

## 骨质疏松症抑制人间充质干细胞的成骨分化

代学俊<sup>1</sup>, 岑蔼儿<sup>2</sup>, 张春梅<sup>3</sup>, 龚 铭<sup>1</sup>, 周治宇<sup>1</sup>, 黄保丁<sup>1</sup>, 叶淦湖<sup>2</sup>, 邹学农<sup>1\*</sup>

(1.中山大学附属第一医院脊柱外科//骨科研究所,广东 广州 510080; 2.东莞常平人民医院,广东 东莞 523573;  
3.兰考县人民医院,河南 兰考 475300)

**摘要:**【目的】为研究患者来源干细胞成骨分化的差异性,选取临床诊断为骨质疏松症患者的骨髓干细胞进行成骨分化诱导。【方法】采用密度梯度离心法,从临床 6 名患者(骨质疏松症 3 人,非骨质疏松症 3 人)的腰椎骨髓血液中分离获得原代骨髓间充质干细胞,并体外扩增至 3-4 代后进行实验。成骨诱导液的成分包括地塞米松(100 nmoL/L),二磷酸抗坏血酸(0.05 mmol/L), $\beta$ -甘油磷酸钠(10 mmol/L)溶解于含有 100 mL/L 胎牛血清的低糖 DMEM 中。通过测定 hMSC 的增值与碱性磷酸酶(ALP)含量反应干细胞成骨分化活性。定量 PCR 检测 Runx-2、ALP 及成骨标志基因 osteocalcin(OC)和 osteonectin(ON)表达水平;通过矿化结节茜素红染色确认并定量检测钙离子浓度。【结果】比较两组干细胞增殖差异,骨质疏松组较非骨质疏松组降低,而 ALP 含量无显著差异。Q-PCR 检测显示在第 3、7 天时,骨质疏松组 Runx-2、ALP 的 mRNA 表达水平均显著低于非骨质疏松组。骨质疏松组的成骨相关基因 OC 在 3、7、14 d 时 mRNA 表达水平均显著低于非骨质疏松组,而 ON 仅在第 7 天表达具有显著差异;矿化结节染色及钙离子定量检测显示,较之非骨质疏松组,骨质疏松组矿化结节染色浅,钙定量降低。【结论】使用成骨诱导干细胞分化方案(地塞米松、二磷酸抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠)结果提示骨质疏松症患者的干细胞成骨分化能力较非骨质疏松患者降低。因此,选取有骨质疏松症患者自身的骨髓间充质干细胞作为治疗的种子细胞可能并不适用于临床。

**关键词:**骨质疏松症、人骨髓间充质干细胞、成骨分化

中图分类号:R681.4

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)05-0723-07

## Osteoporosis Suppress Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells

DAI Xue-jun<sup>1</sup>, CEN Ai-er<sup>2</sup>, ZHANG Chun-mei<sup>3</sup>, GONG Ming<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-yu<sup>1</sup>, HUANG Bao-ding<sup>1</sup>,  
YE Gan-hu<sup>2</sup>, ZOU Xue-nong<sup>1\*</sup>

(1.Orthopaedic Research Institute//Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Changping People's Hospital of Dongguan, Changping 523573, China; 3.Lankao People's Hospital of Henan, Lankao 475300, China)

**Abstract:**【Objective】 To demonstrate differences in osteogenic differentiation, we test the capacity of hMSC between the osteoporosis and the non-osteoporosis patients. 【Method】 Six cases of bone marrow derived from patients with lumbar operation, in which three patients were diagnosed with osteoporosis and three with non-osteoporosis. For each patient, hMSC were divided into control group and osteogenic induction group. hMSC were separated from fresh bone marrow by density centrifugation and expanded. Osteogenic differentiation of hMSC was induced by treatment with dexamethasone (100 nmoL/L), ascorbic acid (0.05 mmol/L),  $\beta$ -glycerol phosphate (10 mmol/L) and low glucose DMEM medium with 0.1 volume fraction fetal bovine serum. The hMSC proliferation was evaluated after the induction by simultaneous monitoring of CCK-8 value and alkaline phosphatase activity (ALP). RT-qPCR assay was used to identify the differentially expressed osteogenic gene Runx-2, ALP, osteocalcin (OC) and osteonectin (ON). The formation of mineralized nodule was verified by staining with Alizarin red S as well as calculated by calcium quantitative assay.

