

羊水干细胞治疗维甲酸诱导的大鼠骨质疏松的初步研究

白璐 陈必良[△] 张建芳 李洁 张琳琳

(第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 维甲酸(ratinoicacid)诱导雌性大鼠骨质疏松(Ostoporosis, OP)模型, 观察并分析羊水干细胞(amniotic fluid-derived stem cells, AFS)对 OP 的治疗作用。方法: 选取 40 只 SD 雌性大鼠, 随机分为 4 组, 每组 10 只。除正常组(A 组)外, 模型组(B 组), 一次注入 AFS 组(C 组)和两次注入 AFS 组(D 组)均用维甲酸 70 mg / (kg·d) 连续灌胃 14 d, A 组用等量灭菌注射用水灌胃。于给药二、三周分别测量各组大鼠血清 Ca、Pi、碱性磷酸酶 ALP 和抗酒石酸酸性磷酸酶 TRACP 含量, 制造模型(简称造模)过程观察动物生活习性体重等变化, 实验结束进行股骨骨形态计量学测量, 骨薄片病理学观察。结果: 造模过程中, 大鼠出现少食、竖毛、及体重减轻。B、C 组大鼠体重较正常组显著降低($P<0.05$)。造模 21d 后, B 组血清 Ca^{2+} 水平显著升高。模型组骨密度较正常组显著下降($P<0.05$), 但 D 组骨密度变化无明显统计学意义。B、C、D 组血清 ALP、TRACP 均明显高于正常组($P<0.05$)。骨薄片染色显示模型组骨胶原排列杂乱无序, 结构松散, D 组有修复迹象。结论: 羊水干细胞尾静脉注射可缓解维甲酸诱导的大鼠骨质疏松, 且两次给药的治疗效果好于单次给药。

关键词: 骨质疏松; 羊水干细胞; 维甲酸

中图分类号: Q95-33, R711 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)11-2049-04

Primary Study on the Effect of AFS in Ratinoicacid-Induced Osteoporosis in Rat

BAI Lu, CHEN Bi-liang[△], ZHANG Jian-fang, LI Jie, ZHANG Lin-lin

(Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital of The Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the therapeutic effect of amniotic fluid-derived stem cells (AFS) on ratinoicacid (RA) induced Osteoporosis. **Methods:** Forty SD female rat were divided randomly into four groups: control group (group A), model group (group B), RA+AFS(once) group(group C), RA+AFS(twice) group(group D). Model group and treatment groups were administrated RA q.d intra-gastrically to induce OP, with control group administrated with equal volume of normal saline instead. Group C were injected with AFS through caudal vein on the 7th, 14th day after first RA administration, while Group D were injected on the 14th day. On the 2nd and 3rd week of the experiment, the peripheral blood was obtained to quantify Ca^{2+} , P, ALP and TRACP. At the end of the experient, the measurement of femur morphometry was carried out, then the rat were sacrificed and the femur were harvested for immunohistochemical staining and pathological examination. **Results:** The body weight of group C and group D were decreased markedly ($P<0.05$, vs group A). The concentration of Ca^{2+} were increased apparently ($P<0.05$, vs group A) and the bone density of group B was lower than group A($P<0.05$), while there was no difference statistically in group D. The concentration of ALP, TRACP were much higher in model group and treatment groups than in group A. Examination of femur showed osseous collagen were deranged and surface loosening. Meanwhile, there was indication of repair in group D. **Conclusion:** RA-induced Osteoporosis can be relieved by injecting with AFS through caudal vein, and the prognosis of single injection was better than that of double.

