

· 基础研究 ·

基于“髓系骨病”理论探索 Osterix 阳性骨髓间充质干细胞维持骨稳态的作用

王玉杭¹, 王煦程², 王迪³, 杨婧¹, 曾庆贺¹, 袁文华⁴, 童培建⁴, 金红婷¹

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江 杭州 310053;

3. 浙江中医药大学医学技术学院, 浙江 杭州 310053;

4. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

摘要 目的:探索 Osterix 阳性骨髓间充质干细胞维持骨稳态的作用。方法:Osterix - CreERT2 小鼠(Osterix 基因靶标小鼠)与 Rosa26 - tdTomato 小鼠(番茄红荧光报告小鼠)交配获得子代 Osterix - CreERT2/Rosa26 - tdTomato 小鼠, Osterix - CreERT2 小鼠与 Rosa26 - DTA 小鼠(白喉毒素 A 片段报告小鼠)交配获得子代 Rosa26 - DTA 小鼠和 Osterix - CreERT2/Rosa26 - DTA 小鼠。选取 3 只子代 Osterix - CreERT2/Rosa26 - tdTomato 小鼠纳入示踪组, 6 只子代 Rosa26 - DTA 小鼠纳入空白组, 6 只子代 Osterix - CreERT2/Rosa26 - DTA 小鼠纳入 Osterix 阳性细胞剔除组。各组小鼠均于 1 月龄时按 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量腹腔注射他莫昔芬, 每天 1 次, 连续注射 5 d, 以诱导白喉毒素表达, 特异性剔除 Osterix 阳性细胞。他莫昔芬干预结束后 2 周, 脱颈处死示踪组小鼠, 切取左侧股骨, 通过免疫荧光染色观察 Osterix 阳性细胞在小鼠股骨中的分布情况。他莫昔芬干预结束后 6 个月, 脱颈处死 Osterix 阳性细胞剔除组和空白组小鼠, 切取左侧股骨, 以 Micro - CT 观察小鼠股骨骨微结构、阿尔新蓝 - 苏木精染色观察小鼠股骨组织形态、免疫组织化学染色测定小鼠股骨中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid - binding protein, FABP4)表达量。结果:①Osterix 阳性细胞在小鼠股骨中的分布情况。Osterix 阳性细胞中 tdTomato 蛋白的红色荧光与 DAPI 染色的细胞核蓝色荧光分布高度重合, 均位于髓腔; Osterix 阳性细胞中 tdTomato 蛋白的红色荧光与 CD73 染色的骨髓间充质干细胞细胞核绿色荧光分布高度重合, 均位于髓腔。②小鼠股骨骨微结构观察结果。Osterix 阳性细胞剔除组的骨松质骨密度和骨松质骨小梁厚度均低于空白组 [$(36.077 \pm 3.449) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-3}$, $(25.240 \pm 1.077) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-3}$, $t = 2.831$, $P = 0.031$; $(0.070 \pm 0.004) \text{ mm}$, $(0.055 \pm 0.003) \text{ mm}$, $t = 2.839$, $P = 0.014$], 骨松质骨小梁分离度高于空白组 [$(0.332 \pm 0.012) \text{ mm}$, $(0.381 \pm 0.004) \text{ mm}$, $t = -2.159$, $P = 0.009$]; 2 组的骨松质骨体积分数、骨松质骨小梁数量比较, 组间差异均无统计学意义 [$(6.902 \pm 2.216) \%$, $(2.531 \pm 0.399) \%$, $t = 1.848$, $P = 0.129$; $(0.950 \pm 0.266) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(0.418 \pm 0.037) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $t = 1.626$, $P = 0.122$]。Osterix 阳性细胞剔除组的骨皮质骨密度、骨皮质骨体积分数、骨皮质骨小梁厚度均低于空白组 [$(40.127 \pm 1.718) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-3}$, $(24.990 \pm 3.099) \text{ g} \cdot \text{mm}^{-3}$, $t = 4.522$, $P = 0.003$; $(19.482 \pm 0.803) \%$, $(13.444 \pm 1.604) \%$, $t = 3.600$, $P = 0.009$; $(0.161 \pm 0.006) \text{ mm}$, $(0.117 \pm 0.010) \text{ mm}$, $t = 3.818$, $P = 0.007$]; 2 组的骨皮质骨小梁分离度、骨皮质骨小梁数量比较, 组间差异均无统计学意义 [$(0.295 \pm 0.001) \text{ mm}$, $(0.296 \pm 0.003) \text{ mm}$, $t = -0.372$, $P = 0.072$; $(1.124 \pm 0.221) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(1.146 \pm 0.042) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $t = 1.525$, $P = 0.171$]。③小鼠股骨组织形态观察结果。与空白组相比, Osterix 阳性细胞剔除组小鼠股骨生长板软骨 - 骨连接处有大量脂滴生成, 脂肪空泡堆积。Osterix 阳性细胞剔除组的脂滴面积大于空白组 [$(203.514 \pm 0.957) \%$, $(241.061 \pm 5.805) \%$, $t = -6.381$, $P = 0.003$]。④小鼠股骨中 ALP 和 FABP4 表达量测定结果。Osterix 阳性细胞剔除组股骨 ALP 表达量低于空白组 [$(1.143 \pm 0.122) \%$, $(0.550 \pm 0.641) \%$, $t = 4.305$, $P = 0.013$], FABP4 表达量高于空白组 [$(10.419 \pm 1.113) \%$, $(15.670 \pm 1.405) \%$, $t = -2.930$, $P = 0.043$]。结论: Osterix 阳性骨髓间充质干细胞发挥着维持骨稳态的作用。

