

# 干细胞移植治疗骨质疏松症研究进展

姚志华 裘敏蕾 樊天佑

骨质疏松症是常见的骨代谢疾病之一,以骨密度的减少及骨微结构的退变为主要特征,导致骨骼脆性增加及易发生骨折的全身性疾病<sup>[1]</sup>。目前临床上治疗骨质疏松症主要以药物治疗为主,其作用机制为抑制骨吸收,促进骨形成,纠正异常的骨转换,从而改善骨质量,降低骨折的发生率。然而这些方法治疗费用高,治疗时间长,且存在着一定的药物不良反应<sup>[2-4]</sup>。因此,寻求更理想的治疗方法是十分必要的。

干细胞是一类具有自我更新能力的多潜能细胞,在一定条件下可以分化成多种功能细胞或组织器官,被称为“万能细胞”。近年来,越来越多的研究者希望能够通过移植干细胞促进干细胞成骨分化,从而治疗骨质疏松症。本文整理了近10年的国内外相关文献报道,对干细胞移植的可能性及其移植方法的基础研究做综述。

## 一、干细胞移植治疗骨质疏松症的可能性

目前干细胞移植治疗骨质疏松症仍处于实验研究阶段。从骨质疏松症的发病机制、干细胞的特性以及干细胞的来源等多方面研究说明:干细胞移植治疗骨质疏松症是有其可能性的。

骨质疏松症的主要发病机制:过度的骨吸收使得骨量的减少以及骨质的破坏,进而导致骨形成不足,无法更替受损骨<sup>[5]</sup>。即可认为:在年龄或病理性环境的影响下,骨形成和骨吸收之间存在的不平衡导致骨质疏松<sup>[6]</sup>。在骨的重塑过程中涉及到两种关键细胞:成骨细胞和破骨细胞<sup>[7]</sup>。成骨细胞数量减少或活性降低,以及破骨细胞数量增加或活性增强是发病的根本原因<sup>[8]</sup>,而其中的核心因素是成骨细胞的不足<sup>[9]</sup>。根据该病的发病机制,若能够通过某种治疗增加成骨细胞的数量,那么理论上讲,便能够达到治愈骨质疏松症的目的。

干细胞是一类具有多潜能特性的细胞,在特定的诱导条件下能向多种细胞系分化,其中常用于治疗骨

质疏松的干细胞有脂源性干细胞、皮肤间充质干细胞及骨髓间充质干细胞等。其均可诱导分化为新生骨骼所需的各种功能细胞,如骨祖细胞、成骨细胞等,在骨形成和修复中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

自体的或外源性间充质干细胞在多种因素的作用下定向、趋向性迁移至靶向组织并定植的过程,谓之“归巢”。有研究表明,干细胞在趋化因子家族及其受体的操控下,先动员和迁移,随后间充质干细胞像白细胞一样黏附于血管内皮之中,最后间充质干细胞则从黏附的内皮组织中跨内皮游出,并进入靶向组织中<sup>[11]</sup>。因此,干细胞通过静脉注射后,由于这一特性,可在一定的条件下定植于预期部位,从而发挥作用。

干细胞的来源丰富,尤其是骨髓间充质干细胞及脂源性干细胞,其获取并不困难。骨髓间充质干细胞主要来源于骨髓,可表达成骨因子和血管生长因子,其有助于成骨分化。近几年来在骨组织工程中作为极佳的种子细胞选择之一备受青睐<sup>[12]</sup>。Zuk等<sup>[13]</sup>则发现脂源性干细胞很容易从人体的脂肪组织中获得,并且在一定的条件下可以分化为骨、软骨等细胞。此外,其他组织中也存在丰富的干细胞。皮肤组织中除了表皮干细胞存在外,还含有大量的间充质干细胞<sup>[14]</sup>。近来更有人发现输卵管间充质干细胞成骨分化,其在手术中能够大量获得<sup>[15]</sup>。

综上所述,干细胞移植作为骨质疏松症的一种治疗手段,不仅能从根本上改善病情,直接或间接增加成骨细胞的数量,而且其来源丰富,获取途径并不十分困难。由于骨髓间充质干细胞易于分离、增殖,具有多向分化潜能及“归巢”的特性,故成为骨组织修复和相关疾病细胞治疗的首选材料<sup>[16-18]</sup>。因此,应用干细胞移植治疗骨质疏松症是极具优势及潜在可能性的。