Key words: Osteoporosis; Amniotic fluid-derived stem cells; Ratinoicacid

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R711 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2049-04

前言

随着人口老龄化,骨质疏松(Ostoporosis, OP)发病率呈上升趋势,以绝经后妇女为主。研究人员认为雌激素水平下降是绝经后女性骨质疏松发生的重要因素。维甲酸在临床上有致骨质疏松的副作用,对雌激素的骨反应上与人类有较好的相似性^[1-3],常用作制备 OP 动物模型,因此也被用于 OP 治疗药物的

研究。羊水干细胞(amniotic fluid-derived stem cells, AFS)与其它干细胞相比存在诸多优势,具有多种定向分化能力^[4-7],它可能成为新的种子细胞来源之一,在细胞治疗及组织工程研究中具有广阔的应用前景^[8-10]。

1 材料和方法

1.1 主要材料及仪器

羊水干细胞(第四军医大学妇产科实验室), T104 培养基, 胎牛血清, 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司, 地塞米松(美国 Sigma 公司), 倒置显微镜(Olympus 公司, 美国), CO_2 细胞培养孵箱, 超净工作台(苏州净化总厂), 双能 x 线骨密度仪(德

作者简介:白璐(1984-),女,硕士研究生,主要从事围生医学与优生优育的研究。电话:15829721189 E-mail:bailu2232009262@163.com

[△]通讯作者:陈必良 教授

(收稿日期:2012-01-06 接受日期:2012-01-30)

国) 维甲酸(美国 Sigma 公司) 临用前用蒸馏水配成 70 mg/kg 的混悬溶液, 4℃, 避光保存。Ca、Pi、碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松大鼠模型的制备 选取 3 月龄 SD 大鼠共 40 只 (SPF 级 第四军医大学实验动物中心提供) 体重 250-280g 大鼠随机分成 4 组(10 只每组) :A. 空白对照(Control ,CON) 组、B. 维甲酸(RA)灌胃组、C. 维甲酸(RA)灌胃 + 二次尾静脉注入 AFS 组 D. 维甲酸(RA)灌胃 + 一次尾静脉注入 AFS 组。A 组灌胃给予等量灭菌注射用水对照, 其它 3 组上午用维甲酸 70 mg·kg/d 灌胃造模, C 组分别于造模第 7 天与第 14 尾静脉注入 AFS, 剂量均为 1×10^6 个/ml, D 组于造模第 14 天尾静脉注入 AFS, 剂量为 2×10^6 个/ml。

1.2.2 实验期间观察动物生活习性 & 体重变化 实验终止后一周, 用 1% 戊巴比妥钠 30mg/kg 行腹腔注射麻醉后, 腹主动脉抽血处死, 分离血清, 测定血液生化学指标。迅速取下右侧股骨, 剔除股骨上面残存的肌肉, 称重, 用双能 x 线骨密度仪测定骨矿物质密度值 (BMD), 游标卡尺测量记录试验后股骨中点横断面的外直径 (B), 并进行骨薄片 Masson-Goldner-Trichrome 染色。

2 结果

2.1 RA 及 AFS 对大鼠生活习性 & 体重的影响

连续 14 天造模和给药过程中, 大鼠陆续出现不同程度少食、竖毛、喜卧及体重减轻, 未出现维甲酸中毒症状。实验结束时 B、C 组大鼠体重与实验前显著降低 ($P < 0.05$) , D 组体重差异无统计学意义, 如表 1 (Table 1) 所示。

表 1 不同时间各组大鼠体重

Table 1 The weight of each group in different times

Group	Body weight (g)			
	1d	7d	14d	21d
A	259.5± 7.9	264.3± 3.6	270.8± 5.3	277.1± 4.8
B	274.3± 5.6	267.0± 3.6	259.8± 4.4	258.2± 6.3*
C	271.1± 3.2	262.9± 5.3	258.3± 5.2	255.6± 7.5*
D	266.0± 6.9	261± 3.9	264± 10.8	265± 5.4