收稿日期:2013-11-15

基金项目:国家基础研究计划(973 项目,2012CB619100);东莞市高等院校科研机构和医疗卫生单位科技计划项目(20101051503501)

作者简介:代学俊,博士研究生,研究方向:脊柱外科,E-mail:13297979@qq.com; \*通信作者:邹学农,博士生导师,E-mail:zxong@hotmail.com

【Result】The values of proliferation were increased significantly in non-osteoporosis group, while the ALP indices showed to significant differences between the groups. RT-qPCR assay indicated that, compared to osteoporosis group, Runx-2 and ALP were up-regulated on day 3 and 7, OC was up-regulated on day 3, 7 and 14, ON was up-regulated on day 7. The calcium nodules staining and quantitative assay showed that the capacity of hMSC in osteoporosis group was suppressed during the process of osteogenic induction, in comparison to the non-osteoporosis group. 【Conclusion】Our data suggest multipotency of hMSC were suppressed by osteoporosis in osteogenic differentiation, which is induced by dexamethasone, ascorbic acid, and  $\beta$ -glycerol phosphate. Hence, it may not suitable for applying hMSC from osteoporosis patient in treatment of their own disease.

**Key words:** osteoporosis; human bone marrow stem cells (hMSC); osteogenic differentiation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2014, 35(5): 723-729]

随着我国人口的老龄化,老年性骨质疏松症的发病率呈逐年上升趋势,其多发性、易发性、严重后果与社会负担已逐渐成为重要的公共保健问题。老年性骨质疏松症为慢性疾病,属于原发性骨质疏松症。其主要病因是骨质形成与吸收平衡失调,导致骨量下降、骨细微结构破坏。因此骨质疏松症增加,骨折的危险性上升<sup>[1]</sup>。目前,对于骨质疏松症的临床治疗方法虽多但疗效均不理想。人骨髓间充质干细胞 (human marrow-derived mesenchymal stem cells, hMSC)可在体外诱导成骨,成软骨及成脂肪分化。对促进骨愈合与再生方面具有重要临床意义<sup>[2-3]</sup>。近年来,由于干细胞的研究发展,干细胞成骨诱导分化被认为有助于本疾病的治疗。在治疗方式上是否选取患者自身或外源性干细胞作为治疗种子细胞的研究仍缺乏。本文对临床确诊为骨质疏松症患者的自身干细胞体外诱导成骨分化过程中的细胞增殖、碱性磷酸酶含量、成骨分化相关基因的表达变化及矿化钙结节形成等多项指标进行考察,探讨骨质疏松症患者干细胞临床应用治疗自身疾病的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要实验设备、材料与试剂

细胞培养瓶购自 CORNING 公司, L-DMEM 购自美国赛默飞世尔科技公司, 倒置光学/荧光多功能显微镜 (Nikon 公司, 型号: TS100)。酶联免疫检测仪 (Thermo 公司, 型号: 354)。NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo 公司)。Trizol、胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒、RT-qPCR 试剂均购自大连 TaKaRa 公司; ALP 缓冲液 (1.5 mol/L)、地塞米松 (dexamethasone Dex)、二磷酸抗坏血酸 (ascorbic acid AsAp)、 $\beta$ -甘油磷酸钠 ( $\beta$ -glycerol phosphate  $\beta$ -GP)、茜素红 S 购自美国 Sigma 公司,

胰蛋白酶购自 Gibco 公司, 淋巴细胞分离液 [Ficoll-paque™ PLUS, (1.007±0.001)g/mL] 购自瑞士 GE Healthcare, CCK-8 试剂盒购自日本 DOJINDO 公司, 氯仿、异丙醇购自广州化学试剂厂。

### 1.2 临床标本收集

经中山大学附属第一医院伦理委员会同意并取得患者的知情同意后, 选取 2012 年 02 月-2012 年 03 月于本院进行外科脊柱手术的 50 岁以上绝经女性患者为研究对象, 按照临床骨质疏松症的诊断分为骨质疏松组 (3 例) 与非骨质疏松组 (3 例)。年龄在 50~73 岁, 骨质疏松组平均年龄 (60±6.7) 岁。非骨质疏松组平均年龄 (62±4.2) 岁。两组年龄之间没有差异性。