关键词 髓; 骨髓; 间充质干细胞; 骨生成; Osterix; 动物实验**Effect of Osterix - expressing bone marrow mesenchymal stem cells in maintaining bone homeostasis based on the “myeloid bone disease” theory**WANG Yuhang¹, WANG Xucheng², WANG Di³, YANG Jing¹, ZENG Qinghe¹, YUAN Wenhua¹, TONG Peijian⁴, JIN Hongting¹

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2021ZZ014)

通讯作者:金红婷 E-mail:hongtingjin@163.com

1. First School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China
2. Third School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China
3. School of Medical Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China
4. Zhejiang Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Osterix – expressing bone marrow mesenchymal stem cells (BM – MSCs) in maintaining bone homeostasis. **Methods:** Osterix – CreERT2 mice (Osterix gene target mice) were mated with Rosa26 – tdTomato mice (tdTomato fluorescent reporter mice) to obtain offspring Osterix – CreERT2/Rosa26 – tdTomato mice. Osterix – CreERT2 mice were mated with Rosa26 – DTA mice (diphtheria toxin A fragment reporter mice) to obtain offspring Rosa26 – DTA mice and Osterix – CreERT2/Rosa26 – DTA mice. Three offspring Osterix – CreERT2/Rosa26 – tdTomato mice were assigned to the tracing group, six offspring Rosa26 – DTA mice to the blank group, and six offspring Osterix – CreERT2/Rosa26 – DTA mice to the Osterix positive cells died group. Mice in each group, aging one month, were intraperitoneally injected with tamoxifen at 0.1 mg/g according to the body mass, once a day for five consecutive days to induce the expression of diphtheria toxin, followed by Osterix positive cells died. Two weeks after tamoxifen intervention, mice in the tracing group were sacrificed by cervical dislocation. The left femur was excised, and the distribution of Osterix – expressing cells in the femur was observed by immunofluorescence staining. Six months after tamoxifen intervention, mice in the Osterix positive cells died group and the blank group were sacrificed by cervical dislocation. The left femur was excised. Micro – CT was used to observe the bone microstructure of the femur. Alcian blue – hematoxylin staining was used to observe the morphology of the femur. Immunohistochemical staining was used to determine the expression of alkaline phosphatase (ALP) and fatty acid – binding protein 4 (FABP4) in the femur. **Results:** ① Distribution of Osterix – expressing cells in the femur. The red fluorescence of tdTomato protein in Osterix – expressing cells highly coincided with the blue fluorescence of DAPI – stained nuclei, both of which were located in the medullary cavity. The red fluorescence of tdTomato protein in Osterix – expressing cells highly coincided with the green fluorescence of CD73 – stained nuclei of BM – MSCs, both of which were located in the medullary cavity. ② Microstructure of the femur in mice. The cancellous bone density and trabecular thickness of the Osterix positive cells died group were lower than those of the blank group (36.077 ± 3.449 vs 25.240 ± 1.077 g/mm³), $t = 2.831$, $P = 0.031$; 0.070 ± 0.004 vs 0.055 ± 0.003 mm, $t = 2.839$, $P = 0.014$), and the degree of separation of cancellous bone trabeculae was higher than that of the blank group (0.332 ± 0.012 vs 0.381 ± 0.004 mm, $t = -2.159$, $P = 0.009$). There was no significant difference between the two groups in the volume fraction of cancellous bone and the number of cancellous bone trabeculae (6.902 ± 2.216 vs $2.531 \pm 0.399\%$, $t = 1.848$, $P = 0.129$; 0.950 ± 0.266 vs 0.418 ± 0.037 pieces/mm, $t = 1.626$, $P = 0.122$). The cortical bone density, cortical bone volume fraction, and cortical bone trabecular thickness of the Osterix positive cells died group were lower than those of the blank group (40.127 ± 1.718 vs 24.990 ± 3.099 g/mm³), $t = 4.522$, $P = 0.003$; 19.482 ± 0.803 vs $13.444 \pm 1.604\%$, $t = 3.600$, $P = 0.009$; 0.161 ± 0.006 vs 0.117 ± 0.010 mm, $t = 3.818$, $P = 0.007$). There was no significant difference between the two groups in the degree of separation and number of cortical bone trabeculae (0.295 ± 0.001 vs 0.296 ± 0.003 mm, $t = -0.372$, $P = 0.072$; 1.124 ± 0.221 vs 1.146 ± 0.042 pieces/mm, $t = 1.525$, $P = 0.171$). ③ Morphology of the femur in mice. Compared with the blank group, the Osterix positive cells died group showed a large number of lipid droplets and fat vacuoles accumulating at the cartilage – bone junction of the femoral growth plate. The lipid droplet area of the Osterix positive cells died group was larger than that of the blank group (203.514 ± 0.957 vs $241.061 \pm 5.805\%$, $t = -6.381$, $P = 0.003$). ④ ALP and FABP4 expression in the femur of mice. The expression of ALP in the femur of the Osterix positive cells died group was lower than that of the blank group (1.143 ± 0.122 vs $0.550 \pm 0.641\%$, $t = 4.305$, $P = 0.013$), and the expression of FABP4 was higher than that of the blank group (10.419 ± 1.113 vs $15.670 \pm 1.405\%$, $t = -2.930$, $P = 0.043$). **Conclusion:** Osterix – expressing BM – MSCs play a role in maintaining bone homeostasis.

