石酸酸性磷酸酶染色镜下观 ($200 \times$)



注:a,与 Sham 组相比较, $P<0.05$;b:与 OVX 组相比较, $P<0.05$

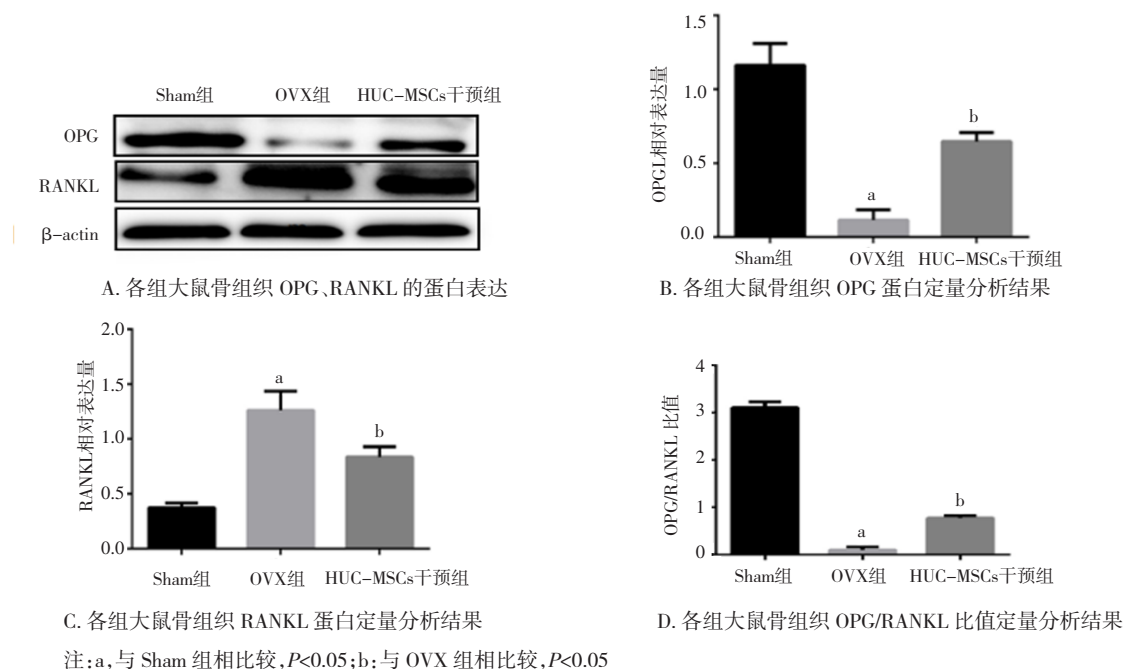
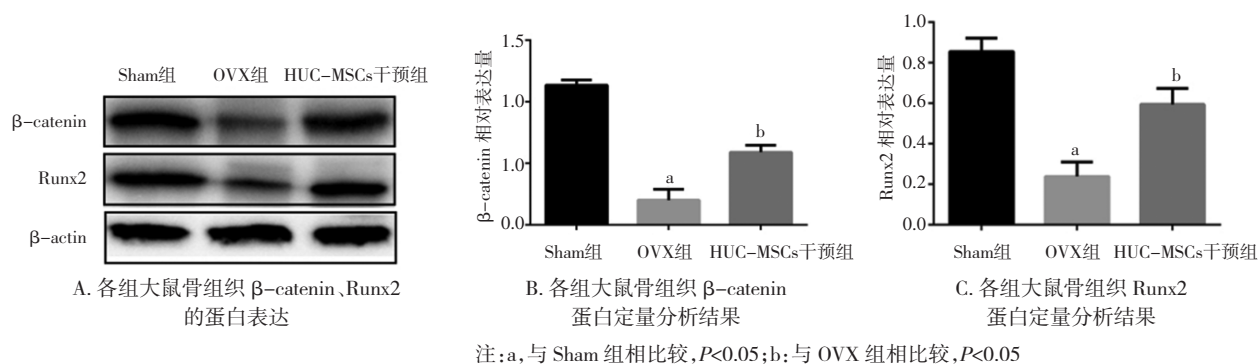
B. 各组大鼠骨切片破骨细胞定量分析结果