### 1.3 hMSC 的分离、培养及传代

术中用 50 mL 注射器抽取腰椎骨髓血约 15~25 mL, 取 15 mL 离心管, 按体积 4:3 比例先后加入 Ficoll 分离液及骨髓液, 室温 1200 r/min ( $r=9$  cm), 离心 45 min。小心的吸弃上层水相至中间絮状细胞层, 将中间细胞层移至另一 15 mL 离心管, 加入适量含 100 mL PBS 的 L-DMEM, 混匀, 1200 r/min ( $r=9$  cm), 离心 5 min, 弃上清, 再加入 2~3 mL 含 10% FBS 的 L-DMEM, 吹打悬浮细胞。将该细胞悬浮液转移至 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中并加入 5 mL 含 100 mL/L FBS 的 L-DMEM, 混匀后置于 37℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo 细胞培养箱, 型号: 3951) 中静置培养, 2 d 后首次换液, 之后每 3 d 全量换液, 约至 14 d 左右原代 hMSC (P0 代) 增长至 80%~90% 融合率, 室温条件下用 2.5 g/L 胰蛋白酶 (Gibco, SH30042.01B) 消化并收集细胞, 以 1:3 (面积比) 传代接种于 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶, 记为 P1 代, 每 3 d 更换培养液。按以上同样操作方法消化传代。

### 1.4 实验分组与成骨诱导

将两组患者分离的 hMSC 均扩增至 P4 代, 以

$1.33 \times 10^4/\text{cm}^2$  的细胞密度接种至 96 孔培养板中培养。成骨诱导液含地塞米松(100 nmol/L),二磷酸抗坏血酸(0.05 mmol/L), $\beta$ -甘油磷酸钠(10 mmol/L)的 10%FBS L-DMEM 培养基。为探讨成骨诱导各成分对 hMSC 的增殖与成骨分化作用的关联性,将实验组分为地塞米松(Dex)、二磷酸抗坏血酸(AsAp)、 $\beta$ -甘油磷酸钠( $\beta$ -GP)、Dex+AsAp、Dex+ $\beta$ -GP 与 AsAp+ $\beta$ -GP,空白对照加入 10%FBS L-DMEM 培养液,每组设 3 复孔;同时以相同细胞密度接种 6 孔培养板,设立空白对照组与成骨诱导分化组。96 孔板进行细胞增殖、碱性磷酸酶含量及钙结节定量检测,6 孔培养板细胞用于提取总 RNA 及相关基因定量表达检测。

### 1.5 成骨鉴定

**1.5.1 细胞增殖与碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ALP)活性检测** 接种于 96 孔板的 hMSC 分别于成骨诱导第 3、7、14 天检测细胞增殖活性(Cell Counting Kit-8, Dojindo, 货号:CK04),按试剂盒使用说明书操作,在酶联免疫检测仪(450 nm 测定各孔吸光度值(D),测定细胞增殖活性。待检测完后用 PBS 清洗 2 次,加入 ALP 缓冲液(0.1 mol/L glycine, pH 9.6; 1% Nonidet P-40; 1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mmol/L  $\text{ZnCl}_2$ ) 100  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^\circ\text{C}$  孵育 10 min; 再加入对磷酸对硝基苯酯(PNPP,溶于二乙醇胺缓冲液中配置成 1 mg/mL 底物反应液) 100  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^\circ\text{C}$  避光孵育 15 min; 2 mol/L NaOH 100  $\mu\text{L}$ /孔, 室温避光反应 10 min; 405 nm 记录各测得 OD 值。

**1.5.2 钙结节染色及定量茜素红染色法检测钙结节** 在成骨诱导第 14 天,吸弃诱导培养液, PBS 洗涤 3 次,用 10%的冰乙醇固定 1 h,吸取冰乙醇后用双蒸水冲洗 2 次,加入 pH 4.0 的茜素红溶液,室温下染色 10 min。弃去染液后,再用蒸馏水清洗,加入质量体积分数为 10%的氯化十六烷基吡啶(CPC) 100  $\mu\text{L}$ /孔,室温反应 15 min 后,使结合钙盐的茜素红溶解于溶液中。酶标仪 560 nm 测定各孔 OD 值。

**1.5.3 实时定量 PCR** 成骨诱导分化 3、7、14 d 收集细胞,按照 Trizol 说明书方法提取细胞总 RNA, nanodrop 2000 检测总 RNA 纯度及含量,逆转录按 TaKaLa 试剂盒说明书进行操作,使用随机引物反转录, cDNA 于负 20  $^\circ\text{C}$  保存。根据试剂盒说明书进行 q-PCR 操作,反应体系为 10  $\mu\text{L}$ ,反应程序为: 95  $^\circ\text{C}$  10 min, 95  $^\circ\text{C}$  15 s, 60  $^\circ\text{C}$  30 s, 72  $^\circ\text{C}$  20 s,

40 个循环,内参为 GAPDH。基因相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta}$  公式计算,引物如表 1。

