

针刺对人羊膜间充质细胞移植治疗 去卵巢大鼠骨质疏松的协同效应

陈玉敏¹, 陈涛平², 韩翠玉², 史同焕², 董淑香²

(1. 河北大学医学院, 生理教研室, 保定 071000; 2. 河北大学附属医院, 骨科, 保定 071000)

【摘要】 目的 探讨针刺联合人羊膜间充质细胞(human amniotic mesenchymal cells, HAMCs)移植对去卵巢骨质疏松协同效应研究。**方法** 选择雌性未孕的 Wistar 大鼠 45 只, 完全随机分组分为假手术组、模型组及实验组(针刺+人羊膜间充质细胞移植), 每组各 15 只。各组手术伤口恢复后, 第 7 天开行针刺+尾静脉注射 HAMCs 液(假手术组除外)连续干预 12 周, 于末次干预后 24 h, 处死大鼠并采集标本。从开始干预至处死, 每周测定 1 次各组大鼠的体质量, 双能 X 线吸收骨密度仪分别测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度, 用原子吸收法测定其骨钙含量; 干预 12 周后采用 ELISA 法检测血清 25-羟基维生素 D(25-HVD)、I 型胶原 C 端肽(CTX-I)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRAP5b) 的表达变化; 干预 12 周后检测各组大鼠生物力学性能的变化。干预 12 周后 RT-PCR 技术检测椎骨中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的基因表达情况。**结果** 假手术组大鼠体重逐渐增加, 符合动物自然生长规律, 模型组于造模后两个月开始, 体重却明显高于假手术组, 实验组体重渐增, 与假手术组相近。模型组比较假手术组的骨密度和骨钙含量均降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与模型组较, 实验组的骨密度和骨钙含量均升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。ELISA 法显示, 血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达, 与假手术组比较, 模型组显著降低, 与模型组比较, 实验组显著升高, ($P < 0.05$)。生物力学检测显示, 假手术组的极限载荷、极限应力和弹性模量比模型组有显著增高 ($P < 0.05$), 实验组的极限载荷和弹性模量比假手术组有显著增高 ($P < 0.05$)。RT-PCR 检测显示 TGF- $\beta 1$ 的 m-RNA 的表达, 与假手术组、模型组比较, 实验组明显上调 ($P < 0.05$)。**结论** 针刺联合人羊膜间充质细胞 (HAMCs) 移植具有较好的对去卵巢骨质疏松协同效应, 可改善去卵巢大鼠骨质疏松症的作用。

【关键词】 人羊膜间充质细胞; 针刺; 移植; 去卵巢; 大鼠; 骨质疏松

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0043-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.009

Synergistic effect of acupuncture and human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on the treatment of osteoporosis in ovariectomized rats

CHEN Yu-min¹, CHEN Tao-ping², HAN Cui-yu², SHI Tong-huan², DONG Shu-xiang²

(1. Department of Physiology, Hebei University School of Medicine, Baoding 071000, China;