Keywords marrow; bone marrow; mesenchymal stem cells; osteogenesis; Osterix; animal experimentation

成骨细胞特异性转录因子 Osterix 是骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞所必需的转录因子^[1]。Osterix 阳性细胞主要靶标于干骺端和骨干处^[2]。髓为奇恒之腑,是维持人体生命活动的基本物质^[3]。受科技水平的限制,古人未能探明髓的本质。“浙派中

医”骨伤团队开创了“髓系骨病”理论^[4],总结性地提出了“诸骨病萎,皆属于髓”的理念。现代医学研究表明,骨髓间充质干细胞是软骨细胞和成骨细胞共同的前体细胞,骨髓间充质干细胞的功能与髓的功能高度相似,骨髓间充质干细胞及其微环境可滋养骨骼,维

持骨稳态,发挥“髓以养骨”的功效^[5-6]。因此,越来越多的学者认为骨髓间充质干细胞可能是髓的物质基础之一^[7-8]。我们基于“髓系骨病”理论,探索了 Osterix 阳性骨髓间充质干细胞维持骨稳态的作用,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 Osterix - CreERT2 小鼠(Osterix 基因靶标小鼠)和 Rosa26 - DTA 小鼠(白喉毒素 A 片段报告小鼠)购自 Jackson Laboratory, Rosa26 - tdTomato 小鼠(番茄红荧光报告小鼠)为馈赠所得。Osterix - CreERT2 小鼠与 Rosa26 - tdTomato 小鼠交配获得子代 Osterix - CreERT2/Rosa26 - tdTomato 小鼠, Osterix - CreERT2 小鼠与 Rosa26 - DTA 小鼠交配获得子代 Rosa26 - DTA 小鼠和 Osterix - CreERT2/Rosa26 - DTA 小鼠。实验动物合格证号:SYXK(浙)2021-0012。实验方案经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查通过。

1.2 实验试剂 4% 多聚甲醛、14% 乙二胺四乙酸二钠(disodium ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、他莫昔芬、阿尔新蓝 8GX、碘酸钠、硫酸钠、硫酸铝铵、二氨基联苯胺、苏木精(美国 Sigma 公司),胃蛋白酶抗原修复液(北京中杉金桥生物科技有限公司),鼠源碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体(Arigo 生物科技公司),鼠源脂肪酸结合蛋白 4(fatty acid-binding protein, FABP4)抗体、鼠源荧光 CD73 抗体、山羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(英国 Abcam 公司)。

1.3 实验仪器 VIP 5Jr 组织脱水机(日本樱花公司), AP280-2 组织包埋机、HM355S 石蜡切片机(德国 Microm 公司),显微镜和显微拍摄系统(德国蔡司公司), SkyScan1176 Micro-CT(比利时 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及干预 选取 3 只子代 Osterix - CreERT2/Rosa26 - tdTomato 小鼠纳入示踪组, 6 只子代 Rosa26 - DTA 小鼠纳入空白组, 6 只子代 Osterix - CreERT2/Rosa26 - DTA 小鼠纳入 Osterix 阳性细胞剔除组。各组小鼠均于 1 月龄时按 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 体质量腹腔注射他莫昔芬, 每天 1 次, 连续注射 5 d, 以诱导白喉毒素表达, 特异性剔除 Osterix 阳性细胞。

2.2 实验指标观察

2.2.1 Osterix 阳性细胞在小鼠股骨中的分布情况观察 他莫昔芬干预结束后 2 周, 脱颈处死示踪组小

鼠, 切取左侧股骨, 置于 4% 多聚甲醛中固定 3 d, 14% EDTA 脱钙 14 d, 流水冲洗 24 h 后常规冰冻切片, 厚度 $3 \mu\text{m}$ 。切片用胃蛋白酶抗原修复液在 37°C 处理 15 min, 加入鼠源荧光 CD73 抗体(用 PBS 按 1:1000 稀释)在 4°C 孵育过夜, 山羊抗小鼠 IgG 荧光二抗(用 PBS 按 1:200 稀释)中孵育 20 min, DAPI 染色。在光学显微镜下观察 Osterix 阳性细胞分布情况。

2.2.2 小鼠股骨骨微结构观察 他莫昔芬干预结束后 6 个月, 脱颈处死 Osterix 阳性细胞剔除组和空白组小鼠, 切取左侧股骨。将股骨标本用保鲜膜包好, 置于 Micro-CT 载物台上, 以股骨远端生长板为中心选择感兴趣区, 对其中的松质骨和皮质骨进行处理, 经过测量规划和收集后, 利用 NRECON1.6.10 软件将 2D 投影图转化为 3D 容积图, 经 CTAn1.10 软件分析后利用 CTVOX3.0.0 软件构建 3D 图像, 观察小鼠股骨骨微结构, 并测量骨松质和骨皮质的骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量及骨小梁分离度。