## 二、干细胞移植治疗骨质疏松症可能的方法

目前,干细胞移植治疗骨质疏松症可能的方法有:干细胞直接移植、修饰后干细胞移植、体外诱导干细胞分化后移植。

作者单位:200071 上海中医药大学附属市中医医院

通讯作者:樊天佑,主任医师,硕士生导师,电子信箱:fantiany-ou365@hotmail.com

## 1. 干细胞直接移植

(1)骨髓间充质干细胞直接移植:骨髓间充质干细胞直接移植是通过直接增加干细胞的数量,利用其成骨的特性,从而增加成骨细胞的数量,以达到治疗目的。Ocarino等<sup>[19]</sup>将健康大鼠体内的骨髓间充质干细胞注入卵巢切除引导的骨质疏松症的大鼠的股骨,2个月后通过组织形态学检测发现大鼠股骨的骨量明显得到改善,结果表明骨髓间充质干细胞对于骨质疏松症的治愈非常重要。吴礼凤等<sup>[20]</sup>通过尾吊模拟失重的方法建立骨质疏松症的大鼠模型,同时予双侧胫骨骨髓腔注射成骨诱导的同种异体骨髓间充质干细胞后,发现治疗组相比对照组胫骨骨密度、骨小梁面积百分比、骨小梁数量和厚度均显著增加( $P < 0.01$ ),骨小梁分离度显著降低( $P < 0.01$ )。说明骨髓腔注射干细胞能够增加大鼠骨密度,改善骨超微结构,减少骨量丢失,有效防治骨质疏松症。Shen等<sup>[21]</sup>将18~24个月大的雌性Balb/c小鼠通过X线24h照射,消除宿主骨髓干细胞,然后从增强绿色荧光蛋白转基因的雄性C57BL/6和Balb/c小鼠中分离取得骨髓间充质干细胞,并将其静脉注入以上雌性Balb/c小鼠中( $1 \times 10^6$ 个细胞/只)。随后每2~3周检测股骨头关节的骨密度。结果发现对照组相比治疗组具出更高的骨密度,并且移植了年轻的骨髓间充质干细胞相比移植了衰老的骨髓间充质干细胞,骨密度更高。另外,移植了年轻的骨髓间充质干细胞的小鼠具有更长的寿命( $P = 0.009$ )。这表明骨髓间充质干细胞移植可恢复老年雌鼠的骨密度,并且使得老年雌鼠寿命更长。

(2)脂肪源干细胞移植:早些研究显示脂肪源干细胞与骨髓间充质干细胞具有相似的表型,这表明其同样具有分化为成骨细胞的能力<sup>[22]</sup>。陶晖等通过尾静脉给予治疗组大鼠植入脂肪源干细胞,4周后取材观察发现治疗组大鼠的腰椎和股骨骨密度均有显著升高( $P < 0.05$ ),而骨组织形态学显示,骨小梁的数目增多,且变厚变粗,骨小梁间出现连接,陷窝减少,这说明脂肪源干细胞能明显改善骨质疏松。Cho等将人体脂肪源干细胞移植治疗卵巢切除诱导的骨质流失的裸鼠,相比仅仅通过雌激素及磷酸盐治疗的裸鼠,干细胞移植治疗组血清骨钙素升高( $P < 0.05$ ),这表明脂肪源干细胞能防止骨质流失。