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem

[作者简介] 陈玉敏 (1976 -), 女, 硕士研究生, E-mail: chenyumint@163.com。

[通讯作者] 陈涛平。E-mail: ctp00@163.com, 电话: 18603121976。

cells (HAMCs) transplantation on the osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Forty-five healthy female non-pregnant Wistar rats were randomly divided into sham operated group, model group and experimental group (acupuncture + HAMC transplantation), 15 rats in each group. At 7 days after the surgical wound healing, the rats received acupuncture every day and intravenous injection of HAMCs suspension (except the sham operated group) once a week for consecutive 12 weeks. The body weight was measured every week. 24 hours after the last intervention, the rats were killed and specimens were collected. Specimens of the mid-, proximal- and distal femur were taken to measure the bone mineral density using a dual energy X-ray absorptiometer. At 12 weeks after the intervention, changes of the expression of serum 25-hydroxy-vitamin D (25-HVD), C-terminal peptide of type I collagen (CTX-I), bone specific alkaline phosphatase (BAP) and human tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) were determined by ELISA, the biomechanical properties of the removed femur was measured, and the expression of transforming growth factor- β (TGF- β) in the vertebrae was assessed by RT-PCR assay. **Results** Body weight of rats in the sham operation group was increased gradually in accordance with the natural growth of animals, that of the model group was significantly higher than that of the sham operated group since two months after modeling, and the body weight of the experimental group was similar to that of the sham operated group. The bone mineral density and calcium content of the model group were significantly decreased compared with that of the sham operated group ($P < 0.05$), and the bone mineral density and bone calcium content of the experimental group were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$). The ELISA showed that the expressions of serum 25-HVD, CTX I, BAP, and TRAP5b in the model group were significantly lower than that of the sham operated group, and those of the experimental group were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$). Measurement of biomechanical properties showed that the limit load, limit stress and elastic modulus of the femur of the sham operated group were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$), and the limit load and elastic modulus of the experimental group were significantly higher than that of the sham operated group ($P < 0.05$). T-PCR showed that the expression of TGF- β 1 m-RNA in the experimental group was significantly up-regulated than that of the sham operated and model groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem cell (HAMCs) transplantation has a synergistic effect on the treatment of osteoporosis, and can improve the conditions in ovariectomized rats.

【Key words】 Human amniotic mesenchymal stem cells, HAMCs; HAMCs transplantation; Acupuncture; ovariectomized rats; Osteoporosis

骨质疏松症多见于中老年,病变特征为骨骼结构改变,骨脆性增加,强度减低,较易发生骨折。骨质疏松症可由多种因素导致,发病机制较为复杂,可反复发生骨折,对患者的生活质量造成了严重的影响,同时也给患者的家庭及社会带来较大经济负担^[1-3]。随着我国老龄化社会的到来,发病人数越来越多,防治骨质疏松症已经成为一个迫切需要解决的问题^[4-6]。近些年来随着医学科研的发展与医疗水平的提高,骨质疏松症的治疗手段也多样化,较为常用的有药物治疗法、中医中药治疗、中医针灸治疗、细胞移植治疗等,其中细胞疗法是目前实验研究的热点^[7-9]。人羊膜间充质细胞(HAMCs)来源于羊膜组织,是孕妇产生的一种废弃物,只要征得孕妇同意即可获得,不受伦理道德的限制,来源广泛,且具有在特定条件下分化为各种细胞的能力,这种特性的存在,使其为各种疾病的治疗提供了新的思路^[10-12]。居于以上优点,AM-MSCs 成为近几年的研究又一热点,其在包括免疫相关的疾病

在内的多种疾病的治疗方面取得了令人瞩目的成绩。本研究旨在联合应用针刺及 AM-MSCs 移植干预去卵巢大鼠骨质疏松症,观察其作用效果。

1 材料和方法

1.1 材料及来源

骨密度测定仪器(法国 GK 公司)、LG-DMEM (Gibico 公司)、胰蛋白酶(Amresco 公司)、体重计、双能 X 射线骨密度测量仪(美国 GE 公司)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)酶联免疫测定试剂盒、大鼠 I 型胶原 C 端肽(CTX-I)检测试剂盒、大鼠抗酒石酸性磷酸酶 5b(TRAP5b)检测试剂盒(上海斯信生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组:选择 2 月龄 45 只 Wistar 大鼠,均为雌性、未孕,每只大鼠体重控制在 215 ~ 255 g,购自河北医科大学第二医院,动物质量合格证号:【SCXK(冀)2010-0-056】。河北大学附属

医院 SPF 级实验动物室常规饲养 SY【XK(冀)2011-0008】，所有大鼠均在相同条件下进行饲养。采用完全随机法。将 45 只大鼠平均分成 3 组，分别为假手术组、模型组及实验组，各组均为 15 只。