图 6 HUC-MSCs 干预对骨质疏松大鼠破骨细胞数量的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

和破骨细胞定量分析可得,Sham 组、OVX 组、HUC-MSCs 干预组大鼠 Obs/BS 比值分别为 61.559 ± 8.155 、 33.948 ± 7.339 、 45.279 ± 3.947 ,Ocs/BS 比值分别为 28.482 ± 4.544 、 44.891 ± 3.615 、 37.532 ± 3.910 。方差分析 3 组 Obs/BS、Ocs/BS 比值的差异均有统计学意义($F=17.005$, $P=0.001$; $F=17.637$, $P=0.001$)。与 Sham 组相比,OVX 组的股骨干骺端的成骨细胞数量明显减少,破骨细胞明显增加,Obs/BS 明显降低($P=0.000$),Ocs/BS 明显增大($P=0.000$);HUC-MSCs 干预后,成骨细胞数量明显增多,同时破骨细胞数量明显减少,Obs/BS 明显增高($P=0.041$),Ocs/BS 明显降低($P=0.026$)(图 5、图 6)。

2.6 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠 OPG、RANKL 蛋白表达的影响

Western blot 定量分析结果显示,Sham 组、OVX 组、HUC-MSCs 干预组中 OPG 蛋白的相对表达量分别为 1.164 ± 0.146 、 0.115 ± 0.070 、 0.647 ± 0.061 ,RANKL 蛋白的相对表达量分别为 0.375 ± 0.041 、 1.260 ± 0.178 、 0.836 ± 0.095 ,且 OPG/RANKL 比值分别为 3.102 ± 0.119 、 0.097 ± 0.063 、 0.776 ± 0.045 。方差分析 3 组 OPG、RANKL 蛋白表达量及 OPG/RANKL 比值的差异均有统计学意义($F=82.537$, $P=0.000$; $F=41.689$, $P=0.000$; $F=1101.760$, $P=0.000$)。与 Sham 组相比,OVX 组大鼠 OPG 表达、OPG/RANKL 比值明显降低(均 $P=0.000$),RANKL 表达明显增加($P=0.000$);与 OVX 组相比,HUC-MSCs 干预组中大鼠的 OPG 表达、OPG/RANKL 比值明显增加($P=0.001$, $P=0.000$),RANKL 表达明显降低($P=0.005$)(图 7)。

图 7 HUC-MSCs 干预对骨质疏松大鼠 OPG、RANKL 表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)图 8 HUC-MSCs 干预对骨质疏松大鼠 β-catenin、Runx2 表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.7 HUC-MSCs 通过 Wnt/β-catenin/Runx2 通路调节骨质疏松大鼠 OPG、RANKL 蛋白表达

Western blot 定量分析结果显示, Sham 组、OVX 组、HUC-MSCs 干预组中 β-catenin 蛋白的相对表达量分别为 1.135 ± 0.042 、 0.202 ± 0.088 、 0.590 ± 0.057 , Runx2 蛋白的相对表达量分别为 0.856 ± 0.066 、 0.239 ± 0.071 、 0.595 ± 0.078 。方差分析 3 组 β-catenin、Runx2 蛋白表达量差异均具有统计学意义 ($F=154.887, P=0.000$; $F=55.505, P=0.000$)。与 Sham 组相比, OVX 组大鼠表达 β-catenin、Runx2 明显降低 (均 $P=0.000$); 与 OVX 组相比, HUC-MSCs 组中大鼠的 β-catenin、Runx2 表达明显增加 ($P=0.000$; $P=0.001$) (图 8)。

3 讨论

本研究探讨了 HUC-MSCs 对骨质疏松大鼠骨代谢的影响及具体机制。结果表明 HUC-MSCs 可以通过 Wnt/β-catenin/Runx2 通路调节 OPG/RANKL