(3)输卵管间充质干细胞(htMSCs)移植:以往的研究发现,人类的htMSCs在体外显示出明显的成骨分化能力,但移植体内后其成骨分化能力还未可知。

近年来,少数研究者正进行着相关的研究。

Jazedje等<sup>[15]</sup>从5位30~50岁接受子宫切除术或输卵管结扎术/切除术的妇女中获取输卵管样本。手术前的24h准备含有htMSCs的CellCeram板架(一种嵌入式生物吸收的陶瓷细胞培养板架,包含60%的羟基磷灰石和40%的磷酸三钙)。动物模型选取7只NIS Wistar鼠(3个月大、每只体重在320~420g)。先将大鼠置于头颅架中。切口从鼻额区域至枕骨隆突区域,使得颅骨充分暴露。在颅骨两边对称部位,用微电钻钻出直径4.5mm的全厚层颅骨缺损部分,硬膜保存完整。6只大鼠的左侧以空白CellCeram板架覆盖,右侧以含有htMSCs的CellCeram板架( $10^6$ 个/支架)覆盖。分别于术后的第30、60、90天后处以安乐死,对颅骨组织标本进行组织形态学分析。结果发现:对照一侧的大鼠颅骨中未观察到无自发生长的骨组织,有htMSCs的一侧观察到成熟的骨细胞,并且PCR及免疫荧光分析确定有人类DNA的存在,且无排斥。这表明htMSCs能促进成骨,并进一步支持htMSCs的免疫调节功能。最后得出结论,htMSCs能应用于增加体内骨的再生,为干细胞治疗骨质疏松症提供潜在可能。

干细胞的直接移植简单、方便,且可行性强,仅仅通过将提取的健康主体的干细胞注入到治疗部位或静脉给药,即可达到治疗的目的。目前对于单纯的干细胞移植不局限于常见的干细胞种类,更扩展到了输卵管等器官中所含有的间充质干细胞。这为干细胞的直接移植提供更广的来源。但是,干细胞移植尽管在短时间内改善骨质疏松症的症状,但由于其受到数量等多种因素影响,实际治疗效果有限。因此,为了提高体外增殖能力,增加移植数量,增强成骨分化能力,许多研究者希望通过对干细胞的基因修饰达到增强治疗效果的目的。

2. 基因修饰后的干细胞移植:基因修饰后的干细胞移植是通过增强或抑制干细胞中的某一基因片段,抑制其成脂分化或促进其成骨分化,使得移植的干细胞更容易成骨分化,进而治疗骨质疏松症。

Li等则通过用Lentivirus载体,将抑制锌指467的脂肪源干细胞注入DDY鼠后,发现锌指467被抑制的组别相对于仅仅脂肪源干细胞直接移植的组别,在 $\mu$ CT影像上显示出其骨量丢失明显受到限制( $P < 0.01$ )。Dmitriy等从豚鼠中分离出脂肪源干细胞,慢病毒为载体,在启动因子作用下编码为萤光素酶报告基因。通过此载体标记脂肪源干细胞,然后用骨形成

蛋白-6 编码质粒进行核转染。18 只裸鼠通过手术制造尾椎骨空洞模型。在实验组裸鼠的空洞中注入混有转染后脂肪源干细胞的纤维蛋白胶,对照组仅注入纤维蛋白胶。裸鼠在 12 周内自由活动,利用 Micro-CT 观察骨再生过程,以及组织特定的报告基因和生物发光成像技术观察干细胞分化情况。结果显示在 12 周期间,裸鼠移植处存在荧光素酶表达的细胞,术后 2 周实验组的大量空洞缺陷被修复,且实验组中的干细胞的骨形成速率为对照组的 2 倍,骨量是对照组的 2 倍。12 周后空洞内的骨量与周围正常椎体的骨量相近。免疫组化染色提示转染后的脂肪源干细胞促进新骨的形成,进而得出结论,BMP 修饰后的脂肪源干细胞能够为骨质疏松症提供新的治疗方法。

端粒酶反转录酶可以延长细胞寿命,增强细胞增殖能力。Saeed 等将小鼠的 *terc* 基因敲除。32 周后发现,其总骨矿物质含量和总骨密度分别下降 13% 和 23%,基因敲除的小鼠骨髓间充质干细胞和成骨细胞的成骨能力显著降低,这直接导致骨量的丢失,进而发生骨质疏松。这一现象表明端粒酶活化的间充质干细胞或许是一种新的治疗骨质疏松症的移植方法。大量基因修饰后干细胞移植的实验结果显示,此类方法能够有效改善骨质疏松症中成骨细胞数量不足的问题。而 Li 等的实验显示,基因修饰后的干细胞移植相比干细胞直接移植,确实能够在一定程度上缓解因数量有限所引起的不足。但是基因修饰后的干细胞属性发生一定地变化,故其移植的安全性有待进一步研究。

3. 体外诱导干细胞分化后移植:这是一种近来逐渐为研究者感兴趣的干细胞移植方法。即将取得的干细胞在体外相关诱导液的诱导培养后,再植入对象体内。这类方法既能够弥补干细胞直接移植所需考虑的数量不足的问题,也能够避免基因修饰后移植带来的繁琐不便。最重要的是,诱导分化后的干细胞移植相对基因修饰后的干细胞移植更安全。