Note: * $P < 0.05$ vs 1d

2.2 RA 及 AFS 对大鼠股骨物理指标的影响

实验结束时, 与 A 组相比, B、C 组大鼠股骨物理指标 (横断面的外径 B、湿重 W) 均降低 ($P < 0.05$) , D 组无显著性差异, 如

表 2 (Table 2)。B、C 组大鼠股骨中点的骨密度较自身实验前均下降 ($P < 0.05$)。D 组大鼠股骨物理指标及股骨中点的骨密度变化较实验前无统计学意义 ($P > 0.05$) , 如表 3 (Table 3) 所示。

表 2 实验结束各组大鼠股骨湿重和外径结果

Table 2 The result of weight and diameter in each group rats after the experiment

Group	B(mm)	W(g)
A	3.87± 0.20	0.95± 0.06
B	3.29± 0.4*	0.60± 0.03*
C	3.33± 0.28*	0.64± 0.11*
D	3.67± 0.32	0.78± 0.04

Note: * $P < 0.05$ vs 1d

表 3 实验结束各组大鼠股骨骨密度结果

Table 3 The result of Bone mineral density in each group rats after the experiment

Group	A(g·cm ⁻²)	B(g·cm ⁻²)	C(g·cm ⁻²)	D(g·cm ⁻²)
实验前 (Before the experiment)	0.256± 0.008	0.266± 0.009	0.256± 0.002	0.261± 0.011
实验后 (After the experiment)	0.251± 0.016	0.213± 0.007*	0.229± 0.012*	0.254± 0.018

注: * $P < 0.05$ vs 实验前

Note: * $P < 0.05$ vs Before the experiment

2.3 RA 及 AFS 对大鼠血生化指标的影响

与 A 相比, 实验第三周结束时, B、C 组血 Ca 含量显著升高 ($P < 0.05$) , D 组升高不明显 ($P > 0.05$) , 如表 4 (Table 4) 所示。血 Pi 各组前后变化无统计学意义。碱性磷酸酶 ALP (金氏单位

/100ml) 抗酒石酸酸性磷酸酶 TRACP(U/L)测定结果显示, B、C、D 组含量均升高, 与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.05$) , 如表 5、6 (Table 5, 6) 所示。

表 4 不同时间各组血钙含量
Table 4 The result of blood calcium in each group rats in different times

Group	Ca ²⁺ (mmol/L)		
	1 w	2 w	3 w
A	1.32± 0.09	1.35± 0.12	1.33± 0.07
B	1.54± 0.10	1.91± 0.15	2.26± 0.05*
C	1.49± 0.24	1.75± 0.16	1.93± 0.15*
D	1.43± 0.14	1.49± 0.04	1.47± 0.09*

Note: * P<0.05 vs A

表 5 不同时间各组血磷含量
Table 5 The result of blood phosphorus in each group rats in different times

Group	ALP(金氏单位/100m ^l)		
	1 w	2 w	3 w
A	43.48± 0.91	45.51± 0.67	49.96± 1.25
B	48.96± 0.58	73.57± 1.15	102.36± 1.20*
C	47.52± 0.96	76.99± 1.02	91.25± 0.87*
D	49.68± 0.59	82.31± 1.38	88.19± 0.18*

Note: * P<0.05 vs A

表 6 不同时间各组抗酒石酸酸性磷酸酶 TRACP 含量
Table 6 The result of TRACP in each group rats in different times

Group	TRACP(U/L)		
	1 w	2 w	3 w
A	8.36± 0.36	8.29± 0.78	8.45± 0.52
B	8.25± 0.98	14.29± 0.93	26.38± 0.16*
C	8.29± 0.49	11.68± 0.65	22.32± 0.36*
D	8.28± 0.29	12.08± 0.38	19.09± 0.22*

Note: * P<0.05 vs A

2.4 RA 及 AFS 对大鼠骨密度的影响
实验结束后，通过检测骨密度发现 B 组与 C 组骨密度实

验前后差异具有统计学意义 (P<0.05) D 组变化不明显 ,如 Table 7 所示。

表 7 实验结束各组大鼠股骨骨密度结果
Table 7 The result of Bone mineral density in each group rats after the experiment