1.2.2 模型的建立：将各组大鼠采用吸入乙醚法进行麻醉，麻醉后将大鼠固定，经皮肤消毒后，选择腰椎后侧正中为切口切开皮肤，分离两旁肌肉，打开腹膜，找到双侧卵巢，模型组及实验组两组大鼠双侧卵巢需完全切除，而对假手术组大鼠的处理则为相同部位切开皮肤后，在卵巢周围的周边部位切下少量的组织，而不切除卵巢，操作完成后向腹腔中撒入青霉素粉末，然后相同的方法缝合皮肤。手术结束后 7 d 大鼠伤口愈合后，对实验组大鼠行行针刺+尾静脉注射 HAMCs 液进行干预。具体注射方法为每次为各只大鼠注射约 2 mL 的 HAMCs 细胞悬液，注射 2×10^4 个细胞，每周注射 1 次。具体针刺方法为：实验组运用针刺膻穴治疗，参照《实验针灸学》动物穴位的定位方法选取“大杼”“肾俞”“脾俞”，均取双侧。将大鼠固定，穴位局部剪去鼠毛，进行常规消毒，采用一次性美容针，左手固定大鼠皮肤，右手持针准确刺入上述膻穴 2~5 mm，每日 1 次，每次持续 30 min，每隔 10 min 轻捻转行针 1 次（持续 10 s，以增强针感）。干预时长为 12 周，整个操作过程均由同实验者完成^[13]。

1.2.3 HAMCs 的培养及鉴定：经过孕妇同意后，收集胎膜组织，将羊膜与绒毛膜进行分离，整个操作均在无菌条件下进行。将分离后得到的羊膜经过反复冲洗将血液及杂物冲洗干净后，用剪刀将洗净的羊膜剪成乳糜样大小的颗粒，首先向盛有羊膜的器皿中加入胰蛋白酶进行消化，再次进行冲洗将未消化的组织洗去，然后向其中加入胶原酶将组织进行彻底消化，将消化后的液体通过 300 目钢网进行过滤，将过滤液进行收集，吸取少量过滤液置于离心管中，将离心管放入离心机中在 1 500 r/min 状态下进行离心，10 min 将其取出向其中加入 LG-DMEM 培养基，并吹打均匀使细胞呈完全悬浮状态，用滴管吸取少量悬浮细胞液滴在 6 孔培养板上进行接种，接种完毕将培养箱调至特定状态，将 6 孔板放在其中进行培养。培养至第 3 天时，取出培养板弃去旧的培养基并重新加入新的培养基继续进行培养，当细胞贴壁细胞数达 80%~90% 后，先后加入胰蛋白酶、培养基，经过消化后再次进行离心，最后进行细胞传代，当细胞生长至第 3 代时，取适量

AM-MSCs 液注射至实验组各只大鼠体内。最后采用光学显微镜对 AM-MSCs 进行观察^[14]。

1.2.4 测定各组大鼠的体质量：从造模后 7 d 开始，每周测定 1 次各只大鼠体重，直至造模后的第 13 周将大鼠处死时结束。具体操作过程为，将体重计置于桌面上，置“0”后将事先准备好的小桶置于体重计上，记录小桶重量，然后分别将各组各只大鼠置于小桶中，记录体重计读数，将每次读数减去小桶重量，分别对每只大鼠进行两次体质量测定，为确保测定结果的准确性将两次测定结果的平均值做为大鼠体质量^[15]。

1.2.5 双能 X 线吸收骨密度仪测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度：在造模后的第 13 周后将各组大鼠处死，固定后，无菌条件下将大鼠左侧股骨取出，标记出大鼠股骨中点，分别对大鼠左侧股骨中点、近端及远端分别进行骨密度测定。具体操作方法为将大鼠股骨中点、远近端分别置于双能 X 线吸收骨密度仪进行测定记录测定值结果用于最后数据比较^[16]。

1.2.6 原子吸收法测定其骨钙含量：模型建立第 13 周后，经过最后一次干预后 24 h，以颈部脱臼法将各组大鼠处死，固定在支架上，用手术刀将大鼠股骨取出，将股骨上附着的组织剔除干净，用原子吸收法对剔除干净软组织的股骨进行钙含量的测定^[17]。