2.2.3 小鼠股骨组织形态观察 Micro-CT 检查结束后, 将 Osterix 阳性细胞剔除组和空白组小鼠股骨标本置于 4% 多聚甲醛中固定 3 d, 14% EDTA 脱钙 14 d, 流水冲洗 24 h 后常规石蜡包埋切片, 厚度 $3 \mu\text{m}$ 。从 Osterix 阳性细胞剔除组和空白组各随机选取 3 只小鼠的股骨切片, 进行阿尔新蓝-苏木精染色后, 在光学显微镜下观察股骨组织形态, 并用 Image-Pro Plus 软件测定脂滴面积, 测定结果以脂滴积分光密度与总光密度的比值表示。

2.2.4 小鼠股骨中 ALP 和 FABP4 表达量测定 从 Osterix 阳性细胞剔除组和空白组随机选取 3 只小鼠的股骨切片, 在胃蛋白酶抗原修复液中于 37°C 孵育 30 min, 加入一抗(鼠源 ALP 抗体, 用 PBS 按 1:200 稀释; 鼠源 FABP4 抗体, 用 PBS 按 1:500 稀释), 在 4°C 孵育过夜, 加入山羊抗鼠二抗(用 PBS 按 1:1000 稀释)孵育 20 min, 二氨基联苯胺染色, 苏木精复染。用 Image-Pro Plus 软件测定 ALP 和 FABP4 表达量, 测定结果以阳性染色物积分光密度与总光密度的比值表示。

2.3 数据统计 采用 SPSS25.0 软件进行数据统计分析, 空白组和 Osterix 阳性细胞剔除组骨松质骨密度、骨松质骨小梁厚度、骨松质骨小梁分离度、骨松质骨体积分数、骨松质骨小梁数量、骨皮质骨密度、骨皮质骨体积分数、骨皮质骨小梁厚度、骨皮质骨小梁分离度、骨皮质骨小梁数量、脂滴面积、ALP 表达量、

FABP4 表达量的组间比较均采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 Osterix 阳性细胞在小鼠股骨中的分布情况

Osterix 阳性细胞中 tdTomato 蛋白的红色荧光与 DAPI 染色的细胞核蓝色荧光分布高度重合, 均位于髓腔 [图 1(1)至图 1(3)]; Osterix 阳性细胞中 tdTomato 蛋白的红色荧光与 CD73 染色的骨髓间充质干细胞细胞核绿色荧光分布高度重合, 均位于髓腔 [图 1(4)至图 1(6)]。

3.2 小鼠股骨骨微结构观察结果 实验过程中 Osterix 阳性细胞剔除组 1 只小鼠死亡; 此外, 空白组和 Osterix 阳性细胞剔除组各有 1 只小鼠的数据明显异于其他小鼠, 数据统计时予以剔除。Osterix 阳性细胞剔除组的骨松质骨密度和骨松质骨小梁厚度均低于空白组, 骨松质骨小梁分离度高于空白组; 2 组的骨松质骨体积分数、骨松质骨小梁数量比较, 组间差异均无统计学意义 (图 2、表 1)。Osterix 阳性细胞剔除组的骨皮质骨密度、骨皮质骨体积分数、骨皮质骨小梁厚度均低于空白组; 2 组的骨皮质骨小梁分离度、骨皮质骨小梁数量比较, 组间差异均无统计学意义 (图 2、表 2)。

3.3 小鼠股骨组织形态观察结果 与空白组相比, Osterix 阳性细胞剔除组小鼠股骨生长板软骨 - 骨连

接处有大量脂滴生成, 脂肪空泡堆积 (图 3)。Osterix 阳性细胞剔除组的脂滴面积大于空白组 [(203.514 ± 0.957)% , (241.061 ± 5.805)% , $t = -6.381$, $P = 0.003$]。

3.4 小鼠股骨中 ALP 和 FABP4 表达量测定结果

免疫组织化学染色结果显示, Osterix 阳性细胞剔除组可见少量 ALP 和大量 FABP4, 而空白组 ALP 较多、FABP4 较少 (图 4、图 5)。Osterix 阳性细胞剔除组股骨 ALP 表达量低于空白组, FABP4 表达量高于空白组 (表 3)。

4 讨论

中医学理论认为, 肾藏精, 精生髓, 髓居骨中以养骨, 骨骼赖以生长。《说文解字》言: “髓者, 骨中脂也。” 这都表明髓是骨骼生长、发育和代谢过程中的重要物质基础。骨骼得到髓的濡养, 则生长发育正常, 保持其坚韧之性; 骨骼失去髓的濡养, 就会出现骨骼脆弱、发育不良等疾病^[9]。《素问》中“骨者, 髓之府” “髓者, 骨之充也” 的论述表明, 髓是藏于骨内的精微物质, 在维持骨稳态方面发挥着重要作用。而《素问》中“肾者, 水脏也, 今水不胜火, 则骨枯而髓虚, 故足不任身, 发为骨痿” 的论述则表明, 骨痿的病机是肾虚而髓不能满。因此, “髓萎骨枯” 是骨病的一个重要病机。中医学理论中的髓与现代医学中骨髓间充质干细胞在功能上具有高度相似性。有研究发现, 骨髓间