比值减少骨质疏松大鼠的骨丢失, 促进成骨, 从而改善骨代谢, 缓解骨质疏松。HUC-MSCs 可能作为骨质疏松治疗的一种有潜力的方法。

骨质疏松是老年人和绝经后妇女骨折最常见的原因, 由其引起的慢性疼痛、身体限制、生活方式的改变, 严重干扰人们正常生活, 影响生活质量。近年来, 随着人口老龄化问题日趋严重, 骨质疏松的发病率也逐年升高, 对社会造成了极大的负担。目前对于骨质疏松的针对性治疗主要为药物治疗和非药物治疗, 但至今尚无一种特效治疗方法可以恢复已经流失的骨质, 只能延缓进一步的骨破坏^[10]。而干细胞治疗作为一种新兴的治疗方式, 可以有效地解决这个问题。HUC-MSCs 在体外诱导条件下具有向成骨细胞定向分化的潜能, 相比其他成体干细胞, 来源更丰富, 临床取材方便, 分离纯度更高, 具有强大的增殖与自我更新能力, 免疫原性较低, 蕴藏着

更加优越的临床应用价值^[11-12],目前已广泛应用于脊髓神经损伤、软骨组织缺损等领域^[13-14]。

目前,关于 HUC-MSCs 与骨质疏松的相关研究仍然较少。骨小梁微结构和骨密度通常被认为是预测骨丢失和骨结构恶化的理想指标^[15]。An JH 等^[16]从人脐血(human umbilical cord blood,HUCB)中获得的 MSCs 被证明可以改善骨小梁和骨形成参数。为进一步探究 HUC-MSCs 干预对骨质疏松的影响及机制,本研究对大鼠股骨进行骨组织骨密度测量、HE 染色及骨形态计量学参数分析,结果显示 OVX 组骨密度较 Sham 组明显降低,且骨小梁结构稀疏,骨小梁分离度较大,HUC-MSCs 可以使骨密度恢复到接近正常水平,骨小梁结构排列紧密,增加骨小梁数量、减少骨小梁分离度,结果与先前文献^[17]报道一致。国际骨质疏松基金会提出,成骨细胞在骨形成过程中产生的 ALP 和骨吸收过程中破骨细胞释放的 CTX 作为骨形成和骨吸收的参考指标^[18],可用于监测骨质疏松治疗效果。在本研究中,OVX 组大鼠的血清 ALP 浓度明显降低,CTX 水平明显增高,在 HUC-MSCs 干预后,这一现象可以得到明显逆转。这与先前 Hong B 等^[19]研究的结果一致,说明 HUC-MSCs 确实可以发挥改善骨质疏松的作用。

骨代谢平衡是一种骨形成和骨吸收构成的动态平衡过程,而这种平衡主要是由成骨细胞调节的骨形成和破骨细胞控制的骨吸收构成。有研究显示,HUC-MSCs 可促进成骨细胞增殖;也有体外研究显示,HUC-MSCs 在破骨细胞分化培养基中与大鼠破骨细胞祖细胞共培养时,即使在高浓度 RANKL 的情况下,HUMSCs 也能明显降低破骨细胞的数量和活性^[20]。本研究采用碱性磷酸酶染色和抗酒石酸染色进行成骨细胞和破骨细胞计数,结果显示,在 HUC-MSCs 干预后,成骨细胞数量明显增多,破骨细胞明显减少,与上述结果一致。因此可以得出 HUC-MSCs 干预可以通过促进骨吸收、抑制骨形成改善骨质疏松。在骨代谢过程中,OPG 和 RANKL 的相对水平决定了成骨和破骨形成的过程。由成骨细胞产生的 RANKL 通过与破骨细胞受体 RANK 结合,诱导破骨细胞分化。成骨细胞还产生可溶性蛋白 OPG,OPG 阻断 RANKL 和 RANK 之间的相互作用,从而控制骨代谢过程^[21]。另外,OPG/RANKL 比值的失衡可能导致骨量的损失^[22]。因此,OPG 和 RANKL 之间的平衡在骨代谢稳态中起着重要作用。先前有文献报道,以双膦酸盐诱导的颌骨坏死大鼠为研究对象,该模型中 OPG/RANKL 比值呈明显下降趋势,而