1.2.7 采用 ELISA 法检测血清：25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达变化：实验组大鼠经过 12 周的干预后，将各组大鼠取仰卧位，固定后，用注射器经大鼠境外静脉进行采血，将注射器中抽出的血液注入离心管，把离心机调至 3 000 r/min 状态，打开离心机将离心管放入进行离心，15 min 后用胶头滴管将离心管中的上清液吸出，采用 ELISA 法对血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 进行测定，所有操作均按照试剂盒的说明书进行。对各项结果进行记录^[18]。

1.2.8 检测各组大鼠生物力学性能的变化：于模型建立第 13 周后，在末次干预后 24 h，将各组大鼠处死，将大鼠固定在支架上，用手术刀将大鼠股骨取出，将股骨上附着的组织剔除干净，然后进行股骨生物力学测试，所采用的实验为三点弯曲实验，将各组大鼠处理后的股骨放在试验机上进行测试，所选择的跨距为 17 mm，加载速度为 2.0 mm/min，然后根据结果对其载荷-变形曲线，应力-应变曲线进行描绘^[19]。

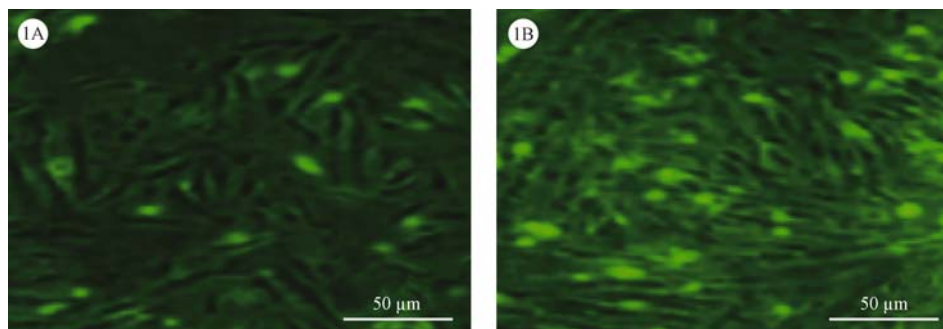


图 1A:第 6 天时 HAMCs($\times 200$, 标尺 = $50\mu\text{m}$);图 1B:传至第 8 代的 HAMCs($\times 200$, 标尺 = $50\mu\text{m}$)

图 1 HAMCs 的形态观察

Fig. 1 Morphological observation of the HAMCs at 6th day (A) and after 8th passage (B).

1.2.9 RT-PCR 检测 TGF- $\beta 1$ 基因表达情况:抽取各组大鼠血液,将各组大鼠血液经过特定处理后从中提取出总的 RNA,从中取出 $2\mu\text{L}$ 进行逆转录,结果为 cDNA。将逆转录得到的片段作为 PCR 反应模板进行 PCR 反应,整个操作按照相关试剂盒说明进行。TGF- $\beta 1$ 上下游引物委托 TaKaRa 生物公司设计合成。TGF- $\beta 1$ 引物:上游 5'-TTTCCCGATATT CGGGCAGC-3', 下游 5'-GTACATGAGCAGGCTCAG CC-3'。 β -actin 引物:上游 5'-TG-GTGGGTATGGGTC AGAAGGACTC-3', 下游 5'-CATG-GCTGGGGTGT GAAGGTCTCA-3'。PCR 反应条件为:在 94°C 条件下变性,时长为 1 min,然后在 56°C 条件下进行退火,退火时长为 0.5 min,最后进行延伸,延伸所需条件为 72°C ,延伸时长为 1 min,共经过 30 个循环。

2 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和双因素重复测量数据方差分析,组间比较采用 LSD-t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HAMCs 的形态观察