Group	A(g.cm ⁻²)	B(g.cm ⁻²)	C(g.cm ⁻²)	D(g.cm ⁻²)
实验前(Before the experiment)	0.256± 0.008	0.257± 0.002	0.266± 0.009	0.261± 0.011
实验后(After the experiment)	0.251± 0.016	0.209± 0.012*	0.213± 0.007 [#]	0.254± 0.018

Note: * P<0.05 vs A

2.5 骨组织 Masson-Goldner-Trichrome 染色
骨组织取 5μm 骨薄片进行 Masson-Goldner-Trichrome 染色 ,结果显示 :A 组可见骨胶原纤维排列呈束状 ,走向一致 ,排列规则紧密 ,B,C 两组纤维排列杂乱无序 ,结构松散。D 组可见部分胶原排列恢复到与 A 组骨胶原相似的形态和排列 ,说明二次注入 AFS 对骨质疏松具有潜在治疗作用。

2.6 统计学方法
应用 SPSS 13.0 统计软件 ,组间差异用 T 检验 ,P<0.05 说明有统计学意义。

3 讨论
骨质疏松症是一种全身性的以骨量减少及骨组织微结构

破坏为特征,骨矿物质密度减小的疾病。羊水干细胞具有定向分化潜能,在不同诱导条件下可向多方向诱导,成骨细胞、软骨

细胞、心肌细胞、神经胶质细胞等。由其分化而来的成骨细胞在骨质疏松症等骨骼疾病的发生、发展中起着重要作用。

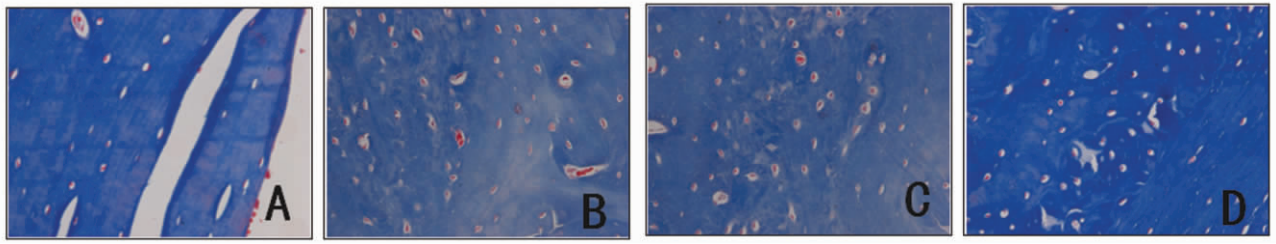


图1 骨组织 Masson-Goldner-Trichrome 染色(400×)。

注:A为正常骨纤维 B为单纯应用维甲酸处理后的骨纤维 C为维甲酸联合药物一次处理后 D为维甲酸联合药物处理2次

Fig.1 Masson-Goldner-Trichrome of femur of a rat.

Note: Bone fibre of control group(group A), Bone fibre of model group(group B), Bone fibre of RA+AFS(once) group(group C), Bone fibre of RA+AFS(twice) group(group D)

维甲酸是维生素A的衍生物,是治疗白血病的药物,并与维生素A具有相似的药理作用,主要用于皮肤疾病的治疗,其最大副作用是骨质疏松。维甲酸所导致的骨质疏松动物模型最早由邵金莺等于在1989年首创。此模型虽然病因上与人类骨质疏松不同,但与人类在对雌激素的骨反应、发病症状及组织形态学表现上极为相似,且操作简单,成功率高,时间短,对于动物骨量减少,骨组织显微结构病理改变非常典型,是动物骨质疏松的常用造模方法^[11,12]。

本实验显示,维甲酸组大鼠血Ca显著高于正常组,而血Pi两组无差异,提示维甲酸导致骨质疏松并非影响钙磷平衡而是直接影响钙盐沉积过程。C组大鼠血Ca高于正常组,D组血Ca较正常组无统计学差异,说明一次性注入AFS对骨质疏松症状的改善效果不明显,二次注入AFS对其有潜在治疗作用。