Orawan 等将置于成骨培养基中的脂肪源干细胞通过芝麻素或不通过芝麻素治疗 21 天后,使用茜素红染色和蛋白质印迹法观察信号通路。结果发现芝麻素激活了 hFOB1.19 中磷酸化的 p38 和 ERK1/2,并且提高了 hFOB1.19 中 COL<sub>1</sub>、ALP、OCN、BMP<sub>2</sub> 和 Runx2 的基因表达。从而得出结论,芝麻素通过激活 p38 和 ERK1/2 信号通路,并极有可能通过调节成骨细胞中 OPG 和 RANKL 的表达,直接调节破骨细胞的发育。

许应星等通过体外分离培养去势雌性大鼠的骨髓间充质干细胞,分别在成骨诱导和脂肪诱导下连续培养 15 天,并在此基础上添加剂量为 10 $\mu$ g/ml 的淫羊藿总黄酮,结果发现淫羊藿总黄酮能显著增加骨髓间充质干细胞 ALP 的表达,以及成骨早期分化因子 Runx2mRNA 的表达,显著下调骨髓间充质干细胞中脂肪形成关键基因 PPAR $\gamma$ -2mRNA 的表达,从而抑制脂滴的形成。并且进一步发现在成骨诱导条件下,EFs 呈时间依赖性下调 DKK1 的表达;在成脂诱导条件下,EFs 呈时间依赖性抑制 DKK1 蛋白的上调。这表明通过抑制 DKK1 蛋白的表达调控去势雌性大鼠 BMSCs 向成骨分化或许是淫羊藿治疗骨质疏松症的机制之一。

## 五、展 望

干细胞移植是一项新型的治疗手段,具有独特的优势。干细胞能够成骨分化,且来源丰富,获取方便,因此研究者希望将干细胞移植技术引入到骨质疏松症治疗中。随着再生医学的发展,目前干细胞基础研究已取得了一定的进展。干细胞移植主要有直接移植、基因修饰后移植以及体外诱导分化等。干细胞的直接移植方法简单,但数量有限,基因修饰后的移植能够一定程度上弥补这一不足。这两种方法目前研究较多,比诱导分化方面的研究更为成熟。而体外诱导干细胞分化是目前的研究热点,它既简化了基因修饰这一过程的繁琐,又能弥补直接移植的不足。当然,无论哪种干细胞移植途径,其治疗骨质疏松症的机制均是直接或间接促进成骨分化,增加成骨细胞数量,抑制破骨分化,改善骨代谢,从而从根本上治疗骨质疏松症。

但是在临床上应用干细胞移植治疗还存在许多问题有待解决:①干细胞的分离获取、基因修饰、诱导分化等的最佳时机及环境有待完善;②干细胞移植包括同种自体移植、同种异体移植、异种异体移植等。这些不同的干细胞来源是否存在移植后体内排斥仍未可知<sup>[10]</sup>;③基因修饰后的干细胞移植需避免机体内被其他组织清除的可能以及其移植的安全性等问题;④干细胞移植还涉及伦理问题<sup>[21]</sup>。因此,干细胞移植治疗骨质疏松症虽然应用前景广阔,但仍需做进一步的深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 Vidica C, Mederle O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis[J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(3):1113 - 1119