表 1 RT-qPCR 扩增片段及引物序列  
Table 1 Nucleotide sequences for qPCR primers

Gene	Size of PCR product(bp)	Sequence
Runx-2	127	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'(F)
		5'-CATTCCGGAGCTCAGCAGCAGAATAA-3'(R)
ALP	137	5'-GGACCATTCCCACGCTTTCAC-3'(F)
		5'-CCTTGTAGCCAGGCCATTG-3'(R)
Osteocalcin	262	5'-CTATTGGCCCTGCCCCACT-3'(F)
		5'-AGCGCCGATAGCCCTCTGA-3'(R)
Osteonectin	194	5'-AAGAGGAGGTGGTGGCGGAAAAT-3'(F)
		5'-GGCAAAGAAGTGGCAGGAAGACT-3'(R)
GAPDH	237	5'-GGAAGGTGAAGCTCGGAGTCAAC-3'(F)
		5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'(R)

### 1.6 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件对细胞增殖与 ALP 含量进行析因设计资料的方差分析。基因表达及钙含量比较采用独立样本  $t$  检验 (Independent  $t$ -test), 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人骨髓间充质干细胞形态学特征

原代干细胞接种初始可见大量的圆形细胞悬浮和红细胞及少量细胞碎片,接种 4 h 后细胞开始贴壁,原代培养 48 h 后可见少量细胞贴壁,初起为小圆形,多角形或梭形,呈集落样生长(图 1A);培养 3 d 后首次换液并吸弃未贴壁细胞。体外培养 7 d 后细胞形态均一,呈长梭形(图 1B)。培养 14 d 至 90% 融合时,细胞可呈漩涡样生长,形态类似成纤维细胞,见图 1C。

### 2.2 干细胞的增殖活性检测

图 2A(骨质疏松)、2B(非骨质疏松组)中各实验处理因素在 3、7 及 14 d 细胞增殖情况显示:两组细胞增殖均随着时间增加而升高,差别具有统计学意义( $F=54.789, P < 0.001$ );且组间差异也具有统计学意义( $F=16.843, P < 0.001$ )。来源于骨质疏松组的细胞增殖活性较非骨质疏松组降低。

### 2.3 干细胞成骨分化 ALP 检测

图 3A(骨质疏松)、3B(非骨质疏松组)各实验处理因素在 3、7 及 14 d 细胞碱性磷酸酶含量对比显示: 两组细胞碱性磷酸酶含量均随着时间增加而升高, 差别具有统计学意义 ( $F=28.048, P<0.001$ ), 但在两组间差异无统计学意义 ( $F=2.010, P=0.157$ )。来源于骨质疏松组与非骨质疏松组细胞的碱性磷酸含量无明显差异。

### 2.4 干细胞成骨分化基因表达检测

在第 3、7 天时, 骨质疏松组 Runx-2、ALP 的 mRNA 表达水平均显著低于非骨质疏松组, 至 14d 两组间无显著差异(图 4A、B)。骨质疏松组的成骨相关基因 osteocalcin (OC) 在 3、7、14 d 时 mRNA 表达水平均显著低于非骨质疏松组, 而 osteonectin

(ON) 仅在第 7 天表达具有显著差异(图 4C、D)。

### 2.5 干细胞成骨分化钙结节染色及定量检测

经成骨诱导培养 4~5 d, 可见细胞形态发生变化。7 d 出现钙化斑点, 随诱导时间延长, 细胞形态由梭形变化为多角型细胞, 约 14 d 细胞形成广泛均一的矿化结节样结构。用茜素红法染色, 可见鲜红色细胞外基质沉积(图 5A: 骨质疏松组、B: 非骨质疏松组)。成骨诱导 14 天进行矿化钙结节定量比较, 非骨质疏松组在  $\beta$ -GP、Dex+ $\beta$ -GP 和成骨诱导等作用下均较骨质疏松组显著升高。图 5A、B 为成骨诱导 14 d, 干细胞于各组中矿化钙结节茜素红染色。图 5C 为成骨诱导 14 d 矿化钙结节相对定量检测, 在  $\beta$ -GP、Dex+ $\beta$ -GP 和成骨诱导组, 非骨质疏松组钙定量均显著高于骨质疏松组。