贴壁细胞数随培养时间的延长而逐渐增多,细胞形态也由刚开始的长梭形而逐渐发生改变,第 6 天时贴壁细胞数量可达 80% 以上,此时细胞排列紧密,细胞体较前拉长,呈漩涡状生长(图 1A)。传代生长分为不同的时期,不同时期内细胞增殖速度是不同的,细胞增殖速度在第 4 天左右是最快,当传代至第 8 代以后逐渐减慢,细胞形态变化较为明显,胞体逐渐变大使整个细胞形态呈扁平状。根据从生长曲线(图 1B)可以进行不同分期,1~3 d 为细胞

生长潜伏期,此期细胞呈贴壁生长,数量逐渐增多;第 4~7 天为细胞对数生长期,此期细胞增殖速度最快;第 8 天细胞增殖速度变缓,达到平台期。

3.2 各组大鼠的体质量

分别在造模后第 7 天开始每周对大鼠体质量进行 1 次测定,将各组大鼠体质量最终结果进行比较结果显示,假手术组大鼠在造模结束后第 7 天至第 13 周体重逐渐增加,这符合动物的自然生长规律,从造模后的第 8 周开始,比较模型组与假手术组体质量,模型组显著高于假手术组;而实验组大鼠体重在这段测定时间内逐渐增加,与假手术组结果相比,二者结果相接近。如图 2。

3.3 双能 X 线吸收骨密度仪测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度

在造模后的第 13 周将各组大鼠处死后,取出股骨置于双能 X 线吸收骨密度仪上,对每组大鼠不同部位骨骼进行骨密度检测,标本选定均为离体骨,测定结果显示,通过比较各组各部位骨密度结果可以得出以下结论,假手术组、模型组两组相比,模型组骨密度升高,且二者差异具有显著性,模型组及实验组两组进行比较,实验组的骨密度升高,差异也具有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

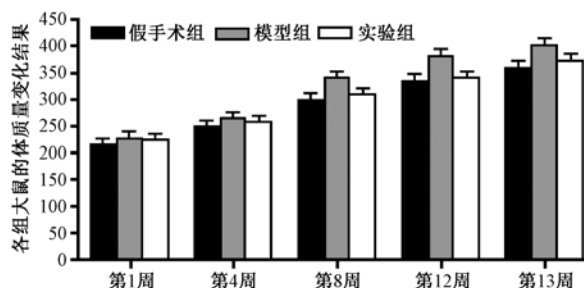


图 2 各组大鼠的体质量比较

Fig. 2 Comparison of body weight of the rats in each group

3.4 原子吸收法测定其骨钙含量

在模型建立第 13 周后,用原子吸收法对各组大鼠骨钙含量进行测定,选用的标本为各组大鼠左侧股骨,并对各组测定结果进行比较,测定及比较结果显示,将假手术组、模型组两组大鼠的骨钙含量进行比较,模型组骨钙含量升高,而将模型组及实验组两组结果进行比较,结果显示实验组的骨钙含量升高,且差异有显著性意义,即 $P < 0.05$ (表 2)。

3.5 各组大鼠 25- HVD、CTX- I、BAP、TRAP5b 的表达变化

采用 ELISA 法对大鼠血清 25- HVD、CTX- I、BAP、TRAP5b 的表达进行测定,经各组大鼠结果比较得出结论如表 3 所示,首先将假手术组、模型组两组的各项结果进行比较,比较结果显示模型组的各项指标均呈现明显的降低趋势,然后将模型组及实验组两组进行比较,比较结果显示实验组各项指标

较前者则升高显著,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3.6 生物力学性能的变化

各组大鼠经过不同处理后,生物力学性能均发生不同变化,采用三点弯曲实验对大鼠生物力学性能的变化测定并对结果进行比较,从表 4 中可以看出,假手术组与模型组相比 N, MPa, M Pa 增高显著,差异具有显著性;而将假手术组与实验组两组相比,后者的 N 和 M Pa 均显著升高,差异具有显著性, $P < 0.05$ 。