HUC-MSCs 干预可以逆转这一现象,但以去卵巢骨质疏松模型为研究对象的相关报道仍然较少^[23]。本研究采用 Western blot 检测骨质疏松大鼠骨组织中 OPG、RANKL 的表达量,结果显示在 HUC-MSCs 干预后,骨质疏松大鼠的 OPG 蛋白表达明显提高,而 RANKL 蛋白表达水平呈下降趋势,提示 HUC-MSCs 可以通过提高 OPG/RANKL 比值,促进成骨,抑制破骨形成,最终改善骨质疏松。

然而,HUC-MSCs 调节 OPG/RANKL 比值的具体机制目前还不清楚。Wnt/ β -catenin 是骨质疏松治疗相关的一条经典通路。经典的 Wnt 信号通路主要是通过 β -连环蛋白(β -catenin)传递信号,发挥相关作用,在物种的进化过程中具有高度的保守性。有研究发现当细胞内 β -catenin 表达增加之后,能够促进成骨细胞分泌 OPG,减少 RANKL 的表达,从而抑制破骨细胞分化,抑制骨吸收^[24]。而 Runx2 是编码成骨细胞的特异性转录因子,在成骨细胞表面发挥重要作用,可以调节成骨细胞分化和骨形成^[25]。同时,之前有研究证实,Runx2 基因与 Wnt/ β -catenin 信号通路有密切关系^[26],大都通过该信号通路发挥作用,并且 Wnt/ β -catenin 信号通路可影响 Runx2、活性或者表达水平,进而发挥正向作用。Liu G 等^[27]发现 HUC-MSCs 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制向脂肪细胞的转化,在基础培养基中有利于成骨,但在成骨条件下抑制成骨细胞分化。近年来,有研究发现正向调控 Wnt5a/ β -catenin 信号通路,可以抑制 HUC-MSCs 的成脂分化^[28]。有体外研究通过模拟体内骨组织损伤微环境,将唑来膦酸处理后的骨髓来源的细胞与 HUC-MSCs 共培养后,发现骨再生标记物 Runx2 的表达明显增加^[29]。因此,推测 HUC-MSCs 可能是通过 Wnt/ β -catenin/Runx2 通路上调成骨细胞 OPG/RANKL 比率发挥作用。为了探寻该假设,本实验采用 Western blot 检测相关通路蛋白 β -catenin、Runx2 相对表达水平,发现骨质疏松大鼠骨组织中的 β -catenin、Runx2 蛋白表达水平明显降低,在 HUC-MSCs 干预后,大鼠骨组织中 β -catenin、Runx2 蛋白表达量明显高于 OVX 组,由此得出 HUC-MSCs 调节 OPG/RANKL 比值是通过 Wnt/ β -catenin/Runx2 通路发挥作用的。

综上所述,骨代谢稳态在骨质疏松的发病过程中起重要作用,HUC-MSCs 作为治疗骨质疏松的一个新兴疗法,可以促进骨形成,抑制骨吸收,进而改善骨质疏松。本研究为临床中治疗骨质疏松提供了新的方向和思路。