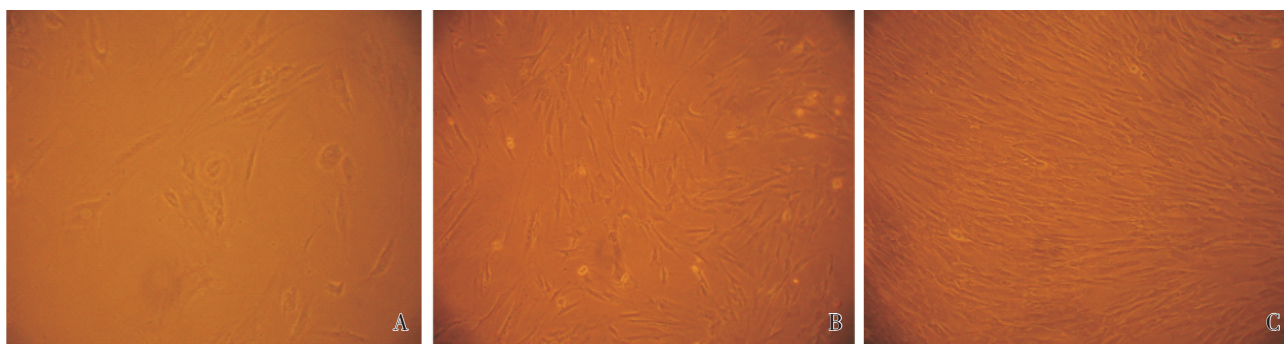


图 1 原代 hMSC 细胞培养 3 d(A), 7 d(B), 14 d(C) 光镜下观察所见( $\times 100$ )

Fig.1 The hMSC morphology at day 3 (A), day 7 (B), and day 14 (C). Original magnification,  $\times 100$

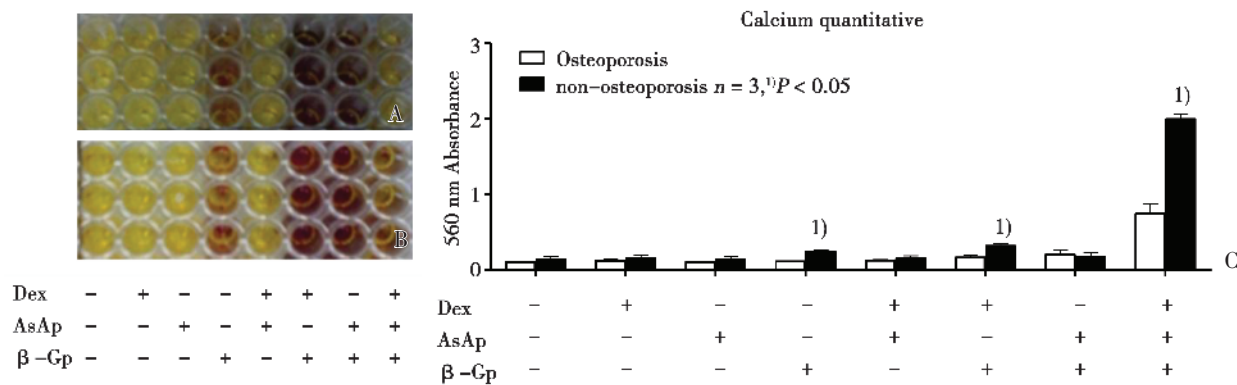


图 5 钙结节染色及定量检测

Fig.5 Alizarin Red staining results after osteogenic induction for 14 days and calcium quantitative assay

Alizarin Red staining results after osteogenic induction for 14 days (5A osteoporosis, 5B non-osteoporosis); The calcium quantitative assay showed that, in  $\beta$ -GP, Dex+ $\beta$ -GP and Dex+AsAp+ $\beta$ -GP, the osteogenic capacity was weakened in osteoporosis than in non-osteoporosis and  $t$  values were 7.479, 3.831, and 9.057 respectively;  $P$  values were 0.002, 0.019, and 0.001 respectively.