血清ALP活性是成骨细胞分化成熟的重要标志之一,在钙化中起着关键性作用。血清TRACP反应骨吸收指标。本实验结果显示,维甲酸对两者均有促进作用,且后者作用大于前者,表明骨吸收和骨形成都比较活跃,说明维甲酸增加成骨细胞的数量和活性,但主要是激活破骨细胞使其活性增强促进骨吸收,结果使骨吸收大于骨形成的状态,最终导致动物的骨质疏松。

大鼠股骨的物理变化可以从整体上反应大鼠股骨的状况是否良好。表二显示,维甲酸导致大鼠股骨的绝对重量变轻($P<0.05$),从而表现为动物体重下降。在大鼠的股骨的直径方面,大鼠股骨中点附近的横断面长轴的外径(B)明显下降,结果提示维甲酸可以导致大鼠股骨的外观性状发生变化,使其变轻,变窄,容易导致骨折的发生。D组大鼠股骨的湿重和股骨中点附近的横断面长轴的外径(B)均与正常组无统计学差异,说明尾静脉两次注入羊水干细胞对大鼠骨质疏松具有潜在治疗作用,且作用大于一次性注入羊水干细胞。

骨密度即骨矿物质密度的简称,其含义是指单位骨组织体积的骨量,骨密度常用于评定骨脆性和骨折发生的危险性。本次实验选取了股骨中点作为骨密度的检测点。由表三结果可见,与正常组比较,B组大鼠股骨中点的骨密度明显降低($P<0$ 。

05)提示骨质疏松模型构建成功。D组与正常组比较骨密度差异无统计学意义,表明二次注入羊水干细胞对骨质疏松临床症状具有缓解作用,从而减少骨折等疾病的发生。

骨薄片 Masson-Goldner-Trichrome 染色显示,维甲酸组较正常组大鼠股骨胶原排列杂乱无序,结构松散,D组胶原结构较维甲酸组有所好转,说明羊水干细胞在动物体内对骨质疏松具有潜在修复作用。

综上所述,大量研究表明^[13-15],超过50岁人群中骨质疏松发病率为90%,女性占大多数。骨量丢失随绝经期到来而开始,随着年龄增长,骨细胞上的雌激素受体减少和绝经后体内雌激素水平降低两个因素的影响,可以部分解释绝经后妇女骨质疏松症发生率骤升的现象^[16]。骨质疏松的治疗药物有几种:双磷酸盐类、钙类、雌激素类药物、降钙素类、SERMs等,这些药物治疗骨质疏松的疗效不等,可以不同程度的延缓骨质疏松的发生。但是绝经后妇女雌激素水平下降导致的骨质疏松症状明显,许多绝经期妇女需要使用雌激素类药物进行激素替代治疗(HRT)^[17]。羊水干细胞因其诸多优势引起越来越多科学界关注^[18,19],它可能成为新的种子细胞来源之一,在细胞治疗及组织工程研究中具有广阔的应用前景。本实验为其在治疗骨质疏松方面提供实验依据,证明AFS静脉注射移植方式的可行性及潜在修复功能。

参考文献(References)

- [1] 杨迺嘉,霍昕.健骨灵胶囊对维甲酸所致骨质疏松大鼠骨形态与骨代谢的影响[J].中国新药杂志,2008,17(14):1229-1232
Yang Nai-jia, Hou Xin. Effect of Jianguling capsule on the bone morphology and metabolism in rats with vitamin A acid induced osteoporosis [J]. Chinese Journal of New Drug, 2008,17(14): 1229-1232
- [2] 沈有高,邓伟民,周丽,等.补肾壮骨颗粒干预维甲酸致骨质疏松大鼠的骨生物力学变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(33):6483-6486
Shen You-gao, Deng Wei-min, Zhou Li, et al. BushenZhuanggu granules effect on bone biomechanics of rats with osteoporosis induced by retinoic acid [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research August, 2009,13(33):6483-6486