3.7 RT-PCR 检测 TGF- β 1 基因表达情况

以 RT-PCR 法对大鼠 TGF- β 1 基因的表达情况进行检测,记录检测结果,将大鼠的检测结果进行比较,结果显示,假手术组、模型组及实验组三组中实验组的 TGF- β 1 基因表达明显上调,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$),见图 3。

表 1 大鼠不同部位离体骨的骨密度(BMD)值
Tab.1 Values of BMD of different parts of the rat femur measured ex vivo

组别 Groups	左侧股骨中点 Left femur midpoint	远端 Distal end	近端 Proximal end
假手术组 Sham	124.33 $\pm$ 12.02	80.74 $\pm$ 10.42	149.31 $\pm$ 11.42
模型组 Model	128.38 $\pm$ 12.31 ^a	85.41 $\pm$ 10.72 ^a	150.42 $\pm$ 14.57 ^a
实验组 Experimental	134.42 $\pm$ 13.12 ^b	87.79 $\pm$ 11.31 ^b	157.38 $\pm$ 15.03 ^b

注:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。
Note. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

表 2 针刺联合人羊膜间充质干细胞移植对大鼠股骨钙含量的影响
Tab.2 Effect of acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on the rat femoral calcium content

组别 Groups	动物数(只) Number of animals	骨钙含量(mg/g) Calcium content (mg/g)	LSD 平均差(I-J) LSD Mean difference	P 值
假手术组 Sham	15	157.36 $\pm$ 13.45		
模型组 Model	15	206.22 $\pm$ 25.42	- 11.258	<0.05
实验组 Experimental	15	241.15 $\pm$ 27.17	15.672	<0.05

表 3 各组大鼠 25- HVD、CTX- I、BAP、TRAP5b 的表达影响
Tab.3 Expression of serum 25-HVD, CTX-I, BAP, and TRAP5b of rats in each group

组别 Groups	25- HVD	CTX- I	BAP	TRAP5b
假手术组 Sham	22.82 $\pm$ 4.17	23.34 $\pm$ 0.28	0.50 $\pm$ 0.26	50.74 $\pm$ 23.12
模型组 Model	18.16 $\pm$ 2.42 ^a	11.21 $\pm$ 0.14 ^a	0.15 $\pm$ 0.17 ^a	38.23 $\pm$ 11.34 ^a
实验组 Experimental	27.41 $\pm$ 5.05 ^b	22.86 $\pm$ 0.14 ^b	0.59 $\pm$ 0.28 ^b	59.69 $\pm$ 23.25 ^b

注:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。Note. :^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

表 4 针刺联合人羊膜间充质干细胞移植对去卵巢大鼠股骨生物力学的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Effect of acupuncture combined with human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on femur biomechanics in the ovariectomized rats

组别 Groups	极限载荷(N) Limit load (N)	极限应力(M Pa) Limit stress (MPa)	弹性模量(M Pa) Elastic modulus (MPa)
假手术组 Sham	142.61 $\pm$ 14.23	0.985 $\pm$ 0.130	6122.01 $\pm$ 205.43
模型组 Model	121.06 $\pm$ 20.14 ^a	0.759 $\pm$ 0.216 ^a	5174.34 $\pm$ 597.21 ^a
实验组 Experimental	153.42 $\pm$ 13.54 ^b	1.040 $\pm$ 0.304 ^b	6752.50 $\pm$ 165.03 ^b

注:^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。Note. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.05$ 。