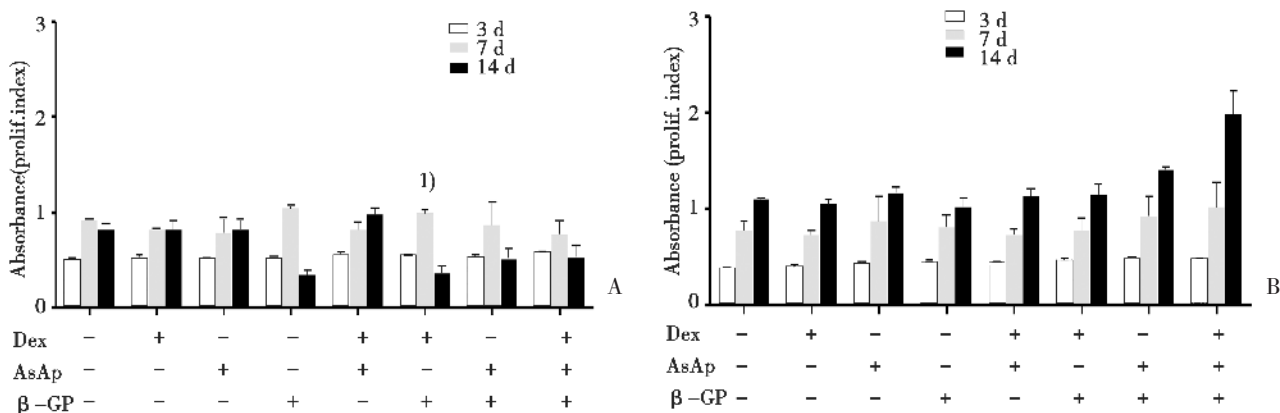


图 2 骨质疏松组与非骨质疏松组 hMSC 成骨诱导细胞增殖活性检测

Fig.2 hMSC proliferation assay after osteogenic induction in osteoporosis (Fig.2A) and non-osteoporosis group (Fig.2B)

In a 96-well plate, the absorbance of formazan product by CCK-8 kit formed at 450 nm on a microplate reader was measured as an index of proliferation (Prolif.). In both groups, the indices were increased throughout culture period, the  $F$  value was 54.789 and the  $P < 0.001$ . Moreover, compared to osteoporosis group, the indices were increased significantly in non-osteoporosis group, the  $F$  value was 16.843 and the  $P < 0.001$ .

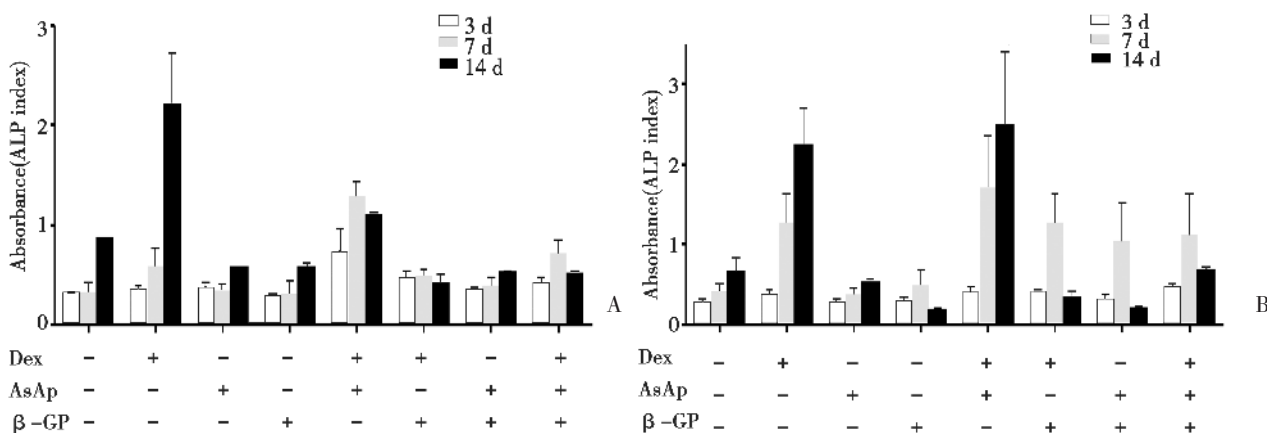


图 3 骨质疏松组与非骨质疏松组 hMSC 细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活力检测

Fig.3 Alkaline phosphatase (ALP) activity assay after osteogenic induction in osteoporosis (Fig.3A) and non-osteoporosis group (Fig.3B)

In a 96-well plate, the absorbance of  $p$ -nitrophenol product formed at 405 nm on a microplate reader was measured as an index of alkaline phosphatase (ALP) activity. It showed that there were no significant differences between the groups, the  $F$  value was 2.010 and  $P$  value was 0.157. However, the ALP activity was up-regulated in both groups, the  $F$  value was 28.048 and  $P < 0.001$ .