参 考 文 献

- [1] Leslie WD, Morin SN. Osteoporosis epidemiology 2013; implications for diagnosis, risk assessment, and treatment[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2014, 26(4): 440–446.
- [2] Chen P, Li ZZ, Hu YH. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review[J]. *BMC Public Health*, 2016, 16(1): 1039.
- [3] Beekman KM, Veldhuis-Vlug AG, den Heijer M, et al. The effect of raloxifene on bone marrow adipose tissue and bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis[J]. *Bone*, 2019, 118: 62–68.
- [4] 刘秋英, 利奕成, 何绍清, 等. 脐带间充质干细胞治疗大鼠骨质疏松的初步研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(11): 1592–1597.
- [5] Liu QY, Li YC, He SQ, et al. Effect of umbilical cord mesenchymal stem cell transplanting on retinoic acid-induced osteoporosis in rats[J]. *Chin J Cell Biol*, 2013, 35(11): 1592–1597.
- [5] Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali DL, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2013, 9(1): 32–43.
- [6] Santos JM, Búrcia RN, Simões SI, et al. The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX[®]) in the treatment of inflammatory arthritis[J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 18.
- [7] 姚映灵, 何玲, 毕杨, 等. 人滑膜间充质干细胞与人脐带间充质干细胞的生物学性状比较[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(2): 302–310.
- [8] Yao YL, He L, Bi Y, et al. Comparison of biological characteristics of human synovial mesenchymal stem cells and human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Chin J Cell Biol*, 2021, 43(2): 302–310.
- [8] Rodríguez JP, Garat S, Gajardo H, et al. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics[J]. *J Cell Biochem*, 1999, 75(3): 414–423.
- [9] 黄健萍, 林思恩, 吴玲芝, 等. 复方脑复康预防大鼠去卵巢后骨质疏松的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(11): 1292–1295.
- [9] Huang JP, Lin SE, Wu LZ, et al. Effects of compound piracetam in preventing osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2011, 36(11): 1292–1295.
- [10] Liang M, Liu WG, Peng ZB, et al. The therapeutic effect of secretome from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in age-related osteoporosis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1357–1366.
- [11] Ezquerro S, Zuleta A, Arancibia R, et al. Functional properties of human-derived mesenchymal stem cell spheroids: a meta-analysis and systematic review[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 8825332.
- [12] Ekram S, Khalid S, Bashir I, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their chondrogenic derivatives reduced pain and inflammation signaling and promote regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(8): 3191–3205.
- [13] Semenova E, Grudniak MP, Machaj EK, et al. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison & characteristics[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(5): 1780–1795.
- [14] Bertoni L, Jacquet-Guibon S, Branly T, et al. Evaluation of allogeneic bone-marrow-derived and umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to prevent the development of osteoarthritis in an equine model[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2499.
- [15] Tang L, Gao XH, Yang XY, et al. Ladder-climbing training prevents bone loss and microarchitecture deterioration in diet-induced obese rats[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 98(1): 85–93.
- [16] An JH, Park H, Song JA, et al. Transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells or their conditioned medium prevents bone loss in ovariectomized nude mice[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(5/6): 685–696.
- [17] Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards[J]. *Osteoporos Int*, 2011, 22(2): 391–420.
- [18] Williams C, Sapra A. Osteoporosis markers[M]//StatPearls[Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- [19] Hong B, Lee S, Shin N, et al. Bone regeneration with umbilical cord blood mesenchymal stem cells in femoral defects of ovariectomized rats[J]. *Osteoporos Sarcopenia*, 2018, 4(3): 95–101.
- [20] Fu YS, Lu CH, Chu KA, et al. Xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly differentiating into osteocytes and reducing osteoclast activity reverses osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(1): 194–208.
- [21] 李苏华, 李惠, 廖湘平, 等. NGAL、OPG、RANKL 及 DAS28 对 RA 骨质疏松的预测作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(9): 1155–1158.
- [22] Li SH, Li H, Liao XP, et al. Value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, and 28-joint disease activity score in predicting osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2019, 44(9): 1155–1158.
- [22] Mountzios G, Dimopoulos MA, Bamias A, et al. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton[J]. *Acta Oncol*, 2007, 46(2): 221–229.
- [23] Yang G, Kim YN, Kim H, et al. Effect of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(6): 975–988.
- [24] Yang N, Liu DK, Zhang X, et al. Effects of ginsenosides on bone remodelling for novel drug applications: a review[J]. *Chin Med*, 2020, 15: 42.
- [25] Han NN, Zheng Y, Li R, et al. β -catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88890.
- [26] Yin YK, Ding LX, Hou Y, et al. Upregulating microRNA-410 or downregulating Wnt-11 increases osteoblasts and reduces osteoclasts to alleviate osteonecrosis of the femoral head[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2019, 14(1): 383.
- [27] Liu GZ, Vijayakumar S, Grumolato L, et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(1): 67–75.
- [28] Bae YK, Kwon JH, Kim M, et al. Intracellular calcium determines the adipogenic differentiation potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells via the Wnt5a/ β -catenin signaling pathway[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 6545071.

(责任编辑: 冉明会)