- [3] 王冬春,檀爱民.仙灵强骨口服液对维甲酸诱导大鼠骨质疏松症的治疗作用[J].时珍国医国药, 2007, 18(1): 69-70
Wang Dong-chun, Tan Ai-min. Effect of Xian ling qiang gu kou fu ye on Os teoporosis Rats Induced by Retinoic Acid [J]. Lishizhen Medicine and Material Medica Research, 2007,18(1):69-70
- [4] De Coppi P, Bartsch G J, Siddiqui M M, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy[J]. Nat Biotechnology, 2007, 25(1): 100-106
- [5] McLaughlin D, Tsimonaki E, Vallianatos G, et al. Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells [J].J Neurosci Res,2006,83 (7): 1190-1200
- [6] Delo D M, Eberli D, Williams J K, et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev,2006,15(5):719-728
- [7] Tsai M S, Hwang S M, Tsai Y L, et al. Colonel amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells[J]. Biol Reprod, 2006, 74(3):545-551
- [8] Kim J, Lee Y, Kim H, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multi potent stem cells [J]. Cell Prolife, 2007,40(6):75-90
- [9] Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immune-suppressed or immune deficient rat[J].J Mol Cell Cardiol, 2007,42(4):746-759
- [10] Ciprianid S, Bonini D, Marchina E, et al. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain[J]. Cell Biol Int, 2007,31(8):845-850
- [11] 许碧莲, 崔燎, 陈文双, 等. 丹参骨宝对维甲酸模型大鼠股骨生物力学及骨密度的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2010, 27(2): 307-310
Xu Bi-lian, Cui Liao, Chen Wen-shuang, et al. Effects of Da nShe nGuBao on Biomechanical Propertis and Bon Density of Femur Induced by Retinoic Acid in Rats [J]. Journal of Biomedic al Engineering, 2010, 27(2): 307-310
- [12] 许鹏, 郭雄. 维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的效果及机理[J]. 四川大学学报(医学版), 2005, 36(2): 229-232
Xu Peng, Guo Xiong. The Effect of Retinoic Acid on Induc- tion of Osteoporotic Model Rats and the Possible Mechanism [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Edi), 2005, 36(2): 229-232
- [13] Lanyon L, Armstrong V, Ong D, et al. Is estrogen receptor a key to controlling bones, resistance to fracture [J]. J Endocrinol, 2004, 182 (2): 183-191
- [14] John PA, Stuart H, Simon T, et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes [J]. JAMA, 2004, 292(17): 2105-2114
- [15] Scariano JK, Simplicio SG, Montoya GD, et al. Estrogen receptor beta-tad nucleotide (CA) repeat polymorphism is significantly associated with bone mineral density in postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int, 2004, 74(6): 501-508
- [16] 贾少杰, 贾晓静. 绝经后女性骨质疏松与 OPG, RANKL 和 Apo E 的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 32(22): 4601-4603
Jia Shao-jie, Jia Xiao-jing. Relationship of OPG, RANKL, ApoE and osteoporosis in postmenopause women [J]. Chinese Journal of women and child health, 2007, 32(22): 4601-4603
- [17] Marx J. Coming to grips with bone loss[J]. Science, 2004, 305(5689): 1420-1422
- [18] Kolambkar Y M, Peister A, Soker S, et al. Chondrogeni differentiate on of amniotic fluid derived stem cells [J]. J Mol Histol, 2007, 38(8): 405-413
- [19] Perin L, Giuliani S, Jin D, et al. Renal differentiate on of amniotic fluid stem cells[J]. Cell Prolife, 2007, 40(6): 936-948
- [20] Hauser P V, De Fazio R, Bruno S, et al. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery[J]. Am J Pathol, 2010, 177(4): 2010-2021