### 3 讨论

多向分化能力是间充质干细胞的重要生物学特征,也是干细胞研究的价值所在。临床上已有干

细胞用于关节软骨的修复与治疗<sup>[4-6]</sup>。在本实验中,应用地塞米松, $\beta$ -甘油磷酸钠和二磷酸抗坏血酸等诱导 hMSC,ALP 检测和茜素红染色均可证明其成骨分化。

在诱导成骨分化过程中,两组干细胞增殖均

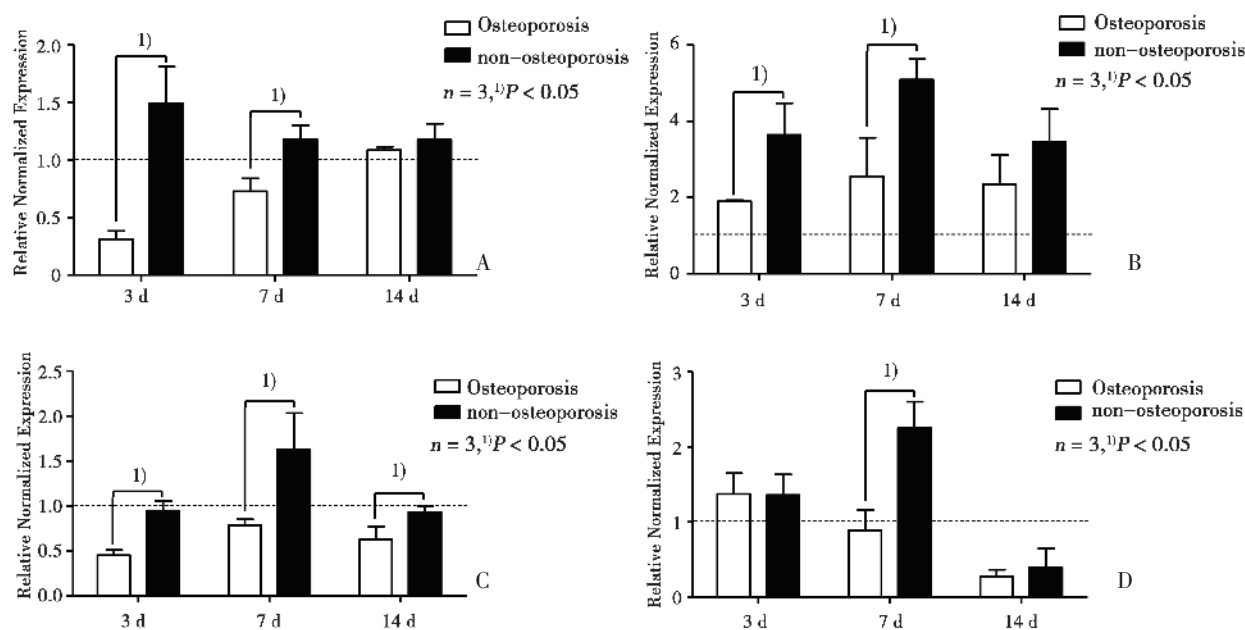


图 4 q-PCR 检测 hMSC 诱导成骨分化关键启动因子 Runx-2 及相关基因 ALP、osteocalcin(OC)、osteonectin(ON)表达检测

Fig.4 Osteogenic gene expression by q-PCR

(A) Runx-2; (B) ALP; (C) OC; (D) ON. Compared to osteoporosis group, Runx2 and ALP were up-regulated at day 3 and 7. The Runx-2 and ALP gene expression in osteoporosis and non-osteoporosis group was analyzed by independent t test, t values were 6.214, 4.72 and 4.785, 3.838, respectively, P values were 0.003, 0.009 and 0.041, 0.018 respectively. The expression of OC was up-regulated on day 3, 7, and 14, t values were 7.121, 3.574 and 3.345, P values were 0.002, 0.023 and 0.029, respectively. ON was up-regulated on day 7 and t value was 5.354, P values was 0.006.

随着时间增加而升高,且来源于骨质疏松组的细胞增殖活性较非骨质疏松组降低。这说明来源于骨质疏松组患者的干细胞增殖能力下降。ALP测定显示,随着成骨诱导时间延长,两组碱性磷酸酶含量均逐渐升高,这在 Dex 和 Dex+AsAp 组均表现明显。可能提示 Dex 与 AsAp 可诱导碱性磷酸酶的表达升高并且二者之间具有协同作用。皮质激素对骨髓间充质干细胞的成骨分化既有促进、又有抑制作用。它依赖于使用的剂量、作用的时间、细胞所处的阶段和细胞的种类,而生理浓度的糖皮质激素对于骨形成是必需的,并由维生素 C 加强<sup>[7]</sup>。骨质疏松组干细胞增殖出现下降提示其成骨分化能力受到抑制。且已有报道骨质疏松患者骨髓间充质干细胞增殖和分化能力均有下降<sup>[8]</sup>,这与本实验结果相似。