- 2 Kumar S, Mahendra G, Nagy TR, *et al.* Osteogenic differentiation of recombinant adeno - associated virus 2 - transduced murine mesenchymal stem cells and development of an immunocompetent mouse model for ex vivo osteoporosis gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15 (12) : 1197 - 1206
- 3 Lewiecki EM. Treatment of osteoporosis with denosumab [J]. *Maturitas*, 2010, 66: 182 - 186
- 4 Ominsky MS, Vlasseros F, Jollette J, *et al.* Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25: 948 - 959
- 5 Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (12) : 3318 - 3325
- 6 Hill PA. Bone remodelling [J]. *British Journal of Orthodontics*, 1998, 25 (2) : 101 - 107
- 7 Manolagas SC, Jilka RL. Mechanisms of disease: bone marrow, cytokines, and bone remodeling - emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis [J]. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 332 (5) : 305 - 311
- 8 Zhang H, Recker R, Xiao G, *et al.* Proteomics in bone research [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2010, 7 (1) : 103 - 111
- 9 Cho SW, Sun HJ, Yang JY, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK - Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice [J]. *Mol Ther*, 2009, 17 (11) : 1979 - 1987
- 10 张杰, 田京. 药物靶向、分子靶向、激素靶向及干细胞靶向与骨质疏松症的治疗 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (34) : 6382 - 6388
- 11 Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF - 1 $\alpha$ /CXCR4 - mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model [J]. *Brain Res*, 2008, 1195: 104 - 112
- 12 Kumar S, Wan C, Ramaswamy G, *et al.* Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect [J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (5) : 1026 - 1034
- 13 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell - based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7: 211 - 228
- 14 Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow - derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization [J]. *Br J Haematol*, 2003, 123 (4) : 702 - 711
- 15 Jazedje, T., Daniela F., Bruno V. P., *et al.* Human fallopian tube mesenchymal stromal cells enhance bone regeneration in a xenotransplanted model [J]. *Stem Cell*, 2012, 8: 355 - 362
- 16 Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, *et al.* Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211: 121 - 130
- 17 Gimeno MJ, Maneiro E, Rendal E, *et al.* Cell therapy: a therapeutic alternative to treat focal cartilage lesions [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37: 4080 - 4083
- 18 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418: 41 - 49
- 19 Ocarino Ndo, Boeloni JN, Jorgetti V, *et al.* Intra - bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats [J]. *Connect Tissue Res*, 2010, 51 (6) : 426 - 433
- 20 吴礼凤, 孙平, 麦燕兴, 等. 骨髓腔注射骨髓间充质干细胞防治模拟失重大鼠的骨质疏松 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (19) : 3511 - 3514
- 21 Shen, J, Tsai, Y, DiMarco, N, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice [J]. *Scientific Reports*, 2011, 10: 1 - 7
- 22 Levi B, Longaker MT. Concise review: adipose Derived Stromal Cells for Skeletal Regenerative Medicine [J]. *Stem Cells*, 2011, 29 (4) : 576 - 582

(收稿日期: 2013 - 03 - 19)

(修回日期: 2013 - 05 - 06)

(上接第 133 页)

## 参考文献

- 1 曹龙, 沈为林. 腕管综合征患者肌电图检查结果分析 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21 (11) : 1191 - 1192
- 2 麦训良. 84 例腕管综合征患者的神经电生理分析 [J]. *临床神经电生理学杂志*, 2009, 18 (3) : 178 - 179
- 3 叶爱萍, 刘辉. 50 例腕管综合征患者的电生理检测 [J]. *中国康复*, 2005, 20 (2) : 102
- 4 安梅. 神经肌电图对腕管综合征的诊断意义分析 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26 (1) : 45 - 46
- 5 汤晓芙. 腕管综合征 (CTS) 的电生理诊断要点 (译自 1999 年 AAEM AAN, AAPMR 的资料) [J]. *临床神经电生理学杂志*, 2003, 12 (01) : 55 - 56
- 6 Bonfiglioli R, Botter A, Calabrese M, *et al.* Surface electromyography features in manual workers affected by carpal tunnel syndrome [J]. *Muscle Nerve*, 2012, 45 (6) : 873 - 882
- 7 王汛, 邵蓓, 倪佩琦. 104 例腕管综合征患者的临床表现与神经电生理相关分析 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2006, 9 (01) : 28 - 29
- 8 姚正鹏, 袁良津, 陈祚胜, 等. 45 例腕管综合征的神经电生理与临床分析 [J]. *安徽医药*, 2010, 14 (9) : 1045 - 1046
- 9 Rainoldi A, Gazzoni M, Casale R. Surface EMG signal alterations in Carpal Tunnel syndrome: a pilot study [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2008, 103 (2) : 233 - 242
- 10 倪雅凤. 48 例腕管综合征患者的神经电生理与临床分析 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2007, 10 (2) : 36 - 37
- 11 Deniz FE, Oksuz E, Sarikaya B, *et al.* Comparison of the diagnostic utility of electromyography, ultrasonography, computed tomography, and magnetic resonance imaging in idiopathic carpal tunnel syndrome determined by clinical findings [J]. *Neurosurgery*, 2012, 70 (3) : 610 - 616

(收稿日期: 2013 - 04 - 16)

(修回日期: 2013 - 05 - 03)