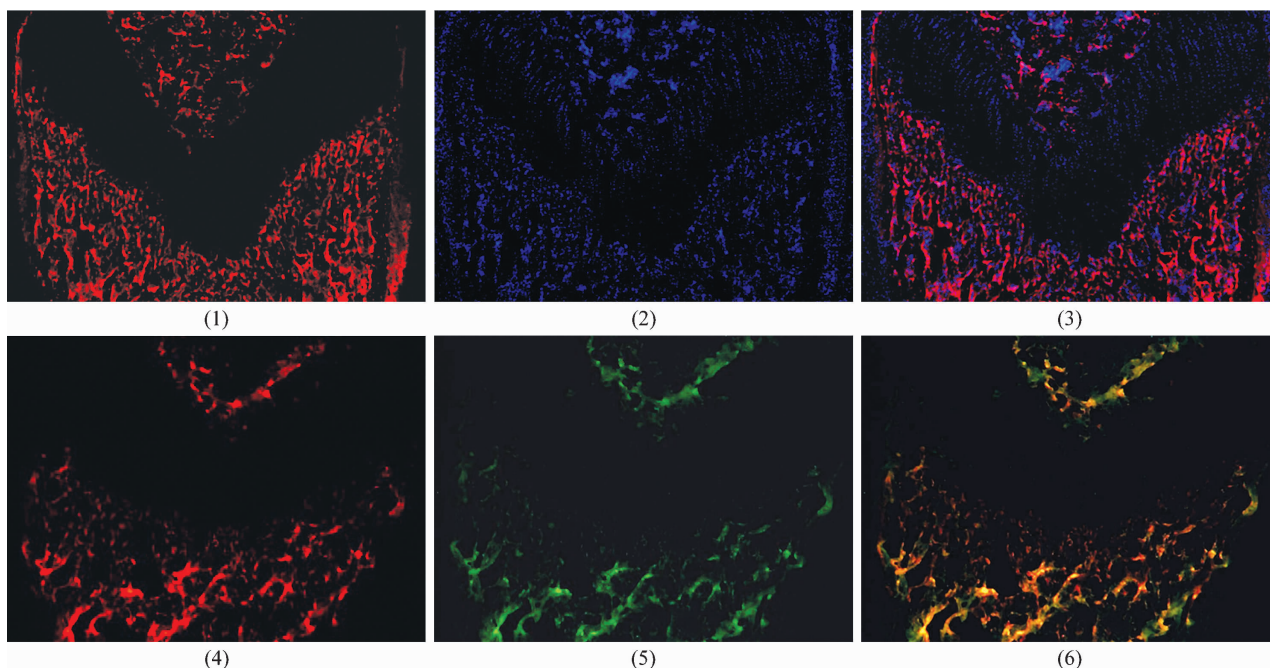


图 1 小鼠股骨组织荧光染色结果 (×5)

注: (1)(4) 中红色荧光部分为 Osterix 阳性细胞中的 tdTomato 蛋白; (2) 中蓝色荧光部分为 DAPI 染色的细胞核; (3) 为 tdTomato 蛋白的红色荧光与 DAPI 染色的细胞核蓝色荧光重合显示结果; (5) 中绿色荧光为 CD73 染色的骨髓间充质干细胞细胞核; (6) 为 tdTomato 蛋白的红色荧光与 CD73 染色的骨髓间充质干细胞细胞核绿色荧光重合显示结果。

充质干细胞拥有分化为成骨细胞的潜力^[10]和参与造血的功能,骨髓间充质干细胞及其微环境还可滋养骨骼,发挥“髓以养骨”的功效,这都与髓的藏精气、充骨化血的功能类似。因此越来越多的研究者认为,骨髓间充质干细胞可能是髓的物质基础之一。

骨髓间充质干细胞存在于成体骨髓中,在一定条件诱导下可分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞。Osterix 是骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞所必需

的转录因子。Ono 等^[2]的研究证实,出生 3 d 的小鼠骨表面大部分成骨细胞和软骨膜中的细胞都呈现出 Osterix - CreER 标记;在随后 1 年中,这些 Osterix 阳性细胞分化为骨干骺端和骨干处的成骨细胞。Zhun 等^[11]的研究显示,Osterix 缺失小鼠可表现出成骨细胞分化和新骨形成停滞的现象。综上所述,骨髓间充质干细胞维持着骨的内环境稳态^[12],这种内环境稳态一旦被打破就会发生类似“髓萎骨枯”的髓系病证。