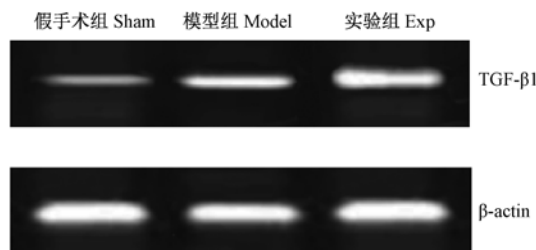


图 3 各组 TGF-β1 基因表达情况

Fig.3 Expression of TGF-β1 gene in each group

4 讨论

骨质疏松症是临床中较为常见的一种疾病,本实验切除雌性大鼠的卵巢使得大鼠雌激素分泌减少,从而造成骨质疏松症模型与女性绝经后雌激素分泌减少引起的骨质疏松症特征相似,因此可以用这种方法造模来研究绝经后骨质疏松症^[20-21]。因骨质疏松症致病因素多,发病机制复杂,所以很难使用一种药物来解决骨质疏松症的所有问题。本研究采用针刺联合 HAMCs 移植干预去卵巢大鼠骨质疏松症,探讨针刺是否具有骨相对特异性调节作用,尤其是抗骨质疏松的效应。

骨组织的成骨细胞和破骨细胞都有雌激素受体,骨组织形成和溶解都受到雌激素的调节。研究表明雌激素减少是性骨质疏松症发生的主要原因,雌激素可预防治疗骨质疏松症。人的骨形成由骨吸收与骨形成相互平衡决定,这种平衡受各种因素扰乱而打破时,骨量就会发生异常,骨结构随即改变,从而影响骨的正常功能。女性患者在月经完全消失后,由于雌激素分泌减少,骨形成与骨吸收的平衡受到影响后,经过复杂的机制作用,导致的最终结果是骨形成与骨吸收平衡打破使骨量形成减少,从而导致的骨骼强度变小,脆性增加,所以极易发生骨折。大量研究表明雌激素对骨质疏松症可以通过作用于相应受体而对成骨及破骨过程直接发挥作用;还可通过旁分泌机制产生大量的作用因子,对成骨及破骨过程产生间接的作用,通过各种凋亡机制发挥作用^[22-24]。这些作用机制增强成骨作用,而减弱破骨作用,所以雌激素可以促进骨生成,当雌激素减少时骨生成减少即可发生骨质疏松症。

目前随着高龄社会的到来,骨质疏松症患者也逐年增加,其治疗方法很多,但效果不是很理想。针刺是一种中医治疗方法,研究发现针刺可以改变机体激素分泌,通过这种内分泌的改变来影响成骨

及破骨作用,因此对骨质疏松症患者有较好的作用^[25-26]。HAMCs 大量相关实验研究将其用于各种疾病的治疗中,并且已经取得了令人瞩目的成绩,探讨 HAMCs 用于疾病治疗安全性的研究发现该种细胞对小鼠的肝肾功能未造成损伤,小鼠生长良好,不存在种间排异反应,且移植后无致癌现象发生,安全可行^[27]。骨质疏松症发病机制复杂,目前有大量研究采用联合法治骨质疏松症,但是还尚未有将 HAMCs 与针刺相结合干预骨质疏松症。

本研究将这两种治疗方法联合起来干预大鼠骨质疏松症,通过对各组大鼠进行不同处理后观察大鼠骨质疏松症改善程度,结果显示与模型组比较,实验组的骨密度和骨钙含量均升高。ELISA 法显示,血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达,与模型组比较,实验组显著升高。生物力学检测显示,假手术组的极限载荷、极限应力和弹性模量比模型组有显著增高,实验组的极限载荷和弹性模量比假手术组有显著增高。RT-PCR 检测显示 TGF-β1 的 m-RNA 的表达,与假手术组、模型组比较,实验组明显上调。一系列结果均提示针刺联合 HAMCs 移植对大鼠骨质疏松症具有协同效应,可改善去卵巢大鼠骨质疏松症的作用。然而目前对 HAMCs 的相关研究仍处于探索阶段,将 AM-MSCs 移植用于临床各种疾病的治疗仍需大量研究支持,需要不断探索,仍有许多问题需要解决。

参考文献:

- [1] 文天林,孙天胜,王玲. 骨质疏松的流行病学、病因和分类[J]. 人民军医, 2010, 35(9): 662-663.
- [2] 戴如春,张丽,廖二元. 骨质疏松的诊治进展[J]. 中国医刊, 2008, 43(4): 4-6.
- [3] Tian YG, Li Y, Li JS, et al. Effects of therapies for regulating and reinforcing lung and kidney on osteoporosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Trad Chin Med, 2015, 35(02): 175-183.
- [4] 徐敏,刘保新,黄承军,等. 原绝经后骨质疏松症的穴位治疗进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(2): 301-302.
- [5] Ono Y. Multifunctional and potent roles of the 3-hydroxypropoxy group provide eldecalsitol's benefit in osteoporosis treatment[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 139: 88-97.
- [6] Maloste M, Ariane B, Graziela Z, et al. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis[J]. Acta Cirurg Bras 2015, 30(11): 727-735.
- [7] Li N, Li XM, Xu L, et al. Comparison of QCT and DXA: Osteoporosis detection rates in postmenopausal women[J]. Int J Endocrinol, 2013, Article ID 895474.

- [8] 朴正福,丁淑琴,张海燕,等. 人羊膜间充质干细胞的分离及分化潜能的研究 [J]. 生物医学工程与临床, 2010, 14(1): 15-19.
- [9] Karlsson H, Samarasinghe S, Amrolia PJ, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses [J]. Blood, 2008, 112(3): 532-541.
- [10] Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis [J]. PLoS One. 2010, 5(2): e9357.
- [11] Kobayashi M, Yakuwa T, Sasaki K, et al. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer [J]. Cell Transplant, 2008, 17(3): 291-301.
- [12] Gerdoni Z, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Ann Neurol, 2007, 61(3): 219-227.
- [13] 谢肇,李起鸿,孟萍,等. 去卵巢大鼠骨质疏松模型的特点 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(28): 79-81.
- [14] 方宁,张路,宋秀军,等. 人羊膜间充质干细胞的分离、培养及鉴定 [J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(3): 234-236.
- [15] 李媛媛,胡慧,梁翠梅,等. 针刺“带脉”穴对代谢综合征大鼠体质量、血糖和脂代谢的影响 [J]. 针刺研究, 2014, 39(3): 202-206.
- [16] 董军,闫虎,谭远超,等. 双能 X 射线骨密度仪测量离体羊股骨骨折端及钢板对接骨折端的骨密度 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(35): 6555-6558.
- [17] 李学朋,孟照明,孟兆亮,等. 补肾活血方对去卵巢大鼠骨质疏松检测指标的影响 [J]. 中国医学创新, 2013, 10(2): 16-18.
- [18] 张荔,孙付军,李贵海. 葛藤分散片对去卵巢大鼠骨质疏松的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 87-89.
- [19] 李双,牛丽颖,窦玉红,等. 淡豆豉对去卵巢骨质疏松大鼠生物力学性能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 57-58.
- [20] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes [J]. J Tissue Eng Regen Med. 2007, 1: 296-305.
- [21] 刘儒鹏,荣培晶, Gary Guishan Xiao. 针刺治疗原发性骨质疏松症的研究概况与述评 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(12): 1400-1401.
- [22] 杜革术. 针刺对绝经后骨质疏松患者骨密度及血清雌二醇的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2011, 30(2): 104-106.
- [23] Richy F, Schacht E, Bruyere O, et al. Vitamin D analogs versus native vitamin D in preventing bone loss and osteoporosis-related fractures—A comparative meta-analysis [J]. Calcif Tissue Int, 2005, 76(3): 176-186.
- [24] Díaz-Prado S, Muñios-López E, Hermida-Gómez T, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine [J]. Differentiation. 2011, 81(3): 162-171.
- [25] De Coppi P, Bartsch, GJr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy [J]. Nature Biotechnol. 2007, 25(1): 100-106.
- [26] Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro [J]. BMC Dev Biol. 2007, 7: 11.
- [27] 郭亚男,关方霞,李国栋,等. 人羊膜间充质干细胞静脉移植治疗阿尔茨海默病 APP + 转基因鼠的有效性安全性评估 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(10): 1811-1818.

[修回日期] 2016-06-12