本实验中成骨基因表达定量检测显示,关键启动子 Runx2 表达水平在分化过程中均高于骨质疏松组;ALP 及成骨标志基因 osteonectin 与

osteocalcin 的表达水平也同样较骨质疏松组升高,这进一步提示:骨质疏松患者的干细胞成骨分化能力可因启动子表达水平较低而受到抑制,这可能导致成骨相关基因的表达下调。

在钙结节染色及定量检测过程中,我们发现骨质疏松组的矿化结节染色浅且定量结果偏小,在  $\beta$ -GP、Dex+ $\beta$ -GP 和成骨诱导液的作用下,钙定量结果均较非骨质疏松组低 ( $P < 0.05$ )。结合 ALP 检测结果,我们认为骨质疏松患者的干细胞成骨分化能力较非骨质疏松组减弱。而且,在实验中还观察到在含有  $\beta$ -GP 的诱导液中,均能促进钙化结节形成,而在不含  $\beta$ -GP 的诱导液中无钙染色及矿化结节形成。提示  $\beta$ -GP 对矿化结节的形成是必不可少的。其原因可能是  $\beta$ -甘油磷酸钠可释放磷酸根离子,提供骨组织在体外培养体系中发生沉淀所需的磷离子,从而促进钙盐沉积和钙化,加速矿化结节的形成<sup>[9-11]</sup>。本实验结果与以上报道相似。

随着人体自然衰老,骨量减少而骨髓中脂肪含量增加。骨髓间充质干细胞作为骨组织工程的重要种子细胞,其成骨/成脂分化与骨质疏松密切相关,而骨髓间充质干细胞在向成骨和成脂方向分化被认为是相互制约关系<sup>[12]</sup>。干细胞的分化依赖于转录因子的调控,这些转录因子活化各阶段所需的特殊基因并使其表达<sup>[13]</sup>。随着年龄增长,Runx-2 表达下降而 PPAR $\gamma$  表达增高。Runx-2 缺失型小鼠因成骨细胞分化异常而完全丧失骨化能力<sup>[14]</sup>,相反 PPAR $\gamma$  可抑制成骨而促进成脂分化<sup>[1]</sup>。推测干细胞成骨分化能力的减弱是因持续激活 PPAR $\gamma$  而抑制 Runx-2 成骨信号传递的结果。因此,结合本实验结果,骨质疏松症可能削弱患者干细胞的成骨分化潜能,且选取有骨质疏松症患者自身的骨髓间充质干细胞作为治疗的种子细胞可能并不适用于临床,但外源性的干细胞是否真正具有治疗骨质疏松的疗效仍还需要继续研究。这也为下一步研究指明了方向。

#### 参考文献

- [1] Pietschmann P, Rauner M, Sipos W, et al. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease; a mini-review [J]. *Gerontology*, 2009, 55(1): 3-12.
- [2] Siddappa R, Fernandes H, Liu J, et al. The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2007, 2(3): 209-220.
- [3] Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(6): 681-693.
- [4] Gelse K, von der Mark K, Aigner T, et al. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(2): 430-441.
- [5] Park J, Ries J, Gelse K, et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(13): 1089-1098.
- [6] Van Damme A, Chuah MK, Dell'Accio F, et al. Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats [J]. *Haemophilia*, 2003, 9(1): 94-103.
- [7] Mostafa NZ, Fitzsimmons R, Major PW, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2 [J]. *Connect Tissue Res*, 2012, 53(2): 117-131.
- [8] Rodriguez JP, Astudillo P, Rios S, et al. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2008, 3(3): 208-218.
- [9] Kotobuki N, Matsushima A, Kato Y, et al. Small interfering RNA of alkaline phosphatase inhibits matrix mineralization [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 332(2): 279-288.
- [10] Kihara T, Hirose M, Oshima A, et al. Exogenous type I collagen facilitates osteogenic differentiation and acts as a substrate for mineralization of rat marrow mesenchymal stem cells in vitro [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2006, 341(4): 1029-1035.
- [11] Chung CH, Golub EE, Forbes E, et al. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization [J]. *Calcif Tissue Int*, 1992, 51(4): 305-311.
- [12] Titorencu I, Jinga V, Constantinescu E, et al. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells [J]. *Cytotherapy*, 2007, 9(7): 682-696.
- [13] Viceda G, Francucci CM, Marcocci C. The role of PPARgamma for the osteoblastic differentiation [J]. *J Endocrinol Invest*, 2010, 33(7 Suppl): 9-12.
- [14] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747-754.

(编辑 徐杰)