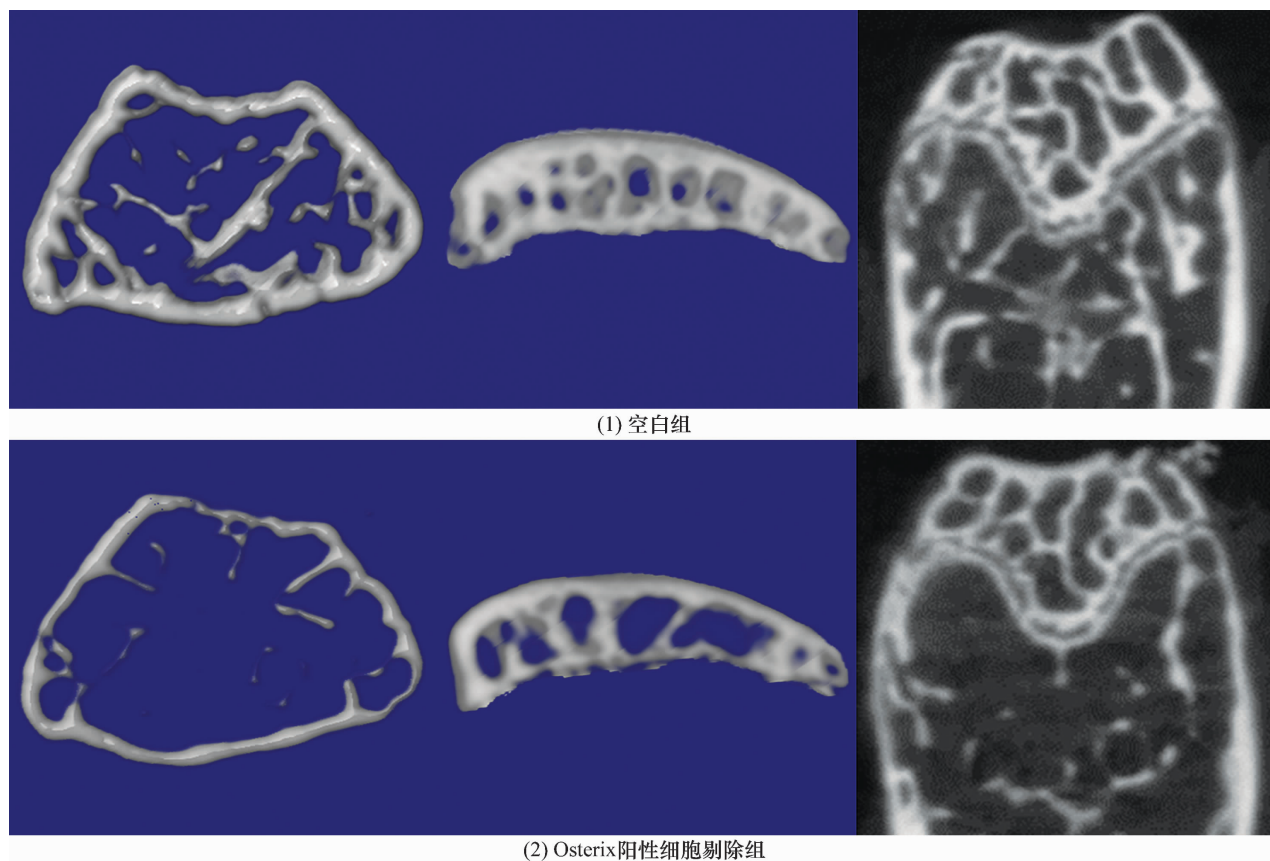


图 2 小鼠股骨 Micro - CT 图像

表 1 小鼠股骨骨松质骨微结构参数

组别	样本量/ 只	骨密度/ ($\bar{x} \pm s, g \cdot mm^{-3}$)	骨体积分数/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s, mm$)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s, mm$)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s, 个 \cdot mm^{-1}$)
空白组	5	36.077 ± 3.449	6.902 ± 2.216	0.070 ± 0.004	0.332 ± 0.012	0.950 ± 0.266
Osterix 阳性 细胞剔除组	4	25.240 ± 1.077	2.531 ± 0.399	0.055 ± 0.003	0.381 ± 0.004	0.418 ± 0.037
t 值		2.831	1.848	2.839	-2.159	1.626
P 值		0.031	0.129	0.014	0.009	0.122

表 2 小鼠股骨骨皮质骨微结构参数

组别	样本量/ 只	骨密度/ ($\bar{x} \pm s, g \cdot mm^{-3}$)	骨体积分数/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s, mm$)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s, mm$)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s, 个 \cdot mm^{-1}$)
空白组	5	40.127 ± 1.718	19.482 ± 0.803	0.161 ± 0.006	0.295 ± 0.001	1.124 ± 0.221
Osterix 阳性 细胞剔除组	4	24.990 ± 3.099	13.444 ± 1.604	0.117 ± 0.010	0.296 ± 0.003	1.146 ± 0.042
t 值		4.522	3.600	3.818	-0.372	1.525
P 值		0.003	0.009	0.007	0.072	0.171

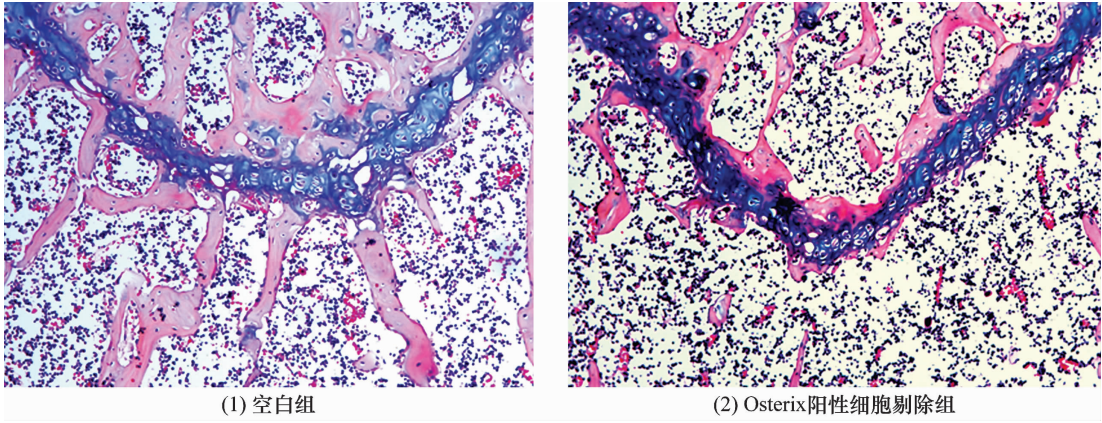


图 3 小鼠股骨组织阿尔新蓝 - 苏木精染色结果 (× 10)

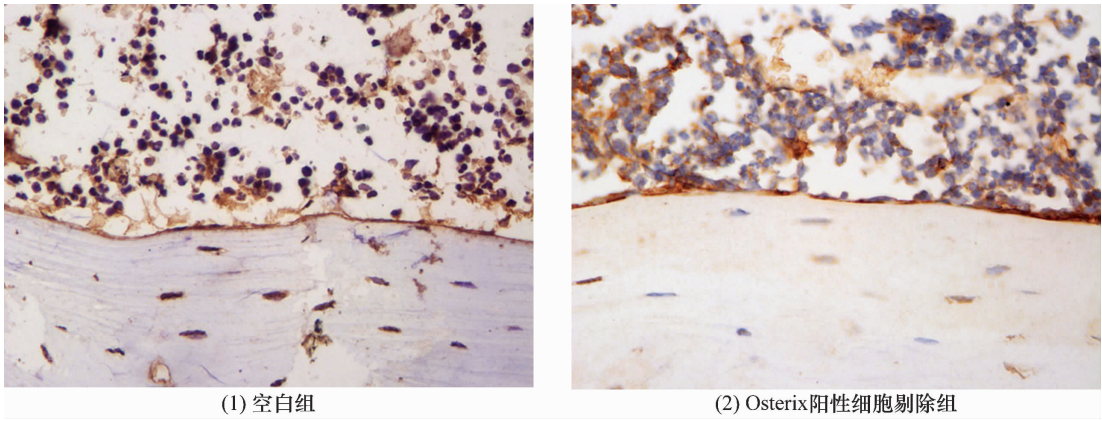


图 4 小鼠股骨组织中碱性磷酸酶免疫组织化学染色结果 (× 20)

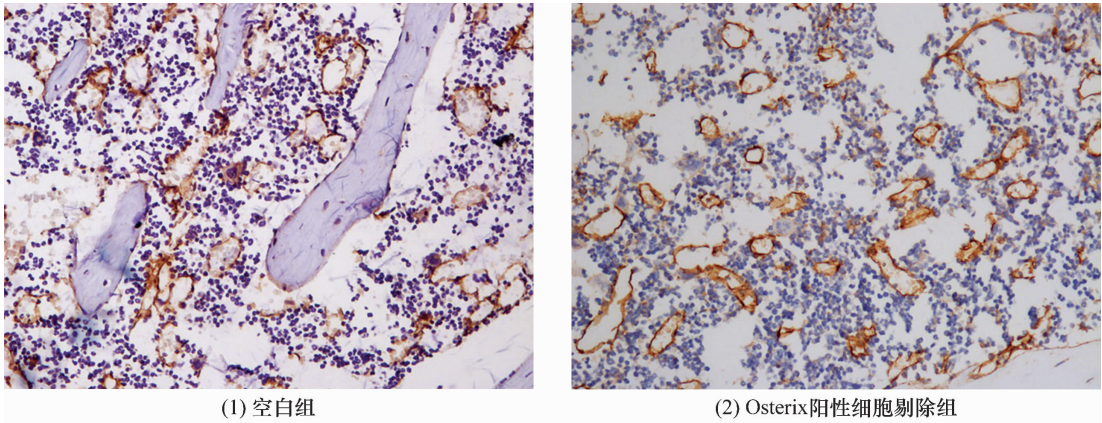


图 5 小鼠股骨组织中脂肪酸结合蛋白 4 免疫组织化学染色结果 (× 20)

表 3 小鼠股骨中碱性磷酸酶和脂肪酸结合蛋白 4 表达量

组别	样本量/只	碱性磷酸酶/($\bar{x} \pm s, \%$)	脂肪酸结合蛋白 4/($\bar{x} \pm s, \%$)
空白组	3	1.143 ± 0.122	10.419 ± 1.113
Osterix 阳性细胞剔除组	3	0.550 ± 0.641	15.670 ± 1.405
<i>t</i> 值		4.305	-2.930
<i>P</i> 值		0.013	0.043

结合现代医学的干细胞理论^[13-14]和中医学理论^[4,9,15],我们认为骨髓间充质干细胞很可能是髓的物质基础之一。在本研究中,注射他莫昔芬可诱导白喉毒素表达,使 Osterix 阳性细胞剔除组子代 Osterix -

CreERT2/Rosa26 - DTA 小鼠的 Osterix 阳性细胞被特异性剔除。免疫荧光染色结果提示,Osterix 阳性细胞为骨髓间充质干细胞,高效靶标于小鼠股骨髓腔内。Micro - CT 和阿尔新蓝 - 苏木精染色结果显示,

Osterix 阳性细胞剔除后小鼠股骨出现骨量减少、骨微结构受损、脂滴形成增多、骨皮质厚度降低等骨质疏松的特征性表现;免疫组织化学染色结果显示, Osterix 阳性细胞剔除组股骨 ALP 表达量减少、FABP4 表达量增多,提示特异性剔除 Osterix 阳性细胞可使小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力减弱、向脂肪细胞分化的能力增强。骨质疏松症属中医学“骨枯”“骨痿”范畴。《素问·痿论》曰:“肾气热则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿。”这说明 Osterix 阳性细胞剔除小鼠的表现与“髓减”十分相近。此外,陈光华等^[16]的研究证实,骨髓间充质干细胞移植可提高骨质疏松大鼠的骨代谢水平。邹振等^[17]的研究显示,基于中医“肾主骨生髓”理论的肾髓同治方可在一定程度上防治小鼠骨质疏松症,其机制主要与调控骨髓间充质干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。这些都表明,骨髓间充质干细胞与髓有着相近的特性。

本研究的结果提示, Osterix 阳性骨髓间充质干细胞发挥着维持骨稳态的作用。

参考文献

- [1] QIN G, LI Y, WANG H, et al. Lysine-specific demethylase 4a regulates osteogenic differentiation via regulating the binding ability of H3K9me3 with the promoters of Runx2, Osterix and osteocalcin [J]. J Biomed Nanotechnol, 2020, 16(6):899-909.
- [2] ONO N, ONO W, NAGASAWA T, et al. A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(12):1157-1167.
- [3] 张紫嫣, 黄雅薇, 张新雪, 等. “肾髓系统”的理论溯源 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(5):744-748.
- [4] 胡雪琴, 金红婷, 施振宇, 等. 髓病理论及其在骨病学中的应用 [J]. 中医正骨, 2018, 30(11):39-42.
- [5] WEI X, HU M, MISHINA Y, et al. Developmental regulation of the growth plate and cranial synchondrosis [J]. J Dent Res, 2016, 95(11):1221-1229.
- [6] DUCHAMP DE LAGENESTE O, JULIEN A, ABOU-KHALIL R, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by periostin [J]. Nat Commun, 2018, 9(1):773.
- [7] 李记泉, 闵冬雨, 贾连群, 等. 基于“心肾髓”理论与骨髓间充质干细胞相关性探索心肌损伤新疗法 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1):90-92.
- [8] 翟怀乐. “补肾生髓法”基于 PI3K/Akt-Jak1/STAT 信号通路促进骨髓间充质干细胞移植治疗肝硬化的机制研究 [D]. 南宁:广西中医药大学, 2020.
- [9] 胡雪琴, 金红婷, 肖鲁伟, 等. “浙派中医”骨伤学家肖鲁伟辨治“髓系骨病”的学术经验 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10):1071-1073.
- [10] LI J, HOU W, YANG Y, et al. Micro/nano-topography promotes osteogenic differentiation of bone marrow stem cells by regulating periostin expression [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2022, 218:112700.
- [11] ZHUN W, DONGHAI L, ZHOUYUAN Y, et al. Efficiency of cell therapy to GC-induced ONFH: BMSCs with Dkk-1 interference is not superior to unmodified BMSCs [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018:1340252.
- [12] SOUZA A, FREITAS G P, LOPES H B, et al. Jabuticaba peel extract modulates adipocyte and osteoblast differentiation of MSCs from healthy and osteoporotic rats [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(2):163-173.
- [13] 刘铨, 杜斌, 孙光权, 等. 右归饮诱导骨髓间充质干细胞修复兔激素型股骨头坏死的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(6):809-814.
- [14] WANG N F, BAI C X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate autophagy in RAW264.7 macrophages via the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/heme oxygenase-1 signaling pathway under oxygen-glucose deprivation/restoration conditions [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(6):699-707.
- [15] 吴丛姿, 金红婷, 童培建. 从髓论治膝关节关节炎 [J]. 中医正骨, 2021, 33(1):52-55.
- [16] 陈光华, 黄贵芝, 林颖, 等. 骨髓间充质干细胞移植对去卵巢骨质疏松大鼠骨密度的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(1):49-53.
- [17] 邹振, 曾庆贺, 夏臣杰, 等. 肾髓同治方防治小鼠去卵巢绝经后骨质疏松症的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10):5849-5853.

(收稿日期:2022-07-14 本文编辑:李晓乐)

反映学术进展, 引领学科发展